



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

“DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE mRNA DE LAS PROTEÍNAS DE UNIONES
ESTRECHAS DE MUCOSA INTESTINAL DE LA GALLINA DOMÉSTICA”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

ELIZABETH AGUIRRE GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL: DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DR. JOSÉ FRANCISCO MONTIEL SOSA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, ENERO 2016.



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.

C O M I T É T U T O R

DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Departamento de Ciencias Biológicas
Unidad de Investigación Multidisciplinarias
Laboratorio de Morfología Veterinaria y Biología Celular. L4

DRA. MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Departamento de Morfología

DR. JOSÉ FRANCISCO MONTIEL SOSA

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Departamento de Ciencias Biológicas
Unidad de Investigación Multidisciplinarias
Laboratorio de Bioquímica L8

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Morfología Veterinaria y Biología Celular L4 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán FESC-C4-UNAM contando con el apoyo del Proyecto de Investigación “Morfología Veterinaria y Biología Celular” (clave PIAPIC15)

DEDICADA:

A Dios

A mis padres

A mis extraordinarios hermanos

A mis queridos sobrinos

*“Cuando hay una tormenta los pajaritos se esconden,
pero las águilas vuelan más alto”*

Mahatma Gandhi

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo económico brindado a través del PAEP.

Al CONACYT, por el apoyo otorgado mediante una beca para poder realizar mis estudios de Maestría en Ciencias de la Producción y Salud Animal.

Al laboratorio de Morfología Veterinaria y Biología Celular (L4), en el cual se desarrolló el trabajo de investigación.

A mi tutor el Dr. Carlos Gerardo García Tovar por su excelente asesoría durante todo el proceso de mi formación, realización y finalización del trabajo así mismo con la tesis.

A los integrantes de mi comité tutorial: Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda y Dr. José Francisco Montiel Sosa por sus aportaciones y apoyo para mejorar dicho proyecto.

A los miembros del jurado: Dr. Misael Rubén Oliver González, Dr. Daniel Martínez Gómez, Dr. Juan Carlos Del Río García y Dr. Mario Pérez Martínez por sus valiosos comentarios para mejorar esta tesis.

Al M en C. Francisco Rodolfo González Díaz por su invaluable apoyo y grandes aportaciones intelectuales y procedimentales para la realización de este trabajo.

Al M.V.Z. José Luis Nieto Bordes por su ayuda en la realización de diversos reactivos y apoyo en la fase experimental del trabajo.

Al Dr. Carlos Ignacio Soto Zarate por todos sus comentarios y sugerencias durante el desarrollo de dicho trabajo.

A la Dra. María Leonor Quintero Mora por las aportaciones iniciales que me brindo y hacer más entendibles los procedimientos.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES.

Agradezco infinitamente a Dios por permitirme estar en esta vida y seguir cumpliendo mis metas.

A mi mamá Isabel, a mi papá Ignacio † sé que sigue pendiente de mi desde el cielo, a mi hermana Montserrat y a mi hermano Alejandro que incondicionalmente me han apoyado y alentado cada momento para continuar con este proceso hasta su conclusión.

A mis sobrinos Fernando, Aarón y Gabriel que son seres con tanta energía y alegraban los días difíciles que llegue a tener.

A mi querida Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por permitirme realizar mis estudios de posgrado y seguir formando parte de su comunidad estudiantil.

A los doctores que me brindaron sus conocimientos en las diversas asignaturas que curse durante esta Maestría.

Al Dr. Carlos Gerardo García Tovar que además de ser un tutor muy paciente y dedicado es una excelente persona que me brindó su apoyo cada segundo así como invaluable consejos.

Al M en C. Francisco Rodolfo González Díaz por brindarme su amistad, por animarme a seguir adelante y por su enorme apoyo en el periodo de recuperación quirúrgica, estoy profundamente agradecida.

Al Dr. José Luis por sus amenas conversaciones que hacían que los días en el laboratorio pasarán rápidamente.

A todos y cada uno de mis amigos que siempre estuvieron apoyándome en cada momento Briss, Eli, Chayo, Lili a los nuevos amigos Lidia, Juan, Gaby, Chio, Anita, Rosita, Alejandro, Paúl, Eli, Diana y Mary que pude conocer durante la maestría, gracias por los inigualables momentos que compartimos.

A mis compañeros de trabajo y además amigos M en C. Rosario Martínez, MVZ. Liliana Zúñiga, MVZ. Reyna Pichardo, M en C. Gabriela Castillo, MVZ. Tere Cortes Ortiz, Dr. Germán Garrido, Dr. Rubén Oliver, Dr. Ignacio Soto y Dra. Leo que me han alentado a seguir adelante en esta travesía.

A todos los doctores del área de biológicas que me han brindado su constante apoyo para culminar con esta etapa tan importante en mi vida académica.

A todas aquellas personas que directa o indirectamente estuvieron presentes en esta gran etapa de mi vida.....

¡GRACIAS!

ÍNDICE	PÁGINA
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE CUADROS.....	IX
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
ABREVIATURAS.....	3
I. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. IMPORTANCIA DE LA PRODUCCIÓN AVÍCOLA EN MÉXICO	5
1.2. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DEL TRACTO INTESTINAL DE LAS AVES	5
1.3. PROCESOS DE ABSORCIÓN INTESTINAL EN AVES	7
1.4. UNIONES INTERCELULARES	7
1.5. UNIONES ESTRECHAS (TJS)	8
1.6. PROTEÍNAS QUE FORMAN A LAS UNIONES ESTRECHAS	8
1.7. OCLUDINAS	8
1.8. CLAUDINAS	9
1.9. FORMACIÓN DE HEBRAS DE UNIONES ESTRECHAS	12
1.10. SEÑALIZACIÓN QUE PARTICIPA EN LA REGULACIÓN DE LAS UNIONES ESTRECHAS	14
1.11. IMPORTANCIA DE LA BARRERA EPITELIAL COMO SISTEMA DE DEFENSA INMUNOLÓGICA DEL INTESTINO DELGADO Y GRUESO EN MAMÍFEROS Y AVES.	16
II. JUSTIFICACIÓN	17
III. HIPÓTESIS.....	18
IV. OBJETIVOS.....	19
4.1. OBJETIVO GENERAL	19
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
V. METODOLOGÍA	20
5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	20
5.2. DISEÑO Y ALINEAMIENTO DE INICIADORES.....	20
5.2.1. <i>Diseño de iniciadores para el gen de ocludina y claudina 1, 5 y 16.....</i>	<i>20</i>
5.2.2. <i>Iniciadores para el gen de claudina 2, 3, 10 y 12.....</i>	<i>21</i>
5.2.3. <i>Alineamiento de iniciadores para los genes a estudiar</i>	<i>23</i>
5.3. ANIMALES	23
5.4. COLECCIÓN DE MUESTRAS.....	23
5.5. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	24
5.6. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL.....	25
5.7. TÉCNICA RT-PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA POR TRANSCRIPTASA REVERSA).....	25
5.7.1. <i>Síntesis de cDNA.....</i>	<i>25</i>
5.7.2. <i>PCR punto final</i>	<i>25</i>
VI. RESULTADOS	28

ÍNDICE	PÁGINA
6.1. DISEÑO DEL INICIADOR FRONTAL Y REVERSO PARA LOS GENES DE OCLUDINA Y CLAUDINAS 1, 5 Y 16.....	28
6.2. ALINEAMIENTO DE INICIADORES CON SEQUENCHER	29
6.3. AISLAMIENTO DE LA TÚNICA MUCOSA DE LAS DIFERENTES REGIONES DEL INTESTINO	30
6.4. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO Y ELECTROFORÉTICO DEL RNA EN MUESTRAS DE MUCOSA DE LA GALLINA DOMÉSTICA CON 6 A 8 SEMANAS DE EDAD	30
6.5. AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS MEDIANTE RT-PCR.....	33
VII. DISCUSIÓN	46
VIII. CONCLUSIONES.....	52
IX. PERSPECTIVAS	53
X. ANEXOS.....	54
10.1. TÉCNICA DE PARAFINADO	54
10.2. TÉCNICA DE DESPARAFINADO	54
10.3. TINCIÓN HEMATOXILINA—EOSINA.....	54
10.4. EXTRACCIÓN DE RNA CON MINI KIT AMBION	55
10.5. ESPECTOFOTOMETRÍA DE LA MUESTRA DE RNA OBTENIDA	56
10.6. ELECTROFORESIS HORIZONTAL DE LA MUESTRA DE RNA	56
10.7. SÍNTESIS DE cDNA (ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO DE CADENA COMPLEMENTARIA).....	57
10.8. CUANTIFICACIÓN DE cDNA CON NANODROP	57
10.9. ALINEAMIENTO DE INICIADORES	58
XI. REFERENCIAS.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Anatomía del aparato digestivo de la gallina doméstica (*Gallus gallus domesticus*)
- Figura 2. Histología del intestino
- Figura 3. Modelo de la proteína ocludina
- Figura 4. Modelo de la proteína claudina
- Figura 5. Procedimiento para el diseño de iniciadores (iniciadores)
- Figura 6. Imágenes mostrando la obtención de la muestra en estudio
- Figura 7. Fases de la PCR
- Figura 8. Alineamiento de los iniciadores en el gen de claudina 1
- Figura 9. Túnica mucosa del segmento íleon intestinal de la gallina doméstica
- Figura 10. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.5% de los extractos de RNA
- Figura 11. Análisis electroforético de los productos obtenidos por RT-PCR de claudina 1 al emplear los iniciadores reportados por Ozden, 2009.
- Figura 11a. Análisis electroforético de los productos obtenidos por RT-PCR de claudina 1 utilizando los iniciadores diseñados en este trabajo.
- Figura 12. Análisis electroforético de los productos obtenidos por RT-PCR de claudina 2
- Figura 13. Análisis electroforético de RT-PCR de claudina 3
- Figura 14. Análisis electroforético de RT-PCR de claudina 5
- Figura 15. Análisis electroforético de RT-PCR de claudina 10
- Figura 16. Análisis electroforético de RT-PCR de claudina 12
- Figura 17. Análisis electroforético de RT-PCR de claudina 16
- Figura 18. Análisis electroforético de RT-PCR de ocludina

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Claudinas y ocludina expresadas en mamíferos y aves

Cuadro 2. Iniciadores empleados para la identificación del gen de ocludina, claudinas y β -actina

Cuadro 3. Condiciones de la PCR para las diferentes proteínas

Cuadro 4. Cantidad de RNA obtenido de las muestras en estudio

Cuadro 5. Determinación de la pureza del RNA (relación de lecturas 260/280 nm) obtenido

Cuadro 6. Presencia del producto amplificado en embrión de pollo con el tamaño esperado para cada una de las muestras.

Cuadros 7. Presencia del producto amplificado en gallina doméstica (*Gallus gallus domesticus*) con el tamaño esperado para cada una de las muestras.

RESUMEN

Las uniones estrechas están formadas principalmente por dos proteínas, claudina y ocludina. Son fundamentales para mantener la integridad y la función de barrera del epitelio intestinal, a través del cual se realiza la absorción de nutrientes principalmente por transcitosis, sin embargo en aves el 90 % de las sustancias son absorbidas por vía paracelular; un problema que se presenta al aumentar este transporte, es el riesgo de una mayor absorción de toxinas y patógenos, lo cual podría ser controlado por mecanismos de remodelación de las uniones estrechas. En la actualidad estos mecanismos no se conocen adecuadamente, de ahí la necesidad de determinar en principio las proteínas que forman las uniones estrechas de animales adultos, ya que realizan de manera diferencial la doble función de barrera y permeabilidad, siendo el objetivo de este trabajo determinar la expresión del mRNA de las proteínas claudinas 1, 2, 3, 5, 10, 12, 16 y ocludina, en las diferentes regiones del intestino (duodeno, yeyuno, íleon, ciego y recto) del pollo (*Gallus gallus domesticus*) de 6-8 semanas de edad por medio de la técnica RT-PCR. Para cumplir con el objetivo del trabajo se planteó un diseño experimental que consistió en adquirir pollos machos, de 6-8 semanas de edad, con un peso promedio de 4kg, destinados para abasto y embriones de pollo con 16 días de incubación (como control positivo). En todos los casos se realizó la toma de muestras de las diferentes regiones del tracto intestinal; extracción de RNA y realización de la técnica de RT-PCR; finalmente la visualización de los amplificados de acuerdo a los iniciadores empleados.

Los resultados mostraron un amplificado de 196 pares de bases (pb) para claudina 1 en el control positivo y un amplificado de 350 pb en las muestras de pollos de 6 a 8 semanas de edad, ello utilizando iniciadores reportados en la literatura; un nuevo par de iniciadores diseñados por nosotros, detectó un amplificado de 662pb en todos los segmentos intestinales, tanto en muestras de embrión como en las aves empleadas en este trabajo.

Claudina 2 (162pb), 5 (224pb), 10 (687pb), 12 (738pb), 16 (191pb) y ocludina (430pb), se encontraron en todos los segmentos del intestino en etapa embrionaria, coincidiendo con lo reportado en la literatura. Evidenciando por primera vez su presencia en los segmentos ciego y recto.

En este trabajo se reporta por primera vez la expresión del mRNA de ocludina y claudinas en estudio, en los cinco segmentos intestinales.

A partir de los resultados obtenidos se concluye que se logró evidenciar la expresión del mRNA para las principales proteínas involucradas en la formación de las uniones estrechas en todo el tracto intestinal de la gallina doméstica de 6 a 8 semanas de edad.

Palabras clave: Gallina doméstica, mRNA, claudina, ocludina, uniones estrechas y RT-PCR.

ABSTRACT

Tight junctions are mainly formed by two proteins, claudin and occludin. They are essential for maintaining the integrity and barrier function of the intestinal epithelium, through which nutrient absorption takes place mainly by transcytosis, however in birds 90% of the substances are absorbed through paracellular transport; a problem that occurs when you increase this transport is the risk of increased absorption of toxins and pathogens, which could be controlled by mechanisms remodeling of the tight junctions. At present, these mechanisms do not in principle need to identify the proteins that form tight junctions in animals 6 to 8 weeks old as they perform differentially dual permeability barrier function properly described. Therefore, the aim of this study was to determine mRNA expression of claudins 1, 2, 3, 5, 10, 12, 16 and occludin in different regions of the intestine (*duodenum*, *jejunum*, *ileum*, *cecum* and *rectum*) mature chicken (*Gallus gallus domesticus*) by via RT-PCR. To meet the objective of this study an experimental design that was to acquire male chickens, 6-8 weeks of age, with an average weight of 4kg, destined for slaughter and chicken embryos with 16 days of incubation (as a positive control was raised). In all cases the sampling of the different regions of the intestinal tract were then collected; RNA extraction and realization of the RT-PCR were performed using specific iniciadores.

The results showed an amplified product of 196 base pairs (bp) to claudin 1 in the positive control and an amplified 350 bp in samples of chickens 6 to 8 weeks old, thereby using iniciadores reported in the literature; a new pair of iniciadores designed by us, 662bp detected an amplified across the intestinal segments, both samples embryo and chickens 6 to 8 weeks old.

Claudina 2 (162bp), 5 (224bp), 10 (687bp), 12 (738bp), 16 (191bp) and occludin (430bp), were found in all segments of the intestine in an embryonic stage, coinciding with those reported in the literature. Demonstrating for the first time it is presence in *cecum* and *rectum*.

We reported for the first time in this study, the mRNA expression of occludin and claudins study in the five intestinal segments.

From the results obtained it concluded that evidence is obtained of mRNA expression for the major proteins involved in the formation of tight junctions in the intestinal tract of domestic fowl, 6-8 weeks of age.

Keywords: chicken, mRNA, claudin, occludin, tight junctions and RT-PCR.

ABREVIATURAS

TJs	Uniones estrechas	pH	Potencial de hidrogeniones
μl	Microlitro	JAM	Molécula de adhesión a la unión
D	Duodeno	ZO	Zónula ocludens
Y	Yeyuno	kDa	Kilodaltones
I	Íleon	TER	Resistencia transepitelial
C	Ciego	PDZ	Dominio de unión
R	Recto	EL	Asa extracelular
Mpb	Marcador de pares de bases	TM	Dominio transmembrana
dNTP's	Desoxirribonucleotidos trifosfatos	IL	Asa intracelular
mRNA	RNA mensajero	GUK	Dominio guanilato quinasa
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa	SH3	Dominio homólogo Src3
T°C	Temperatura grados centígrados	NH2	Extremo amino terminal
pb	Pares de bases	COOH	Extremo carboxilo terminal
BL	Buffer de Lisis	MDCK	Línea celular de riñón de canino
rpm	Revoluciones por minuto	Cldn	Claudina
TBE	Solución buffer tris base, ácido bórico y EDTA	Ca	Calcio
EDTA	Ácido Etilen Diamino Tetracético	μm	Micrómetros
DEPC	Dietilpirocarbonato	PKC	Proteína quinasa C
μg	Microgramos	PKA	Proteína quinasa A

ng	Nanogramos	PP1,2,2B	Proteína fosfatasa 1,2 y 2B
Oligo dT	Oligonucleótido Timina	Thr	Treonina
Ser	Serina	UV	Ultravioleta
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno	TNF-α	Factor de Necrosis tumoral alfa
IL-1	Interleucina 1	PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PRR	Receptores de reconocimiento de un patrón	Kg	Kilogramos
H-E	Hematoxilina-Eosina	PBS	Buffer Salino de fosfatos
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario	MI	Mililitros
M-MLV RT	Enzima transcriptasa reversa	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Tm	Temperatura de fusión	A	Adenina
T	Timina	G	Guanina
C	Citosina	Min	Minutos
Seg	Segundos	MgCl₂	Cloruro de magnesio
KCl	Cloruro de potasio	Primer F	Iniciador frontal
Primer R	Iniciador reverso	BrE	Bromuro de Etidio
Nm	Nanómetros	SC	Segmento completo
M	Túnica mucosa	RNA	Ácido ribonucleico
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosa		

I. INTRODUCCIÓN

1.1. *Importancia de la producción avícola en México*

La avicultura es una actividad económica sumamente importante en nuestro país ya que es una de las ramas de la ganadería mexicana con mayor tradición, también lo es a nivel mundial ocupando el quinto lugar en producción de huevo y el séptimo en producción de carne de pollo. Dentro de la producción pecuaria la avicultura representa el 63% (huevo 29%; pollo 34.1% y pavo 0.1%), en comparación a la porcicultura (14.5%) y a la producción bovina (20.6%). En 2014, en México se produjeron un total de 5, 605,295 toneladas de huevo, carne de pollo y pavo, con un valor de 133,543 millones de pesos. Asimismo, es una industria altamente dinámica que ha logrado no solo sostener sino incrementar su crecimiento, de tal manera, que por ejemplo, en la década pasada la producción de huevo mostró un aumento de 76%, mientras que en la producción de pollo fue de 119%, y los empleos en el sector aumentaron un 73%. En el mismo sentido se prevé que crecerá un 2.5% para el 2015 (UNA, 2014).

Las aves son destinadas de manera primordial para la producción de carne y huevo, por lo cual es de suma importancia mantener la salud del tracto gastrointestinal, lo cual conlleva a una buena absorción de nutrientes y finalmente a una mayor productividad (Gregus, 2014).

1.2. *Anatomía e Histología del tracto intestinal de las aves*

En las aves el aparato digestivo presenta algunas diferencias a nivel anatómico e histológico en comparación con el de los mamíferos, lo cual hace interesante su estudio dada la mayor eficiencia productiva de estos animales.

El aparato digestivo está constituido por órganos encargados de la recepción, reducción mecánica, digestión química y absorción del alimento sólido y líquido; así como de la eliminación de los residuos no absorbidos. En las aves el aparato digestivo consta de: cavidad oral, faringe, esófago, ingluvia, estómago (proventrículo y ventrículo), intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) y el intestino grueso (2 ciegos y el recto); este último termina en la cloaca, órgano en el que desembocan los órganos urinarios y genitales (Figura 1). La diferencia principal con respecto a los mamíferos es que en las aves el íleon es más largo y el intestino grueso en mamíferos está formado por ciego, colon y recto que termina en el canal anal en comparación con las aves que solo consta de 2 segmentos. (Dyce *et al.*, 2012; Clara, 2008).

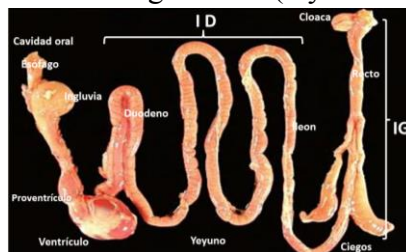


Figura 1. Anatomía del aparato digestivo de la gallina doméstica (*Gallus gallus domesticus*) (EAG, 2015).

Las glándulas anexas poseen conductos que se abren hacia la cavidad oral (glándulas salivares) o al intestino delgado (hígado y páncreas) (Dyce *et al.*, 2012; Whittow, 2000; Guadarrama, 1991). El vestigio del saco vitelino (divertículo de Meckel) se puede encontrar aproximadamente en la mitad del intestino delgado y se toma como punto de división entre yeyuno e íleon (asa axial). En las aves adultas la longitud del tracto digestivo entero puede alcanzar los 210 cm o más. En general los intestinos son relativamente más cortos que en los mamíferos (Reece, 2004).

Histológicamente el intestino se conforma de 4 túnicas: mucosa, submucosa, muscular y serosa. La primera es la túnica mucosa, la cual está formada por un epitelio que presenta células de revestimiento (epiteliocitos absorbentes) de forma columnar cuyo borde apical presenta microvellosidades, núcleo ovoide y en posición basal, los exocrinocitos caliciformes son otras células típicas y tienden a aumentar en número conforme se aproximan al recto, también se encuentran células enteroendócrinas, exocrinocitos con gránulos acidófilos (células de Paneth) y células M que realizan la endocitosis y el transporte de macromoléculas en vesículas a través de su citoplasma hacia la membrana basolateral, donde son liberados al espacio extracelular. La membrana basolateral de las células M presenta una profunda invaginación que alberga linfocitos y macrófagos, encargados de procesar los antígenos para la posterior presentación antigénica (Campos, 2014; Dyce *et al.*, 2012; Alberts *et al.*, 2015; Díaz, 2008; Ramiro-Puig *et al.*, 2008). La lámina propia de la mucosa está compuesta por tejido conectivo colágeno laxo con muchas fibras reticulares, granulocitos y agranulocitos. La tela submucosa es de tejido conectivo colágeno laxo con glándulas submucosas simples, ramificadas y tubuloacinares, se abren hacia las criptas; presenta gran cantidad de tejido linfático nodular. La túnica muscular es de músculo liso el cual se divide en 2 estratos, el circular interno y el longitudinal externo. Por último, la túnica serosa se encuentra compuesta por tejido conectivo colágeno laxo y un mesotelio (Figura 2), (Garthner *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2000; Banks, 1996).

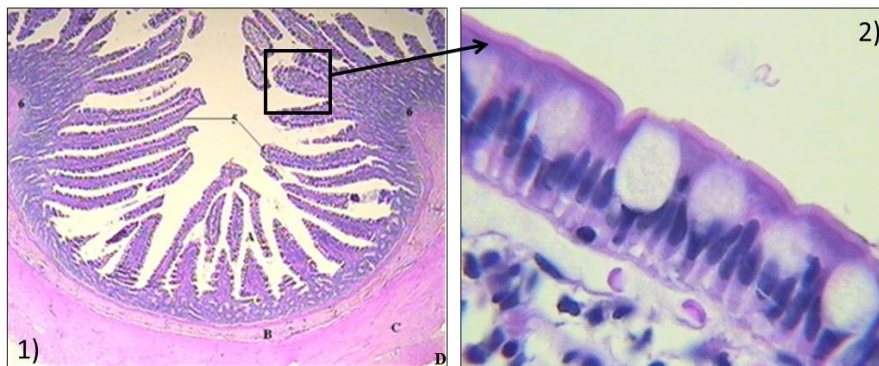


Figura 2. Histología del intestino. 1) Corte transversal del intestino delgado (A: Túnica mucosa, B: Tela submucosa, C: Túnica muscular y D: Túnica serosa) Tinción H-E. Objetivo 4x. 2) Mayor aumento del recuadro en 1) observa el epitelio intestinal en el cual se aprecian dos tipos celulares epiteliocitos absorbentes con microvellosidades y exocrinocitos caliciformes. Tinción H-E. Objetivo 100x (EAG, 2012)

Además, la túnica mucosa del intestino delgado presenta una serie de pliegues o vellosidades (con forma de elipse) que le sirven para crear un área de contacto enfocada a optimizar los procesos de secreción y absorción de nutrientes (Morales, 2007), se vuelve progresivamente más delgada desde el duodeno hasta el íleon, mientras que las vellosidades se vuelven más cortas y la

profundidad de las criptas disminuye. El intestino delgado es el principal lugar donde se produce la digestión química mediante la acción de las enzimas digestivas. En cuanto al potencial de hidrogeniones (pH) del tracto intestinal se encuentra entre los rangos de aproximadamente 5.6 y 7.2. El tiempo necesario para que el alimento pase a través de todo el tracto digestivo es generalmente más largo en los herbívoros y más corto en los carnívoros, frugívoros y aves (Reece, 2004).

1.3. *Procesos de absorción intestinal en aves*

Como se ha mencionado, el tracto digestivo del ave se considera corto y simple en comparación con el del mamífero; sin embargo, es sabido que es altamente eficiente para los procesos de digestión y absorción de los nutrientes (Morales, 2007).

Las células que conforman el epitelio intestinal forman una lámina que actúa como una barrera que separa el lumen intestinal del fluido intersticial subepitelial que permea al tejido conectivo de la lámina basal. Para lograr la función de absorción del intestino; el paso de moléculas puede ser mediante un proceso de transcitosis (a través de la célula) o bien tránsito paracelular (entre las células). La transcitosis implica la endocitosis de moléculas desde el polo apical de los enterocitos absorbentes. En el tránsito paracelular las moléculas absorbidas principalmente aminoácidos y azúcares, pasan entre las células a través de los complejos de unión, los cuales están constituidos por uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas (Alberts *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2012; Anderson *et al.*, 1995).

1.4. *Uniones intercelulares*

En general las uniones celulares especializadas pueden estar en regiones de contacto célula-célula y célula-matriz de todos los tejidos y mayoritariamente en los epitelios; se clasifican en tres grupos funcionales:

1. Uniones oclusivas: proporcionan un sellado de la región situada entre las células epiteliales, el cual limita el paso incluso de pequeñas moléculas entre las dos caras del epitelio. Incluye las uniones estrechas (TJs).
2. Uniones de anclaje: unen mecánicamente las células a sus vecinas o a la matriz extracelular. En este grupo están las zonas de anclaje de filamentos de actina: a) uniones adherentes (célula –célula) y b) adhesiones focales (célula-matriz) y zonas de anclaje de filamentos intermedios: a) desmosomas (célula-célula) y b) hemidesmosomas (célula-matriz).

3. Uniones comunicantes: median el paso de señales eléctricas entre las células adyacentes. Incluye: uniones de tipo gap.
4. Uniones de relevo de señal: sinapsis químicas y sinapsis inmunológicas (Alberts *et al.*, 2015).

1.5. Uniones estrechas (TJs)

Las uniones estrechas son un elemento del complejo de unión en células epiteliales y endoteliales, forman un cinturón entre la membrana plasmática del dominio lateral cerca del polo apical, lo cual sirve como barrera primaria a la difusión de solutos, regulando el tránsito paracelular y creando la polarización de dichas células (Furuse *et al.*, 1993).

Las uniones estrechas son fundamentales para mantener la integridad y función de la barrera de las células del epitelio y del endotelio (Furuse, 2010); desempeñando dos roles, el primero, restringir el movimiento de proteínas entre el compartimiento basolateral y apical; el segundo, regular el paso de iones y moléculas pequeñas en el espacio paracelular (Collins *et al.*, 2013).

1.6. Proteínas que forman a las uniones estrechas

Las principales proteínas que integran las uniones estrechas en mamíferos son claudina, ocludina, tricelulina, molécula de adhesión a la unión (JAM) y Marvel D3; que son proteínas de adhesión transmembranal que se unen homotípicamente a su contraparte de las células vecinas ocluyendo el espacio existente entre ellas, estas proteínas se unen a filamentos de actina mediante proteínas de la familia zónula ocludens (ZO). (Elkouby-Naor *et al.*, 2010; Karcher *et al.*, 2008; Alberts *et al.*, 2015; Fanning *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 1995).

Principalmente se reporta la presencia de ocludina y claudina como miembros de las uniones estrechas, ambas cruzan la membrana celular cuatro veces, creando así dos bucles extracelulares y uno intracelular, además de los dominios amino y carboxi terminal (Cording *et al.*, 2013; Assimakopoulos, 2011; Raleigh *et al.*, 2010).

1.7. Ocludinas

El nombre proviene del verbo latino "*occludere*", lo que significa restringir el paso, estas son proteínas altamente conservadas entre mamíferos y aves. Recientemente se ha reportado sólo una isoforma de ocludina resultante de un splicing alternativo (Muresan *et al.*, 2000). Ocludina sólo se expresa en condiciones normales en las células que forman uniones estrechas. El tamaño de ocludina varía con la especie, por ejemplo ocludina de pollo es de 55.9—62 kilodaltones (kDa),

mientras que ocludina humana es 82 kDa. Ocludina de cerdos se compone de 504 aminoácidos (Assimakopoulos, 2011; Yakey *et al.*, 2010; Lapierre L, 2000; Furuse *et al.*, 1993).

Los cuatro dominios transmembrana que contiene consisten de 21-24 residuos de aminoácidos, en su mayoría hidrófobos. Los dos bucles extracelulares son de 43 aminoácidos de longitud cada uno y el bucle intracelular cuenta con 10 aminoácidos de longitud. Ambos bucles extracelulares son ricos en tirosina y glicina (entre 20-30%) (Figura 3).

En la secuencia de aminoácidos de ocludina no parece existir alguna secuencia señal típica en el extremo amino terminal, el cual es intracelular y contiene 57 aminoácidos, y no hay sitio de enlace de N-glicosilación (Figura 3); el contenido de residuos de alanina, tirosina, serina y glicina es altamente característico (9.3, 9.1, 8.9 y 8.9%, respectivamente). Esta porción contiene un dominio WW (PPYP), que está participando en el motivo de interacción con otras proteínas de señalización y reguladoras (Furuse *et al.*, 1993).

La parte carboxilo terminal intracelular es muy larga (50% de la secuencia) tiene varios sitios potenciales de interacción con otras macromoléculas y sitios de fosforilación (Figura 3). Se trata de una secuencia altamente hidrófila, que contiene tramos de aminoácidos cargados, como EEEEE (aa 347-351) y RRGRRRRR (aa 363-370). Se ha propuesto que el sitio y el grado de fosforilación de ocludina son parámetros importantes en la definición de la localización y la función de la molécula (Assimakopoulos, 2011).

Por ejemplo, ocludina altamente fosforilada, especialmente en residuos serina/treonina, se detecta principalmente en la zona de unión y se correlaciona con la permeabilidad transcelular restringida. Por el contrario, ocludina no fosforilada se detecta intracelularmente, en el compartimento vesicular, y se considera que contribuye menos a la permeabilidad transcelular. Estas son un grupo de macromoléculas fácilmente sometidas a estímulos reguladores, donde el sitio de fosforilación es importante; sugiriéndose que el alto grado de fosforilación en residuos de tirosina se correlaciona con la pérdida de la función y una mayor permeabilidad transcelular (Cording *et al.*, 2013; Cummins, 2012; Assimakopoulos, 2011; Shufeng Liu *et al.*, 2009; González-Mariscal *et al.*, 2007; González-Mariscal *et al.*, 2003; Lapierre, 2000; Furuse *et al.*, 1993).

1.8. Claudinas

El nombre claudina proviene del verbo latino "*claudere*", que significa "cerca". Es una familia de proteínas multigénica que consta de aproximadamente 24 miembros en humanos y ratones (Assimakopoulos, 2011; Furuse, 2010; Angelow *et al.*, 2008; Fujita *et al.*, 2006); en embriones de pollo se ha observado su presencia en diferentes órganos (Collins *et al.*, 2013). Son proteínas transmembranales con un peso molecular que va de 20 a 27 kDa, siendo componentes estructurales y funcionales (Furuse, 2010) extremadamente cruciales para la formación de las

uniones estrechas; conforman una red transmembrana y transeleular que sirve a la permeabilidad paracelular, la polarización epitelial y la conservación de la resistencia transeleular (TER), así como la permeación selectiva de moléculas y de iones con carga. Poseen un extremo amino-terminal intracelular, cuatro segmentos transmembrana que forman dos bucles extracelulares, un bucle intracelular y una cola carboxi terminal corta intracelular (Figura 4). La primera y la cuarta parte transmembrana, así como el primer y segundo bucle extracelular están muy conservados, mientras que la cola C-terminal tiene la mayor variabilidad entre los miembros de la familia de las claudinas (Assimakopoulos, 2011; González-Mariscal *et al.*, 2007).

El primer bucle extracelular, compuesto por aproximadamente 50 aminoácidos, es más largo e hidrofóbico que el segundo, también contiene aminoácidos cargados cuyo, número y distribución depende del subtipo de claudina, lo que determina la selectividad de carga y la conductancia en el transporte paracelular. El segundo bucle extracelular contiene aproximadamente 20 aminoácidos, se tiene la hipótesis que se pliega en hélice-giro-hélice y forman dímeros, por lo que es posiblemente responsable del contacto célula a célula. Contiene muchos residuos cargados, que regulan la afinidad para los iones y, posiblemente, forma canales paracelulares selectivos de iones. La cola C-terminal contiene un dominio de unión PDZ el cual une a las proteínas ZO1, 2 y 3, MUPP-1, PATJ e influye en la estabilidad de las claudinas y su focalización en las uniones estrechas. Casi todas las claudinas tienen una secuencia Tyr-Val C-terminal, que actúa como un motivo de interacción del dominio PDZ. (Assimakopoulos, 2011; Furuse, 2010; Shufeng Liu *et al.*, 2009; Angelow *et al.*, 2008; González-Mariscal *et al.*, 2003).

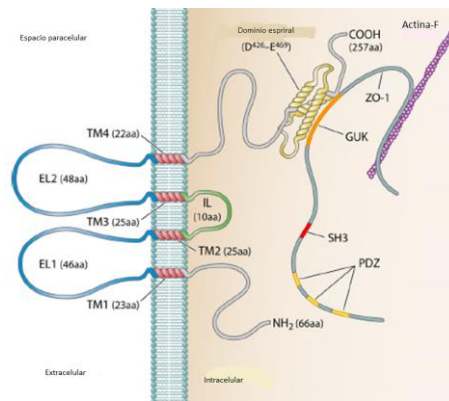


Figura 3. Modelo de la proteína ocludina. EL1, EL2, primera y segunda asa extracelular; TM1 a TM4, dominio transmembrana 1 a 4; IL, asa intracelular; GUK, dominio guanilato quinasa; SH3, dominio homólogo Src3 (Modificado de Cummins, 2012).

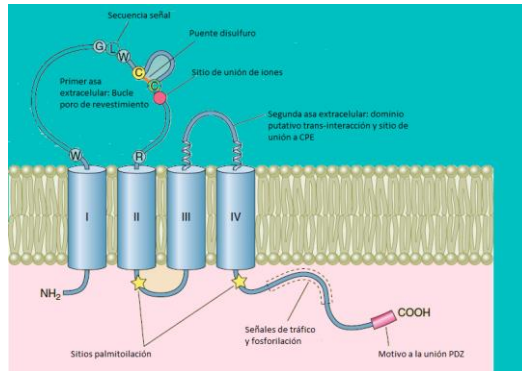


Figura 4. Modelo de la proteína claudina. Se muestra la topología y la estructura secundaria y los dominios funcionales propios. Los dominios transmembrana α helicoidal propios están señalados con números romanos (Modificado de Günzel *et al.*, 2013).

La región C-terminal citoplasmática de varias claudinas tienen residuos de serina o treonina fosforilados, esta modificación parece regular la localización de las claudinas y las propiedades de barrera en las uniones estrechas, pero los mecanismos moleculares son desconocidos (Furuse, 2010).

Las claudinas juegan un papel importante en la función de barrera epitelial, ya que se sabe que las diferencias en la densidad y/o tortuosidad de las hebras y/o combinación en el radio de mezcla de los miembros de la familia de estas proteínas podría determinar las propiedades de barrera de las uniones estrechas (Angelow *et al.*, 2008; González-Mariscal *et al.*, 2003).

Investigaciones realizadas en pollos durante el desarrollo embrionario, indican que la diferenciación del epitelio intestinal se produce entre los días 14 y 21, los cambios morfológicos incluyen formación de vellosidades, microvellosidades, cambios en la forma celular, y aumento en la cantidad de exocinocitos caliciformes; también se señala que existe el aumento en la capacidad del epitelio para transportar glucosa y de su preparación para la absorción que se requiere después de la eclosión. Existiendo además reportes de la expresión diferencial de claudinas 3, 5 y 16 dependiendo del sitio de localización; claudina 3 solo se identificó en las vellosidades, claudina 5 en las criptas y parte baja de las vellosidades y claudina 16 en los exocinocitos caliciformes de la parte alta de las vellosidades, por lo que pudieran tener una función durante la diferenciación (Ozden *et al.*, 2010).

Por otro lado, estudios realizados empleando células MDCK han reportado que dominios específicos de las claudinas son importantes en regular el tránsito paracelular, así como también que la distribución diferencial de claudinas en los tejidos conduce a la gran variedad de resistencia eléctrica y de permeabilidad observada entre láminas epiteliales y endoteliales (Karasov, 2011; Haworth *et al.*, 2005; Balda *et al.*, 2000).

Diversas claudinas son expresadas tanto en mamíferos como en embriones de pollos durante diversos estadios de desarrollo; pero también en otros órganos de las gallinas adultas, por ejemplo en oviducto (Bambang *et al.*, 2013). En el cuadro 1 se resumen las principales claudinas y ocludina participantes en uniones estrechas de diferentes endotelios y epitelios.

Cabe destacar que no se tienen reportes que indiquen diferencias en la conformación estructural de las proteínas que integran las uniones estrechas en intestinos delgado y grueso.

1.9. Formación de hebras de uniones estrechas

En la gran mayoría de tipos de células epiteliales, diferentes subtipos de claudinas se coexpresan; las combinaciones y proporciones dependen de los tipos de células, creando así la diversidad bioquímica de las uniones estrechas. Varios estudios indican que las hebras de las uniones estrechas están constituidas por mosaicos de múltiples subtipos de claudinas. Así también en la misma unión estrecha se pueden observar diferencias de los subtipos de claudinas expresadas en las hebras que las forman; por ejemplo, en los contactos entre células ciliadas externas y células Dieter en el oído interno claudina-14 se concentra en hebras de la parte apical mientras que claudinas 6 y 9 se localizan en hebras laterales, lo que sugiere que la compatibilidad heteromérica depende de la combinación (Nunes *et al.*, 2006). Algunas claudinas no pueden formar hebras de uniones estrechas por sí mismas (Furuse, 2010).

Las uniones estrechas *in vivo* generalmente expresan 2 tipos de claudinas, con dos excepciones notables, los oligodendrocitos y los endocrinocitos sustentaculares (células de Sertoli), que expresan solo claudina 11. Las claudinas también se caracterizan por un patrón de expresión tisular diferencial y una selectividad de desarrollo. Algunos miembros de la familia de claudinas son receptores para ligandos extracelulares, como la enterotoxina de *Clostridium perfringens*, que se une directamente a claudina 4 (alta afinidad) y claudina 3 (baja afinidad) (Assimakopoulos, 2011; Sakai *et al.*, 2007).

Al comparar la secuencia de aminoácidos de las claudinas con las proteínas conocidas se encontraron similitudes con al menos tres proteínas asociadas a la membrana, las obtenidas de la próstata ventral de rata-1, del receptor de la enterotoxina de *Clostridium perfringens* y la proteína específica de oligodendrocitos.

Por otro lado las uniones estrechas son estructuras dinámicas que pueden ensamblarse y desensamblarse dependiendo de los requerimientos funcionales de las células (Takahashi *et al.*, 2008). Existen mecanismos que permiten la internalización de claudinas que puede conducir a la reestructuración de las uniones estrechas a partir de señales extra o intracelulares que induzcan su modificación, incluyendo aquellas relacionadas con el movimiento de células a través de células adyacentes (Matsuda *et al.*, 2004). Así mismo se ha reportado que las células dendríticas, median

un nuevo mecanismo de absorción bacteriana, envían dendritas que expresan proteínas de uniones estrechas (occludina, claudina 1, zónula ocludens 1) a través de los espacios entre las células epiteliales, que disocian las interacciones intercelulares y producen la creación de otras nuevas, de esta manera, pasan sus dendritas a la superficie de los epitelios sin perturbar la integridad de la barrera epitelial (Blank *et al.*, 2011; Assimakopoulos, 2011; Rescigno *et al.*, 2001).

Cuadro 1. Claudinas y occludina expresadas en mamíferos y aves.




CLAUDINA	ESPECIE	FUNCIÓN	REFERENCIA
Claudina (Cldn) 1	Embrión de pollo (intestino) y mamífero (intestino: duodeno, yeyuno e íleon)	Propiedades de barrera	Collins <i>et al.</i> , 2013; Zhe Lu <i>et al.</i> ,2013; Amasheh <i>et al.</i> ,2011; Ozden, 2009
Cldn 2	Embrión de pollo (endodermo/ intestino) y mamífero (intestino: duodeno, yeyuno e íleon)	Se cree son formadoras de poros /Permeabilidad paracelular: canal paracelular para cationes pequeños	Collins <i>et al.</i> , 2013; Zhe Lu <i>et al.</i> ,2013; Amasheh <i>et al.</i> ,2011
Cldn 3	Embrión de pollo (endodermo/intestino) y mamífero (intestino: duodeno, yeyuno e íleon)	Transporte paracelular	Zhe Lu <i>et al.</i> ,2013; Amasheh <i>et al.</i> ,2011; Ozden <i>et al.</i> , 2010
Cldn 4	Embrión de pollo y mamífero	Propiedades de barrera	Collins <i>et al.</i> , 2013; Zhe Lu <i>et al.</i> ,2013; Amasheh <i>et al.</i> ,2011
Cldn 5	Embrión de pollo (intestino) y mamífero (intestino: duodeno, yeyuno e íleon)	Propiedades de barrera	Zhe Lu <i>et al.</i> ,2013; Collins <i>et al.</i> , 2013; Amasheh <i>et al.</i> ,2011; Ozden <i>et al.</i> , 2010
Cldn 6	Embrión de pollo y mamífero	Propiedades de barrera	Collins <i>et al.</i> , 2013
Cldn 7	Mamíferos	Permeabilidad paracelular para cationes y aniones pequeños	Zhe Lu <i>et al.</i> ,2013; Amasheh <i>et al.</i> ,2011
Cldn 8	Embrión de pollo y mamífero	Propiedades de barrera	Collins <i>et al.</i> , 2013; Zhe Lu <i>et al.</i> ,2013; Amasheh <i>et al.</i> ,2011
Cldn 9	Embrión de pollo y mamífero	Propiedades de barrera	Collins <i>et al.</i> , 2013; Zhe Lu <i>et al.</i> ,2013
Cldn 10	Embrión de pollo (endodermo) y mamífero (intestino: duodeno, yeyuno e íleon)	Se cree son formadoras de poros/Permeabilidad paracelular: canal paracelular para aniones pequeños	Collins <i>et al.</i> , 2013; Zhe Lu <i>et al.</i> ,2013; Amasheh <i>et al.</i> ,2011
Cldn 11	Embrión de pollo y mamífero	Propiedades de barrera	Collins <i>et al.</i> , 2013; Zhe Lu <i>et al.</i> ,2013; Amasheh <i>et al.</i> ,2011
Cldn 12	Embrión de pollo (endodermo) y mamífero (intestino: duodeno, yeyuno e íleon)	Permeabilidad paracelular transporte de Ca	Zhe Lu <i>et al.</i> ,2013; Amasheh <i>et al.</i> ,2011
Cldn 13	Mamíferos	No determinada	Zhe Lu <i>et al.</i> ,2013; Amasheh <i>et al.</i> ,2011
Cldn 14	MDCK II; intestino de ratón	Propiedades de barrera	Zhe Lu <i>et al.</i> ,2013; Amasheh <i>et al.</i> ,2011
Cldn 15	Embrión de pollo (endodermo) y mamífero	Se cree son formadoras de poros/ Formación de TJs en intestino delgado	Collins <i>et al.</i> , 2013; Zhe Lu <i>et al.</i> ,2013; Amasheh <i>et al.</i> ,2011
Cldn16	Embrión de pollo (endodermo/ intestino) y mamífero (intestino: duodeno, yeyuno e íleon)	Transporte paracelular de cationes bivalentes / iones calcio (Ca) en diferentes epitelios e intestino de pollo	Collins <i>et al.</i> ,2013; Ozden <i>et al.</i> , 2010
Cldn 17 y 18	Mamíferos	No determinada	Zhe Lu <i>et al.</i> , 2013
Cldn 19	Embrión pollo, neurilemnocitos (células de Schwann)	Propiedades de barrera	Collins <i>et al.</i> , 2013; Amasheh <i>et al.</i> , 2011
Cldn 22 y 23	Endodermo de embrión de pollo	No determinada	Collins <i>et al.</i> , 2013
Occludina	Mamíferos	Se expresa en células que forman uniones estrechas	Cummins, 2012; Felman <i>et al.</i> , 2005; Muresan <i>et al.</i> , 2000

De hecho se postula que las uniones estrechas se remodelan repetidamente y cubren dos aspectos aparentemente contradictorios: rearrreglos celulares dentro de las láminas epiteliales y mantenimiento de la función de barrera (Takahashi *et al.*, 2008), lo cual sería de gran importancia para favorecer la absorción de nutrientes por la vía paracelular.

Karcher *et al.* (2008) reportan que en el epitelio intestinal de las aves el 90 % de las sustancias (iones, nutrientes, etcétera) son absorbidas por esta vía a través de poros con radios de 0,003 a 0,004 micrómetros (μm) los cuales están presentes en las uniones estrechas, estos podrían depender de los componentes estructurales de las uniones estrechas en un momento determinado y podría explicar porque las aves tienen una mayor capacidad de absorción de metabolitos solubles en agua en comparación con los mamíferos (Karasov *et al.*, 2012). Ahora bien, para entender la dinámica de las uniones estrechas un aspecto importante es comprender su ensamblaje y funcionalidad, para lo cual es necesario conocer la naturaleza precisa de las asociaciones entre los bucles extracelulares de ocludina y claudina, la duración de cada ciclo y la composición específica de aminoácidos, los cuales son factores importantes en la formación de la barrera (Assimakopoulos, 2011).

1.10. Señalización que participa en la regulación de las uniones estrechas

Diversas moléculas están implicadas en la regulación de las uniones estrechas (TJs), estas son: Proteína Quinasa C (PKC), Proteína Quinasa A (PKA), Miosina Quinasa de cadena ligera; Proteínas Quinasas activada por mitógeno, Fosfoinositol 3 Quinasa y vía de señalización Rho.

-  **PKC.** Proteína quinasa C participa en el desmontaje de la unión, mientras que las nuevas isoformas regulan la formación de la unión aunque varía de acuerdo al modelo celular.
-  **PKA.** Proteína quinasa A, regula el ensamble y la apertura de la ruta paracelular en células epiteliales y endoteliales. La activación de PKA hace que las proteínas de TJs se bloqueen y no formen la barrera. Una GTPasa denominada Rab13 actúa como vínculo entre la PKA de señalización y el montaje de las TJs. Esta GTPasa recluta a los contactos entre célula-célula en una etapa temprana de montaje de la unión. Rab13 se une a PKA inhibiendo su actividad y retrasando la llegada de claudina 1 y ZO-1 en la unión estrecha; en el caso de células endoteliales cerebrales la activación de PKA promueve la función de barrera, pero esto no se puede generalizar para otros endotelios y epitelios ya que varía según la célula.
-  **Fosfatasas PPI, PP2A Y PP2B.** La fosforilación en los residuos serina/treonina de varias proteínas de uniones estrechas promueve la función de barrera de las TJs; por lo que la reducción de la fosforilación afecta negativamente la integridad de la unión estrecha. La mayor actividad de la proteína fosfatasa 2 A (PP2A) induce desfosforilación de ZO-1, ocludina y claudina 1 y un aumento de la permeabilidad paracelular, mientras que la inhibición de la PP2A con ácido okadaico promueve la fosforilación de estas proteínas y

acelera el montaje de la unión. Tanto PP2A y PP1 interactúan con el extremo carboxilo terminal de la cola de ocludina, la primera desfosforila a ocludina en residuos treonina (Thr) mientras que PP1 lo hace en residuos serina (Ser).

🐔 *Señalización Rho.* Rho pertenece a la superfamilia Ras de pequeñas proteínas GTPasas. A su vez Rho es una familia de GTPasas que incluye RhoA, Rac y Cdc42. La intervención de Rho en la señalización de las TJs es interrumpir la función de barrera de dichas estructuras; estas proteínas logran esto ya que, ayudadas por ROCK, son proteínas que puede inducir la contractibilidad actina-miosina pues interactúan directamente con ellas, proporcionándoles así, la fuerza para la interrupción de las uniones intercelulares. La vía de señalización Rho/ROCK participa tanto en el montaje como en el desmontaje de las uniones estrechas. En células intestinales T-84, la activación de RhoA para la apertura de la unión incluye varios factores, como la presencia de citoquinas proinflamatorias, mientras que en cultivos dispersos y en monocapa, Rho es importante en la formación *de novo* de uniones estrechas. Dentro del mecanismo por el cual se desmontan las uniones estrechas se encuentra la fosforilación de serina 19 en MLC2, contracción de fibras de actina-miosina y reducción de la concentración de calcio.

🐔 *Señalización MAP.* Tiene una fase membranosa y citoplasmática, la primera se produce en receptores para factores del crecimiento e implica la activación de proteínas GTP seguido por la activación de varias quinasas citoplasmáticas conocidas como MAPK. La activación de MAPK también participa en la apertura de uniones estrechas desencadenada por Ras. Aunque también la fosforilación de claudina 1 en treonina 203 por MAPK es crucial para la función de barrera de las uniones estrechas. Si se realiza una mutación en este aminoácido se observa que se altera la barrera aumentando así la permeabilidad paracelular. En el caso de claudina 1 se conoce que Thr se conserva en ratas y ratones, no así en bovinos, pollos y humanos (Ulluwishewa *et al.*, 2011; González-Mariscal *et al.*, 2007).

En cuanto a la regulación de las claudinas y de las propiedades de las uniones estrechas se da mediante varios procesos tales como: regulación de la transcripción, modificación postraduccional, interacción con proteínas de andamiaje citoplasmático e interacciones con las claudinas de la misma membrana (interacción *cis*) o de células vecinas (interacción *trans*). Todos estos procesos determinan el ensamble, remodelación, modelación y degradación de las uniones estrechas. Los principales reguladores de la expresión de claudinas son: TNF- α /NF- κ B y TGF- β -Smad/Snail, PPAR γ , SP1, HNF-1 α , HNF-4 α , CDX1, CDX2, GATA-4 y Grhl2 (Günzel *et al.*, 2013).

1.11. Importancia de la barrera epitelial como sistema de defensa inmunológica del intestino delgado y grueso en mamíferos y aves.

Dentro de los mecanismos de defensa innata podemos mencionar diferentes factores que la regulan tales como, los físicos o estructurales conformados por el epitelio y la mucosa intestinal en donde las células forman una barrera epitelial por efecto de las uniones estrechas que sellan el espacio entre el dominio lateral cerca del borde apical para evitar la entrada o establecimiento de agentes patógenos y toxinas, esta barrera es de gran importancia y colabora con otros mecanismos de defensa como las vellosidades intestinales, los movimientos peristálticos y la producción de moco que poseen la capacidad de captar y desplazar partículas extrañas hacia el exterior. Aunado a esto tenemos a los factores químicos como el grado de acidez o alcalinidad (pH), péptidos antimicrobianos, proteínas y finalmente la barrera celular donde participan los heterófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos y células dendríticas, haciendo posible el paso del complemento, de anticuerpos y otras moléculas presentes en el plasma, por ejemplo presencia de citosinas proinflamatorias como la IL-1 en los enterocitos de pollo. Las células mencionadas, en particular macrófagos y neutrófilos, lo realizan reconociendo moléculas específicas de superficie que son comunes y constantes presentes en los microorganismos y que en general se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) y que son reconocidos por receptores localizados en la superficie de las células del sistema inmune innato, llamados receptores de reconocimiento de un patrón (PRR, por sus siglas en inglés), la interacción entre el receptor y su ligando desencadena diferentes tipos de respuestas. Las células dendríticas juegan un papel muy importante en el reconocimiento de patógenos y la activación de la respuesta inmune adaptativa mediante la presentación de antígenos. Como anteriormente se mencionó las células dendríticas, tienen mecanismos que les permiten enviar dendritas a través de los espacios entre las células epiteliales, reconociendo patógenos que se encuentren en la luz intestinal, reestructurando las uniones estrechas para evitar que se rompa la barrera intestinal. (Blank *et al.*, 2011; Assimakopoulos, 2011; Gómez *et al.*, 2010; Rescigno *et al.*, 2001).

II. JUSTIFICACIÓN

El intestino de las aves es más corto que el de los mamíferos, disminuyendo así la superficie de contacto, sin embargo, las aves tienen una mayor capacidad de absorción con respecto a los mamíferos a partir de una adaptación evolutiva de las aves para compensar la menor superficie de absorción, esto es, un mayor tránsito paracelular para hacer más eficiente la absorción de nutrientes. Este aumento en el transporte paracelular puede deberse a la modificación de las proteínas constituyentes de las uniones estrechas que sellan la hendidura paracelular y regulan la absorción de nutrientes por medio de este mecanismo, dependiendo de las claudinas que se expresen en determinado momento fisiológico, ya que las diferentes claudinas son expresadas de acuerdo a la función que están desempeñando la unión estrecha; por ejemplo claudina 1 y 5 participa en formación de barrera mientras que claudinas 2, 3, 10, 12 y 16 realizan la permeabilidad y finalmente ocludina que se encuentra siempre que se formen las uniones estrechas. Sin embargo, un problema que se presenta al aumentar el transporte paracelular es el riesgo de una mayor absorción de toxinas y permitir el paso de patógenos, a lo que las aves deben enfrentarse mediante mecanismos de remodelación de uniones estrechas y de defensa eficientes.

A pesar de la importancia que presentan las uniones estrechas en la absorción de nutrientes, en aves existe poca información de la morfología, biología celular y molecular, que proporcione información que ayude a comprender los procesos fisiológicos, inmunológicos, nutricionales y patológicos.

En principio, se hace necesario estudiar las proteínas que conforman a las uniones estrechas y a partir de estos conocimientos comenzar a armar un modelo que nos permita conocer la forma en que se estructuran, remodelan y regulan las uniones estrechas en el epitelio intestinal de las aves, relacionándolo con el estado fisiológico en el que se encuentren (Mac Donald *et al.*, 2008; Balda *et al.*, 2000; Haworth *et al.*, 2005; Ozden *et al.*, 2010).

Para poder conocer lo anterior fue necesario comenzar determinando los mensajeros de las proteínas más importantes en la formación de las uniones estrechas de la mucosa intestinal de los diversos segmentos estudiados en gallina doméstica (*Gallus gallus domesticus*) de 6 a 8 semanas de edad. Debido al recambio que existe en la conformación de las uniones estrechas en cuanto a las proteínas que las integran y a que no se tienen antecedentes de las claudinas presentes salvo en embriones, consideramos estudiar en principio los RNA mensajeros para tener una visión general de todas las proteínas (en particular claudinas y ocludinas) que pudieran expresarse en gallinas. Una vez determinado esto, lograr identificar de cuales proteínas debemos realizar estudios que nos permitan evidenciar aquellas que se expresan en diferentes momentos fisiológicos. Por ejemplo conocer las claudinas presentes en las uniones estrechas durante el proceso de absorción intestinal comparado con las expresadas cuando este proceso no se está realizando.

III. HIPÓTESIS

La expresión de las proteínas de uniones estrechas ocludina y claudina (1, 2, 3, 5, 10, 12 y 16) se expresan a nivel de la túnica mucosa del tracto intestinal en pollos de engorda (*Gallus gallus domesticus*) de 6 a 8 semanas de edad, tal como sucede en la etapa embrionaria de estos animales, por lo que será posible identificarlas a través del aislamiento de sus mRNA y amplificación.

IV. OBJETIVOS

4.1. *Objetivo General*

Determinar la expresión del mRNA de ocludina y claudina 1, 2, 3, 5, 10, 12 y 16, en la túnica mucosa de diferentes regiones del intestino de *Gallus gallus domesticus* de 6 a 8 semanas de edad, por medio de la técnica RT-PCR.

4.2. *Objetivos Particulares*

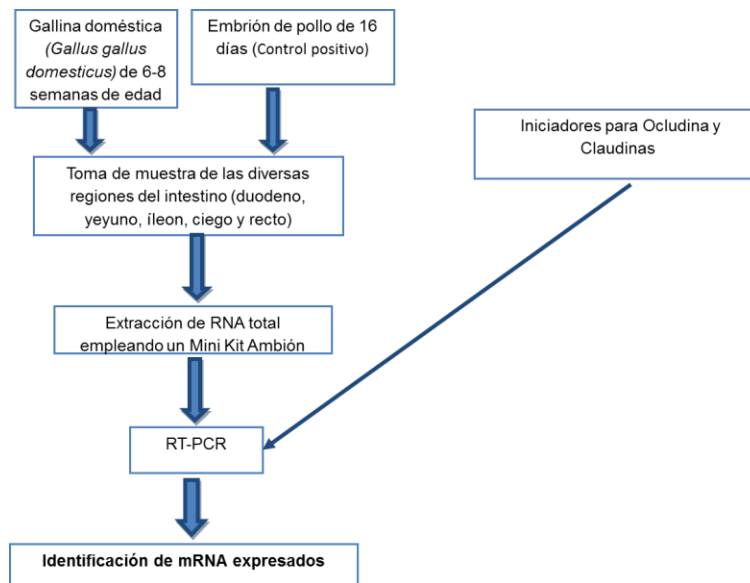
- 🐔 Colectar muestras de la túnica mucosa de las diferentes regiones del intestino de las aves empleadas en este trabajo (duodeno, yeyuno, íleon, ciego y recto).
- 🐔 Determinar la expresión del mRNA de ocludina y claudina 1, 2, 3, 5, 10, 12 y 16 en la túnica mucosa de diversos segmentos del intestino de los pollos de engorda (*Gallus gallus domesticus*), mediante RT-PCR.
- 🐔 Comparar la expresión del mRNA para las proteínas ocludina y claudina 1, 2, 3, 5, 10, 12 y 16 en muestras de diferentes regiones del intestino de embriones de pollo y animales de 6—8 semanas de edad.

V. METODOLOGÍA

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio 4 “Morfología Veterinaria y Biología Celular” de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM.

5.1. *Diseño experimental*

El trabajo se desarrolló de acuerdo al siguiente diseño experimental.



5.2. *Diseño y alineamiento de iniciadores*

Para este trabajo se utilizaron iniciadores (iniciadores) referidos en la literatura, así como otros que fueron diseñados en programas bioinformáticos. Los detalles de los iniciadores empleados se describen en el Cuadro 2.

Los criterios para la inclusión de las proteínas seleccionadas en esta investigación fueron dos, el primero fue su identificación previa en muestras de embriones de la especie animal en estudio y segundo la función que desempeñan ya sea de permeabilidad o de barrera, pues ambas involucran a las uniones estrechas, estructuras objeto de esta investigación.

5.2.1. *Diseño de iniciadores para el gen de ocludina y claudina 1, 5 y 16*

Para detectar el gen de ocludina y claudina 1, 5 y 16 se diseñaron los iniciadores, haciendo uso del programa bioinformático PRIMER-BLAST y PRIMER3, primeramente se realizó la búsqueda del gen para dichas proteínas y especie a trabajar, una vez encontrada se procedió a diseñar los iniciadores tomando en cuenta los siguientes parámetros: 40 a 60% de CG, diferencia

de Tm entre pares de iniciadores de 2°C y el delta G (ΔG) que indica la formación de dímeros y orquillas debe estar por arriba de -5 finalmente se seleccionó el par de iniciadores a utilizar; el procedimiento se ilustra en la Figura 5.

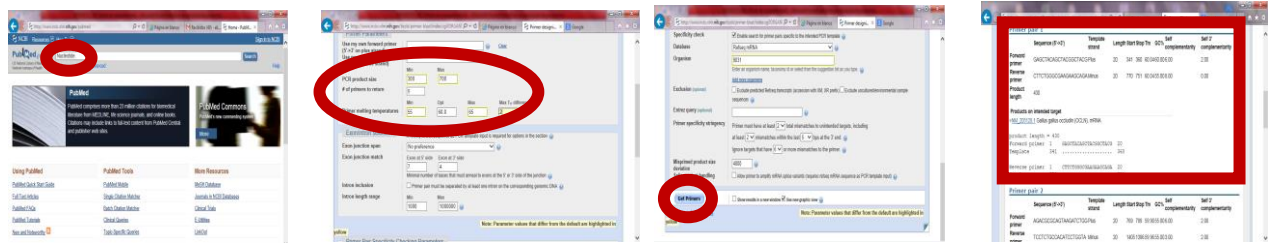


Figura 5. Procedimiento para el diseño de los iniciadores (iniciadores)

Después se usó el Analizador de oligos (Oligo Calc), determinando las propiedades de formación de dímeros y formación de estructuras secundarias.

5.2.2. *Iniciadores para el gen de claudina 2, 3, 10 y 12*

En cuanto a los iniciadores para el gen de claudina 2 y 3 se utilizaron los reportados por Ozden *et al.* (2010) quienes reportan su expresión en intestino de embriones de pollo; mientras que los iniciadores para el gen de claudina 10 y 12, reportados por Collins *et al.* (2013), fueron escogidas de acuerdo a su expresión en embriones de pollo y principalmente por la participación de las proteínas en propiedades de barrera y permeabilidad paracelular.

Cuadro 2. Iniciadores empleados para la identificación del gen de ocludina, claudinas y β -actina.

Gen y número de acceso	Proteína		Secuencia del iniciador (5' a 3')	Tamaño del Amplificado (pb)	Referencia
Cldn 1 NM_001013611.2	Claudina 1	Sentido	GTCTGGTTGGTGTGTTG	196	Ozden, 2009
		Antisentido	TTAACGGGTGTGAAAGGG		
Cldn 1 NM_001013611.2	Claudina 1	Sentido	TGCCACTCCCTGATGTTCC	662	Este trabajo
		Antisentido	AGGTCTCATAAGGCCCACT		
Cldn 2 XM_420271	Claudina 2	Sentido	CTCAGCCCTCCATCAAAC	162	Ozden, 2009
		Antisentido	TGCGTCTTCTCCTTAC		
Cldn 3 NM_204202	Claudina 3	Sentido	AGCCCTCCATCTCAGCAG	185	Ozden, 2010
		Antisentido	TTCTCCGCCAGACTCTCC		
Cldn 5 NM_204201.1	Claudina 5	Sentido	ATCTACATCCTCTGCGGGGT	224	Este trabajo
		Antisentido	TACTTGACGGGGAAGGAGGT		
cClaudin-10 GI:118084678	Claudina 10	Sentido	CATGGCGAGCACGTGCGCGGAG *GATGGCGAGCACGTGCGCGGAG	687	Collins <i>et al.</i> , 2013
		Antisentido	TTAAACGTAAGCGTTCTTGTC		
cClaudin-12 GI:118085731	Claudina 12	Sentido	ATGGGCTGCAGGGATGTTTAT	738	Collins <i>et al.</i> , 2013
		Antisentido	CTTAAGATGTGTGTGCACAACA *TTAAGATGTGTGTGCACAACA		
Cldn 16 XM_426702.2	Claudina 16	Sentido	CTGGCTTAACTCAGGGTGCA	191	Este trabajo
		Antisentido	GGGCTGCTGTGACCTTTACT		
Ocludin D21837.1	Ocludina	Sentido	GAGCTACAGCTACGGCTACG	430	Este trabajo
		Antisentido	CTTCTGGGCGAAGAAGCAGA		
NM_205518	β -actina (Control positivo)	Sentido	TCTTGGGTATGGAGTCTG	331	Zhang <i>et al.</i> , 2013
		Antisentido	TAGAAGCATTGCGGTGG		

*Secuencia empleada de acuerdo a lo descrito en metodología (apartado 5.2.3).

Como control positivo interno, se incluyó a la β -actina de pollo, los iniciadores empleados fueron los reportados por Zhang *et al.* (2013).

5.2.3. Alineamiento de iniciadores para los genes a estudiar

Cada iniciador fue analizado con el programa SEQUENCHER 5.2.4, esto con la finalidad de verificar que las bases contenidas correspondieran con el gen que codifica para la proteína de interés y que se alinean correctamente. Así, se pudo identificar que los iniciadores reportados para el gen de claudina 10 y 12 presentaban una base errónea en la secuencia, teniendo que ser reemplazada, utilizándose la secuencia señalada en el cuadro 2 con un asterisco.

5.3. Animales

Se utilizaron 3 pollos de la línea genética pesada de engorda (*Gallus gallus domesticus*), machos, peso aproximado de 2-4 kilogramos (kg), de 6—8 semanas debido a que es la edad a la cual se envían a rastro, así también los trabajos previos han sido enfocados en etapas embrionarias de los pollos y no hay reportes en la etapa adulta del ave. Los animales utilizados en este trabajo fueron donados por una granja comercial.

Para el control positivo se emplearon embriones de pollo con 16 días de incubación a una temperatura de 38.5°C, los cuales fueron donados por la empresa AVIMEX.

5.4. Colección de muestras

Se obtuvieron muestras del aparato digestivo de los pollos de 6—8 semanas de edad, sacrificados humanitariamente introduciendo al ave en un contenedor hermético al cual se hizo llegar monóxido de carbono hasta que el ave perdió la conciencia y murió aproximadamente en 10 minutos; este procedimiento se realizó en la sala de necropsias de la Unidad de Aislamiento Animal de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES-Cuautitlán. De acuerdo con lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995 para el sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. La solicitud para utilizar esta técnica en este trabajo fue aprobada por el CICUAE-FESC con número de registro C14-08.

Se realizó la obtención de la túnica mucosa mediante la técnica de raspado, para su posterior examen histológico con tinción Hematoxilina Eosina (H-E) (Anexo 10.1—10.3) para evidenciar que la muestra obtenida solo contenía a la mucosa intestinal.

5.5. Preparación de la muestra

La muestra se manejó siempre en condiciones de cadena fría, desde la extracción del tracto digestivo del pollo, posterior a su sacrificio humanitario. Se realizó un lavado general del tracto digestivo completo con buffer salino de fosfatos (PBS), seguido de la disección empleando para ello bisturí, pinzas de disección planas y tijeras de Mayo, efectuando un corte transversal de cada segmento del intestino, duodeno (porción media), yeyuno (porción media), íleon (porción media), ciego (porción media) y recto (porción caudal); cada uno de estos segmentos fueron nuevamente lavados con PBS, después se realizó un corte longitudinal a cada segmento obtenido, para exponer el lumen y así la túnica mucosa, se retiró el exceso de contenido o moco con un ligero raspado usando una espátula; posterior a esto se realizó la obtención de la túnica mucosa mediante la técnica de raspado con hoja de bisturí, una vez obtenido el tejido se colocó en un tubo eppendorf de 2 ml el cual contenía buffer de lisis (BL) con 2-mercaptoetanol y se procedió a la homogenización del tejido, con un sonicador (marca Ultrasonic processor modelo Gex 130) previa limpieza empleando agua con dietilpirocarbonato (DEPC) bajo las siguientes condiciones: 10 pulsaciones, 10 segundos con una amplitud de 90%, logrando así el homogenizado de la muestra, se almacenó en hielo para la subsecuente extracción del RNA. El procedimiento anterior se ilustra en la Figura 6.

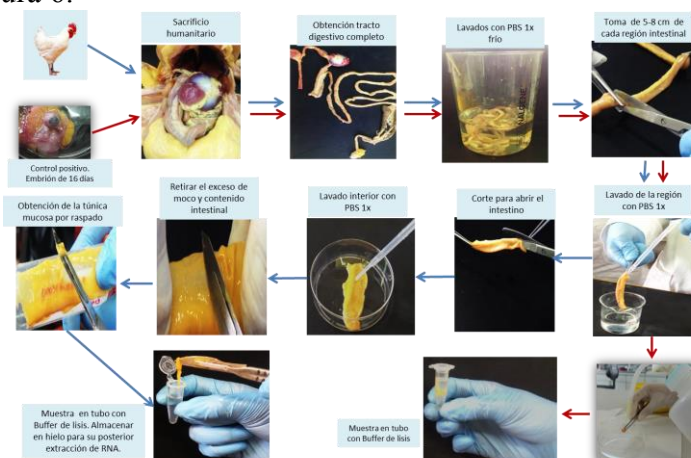


Figura 6. Imágenes mostrando la obtención de la muestra en estudio.

Las muestras para el control positivo fueron obtenidas de embriones de pollo de 16 días de incubación, los cuales fueron sacrificados de acuerdo a los lineamientos aprobados por el CICUAE. El método empleado para el sacrificio fue exponerlos a una temperatura inferior a los 4°C durante cuatro horas (Close *et al.*, 1996).

Enseguida se recolectó el tracto intestinal del embrión, se realizó un lavado con PBS, se obtuvo una pequeña muestra de cada segmento intestinal (duodeno, yeyuno, íleon, ciego y recto), fueron colocadas en tubos eppendorf de 2 mililitros (ml) con buffer de lisis con 2-mercaptoetanol y se procedió a la homogenización del tejido con el sonicador empleando las siguientes condiciones: 10 pulsaciones, 10 segundos con una amplitud de 90%, logrando así el homogenizado de la muestra, se almacenó en hielo para la posterior extracción del RNA.

5.6. *Extracción de RNA total*

La extracción del RNA de la túnica mucosa provenientes de los diversos segmentos del tracto intestinal de la gallina doméstica, así como, del tracto digestivo de un embrión de 16 días de incubación se realizó empleando el Mini Kit Pure Link™ (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor; el procedimiento se describe en el Anexo 10.4.

Al RNA obtenido se le realizaron 2 pruebas, espectrofotometría para verificar su concentración y pureza empleando un espectrofotómetro Accesolab Nano Drop ND-1000 A113 (Anexo 10.5.) y la electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.5%, 65 volts durante 1 hora 30 minutos (Anexo 10.6.), para evaluar la integridad del RNA total en cada una de las muestras (Luna, 2012; Quintero *et al.*, 2012).

5.7. *Técnica RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa)*

5.7.1. *Síntesis de cDNA*

Para cada una de las proteínas de interés se sintetizó el cDNA (Anexo 10.7.), empleando la enzima M-MLV RT (Enzima Transcriptasa Reversa de laboratorio Invitrogen). Se realizó la estimación de la pureza y cantidad del cDNA (Anexo 10.8.) mismo que se utilizó como templado para la realización de la técnica de PCR punto final.

5.7.2. *PCR punto final*

Para lograr determinar la temperatura a la cual se alinearían cada uno de los iniciadores se calculó el valor de la temperatura de fusión (T_m), ello mediante el uso de la fórmula $T_m = 2^\circ\text{C} (A+T) + 4^\circ\text{C} (G+C)$, la cual osciló entre 54 a 62 grados centígrados ($^\circ\text{C}$). La estandarización de las condiciones de cada una de las etapas de la técnica PCR punto final se realizó empleando un termociclador (Techgene TC-3000), se esquematizan en la Figura 7, esto para las diferentes claudinas y ocludina en estudio, teniendo como base lo reportado por Ozden *et al.* (2010) y las condiciones de estandarización de cada proteína se presentan en el Cuadro 3.



Figura 7. Fases de la PCR.

Cuadro 3. Condiciones de la PCR para las diferentes proteínas.

PROTEÍNA	REACTIVOS	CANTIDAD µl	ETAPA	TEMPERATURA en °C	TIEMPO
Claudina 1 Utilizando los iniciadores reportados por Ozden, 2009	Agua	13	Iniciación	95°C	7 minutos(min)
	inyectable		50ciclos		
	Buffer 10x	2	• Desnaturalización	95°C	30 segundos(seg)
	MgCl2	1,2	• Alineamiento	55°C	30 seg
	dNTP's	0,4	• Extensión	72°C	30 seg
	Iniciador F	0,5	Finalización	72°C	5 min
	Iniciador R	0,5			
	Taq P	0,4			
Muestra	2				
Claudina 1 Diseñados para este trabajo	Agua	13	Iniciación	95°C	7 min
	inyectable		50ciclos		
	Buffer 10x	2	• Desnaturalización	95°C	30 seg
	MgCl2	1,2	• Alineamiento	62°C	30 seg
	dNTP's	0,4	• Extensión	72°C	30 seg
	Iniciador F	0,5	Finalización	72°C	5 min
	Iniciador R	0,5			
	Taq P	0,4			
Muestra	2				
Claudina 2	Agua	13	Iniciación	95°C	7 min
	inyectable		50ciclos		
	Buffer 10x	2	• Desnaturalización	95°C	30 seg
	MgCl2	1,2	• Alineamiento	55°C	30 seg
	dNTP's	0,4	• Extensión	72°C	30 seg
	Iniciador F	0,5	Finalización	72°C	5 min
	Iniciador R	0,5			
	Taq P	0,4			
Muestra	2				
Claudina 3	Agua	12	Iniciación	95°C	7 min
	inyectable		50ciclos		
	Buffer 10x	2	• Desnaturalización	95°C	30 seg
	MgCl2	1,2	• Alineamiento	55°C	30 seg
	dNTP's	0,4	• Extensión	72°C	30 seg
	Iniciador F	1	Finalización	72°C	5 min
	Iniciador R	1			
	Taq P	0,4			
Muestra	2				
Claudina 5	Agua	13.6	Iniciación	95°C	7 min
	inyectable		50ciclos		
	Buffer 10x	2	• Desnaturalización	95°C	30 seg
	MgCl2	1,2	• Alineamiento	60°C	30 seg
	dNTP's	0,4	• Extensión	72°C	30 seg
	Iniciador F	0,2	Finalización	72°C	5 min
	Iniciador R	0,2			
	Taq P	0,4			
Muestra	2				
Claudina 10	Agua	12	Iniciación	95°C	7 min
	inyectable		50ciclos		
	Buffer 10x	2	• Desnaturalización	95°C	30 seg
	MgCl2	1,2	• Alineamiento	59°C	30 seg
	dNTP's	0,4	• Extensión	72°C	30 seg
	Iniciador F	1	Finalización	72°C	5 min
	Iniciador R	1			
	Taq P	0,4			
Muestra	2				

PROTEÍNA	REACTIVOS	CANTIDAD µl	ETAPA	TEMPERATURA en °C	TIEMPO
Claudina 12	Agua inyectable	12	Iniciación	95°C	7 min
	Buffer 10x	2	50ciclos		
	MgCl2	1,2	• Desnaturalización	95°C	30 seg
	dNTP's	0,4	• Alineamiento	56°C	30 seg
	Iniciador F	1	• Extensión	72°C	30 seg
	Iniciador R	1	Finalización	72°C	5 min
	Taq P	0,4			
	Muestra	2			
Claudina 16	Agua inyectable	13,6	Iniciación	95°C	7 min
	Buffer 10x	2	50ciclos		
	MgCl2	1,2	• Desnaturalización	95°C	30 seg
	dNTP's	0,4	• Alineamiento	60°C	30 seg
	Iniciador F	0,2	• Extensión	72°C	30 seg
	Iniciador R	0,2	Finalización	72°C	5 min
	Taq P	0,4			
	Muestra	2			
Ocludina	Agua inyectable	13,75	Iniciación	95°C	7 min
	Buffer 10x	2	50ciclos		
	MgCl2	1,2	• Desnaturalización	95°C	30 seg
	dNTP's	0,4	• Alineamiento	61°C	30 seg
	Iniciador F	0,12	• Extensión	72°C	30 seg
	Iniciador R	0,12	Finalización	72°C	5 min
	Taq P	0,4			
	Muestra	2			
β-actina (pollo)	Agua inyectable	17	Iniciación	94°C	5 min
	Buffer 10x	2,5	30ciclos		
	MgCl2	1,5	• Desnaturalización	94°C	30 seg
	dNTP's	0,5	• Alineamiento	58°C	30 seg
	Iniciador F	1	• Extensión	72°C	1 min 30 seg
	Iniciador R	1	Finalización	72°C	7 min
	Taq P	0,5			
	Muestra	2			

En todos los casos se empleó β-actina como control positivo interno.

Finalmente para corroborar la amplificación de la secuencia blanco, se realizó la electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con Bromuro de Etidio (BrE) con una corrida de 70 volts durante 1 hora y 30 minutos; posteriormente se visualizaron en un transiluminador, el cual utiliza luz ultravioleta de onda larga (300 nanometros (nm)) evidenciando así un amplificado en donde el bromuro de etidio haya reaccionado (Tamay de Dios *et al.*, 2013; Nolan *et al.*, 2013; Mc Pherson *et al.*, 2006; Sambrook *et al.*, 2001; Herrington *et al.*, 1998; Henry, 1992; Burdon R., 1978).

VI. RESULTADOS

6.1. *Diseño del iniciador frontal y reverso para los genes de ocludina y claudinas 1, 5 y 16*

Aunque inicialmente se buscó trabajar con iniciadores reportados en la literatura, nos encontramos que no los había para todos los genes de las proteínas en estudio, por lo que los iniciadores utilizados para la identificación del gen de ocludina, claudina 1, 5 y 16 fueron diseñados con el programa bioinformático Primer BLAST y Primer3 respectivamente. De manera específica, en el caso de los iniciadores para el gen de claudina, si bien existía su reporte por parte de Ozden (2009), estos tuvieron que ser diseñados ya que al ser empleados presentaron diferencias en el amplificado identificado en muestras de embrión y de los animales en estudio. Los iniciadores para el gen de claudina 5 y 16 fueron diseñados ya que los reportados al ser analizados en el programa Primer3 presentaron alto grado de formación de dímeros y los amplificados obtenidos eran pequeños. Los iniciadores obtenidos se presentan a continuación.

Gen de ocludina:

Iniciador F: 5'-GAGCTACAGCTACGGCTACG-3'

Iniciador R: 5'-CTTCTGGGCGAAGAAGCAGA-3'

Amplificado: 430pb

Gen de claudina 1

Iniciador F: 5'-TGCCACTCCCTGATGTTTCC-3'

Iniciador R: 5'-AGGTCTCATAAGGCCCCACT-3'

Amplificado: 662pb

Gen de claudina 5

Iniciador F: 5'-ATCTACATCCTCTGCGGGGT-3'

Iniciador R: 5'-TACTTGACGGGGAAGGAGGT-3'

Amplificado: 224pb

Gen de claudina 16

Iniciador F: 5'-CTGGCTTAACTCAGGGTGCA-3'

Iniciador R: 5'-GGGCTGCTGTGACCTTTACT-3'

Amplificado: 191pb

6.2. Alineamiento de iniciadores con Sequencher

Mediante el alineamiento de todos los iniciadores empleados en el presente trabajo con el gen correspondiente, utilizando el programa Sequencher 5.2.4, fue posible verificar que las secuencias alineaban correctamente; así mismo, se pudieron identificar algunos errores en la secuencia del iniciador frontal para claudina 10 y en el iniciador reverso para claudina 12, los cuales fueron corregidos previo a su síntesis. En la Figura 8, panel A, se observa el cromosoma donde se ubica el gen codificante para claudina 1; en el panel B se presenta la imagen donde se observa el área de alineamiento de ambos iniciadores; finalmente en los paneles C y D se puede visualizar el alineamiento correcto de los iniciadores frontal y reverso. En el Anexo 10.9., se presentan el resto de los alineamientos para los genes de claudinas y ocludina.

Claudina 1 662pb

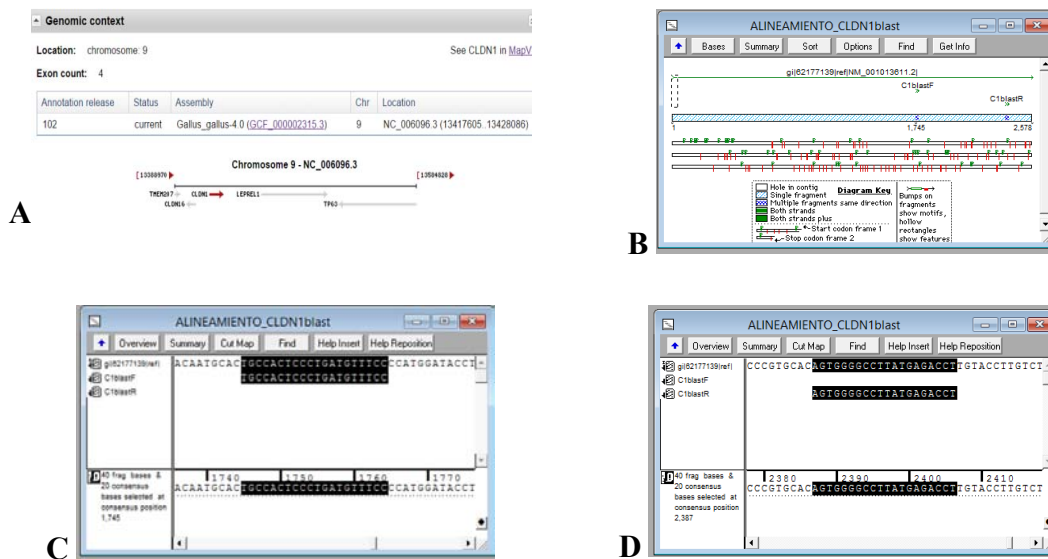


Figura 8. Alineamiento de los iniciadores en el gen de Claudina 1 mediante el empleo del programa Sequencher 5.2.4. El panel A muestra el cromosoma que contiene el gen codificante para claudina 1; el panel B presenta el área donde se ubican ambos iniciadores; los paneles C y D muestran el alineamiento para el iniciador frontal y reverso respectivamente.

6.3. *Aislamiento de la túnica mucosa de las diferentes regiones del intestino*

En el presente estudio logramos obtener la túnica mucosa de los segmentos del intestino mediante la técnica de raspado con hoja de bisturí, garantizando así que se trabajó únicamente con la mucosa (Figura 9).

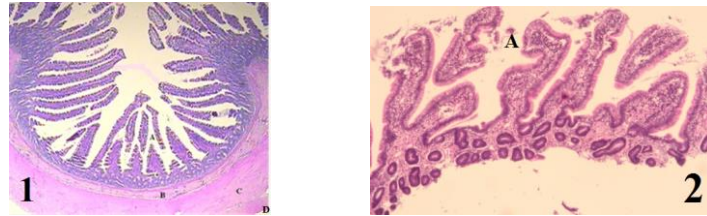


Figura 9. Túnica mucosa del segmento íleon intestinal de la gallina doméstica. En el panel 1 se puede observar un segmento de íleon completo, identificando todas las túnicas que conforman el intestino: túnica mucosa (A), tela submucosa (B), túnica muscular (C) y túnica serosa (D); tinción H—E, 4x. En el panel 2 se observa la túnica mucosa aislada (A) integrada por las vellosidades y criptas intestinales, no observándose las túnicas restantes; tinción H—E, 20x (EAG, 2015).

6.4. *Análisis espectrofotométrico y electroforético del RNA en muestras de mucosa de la gallina doméstica con 6 a 8 semanas de edad*

Todas las muestras de RNA obtenidas posterior a la extracción se sometieron a análisis espectrofotométrico y electroforético. El primero permitió conocer que la cantidad de RNA era adecuada para realizar la subsecuente amplificación; ya que la cantidad mínima requerida es de 1 nanogramo (ng); en la relación 260/280 los valores obtenidos estuvieron dentro del rango de 2—2.2 lo cual evidencia una alta pureza en el caso de RNA. En los Cuadros 4 y 5 se muestran los resultados obtenidos de la valoración de los parámetros mencionados para cada una de las muestras analizadas, tanto del control positivo como de las muestras de los pollos de engorda de 6 a 8 semanas de edad (3 repeticiones). Se trabajó con segmento completo (SC) que incluye todas las túnicas que conforman la pared del órgano o bien con una muestra de la túnica mucosa (M).

Cuadro 4. Cantidad de RNA obtenido de las muestras en estudio.

	Embrión con 16 días de incubación	Ave 1	Ave 2	Ave 3	Promedio aves adultas ng/ μ l
Muestra de mucosa intestinal de ave adulta	Nanodrop ng/ μ l	Nanodrop ng/ μ l	Nanodrop ng/ μ l	Nanodrop ng/ μ l	
Duodeno	1853,1	297,6	225,1	421	314.5
Yeyuno	1519,2	274,2	120,2	77,9	157.4
Íleon	1137,9	118,5	1283,4	633,1	678.3
Ciego	2002,4	264,6	1398,7	1340	1001.1
Recto	1996,6	70,9	269,2	844	394.7

Cuadro 5. Determinación de la pureza del RNA (relación de lecturas 260/280 nm) obtenido.

	Embrión con 16 días de incubación	Ave 1	Ave 2	Ave 3	Promedio aves adultas relación 260/280
Muestra de mucosa intestinal de ave adulta	Nanodrop Ratio 260/280	Nanodrop Ratio 260/280	Nanodrop Ratio 260/280	Nanodrop Ratio 260/280	
Duodeno	2,09	2,12	2,16	2,06	2.11
Yeyuno	2,11	2,09	2,26	2,50	2.28
Íleon	2,12	2,18	2,10	2,08	2.12
Ciego	2,10	2,12	2,10	2,12	2.11
Recto	2,11	2,24	2,00	2,12	2.12

En los geles de agarosa se pudo observar que el RNA obtenido se mantuvo integro, observándose las bandas, 18s y 28s del RNA ribosomal (Figura 10).

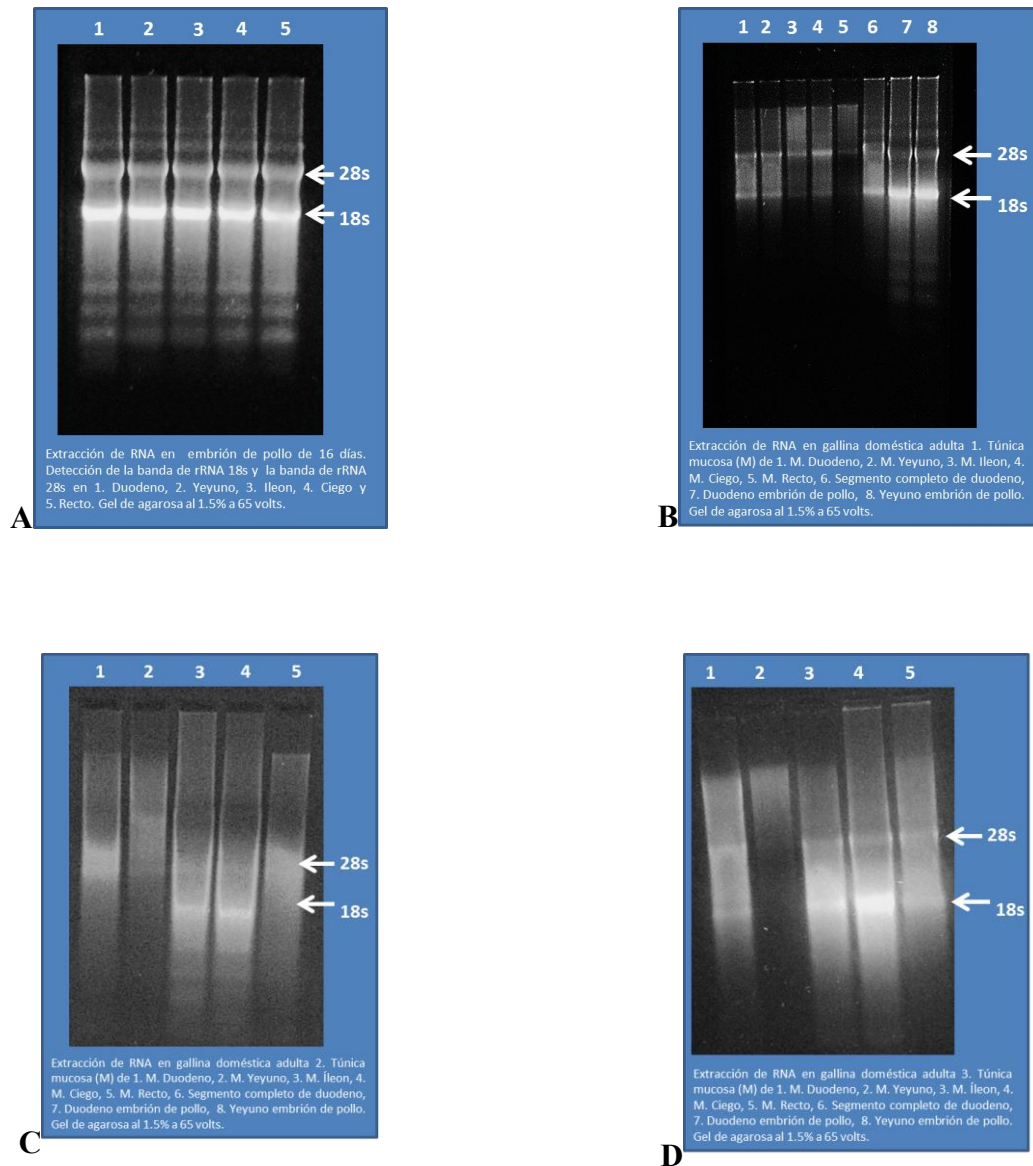


Figura 10. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.5% de los extractos de RNA, donde se indican las bandas correspondientes al rRNA 18s y rRNA 28s.

A) Muestra de SC de embrión de pollo de 16 días de desarrollo. **B)** Extracto de RNA de la mucosa intestinal del ave 1. **C)** Extracto de RNA de la mucosa intestinal del ave 2. **D)** Extracto de RNA de la mucosa intestinal del ave 3. Carril 1: Duodeno; carril 2: Yeyuno; carril 3: Íleon; carril 4: Ciego; carril 5: Recto; carril 6: SC duodeno de ave de 6 a 8 semanas de edad; carril 7: SC duodeno embrión de pollo y carril 8: SC yeyuno embrión de pollo.

6.5. Amplificación de los fragmentos mediante RT-PCR

Para la obtención de estos resultados, primero se realizó la síntesis de DNA complementario (cDNA) posteriormente se efectuó la técnica de PCR punto final utilizando agua inyectable, buffer 10X (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), cloruro de magnesio (MgCl₂), dNTP's, cDNA de la muestra problema, enzima Taq polimerasa e iniciadores específicos en función del fragmento a estudiar; lo anterior bajo condiciones previamente estandarizadas y programadas en el termociclador. En el Cuadro 3 (ver método, apartado 5.7.2) se describe el programa estandarizado en el termociclador así como los reactivos y cantidades utilizadas para cada una de las muestras amplificadas.

En las Figuras 11 a la 18 se presentan las fotografías del análisis electroforético en geles de agarosa al 1.5% de los productos obtenidos por RT-PCR para cada una de las proteínas en estudio; ello tanto del control positivo (diferentes regiones de embrión de pollo) como de muestras problema (diferentes regiones de la mucosa intestinal de las aves objeto de este estudio), mientras que en la parte inferior de cada figura se muestra el control interno de amplificación correspondiente a β -actina.

Claudina 1

El amplificado del gen codificante para claudina 1, empleando para ello los iniciadores reportados por Ozden (2009), se presenta en la Figura 11; en el panel A se visualiza el análisis electroforético de los productos obtenidos por RT-PCR para muestras del control positivo (SC de embrión con 16 días de incubación); como se puede observar todos los productos resultantes de la amplificación de las muestras de las diferentes regiones del intestino correspondieron a una banda de 196 pb de acuerdo a lo esperado para el par de iniciadores utilizados. Los paneles B, C y D corresponden a los productos obtenidos en las muestras de túnica mucosa en las diferentes regiones del intestino para las aves de 6 a 8 semanas de edad 1, 2 y 3, respectivamente; en las muestras se observó un amplificado correspondiente a 350 pb que no coincide con lo esperado para los iniciadores utilizados (196 pb, carril 7 control positivo).

Debido a esta diferencia, fue que se consideró diseñar un nuevo par de iniciadores para este trabajo con el programa PrimerBlast (ver Cuadro 2).

La RT-PCR para claudina 1 con los iniciadores diseñados y bajo las condiciones adecuadas (ver Cuadro 3), se muestra en la figura 11a, en donde en todas las muestras analizadas se obtuvo el producto amplificado con el tamaño esperado para el par de iniciadores utilizados, 662 pb. Es decir, los iniciadores diseñados en este trabajo para claudina 1 amplificaron un fragmento mayor del gen codificante para dicha proteína comparado con los iniciadores utilizados en un inicio.

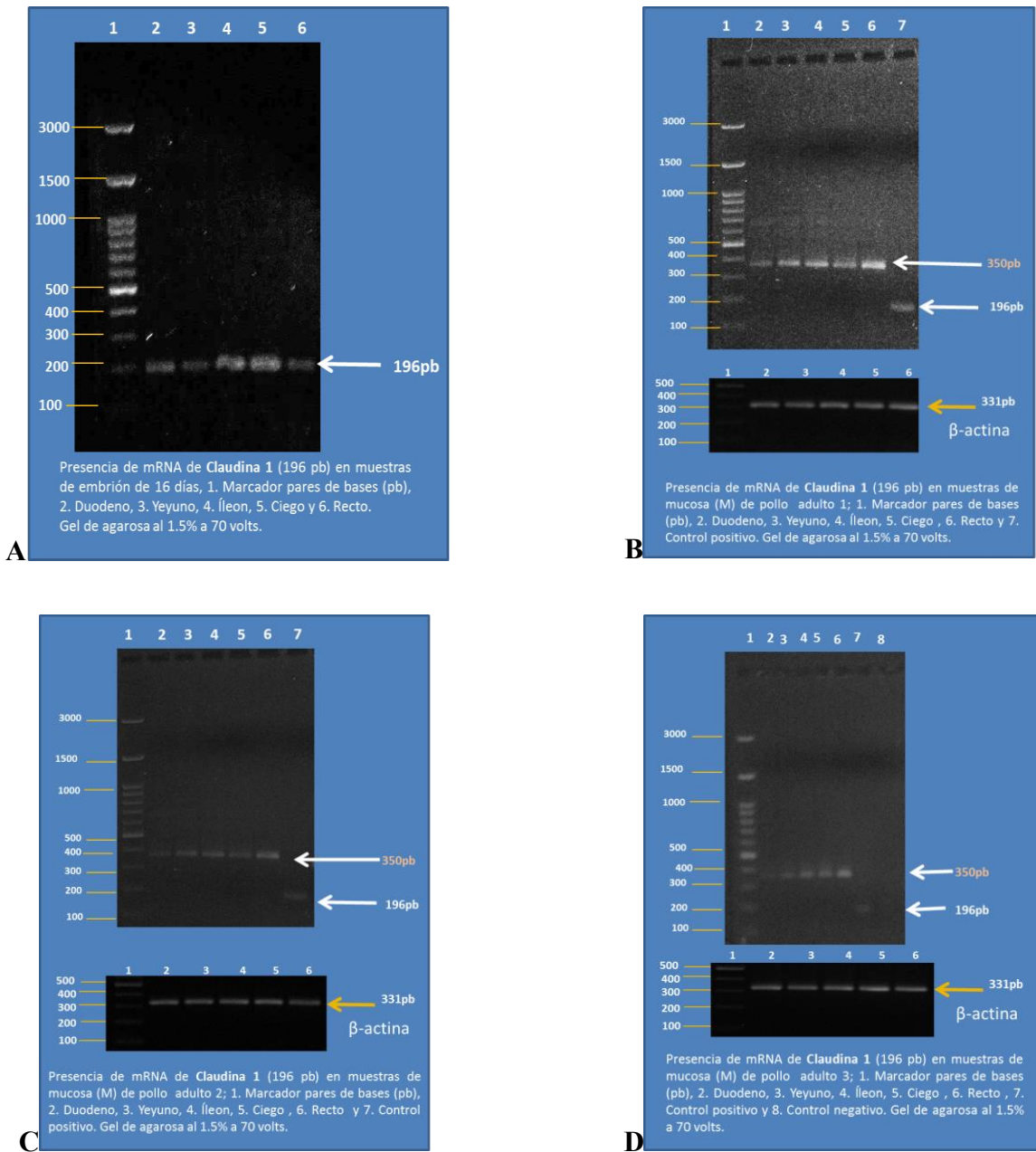


Figura 11. Análisis electroforético de los productos obtenidos por RT-PCR de claudina 1 al emplear los iniciadores reportados por Ozden (2009). **A.** Muestras de SC de embrión de pollo (control positivo). **B, C y D** muestras de mucosa intestinal de aves 1, 2 y 3, respectivamente. En la parte de la derecha se indica el tamaño de los productos amplificados.

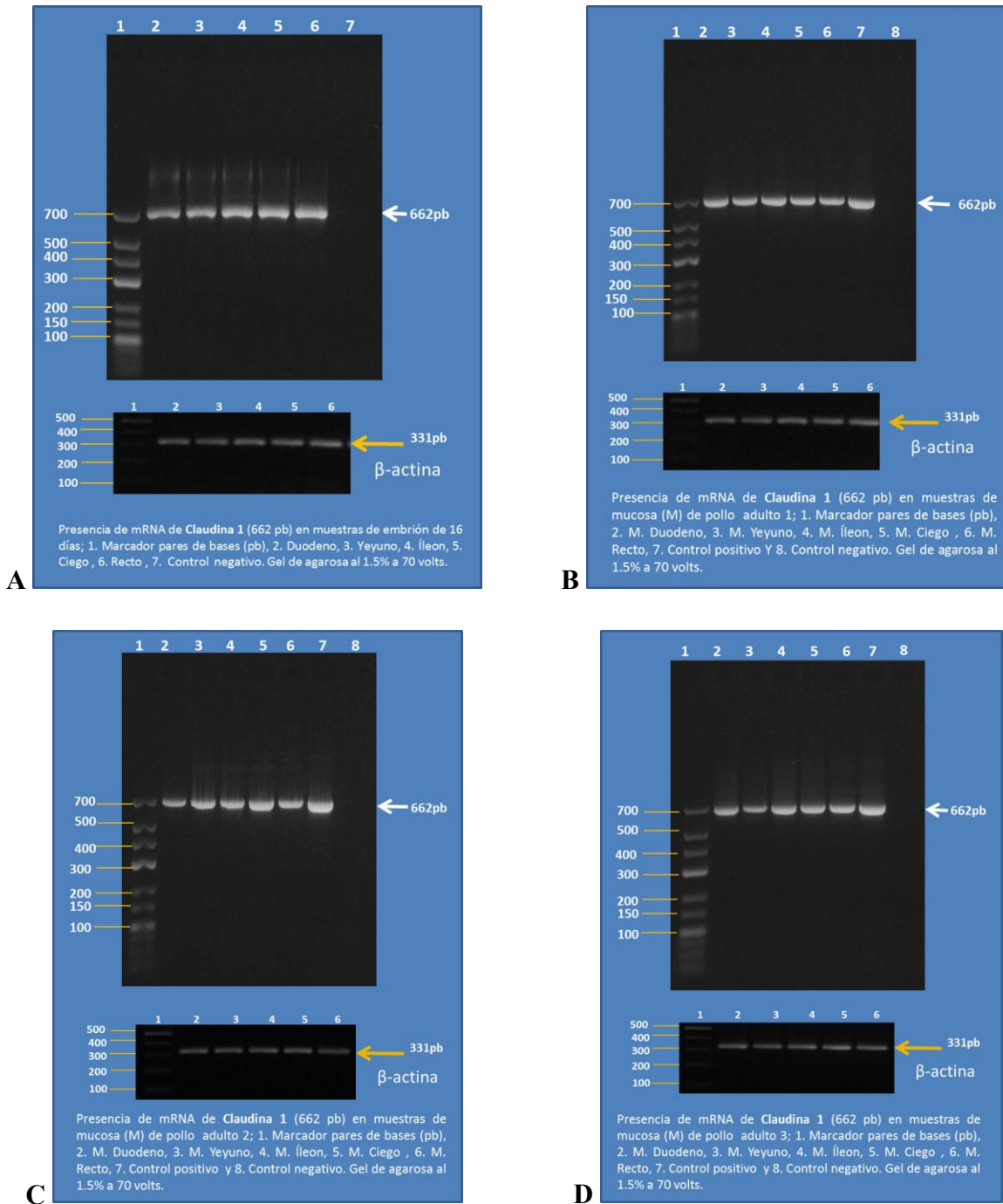


Figura 11 a. Análisis electroforético de los productos obtenidos por RT-PCR de claudina 1 utilizando los iniciadores diseñados en este trabajo. **A.** Muestras de SC de embrión (control positivo) y muestras de mucosa intestinal de los animales empleados en **B.** Ave 1; **C.** Ave 2; **D.** Ave 3.

Claudina 2

En la Figura 12 se presenta los productos obtenidos por RT-PCR para claudina 2 al emplear las muestras de embrión de 16 días de incubación (Panel A, control positivo) y de mucosa intestinal correspondientes a las aves de 6 a 8 semanas de edad 1, 2 y 3, respectivamente (paneles B, C y D), encontrándose un amplificado de 162pb en todas las muestras, lo cual corresponde a lo esperado.

Claudina 3

En la Figura 13 se presenta la imagen de los productos recuperados en la RT-PCR para claudina 3 de las muestras SC (control positivo, panel A) y de las muestras de mucosa intestinal provenientes de las aves 1, 2 y 3, respectivamente (paneles B, C y D). Un amplificado de 185 pb se observó en todas las muestras analizadas coincidiendo con lo reportado por Ozden *et al.* (2010); cabe destacar que en el panel D correspondiente a muestras del ave número 3 se presentó una segunda banda menor a 100pb.

Claudina 5

El análisis electroforético de los productos de RT-PCR para el gen de claudina 5, mostró el amplificado esperado de 224 pb en todas las muestras en estudio (Figura 14). En el panel A se observa el gel correspondiente a las muestras de SC de embrión de pollo con 16 días de incubación (control positivo) y en los paneles B, C y D se presentan los geles de las muestras de mucosa intestinal en los diferentes segmentos de las aves 1, 2 y 3, respectivamente.

Claudina 10

Análisis electroforético de la RT-PCR de claudina 10 mostró un producto de 687 pb en todas las muestras (Figura 15), coincidiendo con lo esperado. Las muestras del control positivo se muestran en el panel A y las muestras de túnica mucosa de las aves 1, 2 y 3 se muestran en los paneles B, C y D, respectivamente. Específicamente en el panel D (ave 3) en los carriles 2, 3 y 5 las bandas son menos intensas en comparación con las otras dos aves, así como, en los otros carriles del mismo gel (carriles 4, 6 y 7).

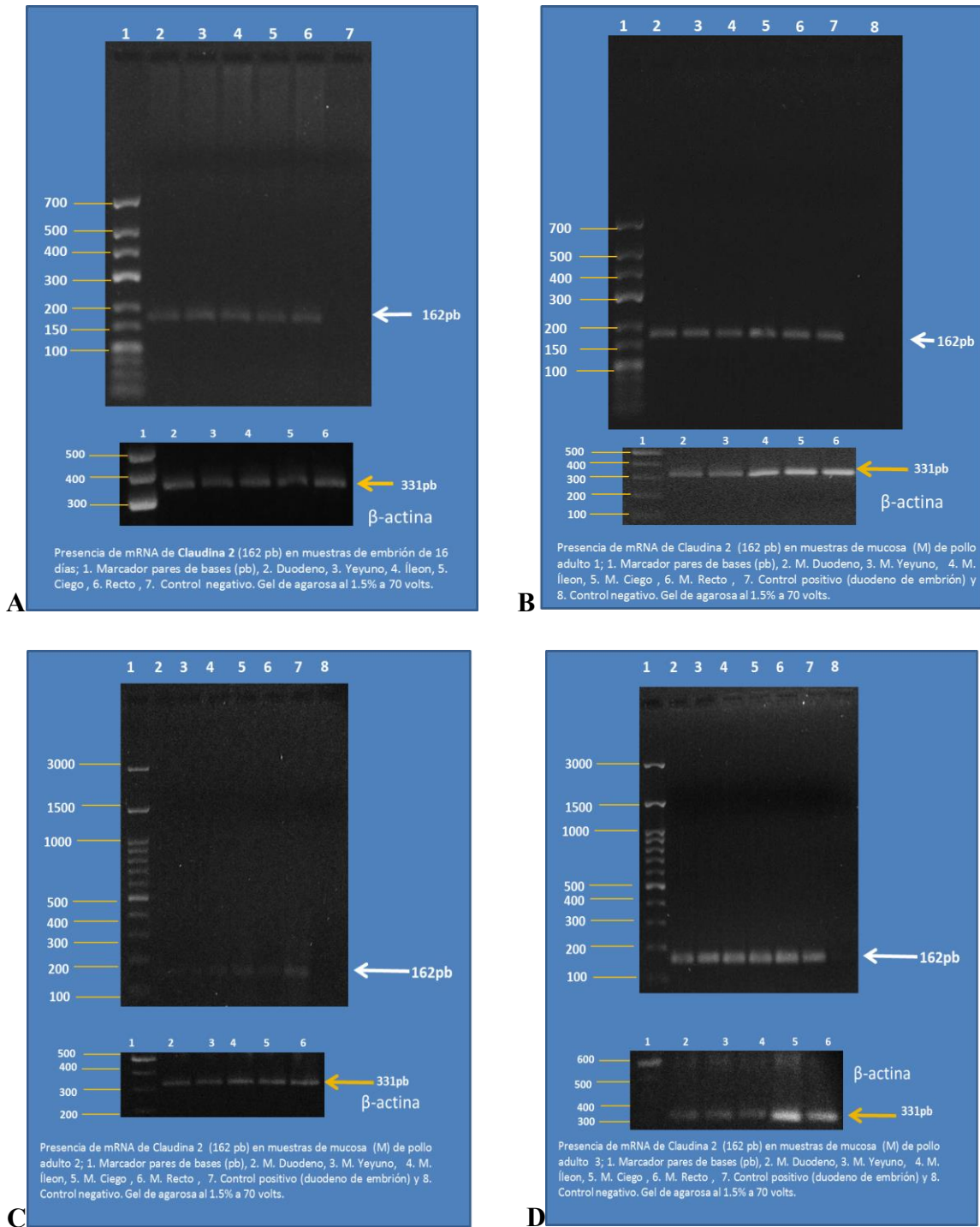


Figura 12. Análisis electroforético de los productos obtenidos por RT-PCR de claudina 2. En **A** se observan las muestras de SC de embrión (control positivo) y en **B**, **C** y **D** las muestras de M. de los especímenes 1, 2 y 3, respectivamente. El tamaño del amplificado se señala al lado derecho de cada imagen.

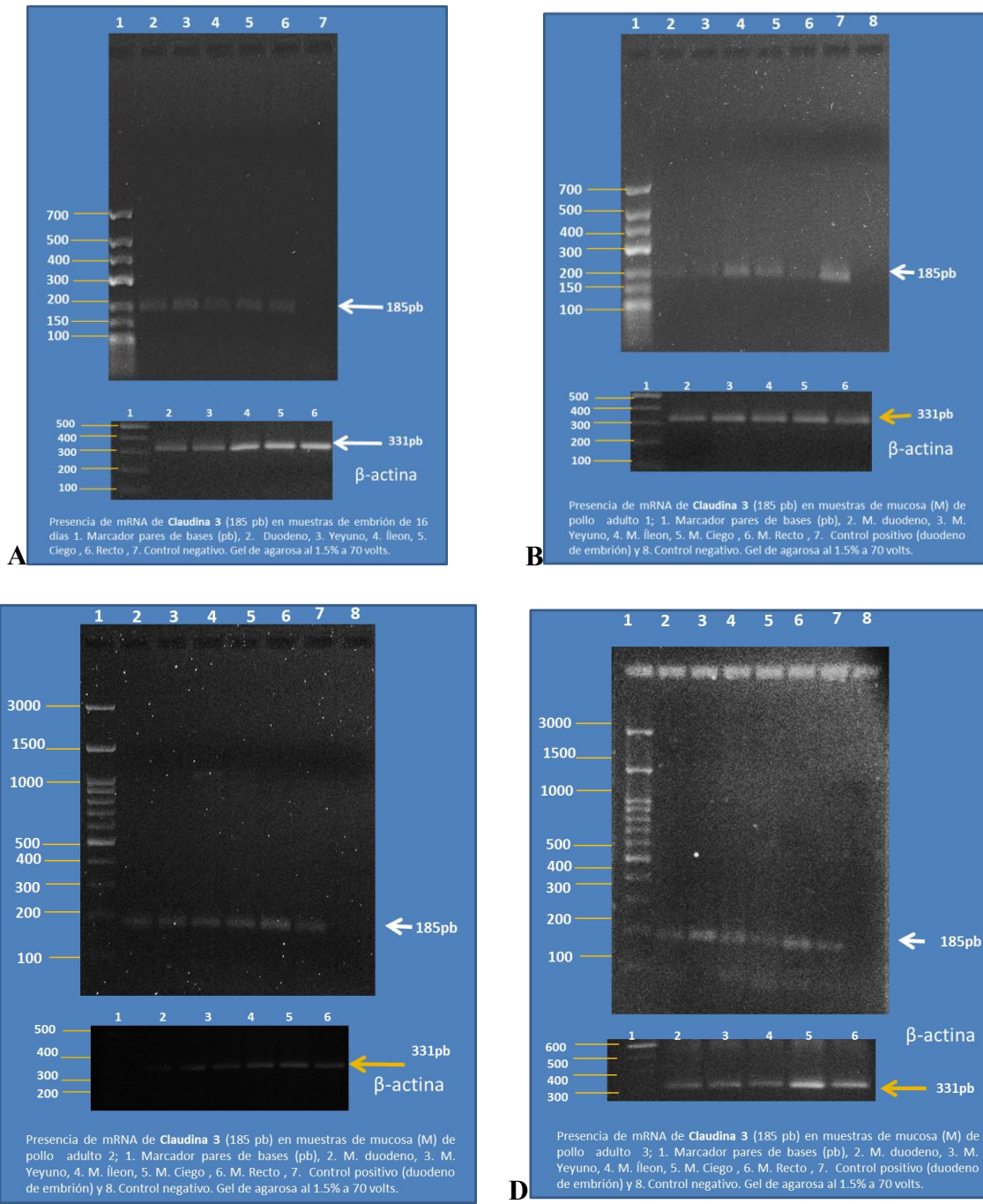
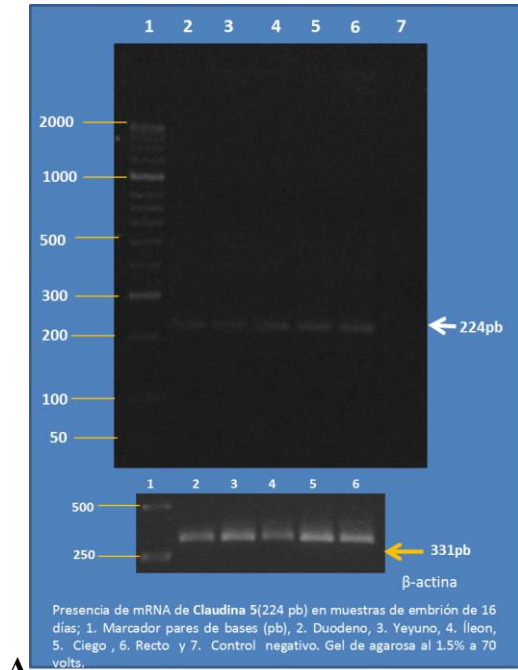
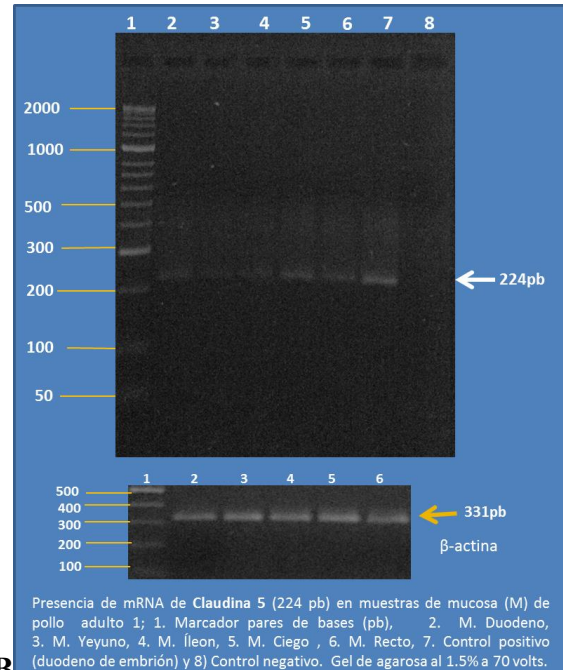


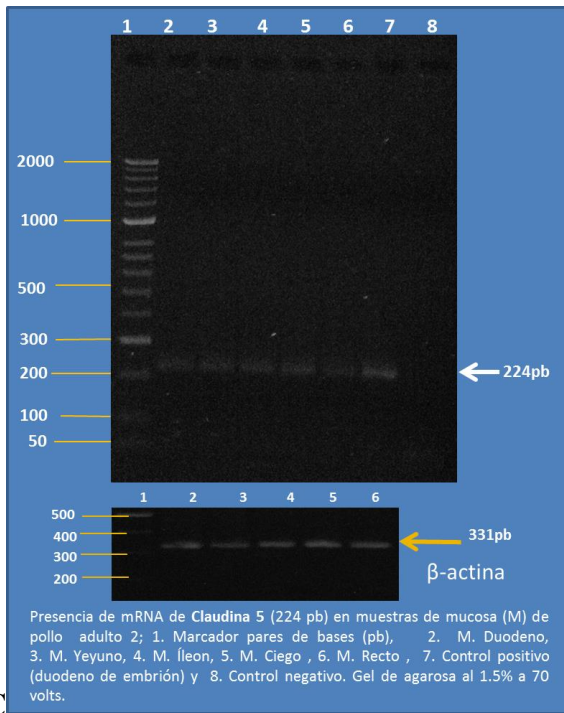
Figura 13. Análisis electroforético de RT-PCR de claudina 3. En el panel **A** se observan el gel con las muestras de embrión (control positivo) y en **B, C y D** se observan los gels con las muestras de mucosa intestinal de pollos de engorda 1, 2 y 3 respectivamente. El amplicón es señalado al lado derecho.



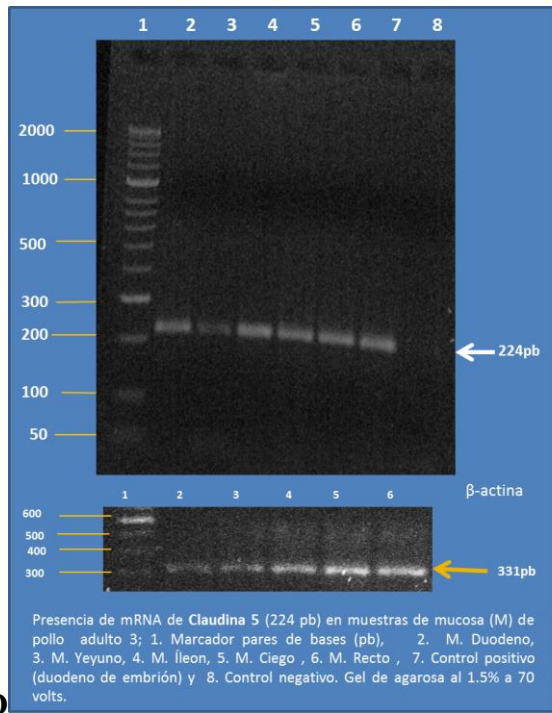
A



B



C



D

Figura 14. Análisis electroforético de RT-PCR de claudina 5. En el panel A muestras de SC de embrión (control positivo) y en los paneles B, C y D muestras de mucosa intestinal de las aves empleadas. El amplificado obtenido se indica del lado derecho en cada imagen.

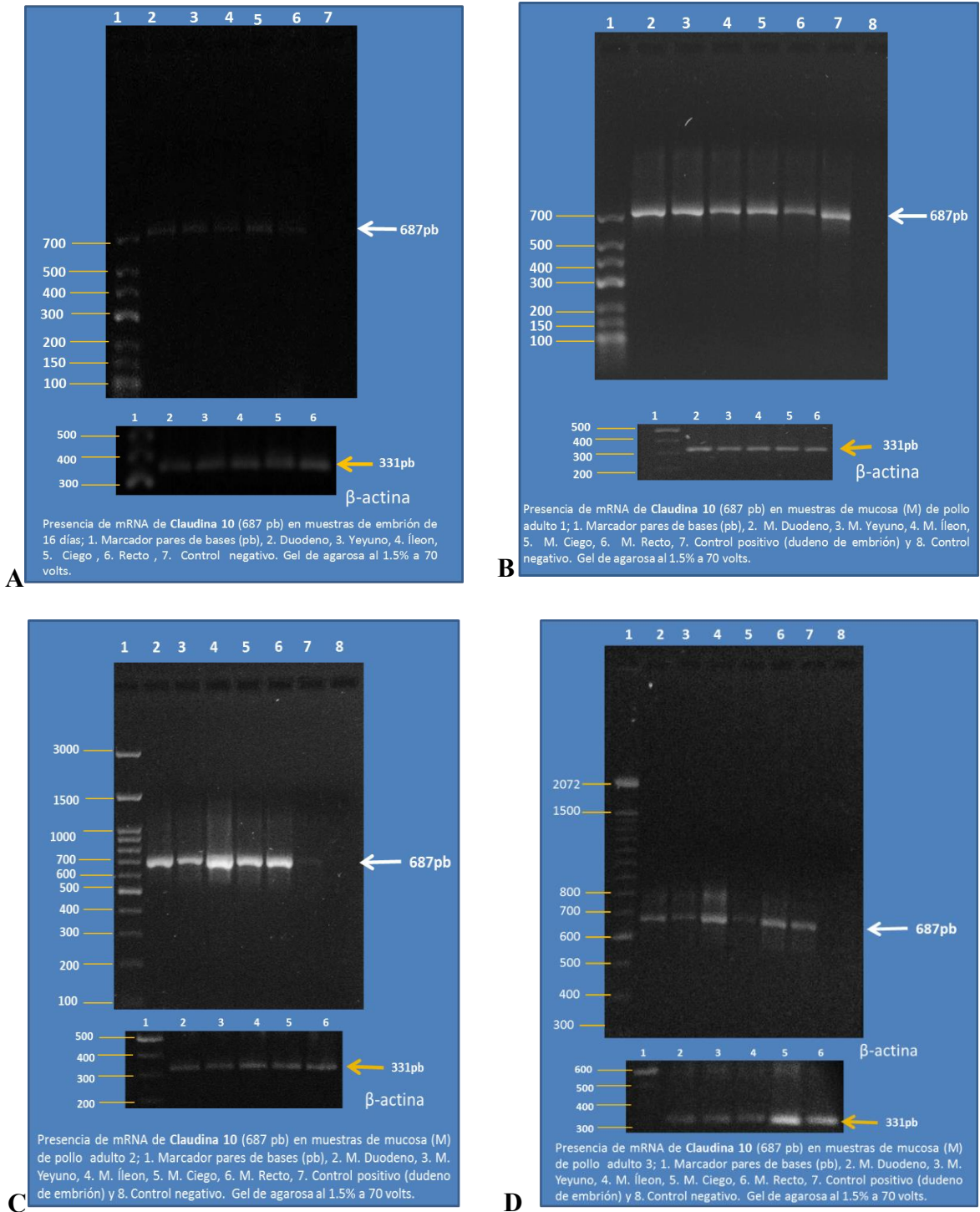


Figura 15. Análisis electroforético de RT-PCR de claudina 10. El panel **A** presenta las muestras de embrión (control positivo) y los paneles **B**, **C**, y **D** presentan las muestras de M. intestinal de pollos 1, 2 y 3, respectivamente. Del lado derecho se señala el amplificado observado.

Claudina 12

El análisis electroforético de la RT-PCR para claudina 12, evidenció un amplificado correspondiente a 738 pb (Figura 16) en todas las muestras en estudio. En el panel A las muestras de SC de embrión de pollo que fue el control positivo; en el panel B, C y D se presentan las muestras de mucosa de las gallinas domésticas 1, 2 y 3, respectivamente.

Claudina 16

En todas las muestras en estudio se presentó el amplificado esperado de 191 pb para claudina 16 (Figura 17). En el panel A se presentan las muestras del control positivo. En el panel B, C y D se presentan las muestras para ave 1, 2 y 3 respectivamente.

Ocludina

En el presente trabajo en cada uno de los segmentos analizados se observó el amplificado de 430 pb correspondiente para ocludina (Figura 18). En el panel A se corrieron las muestras de SC de embrión de 16 días de incubación; en el panel B, C y D se presentan las muestras de M. intestinal de pollo de engorda 1, 2 y 3 respectivamente.

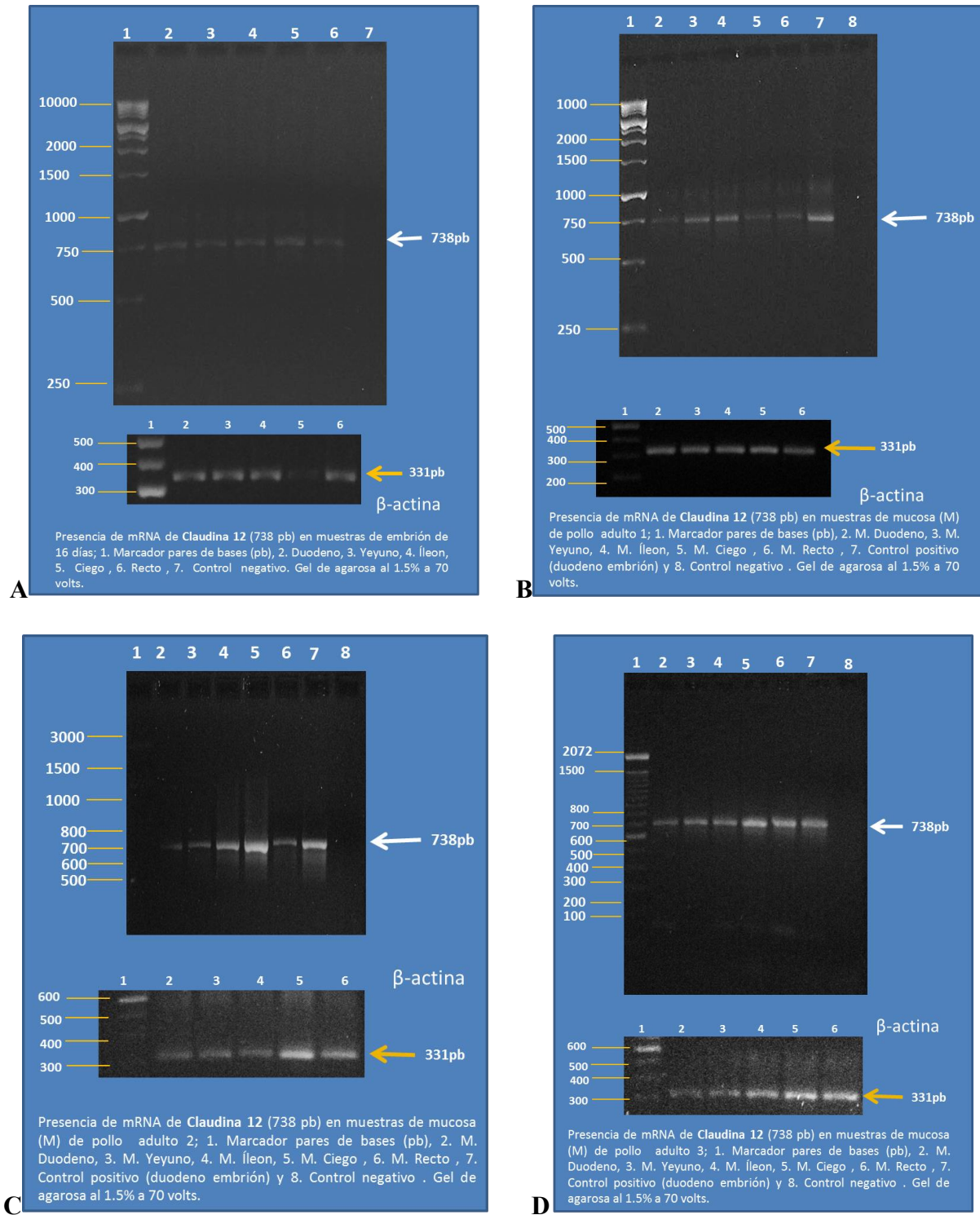


Figura 16. Análisis electroforético de RT-PCR de claudina 12. Panel **A**. Muestras de SC de embrión (control positivo) y en **B, C y D** muestras de mucosa intestinal de pollos de engorda 1, 2 y 3, correspondientemente. Del lado derecho se señala el amplificado detectado.

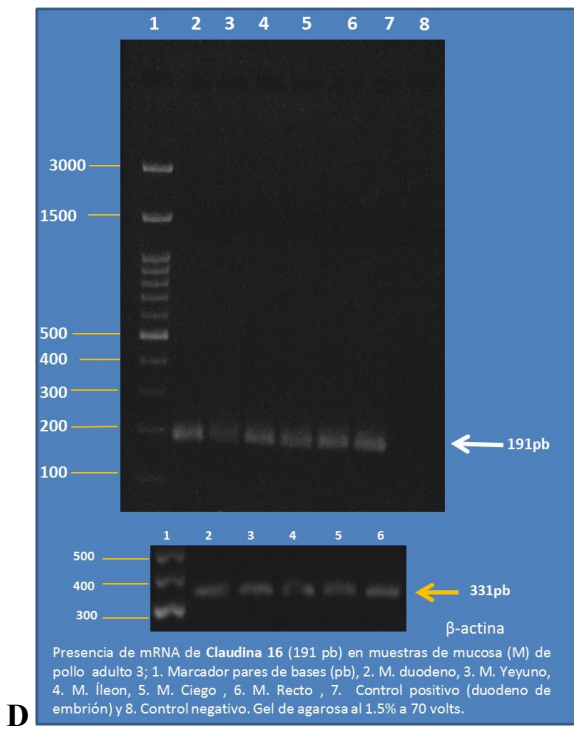
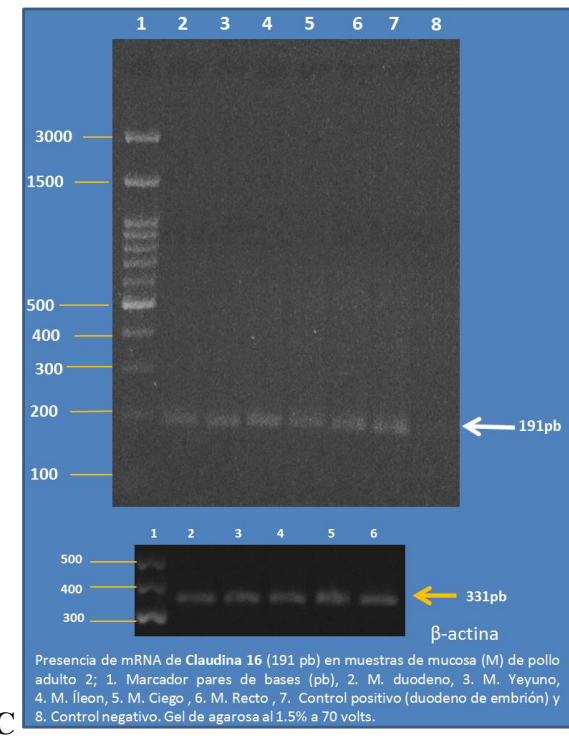
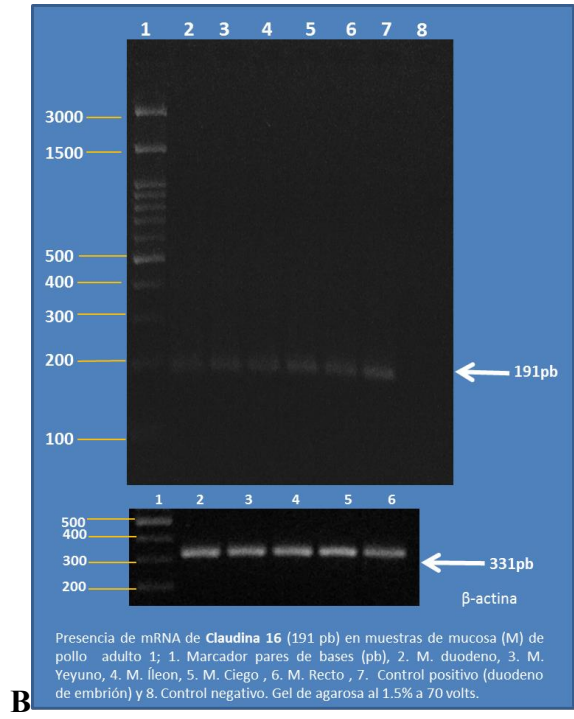
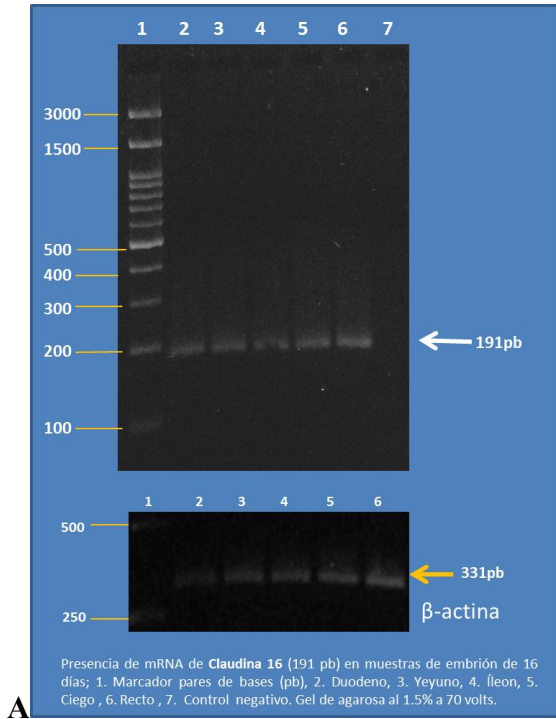


Figura 17. Análisis electroforético de RT-PCR de claudina 16. En el panel **A**. Muestras de SC de embrión (control positivo) y en los paneles **B**, **C** y **D** se presentan las muestras de mucosa intestinal de pollos de 6 a 8 semanas de edad 1, 2 y 3, respectivamente. Del lado derecho de cada panel se señala el amplificado observado.

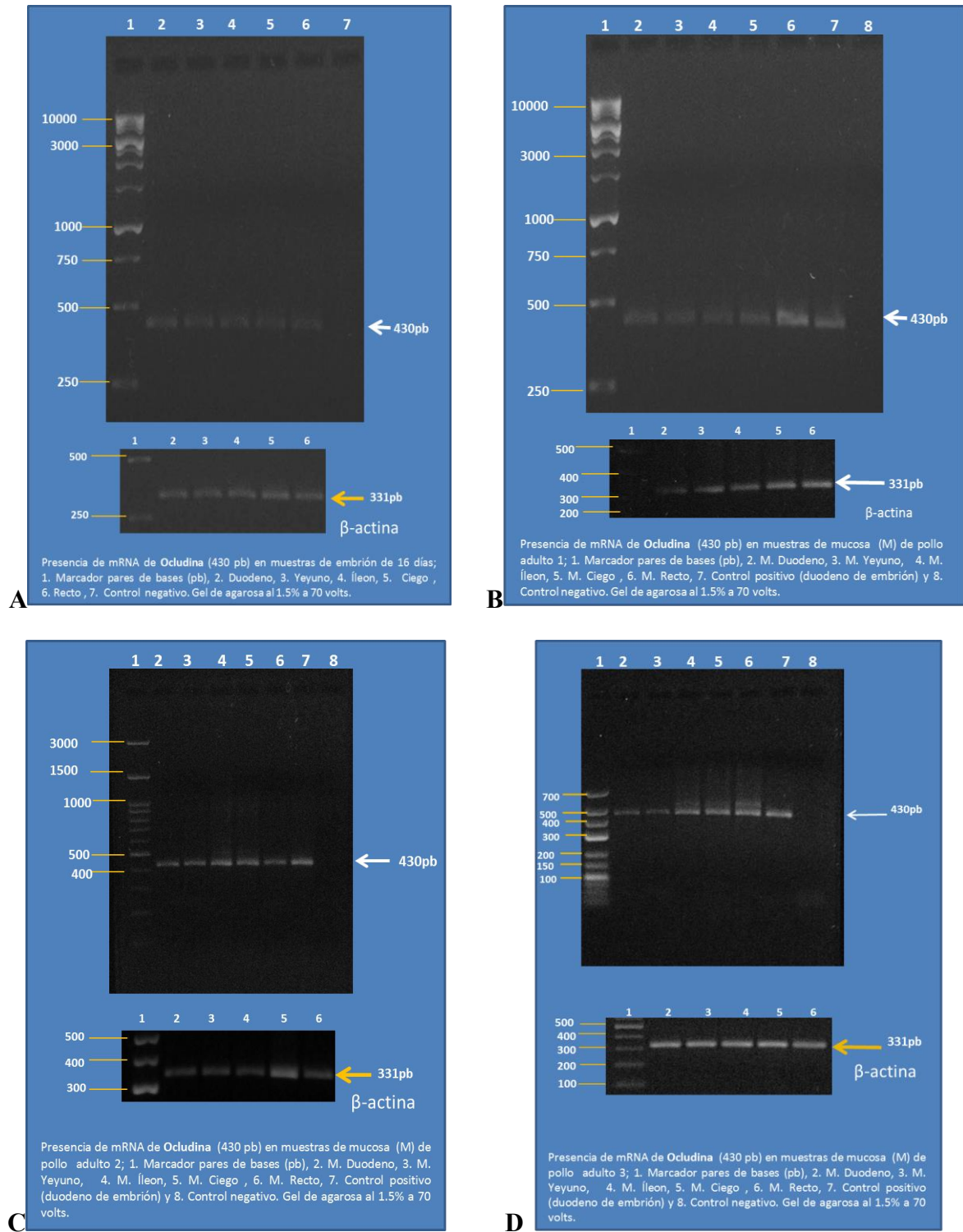


Figura 18. Análisis electroforético de RT-PCR de ocludina en el panel **A**. Muestras de control positivo y en los paneles **B**, **C** y **D** se exhiben las muestras de mucosa intestinal de aves 1, 2 y 3. Del lado derecho se señala el amplificado observado.

En los Cuadros 6 y 7 se resume la presencia de los productos amplificados por RT-PCR en las muestras de las diferentes regiones de intestino de embrión de pollo y aves de 6 a 8 semanas de edad, del mRNA codificante para las proteínas incluidas en el estudio.

Cuadro 6. Presencia del producto amplificado en embrión de pollo con el tamaño esperado para cada una de las muestras.

RT-PCR Embrión de pollo de 16 días de incubación. Control positivo					
Proteína/Segmento intestinal	Duodeno	Yeyuno	Íleon	Ciego	Recto
Claudina 1	✓	✓	✓	✓	✓
Claudina 2	✓	✓	✓	✓	✓
Claudina 3	✓	✓	✓	✓	✓
Claudina 5	✓	✓	✓	✓	✓
Claudina 10	✓	✓	✓	✓	✓
Claudina 12	✓	✓	✓	✓	✓
Claudina 16	✓	✓	✓	✓	✓
Ocludina	✓	✓	✓	✓	✓
β-actina	✓	✓	✓	✓	✓

Cuadro 7. Presencia del producto amplificado en gallina doméstica (*Gallus gallus domesticus*) con el tamaño esperado para cada una de las muestras.

RT-PCR Mucosa intestinal de <i>Gallus gallus domesticus</i> de 6 a 8 semanas.					
Proteína/Segmento intestinal	Duodeno	Yeyuno	Íleon	Ciego	Recto
Claudina 1	✓	✓	✓	✓	✓
Claudina 2	✓	✓	✓	✓	✓
Claudina 3	✓	✓	✓	✓	✓
Claudina 5	✓	✓	✓	✓	✓
Claudina 10	✓	✓	✓	✓	✓
Claudina 12	✓	✓	✓	✓	✓
Claudina 16	✓	✓	✓	✓	✓
Ocludina	✓	✓	✓	✓	✓
β-actina	✓	✓	✓	✓	✓

VII. DISCUSIÓN

El conocimiento de las proteínas que forman las uniones estrechas que regulan el tránsito paracelular en aves es indispensable para comprender el proceso de absorción intestinal, por lo que en el presente trabajo, mediante RT-PCR, se determinó la expresión de los mRNAs correspondientes a las proteínas que están involucradas en la formación de las uniones estrechas en la túnica mucosa de los diferentes segmentos del tracto intestinal en gallina doméstica de 6 a 8 semanas de edad.

Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que en la túnica mucosa de los cinco segmentos intestinales (duodeno, yeyuno, íleon, ciego y recto) de las aves utilizadas se presentó un amplificado para los genes de las proteínas que participan de manera primordial en la formación de las uniones estrechas; las cuales fueron seleccionadas por la función que desempeñan, ya sea, propiedades de barrera (claudina 1 y 5), propiedades de permeabilidad paracelular (claudina 2, 3, 10, 12 y 16) y formación estructural de las uniones estrechas (occludina) (Ozden, 2009; Collins *et al.*, 2013; Furuse *et al.*, 1993). Cabe señalar que dicha expresión fue similar a la presentada en las muestras provenientes de embriones de pollo de 16 días de desarrollo, lo cual permite apoyar la hipótesis de que la expresión de dichas proteínas de la mucosa del tracto gastrointestinal se sigue conservando en los animales de mayor edad.

Los resultados obtenidos en este estudio, mediante los ensayos de RT-PCR, en las muestras provenientes del tracto intestinal de embriones de pollo con 16 días de incubación, coinciden con lo reportado por Collins *et al.* (2013) quienes detectan productos codificantes para claudina 1, 2, 3, 5, 10, 12 y 16 en etapas de gastrulación hasta neurulación en embriones de pollo. Que de manera específica las encuentran en endodermo (capa embrionaria que origina al tracto intestinal); a partir de la etapa de neurulación claudina 3 y 12 fue expresada en el endodermo anterior del embrión mientras que claudina 16 se expresó en el endodermo subyacente a cabeza y pliegues, finalmente claudina 2 y 10 se expresó en endodermo a nivel del eje antero-posterior.

Además, la expresión del mRNA para claudina 1, 2, 3, 5 y 16 en duodeno, yeyuno e íleon provenientes de embrión, encontrada en este estudio, también concuerda con lo descrito por Ozden (2009), quien reporta la presencia y expresión de mRNA para las mismas proteínas en embriones con 18 y 20 días de incubación, así como 2 días posteriores a la eclosión. Al igual que concuerda con lo reportado por Simard *et al.* (2005), quienes evidencian los patrones de expresión de claudina 1 en tejidos embrionarios, entre los que destacan endodermo, duodeno y epitelio intestinal.

Encontramos también que en la mucosa intestinal de la gallina doméstica estudiada en este trabajo, los segmentos de duodeno, yeyuno, íleon, ciego y recto del tracto intestinal expresan un amplificado correspondiente al mRNA de claudina 1, 2, 3, 5, 10, 12, 16 y ocludina. Por lo que este es el primer trabajo que evidencia la presencia de mRNA para ocludina en mucosa intestinal proveniente de la gallina doméstica (*Gallus gallus domesticus*) de 6 a 8 semanas de desarrollo, en cada uno de los segmentos intestinales. Claudina 1 es una proteína importante en la selectividad y permeabilidad de la unión estrecha, participa en la función de barrera en la mayoría de los tejidos epiteliales (Simard *et al.*, 2005; Günzel *et al.*, 2013).

Furuse *et al.* (1993), reportan por primera vez la expresión de mRNA para ocludina en tejido de hígado proveniente de embriones de pollo, la describe como una proteína transmembranal siendo el principal componente de las uniones estrechas de células endoteliales y epiteliales. Estudios previos reportan la expresión de dicha proteína en diferentes muestras provenientes de mamíferos y embriones de pollo. En mamíferos, específicamente en ratones, también se cuenta con los perfiles de expresión de la proteína claudina 1 en los diferentes segmentos del tracto intestinal (Zhe Lu *et al.*, 2013; Amasheh *et al.*, 2011; Holmes *et al.*, 2006); lo cual nos sugiere que los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con lo expresado en mamíferos y relacionado a la función que desempeña dicha proteína es fundamental su presencia en las uniones estrechas de diferentes especies animales.

La detección del mRNA para la claudina 1 utilizando los iniciadores reportados por Ozden (2009) logró evidenciar un amplificado en las muestras de embriones (las cuales fungieron como el control positivo para el presente trabajo) correspondiente con lo reportado en la literatura, sin embargo su utilización en las muestras de la túnica mucosa de cada uno de los segmentos intestinales de aves de mayor edad el amplificado obtenido no coincidió con el tamaño esperado para el par de iniciadores utilizados. Lo anterior pudo haber sido debido a inespecificidad de los iniciadores con respecto al RNA mensajero amplificado o bien que se tratara de una isoforma presente en animales de 6 a 8 semanas de edad y que no se expresa en embriones; por lo que en el presente trabajo fue necesario el diseño de un par de iniciadores exclusivos, con el cual se detectó un amplificado esperado de 662 pb, tanto en las muestras provenientes de embriones como de las gallinas adultas.

La claudina 2 es altamente expresada en tejidos epiteliales y criptas intestinales de embriones de pollo y de mamíferos. En este trabajo se evidenció la presencia del amplificado correspondiente a 162pb en los segmentos intestinales de embriones de pollo coincidiendo con lo reportado por diversos autores (Ozden, 2009; Collins *et al.*, 2013 y Holmes *et al.*, 2006). En mamíferos Zhe Lu *et al.* (2013) han reportado los diferentes patrones de expresión en el tracto intestinal tanto de humanos como de ratones. En humanos claudina 2 fue predominantemente expresada en la parte proximal del tracto gastrointestinal detectándose en vellosidades y criptas del intestino delgado (duodeno e íleon) y a nivel del colon solamente se identificó en células de las criptas no diferenciadas. En ratones, Zhe Lu *et al.* (2013), reportan que se expresa altamente en todo el tracto gastrointestinal (duodeno, yeyuno, íleon e intestino grueso), donde se localiza específicamente en la profundidad de la cripta, expresándose débilmente del lado cercano al epitelio asociado a tejido linfóide asociado a mucosa (MALT) en comparación con el lado de la cripta en contacto con las células epiteliales de las vellosidades.

Claudina 3 es una proteína que es expresada en una gran variedad de epitelios actuando como formadora de barrera. El amplificado obtenido en este trabajo fue de 185pb; la expresión de esta claudina se da a lo largo del tracto gastrointestinal, principalmente en duodeno, yeyuno e íleon del ratón, rata, peces y embriones en diferentes etapas de desarrollo de acuerdo con lo reportado por Zhe Lu *et al.* (2013), Collins *et al.* (2013), Ozden *et al.* (2010) y Ozden (2009). Lo anterior concuerda con nuestros resultados en muestras de embriones de pollo y de ave de 6 a 8 semanas de edad. Además, también se logró evidenciar el amplificado en ciego y recto.

En relación a claudina 5, ésta se expresa predominantemente en uniones estrechas endoteliales y ha sido reportada en epitelio intestinal de ratas y ratones adultos por Zhe Lu *et al.* (2013), Amasheh *et al.* (2011) y Holmes *et al.* (2006); como también en diferentes periodos de desarrollo embrionario del pollo (Ozden *et al.*, 2010) quienes reportan la expresión de dicha claudina en el epitelio de duodeno, yeyuno e íleon. En este trabajo se encontró la expresión del mRNA para claudina 5 en todos los segmentos intestinales estudiados (embrión y pollo adulto incluyendo ciego y recto), lo cual sugiere que no existe variación en la posible presencia de la proteína, aunque sea diferente el tipo de alimento y la especie.

Günzel y colaboradores (2013) han reportado que claudina 10 es expresada en diversas estructuras, como los túbulos renales, médula de riñón e intestinos. Como se sabe, existen dos isoformas de esta proteína, claudina *10 a* que se expresa únicamente en riñón y, la claudina *10 b* que es expresada en otros tejidos; ambas tienen como función permear fuertemente el paso de cationes. En el presente trabajo se observó la expresión del mRNA para claudina 10, en duodeno, yeyuno e íleon de embrión, coincidiendo con Collins *et al.* (2013), reportan su expresión en dichos segmentos en diferentes etapas de desarrollo embrionario; en este trabajo también se identificó la presencia del mRNA en los últimos segmentos del tracto intestinal (ciego y recto), lo cual no estaba reportado hasta nuestro conocimiento anteriormente.

Así mismo, cabe destacar que tanto en muestras de embriones como en muestras de animales de 6 a 8 semanas de edad se detectó el mRNA en todos los segmentos intestinales estudiados y solamente se evidenció una banda coincidiendo con lo mencionado por Günzel *et al.* (2013) ya que las muestras analizadas fueron solamente de tracto intestinal donde se expresa una de las isoformas de la proteína y la otra isoforma se expresa exclusivamente en riñón, es por eso que no se evidenció en este trabajo.

Otra proteína que es expresada principalmente en epitelio intestinal es la claudina 12, la cual desempeña la función de aumentar la permeabilidad de calcio sobrerregulado por la vitamina D, sugiriendo un papel en la absorción paracelular de calcio dependiente de vitamina D. En este trabajo se encontró la expresión del mRNA en todos los segmentos intestinales tanto en embriones de 16 días de edad como en animales de 6 a 8 semanas de edad y solo se hizo evidente la presencia de una banda uniforme en todas las muestras analizadas. Collins y colaboradores (2013) reportan la presencia de 2 bandas en el análisis electroforético de amplificadores obtenidos por RT-PCR en muestras provenientes de embriones de pollo en distintas etapas de desarrollo, las cuales fueron sometidas a un análisis de secuenciación determinando que solo una de las bandas era la correcta (738 pb), por lo que nuestros resultados coinciden con el amplificado obtenido por dichos autores confirmando la presencia de una sola banda.

La claudina 16 es una proteína que puede estar presente en dos versiones, una corta y una larga, ya que cuenta con dos codones de inicio; algunos mamíferos solo poseen la versión corta (rata, ratón o cerdo) o la versión larga (caballo y rata topo desnuda) y algunas otras especies como elefante, perro y primates poseen ambas versiones. Su presencia ha sido reportada en el epitelio renal, donde participa en el transporte paracelular de cationes bivalentes (Günzel *et al.*, 2013).

Ozden *et al.* (2010) reportan su presencia en epitelio intestinal de embriones con 20 días de incubación, principalmente en exocinocitos caliciformes cercanos al ápice de las vellosidades y

también relaciona su presencia con la maduración del tejido. La expresión de esta proteína se ha demostrado en duodeno, yeyuno e íleon, coincidiendo con lo encontrado en el presente trabajo, además, en nuestro estudio también se encontró el amplificado en ciego y recto. Por la función que desempeña se considera coherente la presencia de su mensajero en estos segmentos ya que a nivel de ellos se da la absorción de agua y minerales. En embriones de pollo, Collins *et al.* (2013) reportan la detección de 2 bandas, pero señalan que solo una correspondió al mRNA en estudio lo cual confirmaron mediante la secuenciación de ambas bandas. En el presente trabajo solo fue detectado un amplificado de 191 pb, de esta manera se puede decir que a pesar de haber utilizado unos iniciadores diseñados en este trabajo también logró detectar únicamente una banda como lo confirmado por Collins *et al.* (2013) anteriormente.

En muchas células y tejidos de vertebrados, ocludina es una proteína considerada un componente importante de uniones estrechas (TJs), tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que participa en la formación de dichas estructuras, en la función de barrera y contribuye a su estabilización. En el presente trabajo se logró determinar por vez primera la expresión del mRNA para ocludina en todo el tracto intestinal de la gallina doméstica de 6 a 8 semanas de edad; lo que indica que hay alta probabilidad de que esté presente la proteína, la cual es indispensable para el desarrollo y estabilidad de las uniones estrechas.

En investigaciones anteriores se ha determinado que a nivel histológico el tracto intestinal aviar, a diferencia del tracto intestinal de mamíferos, presenta vellosidades aún en recto (Campos, 2014), por lo que, es posible que tanto el ciego como el recto presenten la función de absorción de nutrientes mediante el tránsito paracelular, el cual estaría regulado por las uniones estrechas; Karcher *et al.*, (2008) reportan que a nivel del epitelio intestinal de duodeno, yeyuno e íleon de las aves, el 90% de las sustancias son absorbidas mediante el tránsito paracelular mediante poros que se ubican en las uniones estrechas. En comparación con los mamíferos, en los ciegos de aves se lleva a cabo la digestión de celulosa y en recto la absorción de proteínas y agua. Debido a lo anterior se consideró de suma importancia incluir el análisis de estos últimos segmentos (ciego y recto) en este trabajo; logrando evidenciar la expresión de los mRNAs de las diversas claudinas y ocludina, tanto en muestras de segmento completo de embriones como en la túnica mucosa de pollos de 6 a 8 semanas de edad. De esta forma es factible que estas porciones del intestino grueso, al tener semejanza histológica con el intestino delgado también pudieran tenerla a nivel fisiológico durante los procesos de absorción.

Karcher *et al.* (2008) también señalan que las especies aviares son las únicas que tienen que cambiar la función del tracto gastrointestinal, pasando de aprovechar una yema de huevo rica en lípidos como fuente de nutrientes durante el periodo embrionario a obtenerlos de las dietas compuestas de carbohidratos y proteínas después de la eclosión. Así, la maduración del intestino delgado implica cambios morfológicos y fisiológicos, siendo esto la principal limitación para el crecimiento inicial óptimo de las aves, por lo que es muy probable la participación de las uniones estrechas en dichos cambios ya que su composición estructural puede ser remodelada.

Las funciones del intestino no solo influyen en el proceso de crecimiento, sino también llevan a cabo una función de protección al formar una barrera entre el entorno externo e interno del organismo, teniendo como su principal componente el epitelio intestinal, este contiene una

barrera terminal en el dominio lateral de la célula, cerca del dominio apical, lo cual depende de la formación o la presencia de las uniones estrechas. La función de barrera sirve principalmente para regular el paso de moléculas a nivel intercelular y mantener una valla entre los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática de la célula (Anderson, 2001). A nivel intercelular, las uniones estrechas juegan una doble función, barrera y permeabilidad.

Considerando esto último, pudieran presentarse diferencias en los tipos de proteínas, en particular las claudinas, que se expresen en determinadas etapas de desarrollo y estado fisiológico en los diferentes segmentos intestinales del ave. La variedad de claudinas incluirán aquellas relacionadas con la función de barrera y las que lo están con la de permeabilidad, pudiendo regularse los componentes de las uniones estrechas dependiendo si se requiere la absorción por la vía paracelular o bien mantener la función de barrera como mecanismo de defensa, el remodelaje de la arquitectura de las uniones estrechas permite que dichas funciones pueda realizarse. Estudios previos afirman que algunas claudinas expresadas en epitelio han sido implicadas en diversas funciones, incluyendo morfogénesis, reciclado en la membrana y alteración de la permeabilidad paracelular (Assimakopoulos, 2011; Ozden, 2009; Matsuda *et al.*, 2004; Rescigno *et al.*, 2001).

Nuestros resultados apoyan la posible presencia del mRNA de todas las claudinas y ocludina en estudio; unas llevan a cabo funciones de barrera (claudina 1, 5) otras participan en la de permeabilidad (claudina 2, 3, 10, 12 y 16) y de estructura como ocludina. Sugestivo de que si está presente el mRNA para todas estas proteínas siendo factible que en las aves de mayor edad se desarrollen ambas funciones, ya que las uniones estrechas presentes en el epitelio intestinal son estructuras dinámicas, cuyos componentes pueden ser intercambiados a través de un remodelado de su estructura en función de la etapa fisiológica del animal y sus requerimientos. Con los resultados obtenidos estamos marcando el inicio para tratar de comprender la fisiología intestinal a nivel estructural, ultraestructural y molecular, lo cual en un futuro nos podría ayudar a comprender mejor los procesos patológicos que se desarrollan durante las enfermedades que afectan al intestino, que tanto merman la producción avícola y a partir de esto, poder proponer posibles estrategias terapéuticas eficaces para prevenir o revertir tales enfermedades.




El conocimiento de las proteínas que integran a las uniones estrechas sentarán las bases para comprender los mecanismos que regulan su modificación en los diferentes estados fisiológicos del intestino, particularmente en los procesos de absorción en donde las aves utilizan preferentemente la vía paracelular. Por otro lado, también permitirá comprender como estas uniones son afectadas por diferentes patógenos que infectan al intestino ya sea a través de la interacción directa de los mismos con las células intestinales o por medio de toxinas que secretan.

Se tienen reportes de patógenos que afectan la uniones estrechas en mamíferos y aves, por ejemplo EPEC induce modificaciones a nivel intracelular que provocan alteraciones en el citoesqueleto que conllevan a la formación de los pedestales y ocasiona alteraciones que repercuten con la actividad fisiológica normal de la célula intestinal, como es el aumento de secreción de electrolitos, cambios en la permeabilidad de las uniones estrechas y remodelación

del dominio apical del enterocito, se sabe que redistribuye ZO1 y desfosforila ocludina todo esto lleva a la alteración de la unión estrecha (Vidal, 2003; Oliver *et al.*, 2008; Peralta *et al.*, 2008; Ruetz *et al.*, 2012). Otro ejemplo es *Clostridium difficile* el cual produce toxina A y B que participan en la alteración de las uniones estrechas, *Clostridium perfringens* produce una enterotoxina que estimula la redistribución de claudina 3 y 4. *Bacteroides fragilis* realiza la proteólisis de E-cadherina terminando en alteración de las uniones, así mismo se conoce que *Vibrio cholera* degrada ocludina y participa en la redistribución de las proteínas de uniones estrechas finalmente *Salmonella entérica* serovar *Typhimurium* ocasiona un decremento en la expresión de mRNA de ocludina y de claudinas 1 y 4 en el yeyuno de aves (Shao *et al.*, 2013).

Por lo anterior es importante conocer las proteínas que conforman a las uniones estrechas para poder identificar las alteraciones ocasionadas por los diferentes patógenos en ellas y así poder crear estrategias terapéuticas que permitan tratar este tipo de enfermedades, en particular en la producción avícola que es tan importante en nuestro país (Berkes *et al.*, 2003; Vidal *et al.*, 2003; Uzzau *et al.*, 2000; Sears *et al.*, 2000).

VIII. CONCLUSIONES

-  Se observó la presencia del amplificado correspondiente al mRNA para las proteínas de uniones estrechas claudina 1, 2, 3, 5, 10, 12 y 16; involucradas en la regulación del tránsito paracelular y las funciones de barrera que desempeñan en los segmentos intestinales duodeno, yeyuno e íleon; tanto en embrión como en animales de 6 a 8 semanas de edad (*Gallus gallus domesticus*) destinados para abasto.
-  Se observó por primera vez la presencia del amplificado correspondiente al mRNA para las proteínas de uniones estrechas claudina 1, 2, 3, 5, 10, 12 y 16; involucradas en la regulación del tránsito paracelular y las funciones de barrera en los segmentos intestinales ciego y recto; tanto en embrión como en pollos de engorda de 6 a 8 semanas de edad (*Gallus gallus domesticus*) destinada para abasto.
-  Se reporta por vez primera la expresión del mRNA codificante para ocludina en la gallina doméstica de 6 a 8 semanas de edad en todos los segmentos intestinales.

IX. PERSPECTIVAS

- 🐔 Realizar la secuenciación de los productos obtenidos para confirmar totalmente que lo amplificado corresponde al segmento del gen para cada una de las claudinas y ocludina de interés.
- 🐔 Realizar la técnica de RT-PCR cuantitativa que nos permita evidenciar diferencias en los niveles de expresión del RNA mensajero para las múltiples claudinas y ocludina de acuerdo al segmento intestinal en el intestino del ave de 6 a 8 semanas de edad.
- 🐔 Determinar la localización tisular y celular del mRNA en cada uno de los segmentos intestinales en estudio, mediante el uso de la Técnica Hibridación *in situ*.
- 🐔 Identificar mediante ensayos de inmunofluorescencia la presencia de las proteínas en cortes histológicos de los diferentes segmentos intestinales.
- 🐔 Establecer un modelo que nos permita reconocer el momento en el que se realizan las funciones de barrera y permeabilidad para desarrollar experimentos en los que se identifiquen las proteínas presentes en las uniones estrechas y confirmar el remodelaje de las uniones dependiendo la función que estén realizando.

X. ANEXOS

10.1. *Técnica de parafinado*

Los tejidos utilizados para esta técnica fueron previamente fijados en Paraformaldehído al 4% en PBS, en relación 1:10 durante 24 horas, posteriormente se realizó el procedimiento de parafinado.

- ✓ 30 min a 1 hora en Etanol al 70%
- ✓ 30 min a 1 hora en Etanol al 95%
- ✓ 30 min a 1 hora en Etanol al 100% I
- ✓ 30 min a 1 hora en Etanol al 100% II
- ✓ 30 min a 1 hora en Xileno absoluto I
- ✓ 30 min a 1 hora en Xileno absoluto II
- ✓ Colocar el tejido en parafina líquida durante 2 a 3 horas
- ✓ Colocar el tejido en parafina líquida nueva, dejar a temperatura ambiente durante toda la noche
- ✓ Colocar los bloques en el horno para que se licue la parafina
- ✓ Colocar el tejido en parafina líquida nueva cuidando la dirección correcta para el corte de 4µm, colectados en portaobjetos y sometidos al siguiente procesamiento.

10.2. *Técnica de desparafinado*

- ✓ 10 minutos en Xileno I
- ✓ 10 minutos en Xileno II
- ✓ 5 minutos en alcohol absoluto I
- ✓ 5 minutos en alcohol absoluto II
- ✓ 5 minutos en alcohol al 90% I
- ✓ 5 minutos en alcohol 90% II
- ✓ 5 minutos en alcohol 80%
- ✓ 5 minutos en alcohol 70%
- ✓ Enjuague en agua destilada
- ✓ Aplicar la tinción correspondiente

10.3. *Tinción Hematoxilina—Eosina*

- ✓ Aplicación de la técnica de desparafinado
- ✓ 10 minutos en Hematoxilina de Ehrlich
- ✓ Enjuagar con agua potable
- ✓ Sumergir 1 minuto en carbonato de litio
- ✓ Enjuagar con agua potable
- ✓ Enjuagar con agua destilada
- ✓ 15 minutos en Eosina

- ✓ Enjuagar con agua potable
- ✓ Sumergir brevemente en alcohol 96% I
- ✓ Sumergir brevemente en alcohol 96% II
- ✓ Sumergir brevemente en alcohol absoluto
- ✓ 5 minutos en Xileno I
- ✓ 5 minutos en Xileno II
- ✓ Agregar resina
- ✓ Colocar cubreobjetos
- ✓ Observar al microscopio

10.4. Extracción de RNA con mini kit Ambion

- ✓ Preparar Buffer de Lisis (BL) con 1% de 2-Mercaptoetanol, 1 ml de BL por cada 10 µl de 2-Mercaptoetanol
- ✓ 10—30 mg de tejido. Agregar 0.6 ml

PREPARAR LA MUESTRA

- ✓ Colocar un tubo de fondo redondo libre RNAsa en hielo y transferir muestra dentro del tubo
- ✓ Usando pipetas libre de RNAsas. Adicionar 600 µl de Buffer de Lisis en la muestra
- ✓ Homogenizar la muestra usando Sonicador con las condiciones de 10 pulsaciones, 10 segundos con una amplitud de 90%
- ✓ Centrifugar a 2600 rpm a 5 minutos a temperatura ambiente
- ✓ Cuidadosamente transferir sobrenadante a un nuevo tubo libre de RNAsa
- ✓ Añadir 500—600 µl de Etanol 70% en el tejido homogenizado
- ✓ Mezclar cuidadosamente por agitación o en vortex, para dispersar cualquier precipitado visible que se tome
- ✓ Transferir aproximadamente 600 µl de la muestra incluyendo cualquier remanente del precipitado al Spin Cartridge
- ✓ Centrifugar a 12,000 rpm durante 15 segundos a temperatura ambiente
- ✓ Eliminar el flujo y reinsertar el Spin Cartridge en el mismo Collection Tube
- ✓ Repetir pasos 3—4 hasta que toda la muestra sea procesada
- ✓ Añadir 700 µl Buffer de Lavado 1 al Spin Cartridge
- ✓ Centrifugar a 12,000 rpm por 15 segundos a temperatura ambiente
- ✓ Eliminar el flujo y el Collection Tube
- ✓ Colocar Spin Cartridge dentro de un nuevo Collection Tube
- ✓ Añadir 500 µl Buffer de lavado 2 con Etanol al Spin Cartridge
- ✓ Centrifugar 12,000 rpm por 15 segundos
- ✓ Eliminar el flujo y reinsertar el Spin Cartridge en el mismo tu Collection Tube
- ✓ Repetir pasos 7—8 una vez

- ✓ Centrifugar el Spin Cartridge a 12,000 rpm por 1 minuto para secar la membrana con RNA unido
- ✓ Desechar el Collection Tube e insertar el Spin Cartridge dentro de un Recovery Tube
- ✓ Añadir 30—100 µl de Agua libre de RNAsa al centro del Spin Cartridge
- ✓ Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto
- ✓ Centrifugar x 2 minutos a > 12,000 rpm a temperatura ambiente
- ✓ Almacenar el purificado RNA a -21°C

10.5. *Espectrofotometría de la muestra de RNA obtenida*

- ✓ Calibrar el equipo con 2 µl de agua libre de RNAsas en el brazo del equipo
- ✓ Abrir el software Nanodrop y seleccionar la opción de ácidos nucleicos
- ✓ Colocar 2 µl de agua libre de RNAsas y registrarlo como blanco
- ✓ Correr el programa
- ✓ Colocar 2 µl de la muestra de RNA a cuantificar y correr el programa
- ✓ Registrar la concentración de RNA proporcionada por la relación 260/280
- ✓ Limpiar con papel limpia lentes el equipo

10.6. *Electroforesis horizontal de la muestra de RNA*

- ✓ Enjuagar todo el instrumental con agua DEPC (Diethyl pirocarbonato) para evitar la presencia de RNAsas
- ✓ Pesar 0.45 gramos (g) de Agarosa
- ✓ Agregar 30 ml de TBE 1X (Solución buffer que contiene Tris base, ácido bórico y EDTA)
- ✓ Calentar en microondas hasta que la agarosa se disuelva
- ✓ Agregar 4 µl de bromuro de etidio 1000X
- ✓ Verter en el recipiente para permitir la gelificación de la agarosa, colocando el peine para formar los pozos
- ✓ Colocar el gel en la cámara de electroforesis
- ✓ Agregar TBE 1X para correr la muestra
- ✓ En un trozo de parafilm, colocar 2 µl de Buffer de carga
- ✓ Colocar 8 µl de la muestra de RNA y mezclar
- ✓ Colocar en un pozo del gel
- ✓ Encender la cámara y correr el gel a 65 volts durante 1 hora 30 minutos aproximadamente
- ✓ Observar el gel en un transiluminador de luz UV
- ✓ Realizar la fotografía
- ✓ Limpiar el aparato

10.7. *Síntesis de cDNA (Ácido desoxirribonucleico de cadena complementaria)*

- ✓ Agregar los reactivos en un tubo libre de nucleasas

Mezcla 1

- 1 µl Oligo dT
- 2 µl RNA total 1ng—5 µg (muestra)
- 1 µl Mix dNTP's 10mM
- 12 µl agua inyectable estéril

- ✓ Calentar la mezcla a 65°C durante 5 minutos

- Pausar el termociclador
- Sacar y enfriar en hielo

Mezcla 2

- 4 µl de Buffer de primera hebra al 5X
- 2 µl DTT 0.1M

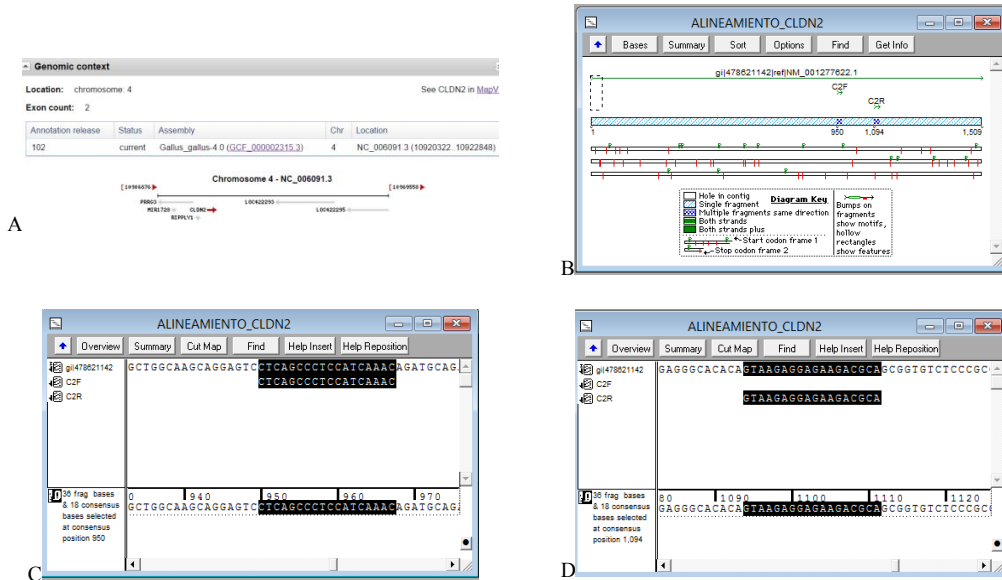
- ✓ Mezclar por pipeteo
- ✓ Agitar por vortex para mezclar los reactivos
- ✓ Incubar a 37°C durante 2 minutos en el termociclador
- ✓ Pausar la reacción y poner en hielo
- ✓ Agregar 1 µl de M-MLV RT y mezclar suavemente por pipeteo
- ✓ Incubar a 37°C durante 50 minutos
- ✓ Inactivar la reacción por calentamiento 70°C durante 15 minutos
- ✓ Almacenar el cDNA a -21°C hasta su posterior uso

10.8. *Cuantificación de cDNA con Nanodrop*

ANIMAL	CARACTERÍSTICA	DUODENO	YEYUNO	ÍLEON	CIEGO	RECTO
EMBRIÓN	Relación 260/280	1,65	1,64	1,66	1,65	1,64
	Cantidad ng/µl	1140,4	721,5	647,2	738,6	756,5
AVE 1	Relación 260/280	1,77	1,76	1,80	1,80	1,80
	Cantidad ng/µl	625,1	616,5	586,3	617,7	603,7
AVE 2	Relación 260/280	1,57	1,57	1,63	1,63	1,58
	Cantidad ng/µl	536	567,4	660,4	569,5	541,1
AVE 3	Relación 260/280	1,72	1,66	1,69	1,71	1,72
	Cantidad ng/µl	706,3	638,7	705	784,5	842

10.9. Alineamiento de iniciadores

Claudina 2 162pb



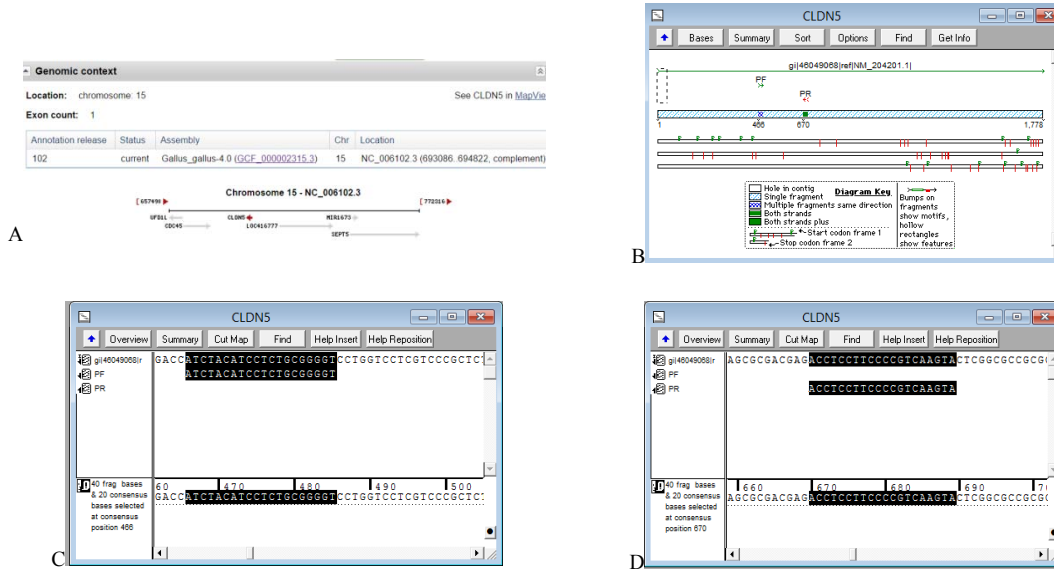
Alineamiento de iniciadores en el gen de claudina 2; panel A muestra el cromosoma que contiene el gen codificante para claudina 2; panel B se observa el área donde se ubican ambos iniciadores; panel C y D se observa el alineamiento para el iniciador frontal y reverso respectivamente.

Claudina 3 185pb



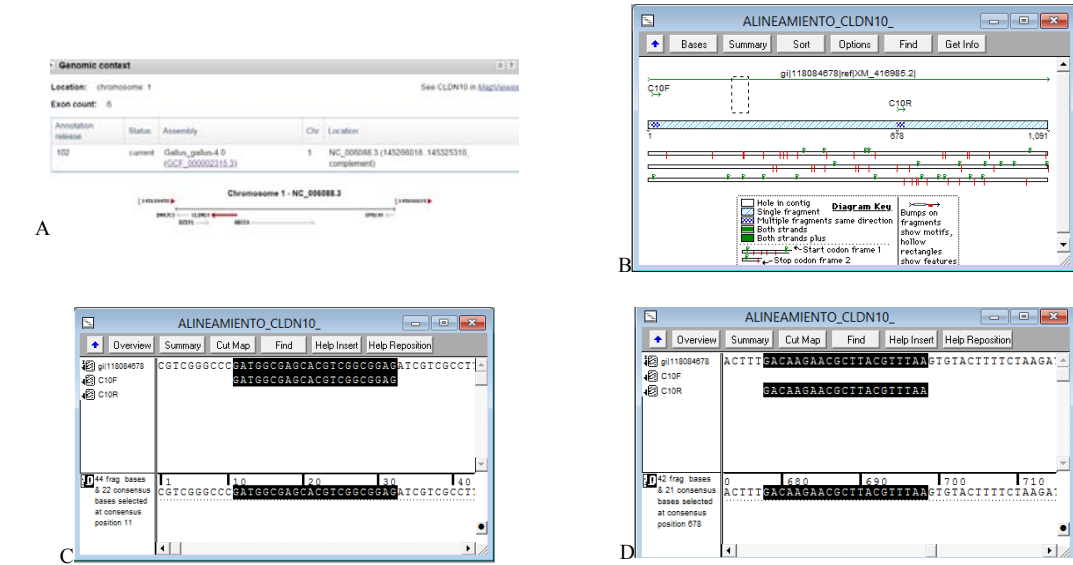
Alineamiento de iniciadores en el gen de claudina 3; panel A muestra el cromosoma que contiene el gen codificante para claudina 3; panel B se observa el área donde se ubican ambos iniciadores; panel C y D se observa el alineamiento para el iniciador frontal y reverso respectivamente.

Claudina 5 224pb



Alineamiento de iniciadores en el gen de claudina 5; panel A muestra el cromosoma que contiene el gen codificante para claudina 5; panel B se observa el área donde se ubican ambos iniciadores; panel C y D se observa el alineamiento para el iniciador frontal y reverso respectivamente.

Claudina 10 687pb



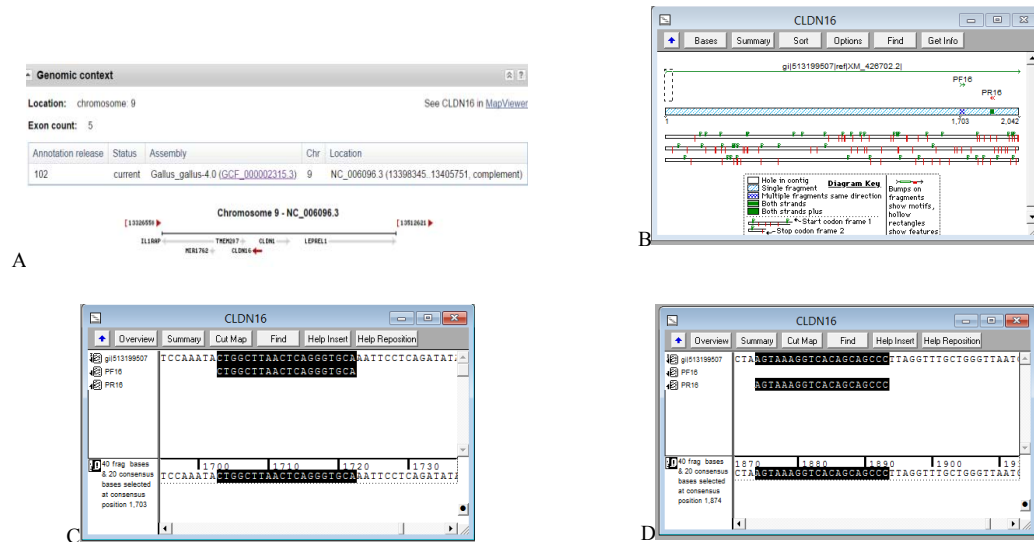
Alineamiento de iniciadores en el gen de claudina 10; panel A muestra el cromosoma que contiene el gen codificante para claudina 10; panel B se observa el área donde se ubican ambos iniciadores; panel C y D se observa el alineamiento para el iniciador frontal y reverso respectivamente.

Claudina 12 738pb



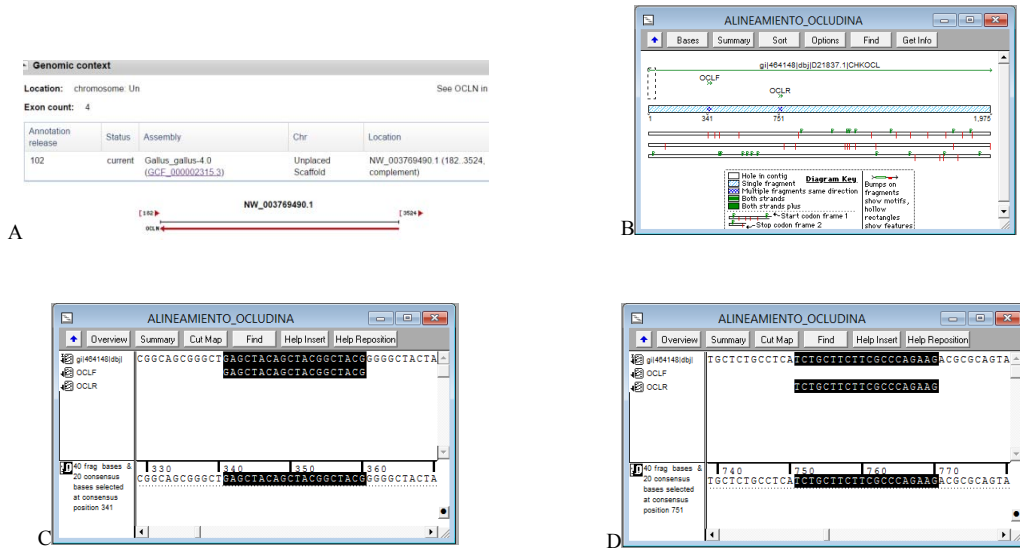
Alineamiento de iniciadores en el gen de claudina 12; panel A muestra el cromosoma que contiene el gen codificante para claudina 12; panel B se observa el área donde se ubican ambos iniciadores; panel C y D se observa el alineamiento para el iniciador frontal y reverso respectivamente.

Claudina 16 191pb



Alineamiento de iniciadores en el gen de claudina 16; panel A muestra el cromosoma que contiene el gen codificante para claudina 16; panel B se observa el área donde se ubican ambos iniciadores; panel C y D se observa el alineamiento para el iniciador frontal y reverso respectivamente.

Ocludina 430pb



Alineamiento de iniciadores en el gen de ocludina; panel A muestra el cromosoma que contiene el gen codificante para ocludina; panel B se observa el área donde se ubican ambos iniciadores; panel C y D se observa el alineamiento para el iniciador frontal y reverso respectivamente.

XI. REFERENCIAS

1. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. (2015). *Molecular Biology of the Cell*. 6th ed., New York, USA: Garland Science.
2. Amasheh S., Fromm M., Günzel D. (2011). Claudins of intestine and nephron – a correlation of molecular tight junction structure and barrier function. *Acta Physiologica*. 201: 133–140.
3. Anderson JM. (2001). Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *Physiology*. 16 (3): 126—130.
4. Anderson JM., Van Itallie CM. (1995). Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *American Journal Physiology*. 269. *Gastrointestinal Liver Physiology*. 32: G467-G475.
5. Angelow S., Ahlstrom R., Yu AS. (2008). Biology of claudins. *American Journal Physiology*. *Renal Physiology*. 295: F867–F876.
6. Assimakopoulos SF. (2011). Enterocytes tight junctions: From molecules to diseases. *World Journal Gastrointestinal Pathophysiology*. 2(6): 23-137.
7. Balda MS., Flores-Maldonado C., Cerejido M., Matter K. (2000). Multiple domains of occludin are involved in the regulation of paracellular permeability. *Journal Cell Biochemistry*. 78(1):85-96.
8. Bambang A., Naoki I., Yukinori Y. (2013). Expression of tight junction molecule “claudins” in the lower oviductal segments and their changes with egg-laying phase and gonadal steroid stimulation in hens. *Theriogenology*. 79: 211–218.
9. Banks WJ. (1996). *Histología veterinaria y aplicada*. 2^a ed., México: Manual Moderno.
10. Berkes J., Viswanathan VK., Savkovic SD, Hecht G. (2003). Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut*. 52(3): 439–451.
11. Blank F., Wehrli M., Lehmann A., Baum O., Gehr P., Garnier GV., Rothen-Rutishauser BM. (2011). Macrophages and dendritic cells express tight junction proteins and exchange particles in an in vitro model of the human airway wall. *Immunobiology*. 216: 86–95.
12. Burdon RH. (1978). *Biosíntesis de RNA*. España: Ediciones Omega.
13. Campos GCA. (2014). Estudio de las poblaciones celulares localizadas en el epitelio de la mucosa del intestino de la gallina doméstica (*Gallus gallus domesticus*). FES-Cuautitlán UNAM. Tesis de Maestría. México.
14. Clara M. (2008). *Curso de Biología Animal*. Facultad de Ciencias. Sección Zoología de Vertebrados.
15. Close B., Battleborough C., Battleborough L., Brent K. (1996). *Recomendaciones para la eutanasia de los animales de experimentación: Parte 2*. UK.
16. Collins M., Baumholtz A., Ryan A. (2013). Claudin family members exhibit unique temporal and spatial expression boundaries in the chick embryo. *Tissue Barriers*. 1:e24517.

17. Cording J., Berg J., Käding N., Bellmann C., Tschek C., Westphal JK., Milatz S., Günzel D., Wolburg H., Piontek J., Huber O., Blasig IE. (2013). In tight junctions, claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization. *Journal of Cell Science*. 126: 554–564.
18. Costa J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 22(5): 299-305.
19. Cummins PM. (2012). Occludin: one protein, many forms. *Molecular and Cellular Biology*. 32 (2): 242.
20. Díaz FP. (2008). Histología del intestino delgado e intestino grueso del conejo (*Oryctolagus cuniculus*). FES-Cuautitlán UNAM. Tesis de Licenciatura. México.
21. Dyce KM., Sack WO., Wensing CJ. (2012). Anatomía veterinaria. 4^{ta}. ed. México: El Manual Moderno.
22. Elkouby- Naor L., Ben-Yosef T. (2010). Functions of claudin tight junction proteins and their complex interactions in various physiological systems. *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier Inc. 279.
23. Fanning AS., Mitic LL., Anderson JM. (1999). Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *Journal American Society Nephrology*. 10: 1337–1345.
24. Feldman GJ., Mullin JM., Ryan MP. (2005). Occludin: structure, function and regulation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57: 883– 917.
25. Fujita H., Chiba H., Yokozaki H., Sakai N., Sugimoto K., Wada T., Kojima T., Yamashita T., Sawada N. (2006). Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. *Journal Histochemistry Cytochemistry*. 54: 933.
26. Furuse M. (2010). Introduction: claudins, tight junctions, and the paracellular barrier. Elsevier Inc. 10: 1063-5823.
27. Furuse M., Hirase T., Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S., Tsukita S. (1993). Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of Cell Biology*. 123(6) parte 2: 1777—1788.
28. Garthner L., Hiatt J. (2002). Texto Atlas de Histología. 2^{da} ed. México: McGraw-Hill Interamericana.
29. Gómez VG., López CC., Maldonado BC., Ávila GE. (2010). El sistema inmune digestivo en las aves. *Investigación y Ciencia*. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 18 (48): 9-16.
30. González-Mariscal L., Betanzos A., Nava P., Jaramillo BE. (2003). Tight junction proteins. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. 81: 1–44.
31. González-Mariscal L., Tapia R., Chamorro D. (2007). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1778: 729—756.
32. Gregus Z. El rendimiento óptimo solo con animales sanos, papel fundamental de la nutrición. Latinoamérica. Engormix. <https://www.engormix.com/MA-avicultura/nutricion/articulos/rendimiento-optimo-solo-con-t5717/141-p0.htm>.
33. Guadarrama GJ. (1991). Morfología del aparato digestivo de la gallina doméstica. FES-Cuautitlán UNAM. Tesis de Licenciatura. México.
34. Günzel D., Yu ASL. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiological Reviews*. 93: 525–569.

35. Haworth KE., El-Hanfy A., Prayag S., Healy C., Dietrich S., Sharpe P. (2005). Expression of claudin-3 during chick development. *Gene Expression Patterns*. 6(1): 40-4.
36. Henry AE. (1992). *PCR Technology principles and applications for DNA amplification*. New York: Oxford University Press.
37. Herrington CS., O'leary JJ. (1998). *PCR3 a practical approach PCR in situ hybridization*. New York. Tokyo: IRL Press Oxford University Press.
38. Holmes JL., Van Itallie CM., Rasmussen JE., Anderson JM. (2006). Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expression Patterns*. 6: 581–588.
39. Karasov WH. (2011). Digestive physiology: a view from molecules to ecosystem. *American Journal Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 301:R276-R284.
40. Karasov WH., Caviedes-Vidal E., Bakken BH., Izhaki I., Samuni-Blank M., Arad Z. (2012). Capacity for absorption of water-soluble secondary metabolites greater in birds than in rodents. *Plos One* 7(2): e32417.
41. Karcher DM., Applegate T. (2008). Survey of enterocyte morphology and tight junction formation in the small intestine of avian embryos. *Poultry Science*. 87:339–350.
42. Lapierre, L. (2000). The molecular structure of the tight junction. *Advanced drug delivery reviews*. Elsevier. 41: 255–264.
43. Luna MM. (2012). Estandarización de la técnica de RT-PCR para la evaluación de la expresión del gen ADH1 de *Candida albicans*. FES-Cuautitlán UNAM. Tesis de licenciatura. México.
44. MacDonald O., Chediack JG., Caviedes-Vidal E. (2008). Isolation of epithelial cells, villi and crypts from small intestine of pigeons (*Columba livia*). *Biocel*. 32(3):219-227.
45. Matsuda M., Kubo A., Furuse M., Tsukita S. (2004). A peculiar internalization of claudins, tight junction specific adhesion molecules, during the intercellular movement of epithelial cells. *Journal of Cell Science*. 117: 1247-1257.
46. Mc Pherson M., Moller S. (2006). *PCR*. 2a. ed. Taylor and Francis Group.
47. Morales RL. (2007). Las paredes celulares de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*: un aditivo natural capaz de mejorar la productividad y salud del pollo de engorde. Universidad de Barcelona. Tesis doctoral. España.
48. Muresan Z., Paul DL., Goodenough DA. (2000). Occludin 1B, a variant of the tight junction protein occludin. *Molecular Biology of the Cell*. 11: 627–634.
49. Nolan T., Bustin SA. (2013). *PCR Technology*. 3ra. Ed. New York: CRC Press Taylor and Francis Group.
50. Nunes F., López LN., Lin HW., Davies C., Azevedo RB., Gow A. (2006). Distinct subdomain organization and molecular composition of a tight junction with adherens junction features. *Journal of Cell Science*. 119:4819–4827.
51. Ozden O. (2009). Expression of claudin tight junction proteins in response to varying environmental and physiological conditions. Faculty of North Carolina State University. Tesis de doctorado. USA.
52. Ozden O., Black BL., Ashwell CM., Tipsmark CK., Borski RJ., Grubb BJ. (2010). Developmental profile of claudin-3, -5, and -16 proteins in the epithelium of chick intestine. *Anatomical Record*. 293(7):1175-83.

53. Quintero ML., Soto ZCI., Mercado MC. (2012). Temas selectos de biología molecular. (Manual del curso práctico). UNAM. FESC.
54. Raleigh DR., Marchiando AM., Yong Z., Le S., Hiroyuki S., Yingmin W., Manyuan L., Turner JR. (2010). Tight junction associated MARVEL proteins marvelD3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Molecular Biology of the Cell*. (21): 1200–1213.
55. Ramiro-Puig E., Pérez-Cano FJ., Castellote C., Franch A. y Castell M. (2008). El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 100 (1): 29—34.
56. Reece WO. (2004). *Dukes physiology of domestic animals*. 12 ed., New York: Cornell University Press.
57. Rescigno M., Urbano M., Valzasina B., Francolini M., Rotta G., Bonasio R., Granucci F., Kraehenbuhl JP., Ricciardi-Castagnoli P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Publishing Group*. 2 (4): 361—367.
58. Sakai N., Chiba H., Fujita H., Akashi Y., Osanai M., Kojima T., Sawada N. (2007). Expression patterns of claudin family of tight-junction proteins in the mouse prostate. *Histochemistry Cell Biology*. 127:457–462.
59. Sambrook J., Russel D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
60. Sears C. (2000). Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions V. Assault of the tight junction by enteric pathogens. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 279: G1129–G1134.
61. Shao Y.; Guo Y.; Wang Z. (2013). β -1,3/1,6-Glucan alleviated intestinal mucosal barrier impairment of broiler chickens challenged with *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Poultry Science*. 92: 1764–1773.
62. Shufeng L., Wei Y., Le S., Jerrold RT., Carolyn B., Coyne, Tianyi W. (2009). Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are down regulated during infection to prevent superinfection. *Journal of Virology*. 2011–2014.
63. Simard A., Di Pietro E., Ryan A. (2005). Gene expression pattern of claudin-1 during chick embryogenesis. *Gene Expression Patterns*. 5: 553—560.
64. Takahashi S., Iwamoto N., Sasaki H., Ohashi M., Oda Y., Taulita S., Furuse M. (2008). The E3 ubiquitin ligase LNXp80 promotes the removal of claudins from tight junctions in MDCK cells. *Journal Cell Science*. 122:985-994.
65. Tamay de Dios L., Ibarra C., Velasquillo C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*. 2 (2): 70—78.
66. Ulluwishewa D., Anderson RC., McNabb WC., Moughan PJ., Wells JM., Roy NC. (2011). Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *The Journal of Nutrition*. 141: 769–776.
67. Unión Nacional de Avicultores. (2014). En línea www.una.org.mx/. México.
68. Uzzau S., Fasano A. (2000). Cross-talk between enteric pathogens and the intestine. *Cell Microbiology*. 2(2): 83—89.

69. Vidal GJ. (2003). *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC): una causa frecuente de diarrea infantil. *Secretaria de Salud del Estado de Tabasco*. 9 (1).
70. Vinueza-Burgos C. (2009). PCR en tiempo real: la nueva era de la información genética celular. *Red Vet*. 10 (2): 1695-7504.
71. Wang Y., Liu Y., Sidhu A., Ma Z., McClain C., Feng W. (2012). *Lactobacillus rhamnosus* GG culture supernatant ameliorates acute alcohol-induced intestinal permeability and liver injury. *American Journal Physiologic Gastrointestinal Liver Physiology*. 303: G32–G41.
72. Whittow GC. (2000). *Sturkie's avian physiology*. 5th ed. USA: Academic Press.
73. Yakey Y., Shepshelovitch J., Nevo-Yassaf I., Yeheskel A., Shmerling H., Kwiatek JM., Gaus K., Pasmanik-Chor M., Hirschberg K. (2012). The MARVEL transmembrane motif of occludin mediates oligomerization and targeting to the basolateral surface in epithelia. *Journal of Cell Science*. 125: 3545–3556.
74. Young B., Heath JW. (2000). *Wheater's histología funcional, texto y atlas en color*. 4^{ta} ed. London, U.K: Churchill Livingstone.
75. Zárate SP., Jiménez SC., Badillo CJ., Garibay OC., Oliver SM. (2009). *Manual de laboratorio de biotecnología molecular*. Instituto Politécnico Nacional.
76. Zhang Z., Wang H., Sun Y., Li H., Wang N. (2013). Klf7 modulates the differentiation and proliferation of chicken preadipocyte. *Acta Biochimica Biophysica Sinica*. 45: 280–288.
77. Zhe L., Lei D., Qun L., Yan—Hua C. (2013). Claudins in intestines: distribution and functional significance in health and diseases. *Tissue Barriers*. 1(3): 1—29.
78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>