

LA UNION ESTRECHA DE LAS CELULAS MDCK.  
FORMACION Y EFECTO DE LA TEMPERATURA.

074844

Tesis que presenta Lorenza González-Mariscal y Muriel para  
obtener el grado de MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL con area  
de concentracion en FISILOGIA.

C. B. S

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA

México D.F., Abril 1984

A Jorge, con todo mi amor

074844

A mi hijo Jorge

A mis padres,

Gregorio y Josefina por su amor y apoyo incondicional

A mis hermanas: Gabriela, Ma Josefa y Mónica

Con un especial agradecimiento al Dr Marcelino Cereijido por el sincero interés que ha tenido en mi formación, y por haberme brindado la oportunidad de trabajar bajo su dirección.

Quiero agradecer la agradable y profesional ayuda de la M en C Bibiana Chávez de Ramírez.

Agradezco a la Dra Graciela Beaty y a la M en C Concepción Gutierrez su constante y desinteresada ayuda en la realización de esta tesis.

Esta tesis conto con la eficaz y amable asistencia técnica de los señores Amparo Lázaro, Roberto Carmona y Raul Guevara.

Esta tesis fue realizada en el departamento de Fisiología y Biofísica del centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, siendo dirigida por el Dr Marcelino Careijido (Tutor), la Dra Graciela Beaty y el Dr Enrico Stefani (Asesores).

## PROLOGO

Las dos propiedades fundamentales de las membranas epiteliales són: 1) actuar como barreras a la difusión por medio de las uniones estrechas, y 2) estar polarizadas estructural, bioquímica y fisiológicamente. En la actualidad hay dos preguntas que, no obstante ser fundamentales, permanecen en pié. La primera es porqué cuándo y cómo se establecen las uniones. La segunda es porqué, cuándo y cómo se polarizan las células epiteliales. El desarrollo de las líneas celulares que conservan en cultivo las propiedades de los epitelios naturales ha permitido abordar dichas preguntas, las mismas que no se pueden hacer (en rigor: sería muy difícil) a los epitelios naturales.

En esta tesis se investigan aspectos relacionados con el establecimiento y naturaleza química de las uniones estrechas así como su relación con la polaridad epitelial. Se utiliza la línea celular MDCK como sistema epitelial modelo.

La organización de esta tesis es la siguiente: en un primer capítulo se hace una revisión de los conocimientos actuales sobre los epitelios, su polaridad y sus rutas de permeabilidad. El segundo está ya más focalizado hacia las uniones estrechas, pues tal como se lo detalla en el Capítulo III (Objetivos) son el centro de nuestro estudio. El Capítulo IV indica los materiales y métodos empleados y el V expone los resultados obtenidos. Dichos resultados se presentan acompañados de la discusión, porque eso brinda una base para comprender porqué se emprendieron los distintos estudios a

partir de las conclusiones que se iban obteniendo. Estas conclusiones quedan resumidas en el Capítulo VI.

## CONTENIDO

	Pag
I Introduccion .....	1
II La Unión Estrecha .....	15
2.1 Morfología .....	15
2.1.1 Modelos estructurales de la unión estrecha ...	18
2.1.1.1 Modelo de dos filamentos de Chalcraft y Bullivant (1970) .....	18
2.1.1.2 Modelo de Staehelin .....	20
2.1.1.3 Modelo de Wade y Karnovsky (1974) .....	21
2.1.1.4 Modelo de Bullivant (1978) .....	23
2.2 Naturaleza química de la unión estrecha .....	27
2.3 Formación de la unión estrecha .....	37
2.3.1 Formación de uniones estrechas en sistemas fetales .....	37
2.3.2 Formación de union estrecha en células epiteliales en desarrollo .....	40
2.3.3 Formación de unión estrecha en células MDCK ...	41
2.3.3.1 La Unión estrecha y el calcio .....	41
2.3.3.2 La unión estrecha y las PIM .....	44
2.3.3.3 La síntesis de proteínas y la unión estrecha .....	45
2.3.3.4 La unión estrecha y el citoesqueleto .....	49
2.4 Relación entre la estructura y la función de la unión estrecha .....	50
2.4.1 Alteraciones fisiológicas de la unión estrecha	53
2.4.2 Alteraciones patológicas de la unión estrecha	55

2.4.3	Alteraciones experimentales de la union estrecha .....	57
2.4.3.1	Alteraciones inducidas por drogas .....	57
2.4.3.2	Alteraciones experimentales generadas por distintos tratamientos .....	59
2.5	Degradación de las uniones .....	62
III	Focalización del problema y objetivos de la tesis ..	64
3.1	Presentación del problema .....	64
3.2	Las líneas celulares: sus ventajas sobre los epitelios naturales .....	68
3.3	La línea celular MDCK como modelo de monocapa epitelial .....	69
3.4	Objetivos .....	73
IV	Material y Métodos	
4.1	Cultivo celular .....	76
4.2	Cultivo de monocapas con fines experimentales ..	77
4.2.1	Sobre discos de nylon recubiertos de colágeno ..	77
4.2.1.1	Preparación del colágeno .....	77
4.2.1.2	Preparación de discos de nylon .....	77
4.2.1.3	Recubrimiento de los discos de nylon con colágeno .....	77
4.2.1.4	Siembra de células sobre discos de nylon con colágeno .....	78
4.2.2	Cultivo celular sobre caja de Petri .....	78
4.2.2	Cultivo celular en botellas de plástico .....	79
4.3	Mediciones eléctricas .....	79
4.4	Estudios morfológicos .....	80

4.4.1	Crio-fractura .....	80
4.4.2	Microscopía de transmisión electrónica .....	81
4.4.3	Cuantificación de resultados morfométricos .....	81
4.4.3.1	Cuantificación de la morfometría de la unión estrecha .....	81
4.4.3.2	Análisis de densidad de partículas intramembranales .....	82
V	Resultados y discusión .....	83
5.1	Efecto de la temperatura sobre las uniones estrechas de las células MDCK .....	83
5.2	Formación de uniones estrechas en células MDCK ..	97
VI	Conclusiones .....	113
6.1	Ensamblaje de la unión estrecha .....	114
6.2	Relación estructura-función de la unión estrecha	115
6.3	Naturaleza química de la unión estrecha .....	115
6.4	Relación entre unión estrecha y polaridad celular	116
VII	Bibliografía .....	117

## I INTRODUCCION

El intercambio de sustancias entre los organismos superiores y el medio se realiza a nivel de las membranas epiteliales, constituidas por una o mas capas de células. Estas células pueden cumplir tan importante función porque estan dotadas de dos propiedades fundamentales. La primera es su capacidad de contactar entre si y formar uniones estrechas, que confieren a la capa celular su papel de verdadera barrera a la difusión. Gracias a esta propiedad se pueden contener líquidos (orina, bilis, sudor, saliva, jugo pancreático etc.), sin que sus componentes penetren al torrente sanguíneo.

La segunda propiedad fundamental de las células epiteliales es estar polarizadas; vale decir, su cara apical no tiene la misma estructura, composición química ni propiedades fisiológicas que su cara basolateral. Así, la cara apical puede presentar vellosidades cubiertas por glucocalix, en tanto que la interna esta cubierta por tejido conectivo. Los organelos intracelulares tambien pueden estar orientados. Por ejemplo, el aparato de Golgi puede estar hacia la región apical, en tanto que es frecuente encontrar a las mitocondrias alineadas del lado basal.

Desde el punto de vista bioquímico, la célula epitelial se caracteriza por una distribución polarizada de macromoléculas, en particular proteínas, en la membrana plasmática luminal y contraluminal. Así se han caracterizado

proteínas presentes exclusivamente en una u otra cara y que por tanto son consideradas como marcadores intrínsecos de la membrana en que se localizan. Tal es el caso de la fosfatasa alcalina y la leucina aminopeptidasa que se ubican en la superficie apical, así como de la ATPasa  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  que se encuentra en la cara basolateral.

Además de su diferente composición de proteínas, se ha visto que el dominio apical y basolateral de la membrana plasmática difieren considerablemente entre sí en su complemento de azúcares y lípidos (Muresan & Jamieson, 1980). Semenza (1976) demostró que en células de tubo renal, el ácido siálico está presente en proteínas basolaterales como la ATPasa  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  y, en cambio no se encuentra en las enzimas apicales.

También se ha demostrado que las células de intestino de mamífero, poseen un menor contenido de fosfolípidos y son más ricas en colesterol y glucolípidos en su cara apical (Lewis et al, 1975). Esto indica que las células epiteliales no solo poseen mecanismos para orientar proteínas, sino también lípidos.

Desde el punto de vista funcional, la segregación de varias enzimas y sistemas de transporte entre la cara apical y basolateral, es responsable de las actividades vectoriales de los epitelios, tales como el transporte unidireccional de fluido, electrolitos y nutrientes, así como la secreción de productos celulares específicos hacia uno de los dos espacios extraelulares que el epitelio separa. Por ejemplo, en tubo

distal de riñón de mamífero, la membrana apical de una célula epitelial es muy permeable al  $\text{Na}^+$  y muy poco permeable al  $\text{K}^+$ , en tanto que la membrana basolateral tiene alta permeabilidad al  $\text{K}^+$  y es impermeable al  $\text{Na}^+$ . En esta membrana existe un mecanismo de transporte activo que saca iones  $\text{Na}^+$  de la célula intercambiándolos por iones  $\text{K}^+$ . La membrana apical en cambio, carece de bombas (Koefoed-Johnsen & Ussing, 1958). Esta asimetría se manifiesta también al probar el efecto de hormonas y drogas. Por ejemplo, en el riñón la hormona antidiurética, que estimula el transporte de  $\text{Na}^+$ , y el glucósido cardíaco ouabaina que lo bloquea, son activos solamente cuando se añaden al medio que baña la superficie serosa; en cambio, la amilorida, que reduce la permeabilidad pasiva al  $\text{Na}^+$  solo es activa cuando se añade por la superficie mucosa del epitelio.

Con base en la asimetría funcional de las membranas apical y basolateral, Koefoed-Johnsen & Ussing (1958), desarrollaron un modelo para explicar el mecanismo de transporte iónico en los epitelios. La suposición fundamental del modelo es que la ruta principal de los iones es transcelular, es decir a través de las dos caras de la célula epitelial. Sin embargo, aunque algunas preparaciones como la piel de rana y la vejiga urinaria dan resultados concordantes con dicho modelo, otros epitelios como la vesícula biliar, el túbulo proximal y el plexo coroideo, no se ajustan a las predicciones de la teoría (ver más adelante diferencias entre epitelios herméticos y de alta permeabilidad). Así se plantea la posibilidad de que en estos epitelios moléculas tales como

el agua, iones inorgánicos y pequeños no electrolitos cortocircuiten la ruta transcelular atravesando el epitelio por la vía paracelular, que tiene como barrera a las llamadas uniones estrechas. Estas uniones que se estudian con más detalle en el siguiente capítulo, forman un verdadero cinturón alrededor de los bordes celulares de la cara apical. Se les llama uniones estrechas o herméticas, porque los microscopistas electrónicos que las descubrieron pensaron que efectivamente bloqueaban totalmente el paso de sustancias a través del espacio intercelular.

La prueba directa de que en los ahora llamados epitelios de alta permeabilidad, la mayor parte de la permeabilidad pasiva a iones atraviesa las uniones estrechas, surgió con los trabajos de Fromter y Diamond (Fromter, 1972; Fromter & Diamond, 1972) en vesícula biliar de Necturus. Para medir la resistencia eléctrica de la ruta paracelular, Fromter y Diamond compararon la resistencia transcelular, es decir la suma de las resistencias de las membranas apical ( $R_a$ ) y basolateral ( $R_b$ ), con la resistencia transepitelial ( $R_t$ ). Estas resistencias se calculan a partir de tres tipos de mediciones y mediante fórmulas obtenidas del análisis del circuito eléctrico (Fig 1.1). Las tres mediciones experimentales son:

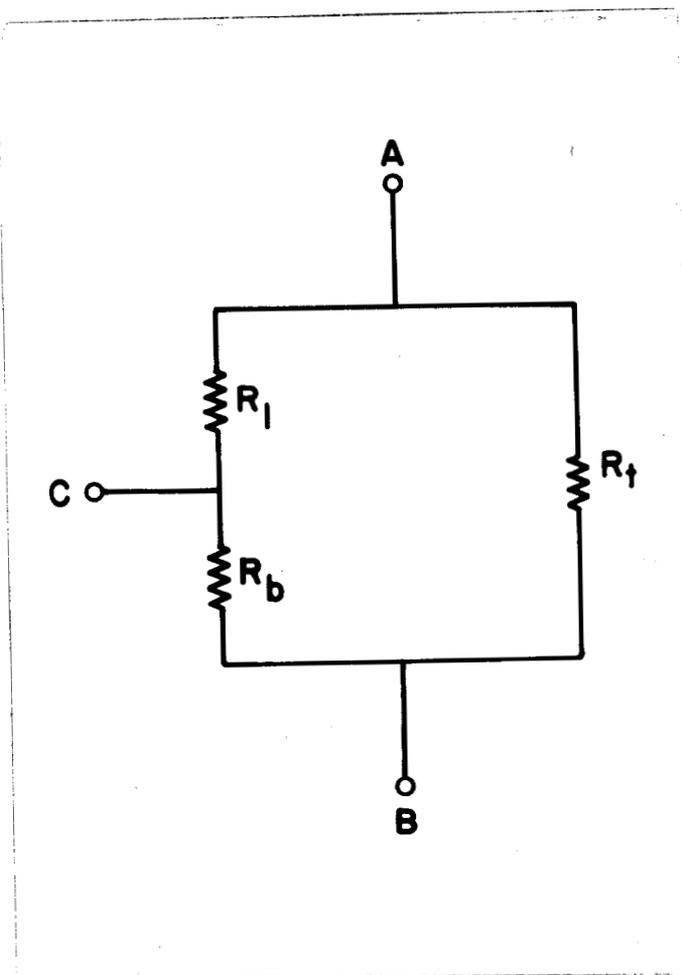


Fig 1.1 Circuito eléctrico que describe las resistencias de la vesícula biliar de *Necturus*.  $R_a$  resistencia de la membrana apical;  $R_b$  resistencia de la membrana basal y  $R_s$  resistencia de la ruta paracelular. Los electrodos se colocan en la solución luminal (A), solución basal (B) o en el interior celular (C). (Tomado de Fronter & Diamond, 1972).

- 1) La resistencia transepitelial ( $R_t$ ) medida entre A y B
- 2) La resistencia  $R_z$  medida entre A y C cuando la corriente fluye del compartimento celular hacia el exterior. Ya que las células de la vesícula biliar de Necturus así como la de varios otros epitelios, se encuentran eléctricamente acopladas por uniones célula-célula de baja resistencia, la corriente que se inyecta a una célula mediante un microelectrodo fluye también a las células vecinas. En este caso, no es posible obtener  $R_z$  de la diferencia de voltaje a través de la membrana apical de la célula que recibe la corriente, sino que es necesario analizar la propagación de la corriente en la capa epitelial y determinar la diferencia de voltaje como una función de la distancia radial  $X$  entre la célula en que se inyecta la corriente y aquella en la que se mide la diferencia de potencial. A este desarrollo matemático se le conoce como análisis de cable.
- 3) El cociente de las resistencias  $R_a/R_b$ . Este se obtiene como la razón de la diferencia de voltaje entre A y C y entre B y C cuando la corriente fluye de A a B.

Siguiendo este procedimiento experimental, Fromter y Diamond encontraron que las membranas celulares de la vesícula biliar de Necturus tienen resistencias de 4,500 ( $R_a$ ) y 2,900 ( $R_b$ ) ohms.cm<sup>2</sup>, lo que en conjunto da una resistencia de 7,400 ohms.cm<sup>2</sup> para el flujo de corriente por la vía transcelular. En cambio la resistencia transepitelial que se obtiene es de tan solo 307 ohms.cm<sup>2</sup>. Esto significa que aproximadamente el 96% del total de la corriente en este epitelio, fluye por la

ruta paracelular y solo un 4% pasa por via transcelular.

Con estos experimentos se demuestra la existencia mas no la localización de la ruta paracelular. Hipoteticamente la corriente podría estar pasando ademas de por el espacio intercelular limitado por la union estrecha, por huecos producidos por células faltantes o descamadas, daño de borde al montar el tejido etc. Para discriminar entre estas posibilidades, Fromter (1972) diseñó un experimento en el cual se pasa corriente transepitelialmente y con un par de microelectrodos sensibles a voltaje se rastrea la superficie apical para detectar las zonas por donde fluye la corriente. En dichas zonas la densidad de corriente es mayor que en el resto del epitelio, por tanto existe una marcada diferencia de voltaje entre un microelectrodo ubicado por encima de estas áreas y otro colocado unas micras mas arriba. De esta manera, se detecta como a traves o a lo largo de los bordes celulares, donde precisamente se localiza la unión estrecha, la deflexión en el voltaje es mayor que en el centro celular. Esto significa que el espacio intercelular limitado por las uniones estrechas constituye la ruta principal para el flujo transepitelial de corriente en este tipo de epitelios.

Otra linea de evidencia para la localización de la ruta paracelular proviene de los experimentos de Machen y colaboradores (1972) en vesicula biliar e intestino de conejo. En ellos se añade lantano a la solución luminal y se mide su flujo de la cara mucosa a la serosa. Luego por microscopia electrónica de corte fino se observan precipitados de lantano e

lo largo de la unión estrecha y el espacio intercelular, mientras que no se encuentra el marcador en el interior celular. Por tanto, se concluye que el Iantano atraviesa el epitelio via la unión estrecha y el espacio intercelular.

Como consecuencia de todos estos trabajos, se ha postulado una clasificación de epitelios en dos categorías límites:

1.- Los llamados de alta permeabilidad, es decir aquellos en los que los solutos atraviesan el epitelio principalmente por una ruta paracelular controlada por las uniones estrechas y, en menor proporción por la ruta transcelular.

2.- Los herméticos, donde la ruta de los solutos es casi exclusivamente la transcelular.

Las características fisiológicas fundamentales que distinguen a estos epitelios son:

a) Los epitelios de alta permeabilidad tienen resistencias eléctricas más bajas que los epitelios herméticos. En los últimos, éstas se aproximan a la suma de las resistencias mismas de las membranas epiteliales. Una excepción a este caso es el epitelio del ducto de la glándula salival del conejo, donde la resistencia transepitelial es muy baja debido a una alta conductancia transcelular al  $\text{Cl}^-$ , y no a una alta permeabilidad de la ruta paracelular (Augustus et al, 1977).

b) Los epitelios herméticos mantienen gradientes salinos mucho más pronunciados (de 30:1 hasta 10,000:1) que los epitelios de alta permeabilidad (de 1.3:1 a 14:1). Este hecho es una consecuencia de la diferencia en las resistencias. Mientras

mayor sea la resistencia menor el flujo pasivo de iones ante un gradiente de concentración y por tanto, mas pronunciado el gradiente que el transporte activo puede mantener.

c) En los epitelios de alta permeabilidad la diferencia de potencial entre soluciones de baño simétricas, producidas por el transporte activo de iones, son pequeñas (0-11 mv) y en los herméticos grandes (30-100 mv). Estas diferencias surgen porque en los epitelios de alta permeabilidad el flujo a través de la unión constituye una resistencia en paralelo que cortocircuita los potenciales.

d) La permeabilidad osmótica al agua es mayor en los epitelios permeables que en los herméticos.

e) En los epitelios de alta permeabilidad el cociente osmolar entre el fluido transportado y la solución de baño es cercano a 1, mientras que, en los epitelios herméticos es mucho mayor de 1.

Es importante señalar, que la clasificación de los epitelios en dos categorías límites, no es sino una sobresimplificación, ya que en realidad existe toda una gama de tipos epiteliales. Así tenemos que en el riñón humano (Kuhn & Reale, 1975) y de varios otros mamíferos (Schiller et al, 1980), tanto la estructura como la respuesta electrofisiológica del epitelio varían desde la de un epitelio muy permeable en el segmento proximal hasta la de un epitelio hermético en el túbulo colector pasando gradualmente, por zonas con morfología y comportamiento intermedio.

Por otra parte, se ha demostrado que bajo condiciones fisiológicas, las uniones estrechas constituyen el paso limitante para el flujo pasivo de iones en los epitelios de alta permeabilidad y, en cambio el espacio intercelular presenta una resistencia mucho menor para el flujo iónico. Esta resistencia del espacio intercelular se vuelve importante cuando se lo reduce experimentalmente. (Smulders et al, 1972; Bindslev et al, 1977, Reuss 1978). Por tanto, se describen primero las características físico-químicas de la barrera constituida por la unión estrecha, para luego analizar el papel del espacio intercelular en el flujo pasivo de iones.

Una de las primeras incógnitas que se planteó sobre la fisiología de la unión estrecha, fué su mecanismo de translocación iónica. Diamond y Harrison (1966) observaron que la adición de un noelectrolito impermeable a una de las soluciones que bañan la vesícula biliar, produce una diferencia de voltaje proporcional al gradiente y flujo osmótico de agua generado. Este potencial conocido como "potencial de arrastre" se origina por el acarreo de los iones por el flujo de agua. Cuando el  $\text{Na}^+$  es la sal principal de ambas soluciones que bañan a la vesícula biliar, el lado hiperosmolar se torna positivo, lo que indica que la unión estrecha es selectiva al catión. La interpretación inicial de estos potenciales de arrastre fue que la unión estrecha se comportaba como un intercambiador iónico con carga negativa. Sin embargo esta idea se ha modificado a la luz de las siguientes observaciones experimentales:

1) Un intercambiador iónico rectifica cuando la corriente es tal que satura a los acarreadores (sitios móviles) o, a la concentración de sitios fijos en membrana. Sin embargo, en vesícula biliar de conejo Wright y colaboradores (1971) observaron que la relación corriente voltaje es lineal hasta los 800 mV.

2) En un intercambiador iónico más grueso que la longitud de un Debye (distancia promedio entre cationes y aniones en una solución salina), la conductancia es independiente de la concentración de sales hasta que esta última se aproxima a la concentración de los sitios cargados de la membrana. En cambio las membranas con sitios neutros (con grupos polares pero sin carga neta) tienen una relación lineal conductancia-concentración independientemente de su grosor. En vesícula biliar (Wright et al, 1971) y en células MDCK (Cereijido et al, 1978) se ha visto que la relación conductancia-concentración es lineal, por lo que más bien parece que las uniones estrechas tienen sitios neutros y no intercambiadores iónicos.

3) El cociente de permeabilidad catión/anión en un intercambiador iónico es función de la concentración de sales. Cuando la concentración es alta este cociente pasa a ser el de agua libre. En vesícula biliar (Wright et al, 1971), dicho cociente no se altera aun cuando la concentración llegue a 300 mM.

Como se ve, todos estos resultados indican que la unión estrecha no se comporta como un intercambiador iónico. Ahora bien, se ha visto que al reducir el pH, adicionar torio, lantano y otros cationes polivalentes disminuyen los potenciales de dilución y la resistencia transepitelial (Wright & Diamond, 1968; Machen et al, 1972; Cereijido et al, 1978). Esto sugiere fuertemente que más que una membrana con sitios neutros, se trata de una unión estrecha con cargas negativas netas. Así mismo, la selectividad iónica de las células MDCK (un epitelio de alta permeabilidad) concuerda con la serie VI de Eisenman ( $K^+ > Na^+ > Rb^+ > Cs^+ > Li^+$ ) (Cereijido et al, 1978). Dicha serie es una de las 11 (de las 120 posibles combinaciones de los cationes alcalinos) secuencias predichas por la teoría de Eisenman la cual basa la selectividad de los cationes en la fuerza del campo aniónico en que se encuentren. Por tanto, es muy probable que los sitios responsables de la discriminación catiónica en este epitelio tengan una carga negativa neta.

Por otro lado, Eisenman (1962) demostró que a mayor grado de hidratación de los sitios responsables de la selectividad, más angosto resulta el rango de conductancia entre los cationes más y menos permeables. En varios epitelios de alta permeabilidad (Barry et al, 1971; Cereijido et al, 1978), se ha visto que el rango de selectividad es muy pequeño lo cual sugiere que además de tratarse de una unión estrecha con sitios de carga negativa neta, estos se encuentran en un alto grado de hidratación.

Ahora bien, la longitud de la unión estrecha tal como se la puede medir en un corte transversal por microscopia electrónica es de unos 100-300 nm. Con base en estas dimensiones se podría esperar que la unión estrecha se comportara eléctricamente como una "barrera gruesa" (mas ancha que la longitud de un Debye). En este tipo de membranas es hasta cierto punto más importante lo que suceda dentro de ellas mismas que el tipo de soluciones que las bañan. Así su relación corriente-voltaje es lineal incluso en soluciones asimétricas. En células MDCK (Cerafido et al, 1978) se demostró que esta relación no es lineal, lo que hace pensar que la unión estrecha no es una membrana gruesa sino mas bien una serie de barreras delgadas con carga negativa neta. Hay que notar que los filamentos individuales de la unión son de un grosor muy cercano al del Debye, por lo que dimensionalmente pueden considerarse como barreras delgadas.

En cuanto al papel del espacio intercelular en el flujo pasivo de iones, Smulders y colaboradores (1972) midieron en vesícula biliar de ratón la conductancia eléctrica transepitelial y la permeabilidad de la sacarosa cuando las soluciones mucosa o serosa se hacen hiperosmóticas con sacarosa. Observaron que la hiperosmolaridad mucosa induce un flujo de agua en la dirección serosa a mucosa, se angosta el espacio intercelular y la resistencia transepitelial aumenta. El gradiente osmótico en la dirección contraria no ejerce efecto alguno en la resistencia transepitelial apesar de que el espacio intercelular se amplia significativamente.

En vesicula biliar de rana, Bindslev y colaboradores (1974) observaron que la hiperosmolaridad mucosa tiene los mismos efectos que en la vesicula de conejo, mientras que la hiperosmolaridad serosa produce una reducción en la resistencia transepitelial y una ampliación de los espacios intercelulares. Tambien se vio como al aplicar corriente de la cara serosa a mucosa, se cierran los espacios y aumenta la resistencia transepitelial mientras que, cuando la corriente fluye de mucosa a serosa se obtienen resultados opuestos. Reuss y Finn (1977) demostraron siguiendo un protocolo muy similar al de Fromter (1972), que en vesicula biliar de Necturus, el aumento en la resistencia transepitelial debido a la hiperosmolaridad mucosa se debe directamente a que al angostarse el interespacio aumenta la resistencia de la ruta paracelular.

En conclusión podemos afirmar que bajo condiciones fisiológicas las uniones estrechas constituyen la máxima resistencia de la ruta paracelular, siendo esta en los epitelios de alta permeabilidad la via principal para el flujo de iones. Ahora, para estudiar en que forma la unión estrecha puede ofrecer distintas resistencias, conviene analizar primero en detalle su estructura y formación. Dicho análisis se presenta en el capítulo siguiente.

## II LA UNION ESTRECHA

### 2.1 Morfología

La unión estrecha o zonula occludens es un cinturón continuo que une a células epiteliales adyacentes en la región apical del borde entre ellas. Sella el espacio intercelular y regula la permeabilidad paracelular.

Farquhar y Palade (1963) mostraron por microscopía electrónica de corte fino que la unión estrecha se manifiesta como puntos o líneas de fusión de dos unidades de membrana. (Fig 2.1). En corte fino tan solo puede inferirse que la unión forma un cinturón continuo, pero en cambio, con microscopía electrónica de crío-fractura esto puede observarse directamente. Con esta última técnica la región de la unión estrecha aparece en la cara P, como una serie de filamentos interconectados y paralelos a la región apical, y como surcos en la cara E. La nomenclatura de caras E y P se refiere a las caras que aparecen al fracturarse el interior hidrofóbico de la membrana. A la mitad más cercana al citoplasma se le denomina protoplásmica y se abrevia P, mientras que a la otra mitad, que se encuentra más próxima al espacio extracelular, se le llama exoplásmica y se abrevia E (Branton et al, 1975). (Fig 2.2). Estos filamentos de la unión estrecha, constituyen precisamente los puntos de fusión de la membrana.



Fig 2.1 Corte fino del complejo de unión entre dos células epiteliales de mucosa gástrica. La unión estrecha (zonula occludens) se extiende de la flecha 1 a la 2. La unión intermedia (zonula adherens) abarca de las flechas 2 a 3. (L) lumen, (il) hoja interna de la membrana celular, (ol) hoja externa de la membrana celular, (fl) línea de fusión de la unión estrecha, (cm) membrana celular. 96 000 X (Tomado de Farquhar & Palade, 1963).

Figura 2.2

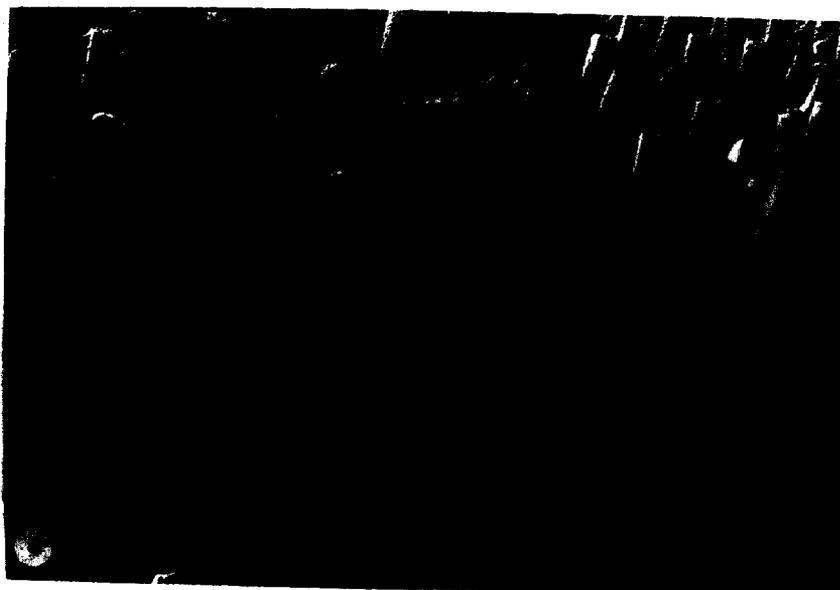


Fig 2.2 Crío-fractura de unión estrecha de ileo de conejo. En la cara P los componentes de la unión aparecen como filamentos, mientras que en la cara E se observan surcos complementarios. 50 000 X (Tomada de Martínez-Palomo et al, 1978).

Siguiendo la terminología de Wade y Karnovsky (1974) para los filamentos de la unión estrecha, se emplean los términos de cordón y zurco respectivamente para la apariencia de los filamentos y sus complementos en las réplicas de crío-fractura. Los cordones aparecen sobre "valles" en la cara P o protoplásmica y los zurcos en las "colinas" de la cara E o exoplásmica del material fijado con glutaraldehído. Se utiliza la terminología de Chalcraft y Bullivant (1970) para los valles y colinas, y la de Branton y colaboradores (1975) para las caras de fractura.

#### 2.1.1 Modelos estructurales de la unión estrecha.

Hasta ahora no existe ninguna técnica que muestre a los filamentos de la unión estrecha por corte fino, por tanto todos los modelos estructurales que a continuación se describen se basan fundamentalmente en evidencias de crío-fractura.

##### 2.1.1.1 Modelo de dos filamentos de Chalcraft y Bullivant. (1970)

Este modelo se basa en el estudio de réplicas complementarias de hepatocito de rata fijadas con glutaraldehído. (Fig 2.3a). Se propone que la red de filamentos en una membranas se encuentre en registro directo con los filamentos de la otra. Bajo este modelo, la fractura rodea al filamento de una membrana y lo deja como un cordón en

la cara P. La fractura no excursiona fuera de la membrana ni alrededor del filamento complementario en la membrana adjunta. En este caso se considera que los filamentos están más firmemente unidos a las caras P de su propia membrana que entre sí.

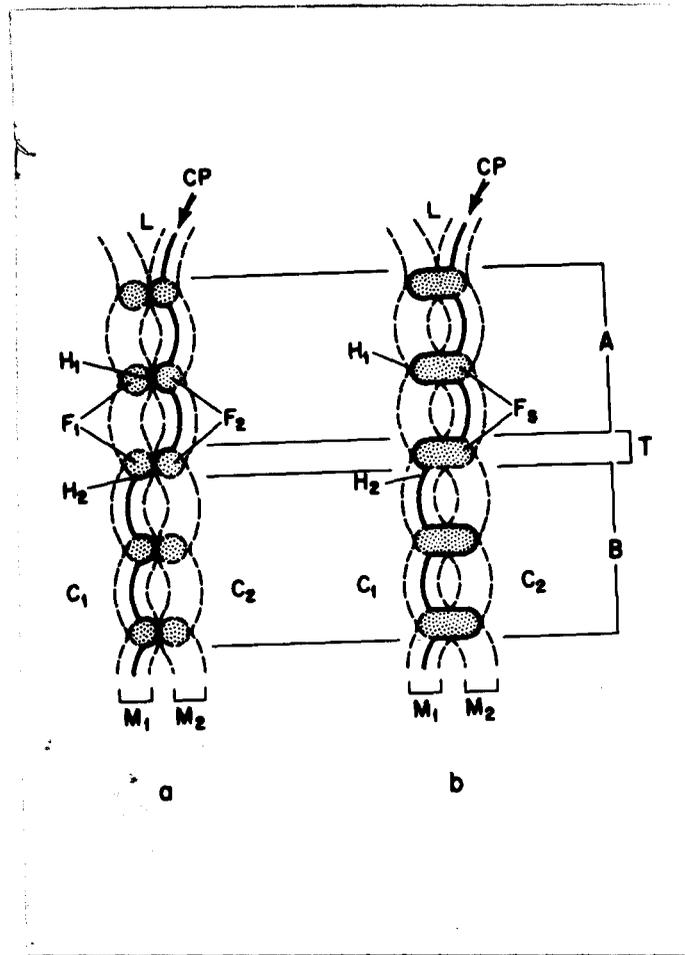


Fig 2.3 Modelos de unión estrecha. Las áreas punteadas representan cortes tangenciales de los filamentos dentro de las membranas M1 y M2 de las células adyacentes C1 y C2. (L) lumen epitelial. El modelo A es el de Chalcraft y Bullivant con dos pares de filamentos F1 y F2. En B se ilustra el modelo alternativo de Wade y Karnovsky. Un solo filamento (Fs) se comparte por las dos membranas adyacentes. La réplica de la cara que aparece a la derecha de la línea oscura (CP) en la parte superior de cada figura ilustra el contorno de la cara P. La parte inferior de las figuras (región B) muestra el contorno de la cara E. La región T representa el contorno de la zona de transición entre las caras E y P. (Tomada de Wade & Karnovsky, 1974).

### 2.1.1.2 Modelo de Staehelin. (1973)

Este modelo se basa en réplicas unilaterales de intestino delgado de rata fijadas y sin fijar con glutaraldehído. (Fig 2.4) Se propone que en la línea de fusión cada membrana posee una hilera de partículas en registro directo con una hilera similar de partículas en la membrana vecina. En general se considera a las partículas muy firmemente unidas a sus parejas en la otra membrana de tal manera que durante la fractura las dos partículas quedan unidas entre sí.

La diferencia fundamental entre este modelo y el de Chalcraft y Bullivant es que la fractura excursiona alrededor de las 2 fibrillas y en consecuencia pasa a la membrana adyacente.

La evidencia experimental de este modelo es la aparición muy ocasional de zurcos en la cara P con la mitad de altura que los demás. Esto se interpreta como que los zurcos de altura "normal" corresponden a aquellas ocasiones en que la fractura rodea a los dos filamentos, mientras que en los de altura media la fractura pasa alrededor de uno solo.

En material no fijado la fractura no pasa de una a otra membrana, y en cambio en la cara E las partículas quedan ordenadas como cuentas de collar y en la cara P aparecen zurcos continuos complementarios.

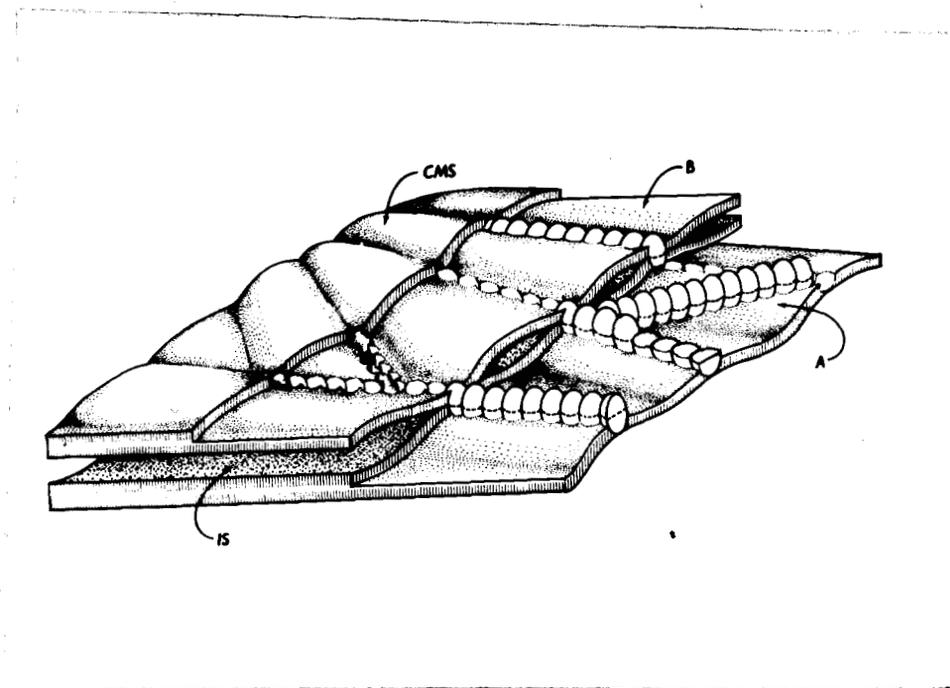


Fig 2.4 Esquema de unión estrecha según Staehelin. Las membranas de la bicapa que contribuyen a la formación de uniones estrechas permanecen unidas por líneas de adhesión. Cada línea consiste de dos hileras de partículas bien empaquetadas dentro de las membranas adyacentes y unidas entre sí al nivel del espacio intercelular. En tejidos fijados con glutaraldehído estas estructuras originan crestas en las caras P (A del esquema) y surcos complementarios en las caras E (B del esquema). Ocasionalmente las partículas que forman crestas en la cara P se fracturan (ver sección media derecha del diagrama). Las preparaciones no fijadas con glutaraldehído muestran caras P con surcos y caras E con crestas. (IS) espacio intercelular, (CMS) superficie citoplásmica de membrana. (Tomado de Staehelin, 1973).

#### 2.1.1.3 Modelo de Wade y Karnovsky (1974).

Este modelo se fundamenta en el estudio de las uniones estrechas de vejiga urinaria y vesícula biliar de sapo en réplicas fijadas con glutaraldehído. Se basa en gran parte en el análisis detallado de las regiones de transición donde la

fractura pasa de la cara E de una membrana a la cara P de la membrana de la célula vecina. Este modelo propone una sola serie de filamentos que se comparten por las membranas adyacentes. (Fig 2.3b).

En general se considera que la fractura pasa por el lado juxtacitoplásmico del filamento compartido y deja una alta cresta en la cara P. Menos frecuentemente la fractura puede pasar del otro lado y dejar una pequeña cresta en la cara E.

Wade y Karnovsky no consideraron la posibilidad de que estos filamentos únicos estuviesen constituidos en realidad por 2 filamentos (uno de cada membrana) alineados entre sí. Si uno considera esta posibilidad y postula que la unión en el estado congelado es tal, que los dos filamentos se comporten como uno, entonces se obtiene un modelo idéntico al de Staehelin. El modelo difiere del de Chalcraft y Bullivant en la misma manera que el de Staehelin, es decir, en que la fractura excursiona alrededor del filamento de la membrana adyacente.

La evidencia experimental principal en este modelo es primero, la presencia de crestas en la cara P con la misma altura que la adjunta cara E en una zona de transición y, segundo, la apariencia característica de crestas y zurcos en esta zona, que sugiere una fractura que bien puede ir en un sentido o en otro alrededor de la fibrilla compartida.

#### 2.1.1.4 Modelo de Bullivant (1978)

Este modelo se basa en réplicas complementarias de las zonas de transición de unión estrecha en intestino delgado de ratón. Se observan 2 filamentos lado a lado, y se postula que cada uno penetra un poco en la membrana adyacente, sin que esto los convierta en un filamento compartido. (Fig 2.5).

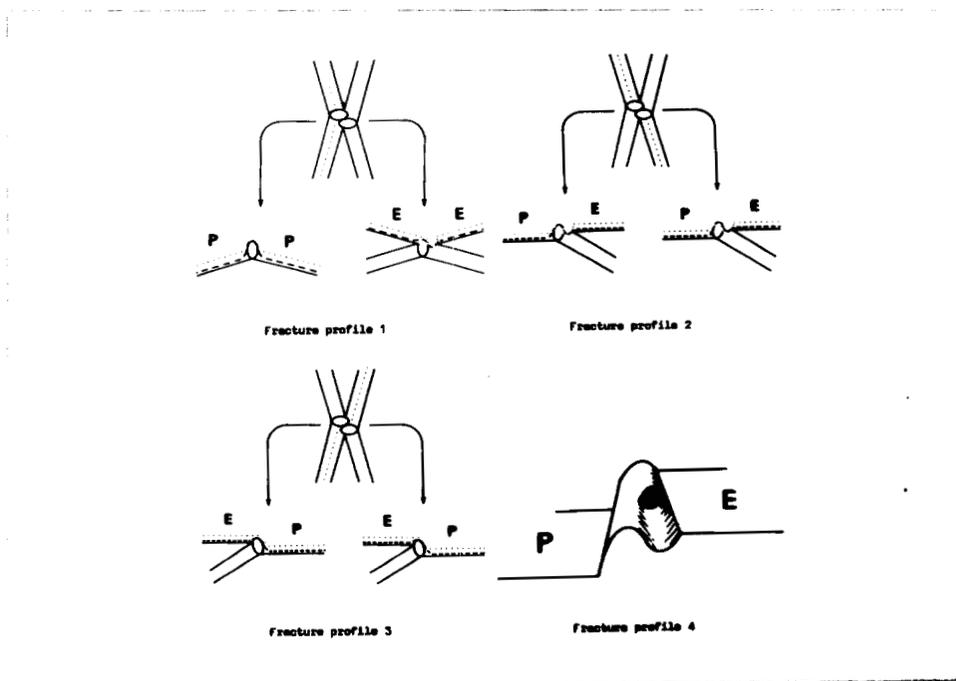


Fig 2.5 Perfiles de fractura en los sitios de fusión de membrana de acuerdo al modelo de dos filamentos desfasados de Bullivant. (Tomada de Bullivant, 1978)

Se argumenta contra la posibilidad de que existan filamentos compartidos señalando la poca probabilidad que existe de que la fractura que sigue el plano de menor esfuerzo excursione a la membrana vecina para rodear al filamento. (Fig 2.6).

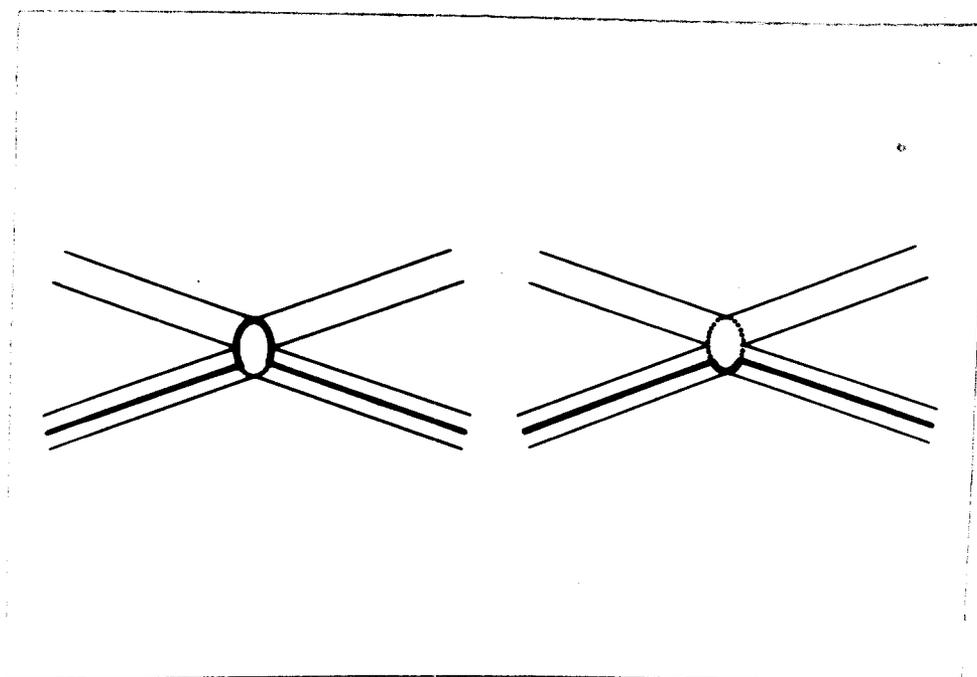


Fig 2.6 Formas posibles de fractura de un filamento único. La fractura de la derecha es la mas factible. (Tomado de Bullivant, 1978).

Por otro lado, el uso de nuevas técnicas de congelación, hace posible que una misma preparación se someta a crió-fractura y crió-grabado a la vez. Con esto se pueden obtener tanto caras internas como superficies reales de membrana.

Empleando esta metodología, Hirokawa (1982) observo como en las uniones estrechas de los hepatocitos de rata, la altura de los filamentos de la cara P es la misma en muestras tratadas con EGTA, es decir con uniones abiertas que en células no tratadas. Dicha altura a su vez coincide con la de las crestas en la superficie real de la membrana. (Fig 2.7).

Estos resultados se oponen al modelo de un filamento de Wade y Karnovsky así como al modelo de Staehelin ya que, si se asume que el filamento único o la pareja de partículas se rompen o separan al abrirse la unión, entonces la altura de la cara P en las muestras no tratadas con EGTA debería ser del doble de aquellas en las que la unión ha sido abierta. Alternativamente, si los filamentos únicos, o las parejas de partículas no se separan sino que permanecen en una de las dos membranas, entonces es de esperarse el encontrar largas crestas y huecos en la superficie real de las membranas tratadas con EGTA. Nada de esto ocurre y, por el contrario, las imágenes coinciden con el modelo de dos filamentos de Bullivant.

Figura 2.7

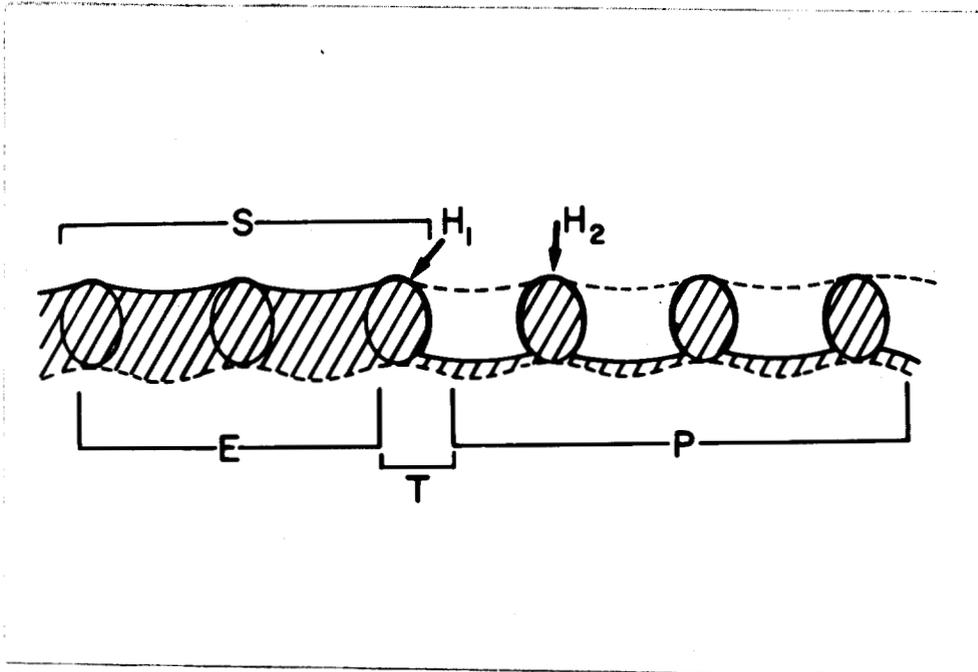


Fig 2.7 Modelo de unión estrecha abierta según Hirokawa. (S) superficie real, (H1) altura del filamento en la cara P, (H2) altura del filamento en la superficie real de la unión estrecha, (T) zona de transición entre las caras P y E.

## 2.2 Naturaleza química de la unión estrecha.

Ya que hasta ahora no existe una metodología adecuada que permita el aislamiento y purificación de los componentes de la unión estrecha, el estudio de la naturaleza química de la misma, se ha basado fundamentalmente en observaciones de tipo morfológico que a continuación se describen.

En preparaciones fijadas con glutaraldehído, las réplicas de crio-fractura muestran una serie de filamentos cilíndricos que representan a la unión estrecha. Sin embargo algunos autores consideran que estos constituyen la estructura genuina de la unión. Existen varias razones para ello:

a) Aunque los filamentos aparecen generalmente como cilindros continuos, también es posible encontrar algunos pequeños segmentos donde se observan con claridad cadenas de partículas similares y con frecuencia cercanas a las uniones comunicantes. (Friend & Gilula, 1972; Montesano et al, 1975). Hay que recordar que de uniones comunicantes o maccula communicans se han aislado preparaciones puras, donde se ha visto que el componente principal es protéico. (Perachia, 1980; Hertzberg et al, 1981).

b) Ya que la unión estrecha no es sino una diferenciación regional de la membrana plasmática, es natural considerar a su estructura como una extensión, aunque algo extrema, del componente diferenciado más importante de la membrana criofracturada, es decir de las partículas intramembranales (PIM). Al respecto hay que aclarar que en estudios con varias técnicas y en diferentes sistemas se ha demostrado que las PIM

están constituidas por proteínas. (Tillack & Marchesi, 1970; Tillack et al, 1972; Segrest et al, 1974; Fisher & Stoeckenius, 1977; Pumpin & Fambrough, 1983).

c) Como se menciona en incisos anteriores, en preparaciones no fijadas con glutaraldehído, se observan cadenas de partículas en lugar de filamentos continuos de unión estrecha.

Como resultado de estas observaciones, se consideró a la unión estrecha como a una serie de cadenas de partículas intramembranales artefactualmente entrecruzadas por la fijación con glutaraldehído. (Staehein, 1973; Van Deurs & Luft, 1979). Sin embargo han surgido recientemente otras interpretaciones para explicar la estructura de la unión estrecha. Pinto Da Silva y Kachar (1982) proponen que las depresiones lineales y continuas que se observan en la cara P de material no fijado, no representan caras complementarias de las hileras de partículas irregulares que se encuentran en la cara E de este material. Si las cadenas de partículas representaran genuinamente la estructura de la unión, no deberían de existir depresiones lineales en la cara complementaria, sino más bien habría de observarse una hilera de depresiones puntuales. Por tanto, o bien el zurco lineal se forma después de la fractura por confluencia de las depresiones puntuales o, la cadena de partículas no representa la estructura original y es más bien una alteración post-fractura. La primera alternativa, no tiene ninguna evidencia experimental directa ni indirecta, mientras que la segunda bien podría ser cierta si consideramos la presencia de bandas continuas en

especímenes fijados y también, el hecho de que en preparaciones no fijadas, existen pequeñas zonas de cara P donde pueden observarse bandas de filamentos continuos.

Existe además la observación experimental de que en especímenes fijados convencionalmente con glutaraldehído, si se les impregna con un 100% de glicerol en lugar de un 25-30% como se hace normalmente, aparecen cadenas de PIM en lugar de filamentos continuos. Es decir, que las bandas no pueden ser el resultado exclusivo del entrecruzamiento lateral e irreversible de las proteínas integrales de membrana, puesto que el efecto se revierte con glicerol que es un compuesto químicamente inerte y por tanto, incapaz de romper las uniones covalentes que supuestamente habría formado el glutaraldehído con las proteínas.

Así mismo, en estudios de congelación rápida de próstata de rata (Kachar & Reese, 1982) en los que el tejido se congela directamente en helio líquido (para minimizar el efecto de la formación de cristales y evitar las posibles alteraciones por fijación química y crioprotección), los filamentos de la unión estrecha aparecen, como cilindros continuos en las zonas donde los cristales de hielo no dañan la membrana plasmática, mientras que aparecen como hileras de partículas en las áreas lastimadas por el hielo.

Con estas evidencias Pinto Da Silva, Kachar y Reese afirman que la estructura filamentosa que se observa por crio-fractura representa micelas cilíndricas invertidas compuestas por lípidos de membrana y posiblemente algunas

proteínas. Estas últimas podrían mantener la estructura por asociación con componentes del citoesqueleto. (Fig 2.8). Por tanto, la formación de la unión estrecha requiere, según esta proposición, de una transición de fase de una bicapa lipídica a una fase hexagonal II.

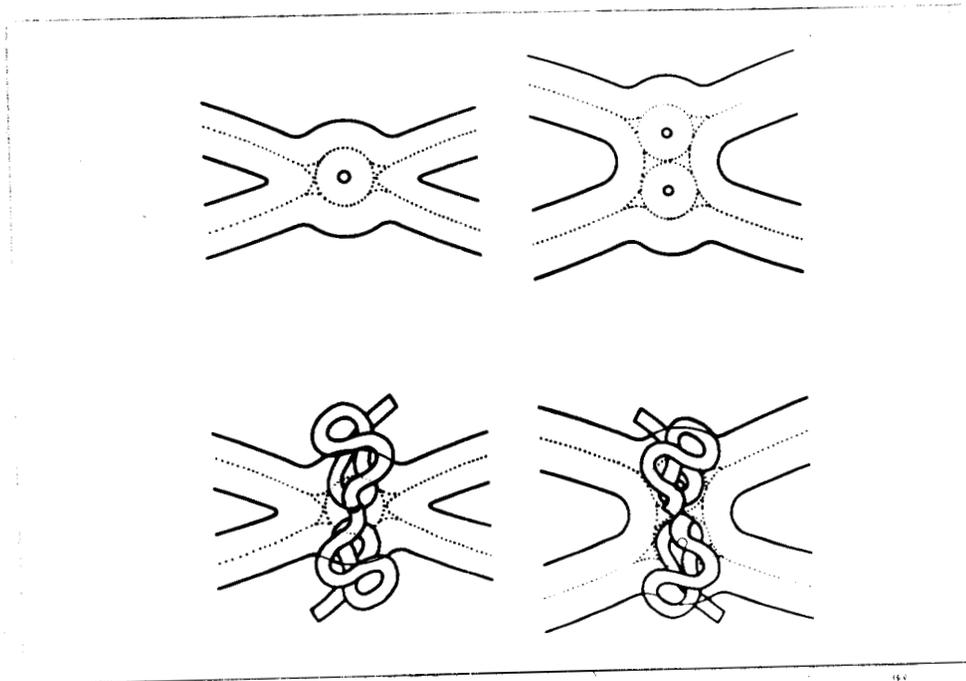


Fig 2.8 Esquema de un corte longitudinal de unión estrecha según el modelo de Pinto da Silva y Kachar. (izquierda) modelo de una micela, (derecha) modelo de dos micelas, (arriba) sin proteínas, (abajo) con proteínas estabilizadoras. (Tomado de Pinto da Silva & Kachar, 1982).

Cabe recordar que los lípidos puros o mixtos, naturales o sintéticos, incluyendo los fosfolípidos, además del apregio en bicapa, pueden adoptar otras configuraciones ante diferentes condiciones de hidratación, temperatura o concentración de cationes. Una de esas configuraciones es la de fase hexagonal II. En esta, las moléculas de fosfolípidos forman largos cilindros con las cabezas polares orientadas hacia un centro de agua. (Fig 2.9). La interacción entre cilindros adyacentes es hidrofóbica y el diametro del centro de agua depende del grado de hidratación, la presencia de cationes y el tipo de fosfolípido involucrado.

Ahora si se compara un filamento de unión estrecha con una micela cilíndrica en fase hexagonal II, vera que tienen muchas características en comun tales como:

- a) ambiente hidrofóbico, dado por el interior de la bicapa
- b) morfología lisa y,
- c) dimensiones adecuadas (9-11 nm de diametro)

Por otro lado, estudios cristalográficos (Luzzati et al, 1968) y de cri-ofratura (Verkleij et al, 1980; Sen et al, 1981; Van Venetie & Verkleij, 1981; Borovjagin et al, 1982), han demostrado que algunos lípidos de membrana pueden asumir la fase Hexagonal II (H II), tanto en un empaque hexagonal como dentro de una bicapa lipídica. En ambos casos la fase H II coexiste con micelas lipídicas esféricas que vistas por crió-fractura dan la misma imagen que las PIM. (Fig 2.10).

Figura 2.9

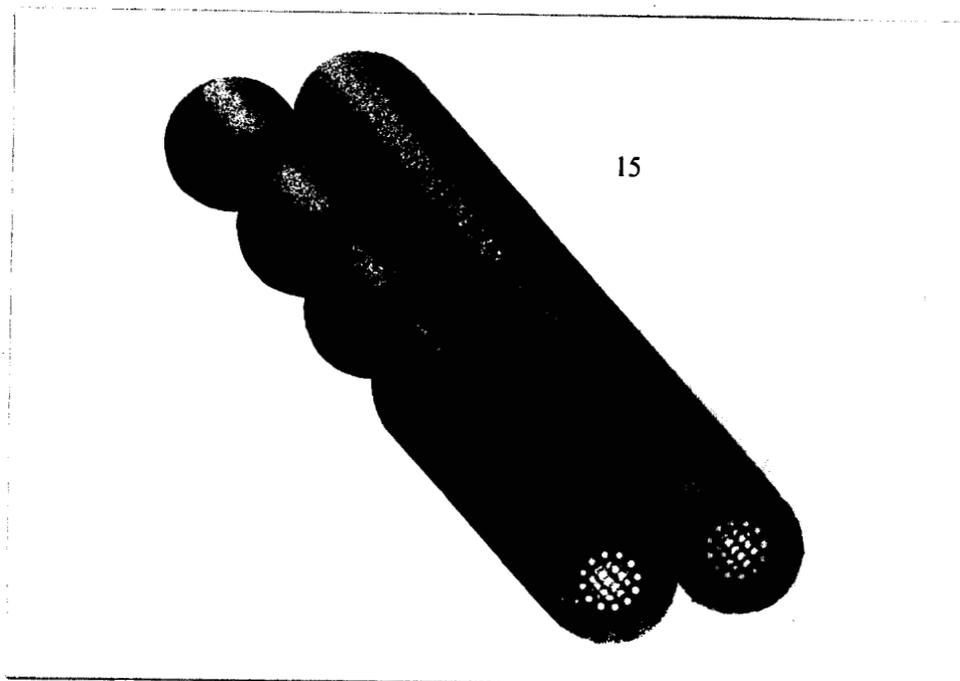


Fig 2.9 Modelo de cilindros en fase HII y su relación con las partículas lipídicas. En ambas estructuras las cabezas polares se orientan hacia un centro acuoso. La interacción entre cilindros es de tipo hidrofóbico. (Tomada de Van Venetie & Verkleij, 1981).

figura 2.10



Fig 2.10 Crio-fractura de liposoma de fosfatidilcolina cardiolipina  $Ca^{2+}$ . La flecha indica una hilera de partículas adyacente a tubos HII. (Van Venetie & Verkleij, 1981).

Por tanto estos resultados apoyan, aunque indirectamente, la posibilidad de que los filamentos de unión estrecha sean de naturaleza lipídica y, así mismo abren la posibilidad de que algunas de las PIM sean micelas lipídicas invertidas.

Ahora si se revisa el modelo de unión estrecha propuesto por Pinto da Silva & Kachar (Fig 2.8) se vera que los filamentos de la unión se localizan exclusivamente en las hojas exoplásmicas de cada unidad de membrana. Al respecto hay que recordar (Fig 2.1) que en corte fino la unión estrecha muestra puntos de fusión precisamente entre las hojas exoplásmicas de las membranas adyacentes. Por otra parte experimentos de apagamiento de fluorescencia (Dragsten et al, 1982) han demostrado que las sondas lipídicas que se localizan en las hojas exoplásmicas de membranas de células epiteliales unidas por uniones estrechas, no pueden pasar de la cara apical a la basolateral. Sin embargo, las sondas que hacen flip-flop y pasan a la cara protoplásmica pueden, posteriormente moverse con libertad alrededor de toda la membrana plasmática. Estos resultados por tanto sugieren que la unión estrecha constituye una barrera al pasaje de sustancias únicamente en la cara exoplásmica. El modelo de micela invertida, propone precisamente que las micelas que forman la unión estrecha se localizan en las mitades exoplásmicas de las membranas plasmáticas.

Volviendo al planteamiento inicial de una unión estrecha de tipo protéico, Margolis y colaboradores (1982) observaron la unión selectiva de liposomas fluoresceinados a la zona de membrana donde se localiza la unión estrecha en células epiteliales. Esta interacción entre liposomas y membranas celulares desaparece al tratar a las células con tripsina, por lo que se infiere se trata de una unión de liposomas a proteínas de la unión estrecha. Sin embargo, hay que recordar que en el modelo de unión estrecha lipídica se propone también la asociación de esta con proteínas de anclaje al citoesqueleto, por lo que resultados como los de Margolis no descartan la posibilidad de una unión estrecha de tipo lipídico.

Por otro lado, en células MDCK se ha demostrado (Cereijido et al 1978a; Hoi Sang et al, 1980; Griep et al, 1983) que en las primeras horas de sembrada una monocapa es necesaria la síntesis protéica para el desarrollo ulterior de la resistencia transepitelial. Sin embargo, al igual que en el caso anteriormente mencionado esto no necesariamente implica que las uniones estrechas en si estén constituidas por proteínas.

En síntesis, se puede decir que el dilema de la naturaleza química de la unión estrecha aun no se ha resuelto. Hay evidencias en favor del modelo de micela invertida y datos que indican la necesaria presencia de proteínas para el establecimiento de la unión. Ambas situaciones concuerdan con un modelo de unión lipoprotéica aunque aun no se tengan

resultados que efectivamente compruben la existencia de tal. Uno de los objetivos de esta tesis, como mas adelante se vera consiste precisamente en averiguar, si el comportamiento de las uniones estrechas ante cambios de temperatura concuerda con el que habria de esperarse si la unió n fuese fundamentalmente lipídica.

## 2.3 Formación de la unión estrecha

### 2.3.1 Formación de uniones estrechas en sistemas fetales.

El primer trabajo que describe la formación de las uniones estrechas durante el desarrollo fetal es el de Montesano y colaboradores (1975). En él se observa como en hígado fetal de rata, al 14avo día de gestación, las PIM se alinean en áreas anteriormente libres de partículas y, forman una red discontinua que asemeja un panal de abejas. (Fig 2.11). Conforme avanza la gestación estos arreglos lineales de partículas se funden para formar filamentos continuos, que para el día 21<sup>o</sup> claramente se identifican como uniones estrechas maduras.

Observaciones similares se hicieron en neuronas fetales humanas y de rata (Humbert et al, 1976), en el epitelio pulmonar fetal de borrego (Schneeberger et al, 1978), en la glándula tiroidea donde, incluso se mostró como el establecimiento de la unión estrecha coincide con el comienzo de la secreción hormonal de la glándula (Luciano et al, 1979), y en el mesotelio peritoneal de embriones de ratón (Suzuki & Nagano, 1979).

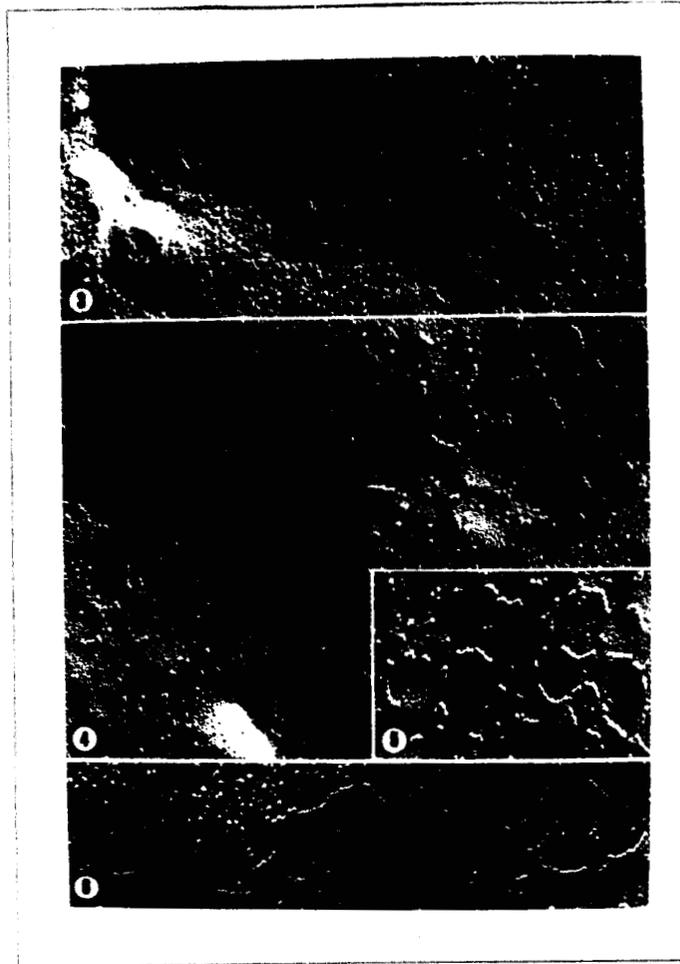


Fig 2.11 Crio-fractura de hepatocitos fetales. Las fotografias muestran los pasos sucesivos en la formaci3n de las uniones estrechas. (3) cadenas de particulas (cabera de flecha) aparecen en zonas pobrenmente particuladas de la membrana. La membrana presenta depresiones poligonales. 82 500 X. (4 y 5) multiples cadenas y pequenos islotes de particulas se ubican alrededor de las depresiones membranales formando una red a manera de panal. 4- 82 000 X 5- 82 500 X. (6) cadenas de particulas se continuan unas con otras. (Tomada de Montesano et al, 1973).

Tambien existen estudios (Tice et al, 1977; Shimono et al, 1981), donde se relaciona el desarrollo fetal de la unión, vista esta por cri-ofratura, con la penetración de trazadores de microscopía electrónica como el lantano y el rojo de rutenio. Estos trazadores de alto peso molecular se aplican por alguna de las caras del epitelio, generalmente la apical. Si la unión estrecha sella la ruta paracelular, el trazador no penetra, mientras que si la unión esta abierta el trazador tiñe el espacio intercelular. Por corte fino se pueden observar con claridad las zonas teñidas asi como las no marcadas por el trazador. De esta manera se infiere la permeabilidad de la unión estrecha analizada en cuestión.

Con esta técnica se ha visto como en los sistemas fetales a medida que la unión estrecha se ensambla, la permeabilidad al trazador disminuye y finalmente desaparece.

### 2.3.2 Formación de unión estrecha en células epiteliales en desarrollo

En monocapas de hepatocito de rata fijadas a diferentes tiempos despues de sembrarse a baja densidad, (Montesano 1980) se observan los siguientes pasos para la formación de las uniones estrechas: a) aparición de una zona libre de PIM b) establecimiento de pliegues en la membrana a manera de panal c) migración de PIM hacia los pliegues del panal y, d) fusión de las partículas en filamentos continuos.

El mismo proceso se sigue en monocapas de hepatocitos (Porvaznick et al, 1979) y durante la citodiferenciación de ameloblastos en el germen molar de la rata (Sasaki et al, 1983).

Tambien se ha estudiado en estos sistemas la permeabilidad epitelial a trazadores electrónicos. En riñon de rata joven se ha visto como durante el desarrollo del túbulo proximal, las nefronas que aun no filtran son permeables al iantano, mientras que las ya funcionales no lo son. En estas últimas las uniones estrechas que se encuentran son sustancialmente más complejas que en las primeras (Larson, 1975).

### 2.3.3 Formación de unión estrecha en células MDCK.

#### 2.3.3.1 La unión estrecha y el calcio.

La primera evidencia experimental de la importancia del calcio para la estabilidad de la unión estrecha, se obtuvo en células oxínticas de Rana pipiens. (Sedar & Forte, 1964). Se demostró que el EDTA fragmenta la unión estrecha y el  $\text{Ca}^{2+}$  revierte por completo este efecto.

En monocapas confluentes de células MDCK (Cereijido et al 1978b), se ha visto que el EGTA elimina la resistencia transepitelial efecto que, se revierte al restituir el calcio al medio. (Fig 2.12).

Estudios posteriores con monocapas de células MDCK (Martinez-Palomo et al, 1980), muestran que la resistencia transepitelial depende de la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este ión no puede ser reemplazado por  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Ba}^{2+}$ . (Fig 2.13). En réplicas de crío-fractura se observa que la apertura de la unión estrecha provocada por la falta de  $\text{Ca}^{2+}$  produce una simplificación en la red de filamentos de la unión estrecha. Al restituir el  $\text{Ca}^{2+}$  al medio se aprecia un retorno al patron normal de filamentos de la unión.

figura 2.12

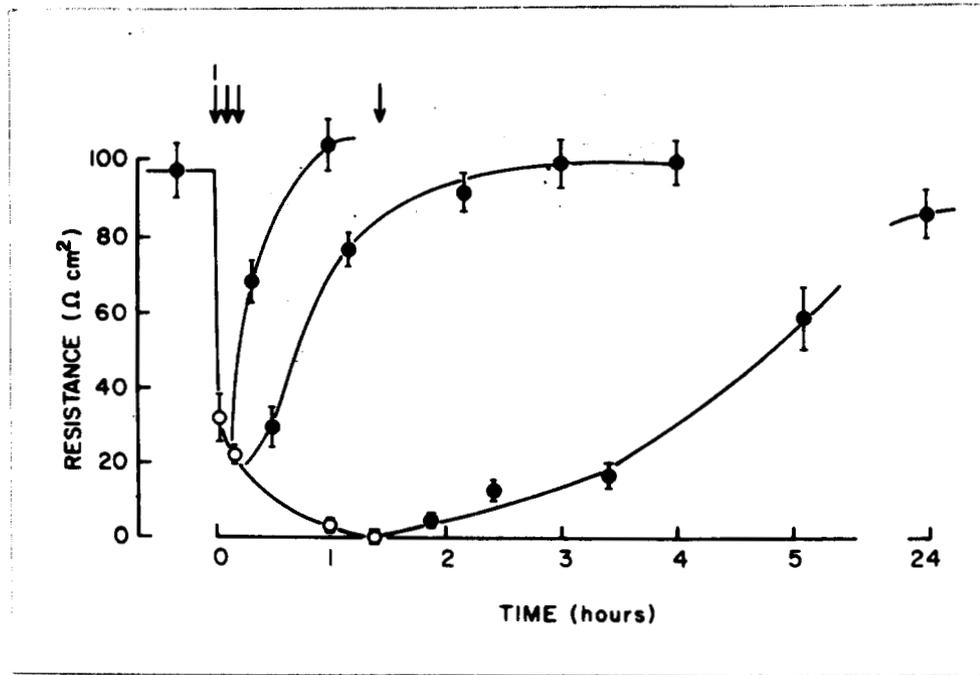


Fig 2.12 Recuperación de la resistencia eléctrica a través de monocapas de células MDCK. En la flecha 1 todos los discos se ponen en MEM sin  $\text{Ca}^{2+}$  y 2.5 mM EGTA. El  $\text{Ca}^{2+}$  se restablece a los tiempos marcados por las flechas. (Tomada de Cornejo et al, 1981).

figura 2.13

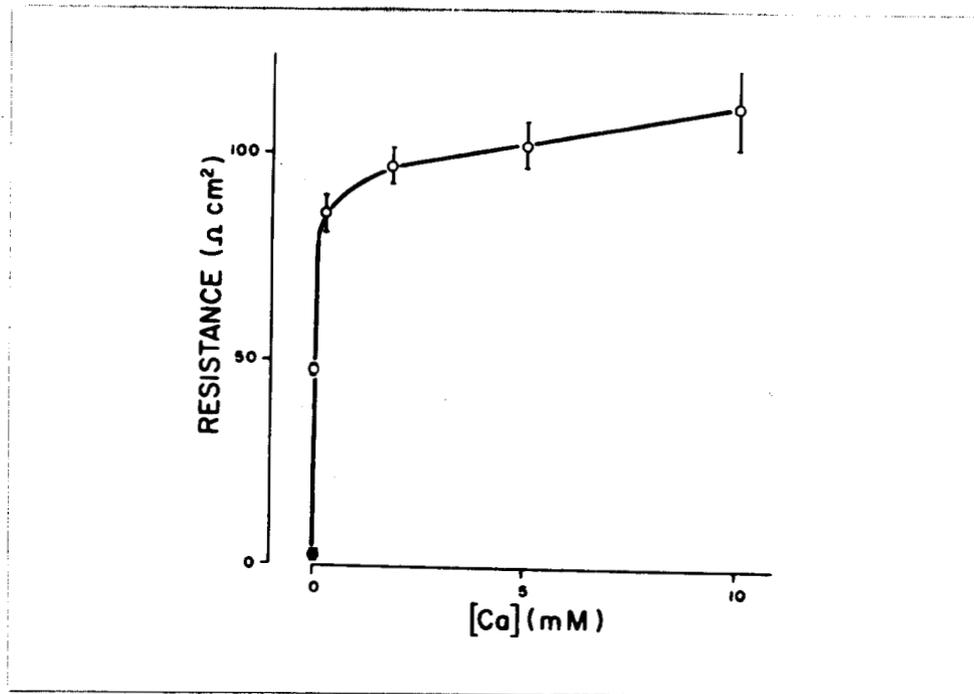


Fig 2.13 Resistencia eléctrica en función de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio de cultivo. Previamente los discos se incuban por 45-90 min en medio con diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . (Tomado de Cerejido et al 1981).

Al adicionar el ionoforo A23187 a monocapas de células MDCK, la resistencia transepitelial se desploma. Esto indica que el requerimiento de  $Ca^{2+}$  es exclusivamente del lado extracelular.

El resellado de las uniones ocurre simultáneamente a la recuperación de la selectividad  $Na^+/Cl^-$  y catión/catión de la monocapa. Sin embargo, en monocapas recién sembradas, la permeabilidad al  $Na^+$  y  $Cl^-$  (1/B) no sigue el curso temporal de desarrollo de la resistencia (Cereijido et al, 1978a). Esto indica que en una monocapa recién sembrada existen diferencias en la cinética de establecimiento de canales específicos de la unión, es decir, que la resistencia transepitelial es solamente una característica de la unión estrecha y la discriminación catión-catión es otra. Aparentemente la velocidad de reciclaje de los componentes responsables de ambas propiedades es distinta.

#### 2.3.3.2. La unión estrecha y las PIM.

Hoi Sang y colaboradores (1979) analizaron la relación entre la formación de la unión estrecha y el establecimiento de una distribución polarizada de PIM entre las membranas apical y basolateral de células MDCK. Vieron, que mientras las monocapas confluentes tienen uniones complejas y distribución polarizada de PIM, los cultivos tratados con EGTA pierden sus uniones y la polarización de PIM. Al resellar las células con  $Ca^{2+}$ , la unión se vuelve a ensamblar y reaparece la

distribución polarizada de PIM. Estos resultados concuerdan con los de Calli y colaboradores (1976). Estos últimos observaron que en lobulo pancreático de cobayo, el EGTA produce fragmentación de la unión acompañada por pérdida en la polaridad de PIM. Sin embargo, Meldolesi y colaboradores (1978) vieron en el mismo sistema como la reintroducción de  $Ca^{2+}$  restablece a la unión estrecha sin que se establezca una distribución polarizada de PIM.

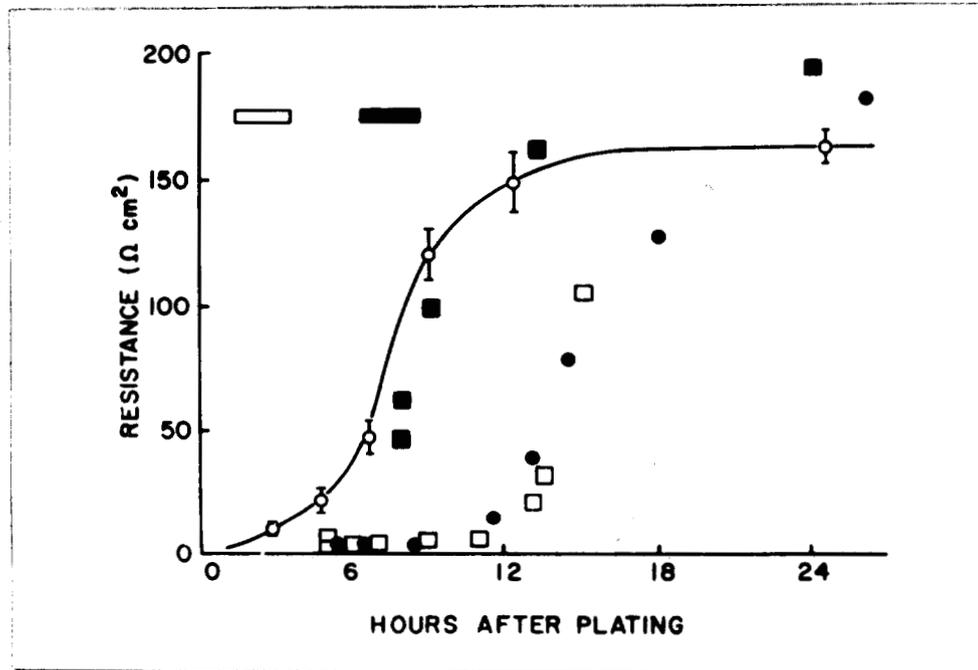
En cuanto a la formación de unión estrecha en células recién sembradas, Hoi Sang y colaboradores (1980), observaron como tan pronto se tiene un filamento continuo (10 hr), aparece una distribución polarizada de PIM.

Apesar de todo lo anteriormente mencionado, no se ha descrito en las células MDCK el proceso morfológico de ensamblaje de la unión. Se sabe que esta relacionado con la distribución de las PIM; que como se vera mas adelante, requiere de una fase temprana de síntesis protéica y, que su estabilidad depende de los microfilamentos. En esta tesis, se ha disenado un modelo experimental, que permite estudiar el proceso de ensamblaje de la unión separadamente de la fase de síntesis protéica. Así mismo este sistema a diferencia de los usados por otros investigadores no requiere el uso de drogas tales como el EGTA que, en última instancia pueden tener efectos colaterales sobre la preparación.

### 2.3.3.3 La síntesis de proteínas y la unión estrecha.

Cereijido y colaboradores (1978a) vieron que la cicloheximida ( $2 \times 10^{-5}$  M) añadida a las 2 horas de sembrada una monocapa produce un retraso considerable en el desarrollo de la resistencia transepitelial. Si esta droga se añade entre las horas 6 y 8 no produce efecto alguno. Por tanto es óbvio que a tiempos tempranos (<6hrs) se lleva a cabo la síntesis proteica. Después de la hora sexta los componentes de la unión ya están sintetizados aunque aun no se encuentren ensamblados. (Fig 2.14). Estos resultados fueron confirmados posteriormente por Hoi Sang y colaboradores (1980), y Griep y colaboradores (1983).

Fig 2.14 Desarrollo de la resistencia eléctrica a través de monocapas de células MDCK sembradas a confluencia a tiempo cero. La resistencia eléctrica surge lentamente a medida que las uniones se sintetizan y cierran (círculos vacíos). La cicloheximida (6µg/ml) presente durante el período marcado por el rectángulo vacío retrasa el desarrollo de la resistencia (cuadrados vacíos). La puromicina ( $10^{-4}$  M) tiene el mismo efecto (círculos llenos). Si la cicloheximida en cambio está presente en el período marcado por el rectángulo lleno, no inhibe el desarrollo de la resistencia eléctrica (cuadrados llenos). (Tomado de Cereijido et al, 1981.



En monocapas maduras (40-48 hrs de sembradas) la cicloheximida, la puromicina y la actinomicina D no causan efecto alguno sobre la resistencia transepitelial. Esto indica que no se requiere de síntesis protéica ni RNAm para el mantenimiento de la resistencia en monocapas bien establecidas. (Griep et al, 1983).

En monocapas tratadas con EGTA, el resellado con  $Ca^{2+}$  no se altera por la cicloheximida y la puromicina (Martinez-Palomo et al, 1980; Griep et al, 1983). Esto concuerda con observaciones de Meldolesi y colaboradores en lobulo pancreático de cobayo.

Se ha visto (Cereijido et al, 1978b), que monocapas sembradas a confluencia con células provenientes de cultivos de baja densidad celular presentan un retraso temporal en el desarrollo de su curva de resistencia. Estas monocapas a diferencia de las provenientes de cultivos confluentes son sensibles a la actinomicina D. Sin embargo, no requieren de nueva síntesis de RNAm si se les mantiene, 24 horas antes de sembrarse, en cultivo en suspensión. (Griep et al, 1983). Incluso, si a estas células después de estar en suspensión por 24 hrs, se les trata al momento de sembrarse con cicloheximida, no se previene en lo absoluto la aparición de la resistencia. Pero, si se les trata con tripsina inmediatamente antes de sembrarse, las células son incapaces de tener resistencia en ausencia de síntesis protéica.

En síntesis, se puede decir que las proteínas están involucradas en la formación de uniones estrechas. Estas proteínas, que no se degradan rápidamente en condiciones de estado estacionario de la monocapa, son destruidas por la tripsina y, pueden resintetizarse en ausencia de contacto célula-célula o célula-sustrato.

#### 2.3.3.4 La unión estrecha y el citoesqueleto.

Meza y colaboradores (1980), vieron que en las células MDCK la colchicina daña los microtubulos sin que esto afecte significativamente a la resistencia transepitelial de monocapas en estado estacionario. Por el contrario, la citocalacina B rompe los microfilamentos y suprime la resistencia electrica.

En monocapas tratadas con EGTA, la colchicina no ejerce efecto alguno tanto en la apertura como en el resellado de la monocapas. La citocalacina B en cambio, inhibe el resellado con  $Ca^{2+}$  y desorganiza el anillo de microfilamentos del borde celular apical. (Meza et al, 1980)). Meldolesi y colaboradores (1978), en lobulo pancreático de cobayo obtuvieron los mismos resultados con la citocalacina B. Sin embargo apesar de que en este sistema, la colchicina no afecto la organización ni la apertura de la unión estrecha con EGTA, si produjo un resellado defectuoso de la misma.

En células MDCK, la citocalacina B y la colcemida (un analogo de la colchicina) aplicadas durante las primeras seis horas de sembrada la monocapa, inhiben por completo la formación ulterior de las uniones estrechas (Hoi Sang et al, 1980).

En conclusión podemos decir, que los microfilamentos estan estrechamente relacionados con la estabilidad de la unión. En cuanto a los microtubulos los resultados son contradictorios, por lo que su relación con la unión estrecha nos es aun incierta.

#### 2.4 Relación entre la estructura y la función de la unión estrecha

Como se mencione en el capítulo I, se ha postulado una clasificación de epitelios en dos categorías límites:

1. Los llamados de "alta permeabilidad", es decir, aquellos en los que los solutos atraviesan el epitelio por una ruta paracelular controlada por las uniones estrechas y,
2. Los llamados "herméticos", donde la ruta de los solutos es, casi exclusivamente transcelular.

Las características de baja resistencia eléctrica, alta permeabilidad osmótica al agua, transporte isotónico de fluidos y pequeños gradientes de concentración son generalmente asociados con epitelios de alta permeabilidad, en tanto que las propiedades inversas aparecen en los herméticos. Sin embargo esta clasificación bimodal de los epitelios, no es sino una sobresimplificación, ya que la relación conductancia intracelular y conductancia intercelular varía en los distintos epitelios. Al respecto, Claude y Goodenough (1973), intentaron una clasificación de los epitelios en función de su resistencia transepitelial. Encontraron una correlación entre la permeabilidad de la unión estrecha y el arreglo de los filamentos de la unión. (Tabla 1). Los epitelios muy permeables tienen pocas bandas, mientras que los impermeables tienen uniones de mayor profundidad y con un número mayor de bandas. Los epitelios con permeabilidad intermedia presentan uniones de morfología intermedia.

Tabla 1. \* Algunos Epitelios Simples Clasificados de Acuerdo a su Resistencia Transepitelial. Medidas de la Morfología de la Unión.

TEJIDO	Resistencia Transepitelial ( $\Omega\text{cm}^2$ )	Morfología de la Unión				N
		No. de Fibrillas	Profundidad ( $\mu\text{m}$ )			
		Gama	Promedio+ES	Gama	Promedio+ES	
<u>Muy Permeable:</u> túbulo contorneado proximal de mamífero.						
Perro	6	-	-	-	-	-
Ratón	-	1-2	1.19+0.12	+	+	48
Rata	-	-	-	-	-	-
<u>Permeable:</u> túbulo contorneado proximal de Necturus	70	106	3.30+0.15	0.1-0.8	0.46+0.02	59
Vesícula de conejo.	30	2-6	4.10+0.11	0.1-1.0	0.41+0.02	90
<u>Intermedio:</u> vesícula de Necturus	300	4-8	6.20+0.21	0.5-1.4	1.00+0.05	23
Yeyuno de rata	>300	-	-	-	-	-
Yeyuno de ratón	-	4-7	5.30+0.17	0.3-0.8	0.39+0.03	34
<u>Intermedios a Herméticos:</u> túbulo contorneado distal	300-600	-	-	-	-	-
Necturus	-	2-7	4.80+0.36	0.1-1.0	0.38+0.06	17
Ratón	-	4-7	5.80+0.20	0.1-0.2	0.14+0.006	18
<u>Muy Herméticos:</u> Estómago de ratón	-	4-11	8.10+0.34	0.3-0.9	0.63+0.03	25
Vejiga urinaria de anfibios	1000-2000	-	-	-	-	-
Sapo	-	5-11	8.10+0.94	0.3-0.5	0.36+0.03	7
Rana	-	5-14	7.90+0.38	0.3-1.1	0.58+0.03	34

(\*) Tomada de Claude y Goodenough (1973)

(+) En la mayoría de los lugares la profundidad de la unión era igual al ancho de una sola fibrilla

(N) número de determinaciones.

(ES) error estándar.

Aunque en diversos sistemas se cumple esta relación morfológica-funcional (ver incisos de alteraciones fisiológicas, patológicas y experimentales), existen otros donde esto no sucede. Martínez-Palomo y Erlíj (1975) observaron que tejidos como la vejiga urinaria de sapo, y la mucosa intestinal de conejo, poseen un número muy similar de filamentos de unión estrecha, a pesar de tener una resistencia eléctrica transepitelial de 12 000 y 125 ohms/cm<sup>2</sup> respectivamente. Møllgård y colaboradores (1976) a su vez, no encontraron relación entre la morfología de la unión estrecha y la permeabilidad del plexo coroideo de borrego en desarrollo. Estas observaciones abren la posibilidad de que estructuras permeantes (poros?) en o entre los filamentos, y no el filamento mismo, sean las responsables de la capacidad de sellado de la unión.

Con respecto a este último punto, Claude (1978) propuso un modelo de permeabilidad transepitelial en el que se grafica la resistencia transepitelial en función del número de filamentos de la unión. En lugar de obtenerse una relación lineal como habría de ser si la resistencia a través de la unión, fuere la suma de un grupo de resistencias en serie, representadas por cada una de las bandas individuales; lo que se obtiene es una relación exponencial. Por tanto se propone que las uniones contienen pequeñas regiones análogas a poros que se pueden abrir y cerrar para dejar pasar a los iones. Así, la resistencia de la unión estrecha, pasa a ser función primero, del número de bandas de la unión y, segundo, de la

probabilidad de que la banda este "abierta".

En esta tesis y como se vera mas adelante, se estudia si en un epitelio en estado estacionario, la alteración de la resistencia transepitelial se acompaña de cambios en la morfología de las bandas de la unión. Asi mismo se analiza si en un epitelio en formación la disminución en la permeabilidad sigue el mismo curso temporal de la aparición de las uniones estrechas.

En la siguiente sección se mencionan varias condiciones en las que se ha estudiado la relación entre la estructura de la unión y su comportamiento.

#### 2.4.1 Alteraciones fisiológicas de la unión estrecha.

Existen diversas condiciones fisiológicas que vienen acompañadas de cambios en la estructura de la unión estrecha. Tenemos asi, que a) en las células de sertoli de testículo humano, la barrera testicular-sanguínea se establece justo antes de que los espermatogónios proliferen para generar espermatoцитos primarios (12-13 años de edad). En el testículo pre-puberal (3-8 años de edad) en cambio, no se encuentran uniones estrechas (Furuya et al, 1978); b) en glandula mamaria de ratón (Pitelka et al, 1973) y de borrego (Morgan & Wooding, 1982), la unión estrecha se vuelve mas compleja al final del embarazo y durante la lactancia; c) en útero de rata, en el día de la implantación, la unión estrecha prolifera (Murphy et al, 1982a); y d) en útero humano a la mitad del ciclo

menstrual se observa una unión mas profunda y extensa que en el resto del ciclo (Murphy et al, 1982b). De estos estudios queda claro que, en condiciones en las que es necesario un control estricto del contenido de una cavidad, la unión estrecha se vuelve morfológicamente más compleja.

#### 2.4.2 Alteraciones patológicas de la unión estrecha.

En realidad son pocos los casos en los que se han observado alteraciones patológicas que se relacionen directamente con cambios en la estructura de la unión estrecha. Incluso en ellos no es posible afirmar que el patrón alterado de la unión es el causante directo de la enfermedad ya que, es posible que sea mas bien una consecuencia. Sin embargo es pertinente aclarar que el hecho de que existan pocos trabajos en los que se observen cambios patológicos de la unión, sea tal vez por falta de estudio y no porque sea esta necesariamente, una condición poco comun. Entre las condiciones patológicas en las que se ha podido determinar alguna alteración en la estructura de la unión estrecha tenemos:

a) En carcinoma hepatocelular humano la unión estrecha se encuentra desorganizada, presentando zonas compuestas por un solo filamento asi como discontinuidades frecuentes a lo largo de la unión (Swift et al, 1983).

b) Las ratas con degeneración congénita de la retina, tienen al nacer un epitelio pigmentado (EPR) de apariencia completamente normal. A las 3 semanas, los núcleos de los fotorreceptores comienzan a degenerar, y el epitelio se vuelve permeable a la peroxidasa y el lantano. A los 72 dias, los fotorreceptores han desaparecido y las células del EPR carecen totalmente de unión estrecha (Caldwell & Mc Laughlin, 1983).

c) En un paciente con síndrome de Fanconi (perturbación renal que se asocia o precede a milomas múltiples), la biopsia de riñon muestra la existencia de uniones estrechas entre

podocitos glomerulares. Hay que aclarar que, en el glomérulo adulto humano sano, este tipo de unión no existe, y solo se presenta en condiciones embrionarias. En la orina de este paciente, se detectan cadenas de proteínas livianas kappa de alto punto isoeléctrico. Al aplicar in vitro dichas proteínas a la cara apical de la vesícula biliar de Necturus, la resistencia transepitelial y la diferencia de potencial eléctrico espontáneo aumentan inmediatamente en forma dependiente de concentración. Este efecto se revierte al eliminar las proteínas. El análisis morfológico de las vesículas muestra uniones estrechas más profundas que las normales. Por tanto se propone, que ciertas cadenas protéicas livianas, en virtud de su carga positiva, son capaces de inducir cambios en la estructura y permeabilidad de la unión. (Alavi et al, 1983).

### 2.4.3 Alteraciones experimentales de la unión estrecha.

Han sido varios y muy diversos los estudios que se han hecho para inducir cambios en la estructura de la unión estrecha. En algunos casos estos han podido ser relacionados con variaciones en la resistencia transepitelial. Para facilitar su estudio, se han dividido en dos grandes grupos: a) los inducidos por drogas y, b) los generados por otros tratamientos.

#### 2.4.3.1 Alteraciones inducidas por drogas.

La tripsina en el epitelio oral de la rata (Shimono & Clementi, 1977) y en células cancerosas de colon que carecen por completo de uniones estrechas (Polak-Charcon et al, 1978) induce una proliferación masiva de las mismas. En cambio, en monocapas de células MDCK provenientes de cultivos en suspensión, el tratamiento con tripsina al momento del sembrado hace necesaria la síntesis de "novo" de proteínas para el desarrollo de la resistencia transepitelial. (Griep et al, 1983).

En vesícula biliar de Necturus, las citoquininas vegetales cinetina y zeatina, la citocalacina B y la faloidina producen un rápido y reversible aumento en la resistencia transepitelial (Bentzel et al, 1980). Las réplicas de crió-fractura de estas preparaciones, muestran un patron sumamente desordenado de unión estrecha. Los filamentos en lugar de estar orientados paralelamente al borde apical

celular, se orientan en forma perpendicular. En base a estas observaciones, Bentzel (1982) propone que la configuración paralela de filamentos de la unión se asocia a una alta permeabilidad transepitelial, mientras que la orientación perpendicular corresponde a una alta resistencia transepitelial.

Por otro lado, la administración crónica de estradiol produce colestasis en hepatocitos de rata. Bajo esta situación, las uniones estrechas de los hepatocitos adquieren un patrón irregular y suelto, con muchos filamentos orientados perpendicularmente a la cara apical (De Vos & Desmet, 1981). En este caso a diferencia de lo que sucede en la vesícula biliar de Necturus y de lo propuesto por Bentzel (1982), se produce un aumento en la permeabilidad de la ruta paracelular.

Entre las sustancias que se ha probado que inducen proliferación de unión estrecha tenemos: la vitamina A en epitelio escamoso de pata de embrión de pollo (Elias & Friend, 1976); el tetracloruro de carbono (Robeneck et al, 1979) y la N-nitrosomorfolona (Robeneck, 1980) en hígado de rata; la progesterona y el oestrogeno en útero de rata (Murphy et al, 1980) y, el AMPcíclico en vesícula biliar de Necturus (Duffey et al, 1981).

El efecto de moléculas protéicas catiónicas sobre la morfología y permeabilidad glomerular, ha sido bastante estudiado en animales experimentales. El sulfato de protamina y la polilisina inducen en el riñon de rata, la formación de uniones estrechas entre las membranas basales glomerulares y

entre los podocitos. (Seiler et al, 1975; Kerjaschki, 1978). La protamina produce en la vesícula biliar de Necturus un rápido y reversible aumento en su resistencia transepitelial. También genera un incremento significativo en la profundidad de la unión estrecha (Bentzel et al, 1978). Estos resultados sugieren que la neutralización de cargas fijas negativas en las membranas epiteliales, desenmascara la capacidad de formar uniones estrechas.

En células MDCK, el promotor tumoral 13-acetato-12-tetradecanoilforbol (TPA) produce un pronunciado aumento en la permeabilidad transepitelial. Morfológicamente se observan alteraciones celulares tales como apertura de la unión estrecha, pérdida de microvellosidades y formación de numerosos procesos celulares que contienen restos de citoesqueleto. (Ojakian, 1981).

#### 2.4.3.2 Alteraciones experimentales generadas por distintos tratamientos.

a) Choque osmótico.- Con este tratamiento se han obtenido resultados discordantes entre sí. Por ejemplo, en vejiga urinaria de sapo Wade y Karnovsky (1974), encontraron que el choque osmótico rompe la estructura de la unión estrecha. Martínez-Palomo y Erlíj (1975) obtuvieron una disminución en la resistencia transepitelial a pesar de que a diferencia de Wade y Karnovsky observaron uniones estrechas no alteradas. En túbulo proximal de sapo, el choque osmótico da paso libre al

lantano (Rawlins et al, 1975), mientras que en intestino de cobayo produce un aumento en la resistencia transepitelial y un patrón mas complejo de unión estrecha (Madara, 1983).

b) Presión.- En tubulo proximal de rata, el aumento en la presión intratubular hace que la unión estrecha se abra (Bulger et al, 1974). Al ligar el ducto biliar, los hepatocitos de cobayo (Mutoh, 1981) y de rata (Easter et al, 1983) sufren un rompimiento progresivo de sus uniones estrechas. Por tanto, queda claro que la presión es un factor que rompe el epitelio destruyendo las uniones estrechas.

c) Lesión mecánica.- En vesícula biliar de Necturus al remover células aisladas del epitelio, las células vecinas migran y cubren la herida. Las uniones estrechas entre estas células se forman a los 15 minutos de haber entrado en contacto (Hudspeth, 1975; Hudspeth, 1982). En traquea de rata al producirse una herida, las uniones estrechas aparecen 6 horas despues de que las células se contactan en la zona dañada (Marin et al, 1979). El hecho de que tanto en Necturus como en traquea de rata se formen en tan corto tiempo nuevas uniones estrechas, sugiere la existencia de una poza de componentes de la unión. Al respecto sería interesante probar si inhibidores de la síntesis de proteína tales como la cicloheximida o la puromicina inhiben la formación de las uniones una vez que las células han entrado en contacto.

d) Tensión mecánica.- Cuando las células mamarias de ratón se siembran a baja densidad, se aplanan y extienden al máximo para formar una monocapa apenas confluyente. La tensión centripeta

del citoesqueleto de estas células hace que los filamentos de la unión estrecha se orienten perpendicularmente a la cara apical. En cambio cuando la tensión se aplica al gel que sirve de soporte celular, las uniones estrechas se vuelven angostas y largas. (Pitelka & Taggart, 1983). Por tanto, la tensión mecánica en sí, ya sea inherente al citoesqueleto o impuesta a la célula por una fuerza exógena, puede desplazar lateralmente a los filamentos de la unión.

e) Temperatura. - La incubación a 37 °C por 5' induce en próstata de rata una proliferación masiva de uniones estrechas (Kachar & Pinto da Silva, 1981; Tadvalkar & Pinto da Silva, 1983). Estas uniones aparecen en 3 lugares atípicos: 1) en la membrana basal de las células epiteliales columnares; 2) en la membrana plasmática de células epiteliales basales (en su estado nativo nunca poseen uniones estrechas); y 3) entre partes de la misma célula (unión estrecha auto-celular) (Kachar & Reese, 1983). Apesar de que no se conoce el mecanismo responsable de la formación de estas uniones atípicas, estos resultados indican: 1) Que la formación de unión estrecha en las células epiteliales no requiere necesariamente de la participación de dos células, ya que esta puede presentarse entre elementos de la misma célula y, 2) que aun en células altamente polarizadas, la formación de unión estrecha no se limita a sitios específicos de la membrana plasmática.

## 2.5 Degradación de las uniones estrechas

A lo largo de este capítulo, se ha mencionado en varias ocasiones el efecto de quelantes de calcio (EGTA y EDTA) sobre la integridad estructural y funcional de la unión estrecha. Recientemente se ha visto por microscopía de barrido los eventos celulares que conducen a la desintegración de la unión por falta de calcio (Pitelka et al, 1983): a) Aparición de una fuerza centrípeta en el citoplasma b) Esta fuerza tenza y desplaza perpendicularmente a los filamentos de la unión c) Los filamentos se fragmentan d) La retracción celular genera delgados filopodios. Estos en su porción distal llevan fragmentos de unión que unen puntualmente a las células entre si, y e) Se endocitan los fragmentos de unión estrecha. En cuanto a la tripsina, se ha visto que degrada a la unión de dos maneras: 1) rompe los filamentos hasta convertirlos en PIM y, 2) endocita los fragmentos de unión (Talmon & Ben Shaul, 1979). El efecto proteolítico de la tripsina sobre la unión, se corrobora por el hecho de que células recién tripsinizadas necesitan de síntesis de proteína para ensamblar sus uniones estrechas (Talmon & Ben Shaul, 1979; Griep et al, 1983).

Sin embargo, en células MDCK, se ha visto (Cereijido, comunicación personal), que al tratar las monocapas con tripsina (sin EDTA), estas se levantan y enrollan como tapetes celulares. De tal manera que el efecto de la tripsina parece ser sobre la adhesión al sustrato y no sobre las uniones en si.

En células cancerosas de colon (Polak Carcon & Ben Shaul, 1979) y de ovario (Risinger & Larsen, 1981, 1983), la degradación epitelial de uniones estrechas sigue los mismos pasos que el tratamiento con tripsina.

### III FOCALIZACION DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS DE LA TESIS

#### 3.1) Presentación del problema

A lo largo de los capítulos anteriores, se ha mencionado que las membranas epiteliales se caracterizan por su capacidad de intercambiar nutrientes y electrolitos entre el medio externo y el interno. Esta capacidad tiene en primer lugar una base estructural en la presencia de las uniones estrechas que, como ya se ha mencionado, forman un cinturón que rodea a las células y confiere al epitelio su papel de verdadera barrera a la difusión. En segundo lugar, tiene una base molecular en la distribución asimétrica de enzimas y sistemas de transporte entre los dos dominios de la membrana de la célula epitelial: el apical que se relaciona con el medio externo, y el basolateral bañado por el líquido intersticial y, por consiguiente, sujeto a regulación por hormonas y otros factores séricos.

Como se menciona en el Capítulo II, hay preguntas que, no obstante ser fundamentales permanecen en pie. La primera es porqué, cuándo y cómo se establecen las uniones estrechas. Hasta ahora se sabe que es necesario el contacto célula-célula para su formación, que el calcio participa en su integración y que al tripsinar un epitelio las uniones desaparecen. Sin embargo no se conoce el mecanismo de ensamblaje de los filamentos de la unión estrecha, se desconoce si provienen de PIM y si, de ser así, estas se desenmascaran recién cuando se

las necesita para unirse longitudinalmente, si los componentes se sintetizan de novo, o si simplemente se alinean y fusionan.

La segunda pregunta que no ha sido respondida es qué relación guarda la estructura de la unión estrecha con la regulación de la resistencia transepitelial. Como se menciona en el Capítulo II, existen diversas situaciones fisiológicas, patológicas y experimentales en las cuales a mayor número de filamentos y profundidad de la unión estrecha corresponde una resistencia transepitelial mas alta. Sin embargo tambien se sabe que hay ocasiones en las que esta relacion no se cumple. Parte de este dilema se ha originado del hecho de que generalmente se comparan diferentes tipos de epitelios y provenientes de distintas especies animales. Por tanto es conveniente estudiar que sucede con esta relación cuando se trabaja con un mismo tipo celular sometido a diferentes condiciones en las que se consiga variar experimentalmente la estructura, la función o ambas.

La tercer pregunta que se plantea se refiere a la naturaleza química de la unión estrecha. En el Capítulo II se menciona que para el establecimiento ulterior de las uniones es necesaria la síntesis de proteínas durante las primeras horas de sembrada una monocapa. En dicho Capítulo tambien se comenta que los trabajos de Pinto da Silva, Kachar y Reese sugieren que los filamentos de la unión son en realidad lípidos organizados en micelas cilíndricas del tipo que, en cristalografía de rayos X, aparece como una fase hexagonal II. Finalment<sup>e</sup> se tiene el modelo lipoprotéico de unión estrecha, en el que los lípidos

integran a los filamentos de la unión y las proteínas constituyen puntos de anclaje con el citoesqueleto. Por otro lado, si el ensamblaje de la unión estrecha se realiza por fusión sucesiva de PIM, entonces resulta factible que la unión sea protéica ya que como aparece en el Capítulo II, se ha demostrado la naturaleza protéica de algunas PIM. Sin embargo también se ha visto que los lípidos pueden formar micelas invertidas que vistas por crió-fractura son indistinguibles de las PIM. Mientras no se tenga una preparación de unión estrecha en la que sea factible el análisis bioquímico, las evidencias a favor o en contra de una u otra postura serán indirectas, pero de cualquier forma contribuirán a esclarecer la situación.

Por último cabe preguntarse que relación guarda la formación de la unión estrecha con el establecimiento de la polaridad celular. Pisam y Ripoché (1976), observaron que cuando las células epiteliales de vejiga de sapo se disocian mediante la quelación del  $Ca^{2+}$  (en esta condición las células pierden sus uniones estrechas) los marcadores apicales se distribuyen sobre toda la superficie celular. Así mismo, las enzimas apicales leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina se encuentran sobre toda la superficie apical de células disociadas de intestino de ratón (Ziomek et al 1980). Por otro lado, como se vio en el Capítulo II, la adición de EGTA en células epiteliales produce una fragmentación progresiva de los filamentos de la unión estrecha que a su vez conduce a una pérdida en la distribución polarizada de las PIM entre las

membranas apical y basolateral. Con el fin de estudiar la relación entre unión estrecha, adhesión a sustrato y polaridad epitelial, Rodriguez Boulan (1983) estudió la gemación de los virus VSV e influenza (geman por superficies opuestas en las monoapas confluentes) en células MDCK disociadas. Sus experimentos mostraron que: 1) En células MDCK en suspensión la gemación viral se realiza por toda la superficie celular es decir, con una pérdida total de la polaridad. 2) En células aisladas adheridas a un sustrato, los virus geman con la polaridad correcta (el virus de influenza por la superficie libre mientras que los virus VSV por el área adherida al sustrato). 3) En grumos de células en suspensión, sin interacción con el sustrato, los virus geman polarizadamente, debido probablemente a que unas células hacen de sustrato a las otras.

Queda así clara la importancia de la interacción de la célula con el sustrato o con otras células (que se hacen mutuamente de sustrato) para el establecimiento de la polaridad celular.

### 3.2 Las líneas celulares: sus ventajas sobre los epitelios naturales

Para realizar esta investigación se podría trabajar con epitelios naturales adultos. Sin embargo es difícil estudiar en ellos los procesos de formación de unión estrecha y polarización celular puesto que ya los tienen establecidos. Una posibilidad podría ser, en principio, estudiar tejidos embrionarios, pero la cantidad de material que estos brindan es muy exigua. Si en cambio trabajamos con una línea celular esta nos ofrece varias ventajas sobre los epitelios naturales. Estas son: 1) Se trata de un solo tipo de células, sin glándulas, vasos ni filates nerviosos. 2) Todas las células tienen la misma edad. 3) Se las puede sincronizar para que estén en la misma fase del ciclo celular. 4) No hay que extirparlas, diseccionarlas y montarlas como a los epitelios naturales para que vivan in vitro unas pocas horas, y hacer el experimento premortem, sino que las células cultivadas nacen y crecen naturalmente in vitro. 5) El medio puede ser totalmente conocido. 6) Se tiene acceso experimental a todas y cada una de las fases que nos interesan, desde el momento en que se las siembra, hasta que sintetizan y ensamblan las uniones oclusoras y se polarizan en apical y basolateral. 7) Se las puede clonar, hacer estudios genéticos transformarlas etc. 8) Creciéndolas en botellas roladoras se las puede obtener en grandes cantidades, lo que facilita su análisis bioquímico.

### 3.3 La línea celular MDCK como modelo de monocapa epitelial

La línea celular MDCK con la que se trabaja en esta tesis, deriva del riñon de un perro Cocker Spaniel adulto y aparentemente normal. El cultivo primario fue hecho en 1958 por Madin y Darby (1979). El numero modal cromosomico de esta línea celular parece esta relacionado con su tiempo de permanencia en cultivo. Así las MDCK que se obtienen de la American Type Culture Collection (pasaje 50), tienen 79 cromosomas por lo que su cariotipo se asemeja al canino normal ( $2n=78$ ) con un autosoma metacéntrico adicional. En cambio las MDCK del NIH (National Institute of Health de los Estados Unidos) que estuvieron por 5 años en cultivo continuo presentan 87 cromosomas (Gausch et al, 1966).

Las células MDCK en cultivo son citologicamente malignas; sus núcleos son grandes con nucleolos múltiples y presentan con frecuencia figuras mitoticas anormales. La oncogenicidad de esta línea celular se probó in vivo al inocularlas en el embrión de pollo por vía intravenosa y topicamente en la membrana corioalantoidea. En el primer caso a la semana se encontraron focos de adenocarcinoma metastásico en el cerebro, y en el segundo aparecieron placas de células MDCK en el epitelio coriónico del embrión de pollo (Leighton et al, 1969, 1970).

Estudios morfológicos y bioquímicos sugieren que las células MDCK derivan de los túbulos contorneado distal (Rindler et al, 1977,1979) y colector (Valentich, 1981). Sin embargo, Herzlinger y colaboradores (1982), observaron que las células MDCK expresan antígenos de superficie correspondientes a la porción ascendente gruesa del asa de Henle y al túbulo contorneado distal. Este posible origen múltiple de las células MDCK se evidencia también en el hecho de que la captación de  $\text{Na}^+$  en ellas es inhibible tanto por amilorida (lo que las asemeja al túbulo contorneado distal), como por los diuréticos furosemida y bumetamida que actúan fundamentalmente sobre el asa de Henle (Rindler et al, 1979,1982; Mc Roberts et al, 1982). El origen diverso de las células MDCK puede tal vez explicar la heterogeneidad encontrada tanto en la formación de ampollas (Lever, 1979) como en la magnitud de la resistencia transepitelial de las monocapas (Simmons, 1981).

Cuando las células MDCK se siembran sobre un soporte impermeable (vidrio o plástico), forman monocapas polarizadas con numerosas ampollas o domos multicelulares. La polarización celular se manifiesta:

a) Morfológicamente, por la presencia de microvellosidades en la cara apical, de uniones estrechas en la porción anterior de la cara lateral y de interdigitaciones en la membrana lateral de las células vecinas (Kaiho, 1977; Leighton et al, 1969,1970).

b) Bioquímicamente, por la localización asimétrica de enzimas de membrana, tales como la ATPasa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  y la leucina aminopeptidasa que se encuentran en las caras lateral y apical respectivamente (Louvard, 1980). c) Funcionalmente, por el transporte vectorial de agua y electrolitos (Misfeldt et al, 1976; Cereijido et al, 1978a y b) así como por la gemación asimétrica de virus (Rodríguez Boulan & Sabatini, 1978).

En cuanto a las ampollas, éstas se forman por el transporte de  $\text{Na}^+$  que provoca secundariamente la acumulación de agua entre la monocapa y el soporte impermeable sobre el que crece. Las ampollas son estructuras temporales, que desaparecen cuando la presión del fluido acumulado excede la resistencia de las uniones entre las células que las forman.

Cuando las células MDCK se siembran sobre un soporte permeable y translúcido como los discos de nylon recubiertos por colágeno, se forma una monocapa que crece a manera de tapiz liso, y no se forman ampollas ya que el agua puede escapar. Las células así cultivadas forman uniones estrechas entre sí y se polarizan estructural y funcionalmente. Además pueden montarse a manera de diafragma entre dos cámaras de lucita y exhibir varias de las propiedades de los epitelios transportadores naturales (Cereijido et al, 1978b).

La resistencia eléctrica se desarrolla a partir de la 4a a 6a hora de sembrada la monocapa y llega a las 24 hrs a un valor de aproximadamente 80-200  $\text{ohms} \cdot \text{cm}^2$ . La diferencia de potencial espontáneo es menor de 1 mV (cara apical positiva). La conductividad de la unión estrecha varía notablemente a lo

largo del perímetro celular, presentandose tanto áreas de alta como de muy baja resistencia. Esta heterogeneidad concuerda con las réplicas de crío-fractura, donde el número de filamentos de la unión puede variar abruptamente de 1 a 10. Sin embargo, ya que para medir conductividad y observar el número de filamentos de la unión estrecha, se emplean técnicas muy distintas, y en consecuencia se usan distintas monocapas, no se puede afirmar en rigor que las áreas de alta conductividad correspondan precisamente a las zonas con pocos filamentos y viceversa.

Las uniones estrechas de las células MDCK son impermeables a los trazadores macromoleculares de microscopía electrónica como la lactoperoxidasa y el rojo de rutenio; su discriminación  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  es de 9 a 1, y la selectividad catiónica concuerda con la serie VI de Eisenman (ver Capítulo I). El sellado de la unión estrecha y su estabilidad dependen de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular. Como se menciona en el Capítulo II, los microfilamentos parecen estar involucrados en el mantenimiento de la estructura de la unión.

### 3.4 Objetivos

Con base en las ventajas de las líneas celulares y en especial de la línea MDCK, y en función de las preguntas que se plantean al principio de este capítulo se proponen para el presente estudio los siguientes objetivos:

1) Estudiar el mecanismo de ensamblaje de los filamentos de la unión estrecha en las células MDCK.

Para esto se ha diseñado un experimento en el cual las células se siembran a confluencia en botellas de cultivo con medio con  $\text{Ca}^{2+}$ . Una vez que las células se adhieren al sustrato (1 hr) se les cambia el medio por uno sin  $\text{Ca}^{2+}$  en el que permanecen por 20 hrs. Esto tiene por objeto que las células se expandan e interdigiten entre sí hasta formar una monocapa completa. Sin embargo, debido a la falta de  $\text{Ca}^{2+}$ , las células no se abrochan entre sí con uniones estrechas. Por tanto, si en este momento se añade el  $\text{Ca}^{2+}$  posible estudiar mediante replicas de crío-fractura el proceso de ensamblaje de la unión estrecha.

2) Analizar la relación entre la estructura de la unión estrecha y la resistencia transepitelial.

Se sigue el mismo protocolo del inciso anterior, solo que ahora también se siembra sobre discos de nylon con colágeno. Se comparan las distintas etapas en la formación de la unión estrecha con su correspondiente resistencia eléctrica transepitelial y permeabilidad a rojo de rutenio.

Para estudiar si la relación estructura/función puede alterarse experimentalmente se analiza el efecto de la temperatura sobre estos dos parametros de las monocapas de células MDCK. Existen además otros motivos para elegir a la temperatura como instrumento de este análisis: la controversia actual sobre la naturaleza química de la unión estrecha. Esto ultimo se plantea en el siguiente objetivo.

3) Estudiar si en las células MDCK la unión estrecha se comporta como si su composición química fuese fundamentalmente lipídica.

Como ya hemos mencionado, aunque para el establecimiento de las uniones estrechas durante las primeras horas de sembrada una monocapa es necesaria la síntesis protéica, esto no necesariamente implica que las uniones en si esten constituidas por proteínas. Como vimos hay estudios que sugieren que los filamentos de la unión están formados por lípidos organizados en fase hexagonal II. Estas fases líquido-cristalinas ya sea formadas por mezclas de lípidos puros (Verkleij et al, 1980; Van Venetie & Verkleij, 1981) o lípidos extraídos de sistemas biológicos (Luzzati & Husson, 1962) son extremadamente sensibles a la temperatura, por tanto es de esperarse que si los filamentos de la unión estrecha son en realidad micelas cilíndricas lipídicas, sufrirán alteraciones morfológicas drásticas cuando la temperatura cambie por varias décadas (3 a 37 °C).

4) Observar que relación guardan entre sí la formación de la unión estrecha y la polaridad celular.

Primero se analiza el estado de la polaridad celular cuando las células están adheridas al sustrato e interdigitadas unas con otras pero sin uniones estrechas entre sí debido a la falta de  $\text{Ca}^{2+}$ . Al añadir este catión se sigue la cinética de formación de unión estrecha y su relación con la polaridad celular. Finalmente en el experimento de la temperatura se estudia si esta afecta de manera alguna la distribución polarizada de PIM.

#### IV MATERIAL Y METODOS

##### 4.1 Cultivo celular masivo

Se utilizan células MDCK (Madin Darby Canine Kidney) entre los pasajes 60 y 90. Las células iniciadoras del cultivo fueron obtenidas de la American Type Tissue Collection.

Las células se cultivan a 35.6 °C en botellas de plástico desechables de 150 cm<sup>2</sup> de área (Costar 3150, Cambridge, Mass.), en una atmósfera compuesta por 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> que mantiene el pH a 7.4 (Incubadora VIP CO<sub>2</sub> 417, Lab Line Instruments Inc., New Brunswick, N.Y.). Cada botella contiene 20 ml de medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) con sales de Earle (Grand Island Biological Co. (GIBCO) 430-1600, Grand Island N.Y.), 24U/ml de penicilina, 24 ugr/ml de estreptomina (GIBCO 600-5145), 0.8 U/ml de insulina (Lilly) y 10% de suero de ternera (GIBCO 200-6170). Este medio completo se denomina CDMEM.

Las células se adhieren al piso de la botella y forman una monocapa confluyente. El medio de cultivo se cambia cada 2 a 3 días. Las células se levantan del piso de la botella de cultivo mediante un tratamiento con tripsina-EDTA (GIBCO 610-5305). La suspensión de células así obtenida se centrifuga durante 2 min a 500 RPM. El sobrenadante se descarta y la pastilla se resuspende en CDMEM. Esta suspensión celular se utiliza tanto para sembrar los discos de nylon (ver más adelante) como para crecer monocapas en botellas de cultivo.

## 4.2 Cultivo de monocapas con fines experimentales

### 4.2.1 Sobre discos de nylon recubiertos de colágeno

#### 4.2.1.1 Preparación del colágeno

Se disecan sobre hielo 20 colas de rata y se desprenden los tendones longitudinales que aparecen como hilos blancos brillantes. Después de cortarlos en pequeños pedazos se ponen en 500 ml de ácido acético frío al 2%. Se mantienen en agitación y 4 °C por una hr. El sobrenadante se dializa extensivamente contra agua destilada a 4 °C.

#### 4.2.1.2 Preparación de discos de nylon

Con un sacabocados se cortan discos de nylon (HC-103 Nitex, Tetko Inc., Elmsford, N.Y.) de 1.3 cm de diámetro. Se limpian por sonicación en acetona durante 15 min y se ponen a hervir en agua destilada por 10 min. Se enjuagan en alcohol al 70% y se dejan secar al aire.

#### 4.2.1.3 Recubrimiento de los discos de nylon con colágeno

Los discos se recubren con colágeno y se exponen a temperatura ambiente a los vapores de hidróxido de amonio por 2 min. Se esterilizan en etanol al 70% por 24 hrs. Para

eliminar el alcohol se lavan 5 veces con amortiguador salino de fosfatos de Dulbecco (PBS, GIBCO 450-1300) esteril. Antes de emplearse se lavan una vez con CDMEM.

#### 4.2.1.4 Siembra de células sobre discos de nylon con colágeno

Los discos se colocan en una multicámara Linbro de 24 pozos (Flow Laboratories Inc., Mc Lean, Vir.), y sobre ellos se siembran las células a confluencia ( $10^6$  células/ml, 1ml/pozo). Después de 60 min de incubación a  $35.6^{\circ}\text{C}$  en atmósfera de aire y 5% de  $\text{CO}_2$  con humedad constante, los discos se transfieren a pozos con medio fresco con el fin de eliminar a aquellas células que no se adhieren al disco. Para los experimentos de temperatura el medio fresco que se utiliza es CDMEM, mientras que para los experimentos de ensamblaje de la unión estrecha se usa el medio esencial mínimo sin  $\text{Ca}^{2+}$  (MEM sin  $\text{Ca}^{2+}$ , GIBCO 410-1300).

#### 4.2.2 Cultivo celular sobre caja de Petri

Se siembran 2 ml de suspensión celular por caja de petri de plástico de  $8\text{ cm}^2$  de área cultivable (Lux 5221, Miles Laboratories, Naperville, Il).

#### 4.2.3 Cultivo celular en botellas de plástico

Se siembran 10 ml de suspensión celular por botella Falcon de 75 cm<sup>2</sup> de área de cultivo (Falcon 3024, Oxnard, Cal.)

#### 4.3 Mediciones eléctricas

Los discos se colocan a manera de diafragma entre dos cámaras de lucita con un volumen cada una de 1 cm<sup>3</sup>. El área del disco que queda expuesta es de 0.69 cm<sup>2+</sup>. La corriente se pasa a través de electrodos de Ag/AgCl colocados a 2 cm de la monocapa. La deflexión en el voltaje que se produce se mide con otro par de electrodos localizados a 1 mm de la membrana.

La contribución del soporte de colágeno, el disco y el medio a la respuesta de voltaje, se sustrae, de tal manera que todos los valores comunicados en esta tesis corresponden exclusivamente a la respuesta de la monocapa.

A un grupo de monocapas se les mide la resistencia en función de la temperatura (de 3 a 37°C). Para ello se utiliza una sonda de implantación tisular (YSI C-8456-00, Cole Palmer, Chicago, Il.) que se introduce directamente a la cámara de lucita y que a su vez se conecta a un termistor de lectura directa (YSI-C8400). Los experimentos de temperatura se realizan en el cuarto frío, el cuarto caliente y el laboratorio, con el fin de que las monocapas, el medio y la cámara se encuentren a la temperatura deseada. Posteriormente se vió que esto no era necesario, ya que la resistencia que se

obtiene con un cambio de temperatura aparece en menos de 2 seg y por tanto refleja inmediata y unicamente la temperatura del CDMEM que se inyecta en la cámara.

#### 4.4 Estudios morfológicos

##### 4.4.1 Crio-fractura

Las réplicas de crio-fractura se obtienen de monocapas sembradas en botellas de 75 cm<sup>2</sup> de área cultivable. Estas monocapas se fijan con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M, por un tiempo mínimo de 30 min. Gradualmente se infiltran con glicerol hasta llegar a una concentración final del 20% en la que permanecen durante 1 hr. En seguida las monocapas se raspan del sustrato y se congelan en freon 22 enfriado a -196 ° con nitrógeno líquido. La crio-fractura se realiza con un aparato Balzers 300 (FL 9496, Balzers Leichenstein) equipado con una bomba turbomolecular a -120 °C y un vacío de  $2 \times 10^{-6}$  mm Hg. Después de la evaporación del platino y el carbón, las réplicas se lavan en hipoclorito de sodio por 24 hrs. Finalmente se enjuagan con agua destilada y se recojen en rejillas cubiertas con Formvar. La observación de las réplicas se hace en un microscopio electrónico Zeiss EM 10 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

#### 4.4.2 Microscopía de transmisión electrónica

Las monocapas sembradas en cajas de petri de 8 cm<sup>2</sup> de área de fijan con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M. Después de 3 lavados con el amortiguador, las muestras se postfijan con tetraóxido de osmio al 1% en la solución amortiguadora con rojo de rutenio (0.5 mg/ml). Paso seguido se deshidratan en series graduales de etanol y se embeben en Epon 812. Los cortes finos se hacen con navaja de diamante y se recogen en rejillas recubiertas con Formvar. Las muestras se tiñen con citrato de plomo y acetato de uranilo. Se examinan en un microscopio electrónico Zeiss EM 10.

#### 4.4.3 Cuantificación de resultados morfométricos

##### 4.4.3.1 Cuantificación de la morfometría de la unión estrecha

A fotografías de las réplicas de crío-fractura ampliadas a 83 000 X se les traza una línea paralela al eje principal de la unión y líneas perpendiculares a esta cada 133 nm. Se cuenta el número de filamentos que intersecta con cada una de estas líneas secundarias y se mide la distancia entre el filamento superior y el inferior, lo que se toma como profundidad de la unión. Un sólo filamento se considera profundidad cero.

Los datos obtenidos se procesan con el programa de distribución normal en una microcomputadora Hewlett-Packard 85C.

4.4.3.2 Análisis de densidad de partículas intramembranales  
(PIM)

A fotografías de réplicas de crio-fractura de membrana plasmática con un aumento de 110 000 X, se les trazan círculos de  $4.52 \text{ cm}^2$  de área ( $0.037 \text{ um}^2$  de membrana) en los que se cuentan en número de PIM. Los círculos se dibujan con el fin de evitar estructuras tales como microvellosidades, zonas de poco contraste o regiones donde el plano de fractura abandona la membrana plasmática. Los resultados se expresan como  $\text{PIM/um}^2 + \text{error standard}$ .

## V RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1 Efecto de la temperatura sobre las uniones estrechas de las células MDCK.

(Los resultados que se presentan en esta sección aparecen publicados en Cereijido y colaboradores, 1983 y en González-Mariscal y colaboradores).

La conductancia eléctrica a través de monocapas de células MDCK disminuye significativamente por el frío (Fig 5.1). Entre 3 °C ( $5.19 \pm 0.24$  mmho.cm<sup>2</sup>) y 37 °C ( $16.03 \pm 0.49$ ) la conductancia cambia en un 306%. Este efecto de la temperatura sobre la permeabilidad de las membranas ha sido previamente observado en otras membranas (Dreyer et al, 1976; Fischbach & Las, 1978; Jahnig \_Bramhall, 1982).

La solución de baño se inyecta a la cámara (1 ml) lo más rápidamente posible por medio de un par de jeringas (50 ml), pero el cambio en conductancia es aun más rápido que el par de segundos que tarda la operación.

Si se toma en cuenta que, además de este tiempo, parte del retraso se debe a la difusión del calor a través de las capas no agitadas de la solución; entonces se verá que el cambio de conductancia constituye un fenómeno sumamente rápido. Dicho cambio es además completamente reversible (Fig 5.2).

figura 5.1

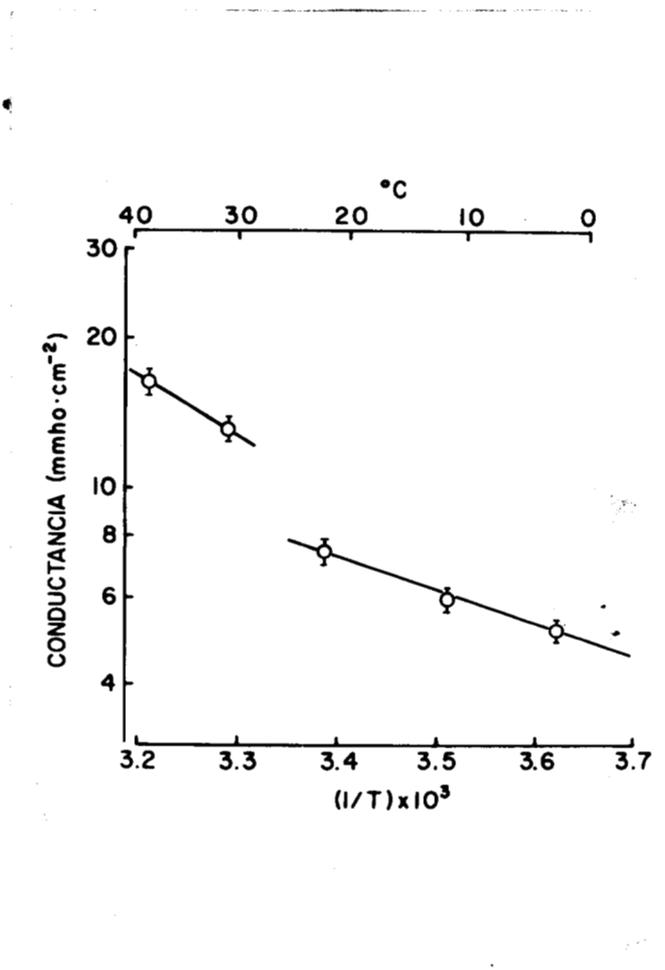


Fig 5.1 Efecto de la temperatura sobre la conductancia eléctrica de monocapas de células MDCK, 24 hrs después de sembradas a confluencia sobre discos de nylon recubiertos por colágeno. La conductancia se calcula con la deflexión en el voltaje producida por una corriente de  $100 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^2$ . La contribución del soporte, la solución y los electrodos se sustraen. Los resultados se expresan como media + error standard. Cada punto es el promedio de 5 a 20 monocapas individuales. Las pendientes de las dos porciones de la curva corresponden a 4.0 y 3.2  $\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

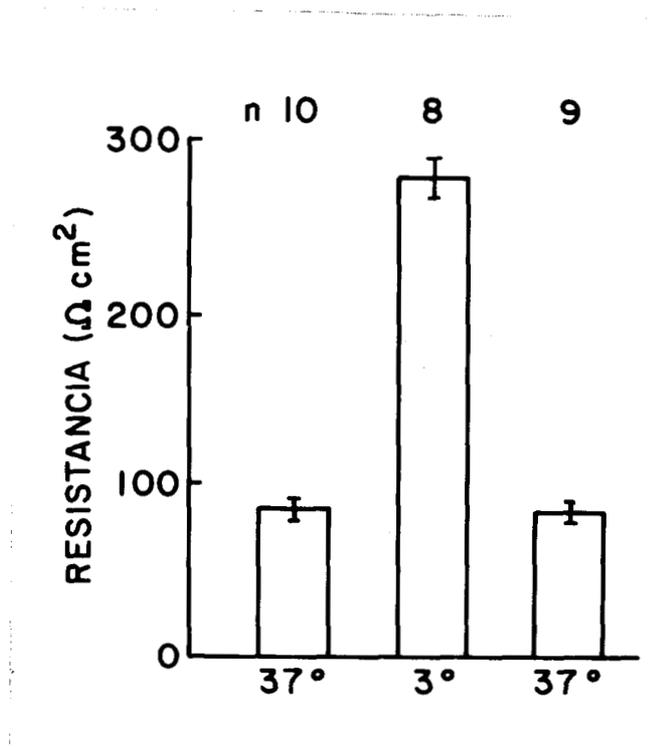


Fig 5.2 Reversibilidad del efecto de la temperatura sobre la resistencia eléctrica a través de monocapas de células NDCK. La población de monocapas se incuba a 37°C; 10 de ellas se toman para la medición eléctrica (los discos se descartan después de las mediciones). Los 17 discos restantes se pasan a CDMEH a 3°C y a 8 de ellos se les mide la resistencia eléctrica. A los 9 últimos discos que han estado a 37 y después a 3°C, nuevamente se los incuba en CDMEH a 37°C y se les mide la resistencia eléctrica.

La gráfica de Arrhenius de los valores de conductancia muestra una discontinuidad y un cambio de pendiente entre los 22 y 31 °C. Este cambio de pendiente generalmente se toma como evidencia de transición de fase de la estructura responsable de la permeabilidad iónica (Dreyer et al, 1976; Anderson et al, 1977; Schwarz, 1979).

De las dos pendientes se calcula la energía de activación de la permeabilidad iónica usando la siguiente ecuación:

$$\ln C = E^*/RT + \ln A \quad (1)$$

donde C es la conductancia eléctrica, E\* la energía de activación, R la constante universal de los gases, T la temperatura absoluta y A la constante de Arrhenius. La ecuación 1 da una energía de activación de 4 Kcal/mol para la rama entre 31 y 37 °C, y de 3.2 para la que se encuentra entre 3 y 22 °C. Energías de activación en este rango corresponden a mecanismos de difusión que no involucran procesos de tipo enzimático bombas, acarreadores etc. (Knifkii et al, 1981; Leech & Stanfield, 1981). Estos resultados concuerdan con la observación de que la translocación iónica a través de monocapas de células MDCK procede por la ruta paracelular (Cereijido et al, 1980) y la permeabilidad a través de esta vía en los epitelios de alta permeabilidad sigue las leyes de la difusión simple (Barry & Diamond, 1971; Barry et al 1971; Wright et al 1971, Moreno & Diamond, 1975).

En la siguiente serie de experimentos se investigó si el cambio de 306% en el grado de permeabilidad de la unión estrecha producido por la temperatura, se refleja en alteraciones de su estructura, estudiada esta en réplicas de frío-fractura.

Las monocapas se fijaron a la más baja (3 °C) y más alta (37 °C) de las temperaturas exploradas eléctricamente. La unión siempre exhibe un eje principal que como ya ha sido demostrado (Cereijido et al, 1978b; Martinez-Palomo et al, 1980) corresponde a la separación de la membrana en las

regiones apical y basolateral (fig 5.3)

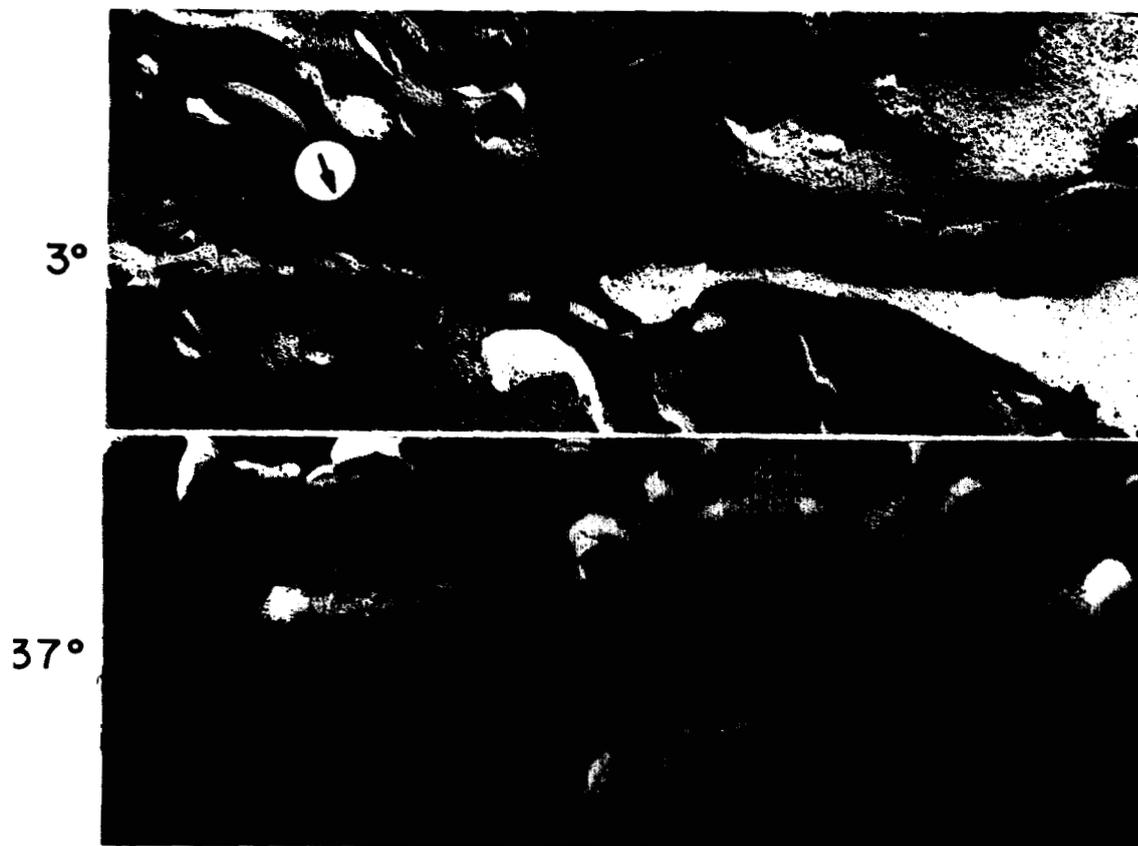


Fig 5.3 Réplicas de crío-fractura de membrana plasmática de monocapas confluentes de células MDCK fijadas a 3 y 37 °C. Los filamentos aparecen como surcos en la cara E y como crestas en la cara P. Nota a) la irregularidad de la red, b) la heterogeneidad en el número de filamentos; varían desde 2 (flecha izquierda a 37 °C) hasta 5 (flecha derecha a 37 °C), y c) algunos filamentos no son continuos sino que parecen como hileras de partículas (flecha a 3 °C). X 40 000.

En el presente estudio para analizar morfométricamente a la unión estrecha, se traza una línea paralela al eje principal de la unión, y a partir de esta se trazan líneas perpendiculares cada 133 nm y se cuenta el número de filamentos que intersectan a dichas líneas (Fig 5.4). La profundidad de la unión esta dada como la distancia entre los filamentos superior e inferior.

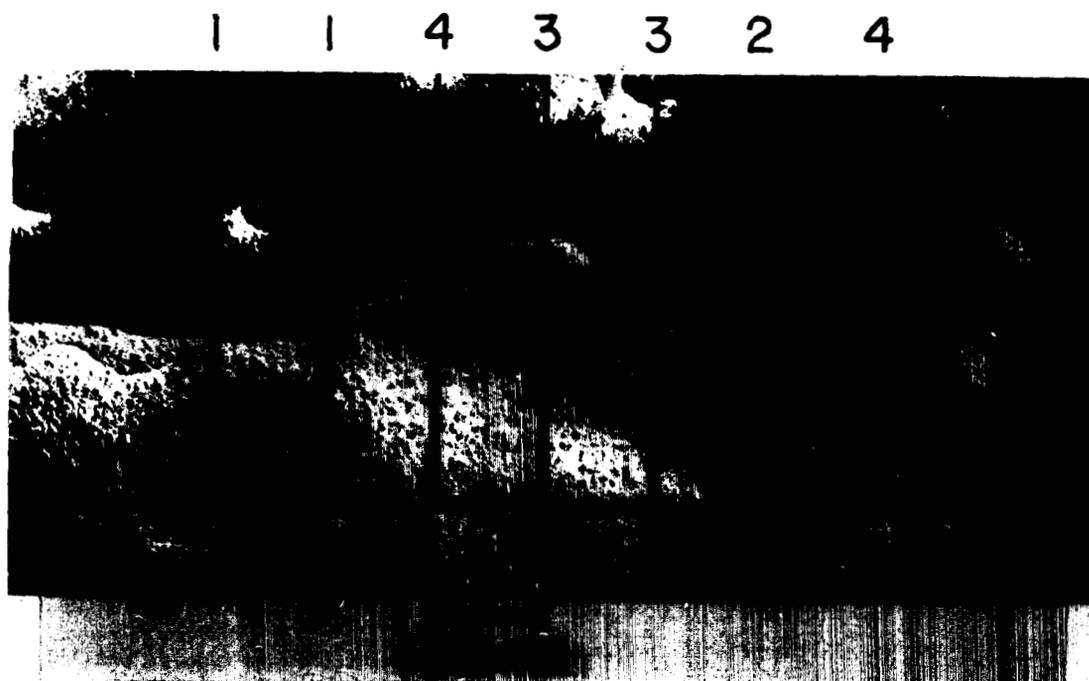


Fig 5.4 Método para evaluar el número de filamentos y la profundidad de la unión estrecha. Se traza una línea paralela al eje principal de la unión y líneas perpendiculares a esta se dibujan cada 133 nm. Se cuenta el número de filamentos que intersecta a cada una de estas líneas (ver parte superior de la figura). La distancia entre los filamentos superior e inferior (flechas) se toma como profundidad de la unión. Un solo filamento se considera profundidad cero.

La tabla 5.1 muestra que estos parámetros no son afectados significativamente por la temperatura. Sin embargo ya que las uniones estrechas en las monocapas de células MDCK tienen un patrón muy irregular, en las figuras 5.5 y 5.6 se compara la distribución del número de filamentos y de la profundidad de la unión a las dos temperaturas exploradas. Las distribuciones no muestran alteraciones significativas que pudieran explicar el cambio de 306% en la resistencia eléctrica transepitelial.

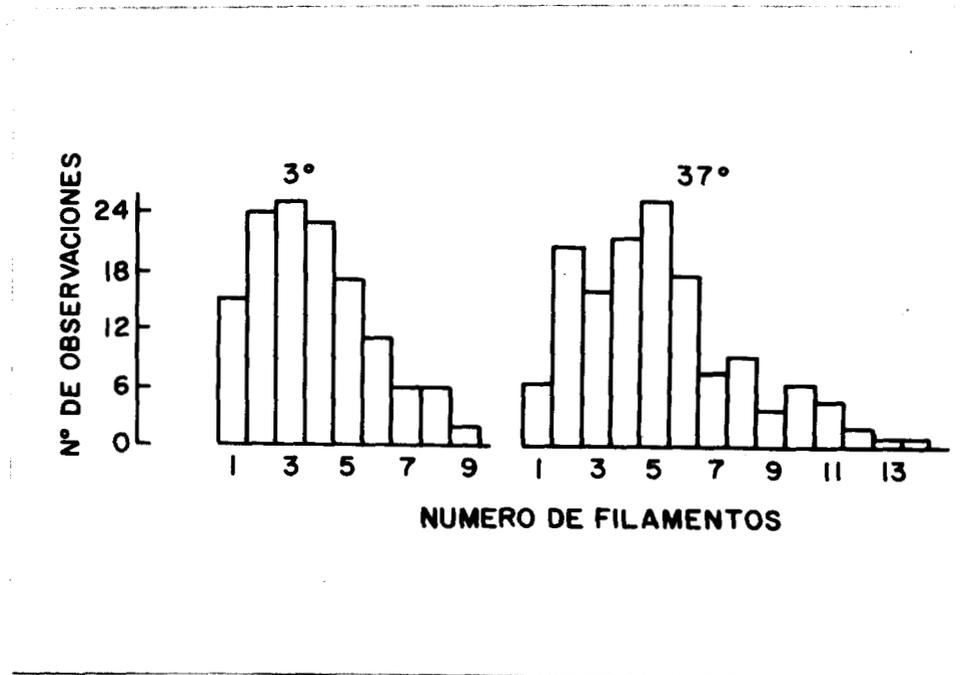


Fig 5.5 Frecuencia de distribución del número de filamentos de la unión estrecha a 3 y 37 °C. Se cuantifica como se describe en la fig 5.4

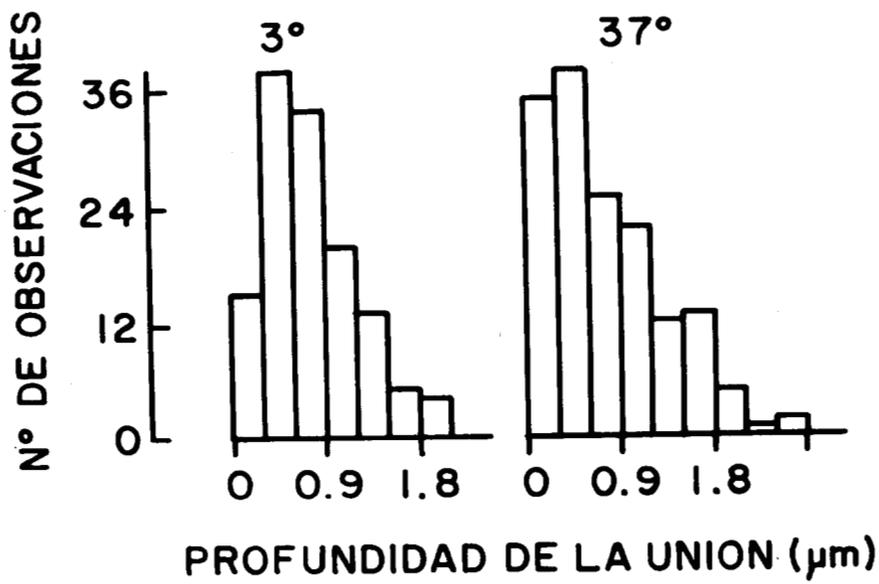


Fig 3.4 Frecuencia de distribución de la profundidad de la banda ocupada por la unión estrecha a 3 y 37 °C. Las mediciones se hacen como se describe en la fig 3.4

TABLA 5.1

Uniones Estrechadas de células MDCK fijadas a 3 y 37 °C

	3 °C		37 °C	
Número de filamentos	4.8	+ 0.2 (129)	5.2	+ 0.2 (153)
Profundidad de la unión (um)*	0.23	+ 0.02 (129)	0.25	+ 0.01 (153)
Densidad de la unión**	18	(129)	21	(153)
Conductancia (mmho/cm <sup>2</sup> )	5.19	+ 0.24 (21)	16.03	+ 0.40 (28)

Los valores se expresan como media+error standard, (número de observaciones).

\* Distancia entre los filamentos superior e inferior.

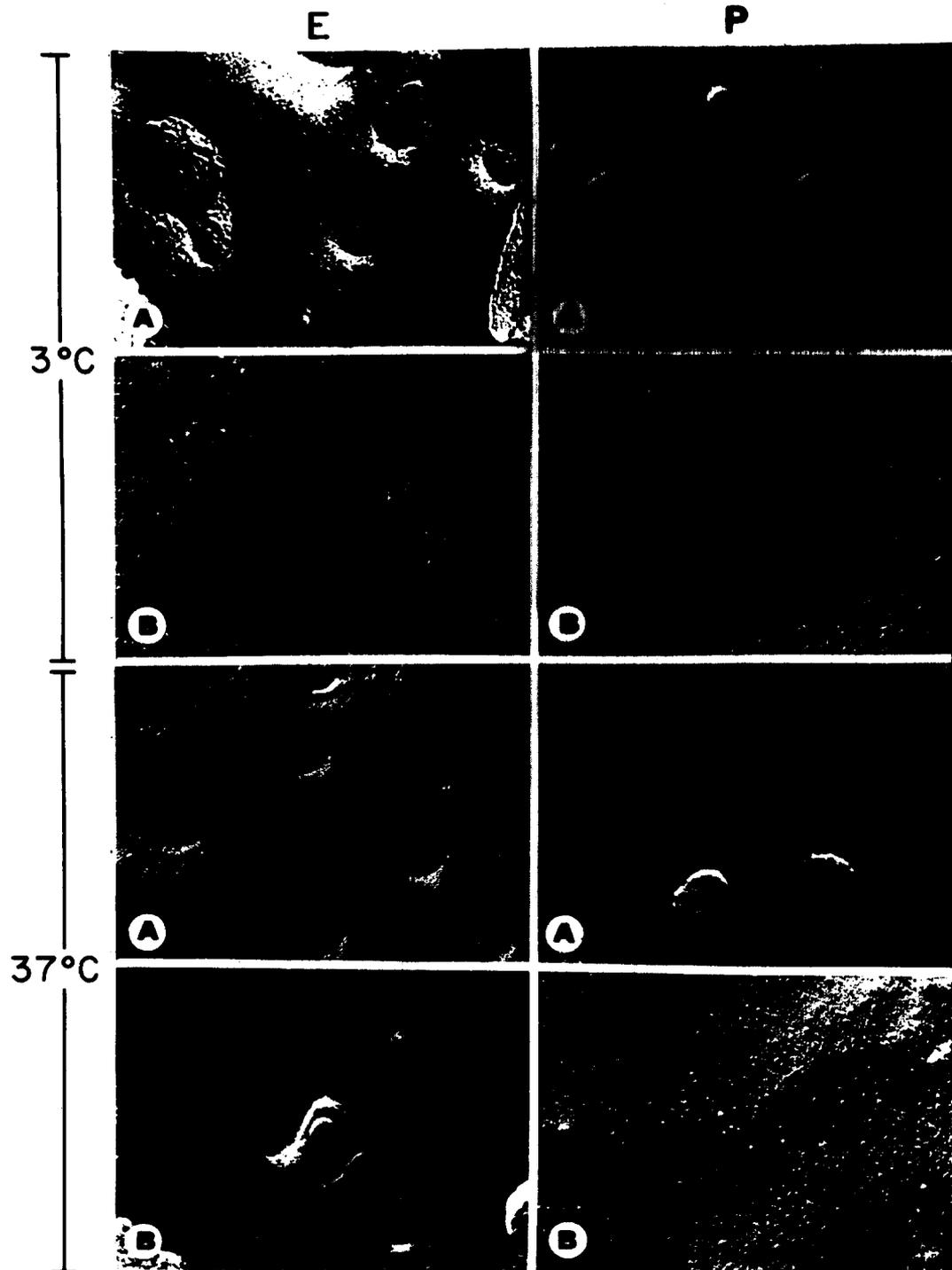
\*\* Número de filamentos dividido entre profundidad de la unión.

La constancia en el patrón de la unión estrecha que se observa aun cuando el grado de oclusión de la misma se modifica por la temperatura, no sugiere que PIM se fusionen y añadan a los filamentos. Sin embargo, la densidad o la distribución polarizada de PIM podría alterarse por la temperatura por alguna otra razón. En el siguiente estudio se comparan las replicas de criofractura de las caras E y P de las regiones

apical y basolateral a 3 y 37 °C (fig 5.7).

---

Fig 5.7 Réplicas de crio-fractura de las caras E y P de las regiones apical (A) y basolateral (B) de la membrana plasmática de las células MDCK incubadas y fijadas a 3 y 37 °C. Notar la diferencia en densidad de PIM entre las distintas regiones y caras.



Con el fin de que la comparación sea válida, las PIM se cuentan en fotografías magnificadas a 110 000 X. Los errores introducidos por microvellosidades o regiones donde el plano de fractura abandona la bicapa lipídica, se minimizan al contar las PIM contenidas en círculos de  $4.5 \text{ cm}^2$  que representan un área de membrana de  $3.7 \times 10^{-8} \text{ m}^2$  (Fig 5.8).



Fig 5.8 Método para evaluar la densidad de PIM en las distintas réplicas de células MDCK. Se trazan círculos de  $4.52 \text{ cm}^2$ , que representan  $0.037 \text{ m}^2$  de membrana sobre fotografías magnificadas a 110 000 X. Los círculos tienen como finalidad evitar estructuras tales como microvellosidades o regiones donde el plano de fractura abandona la membrana plasmática, introduciendo errores considerables en la evaluación del área.

La figura 5.9 resume los resultados obtenidos a 3 °C (barras blancas) y a 37 °C (barras oscuras). A la temperatura cercana a aquella en la que las células normalmente se cultivan (36.5 °C) hay mas PIM en las caras P que en las E, tanto en la región apical como en la basolateral (811+109 vs 800+51 PIM/um<sup>2</sup>). En las caras P la densidad de PIM es mucho mayor en la región basolateral que en la apical (1878+81 vs 1156+74 PIM/um<sup>2</sup>).

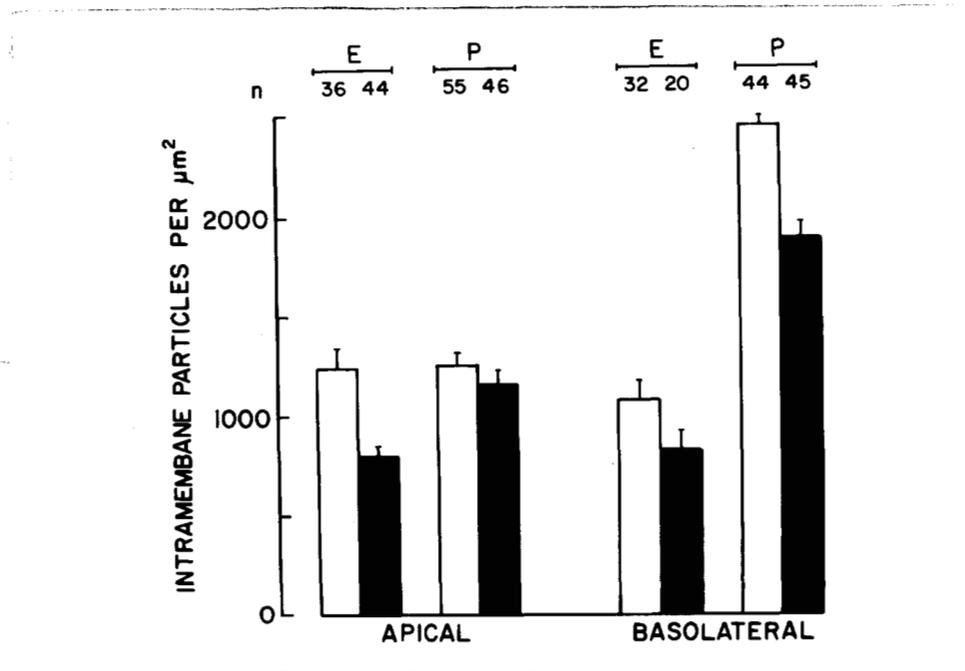


Fig 5.9 Densidad de PIM en la membrana plasmática de células MDCK incubadas y fijadas a 3 (barras claras) y 37 °C (barras oscuras). Notar: a) que la cara P de la región basolateral presenta una mayor densidad de PIM que la cara P de la apical a ambas temperaturas; b) la cara E no parece estar polarizada y, c) el frío tiende a aumentar la densidad de PIM.

El frío produce un aumento significativo en la densidad de PIM en la cara E de la membrana apical ( $p < 0.001$ ), y en la cara P de la membrana basolateral ( $p < 0.001$ ). Con base en estos resultados no es posible definir si el cambio en densidad se debe a inserción de PIM de una poza pre-existente, o a la formación de nuevas PIM como resultado de una transición de fase en el arreglo de las moléculas ya presentes en la membrana.

(Ej. por micelización de la bicapa).

Vistos en conjunto, los resultados presentes indican que la resistencia puede incrementarse en un 306% sin que esto produzca cambios significativos en el patrón de la unión estrecha. Si los filamentos de la unión están constituidos por micelas cilíndricas, estas son mucho más estables a los cambios de temperatura que cualquier otra mesofase lipídica conocida por nosotros. Además resisten cambios de temperatura capaces de provocar una clara transición de fases entre 22 y 31 °C.

#### 5.2 Formación de uniones estrechas en células MDCK.

Las células MDCK obtenidas por tripsinación y sembradas a confluencia sobre discos de nylon recubiertos de colágeno, forman una monocapa continua en una hora aproximadamente. La resistencia eléctrica a través de estas monocapas es despreciable en las primeras 4 horas y después se desarrolla gradualmente hasta alcanzar un valor máximo entre las 15 y 30 horas (Cereijido et al, 1978 a, b; 1981).

La figura 5.10 muestra el desarrollo de la resistencia eléctrica a través de monocapas que después de 60 minutos de sembradas en CDMEM (para facilitar la adhesión a sustrato), se transfieren a MEM sin  $Ca^{2+}$  en el que permanecen por 20 hrs. En este momento que corresponde al punto cero de la abscisa, las monocapas se pasan nuevamente a CDMEM. Los discos en medio sin

$\text{Ca}^{2+}$  no manifiestan resistencia eléctrica, lo cual es de esperarse dada la importancia del  $\text{Ca}^{2+}$  en la capacidad oclusora de la unión estrecha tanto en células MDCK (Cereijido et al 1978b; Martinez-Palomo et al, 1980), como en otras células epiteliales (Forte & Nauss, 1963; Sedar & Forte, 1964; Galli et al, 1976; Pizam & Ripoche, 1976; Meldolesi et al, 1978).

Como puede notarse en la misma figura, al transferir las monocapas a CDMEM la resistencia se desarrolla con una rápida cinética (5-6 hrs); esto puede deberse a que mientras que las células recién sembradas tienen que adherirse al sustrato, alargarse e interdigitarse entre sí, las monocapas que han permanecido por 20 hrs en MEM sin  $\text{Ca}^{2+}$  tienen estos procesos ya terminados. De hecho Rodriguez-Boulan y colaboradores (enviado a publicación) han demostrado que en estas monocapas la inhibición de la síntesis protéica por cicloheximida (6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) no previene en lo absoluto la aparición de la resistencia al adicionar el  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto difiere del comportamiento de monocapas recién tripsinadas, en las cuales tanto la cicloheximida como la puromicina bloquean el desarrollo ulterior de la resistencia transepitelial si se añaden durante las primeras 6 hrs de sembrada la monocapa (Cereijido et al, 1978a; Griebpp et al, 1983).

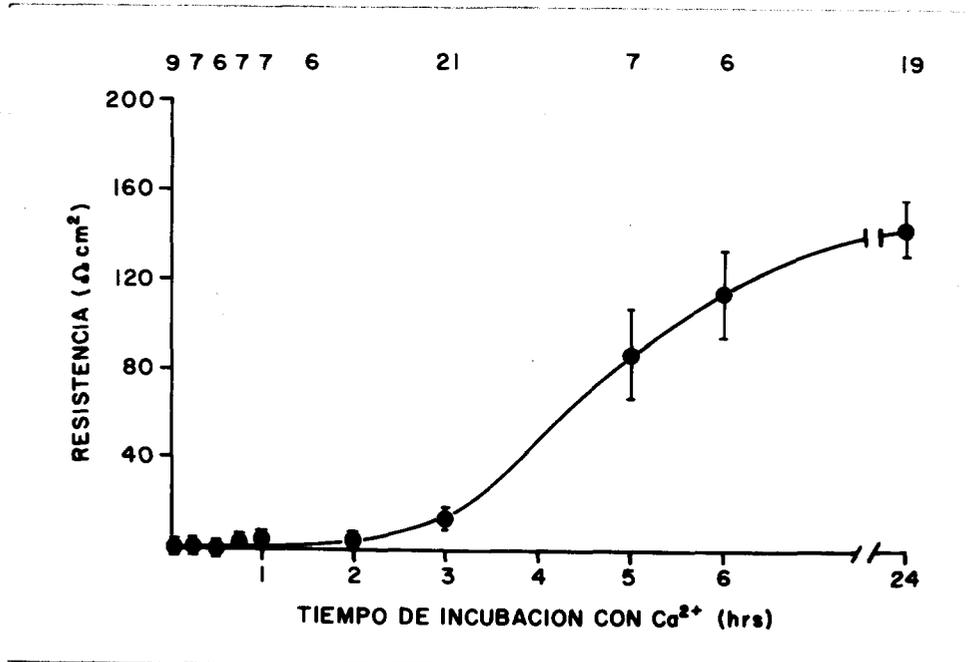


Fig 5.10 Desarrollo de la resistencia eléctrica de monocapa de células MDCK en función del tiempo de incubación en CDMEM. Las células se siembran a confluencia sobre discos de nylon recubiertos con colágeno y a la hora se transfieren del CDMEM al MEM sin  $Ca^{2+}$ . En este último permanecen por 20 hrs. En el tiempo cero de la gráfica que corresponde a las 21 hrs de sembrada la monocapa los discos se transfieren del MEM sin  $Ca^{2+}$  al CDMEM.

La morfología de la monocapa de células MDCK cultivada en CDMEM ha si descrita ampliamente (Leighton et al, 1970; Kaiho, 1977; Misfeldt et al, 1976; Cerejido et al, 1978b; 1980). Entre las principales características estructurales estan: la unión estrecha constituida por una red de filamentos, la distribución polarizada de PIM entre las regiones apical y basolateral, la presencia de microvellosidades en la cara apical y de

desmosomas en las membranas laterales. Como se aprecia en la figura 5.11a las monocapas que han permanecido 20 hrs sin  $Ca^{2+}$  estan interdigitadas entre sí, carecen de desmosomas y de uniones estrechas y presentan microvellosidades en la cara apical. Estas tienden abandonar la región de las uniones intercelulares, hecho que ha sido ya descrito en células mamarias (Fitelka et al, 1983) y en células MDCK (Rodriguez-Boulan et al, enviado a publicación) cultivadas sin  $Ca^{2+}$ . Las células MDCK incubadas bajo estas condiciones son permeables al rojo de rutenio (Fig 5.11a). La relación entre el grado de oclusión de la unión estrecha y la penetración de trazadores de microscopía electrónica como rojo de rutenio, lantano o peroxidasa del rabano al espacio intercelular, ha sido analizada exhaustivamente (Miller, 1960; Farquhar & Palade, 1963; Goodenough & Revel, 1970).

En la figura 5.11b se observa la unión entre dos células que despues de haber permanecido por 20 hrs en MEM sin  $Ca^{2+}$  se transfieren a CDMEM. Se observa la aparición de desmosomas y la clara penetración del rojo rutenio. En la figura 11.5c las células siguiendo el mismo protocolo han permanecido por 6 hrs en CDMEM. Se nota la aparición de unión estrecha (flechas) y que el rojo rutenio no permea al espacio intercelular. En 5.11d las células tienen 24 hrs de incubación en CDMEM y, al igual que en c, el paso del rojo rutenio queda bloqueado por la unión estrecha.

Fig 5. II Cortes finos de monocapas de células MDCK teñidas con rojo rutento. Las monocapas se siembran en CDMEM y a la hora se les cambia el medio por MEM sin  $Ca^{2+}$ , en el permanecen por 28 hrs. Posteriormente se incuban por distintos tiempos en CDMEM. A) Células MDCK incubadas por 20 hrs en MEM sin  $Ca^{2+}$ . El rojo rutento pasa libremente por el espacio intercelular. B) células incubadas por 3 hrs en CDMEM. El rojo rutento marca el espacio intercelular. Nota: la aparición de desmosomas (flecha). C) 6 hrs de incubación en CDMEM. Se aprecian los puntos de fusión de la unión estrecha (flechas). El rojo rutento no penetra al espacio intercelular. d) Células incubadas por 24 hrs en CDMEM. El rojo rutento no permea a través de la unión estrecha (flecha) hacia el espacio intercelular.



La permeabilidad al rojo ruténio de todas las monocapas analizadas se muestra en la figura 5.12. Mientras que a las 3 hrs de incubación en CDMEM el 91% de las monocapas son permeables al trazador, a las 6 hrs solo el 13% de las mismas siguen siendo penetrables. Estos resultados concuerdan plenamente con la respuesta eléctrica de estas monocapas. (Comparar con la fig 5.10).

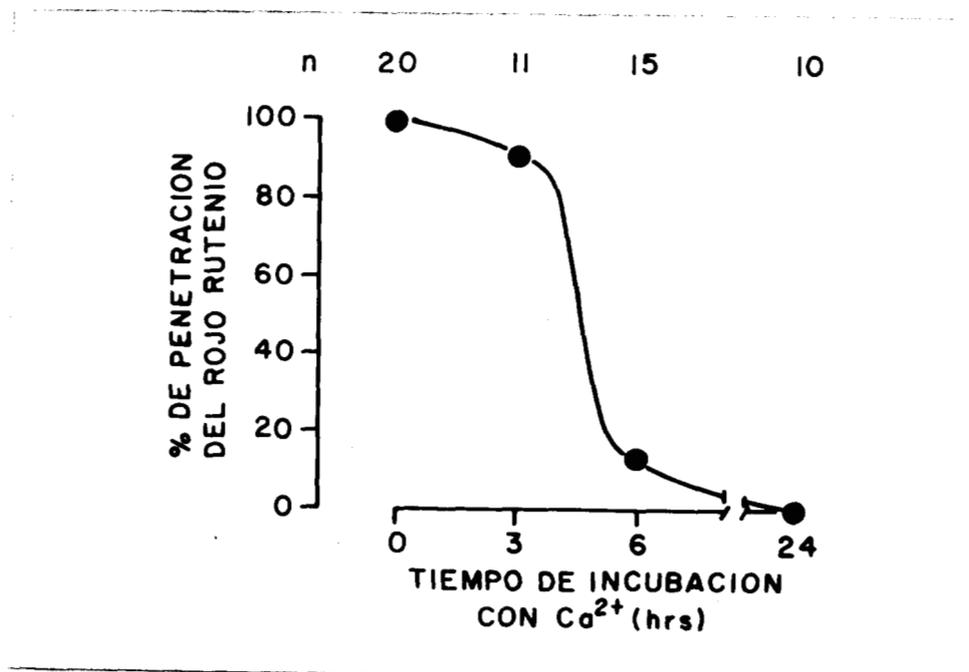


Fig 5.12 Permeabilidad de las monocapas de células MDCK al rojo ruténio. Al igual que en la fig 5.10 el tiempo cero de la gráfica corresponde al momento en que a las monocapas con 20 hrs de incubación en MEM sin Ca<sup>2+</sup> se les cambia a CDMEM. La permeabilidad al trazador se cuantifica observando en los cortes finos la penetración del mismo al espacio intercelular.

Para estudiar el proceso de ensamblaje de los filamentos de la unión estrecha se analizaron las réplicas de crio-fractura de monocapas incubadas por distintos tiempos en

CDMEM. Como se describe en Metodos, despues de fijar la monocapa e infiltrarla con glicerol, se levanta con una navaja de la botella de cultivo. Mientras que las monocapas incubadas por mas de 6 hrs en CDMEM se despegan como tapetes celulares, aquellas sin  $Ca^{2+}$  o incubadas por tiempos cortos en CDMEM (<3 hrs) se desprenden a manera de polvo lo que claramente sugiere que en estas monocapas las células no se encuentran unidas unas con otras.

En las réplicas analizadas de monocapas incubadas por 20 hrs en MEM sin  $Ca^{2+}$  no encontramos uniones estrechas formadas por: a) al menos un filamento continuo, b) con un eje predominante paralelo al borde epitelial y c) separando una zona claramente apical de una basolateral. En cambio obtuvimos: a) nudos de filamentos de unión estrecha entre las microvellosidades de la cara apical (fig 5.13a) y b) filamentos en rosario, es decir, integrados por una hilera de partículas no fusionadas entre sí (fig 5.13b). Estos dos tipos de arreglos no cumplen con la función de barrera al pasaje de iones ya que tanto los resultados eléctricos como la permeabilidad al rojo rutenio muestran su poca funcionalidad. Los nudos y los filamentos en rosario, podrian originarse de: a) remanentes y/o b) sitios donde el  $Ca^{2+}$  por alguna razón alcanza una concentración suficiente para disparar el fenomeno. Nos inclinamos mas bien por la ultima alternativa ya que en células en suspensión recién tripsinadas no hay restos de filamentos. En cambio, las células que se tripsinan y se resuspenden en MEM sin  $Ca^{2+}$  (sin permanecer 60 min en CDMEM

para facilitar su adhesión al sustrato) no presentan restos de filamentos de unión estrecha.

Al agregar el  $\text{Ca}^{2+}$  a estas monocapas se estudia el aspecto de la unión (filamentos en paralelo, cabos sueltos, arreglo en rosario etc.) y se miden los diferentes parámetros morfológicos de la misma (número y proporción de filamentos por banda de unión estrecha, cantidad de unión y profundidad). A los 15 min de adicionarse el  $\text{Ca}^{2+}$  aparecen filamentos lineales frecuentemente únicos y fragmentados (fig 5.13c). Estos filamentos delimitan la región apical la cual distinguimos de la basolateral por las microvellosidades. El ensamblaje de la unión en estas células y bajo estas condiciones difiere sustancialmente de los procesos descritos anteriormente en hígado fetal (Montesano et al, 1975), nefrón fetal humano (Humbert et al, 1976), glándula tiroidea en desarrollo (Luciano et al, 1979), mesotelio peritoneal de ratón fetal (Suzuki & Nagano, 1979) y hepatocitos en cultivo (Montesano, 1980). A diferencia de estos trabajos, en el presente estudio no se observa que las PIM se alineen en áreas libres de PIM para formar una red discontinua que asemeje a un panal de abejas.

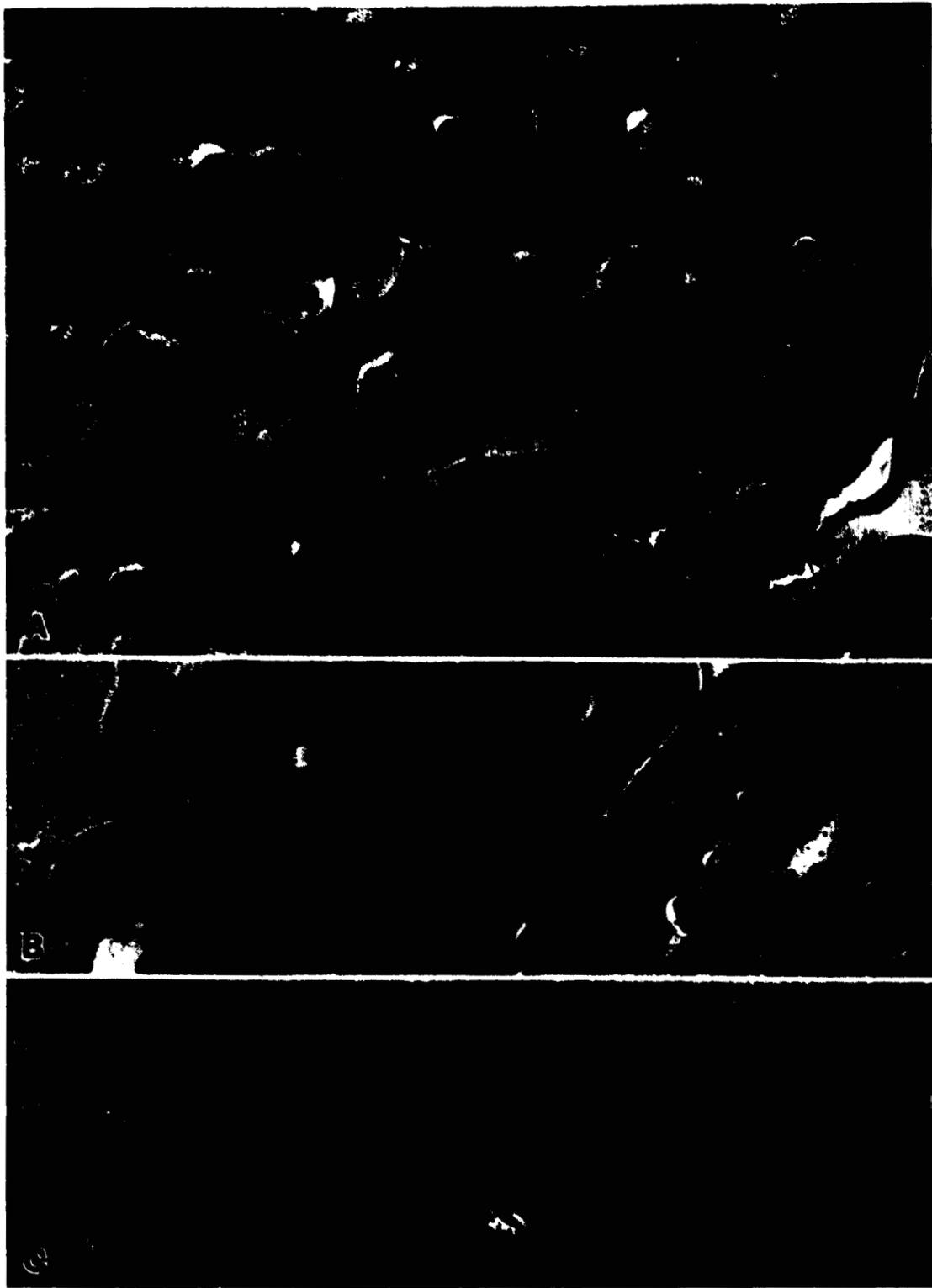
A las 1.5 hrs de incubación en CDMEM (fig 5.13d) se observan bandas de unión estrecha integradas por un mayor número de filamentos que frecuentemente presentan interrupciones (cabezas de flecha). Los cabos sueltos que se encuentran se orientan hacia la región basolateral y crecen desde los filamentos de la unión estrecha sugiriendo así la aposición de algo (PIM?) proveniente de la región basolateral.

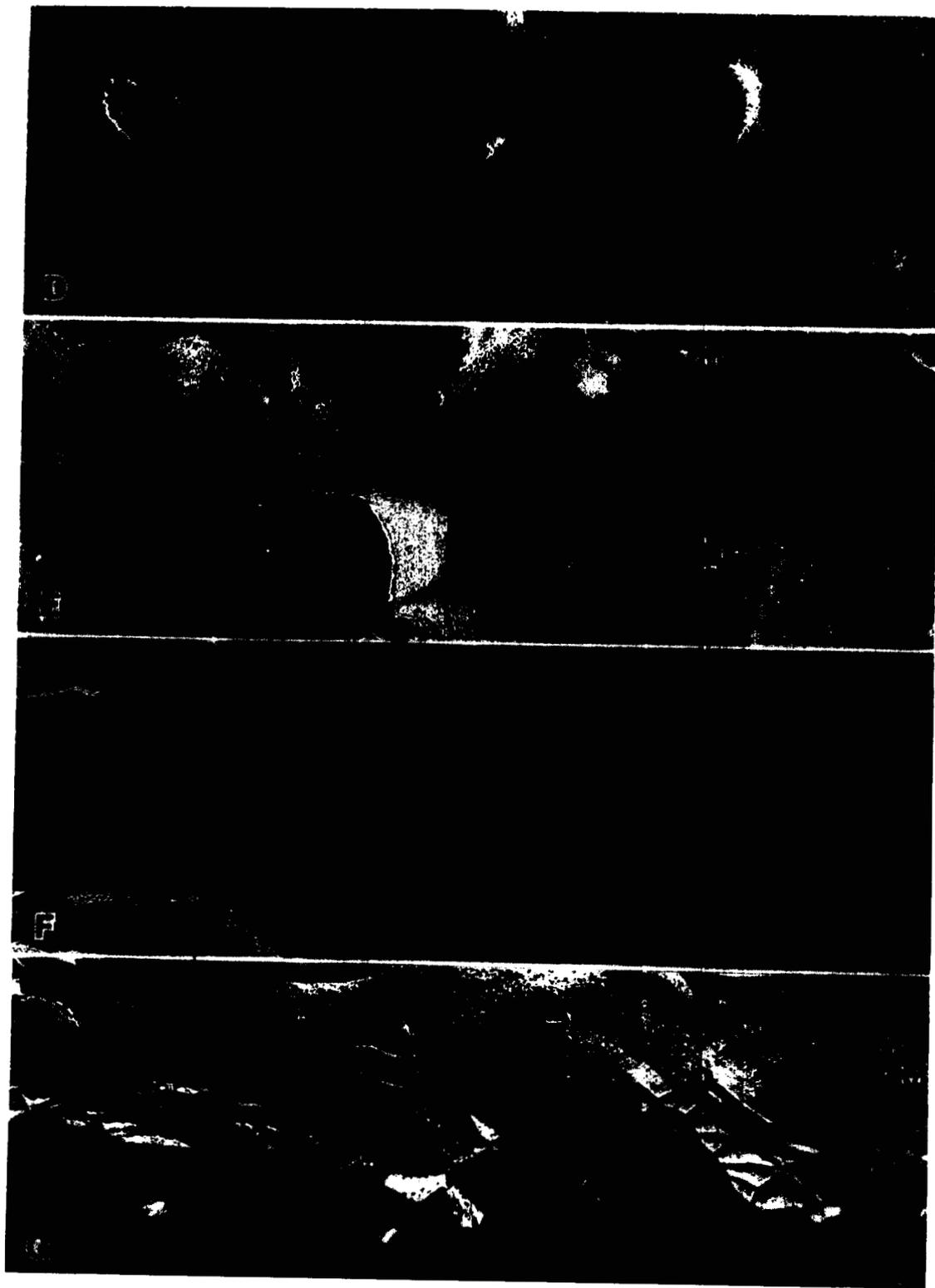
Este ensamblaje in situ de la unión estrecha ante la adición de  $\text{Ca}^{2+}$ , concuerda con los resultados de Meldolesi y colaboradores (1978) y de Hoi Sang y colaboradores (1979).

A las 3 hrs de incubación de las monocapas en CDMEM (fig 5.13d) es frecuente encontrar a los filamentos orientados paralelamente unos con otros y con respecto a la cara apical, ordenamiento que se contrapone definitivamente a la estructura de panal de abeja descrita anteriormente. Las uniones estrechas de células incubadas por 6 hrs en CDMEM son mas profundas y tienen mas filamentos que las correspondientes a tiempos de incubación mas cortos (fig 5.13f). Dichos filamentos pierden linearidad y se vuelven ondulados. Se observan tambien cabos sueltos, que van de la banda de la unión estrecha hacia la cara basolateral. Aparecen uniones comunicantes en la región inmediata inferior a la banda de unión oclusora y, desmosomas ectópicos (desmosomas ubicados en la frontera entre la cara apical y la unión estrecha). Parecería como si los desmosomas, tal y como se muestran en las figs 5.11b y c, se hubiesen formado antes que la unión estrecha, y que al establecerse esta como una barrera funcional aquellos se quedarán atrapados en el borde apical. Si se relaciona la morfología de la unión estrecha con los resultados eléctricos y de permeabilidad al rojo rutenio, se ve que a las 6 hrs la unión estrecha es funcional. Para analizar si la unión ha alcanzado un estado estacionario se incubó a un grupo de monocapas (que han permanecido por 20 hrs en MEM sin  $\text{Ca}^{2+}$ ) en CDMEM por 24 hrs. En la fig 5.13g se observa que la unión

estrecha de dichas monocapas tiene mas entrecruzamientos entre sus filamentos, practicamente carece de cabos sueltos y, los pocos existentes, son pequenos. Desaparecen las uniones comunicantes y se siguen encontrando desmosomas ectópicos. Pareceria que a la unión estrecha de células incubadas por 6 hrs en CDMEM le faltase madurar morfologicamente (mas entrecruzamientos, menos cabos sueltos etc) a pesar de que funcionalmente se comporta como una auténtica barrera a la difusión transepitelial.

Fig 5.13 Réplicas de crío-fractura de monocapas de células MDCK incubadas por distintos tiempos en CDMEM después de haber permanecido por 20 hrs en MEM sin  $Ca^{2+}$ . A) células incubadas por 20 hrs en MEM sin  $Ca^{2+}$ . Se observan nudos de unión estrecha entre las microvellosidades apicales. B) células incubadas por 20 hrs en MEM sin  $Ca^{2+}$ . La unión estrecha consta de un solo filamento fragmentado a manera de rosario. C) 15 min de incubación en CDMEM D) 1.5 hrs de incubación en CDMEM. Notar las interrupciones en los filamentos de la unión (cabexas de flecha) E) 3 hrs de incubación en CDMEM. Observese el paralelismo de los filamentos de la unión. F) 6 hrs de incubación en CDMEM. Las cabexas de flecha señalan los cabos sueltos que van de la red de filamentos hacia la cara basolateral. G) 24 hrs en CDMEM. Observense los desmosomas ectópicos (cabexas de flecha).





Los parámetros morfológicos de las uniones oclusoras de monocapas incubadas por distintos tiempos en  $\text{Ca}^{2+}$  se muestran en la fig 5.14. En la parte superior se presenta la composición de las uniones expresada por la frecuencia con que estas presentan uno, dos o mas filamentos. Claramente se observa como en los primeros momentos las uniones oclusoras son muy simples mientras que a las 6 y 24 hrs el numero de filamentos por unión aumenta, abundando las uniones con 2 o mas (hasta 9) filamentos. Las partes media e inferior de la fig 5.14 muestran como a medida que transcurre el tiempo de incubación en  $\text{Ca}^{2+}$  aumentan tanto la cantidad de material integrante de la unión como la profundidad de la misma.

La distribución polarizada de las PIM entre las regiones apical y basolateral ha sido descrita en varias células epiteliales (De Camilli et al, 1974; Wade et al, 1975). En las células MDCK Hoi Sang y colaboradores (1978) demostraron que el tratamiento de las monocapas con EGTA produce fragmentación de la unión y pérdida de la polaridad de las PIM, efectos revertidos por la adición de  $\text{Ca}^{2+}$ . Rodriguez-Boulan y colaboradores (enviado a publicación) demostraron que las células MDCK incubadas por 20 hrs en MEM sin  $\text{Ca}^{2+}$  no presentan una distribución polarizada de PIM entre las regiones apical y basolateral, aunque la cara P siempre tiene una mayor densidad de partículas que la cara E. Utilizando el metodo que se describe en la fig 5.8 se analiza la distribución de PIM en monocapas que despues de haber permanecido por 20 hrs en MEM sin  $\text{Ca}^{2+}$  se incuban por distintos tiempos en CDMEM.

figura 5.14

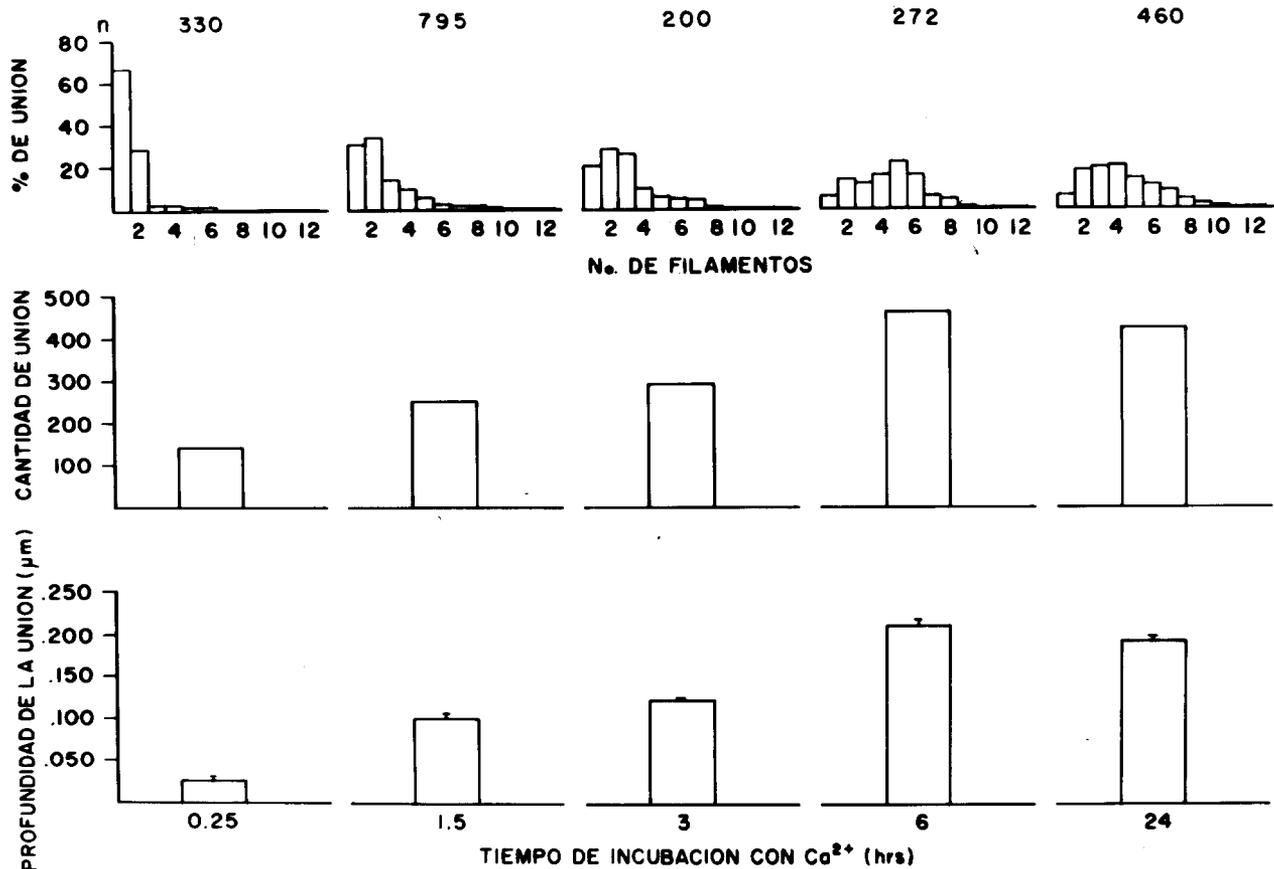


Fig 5.14 Parámetros morfológicos de las uniones ocluseras estudiadas por microscopía electrónica de crio-fractura. Parte superior: composición de la unión expresada por la frecuencia en que estas presentan uno, dos o más filamentos. La altura de cada barra expresa el porcentaje de veces en que una unión esta compuesta por el número de filamentos que figura en el eje de abscisas. Se puede observar que en los primeros momentos las uniones ocluseras son muy simples y en un 65% están constituidas por un solo filamento. El número de filamentos por unión va aumentando hasta que, a las 24 hrs, abundan las uniones con dos o más (hasta nueve) filamentos. Parte media: cantidad de unión estrecha en función del tiempo de incubación en CDMEH. La altura de cada barra expresa la suma de los porcentajes de unión multiplicados por el número respectivo de filamentos que lo integran. Parte inferior: las barras indican la media + error standard de la profundidad de la unión a cada uno de los tiempos explorados.

En la fig 5.15 se observa que en los primeros momentos no existe una distribución polarizada de PIM entre las zonas apical y basolateral mientras que las caras P presentan una mayor densidad de partículas que las caras E. A diferencia de Hoi Sang (1980) que en células recién tripsinadas observo que tan pronto aparece un filamento continuo (10hrs) se establece la distribución polarizada de PIM, en el presente trabajo se vio que la polarización de PIM en las caras P surge hasta la 6<sup>a</sup> hr de incubación en CDMEM, a pesar de que desde los 15 min se encuentran filamentos lineales y continuos. Parece entonces que la polarización de PIM surge hasta que la unión estrecha es funcional. Con respecto a las caras E encontramos que desde la 2<sup>a</sup> hr las PIM en ellas están polarizadas. La razón nos es desconocida.

figura 5.15

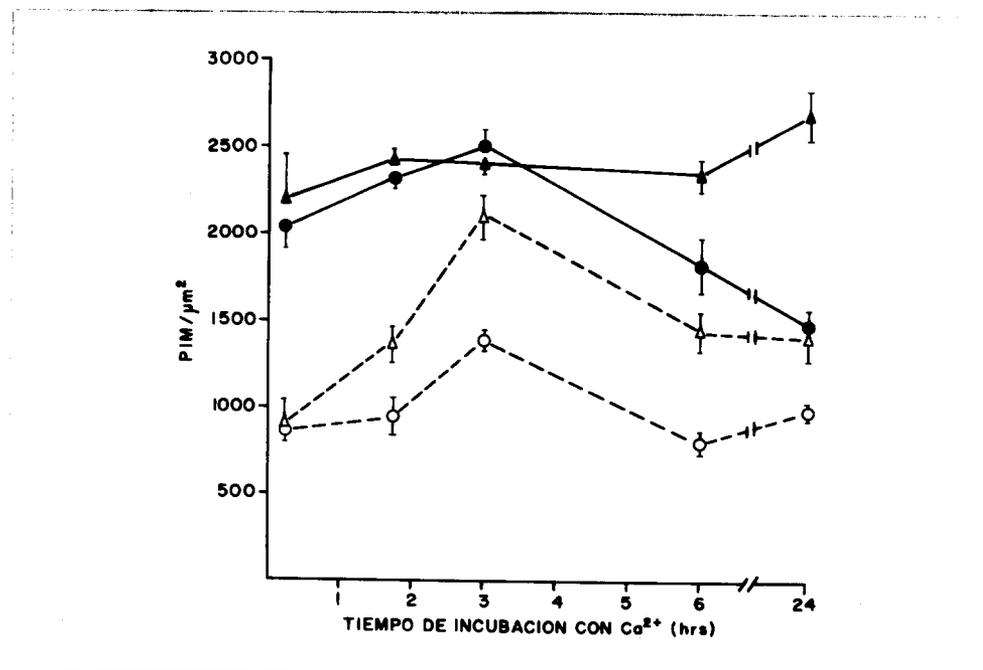


Fig 5.15 Densidad de PIN en la membrana plasmática de células MDCK en función del tiempo de incubación en COMEM. Notar: a) que desde un principio es mayor la densidad de PIN en las caras P que en las E; b) que la polarización entre las regiones apical y basolateral P es significativa hasta la 6<sup>a</sup> hr de incubación en COMEM mientras que, en las caras E la polarización se presenta desde la 2<sup>a</sup> hr. ▲ cara basolateral P, ● cara apical P, △ cara basolateral E, ○ cara apical E.

## VI CONCLUSIONES

Como se menciona en el prólogo, las dos propiedades fundamentales de las membranas epiteliales son: 1) actuar como barreras a la difusión por medio de las uniones estrechas, y 2) estar polarizadas estructural, bioquímica y fisiológicamente. En la actualidad hay dos preguntas que, no obstante ser fundamentales, permanecen en pie. La primera es porqué, cuándo y cómo se establecen las uniones. La segunda es porqué, cuándo y cómo se polarizan las células epiteliales. El desarrollo de las líneas celulares que conservan en condiciones de cultivo las propiedades de los epitelios naturales ha permitido abordar dichas preguntas, las mismas que no se pueden hacer (en rigor: sería muy difícil) a los epitelios naturales.

En esta tesis se investigan aspectos relacionados con el establecimiento y naturaleza química de las uniones estrechas así como su relación con la polaridad epitelial. Se utiliza la línea celular MDCK como sistema epitelial modelo.

Este capítulo reúne las conclusiones a las que conducen los resultados de: 1) resistencia transepitelial, 2) permeabilidad al rojo rutenio, y 3) microscopía electrónica. Los fundamentos de dichas conclusiones se presentan y discuten en detalle en los Capítulos anteriores, de modo que aquí solo se les enumera escuetamente. Pero, cuando por claridad se considera necesario, se incluye junto a cada conclusión la información que conduce a la misma.

### 6.1 Ensamblaje de la unión estrecha

a) Aún cuando las células estén adheridas al sustrato e interdigitadas entre sí formando una monocapa continua, es necesaria la presencia de  $Ca^{2+}$  para que se formen las uniones estrechas.

Esta conclusión se basa en la observación de monocapas incubadas sin  $Ca^{2+}$ , y que por lo tanto que carecen de resistencia eléctrica transepitelial, son permeables al rojo rutenio y se levantan como células aisladas (en lugar de hoja celular) al ser procesadas para microscopía electrónica. Además la crío-fractura de estas monocapas no muestra las uniones estrechas convencionales.

b) El ensamblaje de la unión es aparentemente in situ por aposición de partículas provenientes de la basolateral y sigue los siguientes pasos: 1) formación de filamentos lineales y generalmente únicos que delimitan la región apical de la basolateral; 2) aparición de cabos sueltos, es decir, segmentos cortos de filamentos que van desde un punto cualquiera localizado en plena membrana basolateral y que llegan justamente a la unión estrecha, haciendo anastomosis con uno de sus filamentos; 3) aumento en el número de filamentos y arreglo paralelo de los mismos; 4) pérdida de la linealidad y entrecruzamiento de los filamentos, y 5) disminución sustancial de cabos sueltos. Esta relación entre los cabos sueltos y la cinética de formación de las uniones estrechas, sugiere que dichos cabos son puntos de formación de filamentos oclusores.

## 6.2 Relación estructura-función de la unión estrecha

a) En monocapas con uniones estrechas bien establecidas la resistencia transepitelial no guarda una relación directa con el número y el arreglo de los filamentos de la unión.

Esta conclusión se obtiene al observar que un cambio de temperatura de 3 a 37 °C genera variaciones grandes (306%), rápidas (<2 seg) y reversibles en la resistencia transepitelial mientras que no se detectan modificaciones significativas en la morfología de la unión estrecha.

b) En monocapas con uniones estrechas en formación es necesaria la integración de filamentos y su entrecruzamiento para el desarrollo de una resistencia transepitelial, hecho que además coincide con el bloqueo por parte de la unión estrecha, al paso del rojo rutenio del espacio intercelular.

## 6.3 Naturaleza química de la unión estrecha

Si los filamentos de la unión estrecha están constituidos por largas micelas cilíndricas estas son más estables a los cambios de temperatura que cualquier otra micela conocida hasta ahora por nosotros. Incluso toleran cambios de temperatura capaces de provocar una transición de fases entre 22 y 31 °C.

Esta conclusión surge al analizar la gráfica de Arrhenius y relacionarla con la morfología de la unión a las diferentes temperaturas exploradas.

#### 6.4 Relación entre unión estrecha y polaridad celular

a) La adhesión al sustrato es condición necesaria y suficiente para que las células adquieran un grado considerable de polarización, aun cuando el epitelio carezca de uniones estrechas (Rodríguez-Boulan y colaboradores, 1984 enviado a publicación).

En total acuerdo con dichas observaciones, en esta tesis se demuestra que en monocapas incubadas en MEM sin  $\text{Ca}^{2+}$ , las microvellosidades se encuentran polarizadas.

b) El  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular hace posible la formación de uniones estrechas y el establecimiento de una distribución asimétrica de PIM. Esta polarización coincide temporalmente con la aparición de la resistencia transepitelial, y el establecimiento de uniones estrechas morfológicamente complejas, pero de ninguna manera apoya la noción de que un fenómeno sea la causa del otro .

VII BIBLIOGRAFIA

Alavi, N., Lianos, E.A., Palant, C.E., & Bentzel, C.J. (1983) Induction of epithelial tight junctions by a light chain protein isolated from a patient with Fanconi's syndrome. *Nephron*, 35: 130-135.

Anderson, C.R., Cull-Candy, S.G., & Miledi, R. (1977) Potential dependent transition temperature of the ionic channels induced by glutamate in locust muscle. *Nature*, 268: 663-665.

Augustus, J., Bijman, J., & Van Os, C.H. (1978) Electrical resistance of rabbit submaxillary main duct: A tight epithelium with leaky cell membranes. *J. Membr. Biol.*, 43: 203-226.

Barry, P.M., & Diamond, J.M., (1971) A theory of ion permeation through membranes with fixed neutral sites. *J. Membr. Biol.*, 4: 295-330.

Barry, P.H., Diamond, J.M., & Wright, E.M., (1971) The

mechanism of cation permeation in rabbit gallbladder. J. Membr. Biol., 4: 358-394.

Bentzel, C.J., Hainau, B., Fromm, M., & Hegel, U. (1978). Effect of cationic proteins on tight junctional permeability and morphology in Necturus gallbladder. Kidney Int., 14:750

Bentzel, C.J., Hainau, B., Ho, S., Hui, S.W., Edelman, A., Anagnostopoulos, T., & Benedetti, E.L. (1980) Cytoplasmic regulation of tight junctions permeability: effect of plant cytokinins. Amer. J. Physiol., 239: C75-C89.

Bentzel, C.J., Martinez, M., Hainau, B., Fromm, M., & Hegel, U. (1982) Morphological and physiological factors determining transjunctional fluxes. In: The paracellular pathway. Bradley, S.E., & Purcell, E.F. editors. Josiah Macy Jr. Foundation, New York. 36-56.

Bindslev, N., Tormey M., Pietras R.J., & Wright E.M. (1974) Electrically and osmotically induced changes in permeability and structure of toad urinary bladder. Biochem. Biophys. Acta, 332: 286-297.

Borovjagin, V., Vergara, J., & Mc Intosh, T. (1982) Morphology of intermediate structures in membrane fusion processes and bilayer to hexagonal HII transitions. *Biochem. Biophys. Acta*, 645: 262-269.

Branton, D., Bullivant, S., Gilula, N., Karnovsky, M., Moor, H., Muhlethaler, K., Northcote, D.H., Packer, L., Satir, B., Satir, P., Speth, V., Staehelin, L.A., Steere, R., & Weinstein, R. (1975) Freeze-etching nomenclature. *Science* 190: 54-56.

Bulger, R.E., Lorentz, W.B., Colindres, R.E., & Gottschalk, C.W. (1974) Morphologic changes in rat renal proximal tubules and their junctions with increased intraluminal pressure. *Lab Invest.*, 30(2): 136-144.

Bullivant, S. (1978) The structure of tight junctions. *Ninth International Congress on Electron Microscopy, Toronto*. 3: 659-672.

Bullivant, S. (1982) Tight junction structure and development. In: *The Paracellular pathway*. Bradley, S.E., & Purcell, E.F., editors. Josiah Macy Jr. Foundation, New York. 13-35.

Caldwell, R.B., & McLaughlin, B. (1983) Permeability of retinal pigment epithelial cell junctions in the dystrophic rat retina. *Exp. Eye Res.* 36: 415-427.

Cereijido, M., Ehrenfeld, J., Meza, I., & Martínez-Palomo, A. (1980) Structural and functional membrane polarity in cultured monolayers of MDCK cells. *J. Membr. Biol.*, 52: 147-159.

Cereijido, M., González-Mariscal, L., & Borboa, L. (1983) Occluding junctions and paracellular pathways studied in monolayers of MDCK cells. *J. Exp. Biol.*, 106: 205-215.

Cereijido, M., Meza, I., & Martínez-Palomo, A. (1981) Occluding junctions in cultured epithelial monolayers. *Amer. J. Physiol.*, 240: C96-C102.

Cereijido, M., Robbins, E.S., Dolan, W.J., Rotunno, C. A., & Sabatini, D.D. (1978<sub>a</sub>) Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J. Cell. Biol.*, 77: 853-880.

Cereijido, M., Rotunno, C.A., Robbins, E.S., & Sabatini, D.D.

(1978b) Polarized epithelial membranes procuded in vitro. In: Membrane Transport Processes. Hoffman, J.F. editor. Raven Press, New York. 1: 433-461.

Claude, P. (1978) Morphological factors influencing transpeithelial transepithelial permeability: a model for the resistance of the Zonula Occludens. J. Membr. Biol., 39: 219-232.

Claude, P., & Goodenough, D. (1973) Fracture faces of zonulae occludentes from tight and leaky epithelia. J. Cell Biol., 58: 390-400.

Chalcroft, J.P., & Bullivant, S. (1970) An interpretation of liver cell membrane and junction structure based on observation of freeze-fracture replicas of both sides of the fracture. J. Cell Biol. 47: 49-60.

De Camilli, P., Feluchetti, D., & Meldolesi, J. (1974) Structural difference between luminal and lateral plasmalemma in pancreatic acinar cells. Nature (London), 248: 245-246.

De Vos, R., & Desmet, V., (1981) Morphology of liver cell tight junctions in ethinyl estradiol induced cholestasis. Path. Res Pract., 171: 381-388.

Diamond, J.M., & Harrison, S.C. (1966) The effect of membrane fixed charges on diffusion potentials and streaming potentials. J. Physiol., 183: 37-57.

Dragsten, P.R., Handler, J.S., & Blumenthal, R. (1982) Fluorescent membrane probes and the mechanism of maintenance of cellular asymmetry in epithelia. Fed. Proc. 41: 48-52.

Dreyer, F., Muller, K.D., Peper, K., & Sterz, R. (1976) Temperature dependence of ionic channel properties of ACH-receptors at frog and mouse neuromuscular junctions. Pflug. Arch., 365: R36

Duffey, M., Hainau, B., Ho, S., & Bentzel, C. (1981) Regulation of epithelial tight junction permeability by cyclic AMP. Nature, 294: 451-453.

Easter, D., Wade, J., & Boyer, J. (1983) Structural integrity

of hepatocyte tight junctions. *J. Cell Biol.* 96: 745-749.

Eisenman, G. (1962) Cation selective glass electrodes and their mode of operation. *Biophys. J.* 2: 259-323.

Elias, P.M., & Friend, D.S. (1976) Vitamin A-induced mucous metaplasia. *J. Cell Biol.*, 68: 173-188.

Farquhar, M.G., & Palade, G.E. (1963) Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol.*, 17: 375-412.

Fischbach, G.D., & Lass, Y. (1978) A transition temperature for acetylcholine channel conductance in chick myoballs. *J. Physiol. (London)*, 280: 527-536.

Fischer, a., & Stockenius, W. (1977) Freeze fractured purple membrane parricles: protein content. *Sci.*, 197: 72-74.

Forte, J.G., & Nauss, A.H. (1963) Effects of calcium removal on bullfrog gastric mucosa. *Amer. J. Physiol.*, 205: 631-637.

Friend, D.S., & Gilula, N.B. (1972) Variations in tight junction and gap junctions in mammalian tissues. *J. Cell Biol.*, 53: 758-776.

Fromter, E. (1972) The route of passive ion movement through the epithelium of Necturus gallbladder. *J. Membr. Biol.*, 8: 259-301.

Fromter, E., & Diamond, J. (1972) Route of passive ion permeation in epithelia. *Nat. New Biol.*, 235: 9-14.

Furuya, S., Kumamoto, Y., & Sugiyama, S. (1978) Fine structure and development of sertoli junctions in human testis. *Archiv. Androl.*, 1: 211-219.

Galli, P., Brenna, A., De Camilli, P., & Meldolesi, J. (1976) Extracellular calcium and the organization of tight junctions in pancreatic acinar cells. *Exptl. Cell. Res.*, 99: 178-183.

Gausch, C.R., Hard, W.L., & Smith, T.F. (1966) Characterization of an established line on canine kidney cells (MDCK). *Proc. Soc. Exp. Biol & Med.* 122: 931-935.

González-Mariscal, L., Chavez de Ramirez, B., & Cereñido, M. (1984) The effect of temperature on the occluding junctions of monolayers of epithelioid cells (MDCK). *J. Membr. Biol.*, En prensa.

Goodenough, E.B. & Revel, J.P. (1970) A fine structural analysis of intercellular junctions in the mouse liver. *J. Cell Biol.*, 45: 272-290.

Griep, E.B., Dolan, W.J., Robbins, E.S., & Sabatini, D.D. (1983) Participation of plasma membrane proteins in the formation of tight junctions by cultured epithelial cells. *J. Cell Biol.*, 96: 693-702.

Hertzberg, E.L., Lawrence, T.S., & Gilula, N.B. (1981) Gap junctional communication. *Ann. Rev. Physiol.*, 43: 479-491.

Herzlinger, D.A., Easton, T.G., & Ojakian, G.K. (1982) The MDCK epithelial cell line expresses a cell surface antigen of the kidney distal tubule. *J. Cell Biol.*, 93: 269-277.

Hirokawa, N. (1982) The intramembrane structure of tight

junctions: an experimental analysis of the single-fibril and two-fibril models using the quick-freeze method. J. Ultras. Res., 80: 288-301.

Hoi Sang, U., Saier Jr., M.H., & Ellisman, M.H. (1979) Tight junction formation is closely linked to the polar redistribution of intramembrane particles in aggregating MDCK epithelia. Exp. Cell Res., 122: 384-392.

Hoi sang, U., Saier Jr., M. H., & Ellisman, M.H. (1980) Tight junction formation in the establishment of intramembrane particle polarity in aggregating MDCK cells. Exptl. Cell Res., 128: 223-235.

Hudspeth, A.J. (1975) Establishment of tight junctions between epithelial cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72: 2711-2713.

Hudspeth, A.J. (1982) The recovery of local transepithelial reistance following single-cell lesions. Exp. Cell Res., 138: 331-342.

Humbert, F., Montesano, R., Ferrelet, A., & Orci, E. (1970) Junctions in developing human and rat kidney: a freeze-fracture study. *J. Ultras. Res.*, 56: 202-214.

Jahnig, F., & Bramhall, J. (1982) The origin of a break in arrhenius plots of membrane processes. *Biochem. Biophys. Acta*, 690: 310-313.

Kachar, B., & Pinto da Silva, P. (1981) Rapid massive assembly of tight junction strands. *Science*, 213: 541-544.

Kachar, B., & Reese, T., (1982) Evidence for the lipidic nature of tight junction strands. *Nature*, 296: 64-66.

Kachar, B., & Reese, T., (1983) Formation of misplaced and reflexive tight junction stands in prostate epithelial cells. *J. Ultras. Res.*, 82: 90-95.

Kaiho, M. (1977) Development of junctional complex in cultured cells. *Develop. Growth Different.*, 19: 257-264.

Kerjaschki, D. (1978) Polycation-induced dislocation of slit diaphragms and formation of cell junctions in rat kidney glomeruli. *Lab. Invest.*, 39: 430-440.

Kniffki, R.O., Siemen, D., & Vogel, W. (1981) Development of sodium permeability inactivation in nodal membranes. *J. Physiol.*, 313: 37-48.

Koefoed-Johnson, V., & Ussing, H.H. (1958) The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol. Scand.*, 42: 298-308.

Kuhn, K., & Reale, E. (1975) Junctional complexes of the tubular cells in the human kidney as revealed with freeze-fracture. *Cell Tiss. Res.*, 160: 193-205.

Larson, L. (1975) Ultrastructure and permeability of intercellular contacts of developing proximal tubule in the rat kidney. *J. Ultras. Res.*, 52: 100-113.

Leech, C.A., & Stanfield, P.K. (1981) Inward rectification in frog skeletal muscle fibres and its dependence on membrane potential and external potassium. *J. Physiol.*, 319: 295-309.

Leighton, J., Brada, Z., Estes, L.W., & Justh, G. (1979) Secretory activity and oncogenicity of a cell line derived from canine kidney. *Science*, 158: 472-473.

Leighton, J., Estes, L.W., Mansukhani, S., & Brada Z. (1970) A cell line derived from normal dog kidney (MDCK) exhibiting qualities of papillary adenocarcinoma and of renal tubular epithelium. *Cancer*, 26: 1022-1028.

Lever, J.E. (1979) Regulation of dome formation in differentiated epithelial cell cultures. *J. Supramol. Struct.*, 12: 259-272.

Lewis, B., Gray, G., Coleman, R., & Michell, R. (1975) Differences in the enzymic, polypeptide, glycolipid and phospholipid compositions of plasma membranes from the two surfaces of intestinal epithelial cells. *Biochem. Soc. Transact*, 3: 752-753.

Louvard, D. (1980) Apical membrane aminopeptidase appears at site of cell-cell contact in cultured epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 77: 4132-4136.

Luciano, L., Thiele, J., & Reale, E. (1979) Development of follicles and of occluding junctions between the follicular cells of the thyroid gland. *J. Ultras. Res.*, 66: 164-181.

Luzzati, V., (1968) X ray diffraction studies of lipid-water systems. In: *Biological membranes*. Chapman, D., editor. Academic Press, New York.

Luzzati, V., Husson, F. (1962) The structure of the liquid crystalline phases of lipid water systems. *J. Cell Biol.*, 12: 207-219.

Machen, T.E., Erlij, D., & Wooding, F.B.P. (1972) Permeable junctional complexes. The movement of lanthanum across rabbit gallbladder and intestine. *J. Cell Biol.*, 54: 302-312.

Madara, J. L. (1983) Increases in guinea pig small intestinal transepithelial resistance induced by osmotic loads are accompanied by rapid alterations in absorptive-cell tight-junction structure. *J. Cell Biol.*, 97: 125-136.

Madin, S.H., & Darby Jr., N.B., (1979) ATCC CCL 34, MDCK. As

catalogued in: The American Type Culture Collection.  
Catalogue of strains II. Second Edition. Rockville Maryland.  
30.

Margolis, L., Nayfakh, A., Bergelson, L., & Vasiliev, J.  
(1982) Interaction of solid liposomes with epithelial cells.  
Cell Biol. Int. Rep., 66: 145-157.

Marin, M.L., Gordon, R.E., & Lane, B.P. (1979) Development of  
tight junctions in the rat tracheal epithelium during the early  
hours after mechanical injury. Amer. Rev. Respirat. Dis.,  
119: 101-106.

Martínez-Palomo A., Chavez, B., & González-Robles, A. (1978)  
The freeze-fracture technique: application to the study of  
animal plasma membranes. Ninth International Congress on  
Electron Microscopy, Toronto, 3: 503-515.

Martínez-Palomo, A., Eriij, D. (1975) Structure of tight  
junctions in epithelia with different permeability. Proc.  
Natl. Acad. Sci. USA, 72: 4487-4491.

Martínez-Palomo, A., Meza, I., Beaty, G., & Cereijido, M. (1980) Experimental modulation of occluding junctions in cultured transporting epithelium. *J. Cell Biol.*, 73: 736-745.

McRoberts, J.A., Erlinger, S., Rindler, M.J., & Saier Jr., M.H. (1982) Furosemide-sensitive salt transport in the Madin-Darby canine kidney cell line. Evidence for the cotransport of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , and  $\text{Cl}^-$ . *J. Biol. Chem.*, 257: 2260-2266.

Meldolesi, J., Castiglioni, G., Parma, R., Nassivera, N., & De Camilli, P. (1978)  $\text{Ca}^{++}$  - dependent disassembly and reassembly of occluding junctions in guinea pig pancreatic acinar cells. Effect of drugs. *J. Cell Biol.*, 79: 156-172.

Meza, I., Ibarra, G., Sabanero, M., Martínez-Palomo, A., & Cereijido, M. (1980) Occludin junctions and cytoskeletal components in a cultured transporting epithelium. *J. Cell Biol.*, 87: 746-754.

Miller, F. (1960) Hemoglobin absorption by the cells of the proximal convoluted tubules in mouse kidney. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 8: 689-718.

Misfeldt, D.S., Hamamoto, S.T., & Pitelka, D.K., (1976)  
Transepithelial transport in cell culture. Proc. Natl. Acad.  
Sci. USA, 73: 1212-1216.

Møllgard, K., Malinowska, D.H., & Saunders, N.R. (1976) Lack  
of correlation between tight junction morphology and  
permeability properties in developing choroid plexus. 264:  
293-294.

Montesano, R. (1980) Intramembrane events accompanying  
junction formation in a liver cell line. Anatom. Rec., 198:  
403-414.

Montesano, R., Friend, D.S., Perrelet, A., & Orci, L. (1975)  
In vivo assembly of tight junctions in fetal rat liver. J.  
Cell Biol., 67: 310-319.

Montesano, R., Friend, D.S., Perrelet, A., & Orci, L. (1976)  
In vivo induction of tight junction proliferation in rat liver.  
J. Cell Biol., 68: 793-798.

Moreno, J.H., & Diamond, J.M., (1975) Nitrogenous cations as

probes of permeation channels. *J. Membr. Biol.*, 21:  
197-259.

Morgan, G., & Wooding, F.B.P., (1982) A freeze-fracture study of tight junction structure in sheep mammary gland epithelium during pregnancy and lactation. *J. Dairy Res.*, 49: 1-11.

Muresan, V., & Jamieson, J.D., (1980) Asymmetric distribution of sialo-glycoconjugates on the plasmalemma of pancreatic acinar cells. *Eur. J. Cell. Biol.*, 22: 276

Murphy, C.R., Swift, J.G., Mukherjee, T.M., & Rogers, A.W. (1980) Ovarian hormones alter tight junction structure in uterine luminal epithelial cells. *Micron*, 11: 375-376.

Murphy, C.R., Swift, J.G., Mukherjee, T.M., & Rogers, A.W. (1982a) The structure of tight junctions between uterine luminal epithelial cells at different stages of pregnancy in the rat. *Cell Tiss. Res.*, 223: 281-286.

Murphy, C.R., Swift, J.G., Need, J., Mukherjee, T.M., & Rogers, A.W. (1982b) A freeze-fracture electron microscopic study of

tight junction of epithelial cells in the human uterus. *Anat. Embryol.*, 163: 367-370.

Mutoh, H. (1981) Freeze replica observation of the junction structures in the guinea-pig liver after bile duct ligation and recanalization. *Arch. Histol. Jap.*, 44(4): 345-367.

Ojakian, G.K. (1981) Tumor promoter-induced changes in the permeability of epithelial cell tight junctions. *Cell* 23: 95-103.

Peracchia, C. (1980) Structural correlates of gap junction permeation. *Int. Rev. Cytol.* 66: 81-146.

Pinto da Silva, P., & Kachar, B. (1982) On tight junction structure. *Cell*, 28: 441-450.

Pisam, M., & Ripoche, P. (1976) Redistribution of surface macromolecules in dissociated epithelial cells. *J. Cell Biol.*, 71: 907-920.

Pitelka, D.R., Hamamoto, S.T., Duafala, J.G., & Nemanic, M.K. (1973) Cell contacts in the mouse mammary gland. I Normal gland in postnatal development and the secretory cycle. *J. Cell Biol.*, 56: 797-818.

Pitelka, D.R., & Taggart, B.N. (1983) Mechanical tension induces lateral movement of intramembrane components of the tight junction: studies on mouse mammary cells in culture. *J. Cell Biol.*, 96: 606-612.

Pitelka, D.R., Taggart, B.N., & Hamamoto, S.T. (1983) Effects of extracellular calcium depletion on membrane topography and occluding junctions of mammary epithelial cells in culture. *J. Cell Biol.*, 96: 613-624.

Polak-Charcon, S., & Ben-Shaul, Y. (1979) Degradation of tight junctions in HT29, a human colon adenocarcinoma cell line. *J. Cell Sci.*, 35: 393-402.

Polak-Charcon, S., Shohan, J., & Ben-Shaul, Y. (1978) Junction formation in trypsinized cells of human adenocarcinoma cell line. *Exptl. Cell Biol. Res.*, 116: 1-13.

Porvaznik, M., Johnson, R.G., & Sheridan, J. D. (1979) Tight junction development between cultured hepatoma cells: possible stages in assembly and enhancement with dexamethasone. *J. Supramol. Struct.*, 10: 13-30.

Pumplin, D.W., & Fambrough, D.M., (1983)  $(Na^+ + K^+)$ -ATPase correlated with a major group of intramembrane particles in freeze-fracture replicas of cultured chick myotubules. *J. Cell Biol.*, 97: 1214-1225.

Rawlins, F.A., Gonzalez, E., Perez-Gonzalez, M., & Whitembury, G. (1975) Effect of transtubular osmotic gradients on the paracellular pathway in toad kidney proximal tubule. Electronmicroscopic observations. *Pflug. Arch. Ges. Physiol.*, 353: 287-302.

Reuss, L., & Finn, A.L. (1977) Effects of luminal hyperosmolarity on electrical pathways of Necturus gallbladder. *Amer. J. Physiol.*, 232: C99-C108.

Rindler, M.J., Chuman, L.M., & Saier Jr., M.H. (1977) Hormone responsiveness of an established but differentiated kidney epithelial cell line (MDCK). *Fed. Proc.* 36: 911.

Rindler, M.J., Chuman, L.M., Shaffer, L., & Saier Jr., L.H., (1979) Retention of differentiated properties in an established dog kidney cell line (MDCK). *J. Cell Biol.* 81: 635-648.

Rindler, M.J., McRoberts, J.A., & Saier Jr., M.H. (1982) ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )-cotransport in the Madin Darby canine kidney cell line. Kinetic characterization of the interaction between  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ . *J. Biol. Chem.*, 257: 2254-2259.

Risinger, M.A., & Larsen, W.J. (1981) Endocytosis of cell-cell junctions and spontaneous cell disaggregation in a cultured human ovarian adenocarcinoma (COLO 316) *Tissue & Cell*, 13: 413-430.

Risinger, M.A., & Larsen, E.J. (1983) Interaction of filipin with junctional membrane at different stages of the junction's life history. *Tissue & Cell* 15: 1-15.

Robenek, H., Doldissen, M., & Themann, H. (1980) Morphological changes of tight junctions in the rat liver after chronic administration of N-Nitrosomorpholine (NNM) as revealed by freeze-fracturing. *J. Ultras. Res.* 70: 82-91.

Robenek, H., Themann, H., & Ott, K. (1979) Carbo tetrachloride induced proliferation of tight junctions in the rat liver as revealed by freeze-fracturing. Eur. J. Cell Biol., 20: 62-70.

Rodriguez-Boulan, E. (1983) Membrane biogenesis, enveloped RNA viruses, and epithelial polarity. In: Modern Cell Biology. Alan R Liss, Inc., New York. 1: 119-170.

Rodriguez-Boulan, E., Carejido, M., Borboa, L., Gonzalez-Robles, A., & Beaty, G. (1984) Occluding junctions and membrane polarity in monolayers of epithelioid cells (MDCK kept in Ca-free media. Enviado a publicacion.

Rodriguez-Boulan, E., & Sabatini, D.D. (1978) Asymmetric budding of viruses in epithelial monolayers: a model system for study of epithelial polarity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 5071-5075.

Sasaki, T., Higashi, S., Tachikawa, T., & Yoshiki, S. (1983) Morphology and permeability of junctional complexes in maturing ameloblasts of rat incisors. Acta Anat., 114: 74-83.

Schiller, A., Forssman, W.G., & Taugner, R. (1980) The tight junctions of renal tubules in the cortex of outer medulla. *Cell Tiss. Res.*, 212: 395-413.

Schneeberger, E.E., Walaters, D.V., & Oliver, R.E. (1978) Development of intercellular junctions in the pulmonary epithelium of foetal lamb. *J. Cell. Sci.*, 32: 307-324.

Schwarz, W. (1979) Temperature experiments on nerve and muscle membranes of frogs. Indications for a phase transition. *Pflugers Arch.* 382: 27-34.

Sedar, A.W., & Forte, J.G. (1964) Effects of calcium depletion on tight junctional complex between oxyntic cells of gastric glands. *J. Cell Biol.*, 22: 173-188.

Segrest, J.P., Gulik-Krzywicki, T., & Sardet, C. (1974) Association of the membrane-penetrating polypeptide segment of the human erythrocyte MN-glycoprotein with phospholipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71: 3294-3297.

Seller, M.W., Venkatachalam, M.A., & Cotran, R.B. (1975)

Glomerular epithelium: structural alterations induced by polycations. *Science*, 189: 390-393.

Semenza, G. (1976) Small intestinal disaccharides: Their properties and role as sugar translocators across natural and artificial membranes. *In*: Membrane transport, Enzymes of Biological Membranes. Martonosi, A., editor. Plenum Press. New York, 3: 349.

Sen, A., Williams, W., Brain, A., Dickens, M., & Quinn, P. (1981) Formation of inverted micelles in dispersions of mixed galactolipids. *Nature*, 293 488-490.

Shimono, M., & Clementi, F. (1977) Intercellular junctions of oral epithelium. II Ultrastructural changes in rat buccal epithelium induced by trypsin digestion. *J. Ultras. Res.*, 59: 101-112.

Shimono, M., Nishihara, R., & Yamamura, T. (1981) Intercellular junctions in developing rat submandibulary glands. I Tight junctions. *J. Electron Micros.*, 30: 29-45.

Simmons, N.L. (1981) Ion transport in "tight" epithelia monolayers of MDCK cells. *J. Membr. Biol.*, 59: 105-114.

Smulders, A.P., McD Tormey, J., Wright, E.M. (1972) The effect of osmotically induced water flows on the permeability and ultrastructure of the rabbit gallbladder. *J. Membr. Biol.*, 7: 164-197.

Staehelein, L.A. (1973) Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J. Cell Sci.* 13: 763-786.

Suzuki, F., & Nagano, T. (1979) Morphogenesis of tight junctions in the peritoneal mesothelium of the mouse embryo. *Cell Tiss. Res.*, 198: 247-260.

Swift, J.G., Mukherjee, T.M., & Rowland, R. (1983) Intercellular junctions in hepatocellular carcinoma. *J. Submicrosc. Cytol.* 15: 799-810.

Tadvalkar, G., & Pinto da Silva, P. (1983) In vitro rapid assembly of gap junctions is induced by cytoskeleton

disruptors. J. Cell Biol., 96: 1279-1287.

Talmon, A., & Ben-Shaul, Y. (1979) Tight junctions in dissociated and reaggregated embryonic lung cells. Cell Differentiation: 8: 437-448.

Tice, L. W., Carter, R.L., & Cahill, M.C (1977) Tracer and freeze-fracture observations on developing tight junctions in fetal rat thyroid. Tissue & Cell., 9: 395-417.

Tillack, T.W., & Marchesi, V.T. (1970) Demonstration of the outer surface of freeze-etched red blood cell membranes. J. Cell Biol., 45: 649-

Tillack, T.W., Scott, R.E., & Marchesi, V.T. (1972) The structure of erythrocyte membrane studied by freeze-etching. II Localization of receptors for phytohemagglutinin and influenza virus to the intramembranous particles. J. Exptl. Med., 135: 1209-1227.

Valentich, J.D. (1981) Morphological similarities between the dog kidney cell line MDCK and the mammalian cortical collecting

tubule. Ann. N.Y. Acad. Sci. 372: 384-405.

Van Deurs, B. & Luft, J.H. (1979) Effects of glutaraldehyde fixation on the structure of tight junctions: a quantitative freeze-fracture analysis. J. Ultras. Res., 68: 160-172.

Van Venetie, R., & Verkleij, A.J. (1981) Analysis of the Hexagonal II phase and its relations to lipidic particles and the lamellar phase. A freeze-fracture study. Biochim. Biophys. Acta, 645: 262-269.

Verkleij, A., Van Echteld, C., Gerristen, W., Cullis, P., & De Kriuff, B. (1980) The lipidic particle as an intermediate structure in membrane fusion processes and bilayer to hexagonal HII transitions. Biochem. Biophys. Acta, 645: 262-269.

Wade, J.B., DiScala, V.A., & Karnovsky, M.J. (1975) Membrane structural specialization of the toad bladder revealed by the freeze-fracture technique. I. The granular cells. J. Membr. Biol., 22: 385-402.

Wade, J.B. & Karnovsky, M.J. (1974) Fracture faces of

osmotically disrupted zonulae occludentes. *J. Cell Biol.*, 62:  
344-350.

Wright, E.M., Barry, P.H., & Diamond, J. (1971) The mechanism  
of cation permeation in rabbit gallbladder. *J. Membr. Biol.*,  
4: 331-357.

Wright, E.M., & Diamond, J.M. (1968) Effect of pH and  
polyvalent cations on the selective permeability of gallbladder  
epithelium to monovalent ions. *Biochem. Biophys. Acta*, 163:  
57-74.

Ziomeck, C.A., Schulman, S. & Edidin, M. (1980)  
Redistribution of membrane proteins in isolated mouse  
intestinal cells. *J. Cell Biol.*, 86: 849-857.