



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS, ENSAMBLE Y
MODULACIÓN DE LA UNIÓN ESTRECHA EN
EPITELIOS ESTRATIFICADOS DE
QUERATINOCITOS RCE1 (5T5).

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

MARÍA TERESA ORTIZ MELO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. JOSÉ FEDERICO BERNARDO CASTRO MUÑOZ LEDO

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS (CINVESTAV) DEL IPN

COMITÉ TUTOR:

DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DRA. MARÍA GENOVEVA GONZÁLEZ MORÁN

FACULTAD DE CIENCIAS



MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 5 de marzo de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **ORTÍZ MELO MARÍA TERESA** con número de cuenta 302124958 con la tesis titulada **“Expresión de proteínas, ensamble y modulación de la unión estrecha en epitelios estratificados de queratinocitos RCE1 (5T5)”**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. JOSÉ FEDERICO BERNARDO CASTRO MUÑOZ LEDO**

Presidente: DRA. MARÍA DEL REFUGIO GARCÍA VILLEGAS
Vocal: DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS
Secretario: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
Suplente: DRA. MARÍA GENOVEVA GONZÁLEZ MORÁN
Suplente: DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 4 de junio 2012.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Agradecimientos

Quiero agradecer inicialmente al Posgrado en Ciencias Biológicas, de la UNAM, por su cobijo y apoyo durante la realización del proyecto y para la obtención del grado.

Al CONACyT por la beca otorgada con No. de Registro 239864.

Adicionalmente, este trabajo fue realizado en parte, gracias a los donativos No. 101552 al Dr. Federico Castro Muñoz Ledo y No. 49355-M al Dr. Jesús Valdés.

Agradezco sinceramente al Dr. José Federico Bernardo Castro Muñoz Ledo, quien no sólo es mi tutor principal, si no mi maestro y amigo, gracias por todo el apoyo.

Al Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras, por todos las sugerencias en la realización del proyecto, por todo el apoyo que me ha brindado y por todas las enseñanzas.

A la Dra. María Genoveva González Morán, por sus comentarios para la realización del proyecto y por su apoyo.

Agradecimientos a título personal

Quiero agradecer a todas las personas que estuvieron de una u otra manera involucradas durante mis estudios de maestría, en la elaboración del proyecto y en la obtención del grado.

Gracias a mi familia: Gerardo, Lupe, Gerardo, Sandy, Nelly, gracias por ser mi sostén y mi motivo. ¡¡Los amo!!

Al equipi; Rita, Ariadna, Lila, Lupe, gracias por que a pesar de la distancia y de los caminos diferentes seguimos siendo inseparables.

A Paco, por tantas cosas que aprendimos juntos y por todo el apoyo.

A Llaraí, por todas las veces que me tuve que salir de clase o llegar más tarde, gracias por todo tu apoyo y por siempre animarme a hacer más cosas.

A Nani, por tantas cosas, por todo el apoyo, por la confianza, por siempre decirme lo que necesito escuchar, gracias por tu amistad.

A mis compañeros del posgrado y toda la maravillosa gente que conocí en la maestría y que me enseñaron tantas cosas.

A Columba Guadarrama y Erika Sánchez Guzmán, por la ayuda técnica para la realización de este proyecto y por su amistad.

A mis compañeros de laboratorio por todo el intercambio de ideas.

A todos mis maestros, de la licenciatura, de la maestría y del día a día, gracias a todos, los que están y los que se adelantaron, gracias por compartir un pedazo de su mundo conmigo.

A mis alumnos, por todo lo que me han enseñado, por ser un reto y motivación para ser mejor.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi familia: Gerardo, Lupe, Gerardo, Sandy, Nelly,
porque gracias a ustedes es que es posible alcanzar cada meta.

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS Y CUADROS	vii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS	11
Objetivo general.....	11
Objetivos particulares	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Cultivo de células.....	12
Anticuerpos	13
Microscopía electrónica de transmisión.	14
Medición de Resistencia Eléctrica Transepitelial.	14
Ensayo de flujo paracelular-marcador de biotina	14
Medida del flujo paracelular de inulina en células RCE1	15
Inmunolocalización.....	15
RT-PCR	16
Western Blot	18
Análisis Densitométrico.....	19
RESULTADOS	20
Las células RCE1 forman epitelios con uniones estrechas funcionales.....	20
Las células RCE1 expresan las proteínas de unión estrecha claudina-1, -2, -4, ocludina, ZO-1 y cingulina	27
La unión estrecha de epitelios formados por células RCE1 se puede modular	33
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	50
REFERENCIAS.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura. 1 Complejos de unión celular en vertebrados.	3
Figura. 2 La unión estrecha contribuye a mantener la polaridad celular.	5
Figura. 3 Proteínas transmembranales que forman parte de la unión estrecha. O	7
Figura. 4 Representación de las proteínas de la familia MAGUK; ZO-1, ZO-2 y ZO-3.....	7
Figura. 5 Representación de la estructura de cingulina.....	9
Cuadro 1. Oligonucleótidos empleados para el RT-PCR semicuantitativo en células RCE1.	17
Figura. 6 Micrografía electrónica de transmisión de epitelios formados por células RCE1.	21, 22
Figura. 7 Medida de la Resistencia Transepitelial (TER) en células RCE1 y MDCK.....	23
Figura. 8. Medida de la resistencia transepitelial durante el cultivo de células RCE1.....	24
Cuadro 2. Comparación de Resistencia Transepitelial entre varios epitelios.....	24
Figura. 9 Ensayo de flujo paracelular-marcador de biotina.....	26
Fig. 10 Inmunolocalización de proteínas de unión estrecha en cultivos de células RCE1(5T5).....	28
Fig. 11 Expresión de proteínas de unión estrecha en células RCE1(5T5)..	29
Fig. 12 Cinética de expresión de claudina-1, claudina-2 y claudina-4 durante el crecimiento y diferenciación de las células RCE1(5T5).....	31
Fig. 13 Cinética de expresión de ocludina, ZO-1 y cingulina durante el crecimiento y diferenciación de las células RCE1(5T5).	32
Fig. 14. Efecto del factor de crecimiento epidermal (EGF) sobre la unión estrecha en epitelios formados por células RCE1.....	34
Figura 15. Niveles relativos de los mRNAs que codifican para las proteínas de unión estrecha, en células RCE1(5T5) cultivadas en ausencia o presencia de 10 ng/ml de EGF.	35
Figura 16. Niveles relativos de las proteínas de unión estrecha claudina-1, claudina-4 y cingulina, en células RCE1 cultivadas en ausencia o en presencia de 10 ng/ml de EGF.....	36
Fig. 17. Efecto del ácido retinoico (RA) sobre la distribución de claudina-1 y sobre la resistencia transepitelial de las láminas epiteliales formadas por las células RCE1(5T5).....	38
Fig. 18 Determinación de la hermeticidad de la unión hermética por medición del flujo paracelular de inulina a través del epitelio.....	39
Fig. 19 Efecto del ácido retinoico (RA) sobre la resistencia transepitelial en epitelios formados por células RCE1.....	41
Fig. 20 Niveles relativos de los mRNA que codifican para las claudinas-1, -2, -4, ocludina, ZO-1 y cingulina en epitelios confluentes, estratificados tratados con ácido retinoico	42
Fig. 21 Niveles relativos de proteínas claudina-1, -4 y cingulina en epitelios confluentes, estratificados tratados con ácido retinoico.	43

RESUMEN

La unión estrecha es un dominio membranal especializado que se localiza en la zona apical de células epiteliales y endoteliales polarizadas, constituye una barrera que regula el transporte paracelular de solutos y restringe la difusión lateral de componentes membranales. Esta unión ha sido ampliamente estudiada en epitelios que forman una monocapa, sin embargo, se sabe poco sobre dicha unión en epitelios estratificados. En este trabajo, evaluamos la expresión de componentes de la unión estrecha y el establecimiento de una barrera epitelial funcional, utilizando la línea celular RCE1(5T5) de queratinocitos corneales de conejo, la cual reproduce la expresión secuencial del proceso de diferenciación del epitelio corneal. Con la inmunolocalización de componentes de la unión estrecha, observamos que estas uniones formadas por claudina-1, -2, -4, ocludina, ZO-1 y cingulina, se localizan en las células suprabasales de los epitelios; mediante RT-PCR semicuantitativo y Western Blot evaluamos la cinética de expresión de dichos componentes durante la formación del epitelio, y observamos que éstos son ensamblados para formar una unión estrecha funcional una vez que las células comienzan a estratificar. Esta observación es apoyada por el desarrollo de la resistencia eléctrica transepitelial (TER), la cual se incrementa cuando las células alcanzan la confluencia, con un comportamiento similar al cambio en los niveles de expresión de claudina-2, -4 y cingulina. En contraste, los niveles de claudina-1, ocludina y ZO-1 se mantienen estables a lo largo del crecimiento y diferenciación del epitelio corneal. Adicionalmente, evaluamos los efectos del factor de crecimiento epidermal (EGF) y del ácido retinoico (RA) sobre la unión estrecha, y observamos que el EGF aumenta la TER, sin provocar cambios en los niveles de expresión de las proteínas de unión estrecha. Mientras, el RA provoca la disminución de la TER y un aumento en el flujo paracelular, este efecto es dependiente de la concentración de RA y es reversible. Además el RA provoca la disminución de los niveles relativos de los mRNA que codifican a las proteínas de unión estrecha claudina-2, -4 y cingulina.

ABSTRACT

Tight junction is an specialized membrane domain, located at the apical region of polarized epithelial and endothelial cells. Tight junction constitutes a barrier that regulates paracellular transport of solutes and restricts lateral diffusion of membrane components. This junction has been extensively studied in simple epithelia, however, little is known about such junction in stratified epithelia. In this study, we evaluated the expression of tight junction components and the establishment of a functional epithelial barrier, using the RCE1(5T5) cell line, of rabbit corneal keratinocytes, which reproduces the sequential expression of the corneal epithelial cell differentiation. Immunostaining of claudin-1, -2, 4, occludin, ZO-1 and cingulin, showed that these tight junction components are located at the most suprabasal cells of the epithelium; using semi-quantitative RT-PCR and Western blotting we evaluated the expression kinetics of these components during epithelium formation, and we found that functional tight junctions are assembled once the cells begin to stratify. This observation is supported by the development of transepithelial electrical resistance (TER), which increases when the cells reach confluence, with a behavior similar to that of the change in the expression levels of claudin-2, -4 and cingulin. In contrast, claudin-1, ZO-1 occludin levels remain stable throughout growth and differentiation of corneal epithelium. Additionally, we evaluated the effects of epidermal growth factor (EGF) and retinoic acid (RA) on the tight junction, and we observed that EGF increases TER without causing changes in the expression levels of tight junction proteins. Meanwhile, the RA causes a TER decrease and an increase in paracellular flux, this effect is concentration dependent and reversible. RA addition causes the decrease of mRNA relative levels encoding tight junction proteins claudin-2, -4 and cingulin.

INTRODUCCIÓN

En los organismos multicelulares existen células especializadas, como las epiteliales y endoteliales que forman barreras selectivas entre tejidos y compartimentos corporales. Estas células están polarizadas, es decir, cuentan con un dominio apical representado por la superficie libre de la célula que da hacia el exterior o hacia el lumen del órgano, y de un dominio basolateral, que incluye la superficie basal y lateral de la célula. Estas células están unidas una con la otra, a través de complejos de unión celular (Matter & Balda, 2003) entre los que se encuentran: la unión adherente, la unión estrecha, los desmosomas y las uniones comunicantes, cada una con una localización diferente en la célula. En la figura 1 se muestran diferentes complejos de unión presentes en células de vertebrados.

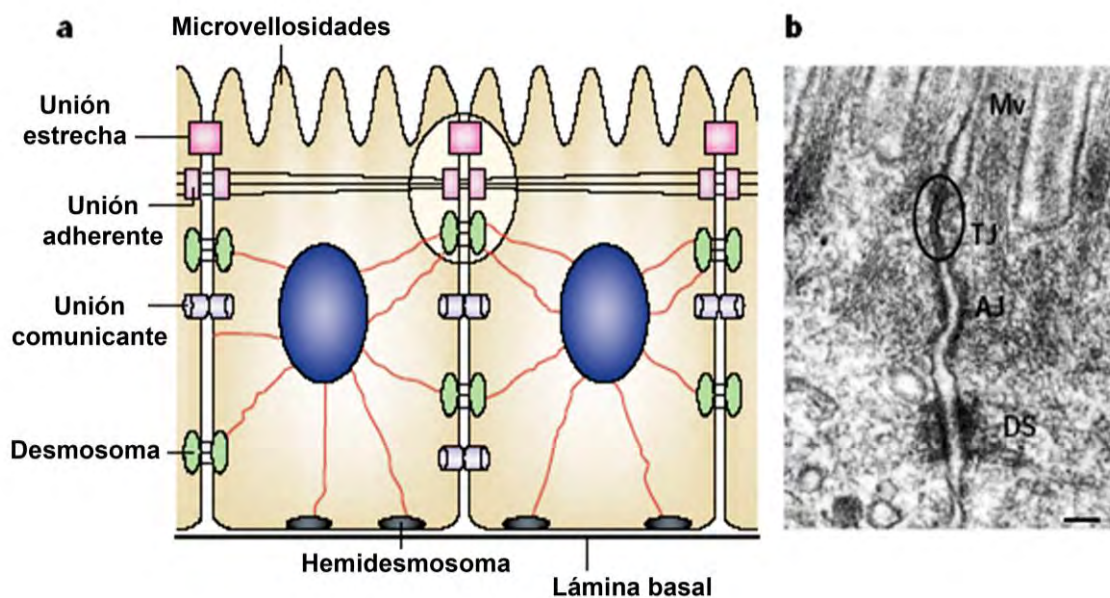


Figura. 1 Complejos de unión celular en vertebrados. a) Esquema de los complejos de unión presentes en células de epitelio intestinal. b) Micrografía electrónica de células epiteliales de intestino de ratón, mostrando los complejos de unión. La unión estrecha está marcada con un círculo. (Mv, microvellosidades, microvilli; TJ, unión estrecha; AJ, unión adherente; DS, desmosoma). Barra 200 nm. Tomado y adaptado de Tsukita, et al., 2001.

La unión estrecha es un dominio membranal especializado que se localiza en la parte más apical de las células epiteliales y endoteliales polarizadas y es un complejo de unión que constituye una barrera primaria que regula el transporte paracelular de solutos y restringe la difusión lateral de lípidos y proteínas membranales, manteniendo así la polaridad celular (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 (ver Figura 2) 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), sin embargo, además de las proteínas que forman las hebras, existen muchas proteínas adicionales que forman parte del complejo de la unión estrecha.

En general, podemos dividir en tres grupos a los componentes que constituyen al complejo multimolecular de la unión estrecha:

1) Proteínas integrales que forman las fibrillas que unen el espacio intercelular y crean la barrera reguladora de permeabilidad paracelular. Entre las que encontramos a JAM (junctional adhesion molecule), ocludina, y a la familia de las claudinas (Furuse *et al.*, 1993; 1998a), cuyas representaciones se muestran en la figura 3.

2) Proteínas asociadas a la membrana, también conocidas como proteínas de la placa de la unión estrecha, que sirven como enlace entre las proteínas integrales de las fibrillas y el citoesqueleto de actina o moléculas citoplásmicas implicadas en procesos de señalización. Como ejemplos de éstas, tenemos a ZO-1 (Stevenson, *et al.*, 1986), ZO-2, ZO-3 (Fig. 4), cingulina (Fig. 5), simplekina, afadina, entre otras.

3) De manera adicional, en la unión estrecha se localizan diversas proteínas citoplásmicas y nucleares (incluyendo proteínas reguladoras, supresores de tumores, y factores de transcripción), 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).

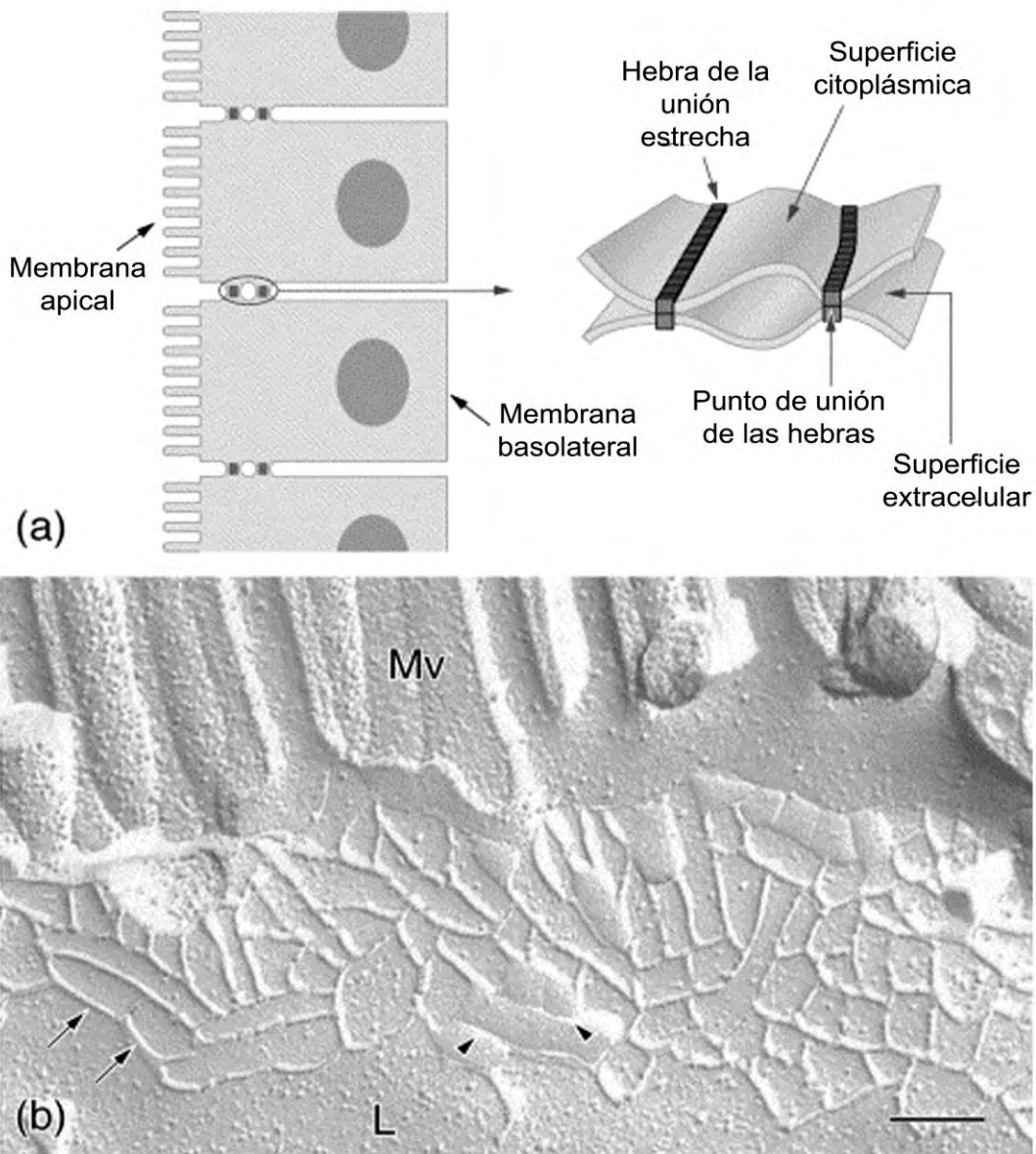


Figura. 2 La unión estrecha contribuye a mantener la polaridad celular. a) Esquema de la unión estrecha. Esta unión separa los dominios apical y basolateral de la membrana celular. La estructura principal de la unión estrecha es una hebra proteica que se une lateralmente en los puntos de unión o “kissing points” con una hebra similar, localizada en la membrana de la célula adyacente, eliminando el espacio extracelular. b) Micrografía electrónica de criofractura de enterocitos de ratón, donde se observan las hebras de la unión estrecha (flechas). Mv, microvellosidades, L, Membrana lateral. Barra 0.2 μm . Tomado y adaptado de Tsukita & Furuse, 1999.

De entre las proteínas integrales que forman las hebras de la unión estrecha destacan la ocludina y las claudinas (fig. 3) por ser los componentes mayoritarios. La ocludina es una proteína de peso molecular de alrededor de 65 kDa; fue la primera proteína integral descrita en las uniones estrechas (Furuse *et al.*, 1993). Posee cuatro dominios intermembranales, un dominio carboxilo-terminal largo y un dominio amino-terminal corto, ambos citoplásmicos (Tsukita, *et al.*, 2001) y forma dos asas extracelulares, como se puede observar en la figura 3. Se conocen dos isoformas de ocludina generadas por procesado (splicing) alternativo del hnRNA correspondiente (Muresan, *et al.*, 2000); se cree que su función podría ser más reguladora que estructural, pues se considera que contribuyen a la estabilización de la unión y la función de barrera (Cummins, P. 2012), siendo reguladas por modificaciones postraduccionales como la fosforilación de los residuos de Ser y Thr (Sakakibara *et al.* 1997) presentes en el extremo carboxilo terminal.

De manera posterior a la descripción de la ocludina, se identificó la segunda proteína integral de la unión estrecha, la claudina (Furuse *et al.*, 1998), que pertenece a una familia proteínica cuyos genes codifican 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 transmembranales, con extremos amino y carboxilo relativamente cortos, expuestos hacia el citoplasma (Fig. 3). 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, se concluyó que las claudinas son proteínas fundamentales para formar estas estructuras, puesto que 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). Adicionalmente, y una vez que se identificaron otras proteínas pertenecientes a la familia de las claudinas (Morita *et al.*, 1999), se realizaron experimentos de sobreexpresión de claudinas en células MDCK que llevaron a concluir que el tipo de claudina presente determina la hermeticidad o fuerza de la unión (Furuse *et al.*, 2001).

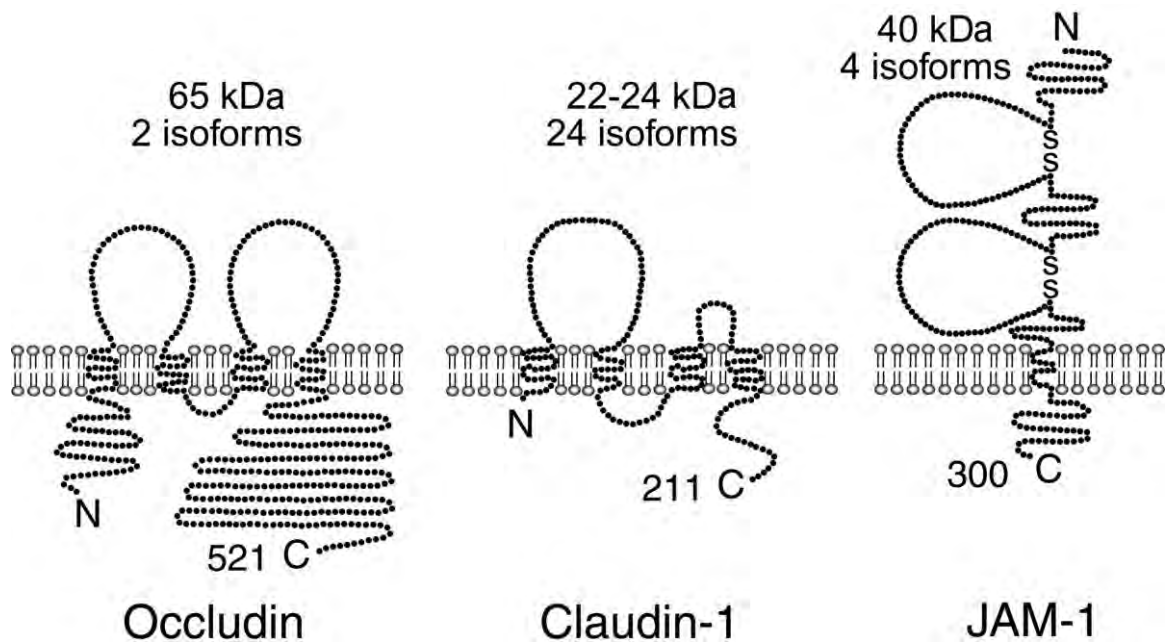


Figura. 3 Proteínas transmembranales que forman parte de la unión estrecha. ocludina con 521 residuos y un peso de 65 kDa, presenta 2 isoformas; claudinas, que poseen alrededor de 211 residuos y un peso de entre 22 y 24 kDa, se trata de una familia proteica con 24 miembros y JAM (junctional adhesional molecule), existen 4 isoformas con alrededor de 300 residuos y un peso de 40 kDa. Tomado de Schneeberger, E. & Lynch, R., 2004.

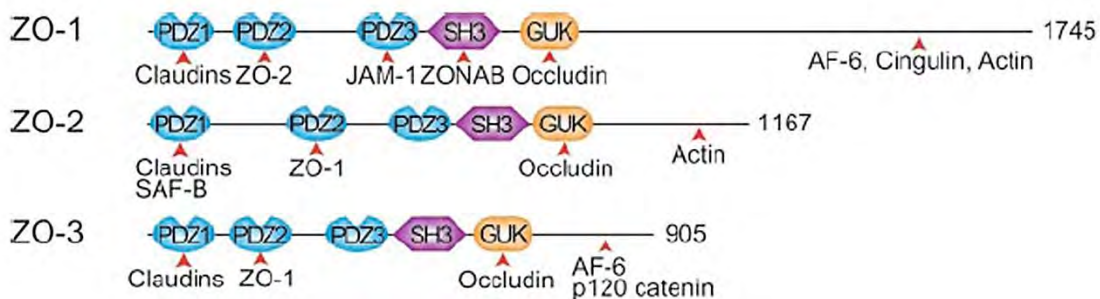


Figura. 4 Representación de las proteínas de la familia MAGUK; ZO-1, ZO-2 y ZO-3. Se muestran los dominios representativos de estas proteínas (PDZ en azul, SH3 en morado y GUK en naranja) y se indican las proteínas que interactúan (flecha roja) con los diferentes sitios de las proteínas Zonula occludens. Tomado de Schneeberger, E. & Lynch, R., 2004.

De manera adicional, entre las proteínas de la unión estrecha, se encuentran varias proteínas que poseen el dominio PDZ, el cual es un dominio estructural que consta de 80–100 aminoácidos, y participa en interacciones proteína–proteína. También se le conoce como dominio GLGF (glicina-leucina-glicina-fenilalanina) (Ponting, *et al.*, 1997). Entre las proteínas membranales con dominio PDZ, están las pertenecientes a la familia MAGUK (Fig. 4), grupo que se distingue por sus dominios de unión a otras proteínas. En la unión estrecha, las proteínas de esta familia son ZO-1 (zonula occludens-1), ZO-2 y ZO-3; identificadas de manera previa a las proteínas integrales de la unión estrecha (Stevenson, *et al.*, 1986). Cada una de ellas posee tres dominios PDZ en la porción amino terminal mientras que en el extremo carboxilo terminal poseen dominios que permiten la interacción con F-actina (González-Mariscal, *et al.*, 2000). A través de sus diferentes dominios interaccionan con otras proteínas de la unión estrecha (Fig. 4), aunque no es claro si estas interacciones pueden ser de importancia para su función biológica (McNeil, *et al.*, 2006). ZO-1 contiene tres dominios PDZ, capaces de interactuar con claudinas, con ZO-2 y con JAM (Itoh *et al.*, 1999; Ebneth *et al.*, 2000). Su dominio SH3 se une a una proteína cinasa, y al factor de transcripción ZONAB (Balda *et al.*, 1996; Balda and Matter, 2000). El dominio GUK se une a la ocludina (Furuse *et al.*, 1994; Fanning *et al.*, 1998); y el extremo C-terminal puede interactuar con actina, AF-6 y cingulina (Fanning *et al.*, 1998; Cordenonsi *et al.*, 1999).

Otra proteína presente en la placa de la unión estrecha y que no posee dominios PDZ, es la cingulina, constituida por dos subunidades de 140 kDa cada una. Cada subunidad está formada por una región globular denominada cabeza, una hélice (tallo) y una pequeña región globular (cola) (Fig. 5). Estas dos subunidades forman un homodímero capaz de interactuar con actina, miosina y varias proteínas con dominios PDZ, como ZO-1 (Citi, *et al.*, 2009), cuya interacción con cingulina podría ser crucial para el ensamblaje de la unión estrecha (D'Atri, *et al.*, 2002).

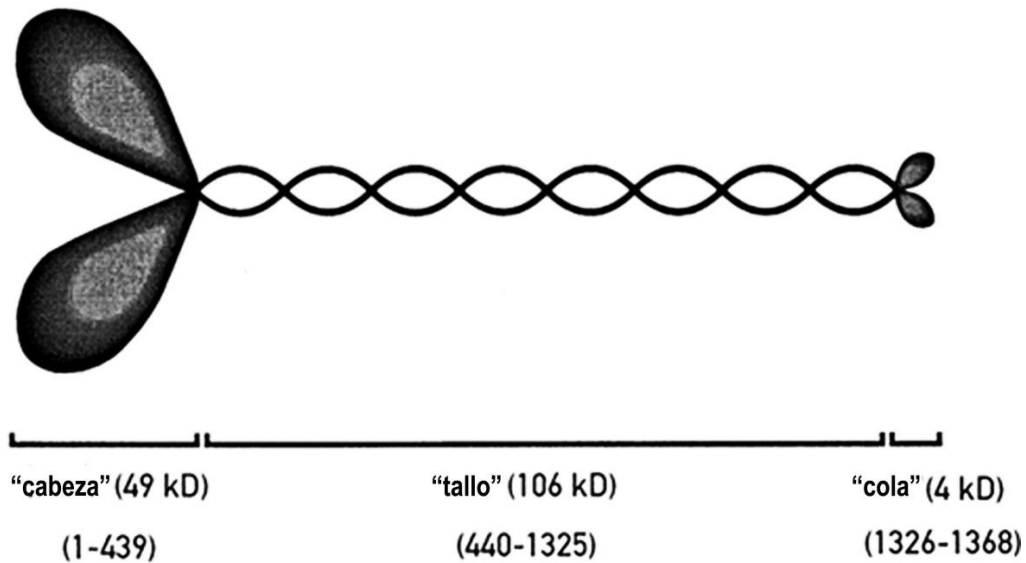


Figura. 5 Representación de la estructura de cingulina. Se muestran sus tres regiones; cabeza, tallo y cola. Formada por 1368 residuos. Tomado y adaptado de Cordenosi, M., et al., 1999.

Al igual que en otros epitelios, el establecimiento del epitelio corneal va acompañado por la formación de uniones estrechas. En el mamífero, las proteínas de unión estrecha del epitelio corneal se han analizado tanto *in situ* como *in vitro*. En 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 y una resistencia transepitelial de $100 \Omega\text{cm}^2$, de manera similar a cultivos primarios de epitelio corneal de humano donde se reportó una resistencia transepitelial de $120 \Omega\text{cm}^2$ (Yi et al., 2000) y la expresión de las claudinas -1, -2, -3, -4, -7, -9, 10 y -14 (Ban et al., 2003b); *in situ*, no se expresa la claudina-10 (Ban et al., 2003a).

Previamente, hemos descrito la formación de uniones estrechas funcionales en los estratos suprabasales de epitelios formados por la línea celular de epitelio corneal de conejo RCE1(5T5). Algunos componentes de la unión estrecha en este tipo celular son las claudinas -1, -2, -4, la ocludina y la proteína ZO-1 como lo sugieren experimentos de inmunotinción y de expresión de los RNA mensajeros correspondientes (Ortiz-Melo, 2009).

En este trabajo, utilizamos a la línea celular RCE1(5T5) de queratinocitos corneales de conejo (Castro-Muñozledo, 1994, 2008; Tamariz *et al.*, 2007) como modelo experimental. 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* la expresión secuencial del proceso de diferenciación (Castro-Muñozledo, 1994; Chen *et al.*, 1997; Tamariz *et al.*, 2007), observada en cultivos primarios de queratinocitos corneales (Schermer *et al.*, 1989). Estas características la convierten en un excelente modelo para analizar los procesos de estructuración y diferenciación terminal del epitelio corneal de mamífero. Demostramos que las células RCE1 forman uniones estrechas funcionales, formadas por claudina-1, -2, -4, ocludina, cingulina y ZO-1, y que se establecen cuando las células forman un epitelio diferenciado.

OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer el patrón de expresión de los mensajeros y de las proteínas presentes en la unión estrecha durante el desarrollo y formación del epitelio corneal, empleando como modelo experimental a la línea celular establecida RCE1(5T5), 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) Evaluar el patrón de expresión de los mensajeros de las proteínas de unión estrecha durante el desarrollo y formación del epitelio corneal.
- 2) Evaluar niveles de las proteínas respectivas, y correlacionarlos con los niveles de los RNAm que las codifican.
- 3) Inmunolocalizar las proteínas de unión estrecha durante la formación del epitelio.
- 4) Evaluar el efecto de factores que puedan modular el ensamblado y/o la hermeticidad de la unión estrecha en epitelios formados por las células RCE1(5T5).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de células.

Se utilizaron cultivos de células RCE1(5T5) (Castro-Muñozledo, 1994) sembradas a una densidad de 2.7×10^3 células/cm², en presencia de células alimentadoras (feeders) 3T3 tratadas letalmente con Mitomicina C, a una densidad de 2.2×10^4 células/cm² (Rheinwald, 1980). Todos los cultivos provienen de un banco desarrollado en el laboratorio. El medio de cultivo utilizado fue la mezcla DMEM-F12-Ham (3:1) suplementada 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 atmósfera húmeda de 10% CO₂ – 90% aire. El medio de cultivo fue cambiado diariamente. Para los tratamientos sin EGF y con Ácido Retinoico (RA), las células RCE1(5T5) se cultivaron hasta alcanzar la confluencia en medio conteniendo EGF. Un día después de la confluencia (7° de cultivo), las células se cambiaron a las tratamientos indicados:

Control: Las células se mantuvieron en las mismas condiciones que al inicio del experimento.

Sin EGF: Medio 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.

RA 0.1, 1 y 10 μM : Medio 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) + $1 \times 10^{-7}\text{M}$, $1 \times 10^{-6}\text{M}$ o $1 \times 10^{-5}\text{M}$ de Ácido Retinoico (*all-trans*-Retinoic acid, Sigma-Aldrich, USA).

En todos los casos, el medio de cultivo se cambió diariamente con medio fresco.

Anticuerpos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos; un anticuerpo policlonal de conejo contra un péptido sintético correspondiente a la región C-terminal de la claudina-1 de humano/ratón (Cat. 71-7800; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), un anticuerpo monoclonal de ratón, hecho contra un péptido sintético que corresponde una secuencia de 22 aminoácidos de la región C-terminal de la claudina-4 humana (Cat. 32-9400, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), un anticuerpo policlonal de conejo contra la región C-terminal de cingulina de pollo (Cat. 36-4401, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Actina (amablemente donado por el Dr. José Manuel Hernández del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.), un anticuerpo monoclonal hecho contra una proteína de fusión con 150 aminoácidos del extremo C-terminal de la ocludina humana, conjugado con Fluoresceína (Zymed, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y un anticuerpo monoclonal de ratón, hecho contra una proteína de fusión que contiene los aminoácidos 334-634 de la proteína ZO-1 de humano, conjugado con Fluoresceína (Zymed, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Se utilizaron también; un anticuerpo anti IgG de conejo marcado con biotina (Biotin-XX goat anti-rabbit IgG, Cat. B2770, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), un anticuerpo anti IgG de ratón marcado con biotina, (Biotin-XX goat anti-mouse IgG, Cat. B2763, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y un anticuerpo anti IgG de conejo marcado con Alexa Fluor 488, , (Cat. A11008, Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Además se empleó estreptavidina-FITC (Vector Laboratorios, Burlingame, CA, USA), estreptavidina-Texas Red (Vector Laboratorios, Burlingame, CA, USA), estreptavidina-HRP (Vector Laboratories, Burlingame), Rodamina-faloidina (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR), Vectashield, medio de montaje para fluorescencia con y sin yoduro de propidio (PI) (Vector Laboratorios, Burlingame, CA, USA).

Microscopía electrónica de transmisión.

Se utilizaron cultivos de células RCE1(5T5) de 8 y 10 días, En éstos, se realizó la búsqueda de uniones estrechas mediante microscopía electrónica de transmisión. Las células se fijaron por 1 hora con glutaraldehído 2.5% (v/v) en cacodilato de sodio 0.1M; se postfijaron en tetróxido de osmio 1% (w/v) con o sin Rojo de Rutenio (0.2 mg/ml) y se embebieron 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.

Las células RCE1(5T5) se sembraron en insertos de cultivo con una membrana de poliéster de 6.5 mm de diámetro (0.33cm^2 de superficie) y con $0.4\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro (Transwell, Costar, Corning, USA), y colocados sobre multiplatos de 24 pozos. Para el experimento de resistencia transepitelial en presencia de ácido retinoico (Fig. 12), se utilizaron insertos de cultivo con una membrana de policarbonato de 6.5 mm de diámetro (0.33cm^2 de superficie) y con $8.0\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro (Costar, MA, USA), y colocados sobre multiplatos de 24 pozos. La resistencia eléctrica transepitelial (TER) se midió, mediante un voltímetro epitelial EVOM (World Precision Instruments, FL, USA). Las medidas se registraron por duplicado en cada uno de los insertos. Los valores de TER se calcularon tomando en cuenta el área de cultivo y sustrayendo la contribución de la membrana con fibroblastos 3T3 confluentes empleados como testigo negativo e incapaces de formar uniones estrechas.

Ensayo de flujo paracelular-marcador de biotina

Se utilizaron células RCE1(5T5) sembradas en cajas de 35 mm con cubreobjetos. Al llegar al día 7 o 14 en cultivo, se lavaron las células tres veces con PBS 1X con MgCl_2 1 mM y CaCl_2 1 mM, y se agregó 1mg/ml de EZ-Link Sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce, USA) disuelto en PBS 1X con MgCl_2 1 mM y CaCl_2 1 mM. Se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron tres veces con PBS 1X (con MgCl_2 1 mM y CaCl_2 1 mM) + Glicina 100 mM. Los cultivos se fijaron con metanol absoluto frío, por 5 min a -20°C , se lavaron con PBS 1X. Posteriormente, se procedió al bloqueo por 1 h a temperatura ambiente con BSA 5% y se incubó con el anticuerpo anti-claudina-1 a una dilución 1:50 por dos horas o con

rodamina-faloidina para hacer visible el citoesqueleto de actina y observar los contornos celulares. La inmunotinción de claudina-1 se hizo evidente por incubación con el anticuerpo secundario dirigido contra IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 488, por 1 h a temperatura ambiente, se lavó y después se incubó con Texas Red Streptavidin o con FITC Streptavidin, para reconocer los sitios de biotilación. Todas las muestras se montaron en Vectashield, medio de montaje protector de fluorescencia (Vector Laboratorios, Burlingame, CA, USA).

Medida del flujo paracelular de inulina en células RCE1

Las células RCE1(5T5) fueron sembradas 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), y colocados sobre multiplatos de 24 pozos. Una vez que las células estratificaron (10 días en cultivo), se añadió medio conteniendo 500 µg/ml de inulina-FITC (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en el medio apical. El flujo de inulina se midió 24 horas después de adicionar la inulina al medio, para ello se tomaron alícuotas de 100 µl de medio de la parte basal y apical. Se utilizó un volumen igual de medio como control. La fluorescencia se midió utilizando un lector de microplacas Synergy HT Multi-Mode (BioTek Instruments, New Jersey, USA). Las medidas se registraron por duplicado y el flujo unidireccional de inulina al compartimento basal se calculó como el porcentaje de inulina administrado en el compartimento apical por cm² de epitelio. Se emplearon fibroblastos 3T3 confluentes como control.

Inmunolocalización

Las células se cultivaron sobre cubreobjetos de vidrio de 18 x 18 mm, hasta los 12 días (7 días post-confluencia) 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 específico 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 correspondiente por 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron 6

veces con PBS 1X. Finalmente se montaron en Vectashield, medio de montaje para fluorescencia con o sin yoduro de propidio (PI). Las laminillas se examinaron en un microscopio confocal, con sistema multifotón de alta velocidad Leica, modelo TCS SP2 (Leica Microsystems, GmbH, Wetzlar, GER).

RT-PCR

Aislamiento de RNA total.

Se realizaron extracciones de RNA total a diferentes tiempos en cultivo (3 a 12 días en cultivo) de células RCE1 cultivadas en cajas de 60 mm de diámetro. Los cultivos se lavaron dos veces con PBS 1X y se lisaron directamente con Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por 5 min. Se añadió cloroformo, incubando por 3 min. a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000 x *g* por 15 min a 4°C. Se precipitaron los ácidos nucleicos con isopropanol centrifugando a 12000 *xg* durante 10 min a 4°C y se lavó la pastilla formada, con etanol al 75% (v/v), se centrifugó a 7500 x *g* por 5 min. 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) de los 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); de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se incubó a 42° C por 50 min e inactivó la reacción a 70°C por 15 min. Para evitar la hibridación entre el RNA total y el DNA complementario se agregó 1 µl de RNasa H (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se incubó a 37°C durante 20 min para eliminar el RNA.

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

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 AGA TGA GCT CCT ATG GTT ATA AAA GTC TGT GAC AAT CT	AJ011497	364 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	NM_009386	435 bp
Ocludina	GAG GAC TGG GTC AGG GAA TA TCA GCA GCA GCC ATG TAC TC	NM_008756	197 bp
Cingulina	GAC AGT TCT GCA GTC CAC CA TAG CTG GTC CTT CTG GTC GT	NM_001037711	107 bp
^PRP0	GCA GGT GTT TGA CAA TGG CAG C GCC TTG ACC TTT TCA GCA AGT GG	XM_535894	231 bp

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para el RT-PCR semicuantitativo se utilizaron primers para PRP0, (un gen ribosomal, cuyos niveles se mantienen constantes durante el crecimiento y la diferenciación de las células (García-Villegas *et al.*, 2009), por lo que se utilizó como control interno. Se usaron también los primers para claudina-2, -4 y -7 descritos por Yi, *et al.* (2000) y para ZO-1 descritos por Go, *et al.* (2006), además de otros primers para claudina-1, claudina-3, ZO-1, ocludina y cingulina diseñados en base a las secuencias mencionadas en el cuadro 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.

Western Blot

Extracción de proteínas totales

Se realizaron extracciones de proteínas totales a diferentes tiempos en cultivo (3 a 12 días en cultivo) de células RCE1(5T5). Las células se lavaron dos veces con PBS y posteriormente fueron lisadas en buffer RIPA (Tritón X-100 1% (v/v), deoxicolato de sodio 1% (w/v), SDS 0.1% (w/v), NaCl 158 mM, EDTA 5 mM, Tris 10 mM, pH 7.2.) en presencia de inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche, Mannheim, GER). El lisado celular obtenido se sonicó por 30 seg y se centrifugó en frío para recolectar el sobrenadante, el cual se dividió en alícuotas. Las proteínas se cuantificaron por el método de Lowry y col. (1951), utilizando albúmina bovina como referencia.

SDS-PAGE y Western Blot

Se realizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 7.5 y 20%, aplicando 20 µg de proteína por carril. Al terminar la corrida se realizó la electrotransferencia de los geles a membranas de nitrocelulosa (Millipore, Massachusetts, U.S.A.), que se sometieron a una tinción reversible con Rojo de Ponceau-S 0.5% (w/v) en ácido acético al 1%(v/v), para confirmar que la transferencia fuera exitosa. Después de lavarlas con agua se realizó el bloqueo con leche descremada al 5% en PBS por 1.5 horas y se incubaron con el anticuerpo primario; anti-claudina-1, o anti-claudina-4, dilución 1:200; anti-cingulina, o anti-actina a una dilución 1:500, por 2 horas; se lavaron con Tween 0.05%(v/v) en PBS (PBS-Tween) y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 hora, se lavaron nuevamente con PBS-Tween, se incubaron con estreptavidina-HRP por 30 min, se lavaron con PBS-Tween y finalmente se realizó la detección con una solución de 3,3,-diaminobencidina tetrahidroclorada (0.4 mg/mL) disuelta en PBS, conteniendo 0.08% de peróxido de hidrógeno.

Análisis Densitométrico.

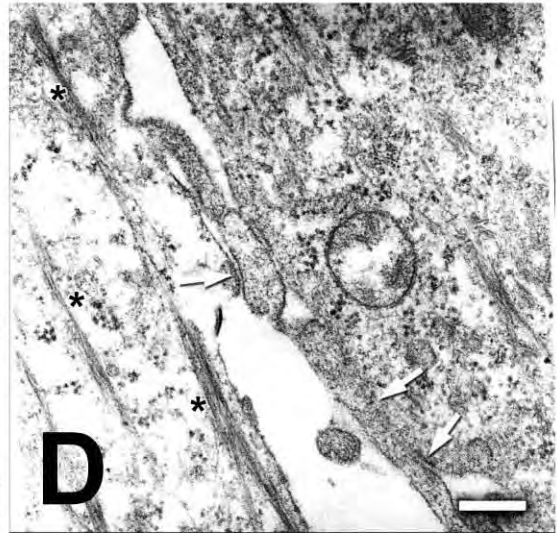
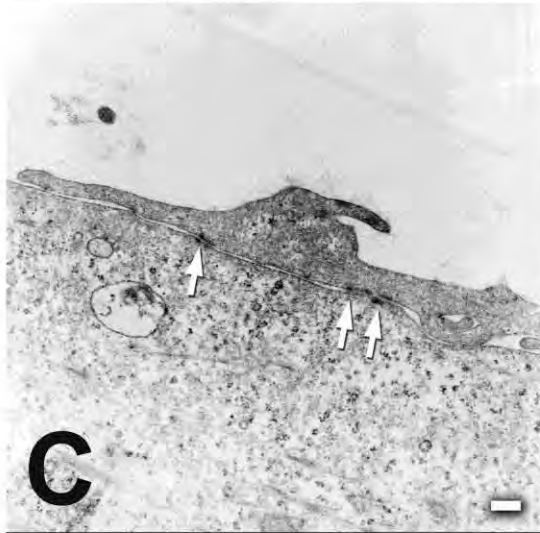
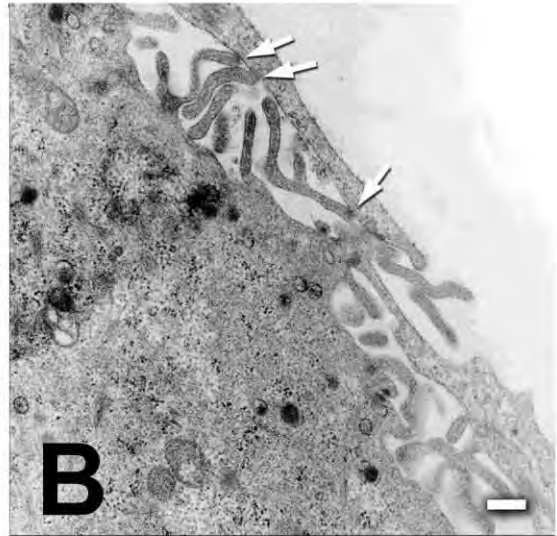
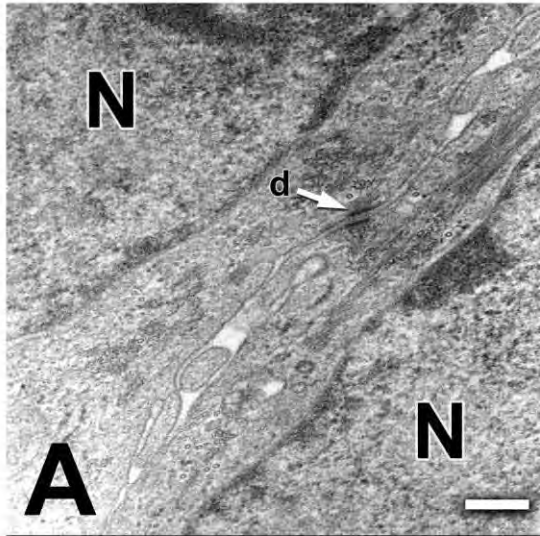
Para los experimentos de Western blot, las membranas de nitrocelulosa fueron fotodocumentadas y las bandas se cuantificaron por análisis densitométrico con el software Quantity One Versión 4.5.0 (BIO-RAD Hercules, CA, USA). La cantidad relativa fue normalizada con respecto a los niveles de actina. De manera similar, en los experimentos de PCR, los amplicones fueron cuantificados por análisis densitométrico de los geles teñidos con Bromuro de etidio. En todos los casos, la cantidad de producto de PCR fue normalizada con respecto a los niveles de PRPO.

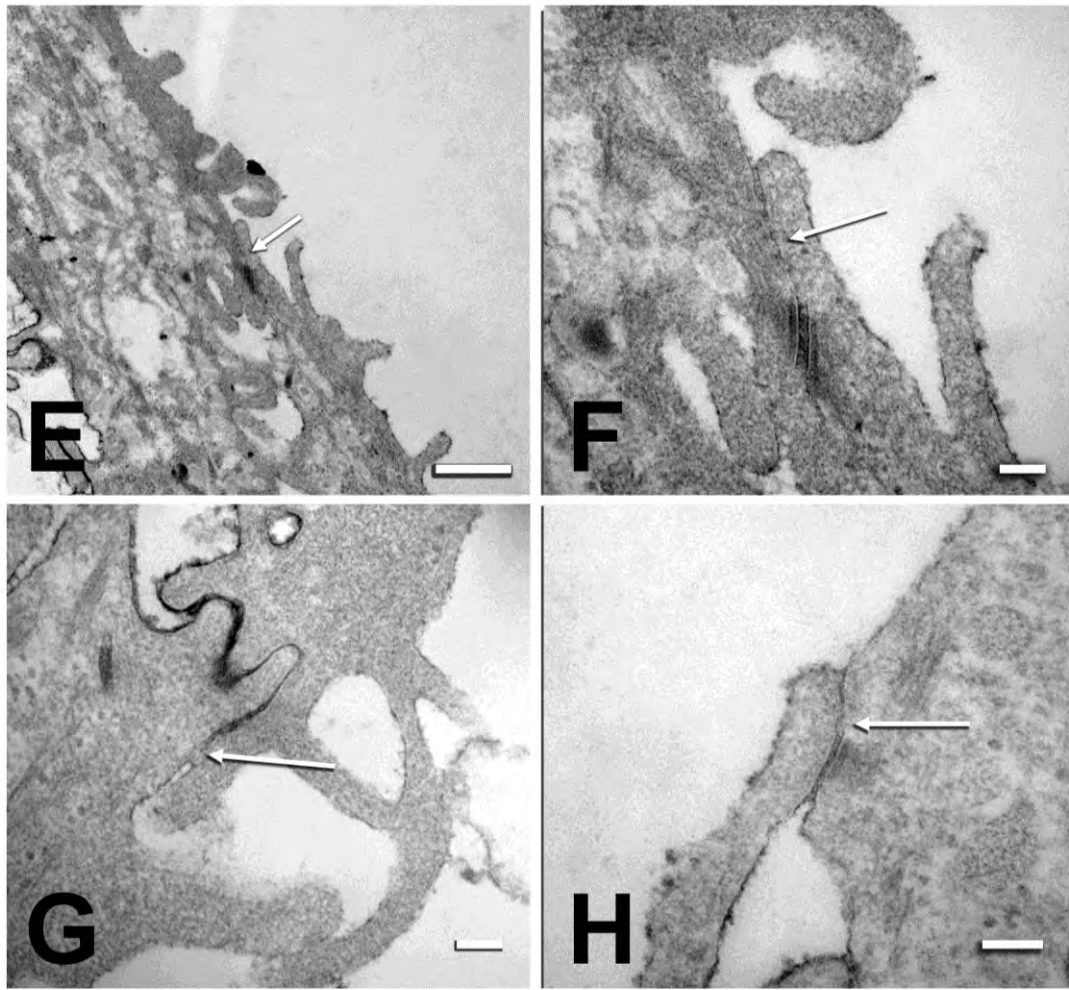
RESULTADOS

Las células RCE1 forman epitelios con uniones estrechas funcionales

Evidenciamos por microscopía electrónica de transmisión la presencia de uniones estrechas en epitelios formados por células RCE1(5T5) (Fig. 6). Para esto utilizamos cultivos de 8 días (Fig. 6; A-D) y cultivos de 10 días (Fig. 6; E-H), estos últimos fueron postfijados en tetróxido de osmio con Rojo de Rutenio (0.2 mg/ml) para corroborar que las estructuras observadas se trataran de uniones estrechas, ya que si éstas no están presentes, este compuesto puede atravesar el epitelio por la vía paracelular. Observamos que las células RCE1(5T5) formaron epitelios con 3-4 capas de células, con una capa basal de morfología cuboidal y capas suprabasales de morfología más alargada y aplanada. En estos epitelios formados por células RCE1 de 8 y 10 días en cultivo, encontramos uniones estrechas (Fig. 6, flechas) en las capas más suprabasales.

Por otra parte, para determinar si estas uniones estrechas eran funcionales medimos la resistencia eléctrica transepitelial en epitelios formados por células RCE1(5T5); como testigo positivo utilizamos epitelios formados por células MDCK, caracterizadas por sus altos valores de resistencia transepitelial (Barker & Simmons, 1981) Los resultados confirmaron que las células RCE1(5T5) poseen uniones estrechas funcionales, aun cuando no forman un epitelio tan hermético como el constituido por las células MDCK (Fig. 7), que presentan una TER que se considera alta (Cuadro 2). Los epitelios formados por células RCE1 presentan una TER considerada como moderada, comparada con valores de TER de otros epitelios (Cuadro 2).





(A-D) Barra = 300 nm; (E) Barra = 500 nm
 (F-H) Barra = 100 nm

Figura. 6 Micrografía electrónica de transmisión de epitelios formados por células RCE1.
 A-D) Las uniones estrechas (flechas) se encuentran sólo en la capa más apical. A) Núcleos de las dos células adyacentes (N) y un desmosoma entre las dos células (d). D) Se pueden distinguir gránulos y filamentos de queratina (*). E-H) Las células fueron postfijadas en tetróxido de osmio 1% con Rojo de Rutenio (0.2 mg/ml). Se observan uniones estrechas (flechas), por donde no puede atravesar el rojo de rutenio.

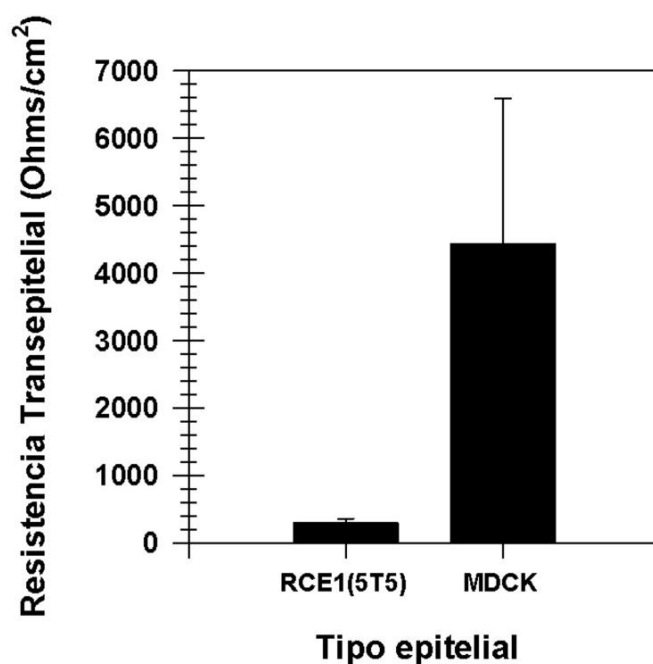


Figura. 7 Medida de la Resistencia Transepitelial (TER) en células RCE1 y MDCK. Se confirmó que los epitelios formados por células RCE1 poseen uniones estrechas funcionales.

Posteriormente, con el propósito de conocer la cinética de estructuración de las uniones estrechas durante la diferenciación del epitelio corneal, medimos la resistencia transepitelial a partir del quinto día en cultivo y hasta alcanzar los 17 días en cultivo (no se muestra). En estos experimentos, las células RCE1(5T5) alcanzaron la confluencia el día 6 en cultivo; la resistencia transepitelial se mantuvo en niveles basales en los primeros días del experimento y hasta el día 6 en cultivo (Fig. 8). Sin embargo, una vez constituido el epitelio, la resistencia transepitelial inició un incremento paulatino (día 7 en cultivo), hasta estabilizarse 6 días después (13 días en cultivo). De esta manera, la resistencia transepitelial del epitelio formado por células RCE1(5T5), va de $46 \pm 17 \Omega/\text{cm}^2$ a los 5 días en cultivo hasta alcanzar $198 \pm 40 \Omega/\text{cm}^2$ a los 13 días en cultivo (Fig. 8), valores que son comparables a los reportados para epitelio corneal en humano (Cuadro 2).

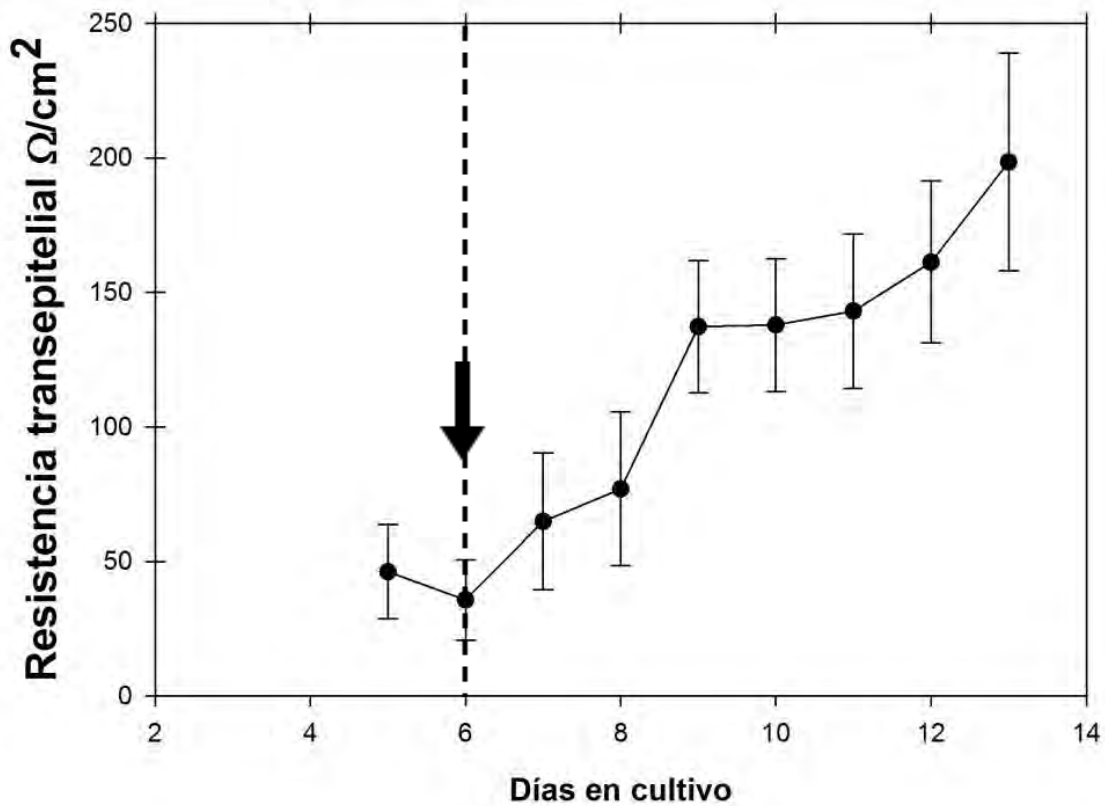


Figura 8. Medida de la resistencia transepitelial durante el cultivo de células RCE1. La resistencia transepitelial aumentó conforme pasaban los días en cultivo, a partir de que las células alcanzaron confluencia (flecha).

Tipo celular	Proveniente de	TER (Ω/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	200		Moderada
Calu-3	Epitelio bronquial humano transformado	500 - 2000	Go et al. 2006	Moderada - Alta
MDCK	Riñón de perro	4000 - 6000	Anderson, 2001	Alta

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

Para examinar con mayor detalle la funcionalidad de las uniones estrechas formadas por las células RCE1(5T5), realizamos un ensayo de seguimiento del flujo paracelular de un compuesto de bajo peso molecular, utilizado para conjugar biotina a las proteínas de la superficie celular. Para esto, se añadió sobre el compartimento apical de epitelios formados por células RCE1(5T5) de 7 y 14 días en cultivo, el compuesto sulfo-NHS-LC-biotin. Posteriormente, se examinó la localización de las proteínas conjugadas a biotina mediante estreptavidina fluoresceinada o marcada con Texas Red. El rastro de la biotilación se siguió por microscopía confocal (Fig. 9). Esto nos permitió comprobar que los epitelios formados por células RCE1 poseen uniones estrechas que son funcionales, ya que no permiten el paso paracelular del compuesto como se puede observar en la Figura 9, en donde se observan cortes ópticos transversales del cultivo, en verde se observa claudina-1 y en rojo se observa el paso del compuesto (Figura 9 B, C, D, J, K y L), el cuál sólo se observa en la superficie del epitelio y no atravesando la vía paracelular. A los 7 días en cultivo (Fig. 9, A-D), claudina-1 se encuentra localizada en los bordes de la célula, y también de manera difusa en el citoplasma de las células (Fig. 9 A), y no hay paso del compuesto (rojo) por la vía paracelular. A los 14 días en cultivo (Fig. 9; E-L) tampoco se observa paso paracelular del marcador y claudina-1 se encuentra localizada más específicamente en los bordes de las células suprabasales más externas (Fig. 9 I). En la figura 9, E-H se muestra la vista superior (Fig. 9E) y cortes ópticos transversales (Fig. 9, F-H) de un epitelio formado por células RCE1 a 14 días en cultivo, en verde el marcador de biotina, reconocido con estreptavidina-FITC y en rojo el citoesqueleto de actina teñido con rodamina-faloidina, para mostrar los límites de las células.

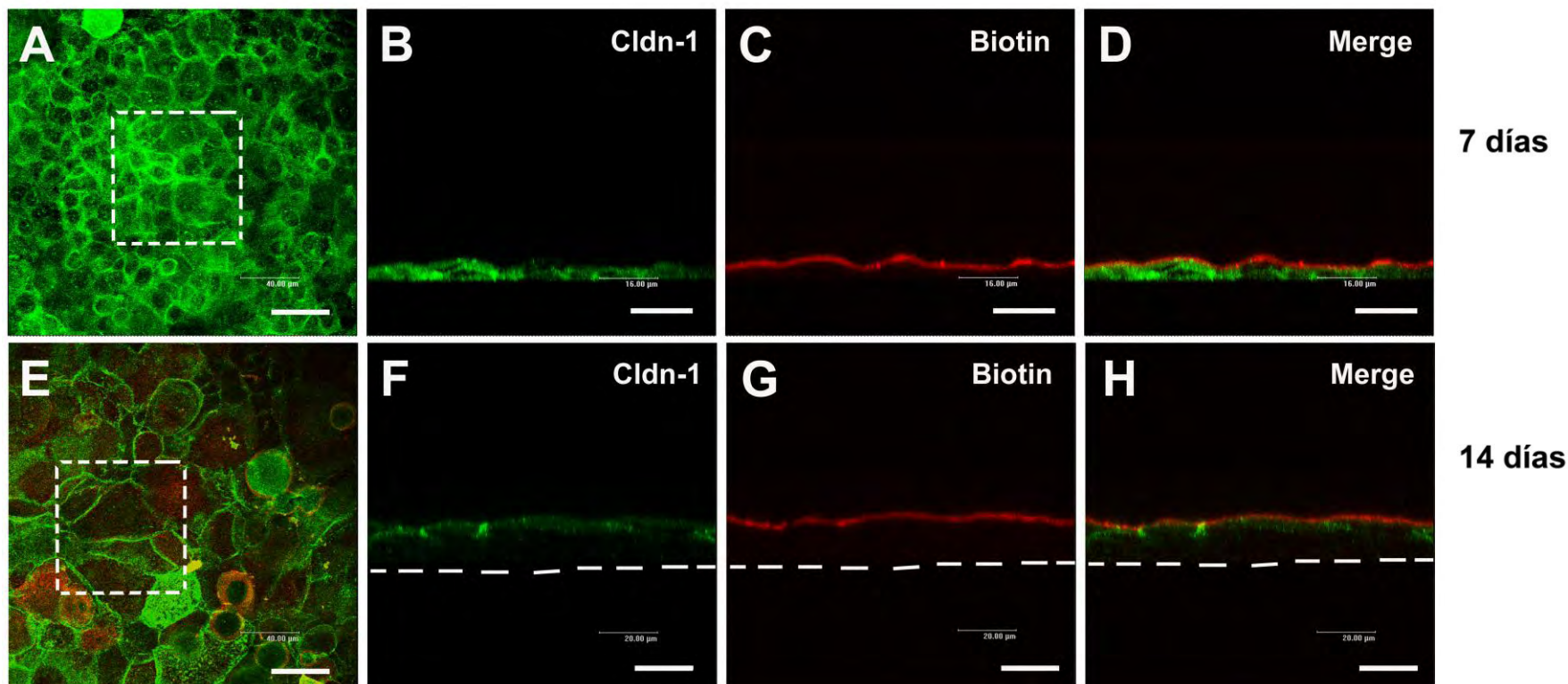


Figura. 9 Ensayo de flujo paracelular-marcador de biotina. (A, E, I) Vista superior del cultivo. El cuadro punteado marca la zona donde se realizó el acercamiento. Barra = 40 μ m, (B-D) Corte transversal del epitelio a los 7 días en cultivo. Claudina-1 (verde) se observa hacia los bordes de la célula y en citoplasma. Biotina (rojo) en la superficie celular, sin poder penetrar la vía paracelular. E-H) Corte transversal del epitelio a los 14 días en cultivo. Claudina-1 (verde) se observa hacia los bordes de la célula. Biotina (rojo) marcando las proteínas de superficie, la biotina no pudo penetrar la vía paracelular. (B-D, F-H) Barra = 16 μ m. D, H) Canales sobrelapados, se observa que la biotina no atraviesa por la vía paracelular. Barra = 20 μ m.

Las células RCE1 expresan las proteínas de unión estrecha claudina-1, -2, -4, ocludina, ZO-1 y cingulina

Examinamos experimentos de inmunotinción de algunas de las proteínas que constituyen a la unión estrecha en epitelios formados por las células RCE1(5T5) después de 9 días en cultivo, para determinar si estas proteínas se encontraban en los epitelios y conocer su localización. Así observamos que la claudina-1 (cldn-1), la ocludina (ocln) y ZO-1 (zonula occludens-1) y α -catenina, proteína que forma parte de la unión adherente, se encuentran en las caras laterales de la región apical de las células, donde se localizan las uniones estrechas (Fig. 10). Como se observa en la figura 10A, α -catenina se observó en las uniones célula-célula. De igual manera, ocludina se localiza en los bordes de las células suprabasales, donde forma una banda continua que delimita el borde celular (Fig. 10 B, C, F y G); y claudina-1 se observa formando una línea continua en los bordes de células suprabasales (Fig. 10 E). Por otra parte, ZO-1 se observa tanto en los bordes celulares, como en el citoplasma en células RCE1(5T5) (Fig. 10 D).

También, examinamos si los epitelios formados por las células RCE1(5T5) expresan los mensajeros que codifican a diferentes claudinas (cldn-1,-2,-3,-4,-7) previamente reportadas en el epitelio corneal de humano y de rata (Yi *et al.*, 2000; Ban *et al.*, 2003b). Para ello, cultivos de células RCE1(5T5) se mantuvieron hasta el día 12 de cultivo y se extrajo el RNA total para determinar la presencia de los mensajeros correspondientes, mediante PCR de punto final. Los resultados nos muestran que las células expresan a las claudinas -1, -2 y -4 (Fig. 11 A). Asimismo, determinamos la expresión de los mensajeros que codifican para otras proteínas críticas en la formación de la unión estrecha: ocludina, ZO-1 y cingulina (cgn) (Fig. 11 B y C). En conjunto, los resultados nos permiten concluir que los epitelios formados por las células RCE1(5T5) expresan las proteínas necesarias para ensamblar la unión estrecha y constituir barreras epiteliales. En particular, estos resultados fueron apoyados fuertemente por evidencia obtenida de experimentos de inmunotransferencia que demuestran que los epitelios contienen a la claudina-1, -4 y a la cingulina (Fig. 11D).

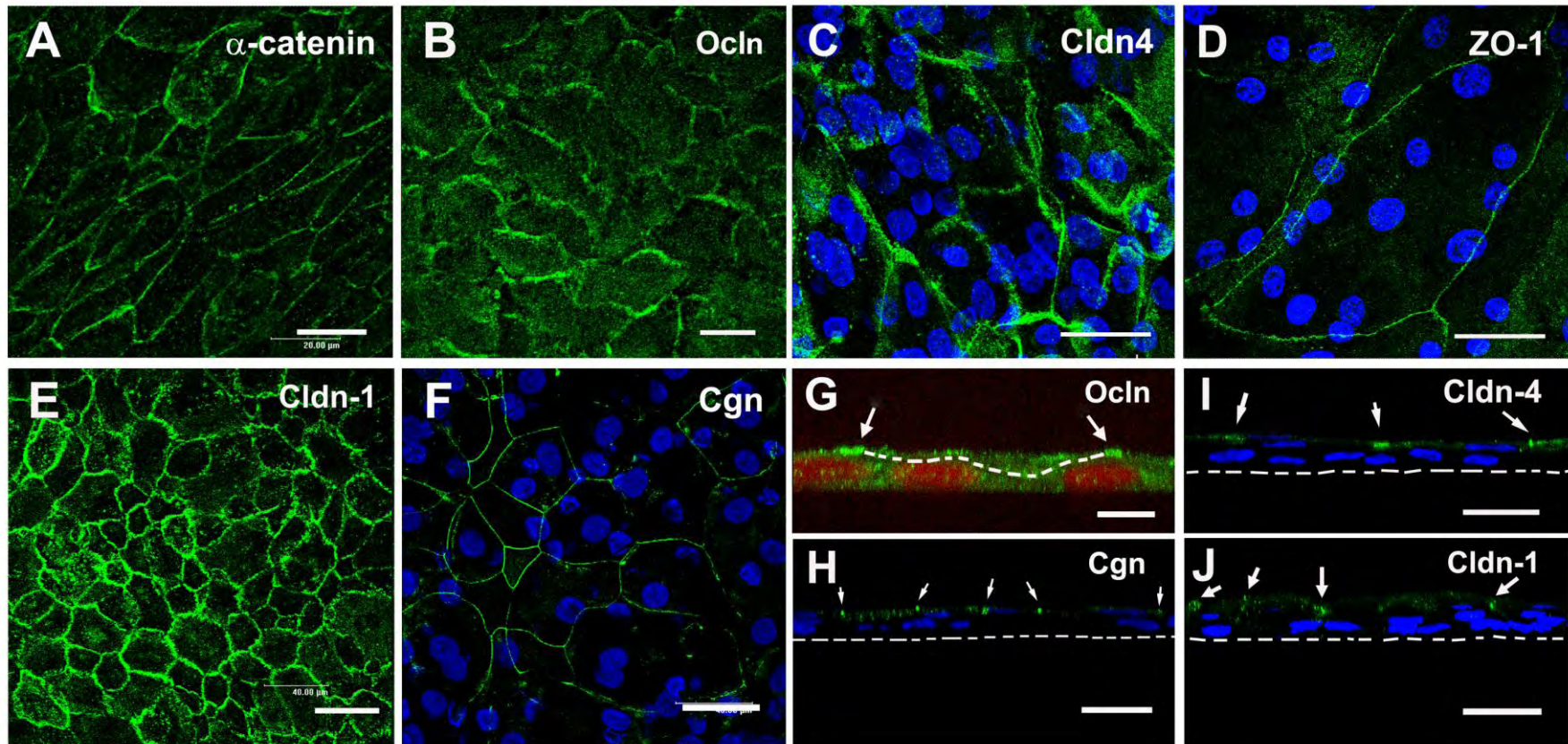


Fig. 10 Inmunolocalización de proteínas de unión estrecha en cultivos de células RCE1(5T5).

A) α -catenina, presente en uniones adherentes. B) Occludina, se localiza en los bordes de la célula y en citoplasma, células RCE1 de 7 días en cultivo. C) Cldn-4, D) ZO-1, se localizan en los bordes de las células RCE1 de 14 días en cultivo. E) Claudina-1, se localiza en los bordes de las células y citoplasma, cultivos de células de 14 días. F) Cgn, se encuentra localizada en los bordes de las células RCE1 de 14 días en cultivo. G-J) Corteóptico transversal del epitelio, se observan las proteínas de unión estrecha ocln (G), cldn-4 (I), cgn (H) y cldn-1 (J) en los sitios de unión (flechas). Núcleos contrastados en rojo (G) o en azul (C,D,F,H,I,J). Barra: (A-D) 20 μ m, (E-F) 40 μ m, (G) 8 μ m, (H-J) 25 μ m.

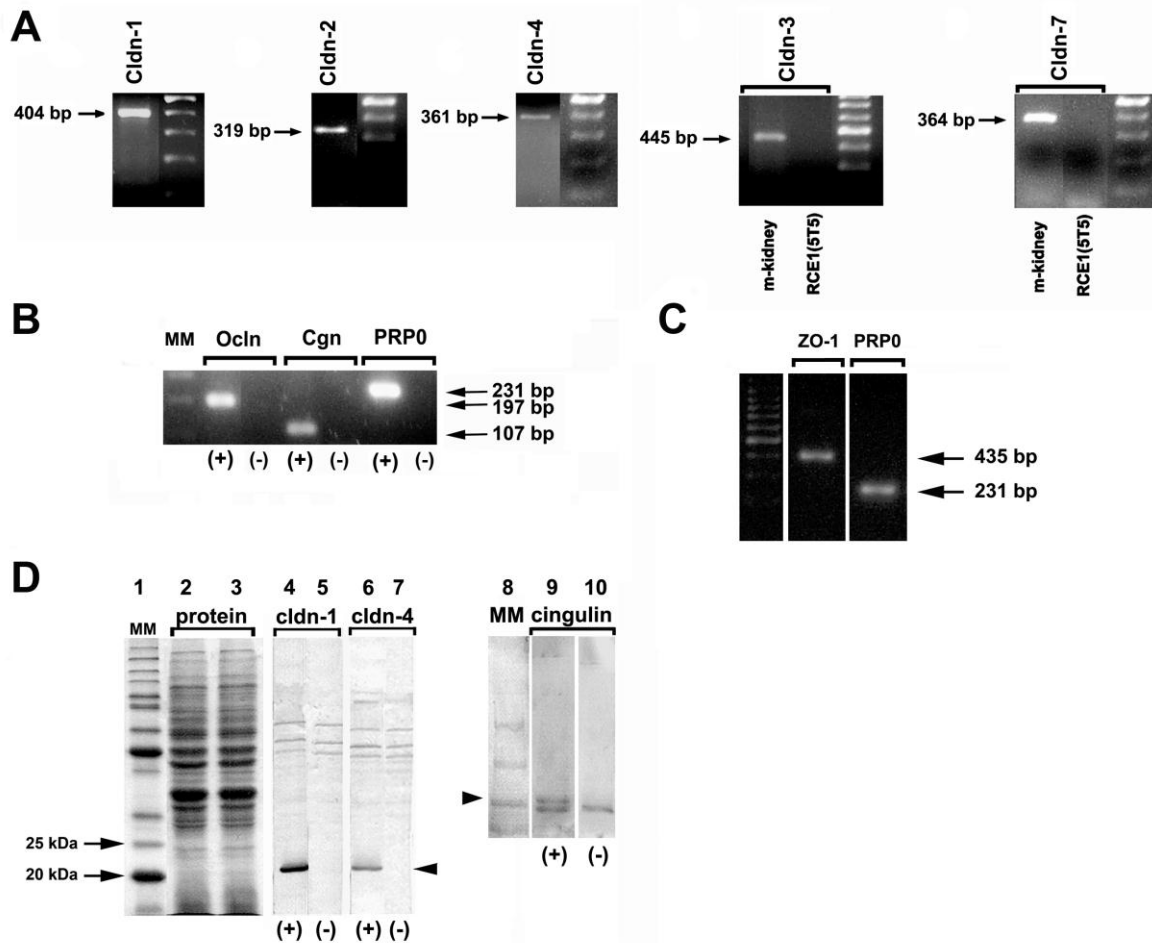


Fig. 11 Expresión de proteínas de unión estrecha en células RCE1. **A)** Análisis de la expresión de claudinas mediante RT-PCR de punto final. Se obtuvo el RNA total de cultivos de células RCE1(5T5) 12 días después de la siembra. Se muestra claudina-1, amplicón de 404 pb; claudina-2, amplicón de 319 pb; claudina-4, amplicón de 361 pb. Debe notarse que no se detectaron los amplificadores correspondientes a claudina-3, de 445 pb y a claudina-7, de 364 pb, por lo que se utilizaron como control positivo extractos de RNA total de riñón de ratón (m-kidney). En B) ocludina, (amplicón de 197 pb), cingulina (amplicón de 107 pb), cultivos de células RCE1(5T5) a los 12 días en cultivo, cuando las células han formado un epitelio estratificado con 4 a 5 capas de células. En C) se presenta el amplicón de ZO-1 (435 pb), a los mismos tiempos de cultivo. Tanto en B como en C, se muestra PRP0 que se utilizó como marcador interno y corresponde a una molécula cuya expresión no cambia durante el crecimiento y la diferenciación del epitelio corneal. (MM) Marcador de peso molecular de 100-1000 bp. D) Análisis del extracto total de proteínas de células RCE1(5T5) de 12 días en cultivo, por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 7.5% y 12.5%. Carril MM corresponde a los marcadores de peso molecular de 10-160 kDa; el carril 2 y 3 presentan la tinción con azul de Coomassie; Carril 8: marcadores de peso molecular (MM) de 10-220 kDa. Los carriles 4, 6 y 9 presentan la inmunodetección de cldn-1, cldn-4 y cingulina por western blot. Los carriles 5, 7 y 10 presentan la ausencia de tinción cuando no se incubó con el anticuerpo primario (control negativo).

Una vez demostrado que las células RCE1(5T5) expresan componentes de la unión estrecha, procedimos a establecer por RT-PCR semicuantitativo la cinética de expresión de los mensajeros que codifican para claudina-1, claudina-2, claudina-4, ocludina, ZO-1, y cingulina, durante la fase de crecimiento y durante la diferenciación de las células RCE1(5T5). Las figuras 12 y 13 ilustran los patrones de expresión de los componentes de la unión estrecha; de manera adicional, se determinaron los niveles de las proteínas correspondientes en experimentos de western blot. Cabe señalar que los anticuerpos anti-claudina-2, anti-occludina y anti-ZO-1, no fueron adecuados para los ensayos de inmunodetección por lo que no se presentan resultados sobre el cambio en los niveles de estas proteínas a lo largo del tiempo en cultivo.

Como se puede apreciar en las figuras 12 y 13, los niveles de mRNA que codifican a claudina-1 (Fig. 12A), ocludina (Fig. 13A) y ZO-1 (Fig. 13B), así como los niveles de la proteína claudina-1 (fig. 12B) se mantuvieron estables desde los primeros días en cultivo hasta que se formó el epitelio. En contraste, los niveles del mRNA que codifica a claudina-2 se mantuvieron constantes entre el día 3 y 6 en cultivo, para posteriormente aumentar a partir del día 7 en cultivo, una vez que el epitelio está confluyente, y alcanzar un pico máximo el día 8, y después disminuir ligeramente y mantenerse constantes del día 9 al 12 en cultivo. Por otra parte, los niveles de mRNA y proteína de cldn-4 (Fig. 12C y D) aumentaron paulatinamente desde el día 3 hasta el día 7; a partir de este día, el mRNA de claudina-4 se mantiene constante (Fig. 12C), mientras que los niveles de proteína continúan aumentando hasta llegar a niveles máximos el día 10 en cultivo, cuando han aumentado cerca de 2 veces con respecto a los valores que se encuentran en los cultivos en el período comprendido entre el día 3 y 6 en cultivo (Fig. 12D).

De manera importante, los niveles de mRNA de cingulina (Fig. 13C) aumentaron paulatinamente del día 3 a 6 en cultivo, donde casi duplican el valor inicial (día 3) y posteriormente se mantienen estables. Sin embargo, la proteína no es detectable entre los días 3 a 5 en cultivo. Sin embargo, una vez que las células alcanzaron la confluencia (día 6 en cultivo), cingulina se inmunodetectó hasta alcanzar los valores más altos al finalizar el experimento (día 12 de cultivo), (Fig. 13D). Cabe señalar que el cambio en los niveles de cingulina correlaciona con el aumento en la resistencia transepitelial (Fig. 12F y 13E).

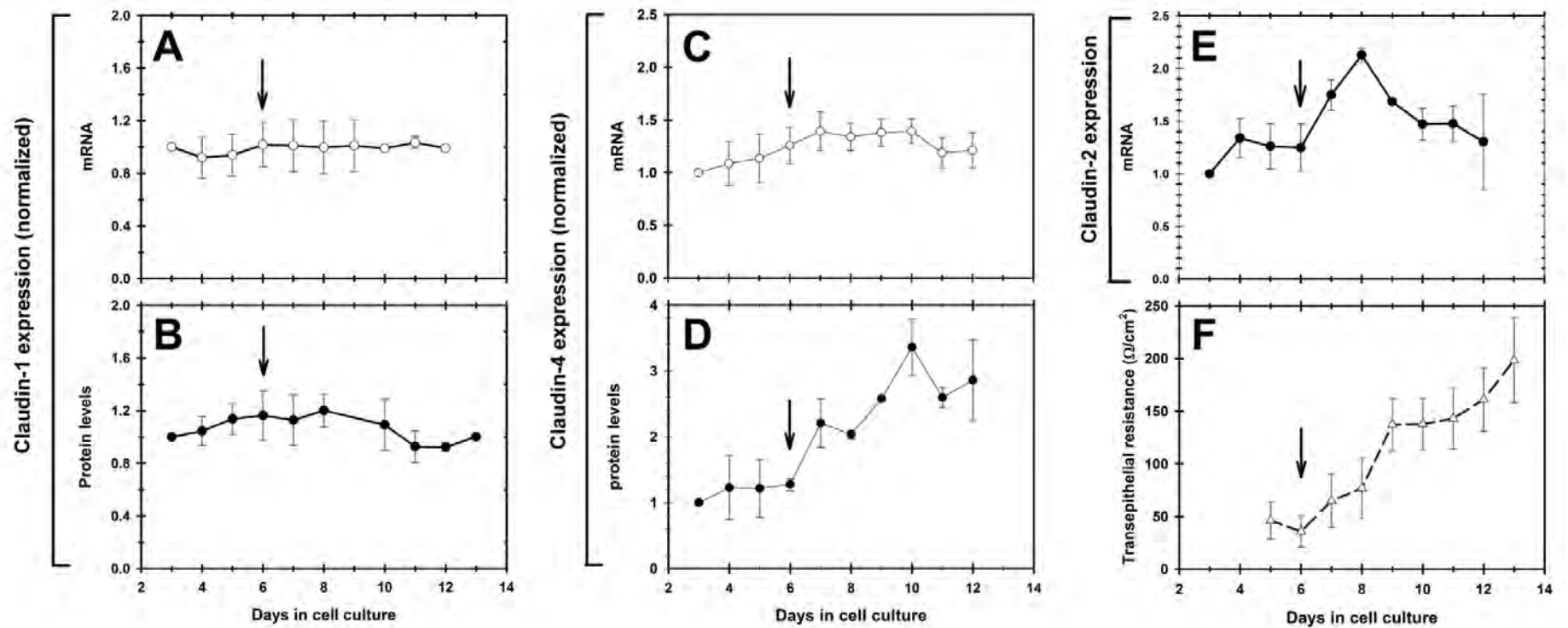


Fig. 12 Cinética de expresión de claudina-1, claudina-2 y claudina-4 durante el crecimiento y diferenciación de las células RCE1(5T5). Niveles relativos del (A) mensajero que codifica a la claudina-1 y (B) la proteína correspondiente. Nótese que esta molécula no cambia significativamente sus niveles. Por otra parte, (C) muestra los niveles relativos del mensajero que codifica a la claudina-4 y (D) los niveles de la proteína correspondiente. Es importante señalar que mientras el mensajero se mantuvo estable, la proteína aumentó de niveles basales encontrados en los días 3 a 6 en cultivo; posteriormente la proteína aumentó hasta 3 veces los niveles encontrados durante la fase de crecimiento exponencial. En E) se presentan los niveles relativos del mensajero de la claudina-2. Tanto el aumento en los niveles de claudina-4 y del mensajero de claudina-2 se inició de manera simultánea al aumento en la resistencia transepitelial (F), que indica el ensamblaje de la unión estrecha. La flecha indica el momento en que las células alcanzan la confluencia.

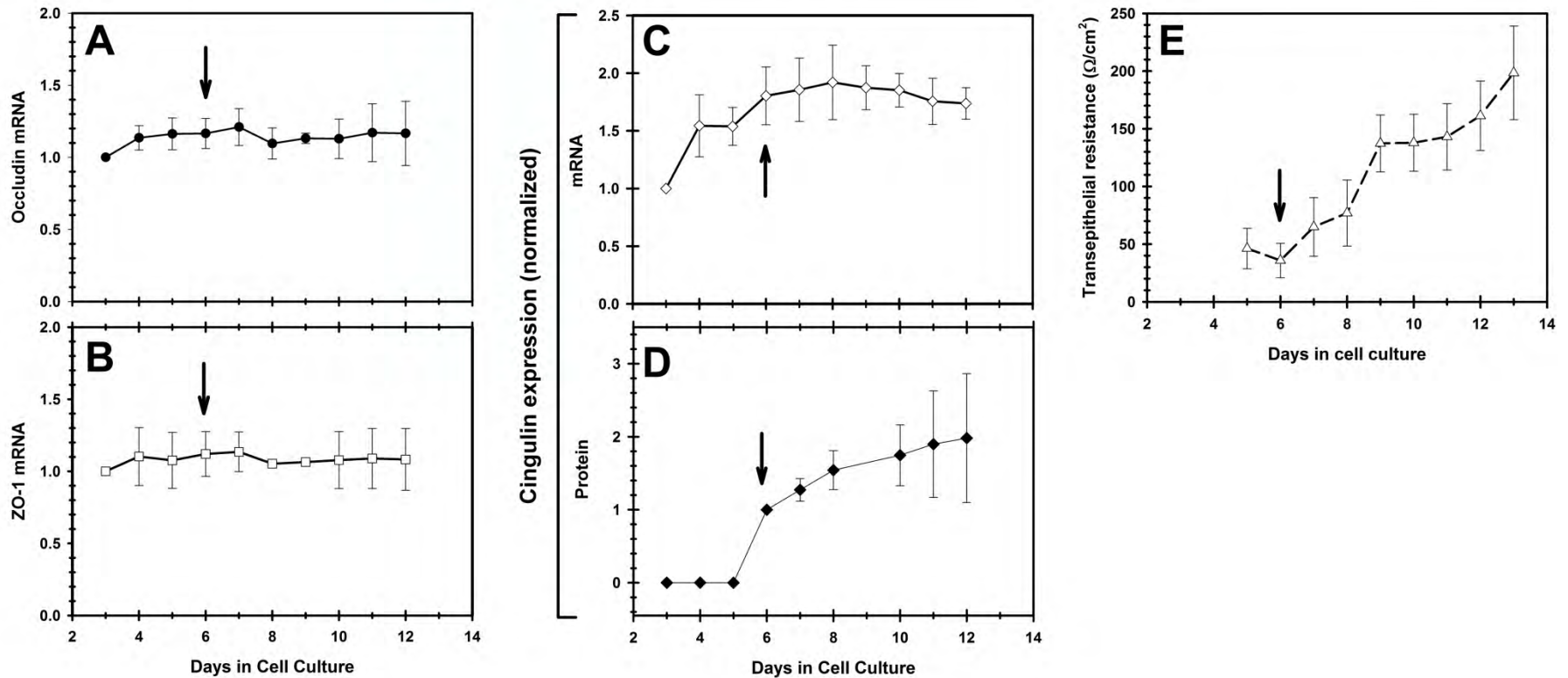
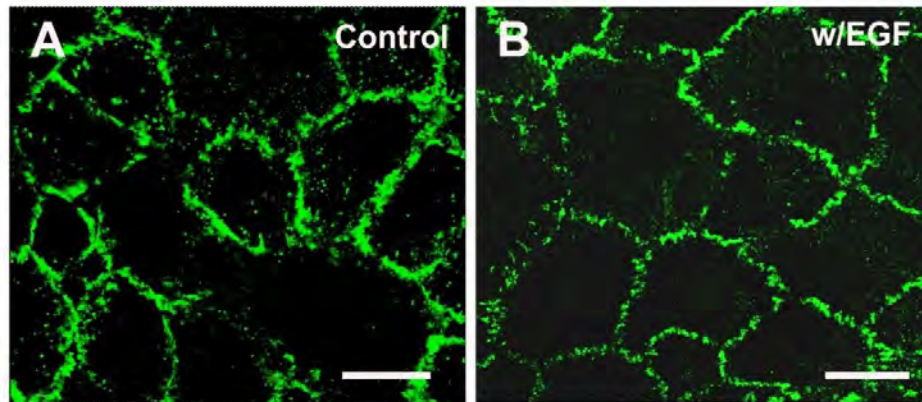


Fig. 13 Cinética de expresión de ocludina, ZO-1 y cingulina durante el crecimiento y diferenciación de las células RCE1(5T5). Se presenta el cambio en los niveles de los mensajeros que codifican a la ocludina (A), a ZO-1 (B), y a cingulina (C). Es notable el cambio tan marcado en los niveles de la proteína cingulina (D), que durante la fase de crecimiento exponencial no se inmunodetectó a pesar de que el mensajero correspondiente aumentó 2 veces cuando las células alcanzaron la confluencia. De igual manera que en la figura 13, en (F) se presentan los valores de resistencia transepitelial durante el crecimiento de células RCE1(5T5). Al igual que en el caso de la claudina-2, el aumento en cingulina coincide con el inicio en el cambio de la resistencia transepitelial. La flecha indica el momento en que las células alcanzan la confluencia.

La unión estrecha de epitelios formados por células RCE1 se puede modular

Como parte de los objetivos del trabajo, evaluamos el efecto de algunos factores que pudieran modular la hermeticidad de la unión estrecha en epitelios formados por las células RCE1(5T5). Para ello, probamos los efectos de dos diferentes condiciones de cultivo que afectan el crecimiento y/o la diferenciación del epitelio corneal: la ausencia del factor de crecimiento epidermal (EGF) o la adición de ácido retinoico (RA). Para ello, cultivos de células RCE1(5T5) con un día de post-confluencia (7 días en cultivo), se mantuvieron en medio conteniendo 10 ng/ml de EGF, o bien en medio sin el factor de crecimiento (testigo negativo). La resistencia transepitelial se determinó el día que se inició el tratamiento con EGF, y posteriormente se midió todos los días hasta alcanzar los 5 o 7 días de tratamiento (día 12 o 14 en cultivo). Asimismo realizamos la inmunolocalización de claudina-1 en células tratadas de la misma manera durante dos días (día 7 a día 9 en cultivo). Como se puede observar en la figura 14, la estimulación de los cultivos con 10 ng/ml de EGF promovió un aumento en la resistencia transepitelial de los epitelios formados por las células RCE1(5T5) (Fig. 14 C; Con EGF), en comparación con los epitelios no estimulados con el factor de crecimiento (Fig. 14 C; Sin EGF). El tratamiento con EGF, además de incrementar la resistencia transepitelial llevó a cambios en la localización de claudina-1, que mostró una inmunolocalización más uniforme rodeando a las células por completo (Fig. 14 B), en contraste con los cultivos no tratados con el factor de crecimiento (Control), donde se apreció una tinción con muchas más discontinuidades (Fig. 14 A). Al evaluar los niveles de expresión de los mRNAs que codifican a las proteínas de unión estrecha; claudina-1, -2, -4, ocludina, ZO-1 y cingulina por medio de RT-PCR semicuantitativo y los niveles de expresión relativos de las proteínas claudina-1, -4 y cingulina por Western Blot, observamos que la presencia de EGF en el medio de cultivo no promueve cambios significativos en los niveles de expresión de los mensajeros (Fig. 15) y proteínas (Fig. 16) en comparación con los niveles de mRNAs y proteínas de epitelios no estimulados con EGF.



Barra= 16 μm

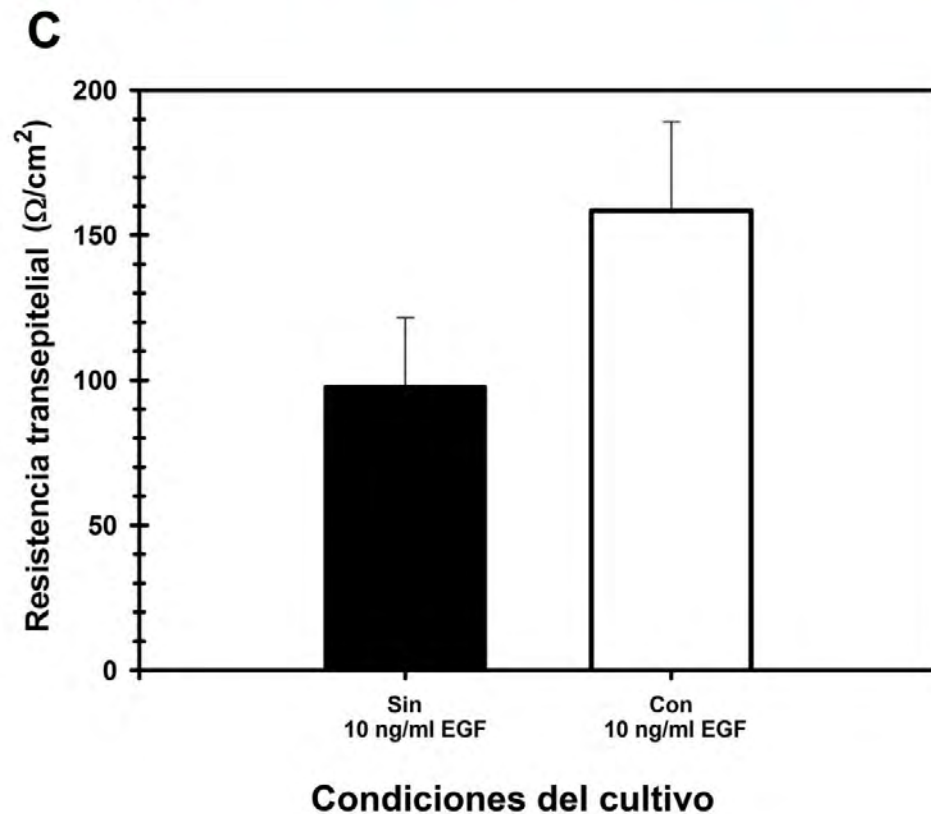


Fig. 14. Efecto del factor de crecimiento epidermal (EGF) sobre la unión estrecha en epitelios formados por células RCE1. Cultivos un día post-confluentes de células RCE1(5T5) fueron estimulados con 10 ng/ml de EGF; 5 días después, se evaluó la integridad de la unión estrecha por inmunotinción con anticuerpos contra claudina 1, y por determinación de los niveles de resistencia transepitelial. Inmunolocalización de claudina-1, nótese el patrón discontinuo observado tanto en (A) cultivos control que no recibieron estimulación con EGF, como en (B) los cultivos tratados con 10 ng/ml EGF. La discontinuidad de la tinción de claudina-1 fue mayor en los cultivos no tratados con el factor de crecimiento. C) Valores de resistencia transepitelial de epitelios formados por células RCE1 cultivadas en ausencia (izquierda) o presencia (derecha) de EGF en el medio de cultivo.

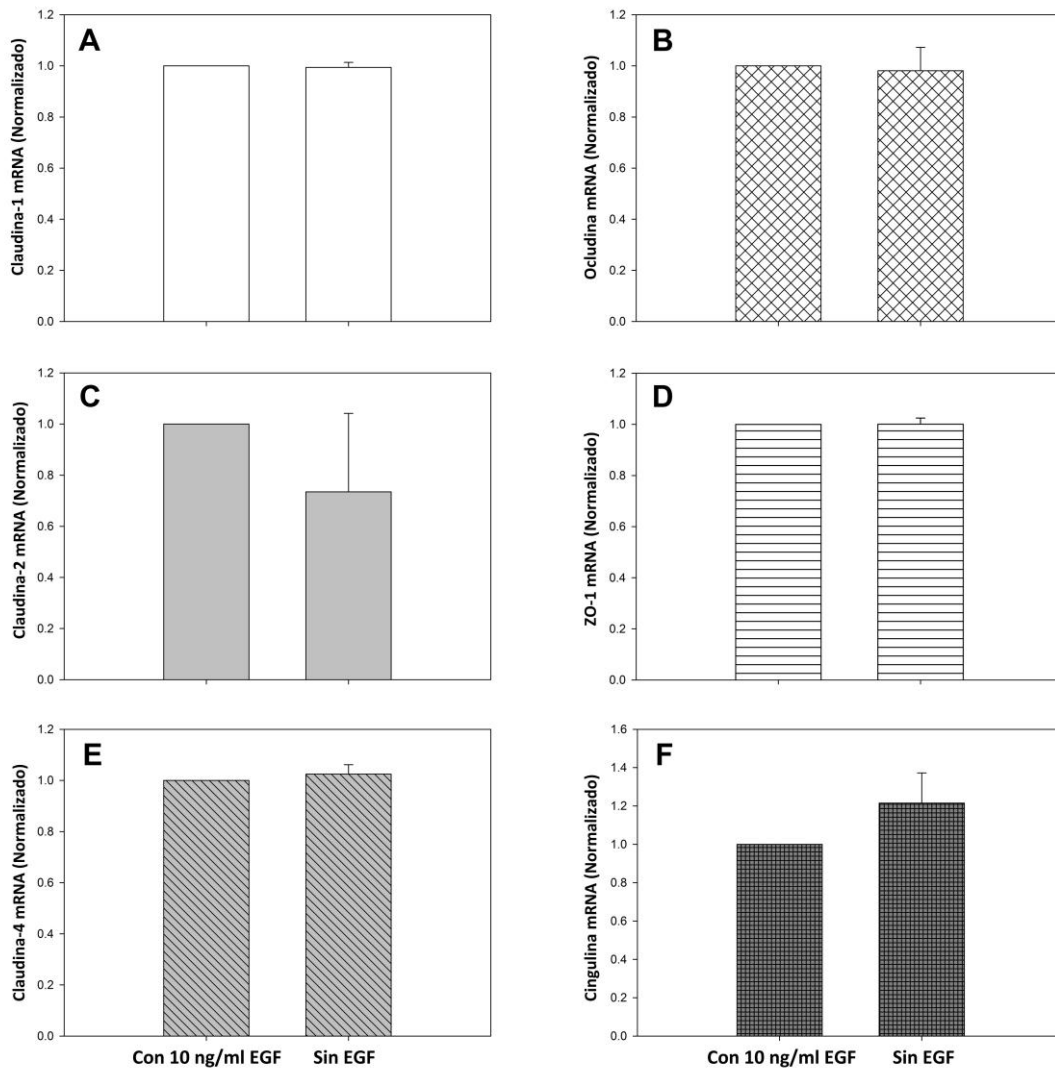


Figura 15. Niveles relativos de los mRNAs que codifican para las proteínas de unión estrecha, en células RCE1(5T5) cultivadas en ausencia o presencia de 10 ng/ml de EGF. Las células con 24 h de confluencia, se estimularon con el factor de crecimiento epidermal durante dos días. Se muestran los promedios de 4 repeticiones.

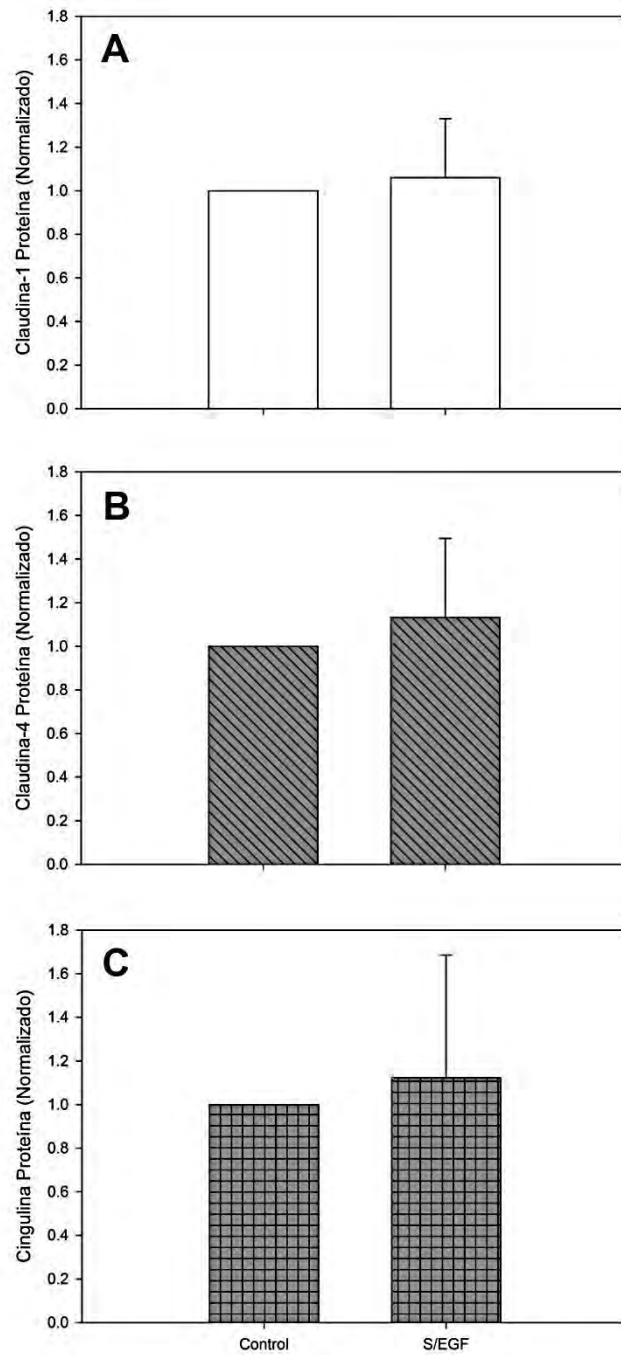


Figura 16. Niveles relativos de las proteínas de unión estrecha claudina-1, claudina-4 y cingulina, en células RCE1 cultivadas en ausencia o en presencia de 10 ng/ml de EGF. Las células con 24 h de confluencia, se estimularon con el factor de crecimiento epidermal. Se muestran los promedios de 4 repeticiones.

Por otro lado, estudiamos el efecto del ácido retinoico, molécula que modula la expresión del proceso de diferenciación de diferentes epitelios (Kim, *et al.*, 2012), sobre la integridad de la barrera epitelial formada por las células RCE1(5T5). Las células se cultivaron en presencia de concentraciones de 0.1, 1.0 y 10 μM ácido retinoico una vez que llegaron a confluencia. Los cultivos controles consistieron en células que crecieron y diferenciaron en medio sin el retinoide. En todos los casos, la resistencia transepitelial se registró diariamente para cada una de las condiciones utilizadas. En estos experimentos, observamos que la resistencia transepitelial disminuye cuando las células se suplementan en medio conteniendo ácido retinoico, en contraste con los cultivos suplementados con medio sin el retinoide, donde se observó un aumento en la resistencia transepitelial una vez que las células llegaron a confluencia (Fig. 17, E). El efecto del retinoide fue proporcional a la concentración utilizada en el tratamiento de los epitelios. Por otra parte, la localización de claudina-1 también se ve afectada por la presencia de ácido retinoico, ésta presenta un patrón discontinuo en los bordes de la célula, a diferencia de las células no tratadas con el retinoide, donde la distribución de la claudina-1 mostró una distribución uniforme típica, rodeando casi por completo a todas las células superficiales del epitelio (Fig. 17, A, B, C, y D). Este efecto también ocurrió de manera proporcional a la concentración de ácido retinoico (Fig. 17).

Para confirmar estos resultados, realizamos un ensayo del flujo paracelular de inulina fluoresceinada en células tratadas con ácido retinoico para determinar si el tratamiento con ácido retinoico modifica el flujo paracelular de solutos. Para esto, cultivos de un día de confluencia (7° día de cultivo), fueron tratados con 0.1, 1.0 ó 10 μM de ácido retinoico. Dos días después, se agregó inulina-FITC en el medio apical (Fig. 18). El flujo de inulina se midió 24 horas después. Como se puede observar en la Fig. 18, el tratamiento con ácido retinoico llevó a una disminución importante de la hermeticidad de la barrera epitelial. Este efecto fue proporcional a la concentración de retinoide utilizada, encontrándose el mayor efecto cuando 10 μM de RA se añadió al medio de cultivo. Por lo tanto, el tratamiento con ácido retinoico no sólo modifica la resistencia transepitelial, sino que además aumenta el flujo paracelular de solutos.

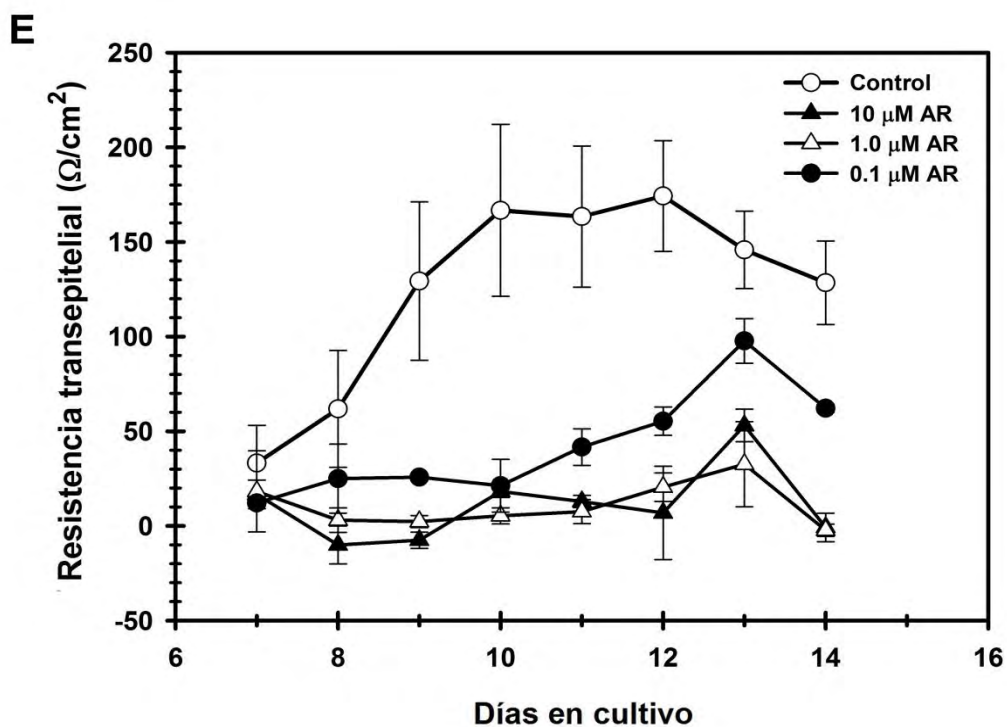
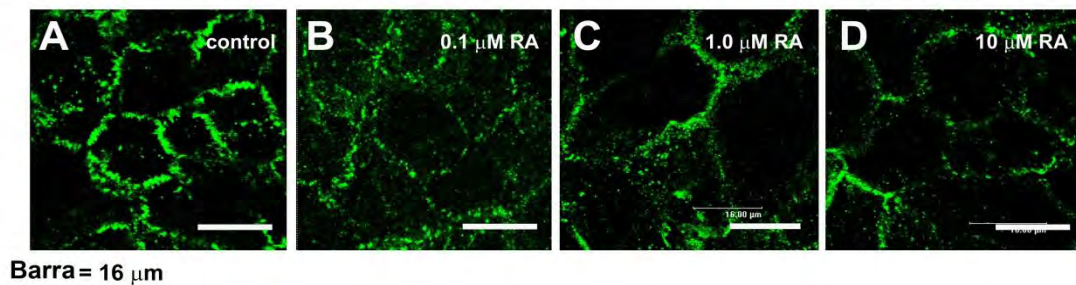


Fig. 17. Efecto del ácido retinoico (AR) sobre la distribución de claudina-1 y sobre la resistencia transepitelial de las láminas epiteliales formadas por las células RCE1(5T5). A-D) Muestra la distribución de claudina-1 en epitelios tratados con las concentraciones de ácido retinoico que se indican. (A) Control; (B) células tratadas con 0.1 μM AR; (C) 1.0 μM AR ó (D) 10 μM AR. Nótese la disminución en la cantidad de claudina y el aumento en la fragmentación de la tinción. Este efecto fue proporcional a la concentración del retinoide. E) Cultivos un día post-confluentes (7° día de cultivo) fueron suplementados con medio conteniendo 0.1 μM (●), 1 μM (△), o 10 μM (▲), de ácido retinoico, o bien, medio sin el retinoide (control, ○); cada día se registró la resistencia transepitelial para cada condición.

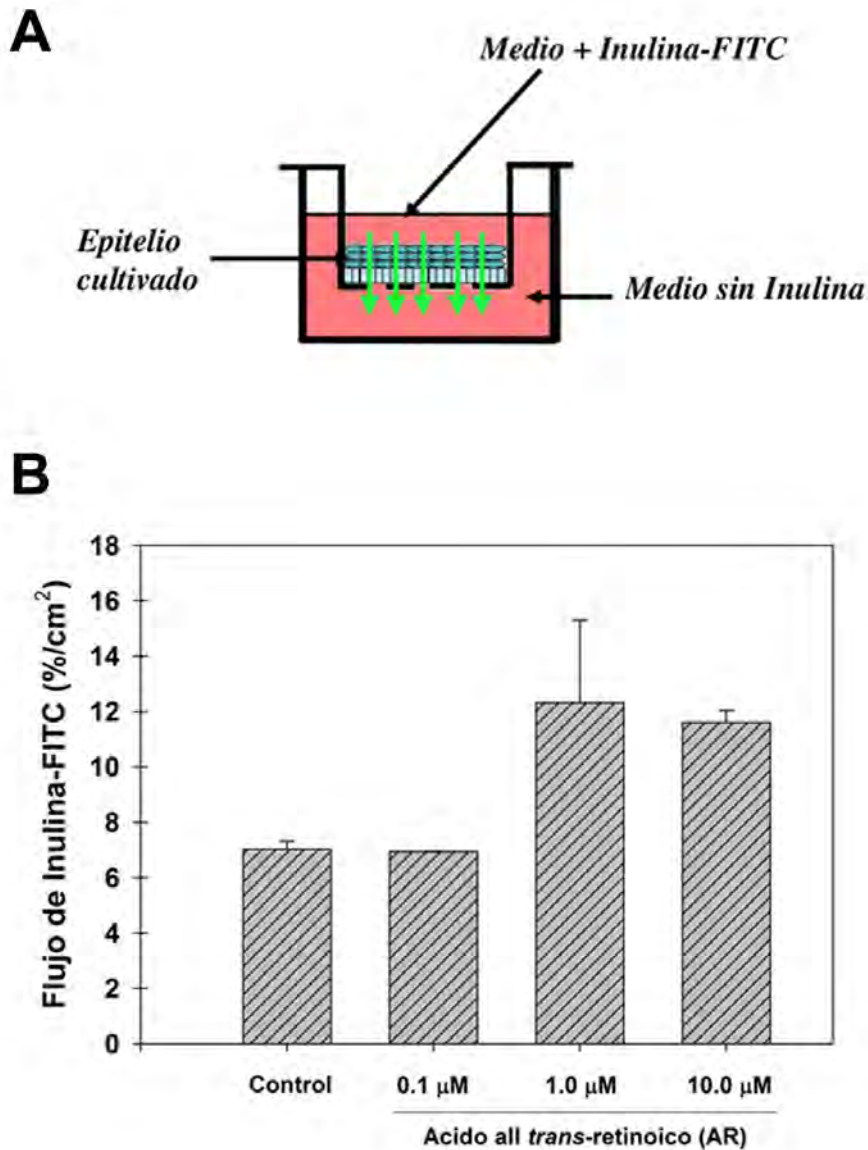


Fig. 18 Determinación de la hermeticidad de la unión hermética por medición del flujo paracelular de inulina a través del epitelio. A) La inulina se agregó al medio en contacto con la parte apical del epitelio, para medir el flujo unidireccional de ésta hacia el compartimento apical. Después de 24 horas, se colectó el medio del compartimento basal, y se determinó por fluorimetría la cantidad de inulina que atravesó al epitelio. B) Valores del flujo paracelular de inulina a través de epitelios formados por células RCE1(5T5) tratadas con las concentraciones indicadas de ácido retinoico (AR). Se reporta el porcentaje de inulina administrada en el compartimento apical, que pasó al compartimento basal en los tratamientos con las diferentes concentraciones de ácido retinoico.

Para evaluar si el efecto del ácido retinoico es reversible, examinamos la resistencia transepitelial de epitelios formados por las células RCE1(5T5). Para ello, las células se cultivaron hasta confluencia y hasta el día 12 después de la siembra. Momento en el que las células formaban un epitelio estratificado con 4-5 capas celulares. Se determinó la resistencia transepitelial inicial, y posteriormente, los cultivos fueron tratados con ácido retinoico 0.1, 1.0 y 10 μ M. El tratamiento con el retinoide se prolongó por 2 días; posteriormente los cultivos se lavaron exhaustivamente con medio libre de suero para finalmente cambiar las células a medio sin el retinoide. La resistencia transepitelial se midió cada 24 horas, en todas las condiciones, hasta la finalización del experimento. Como se ilustra en la Figura 19, la resistencia transepitelial en los cultivos tratados con ácido retinoico disminuyó hasta alcanzar niveles 40-60% menores a los encontrados en los epitelios que no recibieron el tratamiento con el retinoide. Una vez que el análogo de la vitamina A se eliminó del medio de cultivo, los valores de resistencia transepitelial aumentaron hasta alcanzar los valores registrados para el control no tratado con ácido retinoico (Fig. 19).

Finalmente, evaluamos la expresión de mRNA y proteínas de la unión estrecha en células tratadas con ácido retinoico, el tratamiento inició una vez que los cultivos estaban confluentes y se prolongó por 4 días, posteriormente se realizó la extracción de RNA y proteínas. En las células tratadas con ácido retinoico, observamos una disminución en los niveles relativos de los mRNAs que codifican las proteínas de la unión estrecha claudina-2, -4 y cingulina (Fig. 20, C, E, F), mientras que los mRNAs que codifican las demás proteínas de unión estrecha evaluadas se mantienen sin cambio (Fig. 20, A, B, D), con respecto a lo encontrado en las células donde no se adicionó ácido retinoico (control).

En cuanto a los niveles de proteína, claudina-1, claudina-4 y cingulina, se mantuvieron sin cambio significativo en las células tratadas con ácido retinoico (Fig. 21).

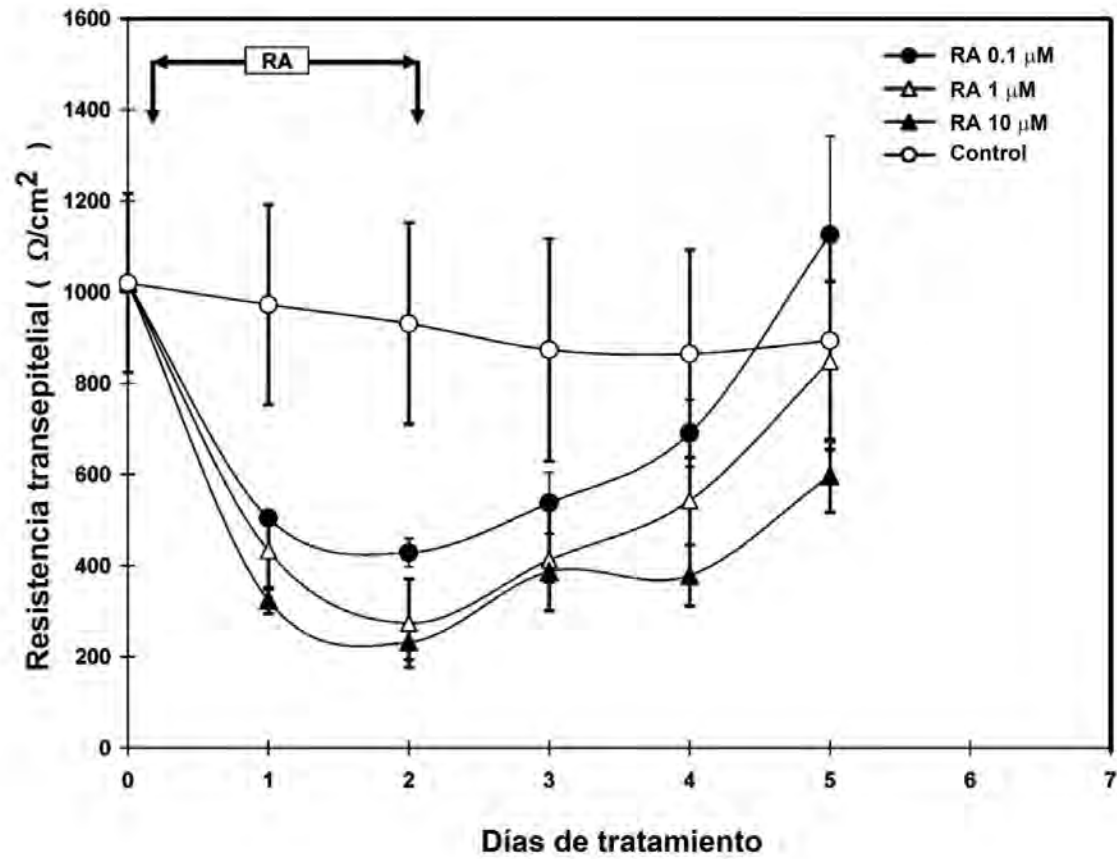


Fig. 19 Efecto del ácido retinoico (RA) sobre la resistencia transepitelial en epitelios formados por células RCE1. El tratamiento inició a los 12 días en cultivo (día 0 de tratamiento) y se mantuvo por 2 días, después se retiró el ácido retinoico suplementando a las células con medio basal y manteniéndolas así hasta el final del experimento. Los registros de la resistencia transepitelial se realizaron diariamente.

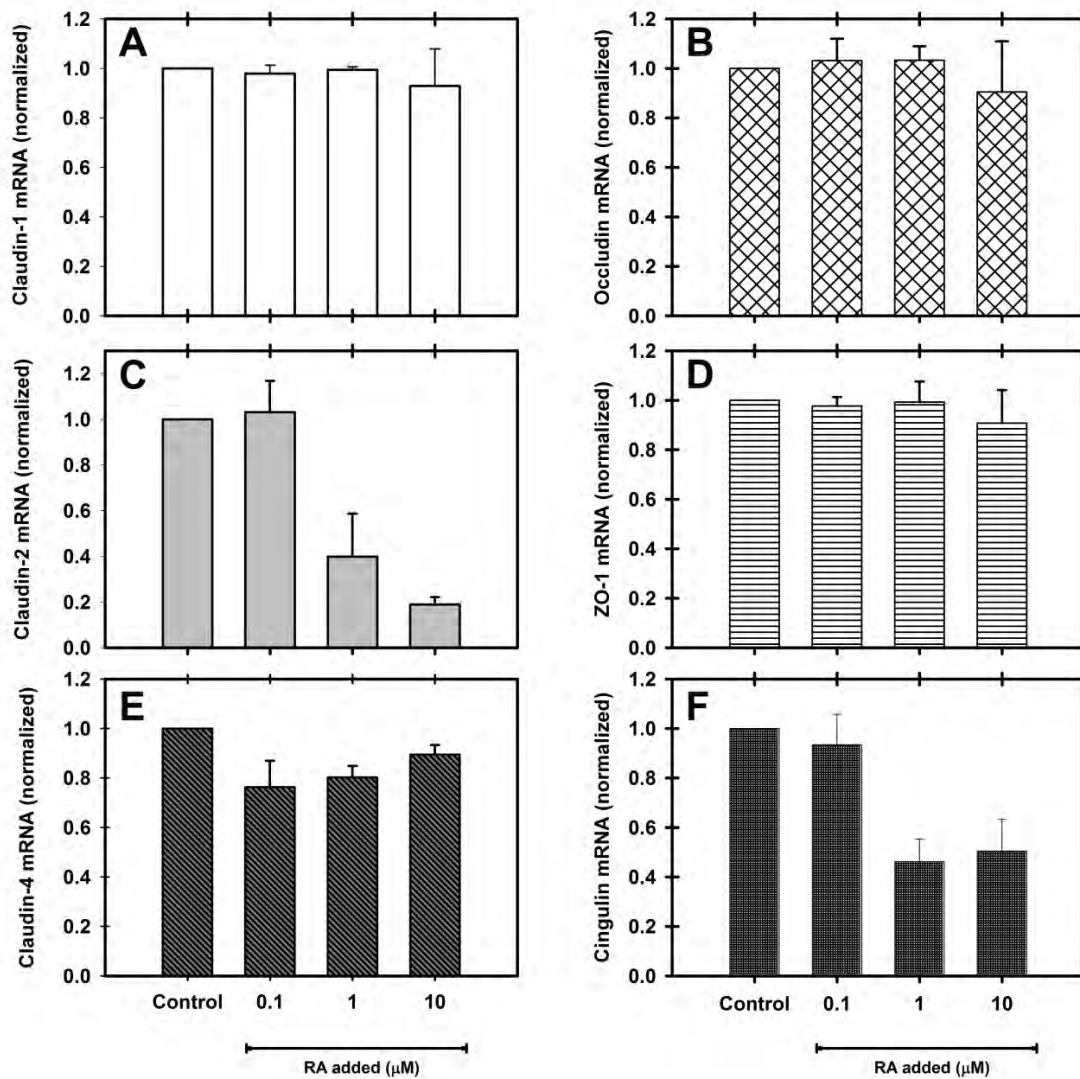


Fig. 20 Niveles relativos de los mRNA que codifican para las claudinas-1, -2, -4, ocludina, ZO-1 y cingulina en epitelios confluentes, estratificados, tratados con las concentraciones indicadas de ácido retinoico (AR) por 2 días. Se muestran los promedios de 4 repeticiones.

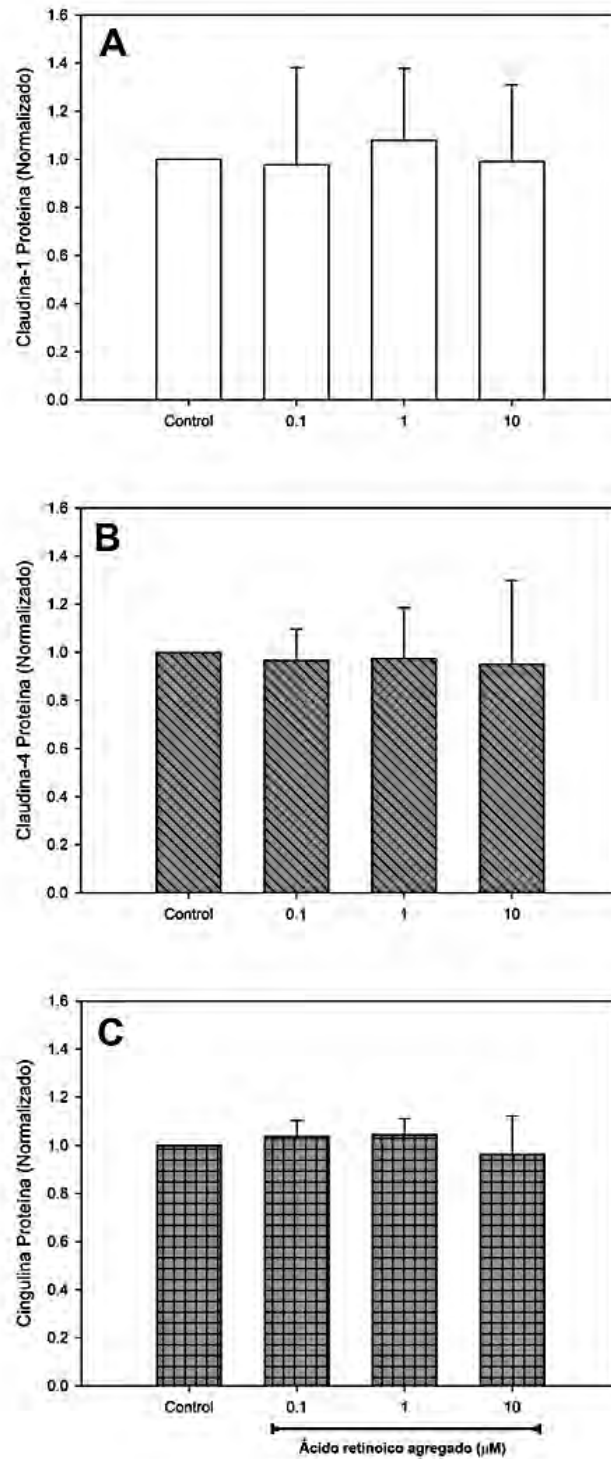


Fig. 21 Niveles relativos de proteínas claudina-1, -4 y cingulina en epitelios confluentes, estratificados, tratados con las concentraciones indicadas de ácido retinoico (AR) por 2 días. Se muestran los promedios de 4 repeticiones.

DISCUSIÓN

La unión estrecha ha sido ampliamente estudiada en epitelios simples y se sabe que células que forman monocapas, como las MDCK, cuando alcanzan la confluencia establecen uniones estrechas rápidamente (Cereijido, et al., 1993). Sin embargo en epitelios estratificados, la unión estrecha está restringida a las capas más apicales del tejido, como se reportó en epidermis y en epitelio corneal (Brandner, et al., 2002; Ban, et al., 2003a), y dado que estas capas están formadas por células diferenciadas, existe la posibilidad de que el ensamble de la unión estrecha en estos epitelios dependa del proceso de diferenciación. Por este motivo, en este trabajo estudiamos la expresión de proteínas de la unión estrecha, durante el crecimiento y la diferenciación de las células de la línea celular de epitelio corneal RCE1(5T5), la cual 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).

Por medio de microscopía electrónica de transmisión, observamos uniones estrechas en las capas suprabasales externas de los epitelios formados por células RCE1(5T5). Aunque el tamaño de estas uniones estrechas es pequeño comparado con el de estas uniones en células MDCK (Gonzalez-Mariscal, *et al.*, 1985), los puntos de unión presentes, fueron similares a las uniones estrechas reportadas en cultivos primarios de epitelio corneal de conejo (Higa, *et al.*, 2007). Encontramos que estas uniones están constituidas por las claudinas-1, -2, y -4, por ocludina, ZO-1 y cingulina, como lo demuestran los experimentos de Inmunolocalización, de RT-PCR de punto final y Western Blot. Cabe destacar que a diferencia de los que ocurre en epitelio corneal de humano y en la rata (Yi et al., 2000), no encontramos a las claudinas-3 y -7, lo cual podría explicarse por la no identidad entre estas secuencias y los mensajeros del conejo, dado que los primers utilizados fueron reportados previamente para amplificar secuencias de humano y de rata. Nuestros resultados también demuestran que las uniones estrechas encontradas en epitelios formados por las células RCE1(5T5) son funcionales; hecho que es apoyado por la impermeabilidad del epitelio al rojo de rutenio y al trazador de Biotina, y por el desarrollo de la unión hermética detectado indirectamente al medir la resistencia transepitelial. Estos resultados nos permiten concluir que aunque las células RCE1(5T5) poseen uniones estrechas funcionales, no forman un

epitelio tan hermético como el constituido por las células MDCK, que presentan una TER que se considera alta (Cuadro 2). Los epitelios formados por células RCE1 presentan una TER considerada como moderada, comparada con valores de TER de otros epitelios (Cuadro 2).

Posteriormente evaluamos la expresión de componentes de la unión estrecha, encontrando que en los epitelios RCE1(5T5), la unión estrecha está constituida por las claudinas 1, 2 y 4, siendo indispensables para la formación de la unión estrecha (Furuse, *et al.*, 1998b), y por la ocludina (ocln), Zonula occludens-1 (ZO-1) y cingulina (cgn), cuya presencia podría regular o propiciar el ensamblaje del complejo de unión estrecha. Se ha sugerido que la ocludina tiene una función reguladora más que estructural (Tsukita, *et al.*, 2001). Por otra parte, las proteínas ZO-1 y ZO-2, son proteínas que se reclutan al lugar en donde se formará la unión estrecha y una vez ahí, participan en la polimerización de las hebras de claudina (Umeda, *et al.*, 2006). En cuanto a cingulina, se ha sugerido que su interacción con ZO-1 podría ser crucial para el ensamblaje de la unión estrecha (Atri, *et al.*, 2002). Por otra parte, nuestros resultados muestran que los niveles de mRNA que codifican a claudina-1, ocludina y ZO-1 se mantienen estables desde los primeros días en cultivo hasta que se ha formado completamente el epitelio, lo que nos hace pensar que la presencia de estos componentes no promueve por sí misma el ensamble de la unión estrecha, sino que puede ser necesaria la presencia de algún otro u otros componentes para ensamblar la unión.

Otra posibilidad para explicar el desfase entre la expresión de estas proteínas de unión estrecha, respecto al desarrollo de la resistencia transepitelial, consiste en la regulación de estas proteínas por modificaciones post-traduccionales. Por ejemplo, el estado de fosforilación de algunas proteínas de la unión estrecha, en especial de ocludina y claudina, puede modificar el ensamblaje de la unión estrecha (Clarke, *et al.*, 2000). Asimismo, las claudinas sufren modificaciones post-traduccionales como la palmitoilación y fosforilación. Se ha visto que en algunas de estas, como en la claudina-14, la palmitoilación es necesaria para su localización eficiente en la unión estrecha. Por otro lado, hay residuos de Ser y Thr en el extremo carboxilo terminal de la región citoplásmica de varias claudinas, entre ellas la claudina-3, -4, -5 y -16 que son fosforiladas (D'souza *et al.* 2005; Aono and Hirai. 2008; Ishizaki *et al.* 2003; Ikari *et al.* 2006). Esta modificación parece regular su localización y las propiedades de barrera de la unión estrecha, aunque los mecanismos por los cuáles ocurre esto se desconocen (Furuse, 2010). Por su parte, la

occludina se une a las ZO-1, ZO-2 y ZO-3 a través de su extremo carboxilo terminal, ubicado en la región citoplásmica (Furuse et al. 1994; Fanning et al. 1998; Itoh et al. 1999a; Haskins et al. 1998). En esta región se encuentran varios residuos de Ser y Thr que son fosforilados, y se sabe que la occludina altamente fosforilada se concentra de manera selectiva en la unión estrecha (Sakakibara et al. 1997).

De manera diferente a los que ocurre con occludina, ZO-1 y claudina-1, los niveles de expresión de claudina-2, -4 y cingulina, se modifican a lo largo del crecimiento y diferenciación de las células RCE1. En el caso de cingulina, los niveles de mRNA aumentan paulatinamente del día 3 a 6 en cultivo, donde casi duplican el valor inicial (día 3) y posteriormente se mantienen estables. Sin embargo, la proteína no es detectable entre los días 3 a 5 en cultivo, sino que es a partir del día 6 en cultivo cuando comienza a ser detectada por Western Blot. Posteriormente los niveles de la proteína continúan aumentando hasta el día 10 en cultivo y después se mantienen estables. Por otra parte, los niveles de mRNA y proteína de cldn-4 aumentaron paulatinamente desde el día 3 hasta el día 7, en el caso del mRNA después de este día se mantienen constantes, mientras que los niveles de proteína continúan aumentando hasta llegar a un pico máximo el día 10 en cultivo, momento en que han aumentado cerca de 2 veces con respecto a los valores basales que se encuentran entre el día 3 y 6 en cultivo. Finalmente, los niveles de mRNA que codifica a claudina-2 se mantienen constantes entre el día 3 y 6 en cultivo, aumentan a partir del día 7 en cultivo, una vez que el epitelio está confluyente, y posteriormente alcanzan un pico máximo el día 8, para después disminuir y mantenerse en niveles similares a los detectados los primeros días de cultivo.

De manera interesante, los niveles del mensajero de claudina-2 y cingulina, así como de la proteína correspondiente, aumentan en el momento en que las células alcanzan el estado de confluencia e inician el proceso de diferenciación (García-Villegas, et al., 2009), que es el mismo momento en que la resistencia transepitelial inicia su aumento. Este hecho es intrigante dado que aún desconocemos los eventos moleculares que regulan esta transición y parecen comunes para otros procesos que se inician en la confluencia.

Por otra parte, se ha observado que la presencia de las claudinas -4, -7 y -8 provoca una mayor resistencia transepitelial, tanto *in vivo* como *in vitro* (Li, et al., 2004; Enck, et al., 2001;

Kiuchi-Saishin, *et al.*, 2002), por lo que el aumento en la expresión de claudina-4 en células RCE1(5T5) a partir del día 7 en cultivo, podría estar relacionado con el aumento en la resistencia transepitelial a partir del mismo día. En contraste, los niveles de la claudina-2 podrían correlacionarse con la mayor permeabilidad epitelial. Se ha reportado que 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). Además, se ha reportado en epitelio intestinal de humano, donde se ha reportado que la claudina-2 disminuye sus niveles durante la diferenciación de las células (Escaffit, *et al.*, 2005).

Toda esta evidencia nos lleva a especular que para que la unión estrecha se ensamble no es suficiente que se encuentren las proteínas indispensables como claudina-1, ocludina y ZO-1, al parecer son necesarios algunos otros procesos para llevar a cabo dicho ensamble, uno de los cuáles podría ser un cambio en la expresión de otras de las proteínas que forman parte de la unión estrecha. Se ha demostrado que ZO-1 y ZO-2 son indispensables para la formación de la unión estrecha (Umeda *et al.* 2006), al parecer, la correcta localización de ZO-1 es importante para la inducción de la polimerización de las claudinas en las hebras de la unión estrecha, sin embargo, no es claro cómo es que ZO-1 es reclutada a la región correcta de la membrana para inducir la formación de las hebras de unión estrecha. Se cree que ZO-1 interactúa con moléculas de la unión adherente como α -catenina o afadina, que pudieran estar implicadas en este reclutamiento (Itoh *et al.* 1997; Yokoyama *et al.* 2001). Otra propuesta es que cingulina, una proteína que interactúa con gran afinidad con ZO-1, pudiera ser la encargada de reclutar a ZO-1 hacia los sitios de formación de la unión estrecha, ya que durante el establecimiento de la polaridad de los epitelios, la unión adherente se forma de manera anterior al establecimiento de la unión estrecha, y ZO-1 está asociada a cadherinas en uniones adherentes, pero después se acumula preferentemente en sitios que contienen cingulina (Atri, *et al.*, 2002). Lo cual podría estar relacionado con el incremento en la resistencia transepitelial al aumentar los niveles de cingulina, a partir del momento en que las células RCE1 alcanzan la confluencia.

En base a todo esto podemos pensar que existe una regulación compleja detrás del proceso de ensamblado de la unión estrecha, que no es clara aún. Este proceso pudiera estar ligado a la diferenciación de las células, ya que éstas uniones se encuentran en las capas más diferenciadas de epitelios estratificados y la expresión de algunos componentes de la unión estrecha, como las claudinas, es regulada por factores de transcripción implicados en el proceso de diferenciación, como es el caso de la claudina-1, regulada por p63 en epidermis (Lopardo, et al., 2008) o la claudina-19 en células de epitelio de riñón es regulada por Sp1. Además del hecho de que la cinética de la resistencia transepitelial, así como de *cldn-4* y cingulina, son similares a la del factor de transcripción Pax-6 (García-Villegas, et al., 2009), que es el marcador de diferenciación más temprano en células de epitelio corneal (García-Villegas, et al., 2009).

Adicionalmente, analizamos el efecto del factor de crecimiento epidermal (EGF) y el del ácido retinoico (RA). El EGF fue capaz de aumentar la fuerza de la unión estrecha, de manera similar a lo reportado en células MDCK, donde provoca el aumento de la resistencia transepitelial, así como el aumento de los niveles de claudina-4 y la disminución de *cldn-2* (Flores-Benitez, et al., 2009). Sin embargo en nuestros resultados, los niveles de expresión de los componentes de la unión estrecha; *cldn-1*, -2, -4, *ocln*, *ZO-1* y *cgln* no presentaron diferencias entre las células crecidas en ausencia o presencia del EGF. No obstante, nosotros observamos que en las células tratadas con EGF existe una tinción más continua de *cldn-1* en los bordes de las células, a diferencia de las células que no fueron tratadas con EGF, de manera similar a lo reportado en células de cáncer gástrico TMK-1, en donde la tinción de *ZO-1* en células en presencia de EGF fue continua en los bordes de las células, mientras que en células sin EGF presentó un patrón punteado (Yoshida, et al., 2005).

En epitelios formados por células RCE1, encontramos que el ácido retinoico en concentraciones de 0.1, 1 y 10 μM disminuye la función de barrera de este epitelio, al evitar el aumento de la resistencia transepitelial, además de modificar la localización de la proteína *cldn-1* y aumentar el flujo paracelular de inulina. De manera importante, los efectos del retinoide fueron

dosis-dependientes, y reversibles. Estos efectos pudieran relacionarse con los niveles de expresión de la cingulina, y de las claudinas-2 y -4, sin que participen como moduladores del ensamblado la claudina-1, la ocludina y ZO-1 que no sufren modificaciones aparentes durante el crecimiento y la diferenciación en cultivo.

Por otra parte, el efecto del ácido retinoico parece depender de la concentración y del tipo celular epitelial. De esta manera, este compuesto disminuye la resistencia transepitelial en una línea celular de epitelio endocervical humano (Gorodeski, et al., 1997). En contraste, en queratinocitos orales, el ácido retinoico provoca la disminución en la expresión de cldn-1 y el aumento en la expresión de cldn-4 (Hatakeyama, et al., 2010), o en queratinocitos epidermales, donde induce un incremento en la expresión de claudina-2, de manera dosis dependiente (Telgenhoff, et al., 2008).

En conjunto, toda la evidencia nos permite concluir que el ácido retinoico puede modular a la unión estrecha en el epitelio corneal, de manera dosis dependiente, y que esta modulación puede ser reversible. Esta modulación se da en términos de una disminución de la resistencia transepitelial y un aumento en el flujo paracelular de solutos. Finalmente, esta modulación podría estar mediada a través de cambios en la expresión de proteínas de la unión estrecha como las claudinas o la cingulina.

CONCLUSIONES

- Las células RCE1 (5T5) forman epitelios con uniones estrechas funcionales, que presentan valores de resistencia transepitelial comparables con los de otros epitelios y que se consideran como moderados.
- Las uniones estrechas presentes en los epitelios formados por células RCE1, son morfológicamente similares a las uniones estrechas previamente reportadas en cultivos primarios de epitelio corneal de conejo.
- Las células RCE1(5T5) expresan a las proteínas de unión estrecha claudina-1, ocludina, y ZO-1, que mantienen sus niveles estables durante el crecimiento y diferenciación en cultivo y que se localizan en la región apical de las células suprabasales más externas, lugar donde se forma la unión estrecha, cuando el epitelio está formado. También expresan a la claudina-2, claudina-4 y cingulina, que aumentan sus niveles relativos tanto de mRNA como de proteína a partir del momento en que el cultivo llega a confluencia.
- La resistencia transepitelial de epitelios formados por células RCE1 aumenta en presencia del factor de crecimiento epidermal, el cual puede modificar el ensamblaje de la unión estrecha, sin provocar cambios en la expresión de cldn-1, -2, -4, ocln, ZO-1 o cgn.
- El ácido retinoico modula la función de barrera de la unión estrecha en epitelios formados por células RCE1(5T5), al disminuir la resistencia transepitelial y aumentar el flujo paracelular de inulina, de manera dosis dependiente. Este efecto es reversible.
- El ácido retinoico disminuye la expresión de los mensajeros que codifican a las proteínas cldn-2 y cingulina.
- El ensamblaje de la unión estrecha en células RCE1 parece depender del proceso de diferenciación y podría estar regulado por factores de transcripción implicados en la diferenciación del epitelio corneal.

REFERENCIAS

1. **Aijaz, S., D'Atri, F., Citi, S., Balda, M., and Matter, K.** 2005. Binding of GEF-H1 to the Tight Junction-Associated Adaptor Cingulin Results in Inhibition of Rho Signaling and G1/S Phase Transition. *Dev Cell*. 8: 777–786.
2. **Balda, M., Anderson, J., Matter, K.** 1996. The SH3 domain of the tight junction protein ZO-1 binds to a serine protein kinase that phosphorylates a region C-terminal to this domain. *FEBS Lett*. 399: 326–332.
3. **Balda, M., Gonzalez-Mariscal, L., Matter, K., Cereijido, M., Anderson, J.** 1993. Assembly of the Tight Junction: The Role of Diacylglycerol. *J Cell Biol*, 123: 293-302
4. **Balda, M., Matter, K.** 2000. The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO J*. 19: 2024– 2033.
5. **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.
6. **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.
7. **Barker, G. & Simmons, N. L.** 1981. Identification Of Two Strains Of Cultured Canine Renal Epithelial Cells (MDCK Cells) Which Display Entirely Different Physiological Properties. *Quart J Exp Physiol*, 66, 61-72.
8. **Brandner, J., Kief, S., Grund, C., Rendl, M., Houdek, P., Kuhn, C., Tschachler, E., Franke, W., Moll, I.** 2002. Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur J Cell Biol*. 81(5): 253-63.
9. **Capaldo, C.T., Macara, I.G.** 2007. Depletion of E-cadherin disrupts establishment but not maintenance of cell junctions in Madin–Darby canine kidney epithelial cells, *Mol. Biol. Cell* 18:189–200.

10. **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.
11. **Castro-Muñozledo, F.** 2008. Corneal epithelial cell cultures as a tool for research, drug screening and testing. *Exp Eye Res.* 86(3):459-469.
12. **Cereijido M., González-Mariscal, L., Contreras, G., Gallardo, J., García-Villegas, R., Valdés, J.** 1993. The making of a tight junction. *J Cell Sci Supp*, 17:127-32.
13. **Chen, M., Goliger, J., Bunnett, N., Soll, A.** 2001. Apical and basolateral EGF receptors regulate gastric mucosal paracellular permeability. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G264-G272.
14. **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.
15. **Citi, S., Paschoud, S., Pulimeno, P., Timolati, F., De Robertis, F., Jond, L., Guillemot, L.** 2009 The Tight Junction Protein Cingulin Regulates Gene Expression and RhoA Signaling. *Molecular Structure and Function of the Tight Junction: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1165: 88–98.
16. **Clarke, H., Marano, C., Peralta-Soler, A., Mullin, J.** 2000. Modification of tight junction function by protein kinase C isoforms. *Adv Drug Del Rev* 41: 283–301.
17. **Cordenonsi, M., D'Atri, F., Hammar, E., Parry, D., Kendrick-Jones, J., Shore, D., Citi, S.** 1999. Cingulin Contains Globular and Coiled-Coil Domains and Interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and Myosin. *J Cell Biol.* 147 (7): 1569-1582.
18. **Cummins, P.** 2012. Occludin: One Protein, Many Forms. *Mol. Cell. Biol.* 2012, 32(2):242 - 250.
19. **D'Atri, F., Nadalutti, F., and Citi, S.** 2002. Evidence for a Functional Interaction between Cingulin and ZO-1 in Cultured Cells. *J Biol Chem.* 277 (31): 27757–27764.
20. **D'Atri, F., Citi, S.** 2002. Molecular complexity of vertebrate tight junctions. *Mol Membr Biol*, 19, 103 – 112.
21. **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.

22. **Ebnet, K., Schulz, C., Meyer, M., Pendl, G., Vestweber, D.** 2000. Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J Biol Chem* 275: 27979–27988.
23. **Fanning, A., Jameson, B., Jesaitis, L., Anderson, J.** 1998. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 273: 29745–29753.
24. **Flores-Benítez, D., Rincon-Heredia, R., Razgado, L., Larre, I., Cereijido, M., Contreras, R.** 2009. Control of tight junctional sealing: role of epidermal growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol*, 297(3):C611-C620
25. **Furuse, M.** 2010. Molecular Basis of the Core Structure of Tight Junctions. Cold Spring Harb Perspect Biol 2: 1-14.
26. **Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., 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.
27. **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.
28. **Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S.** 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123: 1777-1788.
29. **Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S.** 1994. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol*, 127: 1617–1626.
30. **Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K., 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.
31. **García-Villegas, R., Escamilla, J., Fiorentino, R., Cereijido, 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.

32. **García-Villegas, R., Escamilla, J., Sánchez-Guzmán, E., Pastén, A., Hernández-Quintero, M., Gómez-Flores, E., Castro-Muñozledo, F.** 2009. Pax-6 is expressed early in the differentiation of a corneal epithelial model system. *J Cell Physiol.* 220(2):348-356.
33. **GenBank** NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
34. **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.
35. **González-Mariscal, L., Betanzos, A., Avila-Flores, A.** 2000. MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol* 11:315–324.
36. **Gorodeski, G., Eckert, R., Pal, D., Utian, W., Rorke, A.** 1997. Retinoids regulate tight junctional resistance of cultured human cervical cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 273:C1707-C1713.
37. **Gumbiner, B.M.** 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 6: 622–634.
38. **Hatakeyama, S., Ishida, K., Takeda, Y.** 2010. Changes in cell characteristics due to retinoic acid; specifically, a decrease in the expression of claudin-1 and increase in claudin-4 within tight junctions in stratified oral keratinocytes. *J Period Res*, 45(2): 207–215.
39. **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.
40. **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.
41. junctions. *J Cell Sci* 13: 763 – 786.
42. **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.

43. **Lopardo, T., Lo-Iacono, N., Marinari, B., Giustizieri, M., Cyr, D., Merlo, G., Crosti, F., Costanzo, A., Guerrini, L.** 2008. Claudin-1 Is a p63 Target Gene with a Crucial Role in Epithelial Development. *PLoS ONE* 3(7): 1-8.
44. **Matter, K., Balda, M.** 2003. Signalling to and from Tight Junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:225 – 236.
45. **McNeil, E., Capaldo, C., Macara, I.** 2006. Zonula Occludens-1 Function in the Assembly of Tight Junctions in Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells. *Mol Biol Cell*, 17: 1922–1932.
46. **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.
47. **Muresan, Z., Paul, D., Goodenough, D.** 2000. Occludin 1B, a variant of the tight junction protein occludin. *Mol Biol Cell* 11(2): 627 – 634.
48. **Ortiz-Melo, M. T.** 2009. Expresión de claudinas durante la proliferación y la diferenciación de los queratinocitos corneales RCE1 (5T5). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.
49. **Ponting, C. P., Phillips, C., Davies, K. E., Blake, D. J.** 1997. PDZ domains: targeting signalling molecules to submembranous sites. *BioEssays* 19 (6): 469 – 479.
50. **Rheinwald, J. G.** 1980. Serial cultivation of normal human epidermal keratinocytes. *Methods Cell Biol.* 21A: 229 -254.
51. **Schermer, A., Jester, J. V., Hardy, C., Milano, D., 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.
52. **Schneeberger, E. & Lynch, R.** 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C1213 – 1228.
53. **Shen, L., Weber, C., and Turner, J.** 2008. The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state. *J. Cell Biol.* 181 (4): 683–695.
54. **Staehelein, L.A.** 1973. Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight

55. **Stevenson, B., Silicano, J., Mooseker, M., 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.
56. **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.
57. **Telgenhoff, D., Ramsay, S., Hilz, S., Slusarewicz, P., Shroot, B.** 2008. Claudin 2 mRNA and Protein Are Present in Human Keratinocytes and May Be Regulated by All-trans-Retinoic Acid. *Skin Pharmacol Physiol*, 21(4):211-217
58. **Tsukita, S. & Furuse, M.** 1999. Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol* 9 (7): 268–273.
59. **Tsukita, S. & Furuse, M.** 2000. Pores in the Wall: Claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* 149: 13 – 16.
60. **Tsukita, S., Furuse, M., Itoh, M.** 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 285 – 293.
61. **Umeda, K., Ikenouchi, J., Sayaka, K., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M. and Tsukita, S.** ZO-1 and ZO-2 Independently Determine where Claudins are polymerized in Tight-Junction Strand Formation. *Cell*. 126:741-754.
62. **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.
63. **Xu, Li, Overbeek, P. And Reneker, L.** 2002. Systematic analysis of E-, N- and P-cadherin expression in mouse eye development. *Exp. Eye Res.* 774: 753 – 760.
64. **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.
65. **Yoshida, K., Kanaoka, S., Takai, T., Uezato, T., Miura, N., Kajimura, M., Hishida, A.** 2005. EGF rapidly translocates tight junction proteins from the cytoplasm to the cell–cell contact via protein kinase C activation in TMK-1 gastric cancer cells *Exp Cell Res*, 309(2): 397–409.