

70197

LA UNION OCLUSORA DE
LAS CELULAS EPITELIALES MDCK:
SU IMPORTANCIA EN LA PERMEABI-
LIDAD TRANSEPITELIAL

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

TESIS QUE PRESENTA ALMA LETICIA BORBOA OSUNA
PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

MEXICO, D.F. ABRIL.. DE 1986

70197

LA UNION OCLUSORA DE LAS CELULAS MDCK: SU IMPORTANCIA
EN LA PERMEABILIDAD TRANSEPITELIAL

TESIS QUE PRESENTA ALMA LETICIA BORBOA OSUNA PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL CON AREA DE
CONCENTRACION EN BIOQUIMICA.

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
MEXICO, D.F. ABRIL .. DE 1986

Este trabajo de tesis fué realizado en el Departamento de Fi
siología y Biofísica del Centro de Investigaciones y Estu --
dios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, siendo di
rigida por el Dr. Marcelino Cerejido (tutor) y la Dra. Gra-
ciela Beaty (asesor).

Mis estudios de Maestría, fueron apoyados por una beca de --
postgrado y por el subsidio 002205 PPR4A para el fortaleci--
miento de la Maestría en Biología Experimental del Consejo --
Nacional de Ciencia y Tecnología.

Un sincero agradecimiento al Dr. Marcelino Cereijido, por su paciencia y gran ayuda en la realización de mi trabajo de tesis.

Agradezco la valiosa ayuda del M.C. Arturo González Robles - en la elaboración de las micrografías electrónicas.

Mi más alta estima a la Dra. Graciela Beaty, por su interés en mi formación profesional y su ayuda desinteresada en la - elaboración de este trabajo de tesis.

Agradezco también a todas aquellas personas que de alguna manera me ayudaron en el desarrollo de este trabajo.

Esta tesis contó con la eficaz y amable asistencia técnica - de los señores M.C. Amparo Lázaro, Roberto Carmona y Raúl -- Guevara.

Dedico este trabajo con todo mi amor a mi esposo y mi hijo,
ambos de nombre Constantino.

P R O L O G O

En epitelios, como la piel de anfibio y la vesícula biliar de vertebrados, el transporte neto de sustancias es consecuencia de dos propiedades principales:

- i) Las células epiteliales se contactan unas con otras para formar uniones oclusoras, las cuales confieren a la capa celular el papel de -- una barrera de permeabilidad efectiva, y,
- ii) Dichas células están polarizadas, esto es, canales, acarreadores, -- bombas y receptores hormonales presentes en la membrana basolateral, son diferentes a los encontrados en la membrana apical.

Estas propiedades han sido observadas en monocapas de células MDCK (línea celular epitelial de riñón de perro). Esta monocapa se parece a un epitelio permeable, ya que la mayor parte del flujo trans--epitelial procede por la vía paracelular, cuya ruta principal es a través de las uniones oclusoras.

El objetivo de este trabajo es, estudiar la cinética de -- formación de la unión oclusora y su importancia en la polarización de -- las células; así como, la influencia del número de células por área y -- de la edad de la monocapa, en la permeabilidad transepitelial. Para esto, se trabaja con monocapas de células epiteliales MDCK. Las células -- se despegan unas de otras y del sustrato con una mezcla de tripsina- -- EDTA, se vuelven a sembrar como células aisladas y se sigue el desarrollo de la unión oclusora por medición de su resistencia transepitelial. La organización de esta tesis es la siguiente: en el capítulo I se hace una revisión de los conocimientos actuales sobre los epitelios, sus rutas de permeabilidad y su polaridad. Los capítulos II y III están más -- focalizados hacia las uniones oclusoras, pues tal como se detalla en el capítulo IV (Objetivos), son el centro de nuestro estudio. El capítulo V detalla los materiales y métodos empleados y el capítulo VI 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 se resumen en el capítulo VII. El capítulo VIII muestra -- la bibliografía revisada. Nuestros resultados muestran que la ruta paracelular es la que determina el curso temporal de la resistencia y, que -- no existe correlación aparente entre el número de filamentos o la profundidad de la unión oclusora y la densidad celular de la monocapa en -- la permeabilidad de esta ruta, aunque es posible modular la resistencia transepitelial modificando la densidad de siembra.

C O N T E N I D O

	Página
I.- EPITELIOS	
1.1 Que son las membranas epiteliales.	2
1.2 Permeabilidad de las membranas epiteliales.	3
II.- LA UNION OCLUSORA	
2.1 Morfología	18
2.2 Formación de la unión oclusora.	22
2.3 Cambios estructurales y funcionales de la unión oclusora.	25
2.4 Los cationes divalentes y la unión oclusora	27
III.- POLARIDAD	
3.1 Polaridad de las membranas epiteliales.	32
3.1.1 Asimetría Molecular	32
3.1.2 Asimetría Anatómica	32
3.1.3 Asimetría Funcional	33
3.1.4 Asimetría Farmacológica	34
3.1.5 Asimetría Bioquímica	35
3.2 La polaridad y la unión oclusora	35
IV.- FOCALIZACION DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS DE LA TESIS	
4.1 Presentación del problema	40
4.2 Ventajas de las células epiteliales en cultivo	41
4.3 Características morfológicas y funcionales - de la línea celular epitelial MDCK (Madin - and Darby Canine Kidney)	42
4.4 Objetivos	48

V.- MATERIAL Y METODOS	
5.1 Cultivo celular	54
5.2 Cultivo de monocapas con fines experimentales sobre discos de nylon recubiertos con colágena	54
5.2.1 Preparación de la colágena	55
5.2.2 Preparación de los discos de nylon	55
5.2.3 Preparación de los discos de nylon -- con colágena	55
5.2.4 Siembra de células sobre discos de <u>ny</u> lon cubiertos con colágena	56
5.3 Cultivo celular sobre caja de Petri	56
5.4 Cultivo celular en botellas de plástico	56
5.5 Mediciones eléctricas	57
5.5.1 Medición y cálculo de la resistencia de la monocapa	57
5.5.2 Medición del potencial de dilución. Cálculo del cociente de permeabilidad sodio-cloro	58
5.5.3 Medidas eléctricas con microelectro-- dos	60
5.6 Estudios morfológicos	62
5.6.1 Crio-fractura	62
5.6.2 Microscopía electrónica de transmi -- sión	63
5.6.3 Cuantificación de la morfometría de - la unión oclusora.	63
5.6.4 Análisis de la densidad de partículas intramembranales (PIM)	64
VI.- RESULTADOS Y DISCUSION	
6.1 El desarrollo de la resistencia	65
6.2 Papel del calcio en el mantenimiento de la	70

unión oclusora.	
6.3 Papel del suero en el sellado de la unión por calcio	75
6.4 Papel del calcio en la síntesis de los componentes protéicos de la unión oclusora	78
6.5 Papel del calcio en la estructura de la unión oclusora y la polaridad celular epitelial	79
6.6 Permeabilidad de la monocapa con la edad y número de células.	85
6.7 Relación entre estructura y función de la -- unión oclusora.	90
VII.- CONCLUSIONES	
7.1 Desarrollo de un protocolo experimental apto para diseccionar el proceso de ensamblaje de la unión oclusora de otros procesos celulares simultáneos.	96
7.2 Desarrollo de la unión oclusora desde el punto de vista funcional y estructural.	96
7.3 Evolución de la unión oclusora con la edad de la monocapa.	97
VIII.- BIBLIOGRAFIA	99

CAPITULO I: EPITELIOS

1.1 Qué son las membranas epiteliales

1.2 Permeabilidad de las membranas epiteliales

I EPITELIOS

1.1 Qué son las Membranas Epiteliales

El intercambio de sustancias entre las células y la solución extracelular se lleva a cabo a través de la membrana celular; en cambio, el intercambio de sustancias entre los organismos superiores y el medio, toma lugar a nivel de las membranas epiteliales, constituidas por una o más capas de células. La mucosa intestinal, los túbulos renales, la vesícula biliar y la piel de rana son ejemplos de membranas epiteliales; éstos son tejidos cuya función es, no solamente la de ser continentes de los líquidos que se producen en los organismos vivos (sangre, bilis, orina, humor acuoso, lágrimas, sudor, etc.) sino además, y fundamentalmente, la de regular la composición de esos líquidos, por lo que las células epiteliales, además de controlar su propia composición citoplásmica mediante bombas, acarreadores, canales, etc. como lo hace cualquier otra célula del organismo, también regulan la del compartimiento que limitan, puesto que estos líquidos tienen una composición distinta a la del medio interno.

Para cumplir estas funciones es necesario:

- a). Que las células estén selladas entre sí mediante las llamadas uniones oclusoras, que constituyen una barrera a la libre difusión de sustancias, y
- b). Que las células estén polarizadas, es decir, que las bombas, acarreadores, canales, etc. presentes en la membrana apical sean diferentes a las de la basolateral; lo cual permite el transporte vectorial neto de sustancias.

Como ya se mencionó, las membranas epiteliales son asimétricas, es decir, en un dominio pueden ser permeables a ciertos iones e impermeable en el lado opuesto. La asimetría del tejido es el resultado de la asimetría individual de las células; éstas son, en primer lugar, anatónicamente asimétricas. Así, organelos como el núcleo, el complejo de Golgi, -- las mitocondrias, etc. están generalmente distribuidos en un polo definido de la célula epitelial. También funcionalmente asimétricas: la membrana luminal es muy permeable a sodio e impermeable a potasio, en tanto la contraluminal tiene las -- propiedades de permeabilidad contrarias. Desde el punto de -- vista bioquímico la asimetría se manifiesta por la presencia de verdaderas enzimas marcadoras de dominio como la alfa ami no leucino peptidasa para la cara apical y la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ --- ATPasa para la basolateral. La polarización se manifiesta -- desde el punto de vista estructural por la distribución asimétrica de partículas intramembranales en el dominio apical y basolateral y entre las caras P y E y, por la ubicación de los distintos tipos de unión.

1.2 Permeabilidad de las Membranas Epiteliales

En los años 50 el estudio de los mecanismos de transporte en epitelios fué transformado por los aportes del fisiólogo danés H.H. Ussing (Ussing 1949; Ussing y Zerahn 1951; Koefoed-Johnsen, Ussing y Zerahn 1952; Koefoed-Johnsen y Ussing - 1953; Andersen y Ussing 1957; Koefoed-Johnsen y Ussing 1958; - Ussing y col. 1960) y colaboradores, quienes desarrollaron muevos métodos, tales como la medida de corriente de corto circuito y flujos de trazadores con doble marca, para la identificación de iones transportados activamente por el epitelio.

La suposición tácita del modelo de Ussing y col. -- (1960), es que la ruta fundamental de los iones a través del - epitelio es por las dos membranas de la célula epitelial. Sin embargo, si bien algunas preparaciones como la piel de rana o la vejiga urinaria del sapo, proveían resultados de acuerdo -- con dicho modelo, otros epitelios como la vesícula y el riñón, no se comportaban según las predicciones de la teoría (Diamond 1962, a, b y c; Fromter, Muller y Wick 1971).

Más aún, ciertos estudios en piel de rana y vejiga - urinaria, fallaron en confirmar muchas de las predicciones del modelo (Frazier 1962; Cereijido y Curran 1965; Cereijido y Rotunno 1968; Finn 1974).

Y, es que los distintos epitelios tienen, en efecto, muy diversas propiedades. Los voltajes medidos a circuito -- abierto, oscilan desde 0 mv (vesícula) a 100 mv (piel de rana);

las resistencias eléctricas cubren una gama desde 5 Ohm Cm^2 - (túbulo proximal del riñón) a 3000 Ohm Cm^2 (vejiga de mamíferos); algunos epitelios tienen una permeabilidad pasiva simétrica en tanto otros son asimétricos; algunos como la piel de rana, mantienen abruptos gradientes de concentración entre -- las dos soluciones que separan, en tanto otros, como el túbulo proximal del riñón sólo separan pequeños gradientes; algunos, como la glándula salina de los pájaros marinos, transportan fluidos hipertónicos; en tanto otros, como la vesícula y el intestino, transportan fluidos isotónicos (Keynes 1969).

Durante los años 60 comenzaron a acumularse bastantes evidencias indirectas, apoyando la idea que las diferencias entre los distintos epitelios, podría deberse al grado -- de permeabilidad de sus uniones ocluseras, las cuales forman parte del complejo de unión que mantiene unidas a las células epiteliales entre sí (éstas se estudiarán en un capítulo posterior).

La función de las uniones ocluseras, fué objeto de mucha especulación acerca de si son herméticas, o sea, que no dejan pasar sustancias o si son permeables, porque permiten -- el intercambio de materia entre el medio interno y el externo.

Los estudios de microscopía electrónica de transmisión, demostraron que las uniones son impermeables a grandes moléculas como, hemoglobina (Miller 1960; Farquhar y Palade -- 1963), ferritina (McNutt y Weinstein 1970) y lantano coloidal (Goodenough y Revel 1970).

Otros estudios fueron llevados a cabo por Fromter, Muller y Wick (1971) en riñón de rata, Barry, Diamond y Wri--

ght (1971) en vesícula biliar, Clarkson (1967) en intestino - de rata, Blum y col. (1971) en mucosa gástrica de Necturus y Bentzel, Parsa y Hare (1969) en túbulo proximal de Necturus, los cuales concluyeron que una cantidad significativa de H_2O y iones no atraviesan las células.

Sin embargo, un gran número de observaciones sugi— rieron que estas uniones pueden ser permeables a los iones: - La primer evidencia tentativa fué obtenida por Lundberg (1957) en la glándula sublingual del gato y por Ussing y Windhager - (1964) en piel de rana. Más tarde, Windhager, Boulpaep y Giebish (1967), Hoshi y Sakai (1967) y Boulpaep y Seely (1971), mostraron que en riñón de Necturus y Salamandra la conductan— cia del epitelio tubular proximal fué más alta que la conduc— tancia de las células de la pared peritubular.

A pesar de estas evidencias indirectas para la exis tencia de una ruta no transcelular, todavía se especuló si la vía paracelular podría ubicarse entre las uniones oclusoras.

Así, en principio, los solutos tienen dos rutas pa— ra atravesar el epitelio: la transcelular, que implica atrave— sar las dos membranas de las células epiteliales (luminal y - basolateral) y la paracelular, que no atraviesa a las células, (fig. 1.1).

La evidencia concluyente sobre el predominio de una ruta paracelular, surgió con los trabajos de Fromter (1972) y Fromter y Diamond (1972) en vesícula biliar de Necturus; ésta presenta la ventaja de tener una sola capa de células, planas, sin vellosidades, ni invaginaciones o criptas y consiste de - un solo tipo de células, lo cual simplifica el análisis de ca

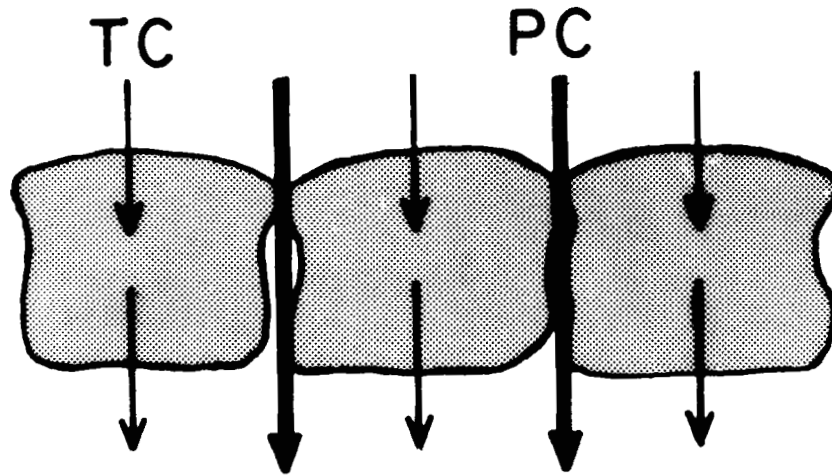


Fig. 1.1 Diagrama esquemático de un epitelio simple que muestra las vías transcelular y paracelular para el flujo de corriente transepitelial (Claude 1978).

ble; las células pueden ser vistas a través del estereomicroscopio y se pueden fijar fácilmente con los microelectrodos. - Sus objetivos fueron los siguientes:

- 1.- Determinar si la corriente que fluye a través del epitelio de la vesícula biliar es uniforme o si hay vías discretas de alta conductancia por las cuales los iones se desvíen;
- 2.- Determinar la conductancia de estas vías, cuantitativamente, y estimar qué parte de la corriente transepitelial total, fluye a través de la ruta paracelular y cuál la transcelular, y;
- 3.- Determinar la localización de la vía paracelular.

Los dos tipos de experimentos llevados a cabo fueron:

- 1.- Análisis de cable: la fig. 1.2 esquematiza el circuito -- equivalente más simple, que describe las resistencias --- transversas de la vesícula de Necturus y la localización - de los electrodos de registro. Pasando corriente desde el lado luminal (A), hacia el intersticial (B) se registra la caída de voltaje con los electrodos A y B. De este modo se obtiene la resistencia transepitelial (R_t)

$$\frac{1}{R_t} = \frac{1}{R_s} + \frac{1}{R_l + R_b}$$

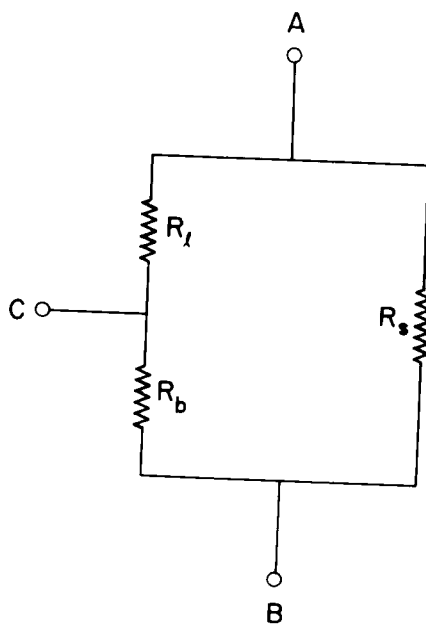


Fig. 1.2 Circuito equivalente para las resistencias transversas de la vesícula de Necturus. R_l = resistencia de la membrana luminal; R_b = resistencia de la membrana basolateral; R_s = resistencia de la unión oclusora y del espacio intercelular; A = electrodo colocado en la solución luminal; B = electrodo colocado en la solución basal; C = electrodo insertado en la célula epitelial. (Fromter y Diamond 1972).

A continuación se inserta el microelectrodo C en -- una célula epitelial; pasando corriente desde el lado luminal (A), hacia el intersticial (B), se registra la caída de potencial V_1 a través de la membrana luminal (entre los electro-- dos A y C), y la caída de potencial V_b a través de la membrana basal (entre los electrodos C y B). La relación entre voltajes es igual a la relación entre las resistencias R_1 y R_b :

$$\frac{V_1}{V_b} = \frac{R_1}{R_b} = a$$

Finalmente se inyecta corriente por medio de un microelectrodo en el interior del compartimiento celular. La corriente fluye hacia los compartimientos externos A y B, a través de las resistencias R_1 y R_b . Se obtiene la R_z entre el -- electrodo intracelular (C) y la solución luminal (A) a través de R_1 y $R_b + R_s$ en paralelo:

$$\frac{1}{R_z} = \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_b + R_s}$$

Los resultados experimentales indican que las resisistencias de las membranas luminal y basolateral, fueron de -- 4500 y 2900 Ohm cm^2 respectivamente, y la R transepitelial -- fué de 310 Ohm cm^2 , entonces, el 95% de la conductancia transepitelial pasa por una derivación paracelular. Análisis semejantes se hicieron en otros dos epitelios: túbulo proximal de riñón (Boulpaep, 1976) y estómago (Sachs, Shoemaker y Col. -- 1971).

2.- Mapeo de voltaje: La anterior serie de experimentos establece la existencia de una ruta paracelular, pero no la caracteriza anatómicamente. La ruta paracelular podría estar constituida por las uniones ocluseras, células descamadas, bordes dañados durante el montaje del tejido o bien, epitelios constituidos por distintos tipos de células. Para discriminar entre estas posibilidades, se pasa una corriente transepitelial y con un par de microelectrodos sensibles a voltaje, se ras--trece la superficie apical para detectar las zonas por las que fluye la corriente (Fig. 1.3 a, sig. hoja).

Si además, el movimiento del electrodo se observa bajo el microscopio, es posible correlacionar los resultados del barrido de voltaje con la estructura del epitelio. La fig. 1.3 b, muestra que cada vez que el electrodo se mueve a través y a lo largo de un borde celular, la deflexión de voltaje es mayor que cuando el electrodo está encima de una célula. Estas observaciones confirman que las uniones celulares actúan como sumideros de corriente.

En cambio, otros epitelios como la piel de rana, la vejiga de sapo y tortuga y el conducto submandibular, tienen una muy alta resistencia transepitelial. En estos casos el camino que siguen los solutos es predominantemente intracelular (Ussing y Windhager, 1964; Cereijido y Curran, 1965).

Otra forma de detectar la existencia de una vía paracelular, se originó de los experimentos en los cuales se -- utilizó el lantano en epitelio de piel de rana (Martínez Palo mo y col. 1971), en túbulo proximal de riñón de sapo (Whittembury y Rawlins 1971) y en vesícula biliar de íleo de conejo - (Machen y col. 1972); ellos encontraron por microscopía elec-

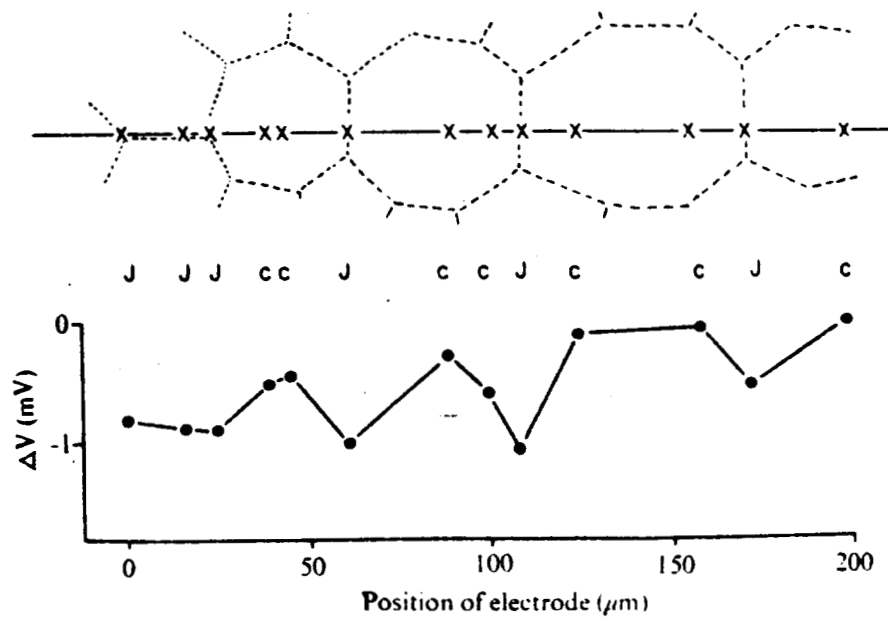
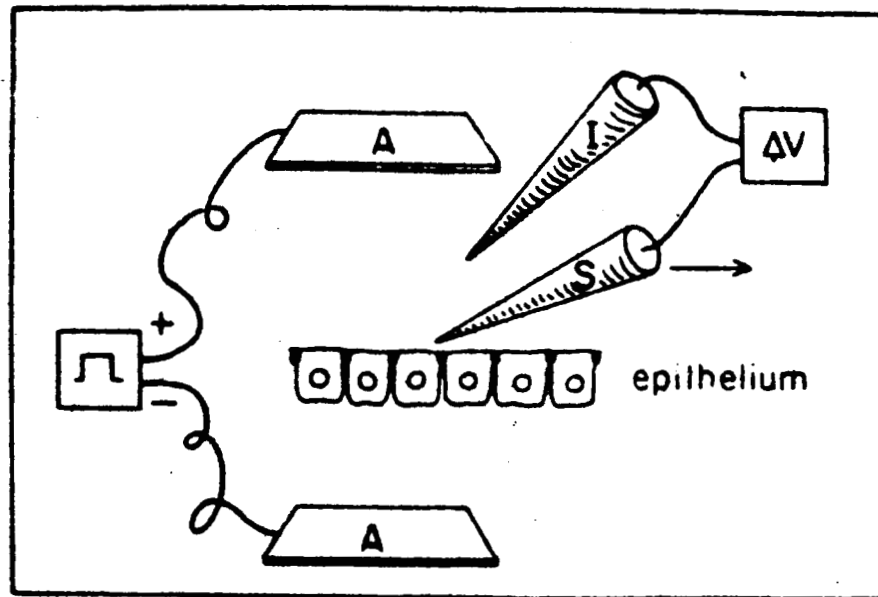


Fig. 1.3 a y b Barrido de voltaje en vesícula de *Necturus* (Fromter y Diamond 1972).

trónica de corte fino, que el lantano penetra las uniones oclusoras, lo cual mostró que éstas son sitios de alta conductancia.

Otros estudios llevados a cabo por Erlij y Martínez Palomo (1972), Di Bona y Civan (1973), Wade y col. (1973), Brindslev y col. (1974) y Civan y Di Bona (1978), mostraron que el establecimiento de gradientes osmóticos a través de epitelios con alta resistencia, así como, vejiga urinaria de sapo, piel de rana y *Xenopus*, por reducción de la osmolaridad serosa o incremento de la osmolaridad mucosa, causa apertura de la unión oclusora, lo cual permite que los iones atraviesen más rápidamente el canal paracelular, resultando en un incremento de la conductancia del tejido.

Con todo lo anterior se puede postular una clasificación de los epitelios, en: herméticos, cuya ruta principal es a través de las células (transcelular) y permeables, cuya ruta principal es a través de las uniones oclusoras y el espacio intercelular (paracelular).

Augustus y col. (1977) plantearon que el único criterio para saber si un epitelio es hermético o permeable, es el cociente de las conductancias de la ruta celular y extracelular, ya que la resistencia eléctrica no es suficiente para discriminar entre las dos clases de epitelio, su propuesta se basaba en su hallazgo de que el epitelio del ducto de la glándula salival del conejo, tiene una resistencia transepitelial muy baja, debido a una alta conductancia transcelular al cloro y no a una alta permeabilidad de la ruta paracelular.

Claude y Goodenough (1973), intentaron una clasificación

ción de los epitelios en función de su resistencia transepitelial. Estos autores encontraron una correlación entre el número de bandas de la unión oclusora (vistas por crio-fractura) y la permeabilidad paracelular; esto es, a mayor número de -- bandas en la unión oclusora, menor permeabilidad (tabla 1-1). Sin embargo, Martínez-Palomo y Erlíj (1975), encontraron que esa correlación no existe, pues observaron que las uniones -- oclusoras de la mucosa de íleo de conejo son permeables a lantano y tienen una malla de bandas semejantes a las uniones de la vejiga urinaria de sapo, que no son permeables a lantano.

Claude (1978), propuso un modelo que relaciona la resistencia transepitelial con el número de bandas de la unión oclusora. Postula que las bandas contienen pequeñas regiones análogas a poros, que se pueden abrir o cerrar al paso de los iones. Los cálculos descritos en este reporte están basados en datos fisiológicos y morfológicos, de una variedad de fuentes bibliográficas. Observa que al graficar $R_j \cdot l_p$ (R_j = resistencia de la unión, l_p = cantidad lineal de elementos paracelulares por unidad de área), que es la Resistencia Específica, contra la media del número de bandas de unión (n) demostrada por crio--fractura, (fig. 1.4), el incremento aritmético en el número -- de bandas de la unión oclusora, parece resultar en un incre--mento logarítmico de la resistencia paracelular. Esto no se -- espera si el número de bandas se comporta como una resisten--cia en serie, en la cual $R_j \cdot l_p$ sería directamente proporcio--nal al número de bandas.

Una interpretación puede ser, según el autor, que -- las bandas contengan estructuras como poros que puedan abrir--se o cerrarse al movimiento de los iones; si estos poros se --

TEJIDO	Resistencia Transepitelial	MORFOLOGIA DE LA UNION				N
		N° de fibrillas		Profundidad (um)		
		Gama	Promedio ± ES	Gama	Promedio ± ES	
<u>MUY PERMEABLE</u> : túbulo contorneado proximal de mamífero						
Perro	6					
Rata						
Ratón	-	1-2	1.19 0.12	*	*	48
<u>PERMEABLE</u> : túbulo con- torneado proximal de -						
Necturus	70	1-6	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 HERMETI- COS</u> : túbulo contornea- do 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 HERMETICOS</u> : estóma- go 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

TABLA 1-1: (tomada de Claude Goodenough, 1973)

Algunos epitelios simples clasificados de acuerdo a su resistencia transepitelial. Medidas de la morfología de la unión.

(*) 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 standard.

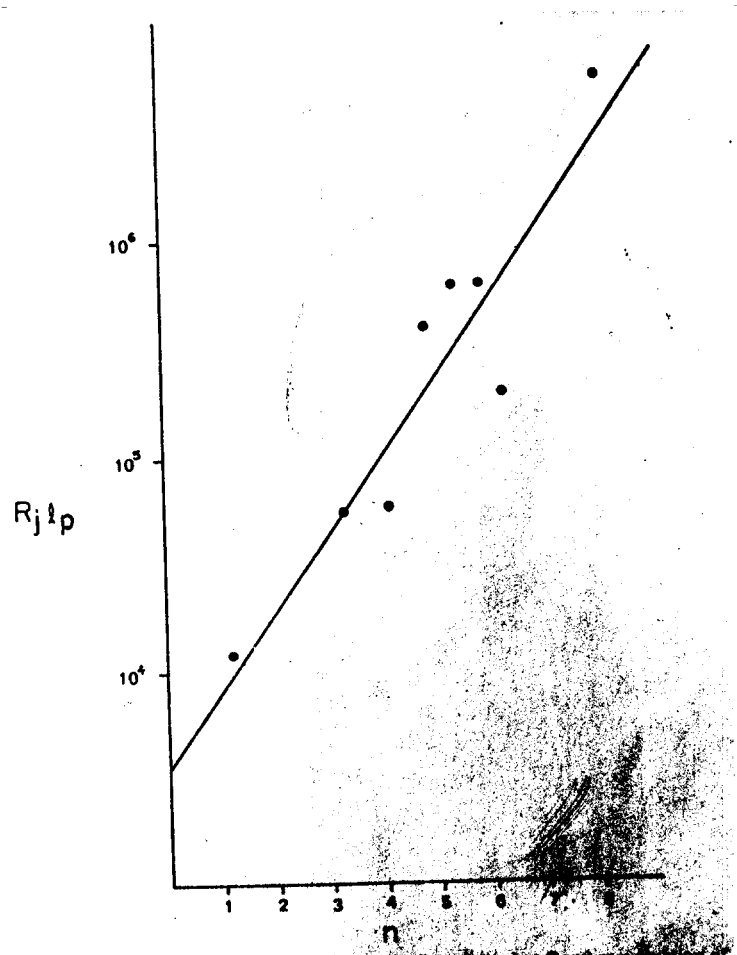


Fig. 1.4 Gráfica de la resistencia específica de unión — (R_{jlp}) (expresada como Ohm.cm) como una función de el número de bandas (n) de la Zonula Occludens. El coeficiente de correlación es 0.93 (Claude 1978).

abren y cierran al azar por periodos cortos de tiempo, la resistencia local de cada banda estará relacionada a la probabilidad (p) de que la banda tenga o no un poro abierto en -- esa región. Entonces, una ecuación para la resistencia espe-- cífica de unión puede ser la siguiente:

$$\log R_j \frac{1}{p} = \log R_j \frac{1}{p} - n \log p$$

min

Esta es la ecuación de la fig. 1.4, de la cual se -- puede obtener el intercepto, la pendiente y el coeficiente -- de correlación.

Concluye que la morfología y fisiología de la unión oclusora es compatible con un modelo de la unión en la cual cada banda de unión contiene poros que pueden abrirse o ce-- rrarse a pequeños iones, con la probabilidad de que cada banda tenga un poro abierto.

Marcial y col. (1984) estudiaron la relación estructura/función de la unión oclusora entre los epitelios de ileo de cuyo y vejiga urinaria de sapo, usando técnicas morfomé-- tricas cuantitativas y aplicando la ecuación de Claude (1978). Mostraron que la morfología de la unión oclusora tiene una -- relación directa con la resistencia transepitelial, si se -- considera la geometría del epitelio. Lo anterior no apoya el trabajo de Martínez-Palomo y Erlij (1975), ya que estos in-- vestigadores no consideraron la diferencia en morfología ce-- lular que existe entre los epitelios estudiados.

Podemos concluir que las uniones oclusoras desempe-- ñan un papel importante en el transporte transepitelial de -- solutos. En los sig. capítulos se estudia dicha unión con -- más **detalle**.

II LA UNION OCLUSORA

2.1 Morfología

Las membranas epiteliales de células adjuntas se man tienen fusionadas por la unión oclusora (Farquhar y Palade -- 1963; Gilula 1974; Martínez-Palomo y Erlij 1975), que forma -- un cinturón alrededor de cada célula, actúa como una barrera al movimiento transepitelial de sustancias, y delimita dos ca ras: la apical, cubierta por microvellosidades y que está en contacto con el líquido que contienen y, la basolateral, la -- cual es lisa y está en contacto con el sustrato (fig. 1.1).

El examen de microscopía electrónica de un corte a -- través de la unión oclusora, muestra que la lámina externa de la membrana celular de las células contiguas se fusiona, y -- aparece en la micrografía como una línea única. A cada lado -- de la línea oscura, hay una línea más clara, que representa la lámina media de la membrana celular respectiva. Las líneas oscuras que se ven en la superficie citoplásmica de las zo-- nas más claras, representan las láminas internas de dos célu-- las contiguas (fig. 2.1(a)).

Pero la línea de fusión es discontinua, ya que con-- siste de una o varias aperturas de la línea de fusión, segui-- da por su refusión (Farquhar y Palade 1963; Bullivant y Ames 1966) (fig. 2.1 b).

CAPITULO II: LA UNION OCLUSORA

- 2.1 Morfología
- 2.2 Formación de la unión oclusora
- 2.3 Cambios estructurales y funcionales de la unión oclusora
- 2.4 Los cationes divalentes y la unión oclusora

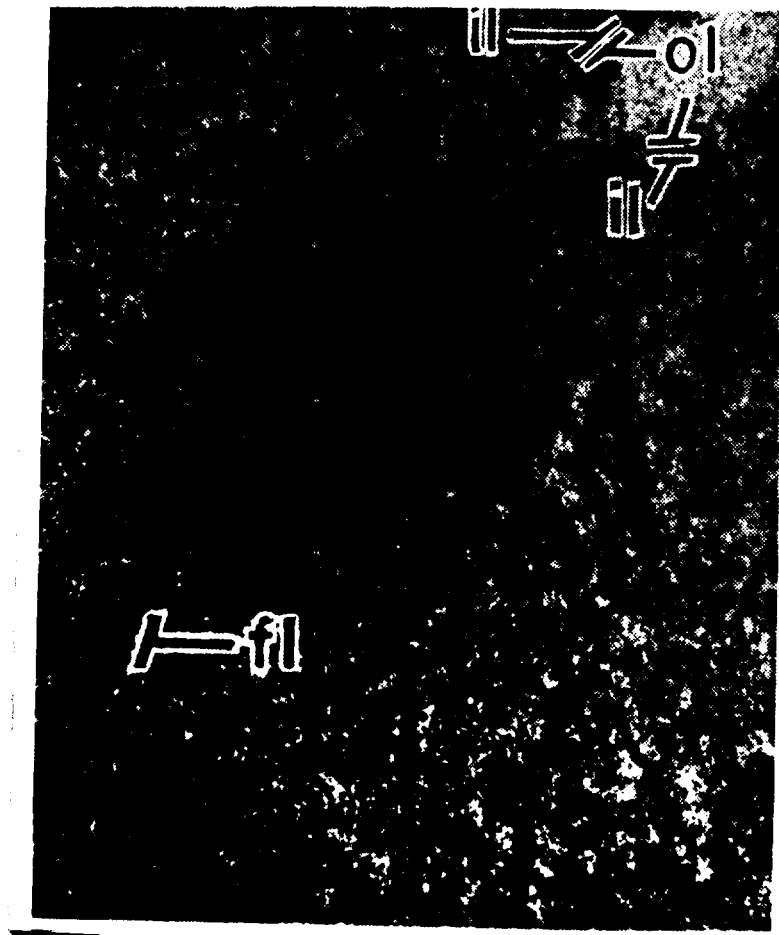


Fig. 2.1(a) Micrografía electrónica (x 230 000) de un -
 corte a través de la unión oclusora entre dos células -
 de mucosa gástrica de rata. fl = línea de difusión en--
 tre las capas externas de las membranas celulares de --
 las dos células; ol e il representan las capas externas
 e internas de la membrana celular de cada elemento (Far
 quhar y Palade 1963).

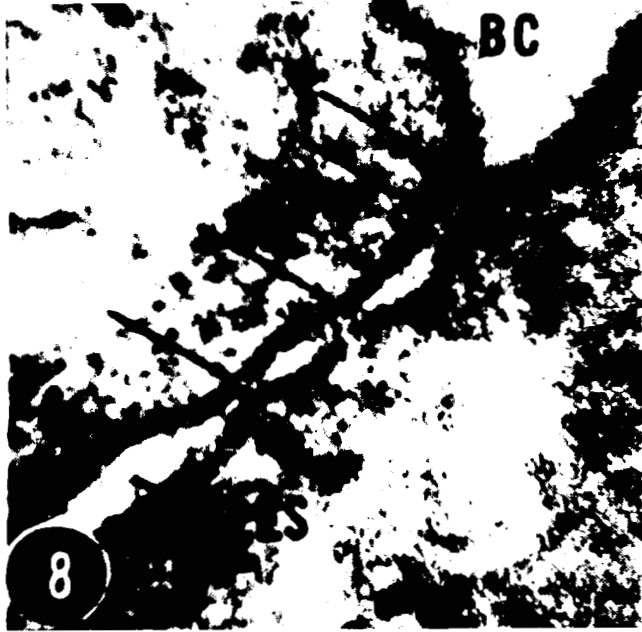


Fig. 2.1(b) Micrografía electrónica de la unión ocluyente de hepatocito de rata, donde se muestran las líneas de fusión y refusión (Bullivant y Ames 1966).

La técnica de crio-fractura, que produce una escisión de la membrana a lo largo del plano central de la bicapa lipídica (Pinto Da Silva y Branton 1970), permite observar que en la región de la unión oclusora existe una red de fibras intramembranales, que se observan en forma de bandas en la cara de fractura P (protoplásmica), y canales complementarios en la cara de fractura E (exoplásmica) (Stahelin y col. 1969; Chalcroft y Bullivant 1970; Friend y Gilula 1972; Claude y Goodenough 1973; Wade y Karnovsky 1974; Branton y col. 1975). Estos filamentos son los que constituyen la línea de fusión de las membranas de dos células contiguas (Claude 1978) (fig. 2.2).



Fig. 2.2 Crio-fractura de la unión oclusora de íleo 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 (Martínez-Palomo y col. 1978).

2.2 Formación de la unión oclusora

La formación de la unión oclusora implica cambios - significativos de las membranas de ambas células. El ensamblaje de las uniones formadas de novo, se caracteriza por la acumulación progresiva de partículas intramembranales, las - cuales se alinean y se funden para formar filamentos contí- nuos, como se observa por la técnica de crio-fractura (Monte- sano y col. 1975; Benedetti y col. 1974; Wanson y col. 1977; Robenek y col. 1979).

Una variedad de sistemas experimentales se han usa- do en el estudio del ensamblaje de la unión oclusora; teji- dos en estados tempranos de diferenciación (Montesano y col. 1975 y 1978); reagregación de células embrionarias (Dermiet- zel y col. 1977; Seeds y Hoffke 1978); inducción de uniones in vitro por vitamina A (Elias y Friend 1976); o por enzimas proteolíticas (Polak-Charcon y col. 1978; Talmon y Ben-Shaul 1979).

Kaiho (1977) estudió en células MDCK el desarrollo de las uniones intercelulares y encontró en tres o cuatro -- días aposición de las membranas celulares y condensación de material floculento extracelular entre las células vecinas, lo que consideró como signos tempranos de la formación de -- desmosomas. Finalmente, los espacios intercelulares se cerra- ron por el complejo de unión en el lado apical.

Epstein y col. (1977) observaron que en células No- vikoff la cicloheximida no impidió la formación de las unio- nes oclusoras, a pesar de estar en presencia de ésta por más de 13 horas, desde la hora de sembrado.

Cereijido y col. (1978) encontraron que si la cicloheximida se añade en las primeras dos horas de sembradas, se produce un retardo considerable en el desarrollo de la resistencia transepitelial. Estos datos los confirmaron Hoi Sang y Col. (1980) y Griep y col. (1983).

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

En monocapas tratadas con EGTA, el resellado por calcio no se altera por la cicloheximida y la puromicina (Martínez-Palomo y col. 1980, Griep y col. 1983). Esto concuerda con observaciones de Meldolesi y col. en lóbulo pancreático de cobayo.

Se ha visto (Cereijido y col. 1978 b), 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 y col. 1983). Incluso, si a estas células después de estar en suspensión por 24 horas, se les trata al momento de sembrarse con cicloheximida, no se previene en 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 oclusoras. Estas proteínas que no se degradan rápidamente en condiciones de estado estacionario de la monocapa, son destruídas por la tripsina y, pueden resintetizarse en ausencia de contacto célula--célula o célula-sustrato.

en ausencia de síntesis protéica.

En síntesis, se puede decir que las proteínas están involucradas en la formación de uniones ocluseras. 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 Cambios estructurales y funcionales de la unión oclusora

Varios estudios sugieren que las uniones oclusoras - sufren cambios de configuración rápidos en varias condiciones fisiológicas y experimentales (Pitelka y col. 1973; Wade y -- Karnovsky 1974). No se conocen los factores involucrados en el ensamblaje y modulación de las uniones oclusoras, así como la regulación de su configuración espacial. Los cambios en la ultraestructura de la forma de las uniones se han estudiado - por técnicas de crio-fractura y microscopía electrónica con-- vencional.

- a) Por ejemplo, drogas como la pronasa en células beta pan -- creáticas (Orci y Amherdt 1973), la faloidina y el tetra-- cloruro de carbono en hepatocitos de rata (Montesano y col. 1976; Robenek 1979), y la N-nitroso morfolina en hepatoci-- tos de rata (Robenek 1980), producen un desarrollo extensivo de uniones oclusoras. Las bandas de unión pireden su -- orientación paralela predominante. Estos cambios indican - proliferación y reorganización de los elementos de unión.
- b) Metz y col. (1977), encontraron que al aplicar presión me-- cánica al ducto biliar, se produce una disminución en el - número de bandas de unión con varias interrupciones en las mismas, y la peroxidasa atraviesa la unión. Sin embargo, - Koga y Todo (1978) encontraron que al aplicar presión mecánica hay un aumento en la profundidad de las uniones oclu-- soras, pero sin cambio en el número de bandas.
- c) Las uniones oclusoras sufren cambios en organización y en profundidad, al someterse a diferentes condiciones hormonales, por ejemplo, cuando se inyecta progesterona y estrógelos.

no a animales ovariectomizados (Murphy y col. 1980 y 1981) o en diferentes estados de preñez en la rata (Murphy y col. 1982); se altera la organización de la unión y disminuye su eficiencia como barrera de difusión.

- d) Humbert y col. (1976), reportaron que el desarrollo de las uniones oclusoras, del epitelio de túbulo proximal de *Necturus*, varía en paralelo con un cambio en la conductancia eléctrica. Así, cuando el epitelio se somete a una diuresis salina, la complejidad de las uniones disminuye, con un incremento en la conductancia de la vía paracelular.
- e) La temperatura también produce cambios en las uniones oclusoras, así, cuando se incubaba a 37 grados tejidos de próstata de rata, hay una proliferación de nuevas bandas de unión, lo cual ocurre aún en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas; lo cual sugiere que la reorganización molecular proviene de un almacén de componentes preexistentes (Kachar y Pinto DaSilva 1981).

Cuando se cambia la temperatura de 37 a 3 grados centígrados en células MDCK, la resistencia eléctrica de la monocapa cambia reversiblemente de 63 a 193 Ohm cm^2 ; cuando la monocapa se fija con glutaraldehído a cada temperatura, la forma de las uniones oclusoras, la distribución estadística del número de bandas y la profundidad de las bandas de la unión no cambia apreciablemente (Cereiido y col. 1983).

Bentzel y col. (1980), mostraron que la adición de faloidina (que aumenta el número de bandas de la unión) a vesícula biliar de *Necturus*, resulta en un aumento en la resistencia transepitelial.

Como observamos por todo lo anteriormente expuesto, se desconoce la relación que guarda la estructura de la unión oclusora y su permeabilidad.

2.4 Los cationes divalentes y la unión oclusora

De los cuatro cationes alcalino-terreos magnesio, calcio, estroncio y bario, aunque todos son bastante similares en sus propiedades físicas y químicas, solo dos, el calcio y el magnesio ocurren naturalmente en los sistemas biológicos.

El calcio es esencial para la vida de la mayoría de los sistemas biológicos. Entre sus múltiples funciones está la de controlar la permeabilidad de los iones monovalentes; además, participa en la generación del potencial de acción en nervio y músculo esquelético. En el caso particular de las células epiteliales, el calcio tiene además otro papel fundamental, permite la interacción de sus membranas, para dar una unión oclusora. De modo que la permeabilidad de la ruta paracelular, puede estar determinada por la selectividad al calcio (Beaty, G. 1978 tesis).

Los estudios de Galli y col. (1976) y Meldolesi y col. (1978), mostraron que el calcio interviene en la formación y mantenimiento de la unión oclusora. Ellos observaron en réplicas de crio-fractura, que la incubación de lóbulos pancreáticos de cuyo, en un Ringer Krebs de bicarbonato libre de calcio y conteniendo 0.5 mM de EGTA, resultó en la fragmentación progresiva de la unión oclusora con formación de uniones múltiples discretas (fascia occludentes) localizadas en la membrana lateral y luminal; después de una a dos horas en

dichas condiciones, la mayoría de las uniones ocluseras aparecen desensambladas. Si los iones calcio son reintroducidos hasta el medio de incubación, la unión oclusera se reforma alrededor de los ápices de la célula.

Meldolesi y col. (1978), observaron que la cicloheximida (usada en la dosis que inhibe síntesis de proteínas) y la citocalasina B (dosis a la cual rompe los microfilamentos y modifica la forma celular), no tiene efecto sobre la organización de la unión oclusera, sobre su desensamblaje -- por el medio sin calcio o sobre su re-formación dependiente de calcio; la organización y desensamblaje tampoco son afectados por colchicina, pero el re-ensamblaje es defectuoso. -- Estos investigadores concluyen que la estructura de la unión oclusera depende del calcio extracelular.

Fujimoto y Ogawa (1982), observaron que en vesícula biliar de ratón, incubada en un Ringer Krebs sin calcio adicionado de 0.5 mM de EGTA, el citoplasma apical toma forma de domo que gradualmente se constriñe a nivel de la unión oclusera, con el subsecuente abultamiento de microfilamentos. Después de 120 minutos de incubación, el citoplasma apical se pierde y sale al lumen.

Cereiido y col. (1978), encontraron que las células MDCK sembradas inmediatamente después de la tripsinización em piezan a desarrollar resistencia transepitelial dentro de 4-6 horas. En este caso la resistencia alcanza un máximo de 340 Ohm cm² a las 24 horas, luego declina a un valor estable de 100 Ohm cm² en pocos días. (fig. 2.3) Si la monocapa estabilizada se coloca en un medio libre de calcio, adicionado de -- EGTA, la resistencia cae casi a cero, si se le adiciona cal--

cio, la resistencia aumenta en 60 minutos hasta el valor original (fig. 2.4). Así, el calcio parece ser necesario para el establecimiento de la unión oclusora. Los demás cationes alcalino-terreos (magnesio, estroncio y bario), no lo reemplazan.

Pitelka y col. (1983), usaron bajas concentraciones de EGTA o citrato de sodio para quelar el calcio extracelular en cultivos primarios de células mamarias de rata. Mostraron que los eventos que se presentaron en estas células fueron: --contracción del cuerpo celular, migración centripeta de las microvellosidades, desestabilización de la organización intramembranal de la unión oclusora, convolución de la membrana periférica en y cerca a la unión oclusora y endocitosis de la unión oclusora fragmentada.

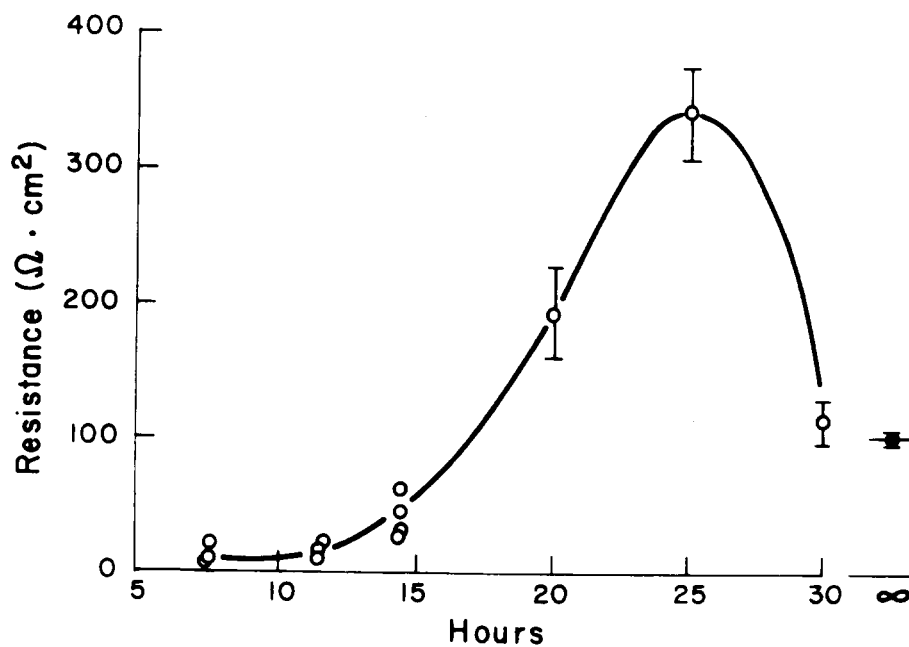


Fig. 2.3 Desarrollo de la resistencia eléctrica en monocapas de células MDCK sembradas a alta densidad sobre discos de colágena. Los discos fueron montados entre dos cámaras de lucita conteniendo CDMEM para la medición de la resistencia eléctrica. El punto lleno sobre una línea horizontal representa el valor de la resistencia en 219 monocapas maduras, por lo menos de 2 días de sembradas. (Ce-reijido y col. 1978).

70197

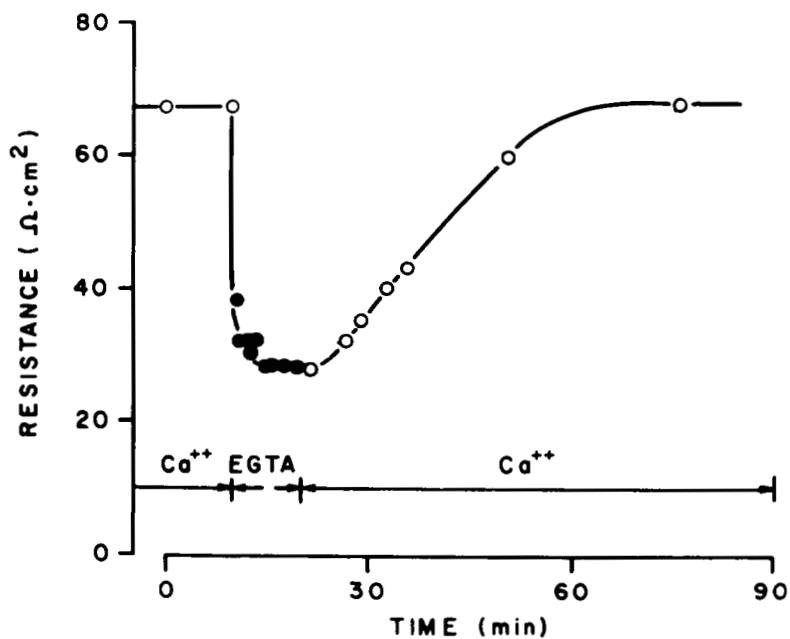


Fig. 2.4 Efecto de la remoción del calcio y la adición de EGTA sobre la resistencia eléctrica de monocapas de células MDCK. El reemplazamiento de CDMEM por un medio libre de calcio adicionado de EGTA provoca una caída rápida de la resistencia a la mitad de su valor control, seguido por un lento decremento. La adición de un medio con calcio, recuperó el valor original de la resistencia. (Cereijido y col. 1978).

CAPITULO III: POLARIDAD

3.1 Polaridad de las membranas epiteliales

- 3.1.1 Asimetría molecular
- 3.1.2 Asimetría anatómica
- 3.1.3 Asimetría funcional
- 3.1.4 Asimetría farmacológica
- 3.1.5 Asimetría bioquímica

3.2 La polaridad y la unión oclusora

III POLARIDAD

3.1 Polaridad de las membranas epiteliales

3.1.1 asimetría molecular

Hay evidencias hasta la fecha, de que las membranas epiteliales son estructuras vectoriales; esto es, sus componentes están asimétricamente distribuidos entre las dos superficies. Esto suministra una base molecular para la asimetría -- funcional. Para proteínas y carbohidratos, la asimetría es absoluta. Cada copia de una cadena polipeptídica, tiene la misma orientación en la membrana. Los carbohidratos de la membrana plasmática se unen a proteínas o lípidos siempre por el lado externo. Sin embargo, la asimetría de los lípidos no es absoluta; casi cada tipo de lípido está presente en ambos lados de la bicapa lipídica, pero en diferentes cantidades. La asimetría de la membrana se mantiene por una baja frecuencia de movimiento espontáneo de los constituyentes de una superficie a la otra (Rothman y Lenard 1977).

3.1.2 asimetría anatómica

Desde el punto de vista anatómico se observa también una marcada asimetría, por ejemplo, la cara apical muestra microvellosidades, en cambio la basolateral es lisa. Además, los organelos celulares no se disponen al azar sino que aparecen orientados. La membrana de la superficie lateral de las células epiteliales presenta tres tipos de uniones intercelulares: i) uniones ocluseras; ii) uniones comunicantes o nexus, y iii) desmosomas, en la dirección apical a basolateral (Farquhar y Palade 1963, Revel y Karnovsky 1967, Goodenough y Revel 1970, Weinstein y McNutt 1972).

3.1.3 asimetría funcional

Desde el punto de vista funcional, en túbulo distal de riñón de mamífero, por ejemplo, la cara apical de una célula epitelial es muy permeable a sodio y muy poco permeable a potasio, entre tanto, la cara basolateral tiene una alta permeabilidad al potasio y parece ser relativamente impermeable a sodio; en la cara basolateral existe un transporte activo de sodio que extruye iones sodio de las células, intercambiándolo por iones potasio (bomba de sodio-potasio), en cambio, la cara apical carece de bombas (Koefoed-Johnson y Ussing 1958).

Las células acinares del páncreas, también como otras glándulas exócrinas, están altamente polarizadas. La liberación de los productos de secreción, la cual ocurre por exocitosis, está restringida a ciertas porciones de la membrana celular luminal (De Camilli y col. 1974).

Las células LLC-PK₁ (línea celular de riñón de cerdo) - en cultivo, forman una monocapa de células epiteliales orientadas asimétricamente y unidas unas a otras por uniones oclusoras. Estas células transportan glucosa del lado luminal al basolateral solamente, al igual que el túbulo proximal de riñón (Misfeldt y Sanders 1981).

El hepatocito es una célula epitelial que muestra marcada polaridad morfológica y funcional. La polaridad funcional es claramente demostrada por transporte transcelular de sales biliares, proteínas, varios compuestos orgánicos, de la sangre al compartimiento biliar (Barth y Schwrtz 1982).

Hay mucho interés en conocer los mecanismos biogénéticos, por los cuales los componentes celulares son segregados

hasta regiones específicas de la membrana celular. Una de las herramientas para estudiar el camino intracelular de las proteínas de membrana y de los productos de secreción, ha sido el uso de virus que tienen la propiedad de gemar polarizadamente; así, el virus de la influenza, el sendai y el virus simian 5, geman exclusivamente por la membrana luminal de las células epiteliales, mientras que el virus de la estomatitis vesicular gema por la membrana basolateral (Rodríguez Boulan y Sabatini 1978, Roth y col. 1979, Rodríguez Boulan y Pendergast 1980, Green y col. 1981, Rodríguez Boulan y col. 1983). Este sistema tiene la ventaja de que puede seguirse con relativa facilidad el camino intracelular de las, pocas en variedad pero abundantes en cantidad, partículas virales. Presupone que la ruta de las proteínas virales es idéntica a las de las proteínas intrínsecas de la membrana.

3.1.4 asimetría farmacológica

La asimetría se manifiesta también en el efecto de hormonas y drogas: la hormona antidiurética, que estimula el transporte de sodio y el glucósido cardíaco ouabaina que lo inhibe solo tienen efecto en la cara basolateral; en tanto la amilorida bloquea el transporte pasivo de sodio en la cara apical (Biber 1971, Aceves y Erlij 1971, Biber y col. 1972).

La línea celular de riñón de sapo (A_6), muestra un incremento en la corriente de cortocircuito (equivalente a un flujo de sodio neto aunado al de glucosa) y en la diferencia de potencial cuando se adiciona insulina (10^4 micro U/ml.) en la solución del lado basolateral, pero no se produce efecto cuando la insulina se adiciona a la solución del lado apical. Esto indica que los receptores de insulina se encuentran en la

superficie basolateral y que muy poca de esta hormona atraviesa el epitelio (Fidelman y col. 1982).

3.1.5 asimetría bioquímica

El transporte activo de sodio a través de las membranas de las células epiteliales, se realiza por la ATPasa sodio-potasio activada. La localización de esta enzima, así como --- otras, se ha estudiado en células epiteliales. Así la ATPasa de sodio-potasio se localiza en la membrana celular basolateral de las células de los túbulos proximal y distal y túbulo colector de riñón de conejo, y membrana basolateral de la línea celular epitelial MDCK; así como, la fosfatasa alcalina - sensible a cisteína, se encuentra en la membrana luminal de - las células del túbulo proximal del riñón de conejo y la amino-peptidasa se encuentra en la membrana luminal de células -- epiteliales MDCK (Rostgard y Moller 1980, Louvard 1980, Lamb y col. 1981).

3.2 La polaridad y la unión oclusora

La formación de una monocapa celular epitelial polarizada involucra dos tipos de eventos: i) la formación de uniones intercelulares ii) la polarización celular por una distribución asimétrica de los componentes de la membrana, entre los dominios apical y basolateral y, por una distribución polar - de organelos intracelulares.

Una vez establecida la polaridad, se mantiene a pesar -- del continuo recambio de moléculas. En varios sistemas epiteliales el estado polarizado es descrito a niveles morfológi--co y molecular, pero el mecanismo involucrado en la génesis

y mantenimiento de la polaridad celular, así como los factores que toman lugar en la determinación de la orientación de la polaridad, son casi desconocidos.

In vivo, la orientación de la capa celular está determinada durante la morfogénesis. La superficie basolateral está siempre en contacto con el medio interno, del cual adquiere los nutrientes, en epitelios monoestratificados.

In vitro, las células epiteliales aisladas se reorganizan en monocapas celulares polarizadas. La superficie apical de la monocapa está en contacto con el medio de cultivo, y la membrana basal está unida al sustrato (plástico, vidrio, colágena, etc.). En estas condiciones, como in vivo, se origina y se mantiene una orientación de la polaridad celular. Esta polaridad se puede invertir experimentalmente sin que se rompa la unión intercelular, por inclusión de vesículas de células de tiroide porcina en colágena (Chambard y col. - 1981).

Se conoce poco acerca de porqué el epitelio se polariza. El crecimiento de la mayoría de las líneas celulares epiteliales, depende de la adhesión al sustrato, esto es, las células no se dividen ni crecen, a menos que se adhieran a una superficie (plástico, colágena, vidrio, etc.).

Rodríguez Boulan y col. (1983), mostraron que la adhesión, de células epiteliales aisladas, a un sustrato o a otra célula es suficiente para la expresión de la polaridad de la membrana plasmática, la cual se demuestra por la gemación asimétrica de virus.

La secuencia de eventos por los cuales las células epiteliales se polarizan, y el papel de la unión hermética en el mantenimiento de esa polaridad, se ha investigado utilizando células en cultivo.

Hoi Sang y col. (1979, 1980), trataron la monocapa confluyente de células MDCK, con una solución buffer de fosfato (PBS) adicionado de 0.1 mM de EGTA, mantenidas a una temperatura de 37 grados centígrados, y obtuvieron una suspensión celular en 1 a 4 horas, la cual sometieron a crio-fractura, para establecer el efecto de la ruptura de la unión oclusora sobre la densidad de las partículas intramembranales en las membranas luminal y basolateral. Observaron que, mientras las monocapas de células MDCK confluentes mostraron uniones oclusoras intactas y una distribución diferencial de partículas intramembranales, entre las membranas luminal y basolateral, los cultivos disociados con EGTA perdieron los elementos de unión y la distribución diferencial de partículas intramembranales. Cuando la suspensión celular se siembra a confluencia, en un medio completo (que contiene calcio), las uniones oclusoras se reforman y las partículas intramembranales se redistribuyen de una manera asimétrica.

Estos estudios de disociación-asociación sugieren una relación cercana, entre la integridad de la unión oclusora y el mantenimiento de la polaridad de las partículas intramembranales, entre las membranas apical y basolateral.

En lóbulos pancreáticos la incubación en un Ringer-Krebs de bicarbonato adicionado de 0.5 mM de EGTA, produce desarreglo y ruptura de las uniones oclusoras, con la consecuente desaparición de la distribución asimétrica de las partículas

intramembranales entre las membranas apical y basolateral (Galli y col. 1976).

Los trabajos de Pisam y Ripoché (1976) en células epiteliales de vejiga urinaria de sapo, los de Drastén y col. (1981) en monocapas de células A₆ usando marcadores fluorescentes y los de Herzlinger y col. (1984) con células MDCK y anticuerpos monoclonales, muestran que la unión oclusora contribuye a mantener la especialización de la superficie celular en epitelios.

Rabito y Tchao (1980), determinaron la unión de ouabaina (H^3) en la línea celular MDCK durante su reorganización epitelial. La ouabaina, un potente inhibidor de la ATPasa sodio-potasio, tiene una alta afinidad por esta enzima. Esta característica hace posible el uso de ouabaina como una medida del funcionamiento de esta enzima.

En este estudio se usó la ouabaina (H^3), como una estimación de la cantidad de ATPasa sodio-potasio durante la reorganización de células MDCK (de células suspendidas a una monocapa completa). En células suspendidas, la unión específica de ouabaina se redujo en un 67% comparada con la unión a una monocapa completa. Después de la resiembra en un soporte permeable, tanto la resistencia transepitelial como la unión de ouabaina incrementaron con el tiempo de incubación. Los resultados mostraron que la monocapa completa muestra más sitios de unión de ouabaina que las células individuales no polarizadas. Concluyeron que la reducción en el número de sitios de unión de ouabaina (3H) cuando la organización de la membrana epitelial se rompió, como se indicó por la caída de la resistencia eléctrica transepitelial, y el incremento en los sitios de unión cuan

do la membrana es reorganizada, puede ser una expresión del desarrollo de las características de permeabilidad específicas de la membrana apical (alta permeabilidad a sodio), con un concomitante incremento de la concentración de sodio intracelular que enciende la síntesis de nuevas bombas de sodio-potasio, para reducir la concentración de sodio intracelular y establecer un nuevo estado de equilibrio.

Hoi Sang y Evans-Layng (1983), encontraron que en células MDCK en suspensión la ATPasa sodio-potasio se encuentra uniformemente distribuida a lo largo de la membrana celular, pero una vez que la unión oclusora se forma, la enzima aparece únicamente en la membrana basolateral.

González-Mariscal (tesis de maestría 1983) encontró que la polarización de las partículas intramembranales surge recién cuando la unión oclusora es funcional.

CAPITULO IV: FOCALIZACION DEL PROBLEMA Y
OBJETIVOS DE LA TESIS

- 4.1 Presentación del problema
- 4.2 Ventajas de las células epiteliales en cultivo
- 4.3 Características morfológicas y funcionales de la línea celular epitelial MDCK (Madin and Dar
by Canine Kidney)
- 4.4 Objetivos

IV FOCALIZACION DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS DE LA TESIS

4.1 Presentación del problema

En la introducción hemos mencionado que la función de -- los epitelios es regular el intercambio de materia entre los organismos y el medio, y que para cumplir esta función es necesario:

- 1). que las células estén selladas entre sí constituyendo -- una barrera a la difusión de solutos. La estructura responsable del sellado de la unión intercelular es la -- unión oclusora, y
- 2). que las proteínas de membrana que operan y regulan el -- transporte vectorial de solutos estén distribuidos asimé-- tricamente, es decir, estén polarizados.

Un problema central en la biología de las células epite-- liales es, cómo y porqué están polarizadas sus membranas. Da-- do que la unión oclusora forma un cinturón alrededor de las -- células, delimitando los dominios apical y basolateral, y -- constituyendo una barrera para la difusión lateral de los com-- ponentes de membrana, parece lógico suponer que debe existir una relación entre la aparición de la unión oclusora y el de-- sarrollo del fenómeno de la polaridad.

El objetivo central de esta tesis, es caracterizar el -- proceso de formación de la unión oclusora, así como, su evolu-- ción con la edad de la monocapa, desde el punto de vista fun-- cional (evolución de la resistencia y de la permeabilidad) y estructural (número de bandas y profundidad de la unión). Co-- lateralmente se analizan algunos aspectos del desarrollo de -- la polaridad.

70197

Los objetivos específicos son los siguientes:

- 1).- Diseñar un protocolo experimental que permita estudiar - el proceso de ensamblado de la unión oclusora, separándolo de todos los otros procesos que sufre la célula, desde que se siembra hasta que se establece la monocapa madura.
- 2).- Estudiar el rol del calcio en la síntesis y ensamblaje - de los componentes de la unión oclusora, y en el sellado de la unión intercelular.
- 3).- Estudiar si la resistencia depende de la edad de la monocapa, y de ser así, demostrar si esta dependencia se correlaciona con cambios en el número de células por unidad de área y/o con la estructura (número de fibrillas y profundidad de la unión oclusora).

4.2 Ventaja de las células epiteliales en cultivo

Los cultivos celulares son de gran valor para el estudio de una variedad de funciones celulares, así, las células epiteliales en cultivo son útiles para estudiar el transporte -- transepitelial y el control del transporte por algunas sustancias (hormonas y drogas) o por cambios físicos.

Handler y col. (1980), citan las ventajas de las células epiteliales en cultivo:

- a). Se minimiza la variabilidad entre las muestras en un experimento. Todas las preparaciones se pueden derivar del mismo lote de células precursoras, minimizando diferencias genéticas; así, las preparaciones pueden ser mantenidas en el mismo medio por un período apropiado antes - del experimento, eliminando diferencias que pueden resultar de factores nutricionales, endócrinos y de edad.
- b). Se puede contar con grandes cantidades de material.
- c). Las células se pueden congelar y descongelar después de algún tiempo, permitiendo retornar al mismo material experimental.

- d). Se evita que haya más de un tipo celular.
- e). Se pueden desarrollar líneas celulares mutantes.
- f). Se puede partir de células epiteliales separadas y asimétricas y seguir temporalmente la formación de un epitelio polarizado.

4.3 Características Morfológicas y Funcionales de la línea celular epitelial MDCK (Madin and Darby Canine Kidney)

La línea celular MDCK deriva de un riñón de perro Cocker Spaniel adulto (Madin and Darby 1958).

Esta línea celular tiene propiedades de epitelio tubular renal y de adenocarcinoma papilar (Leighton y col. 1970; Rindler y col. 1979).

Estudios morfológicos y bioquímicos sugieren que las células MDCK derivan de los túbulos contorneado distal (Rindler y col. 1977, 1979) y colector (Valentich 1981). Sin embargo, Herzlinger y col. (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 sodio 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 y col. 1979, McRoberts y col. 1981).

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; Barker y Simmons 1981).

Leighton y col. (1970), mostraron que cuando las células crecen sobre un soporte impermeable y sólido, forman ampollas que resultan del transporte vectorial de agua del medio hacia el soporte y, que la ouabaína, un inhibidor específico de la ATPasa de sodio-potasio (cara basolateral) acoplada al flujo neto de agua, impide la formación de ampollas.

Leighton y col. (1970), Cereijido y col. (1978), Rindler y col. (1979), mostraron que las paredes de las ampollas están constituidas por epitelio polarizado, esto es, una membrana apical con microvellosidades y una membrana basolateral lisa.

La polarización celular se manifiesta:

- a). Morfológicamente, por la presencia de microvellosidades en la cara apical, de uniones oclusoras en la porción anterior de la cara lateral y de interdigitaciones en la membrana lateral de las células vecinas (Kaiho 1977; Leighton y col. 1969, 1970).
- b). Bioquímicamente, por la localización asimétrica de enzimas de membrana, tales como la ATPasa sodio-potasio 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 electrólitos (Mifeldt y col. 1976; Cereijido y col. 1978 a y b), así como por la gemación asimétrica de virus (Rodríguez-Boulan y Sabatini 1978).

La monocapa de células MDCK tiene la habilidad de formar uniones oclusoras que le confieren una resistencia eléc-

trica y por lo tanto, actúan como una barrera de permeabilidad. Estas uniones están formadas por un conjunto de fibras, interpuestas entre el lumen y el espacio intercelular, que vistas por crio-fractura, aparecen como una red comunicante de fibras en la cara de fractura P y como canales complementarios en la cara de fractura E (Fig. 4.1).

Cereijsido y col. (1980), mostraron que las uniones ocluidoras de la monocapa de células MDCK, no forman como en la mayoría de los epitelios naturales, un cinturón homogéneo a través del perímetro de las células adjuntas, y además estas uniones presentan regiones de alta resistencia intercaladas con sitios de baja resistencia. Los estudios de crio-fractura mostraron que las uniones están compuestas de regiones de 8-10 bandas, intercaladas con otras donde las bandas se reducen a una o dos.

Cuando la monocapa se forma sobre un soporte permeable y translúcido (disco de nylon cubierto con colágena) se puede montar a manera de diafragma entre dos cámaras de Lucita llenas de medio, pasarles una corriente y con la deflexión de voltaje producido, calcular la resistencia transepitelial, la cual empieza a desarrollarse durante las cuatro a 6 horas de sembradas. El valor de esta resistencia aumenta constantemente durante las primeras 24 horas, al final de la cual alcanza un máximo, después del cual decrece hasta un valor constante, aproximadamente 10^4 Ohm cm^2 .

Si se adiciona cicloheximida (6 microgramos/ml.) en las primeras dos a seis horas de sembradas, hay un retardo en el desarrollo de la resistencia, por lo tanto, podemos suponer -

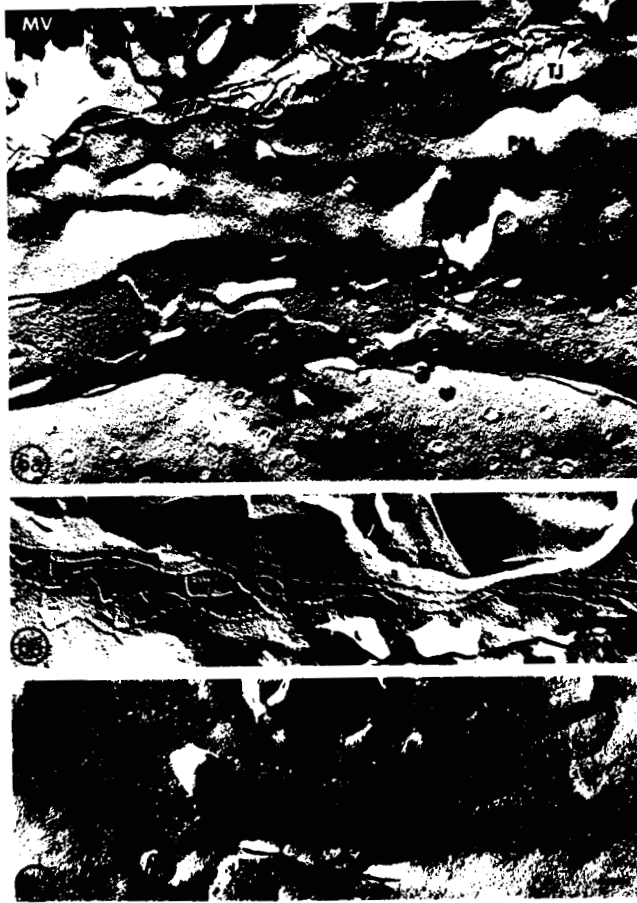


Fig. 4.1 Réplica de crio-fractura de una monocapa confluente de células MDCK. En la cara P de la membrana -- (PM) la unión oclusora (TJ) se vé abajo de las microve-- llosidades (MV). C citoplasma; N membrana interna nuclear (b) bandas de unión en cara de fractura P. (c) surcos en cara de fractura E. (Cereiido y col. 1978).

que los componentes de la unión se sintetizan en ese período de tiempo (Cereijido y col. 1981) (Fig. 4.2)

Hoi Sang y col. (1979, 1980), proponen tres fases en la formación de las uniones oclusoras de las células MDCK reagregantes: una fase inicial de síntesis (primeras 5 horas después de sembradas), una fase intermedia, correspondiente al transporte e inserción de los componentes de la unión hasta la membrana celular y, una fase de ensamblaje final de 10 a 18 horas.

Cereijido y col. (1978), observaron que la monocapa de células MDCK crecida sobre un soporte permeable, desarrolla un potencial eléctrico espontáneo de aprox. $1mV$., así la monocapa se considera un epitelio permeable, característica que constituye una clara ventaja para el estudio de eventos eléctricos a nivel de las uniones oclusoras; este valor está de acuerdo con el reportado por Misfeldt (1976), y con lo esperado para un epitelio permeable, donde la vía paracelular predomina.

La habilidad de la monocapa para discriminar entre aniones y cationes, fué calculada por Cereijido y col. 1978, midiendo el cociente entre la permeabilidad a sodio y cloro. Se obtuvieron los potenciales de dilución generados, montando la preparación entre dos soluciones Ringer conteniendo 75 y 150 mM de NaCl. Los resultados indicaron que la preparación es 8 a 9 veces más permeable a sodio que a cloro.

Los estudios de Martínez-Palomo y col. (1980), mostraron que las uniones oclusoras pueden ser abiertas cuando

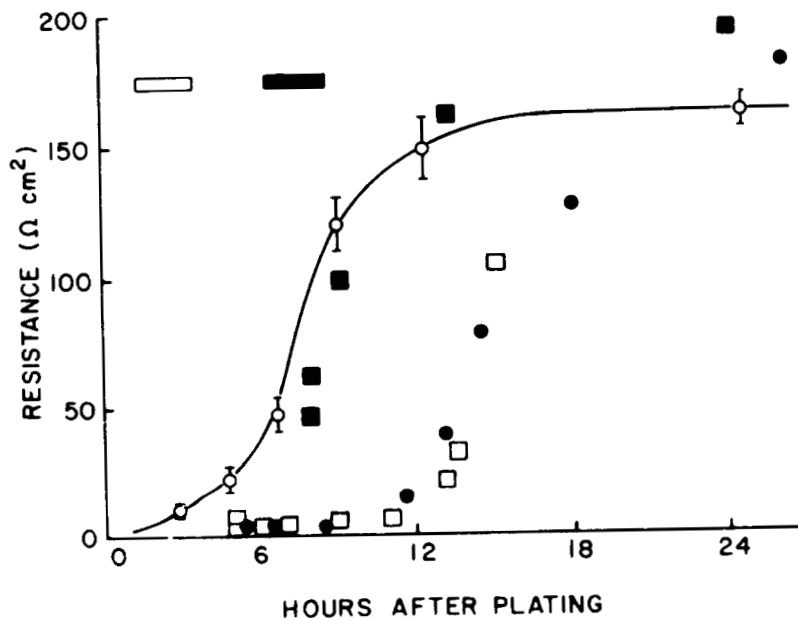


Fig. 4.2 Desarrollo de la resistencia eléctrica a través de monocapas de células MDCK sembradas a confluencia a -- tiempo cero. La resistencia eléctrica surge lentamente a medida que las uniones se sintetizan y cierran (círculos vacíos). La cicloheximida (6 microgramos/ml.) presente durante el período 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 está presente en el período marcado por el rectángulo lleno, no inhibe el desarrollo de la resistencia eléctrica (cuadrados llenos). (Cereijido y col. 1981).

la monocapa se coloca en un medio sin calcio conteniendo EGTA, ya que la resistencia transepitelial disminuye a cero (Fig. 4.3), y la micrografía electrónica muestra apertura de la unión (Fig. 4.4) (Cereiido y col. 1978). Cuando se le adició calcio, la resistencia se recuperó totalmente (Fig. 4.3).

El proceso de apertura y sellado no se afectó por la adición de cicloheximida. Estos investigadores también encontraron que existe un óptimo en la concentración de calcio, más allá de la cual la resistencia no varía notablemente (Fig. 4.5) (Martínez-Palomo y col. 1980).

Meza y col. (1980), mostraron que la asociación de los microfilamentos y la membrana plasmática, en la región de la unión oclusora, resulta en una acción concertada, lo cual regula la función de la unión.

Las uniones oclusoras de las células MDCK son impermeables a los trazadores macromoleculares de microscopía electrónica, como la lactoperoxidasa y el rojo de rutenio.

4.4 Objetivos

Con base en las preguntas planteadas al principio de este capítulo, se proponen para el presente estudio los siguientes objetivos:

- 1). Analizar el papel del calcio en el sellado de la unión oclusora.

Para estudiar lo anterior, se diseñó el siguiente protocolo: las células se siembran a confluencia sobre discos de

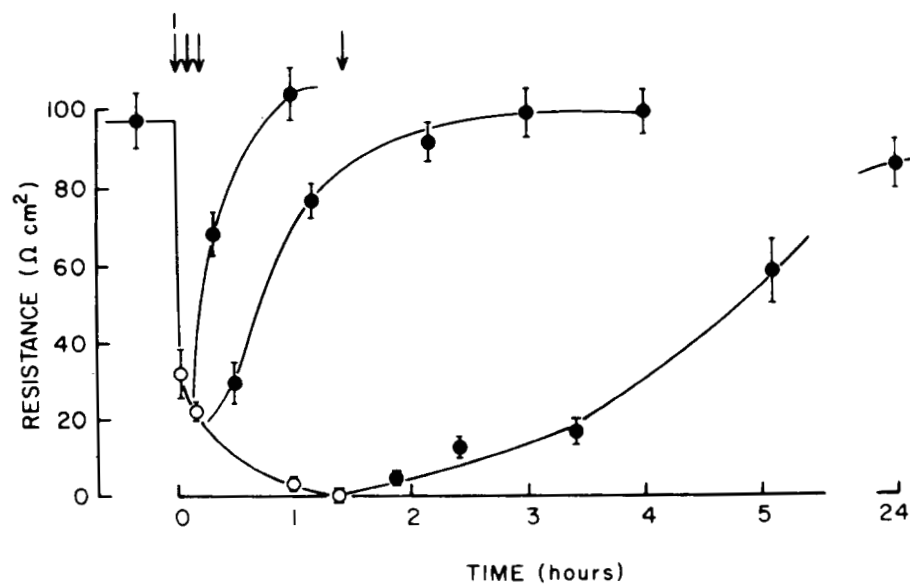


Fig. 4.3 Recuperación de la resistencia eléctrica a través de monocapas de células MDCK. En la flecha 1 todos los discos se colocan en MEM sin calcio y 2.5 mM de EGTA. El calcio se reestablece a los tiempos marcados por las flechas. (Martínez-Palomo 1980).



Fig. 4.4 (a y b) Micrografía electrónica de una monocapa de células MDCK tratadas por 10 minutos con EGTA en un medio libre de calcio. Las uniones ocluseras (flechas) y los desmosomas están abiertos. (a) 6 120 x y (b) 22 000 x. (Cereijido y col. 1978).

70197

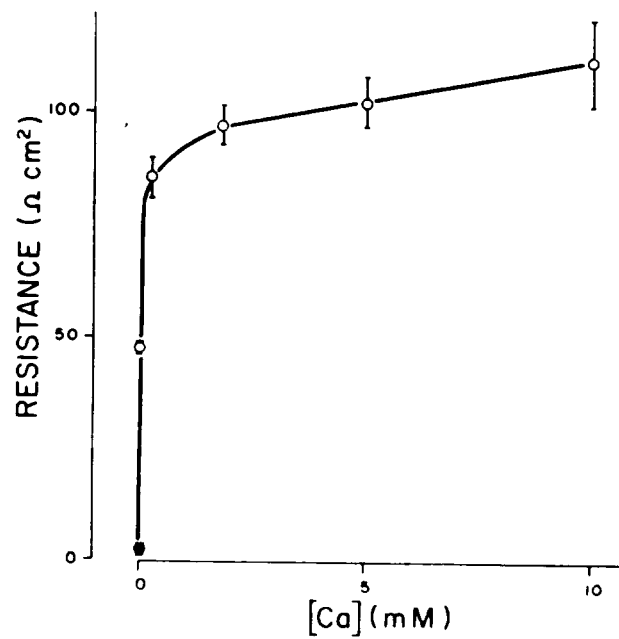


Fig. 4.5 Resistencia eléctrica en función de la concentración de calcio en el medio de cultivo. Previamente -- los discos se incuban por 45-90 minutos en medio con diferentes concentraciones de calcio. (Martínez-Palomo y col. 1980).

nylon cubiertos con colágena en un medio que contiene calcio; a los 60 minutos se pasan los discos con la monocapa a un medio sin calcio, en el cual permanecen 20 horas. Esto hace que las células se recuperen de la tripsina, se extiendan y adueñen sus bordes unas a otras. Al final de este tiempo, si se pasa la monocapa de células a un medio con calcio, es posible estudiar la cinética de sellado de la unión oclusora.

- 2). Estudiar si los componentes protéicos de la unión oclusora están formados o se sintetizan en el momento de agregar el calcio.

Se sigue el protocolo anterior, pero a las 20 horas de estar sin calcio las células, se pasan a un medio con calcio que contiene cicloheximida, en la misma concentración usada para las recién sembradas, y se sigue la cinética de sellado.

- 3). Estudiar si solamente es necesario la adhesión al sustrato para que se polaricen las células o si se necesita la unión oclusora.

Para esto, a las 20 horas de estar la monocapa en un medio sin calcio, se somete a un estudio de crio-fractura para observar si las bandas de la unión oclusora están formadas y por cuenta de las partículas intramembranales, saber si están polarizadas. Lo mismo se hace con monocapas que permanecieron 20 horas con calcio.

Como primera parte de los objetivos de esta tesis, se estudia específicamente el sellado de la unión oclusora.

Los siguientes objetivos se refieren a la permeabilidad - transepitelial.

- 4). Estudiar si la permeabilidad de la monocapa varía con la edad y número de células.

Para esto, se siembran monocapas a alta y baja densidad - celular y se sigue el desarrollo de la resistencia trans-epitelial con el tiempo de sembradas y a la vez, se cuenta el número de células que existen en ese momento.

- 5). Estudiar la relación entre la permeabilidad de la monocapa y la estructura de la unión oclusora.

Para esto, se someten monocapas de células a alta y baja densidad, de 24 y 72 horas de sembradas, a un estudio de crio-fractura, para contar el número de bandas y su profundidad.

CAPITULO V: MATERIAL Y METODOS

- 5.1 Cultivo celular
- 5.2 Cultivo de monocapas con fines experimentales sobre discos de nylon recubiertos con colágena
 - 5.2.1 Preparación de la colágena
 - 5.2.2 Preparación de los discos de nylon
 - 5.2.3 Preparación de los discos de nylon con colágena
 - 5.2.4 Siembra de células sobre discos de nylon cubiertos con colágena
- 5.3 Cultivo celular sobre caja de petri
- 5.4 Cultivo celular en botellas de plástico
- 5.5 Mediciones eléctricas
 - 5.5.1 Medición y cálculo de la resistencia de la monocapa
 - 5.5.2 Medición del potencial de dilución
Cálculo del cociente de permeabilidad sodio-cloro
 - 5.5.3 Medidas eléctricas con microelectrodos
- 5.6 Estudios morfológicos
 - 5.6.1 Crio-fractura
 - 5.6.2 Microscopía electrónica de transmisión
 - 5.6.3 Cuantificación de la morfometría de la unión --
oclusora
 - 5.6.4 Análisis de la densidad de partículas intramem-
branales (PIM)

V MATERIAL Y METODOS

5.1 Cultivo celular

Se utilizan células MDCK (Madin Darby Canine Kidney) entre los pasajes 60-70. Las células iniciadoras del cultivo fueron obtenidas de la American Type Tissue Collection.

Las células se cultivan a 35.6 grados centígrados en botellas de plástico desechables de 150 cm² de área (Costar 3150, Cambridge, Mass), en una atmósfera compuesta por 95% - de aire y 5% de CO₂ que mantiene el pH a 7.4 (incubadora VIP CO₂ 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 Col. (GIBCO) 430-1600, Grand Island, N.Y.) adicionado de 100 U/ml. de penicilina, 100 microgramos/ml. de estreptomicina, 1 U/ml. de insulina (GIBCO 600-5145 y Lilly, respectivamente) y 10% de suero de ternera (GIBCO 200-6170). A este medio se le denomina medio completo (CDMEM).

Las células se adhieren a la superficie del recipiente y forman una monocapa confluyente. El medio de cultivo se cambia cada tercer día. Las células se cosechan con una mezcla de tripsina-EDTA (GIBCO 610-5305). La suspensión de células tripsina-EDTA se centrifuga por dos minutos a 500 r.p.m. y la pastilla se resuspende en CDMEM. Esta suspensión celular se utiliza tanto para sembrar los discos de nylon, como para crecer monocapas en botellas de cultivo.

5.2 Cultivo de monocapas con fines experimentales sobre discos de nylon recubiertos con colágena.

5.2.1 Preparación de la colágena

Se disecan sobre hielo colas de rata y se desprenden los tendones longitudinales, que aparecen como hilos blancos brillantes. Después de cortarlos en pequeños pedazos, se colocan en ácido acético al 2% y frío. Se mantienen en agitación y 4 grados centígrados por una hora. La suspensión se centrifuga a 2000 g, a 4 grados centígrados, descartándose la pastilla de material insoluble. El sobrenadante se dializa contra agua destilada a 4 grados centígrados, a fin de eliminar el ácido. La solución resultante está lista para usarse. El exceso se refrigera.

5.2.2 Preparación de los discos de nylon

Como soportes se utilizan discos de nylon de 1.3 cm de diámetro, con un área de cuadro de la malla de 100 x 120 micras (HC-103 NITEX, TETKO, Inc.). Estos discos se limpian por sonicación durante 15 minutos en acetona, se enjuagan con etanol al 96% y se secan a la temperatura ambiente.

5.2.3 Preparación de los discos de nylon con colágena

Los discos de nylon se cubren con colágena sumergiéndolos en ésta, en frío; se exponen por 3-4 minutos a vapores de amoníaco a temperatura ambiente, a fin de promover el entrecruzamiento de la colágena. Se transfieren a etanol al 70% y se dejan por 24 horas para que se esterilicen. Para eliminar el etanol se lavan 5 veces con amortiguador salino de fosfatos de Dulbecco (PBS, GIBCO 450-1300) estéril. Antes de emplearse se lavan una vez con CDMEM.

5.2.4 Siembra de células sobre discos de nylon cubiertos con colágena

Cada disco se coloca en una cámara individual de una bandeja multicompartimentada con pozos de 16 mm. de diámetro (Linbro Chemical, Co. New Haven, Conn.). En cada compartimento se siembra un mililitro de la suspensión de células en --CDMEM con 10^6 células/ml.; la bandeja se incubaba a 35.6 gra--dos centígrados en un ambiente del 95% de aire y 5% de CO_2 a humedad constante. A los 90 minutos, en los cuales las células se adhieren al sustrato, se transfieren a otro compartimento que contiene un mililitro de CDMEM sin células, de esta manera se eliminan las células no adheridas al sustrato.

En los experimentos para estudiar la primera parte - de los objetivos, los discos con las monocapas se transfie--ren a un medio sin calcio (MEM sin calcio, GIBCO 410-1300).

Para los experimentos de la segunda parte de los ob- jetivos, se siembran 10^5 y 10^6 células/ml. para los tiempos de 24 horas de sembradas a baja y alta densidad, respectiva- mente; para las 72 horas se siembran 10^4 y 10^6 células/ml. - para baja y alta densidad, respectivamente.

5.3 Cultivo celular sobre caja de Petri

Se siembran 2 ml. de la suspensión celular por caja de Petri de plástico de 8 cm^2 de área cultivable (Lux 5221, Miles Laboratories, Naperville, II).

5.4 Cultivo celular en botellas de plástico

Se siembran 10 ml. de suspensión celular por botella

Falcon de 75 cm² de área de cultivo (Falcon 3024, Oxnard, Cal.)

5.5 Mediciones eléctricas

Los discos se colocan a manera de diafragma entre dos cámaras de lucita con un volúmen cada una de 1 cm³. El área del disco que queda expuesta es de 0.23 cm². La diferencia de potencial eléctrico entre las dos cámaras se registra con un par de electrodos de Ag/AgCl colocados a 1 mm. de distancia a cada lado del disco o conectado a un voltímetro. La corriente se pasa a través de electrodos de Ag/AgCl colocados a 2 cm. de la monocapa. A fin de evitar potenciales de asimetría entre los electrodos de Ag/AgCl, éstos se preparan de la siguiente manera:

En un vaso de precipitados de 100 ml. conteniendo HCl 1.0 normal, se coloca un ánodo de alambre de Ag enrollado en forma Helicoidal sobre la pared interna del vaso. En el centro se sumergen dos alambres de Ag que actúan como cátodos y se hace circular corriente para producir la electrólisis. En estas condiciones los dos cátodos están sometidos a un campo eléctrico igual y constante y en consecuencia, se "platean" en forma pareja. Se obtienen así dos electrodos de Ag/AgCl con un potencial de asimetría entre 0 y 0.1 mv.

5.5.1 Medición y cálculo de la resistencia de la monocapa

La monocapa epitelial adherida al disco de colágena se monta entre las dos cámaras conteniendo medio esencial mínimo completo (salvo que se especifique el uso de otras solu

ciones). Se pasa un pulso de corriente de 20 micro ampere y se mide el cambio de potencial registrado. La resistencia -- por unidad de área se calcula según la siguiente ecuación:

$$R' = V' \cdot A/I$$

donde V' es la diferencia de potencial medida al pasar una corriente I de 20 micro ampere a un área de disco A de 0.23 cm^2 .

A este valor R' se descuenta la resistencia de la solución contenida en la cámara y la resistencia del soporte - (disco de nylon cubierto con colágena). Este valor se obtiene de la misma forma que el anterior pero colocando entre ambas cámaras un disco libre de células.

Así pues, la resistencia de la monocapa epitelial resulta ser:

$$R = R' - R'' = A (V' - V'') / I$$

donde R' y R'' son las resistencias por unidad de área del -- disco cubierto por la monocapa y del disco libre, respectivamente; A es el área expuesta del disco (0.23 cm^2), I es la - intensidad de la corriente (20 microampere); V' y V'' son las diferencias de potencial registradas en presencia y ausencia de la monocapa epitelial respectivamente.

5.5.2 Medición del potencial de dilución. Cálculo del cociente de permeabilidad sodio-cloro

La monocapa epitelial adherida al disco se monta entre dos cámaras de lucita. La cámara en contacto con el lado

basolateral de la preparación, es decir, el que está pegado - al soporte, contiene una solución 150 mM de NaCl. El lado luminal de la preparación está bañado por una solución 75mM de NaCl. Se genera así, una fuerza impulsora desde el lado basolateral hacia el luminal, debida al gradiente de concentraciones, pero como dentro de la membrana el catión sodio tiene mayor movilidad (es más permeable) que el anión cloruro, aparece inmediatamente una diferencia de potencial que hace positivo el lado luminal y negativo el lado basolateral. Esta diferencia de potencial es el llamado "potencial de dilución". Para medirlo correctamente es necesario trabajar a temperatura constante y con agitación enérgica.

La ecuación de Goldman-Hodkin-Katz permite calcular - el cociente de permeabilidades entre catión y anión, conociendo el potencial de dilución y las actividades a cada lado de la membrana.

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{Na} a'_{Na} + P_{Cl} a''_{Cl}}{P_{Na} a''_{Na} + P_{Cl} a'_{Cl}} \quad \text{Ec. \# 1}$$

donde E es el potencial de dilución; R, T y F tienen sus significados habituales; P_{Na} y P_{Cl} son las permeabilidades de la membrana al catión sodio y al anión cloruro y $a'_{Na} = a'_{Cl}$ y $a''_{Na} = a''_{Cl}$ son las actividades medias del electrólito NaCl en las soluciones externa e interna, respectivamente. Llamando beta al cociente de permeabilidades entre cloro y sodio.

$$B = \frac{P_{Cl}}{P_{Na}}$$

la ecuación # 1 resulta:

$$E = - \frac{RT}{F} \ln \frac{a'_{Na} + Ba''_{Cl}}{a''_{Na} + Ba'_{Cl}}$$

y en consecuencia:

$$B = \frac{a'_{Na} - a''_{Na} e^{-E F/R T}}{a'_{Cl} e^{-E F/R T} - a''_{Cl}}$$

Los potenciales de dilución se determinan utilizando las siguientes soluciones:

lado luminal NaCl 75mM, CaCl₂ 1mM, TRIS 1.5mM, sacarosa 150 mM.

lado basolateral NaCl 150 mM, CaCl₂ 1mM, TRIS 1.5mM, sacarosa 150 mM. pH de ambas soluciones = 7.4

5.5.3 Medidas eléctricas con microelectrodos

El registro con microelectrodos fué hecho en monocapas cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio cubiertos con colágena, sobre la platina de un microscopio de contraste de -fases Leitz. La solución de registro fué CDMEM. Los experi--mentos fueron llevados a cabo a 37 grados centígrados. La --temperatura del baño fué electrónicamente controlada y fué -monitoreada con un extremo pequeño de un teletermómetro YSI localizado cerca a la monocapa. Para evitar la evaporación -de la solución, ésta se cubrió con una capa delgada de acei-te.

70197

Los microelectrodos se hicieron con un P77 Brown Flaming, Sutter Ins, Co. de tubos capilares de microfibras de vidrio de Borosilicato. Fueron llenados con una solución 3 M de KCl o 4M de acetato de potasio. Se prefirió microelectrodos llenos de acetato de potasio, ya que tienen menos rectificación. Las resistencias de los microelectrodos variaron de 60-250 m Ohm. En la mayoría de los casos se usaron microelectrodos con resistencias de 100-150 M Ohm, la cual dá penetración estable y muestran pocas propiedades de rectificación con la corriente que se usó (menos de 0.5 micro ampere).

Los microelectrodos fueron conectados a amplificadores de alta impedancia estandar (WPI KS 700) lo cual permite registrar el potencial de membrana e inyectar corriente simultáneamente, vía un circuito sustractor.

La corriente inyectada fué registrada con un pre amplificador WIP (KS 700) o vía un convertidor corriente voltaje (analog Devices 52), con 100 M Ohm en el asa alimentadora negativa, así, 1 mv = 0.01 nano ampere. El baño se conectó a tierra vía un alambre de AgCl el cual fué conectado a la entrada negativa del convertidor corriente-voltaje.

Antes de la penetración el circuito sustractor del voltaje fué cuidadosamente ajustado repartiendo pulsos de corriente de 0.1-1 nano ampere.

Una vez que la célula fué penetrada, fueron necesarios ligeros ajustes del balance, y el punto nulo puede ser acertadamente determinado debido a la gran constante de tiempo relativo de la membrana, en comparación con la constante

de tiempo del circuito de registro. Este procedimiento pudo ser óptimamente obtenido con la compensación de la capacidad negativa antes de la oscilación.

Los pulsos de corriente de amplitudes crecientes fueron repartidos para obtener la relación corriente/voltaje. La constante de tiempo de la membrana fué medida al 63% del nivel del estado de equilibrio del voltaje de respuesta. Los microelectrodos fueron montados sobre una pieza de mando piezoeléctrica (Burleigh, Inchworm Controller, PZ 550) montado sobre un micromanipulador tipo Huxley. Para penetrar las células se fueron dando pasos de 4 micro metros.

5.6 Estudios morfológicos

5.6.1 Crio-fractura

Las réplicas de crio-fractura se obtienen de monocapas sembradas en botellas de 75 cm² 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 una hora. Enseguida la monocapa se raspa del sustrato y se congela en freón 22 enfriado a -196 grados con nitrógeno líquido. La crio-fractura se realiza con un aparato Balzers 300 (FL 9496, Balzers Leichenstein) equipado con una bomba turbo molecular a -120 grados centígrados y un vacío de 2×10^{-6} mm de Hg. Después de la evaporación del platino y el carbón, las réplicas se lavan en hipoclorito de sodio por 24 horas. Finalmente se enjuagan con agua destilada y se recogen en rejillas

cubiertas con forvar. La observación de las réplicas se hace en un microscopio electrónico Zeiss EM 10 (Zeiss, Oberkochen Germany).

Hacemos notar que las monocapas que estuvieron 20 - horas sin calcio, al despegar la monocapa del sustrato las - células se dispersaron y hubo que formar una pastilla por -- centrifugación. Las muestras para congelar se tomaron con pipeta Pasteur.

5.6.2 Microscopía electrónica de transmisión

Las monocapas sembradas en caja de Petri de 8 cm² - de área, se fijan con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacolidato de sodio al 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.). Posteriormente se deshidratan en series graduales y se embeben en epon 812. Los cortes finos se hacen con navaja de diamante y se recogen en rejillas recubiertas con forvar. Las muestras se tiñen con citrato de plomo y acetato de uranilo. Se examinan con un microscopio electrónico Zeiss EM 10.

5.6.3 Cuantificación de la morfometría de la unión oclusora

A fotografías de las réplicas de crio-fractura am--pliadas a 83000 x se les traza una línea paralela al eje -- principal de la unión y líneas perpendiculares a ésta 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 solo filamento se considera - profundidad cero. Los datos obtenidos se procesan con el programa de distribución normal en una microcomputadora Hewlwt Packard 85 C.

5.6.4 Análisis de densidad de partículas intra- membranales (PIM)

A fotografías de réplica de crio-fractura de membrana plasmática con un aumento de 110 000 X, se les trazan círculos de 4.52 cm^2 de área ($0.037 \text{ micrómetros}^2$ de membrana) en los que se cuenta el 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 $\# \text{ PIM/ micrómetro}^2$ error estandar. La -- identificación positiva de las regiones de membranas estudiadas apical y basolateral, fué llevada a cabo tomando en cuenata:

- i) La presencia de microvellosidades crio-fracturadas en - el caso de la superficie apical.
- ii) desmosomas, uniones ocluseras, ausencia de microvellosidades y presencia de vesículas pinocíticas, en la re -- gión basolateral.

CAPITULO VI: RESULTADOS Y DISCUSION

- 6.1 El desarrollo de la resistencia
- 6.2 Papel del calcio en el mantenimiento de la unión oclusora
- 6.3 Papel del suero en el sellado de la unión por calcio
- 6.4 Papel del calcio en la síntesis de los componentes protéicos de la unión oclusora
- 6.5 Papel del calcio en la estructura de la unión oclusora y la polaridad celular epitelial
- 6.6 Permeabilidad de la monocapa con la edad y número de células
- 6.7 Relación entre estructura y función de la unión oclusora

VI RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 El desarrollo de la resistencia

El uso de cámaras de plástico para determinar las propiedades eléctricas y flujos iónicos de epitelios de anfibio, se conoce desde los trabajos clásicos de Ussing, (1960.)- Muchos investigadores han considerado la posibilidad de que un artefacto de la conductancia real puede ocurrir en los bordes fijados de una preparación.

Así, la permeabilidad anormal en los bordes, lleva a una reducción en la diferencia de potencial, con el correspondiente incremento de la conductividad del tejido. Entonces, el flujo transepitelial de iones marcados se puede aumentar en ambas direcciones, obscureciendo pequeños cambios en la verdadera permeabilidad iónica pasiva, en respuesta a varios estímulos (Walser 1970).

Civan y col. (1966), redujeron el daño de borde aplicando una presión mínima para fijar el tejido y, no encontraron cambios en la diferencia de potencial.

Un examen más directo de borde fué llevado a cabo por Dobson y Kidder (1968) en piel de rana, en la cual midieron la extensión y características de esta región de daño, variando el cociente borde/superficie, en cámaras de diseño especial. Encuentran que en el área dañada, la cual se extiende aproximadamente 0.7 mm. del borde fijado, los espacios intercelulares están alargados y la conductividad iónica pasiva se incrementa, explicado por la caída en la diferencia de potencial transepitelial. La corriente de corto circuito no se al-

tera y esto sugiere que las células que llevan a cabo el transporte activo no se alteran en la zona de daño, pero sí la conductancia pasiva entre las células, y esto último es responsable del cambio en la diferencia de potencial observada.

Así, cualquier proceso, el cual lleve a la apertura de los espacios intercelulares, así como, el estiramiento - ejercido en el montaje del tejido a la cámara, bajará la diferencia de potencial por decremento en la resistencia de la vía paracelular, pero la resistencia total no disminuye hasta cero, ya que la resistencia transepitelial tiene dos componentes: - uno intercelular, el cual disminuye por el daño y, otro intracelular, el cual no cambia.

Para ver si dicho daño de borde puede perturbar - los valores de la resistencia medida, se estudió el valor de la resistencia por cm^2 de monocapas, medida en cámaras de distinta área expuesta. El valor encontrado corresponde exclusivamente a la monocapa, ya que se le ha descontado la resistencia de la solución y del soporte. Las áreas de monocapas expuestas fueron las siguientes: 1.43, 0.69 y 0.23 cm^2 .

La tabla 6.1 muestra que en cada área medida el valor de la resistencia fué de $220 \pm 21(9)$, $228 \pm 13(10)$ y $266 \pm 16(18)$ respectivamente. Como observamos, no hay diferencia significativa entre cada uno de los valores. Estos resultados indican que no hay bordes dañados y, que por lo tanto, se pueden - hacer las medidas en cualquiera de estas cámaras; las medidas de resistencia eléctrica de las monocapas estudiadas se hicieron en la cámara de 0.23 cm^2 y los potenciales de dilución se midieron en la cámara de 0.69 cm^2 de ventana.

Una vez optimizadas las condiciones experimentales, se midió la evolución de la resistencia de la monocapa de células con el tiempo de sembradas.

La figura 6.1 muestra la gráfica obtenida. La resistencia empieza a desarrollarse a las 5-6 horas de postsiembra, alcanza un máximo aproximadamente a las 24 horas y después baja continuamente hasta el 7° día; esto está de acuerdo con lo encontrado con Cereiido y col. (1978).

Tabla # 6.1

AREA DE LA MONOCAPA (cm ²)	RESISTENCIA TRANSEPITELIAL (Ohm cm ²)
1.43	220 ± 21 (9)
0.69	228 ± 13 (10)
0.23	266 ± 16 (18)

Resistencia transepitelial de monocapas de células MDCK de distinta área expuesta ± error standar (número de determinaciones). Intensidad de la corriente 100 microampere/cm². Diferencia no significativa por análisis estadístico (t student)

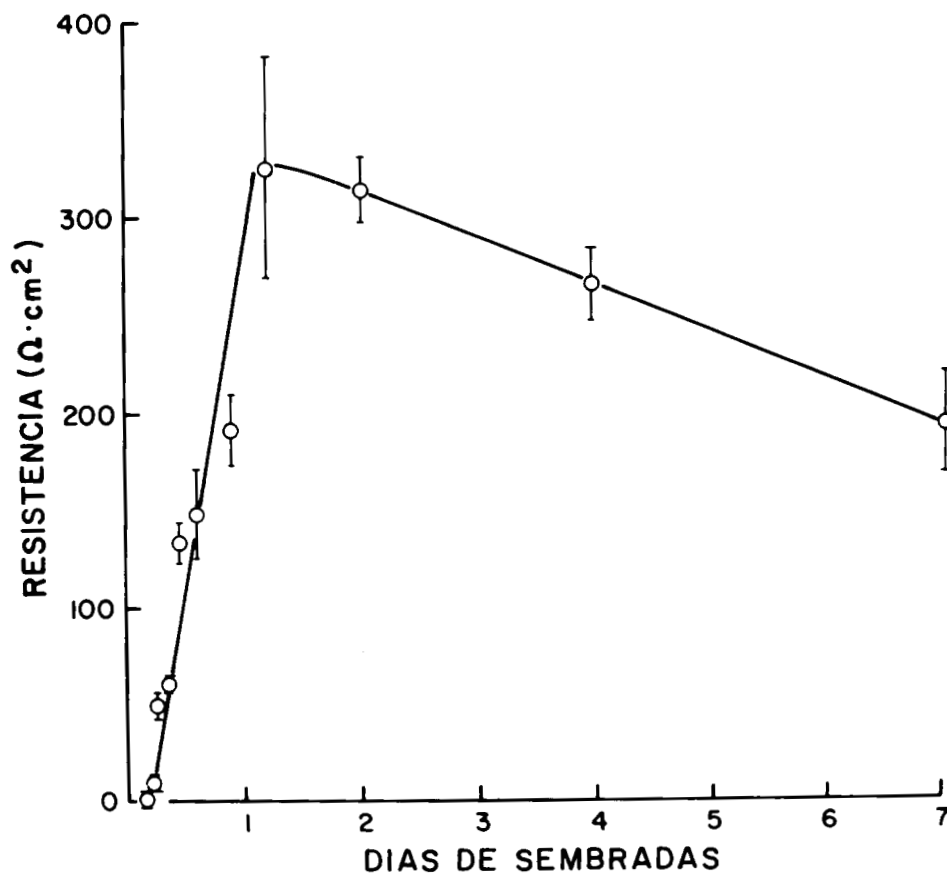


Fig. 6.1 Desarrollo de la resistencia eléctrica en monocapas de células MDCK sembradas a confluencia sobre un disco de nylon cubierto con colágena. Los discos se montan entre dos cámaras de lucita conteniendo CDMEM a temperatura ambiente (20 grados centígrados) para medición de su resistencia transepitelial. El área de la monocapa expuesta fué de 0.23 cm^2 . La corriente transmonocapa fué de $100 \text{ microAmpere/cm}^2$.

Uno de los objetivos de esta tesis, fué estudiar los fenómenos que determinan este particular curso temporal de la resistencia, al que podríamos dividir, para fines de análisis, en una primera etapa de ascenso (primeras 24 horas) y, una segunda etapa de descenso (días subsiguientes). Respecto de la primera etapa, es de suponerse que esta cinética está reflejando una serie de procesos (reponerse de la tripsina, extenderse, etc.) algunos de los cuales poco tienen que ver con el proceso que nos interesa: la formación de la unión oclusora. Por esta razón se diseñó un protocolo que permite descartar la influencia de estos factores y estudiar exclusivamente el rol del calcio, del suero y de la síntesis de proteínas en el desarrollo de la resistencia, y su correlato estructural con la aparición de la unión oclusora. Los incisos 6.1 a 6.5, analizan los procesos involucrados en la etapa de desarrollo de la resistencia.

Con respecto a la segunda etapa, nos preguntamos, cuál es la razón de la monótona caída de la resistencia con el -- tiempo. Experimentalmente analizamos si ésta podría deberse a un aumento de la densidad celular, con el consiguiente aumento de la "longitud" de vías paracelulares o zonas conductoras o bien, a un aumento en la permeabilidad específica de la -- unión oclusora, o, como tercera posibilidad, a un aumento en la permeabilidad de la membrana celular con el consiguiente -- aumento de la permeabilidad transcelular. En las secciones -- 6.6 y 6.7 se analiza la posible contribución de estos facto--res sobre la caída observada en la resistencia.

6.2 Papel del calcio en el mantenimiento de la unión oclusora

Galli y col. (1976) y Meldolesi y col. (1978), mostraron que el calcio es fundamental para el mantenimiento de la estructura de las uniones oclusoras. En las monocapas de células MDCK, este fenómeno fué estudiado por primera vez por Ce-reijido y col. (1978), los cuales mostraron que al quitar el calcio y añadir EGTA al medio de cultivo, se produce una drástica caída de la resistencia. Si se restituye el calcio y se quita el EGTA, la resistencia sube nuevamente a los valores testigo, aunque con una cinética mucho más lenta. Esta caída de la resistencia producida por la falta de calcio se estudió también en la mucosa gástrica de rana (Forte y Nauss, 1963). Los estudios de Martínez Palomo y col. (1980), mostraron que la función de la unión oclusora como barrera de permeabilidad específicamente depende de la concentración de calcio extracelular, y no de Magnesio o Bario, aunque pertenecen a la familia del calcio. Las micrografías electrónicas de cortes transversales de monocapas de células MDCK, tratadas con bajo calcio y adicionadas de EGTA, muestran que la caída de la resistencia coexiste con una marcada apertura de las uniones intercelulares (Martínez Palomo y col. (1980).

Estos experimentos indican que el calcio es esencial para la unión entre las células vecinas, posiblemente por la formación de puentes salinos, entre este catión divalente y sitios negativamente cargados de las dos membranas en aposición. En estos trabajos se utilizó EGTA como agente quelante del calcio y, por consiguiente, para abrir la unión entre las células. Diseñamos un procedimiento distinto, en el cual no se utilizó

EGTA para abrir la unión. Esto es porque el EGTA, al ser un agente quelante, puede afectar la morfología y función de los componentes de la unión oclusora (Pitelka y col. 1983).

Como observamos en la figura 6.1 hay un retardo en la aparición de la resistencia, la cual empieza a desarrollarse aproximadamente 3-5 horas después de sembrar las células; esto resulta lógico, si pensamos que las células se deben depositar sobre la colágena, recuperarse de la tripsina, extenderse, adecuar sus bordes a las vecinas, resintetizar los componentes de la unión oclusora y sellarse. A fin de eliminar la influencia de todos estos procesos, y estudiar exclusivamente el de sellado, diseñamos el siguiente experimento:

En la figura 6.2, los círculos blancos ilustran el desarrollo de la resistencia de monocapas en CDMEM, el cual contiene calcio, y los círculos negros corresponden a monocapas que fueron sembradas en medio completo, pero que a los 90 minutos, se pasaron a un medio sin calcio; 20 horas después, -- mientras que los controles presentan una resistencia de 250 Ohm cm^2 , las monocapas que estuvieron en un medio sin calcio, presentaron resistencia nula. Estas monocapas vistas al microscopio invertido, están completas y sin espacios entre las células, sin embargo, su resistencia evidencia que las uniones no están selladas. Si ahora les agregamos un medio con calcio (CDMEM), la resistencia sube, pero con una velocidad mayor que los controles. Con lo anterior podemos constatar -- que el calcio es necesario para sellar la unión.

La rapidez del proceso lleva a preguntarnos, si los componentes de la unión están ya sintetizados y la cinética --

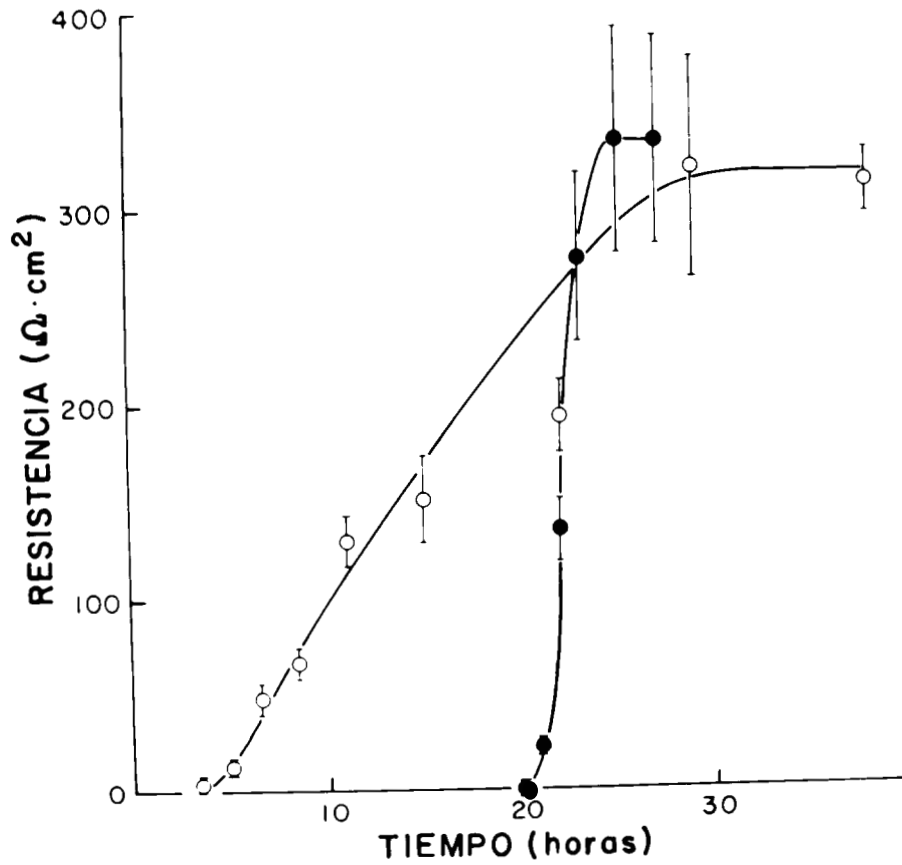


Fig. 6.2 Resistencia transepitelial de monocapas de células MDCK, las cuales permanecieron en un medio con calcio (círculos blancos) el tiempo marcado en la gráfica y, en un medio sin calcio por 20 horas, al cabo del cual se les adicionó -- calcio (círculos negros).

observada corresponde exclusivamente al ordenamiento y sellado de la unión. Para comprobar esta hipótesis, es necesario bloquear la síntesis de proteínas durante este lapso, experimentos que se describen en el punto 6.3.

Como se observa en la figura 6.2 a las 20 horas de permanecer la monocapa sin calcio, funcionalmente las uniones oclusoras no están formadas. Entonces, para constatar si las uniones oclusoras están morfológicamente abiertas antes de agregarles el calcio, se observaron por microscopía electrónica de barrido monocapas que permanecieron 20 horas con calcio y sin calcio. La figura 6.3 a, muestra que la monocapa que permaneció en un medio con calcio, las células se encuentran en aposición y sin espacios entre ellas.

En la figura 6.3 b, se observa que en las células que permanecieron 20 horas sin calcio, hay espacio entre ellas. En ambos casos se observan microvellosidades en la cara apical. Sin embargo, en las monocapas que se mantuvieron sin calcio, las microvellosidades tienden a abandonar la zona de la unión intercelular, hecho que ya ha sido descrito en células mamarias (Pitelka y Taggart 1983). Por esta razón, no sabemos si las células están realmente separadas entre sí o si están selladas, pero hay disminución de vellosidades en la zona de la unión. Para diferenciar entre estas 2 posibilidades, se observó por microscopía electrónica de transmisión, la penetración del rojo de rutenio en monocapas sembradas a confluencia, que permanecieron 20 horas con calcio y sin calcio.

La figura 6.4 a, muestra la micrografía de las células que permanecieron 20 horas con calcio, en la cual se obser

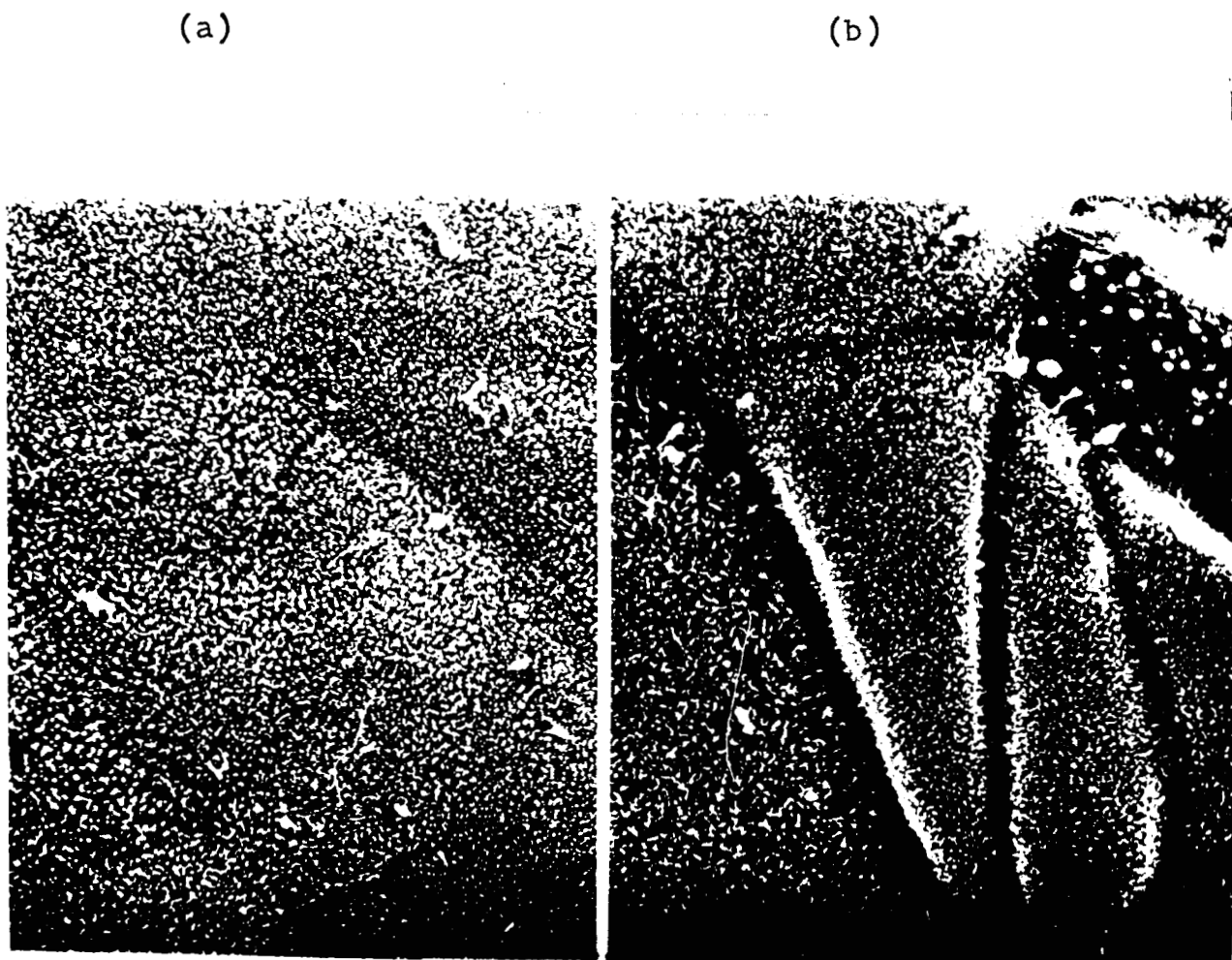


Fig. 6.3 Micrografía electrónica de barrido de (a) monocapas que permanecieron 20 horas en un medio con calcio y (b) en un medio sin calcio. En la fotografía (b) se observan -- los dos tipos de células que reporta Valentich (1981).

va la unión oclusora y debajo de ella los desmosomas y el espacio intercelular, entre dos células vecinas. El rojo de rutenio tiñe la superficie apical, pero no penetra a través de la unión oclusora.

En la figura 6.4 b, el corte muestra dos células MDCK - pertenecientes a una monocapa que se mantuvo durante 20 horas en un medio libre de calcio. El rojo de rutenio tiene libre acceso al espacio intercelular y lo tiñe completamente.

Estos experimentos muestran que con el protocolo utilizado, las células forman una monocapa perfecta pero, que el -- calcio es fundamental para que los extremos apicales se sellen.

6.3 Papel del suero en el sellado de la unión oclusora por calcio

En primer lugar estudiamos si es necesario el suero en el sellado de la unión por el calcio, ya que es uno de los componentes más importantes del medio completo. Debido a que en los siguientes experimentos emplearemos un medio sin calcio al cual le agregamos 2mM de calcio (misma concentración que el -- DMEM empleado en la preparación del CDMEM), debemos conocer si el suero influye en la aparición de la resistencia transepitelial cuando le agregamos un medio con calcio, sin suero o con suero, después de mantener las monocapas en un medio sin calcio. Para esto, sembramos las células en un medio completo y a los 90 minutos las sometimos a varias condiciones experimentales:

La tabla 6.2 muestra que las monocapas que se mantuvieron en un medio completo (CDMEM) por 20 horas, presentaron una resistencia de $136 \pm 20 (7) \text{ Ohm cm}^2$ y cuando se cambiaron al -

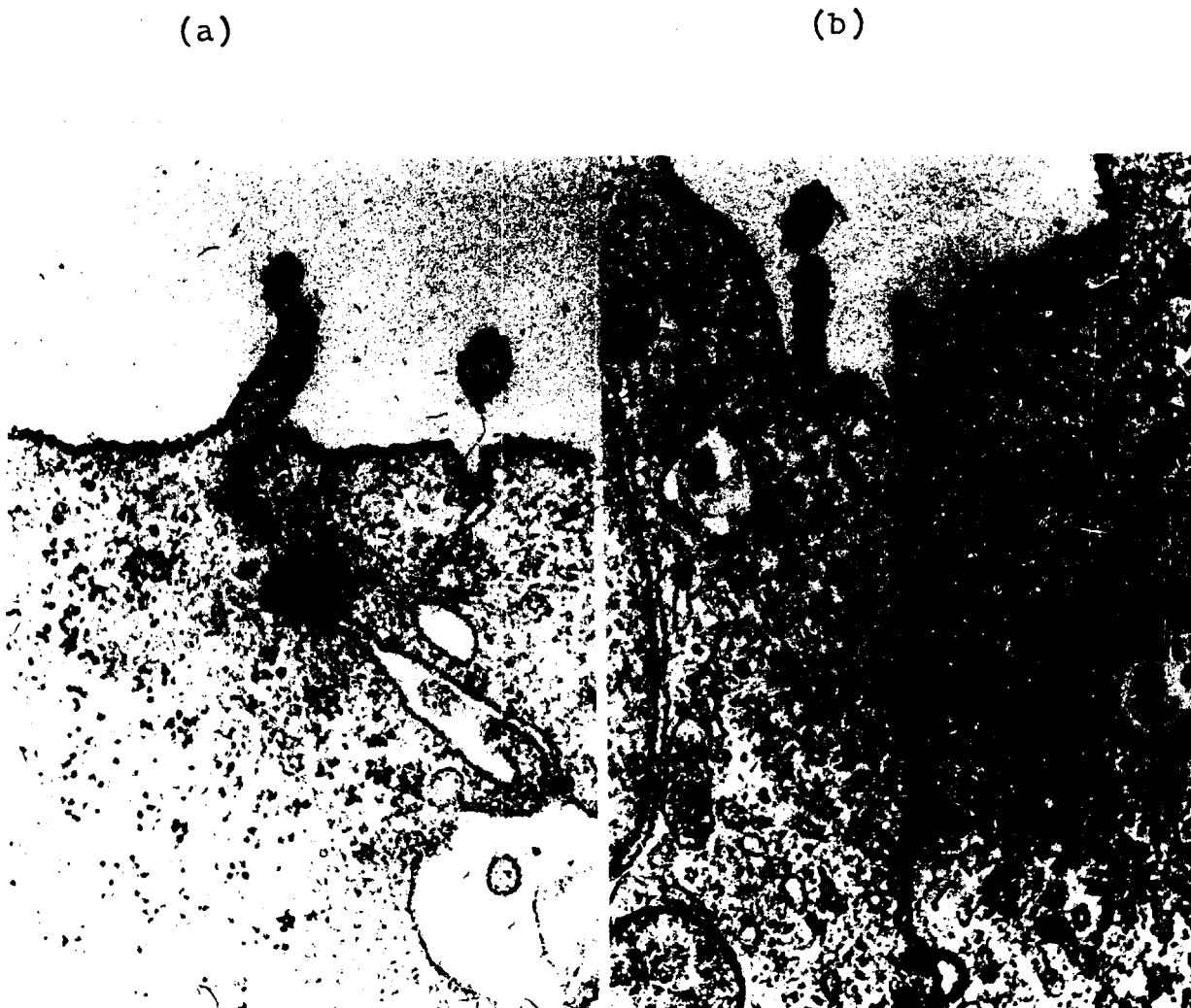


Fig. 6.4 Micrografía electrónica que muestra el tratamiento con rojo de rutenio de (a) monocapas que permanecieron en un medio con calcio y (b) en un medio sin calcio durante 20 horas. Se observa que el rojo de rutenio penetra al espacio intercelular en las células que permanecen 20 horas sin calcio.

TABLA 6.2

SELLADO DE LA UNION OCLUSORA ENTRE CELULAS MDCK: efecto del suero

Condiciones después de la siembra	Resistencia eléctrica (20 horas)	Condiciones	Resistencia eléctrica (24 horas)
	<u>Ohm cm²</u>		<u>Ohm cm²</u>
CDMEM	136 ± 20(7)	CDMEM	130 ± 13(9)
MEM con calcio	108 ± 5(8)	MEM con calcio	93 ± 6(10)
MEM sin calcio	0 ± 0(6)	MEM con calcio	141 ± 11(9)
MEM sin calcio	0 ± 0(6)	CDMEM	111 ± 15(10)

CDMEM = medio esencial mínimo más 10% de suero fetal bovino
MEM con calcio = medio esencial mínimo sin calcio adicionado de 2 mM de calcio
MEM sin calcio = medio esencial mínimo sin calcio

Todas las células fueron sembradas en CDMEM y a los 90 minutos fueron transferidas al medio enlistado en la primera columna. 20 horas después de permanecer en ese medio - segunda columna. El resto de los discos fueron transferidos a la tercera columna e incubados por 4 horas. Al final de este período la resistencia eléctrica fué medida, -- cuarta columna.

Area de la monocapa expuesta 0.23 cm². Corriente transmonocapa = 100 micro Ampere/cm²
Media ± error estandar (número de observaciones).

mismo tipo de medio por 4 horas, desarrollaron una resistencia de 130 ± 13 (9) Ohm cm^2 .

Otro lote de monocapas se mantuvo en un medio sin calcio adicionado de 2mM de calcio pero sin suero, las cuales presentan resistencia de 108 ± 5 (8) al cabo de 20 horas, si estas monocapas se mantienen por otras 4 horas en un medio sin calcio adicionado de 2mM de calcio y sin suero, presentan una resistencia de 93 ± 6 (10).

Un tercer lote de monocapas permaneci6 20 horas en un medio sin calcio, al cabo del cual presentan una resistencia nula; un lote de estas monocapas se pasa a un medio sin calcio adicionado de 2mM de calcio y sin suero durante 4 horas y presentan una resistencia de 141 ± 11 (9); el otro lote se pasa a un medio completo, el cual contiene suero, durante el mismo tiempo y presentan una resistencia de 111 ± 15 (10). De lo anterior podemos deducir que el selle de la uni6n oclusora necesita calcio y no se afecta por la presencia o ausencia de suero en el medio. Entonces, podemos emplear en los siguientes experimentos un medio adicionado de calcio pero sin suero, al cual le llamaremos medio con calcio.

6.4 Papel del calcio en la sntesis de los componentes proticos de la uni6n oclusora

Hasta aquf los experimentos realizados no nos indican si los componentes de la uni6n oclusora ya est6n formados y el calcio s6lo los une, o, si el calcio dispara la sntesis de algunos componentes y luego los une. Para contestar la pregunta anterior, diseamos el siguiente experimento:

Las células se siembran en un medio completo y a los 90 minutos se pasa un lote de monocapas a un medio con calcio, -- las cuales al cabo de 24 horas presentan una resistencia de -- $183 \pm 10(12)$ Ohm cm^2 . Otro lote se pasa a un medio sin calcio, en el cual permanecen durante 20 horas, al final del cual presentan una resistencia nula. Las monocapas que permanecieron -- 20 horas en un medio sin calcio se dividen en dos lotes; el -- primer lote se pasa a un medio con calcio, las cuales presen-- tan una resistencia de $179 \pm 10(12)$ a las 4 horas de incuba-- ción; el segundo lote se transfiere a un medio con calcio adi-- cionado de 6 microgramos/ml. de cicloheximida y al cabo de 4 -- horas presentan una resistencia de $182 \pm 10(12)$. Observamos -- que la resistencia eléctrica alcanza los mismos valores en uno y otro grupo experimental, demostrando que los componentes pro-- téicos de la unión oclusora ya están formados.

6.5 Papel del calcio en la estructura de la unión oclusora y la polaridad celular epitelial

La técnica de crio-fractura muestra que las uniones -- oclusoras aparecen en forma de bandas en la cara E y surcos so-- bre la cara P. A fin de determinar si estas estructuras carac-- terísticas de la unión oclusora aparecen antes y/o después de agregar el calcio, sometimos a las monocapas que permanecieron 20 horas en un medio sin calcio, a la técnica de crio-fractura. Esta revela que en ausencia de calcio no hay bandas pero que -- después de 4 horas en presencia de calcio, ya se han desarro-- llado. Ahora bien, puede que los componentes de la unión oclu-- sora estén acomodados en la membrana epitelial en forma de par-- tículas intramembranales y sólo esperen ser unidas por el cal-- cio, para formar las bandas. Para probar lo anterior, contamos

TABLA 6.3

SELLADO DE LA UNION OCLUSORA EN CELULAS MDCK: efecto de la cicloheximida

Condiciones después de la siembra	Resistencia eléctrica (20 horas)	Condiciones	Resistencia eléctrica (24 horas)
	<u>Ohm cm²</u>		<u>Ohm cm²</u>
MEM con calcio		MEM con calcio	183 ± 110(12)
MEM sin calcio	0 ± 0 (6)	MEM con calcio	179 ± 10(12)
		MEM con calcio + Cy	182 ± 10(12)

MEM con calcio = medio esencial mínimo adicionado de 2 mM de calcio

MEM sin calcio = medio esencial mínimo sin calcio

MEM con calcio + Cy = medio esencial mínimo adicionado de 2 mM de calcio y de 6 microgramos/ml. de cicloheximida

Se sigue el mismo protocolo de la tabla 6.2

Area de la monocapa expuesta 0.23 cm². Corriente transmonocapa = 100 micro Ampere/cm²

Media ± error estandar (número de observaciones).

el número de partículas intramembranales (PIM) en las caras de fractura E y P, tanto apical como basolateral y, en presencia y ausencia de calcio.

La figura 6.5 muestra las réplicas de crio-fractura, -- donde observamos las partículas intramembranales en las caras de fractura E y P de las membranas apical y basolateral, en -- presencia y ausencia de calcio. Cualitativamente no se obser-- van diferencias entre las membranas apical y basolateral. Para un análisis cuantitativo, las partículas intramembranales 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 con-- tar las PIM contenidas en círculos de 4.5 cm^2 , que representa un área de membrana de $3.7 \times 10^{-8} \text{ m}^2$ (Fig. 6.6).

La tabla 6.4 resume los resultados obtenidos. Se obser-- va que en las condiciones control hay una marcada asimetría en la densidad de las PIM, siendo éstas más abundantes en la cara P que en la cara E ($114 \pm 47(12)$ contra $727 \pm 34(17)$ en la api cal y $2704 \pm 78(13)$ contra $962 \pm 62(20)$ en la cara basolateral. La asimetría también es muy marcada entre los dominios basola-- teral y apical, siendo la densidad de PIM mayor en el primero que en el segundo ($2704 \pm 78(13)$ en la basolateral, contra -- $1114 \pm 47(12)$ en la apical, de las caras de fractura P, y, -- $962 \pm 62(20)$ en la basolateral, contra $727 \pm 34(17)$ en la api-- cal, de las caras de fractura E.

Las monocapas que permanecieron 20 horas sin calcio, -- mantiene la polaridad entre las caras P y E de los dominios -- apical y basolateral, pero no hay diferencias entre los domi-- nios apical y basolateral ($2629 \pm 61(35)$ contra $6241 \pm 62(45)$

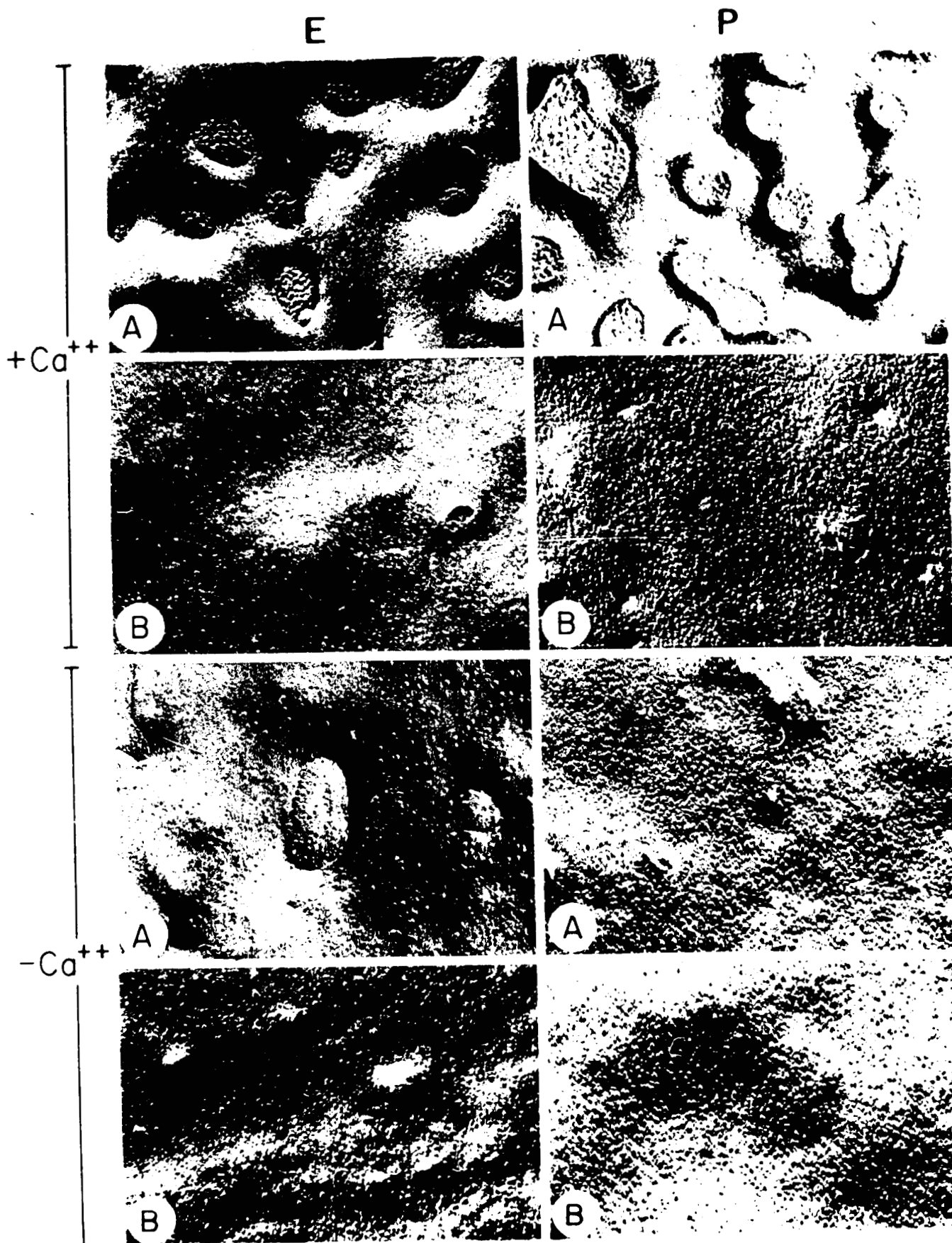


Fig. 6.5 Réplicas de crio-fractura de las caras E y P de las regiones apical (A) y basolateral (B) de la membrana plasmática de células MDCK incubadas por 20 horas en presencia y ausencia de calcio. Note la diferencia en la densidad de partículas intramembranales en cada condición. Esto es muy subjetivo, por lo tanto se puede apreciar mejor la diferencia, en la tabla # 6.4

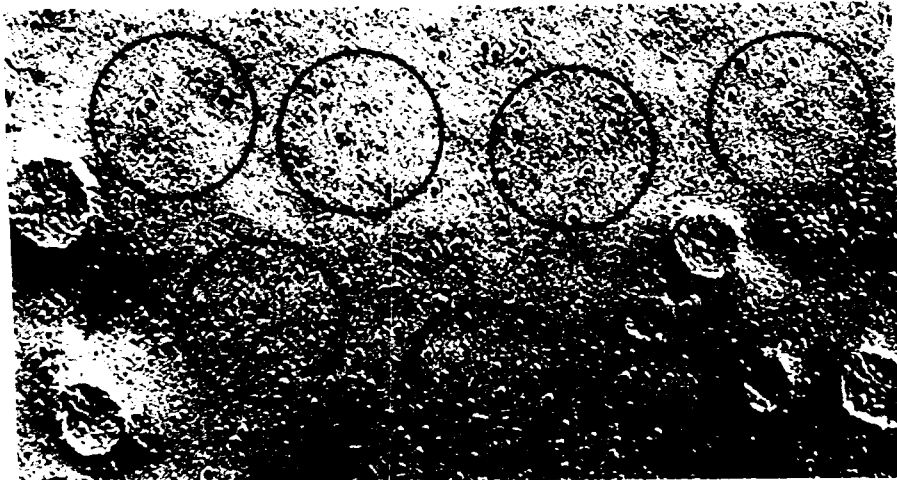


Fig. 6.6 Método para evaluar la densidad de PIM en las distintas réplicas de células MDCK. Se trazan círculos de 4.52 cm^2 que representan $0.037 \text{ micrómetros}^2$, de membrana sobre fotografías magnificadas a 110 000 x. Los círculos tienen como finalidad evitar estructuras tales como microvellosidades o regiones donde el plano de fractura abandona la membrana plasmática, introduciendo errores considerables en la evaluación del área.

TABLA 6.4

NUMERO DE PIM POR MICROMETRO CUADRADO DE MONOCAPAS DE CELULAS MDCK : en presencia y ausencia de calcio.

	<u>Número de PIM por micrómetro cuadrado</u>			
	<u>Apical</u>		<u>Basolateral</u>	
	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>P</u>	<u>E</u>
+ Ca	1114 ± 47(12)	727 ± 34(17)	2704 ± 78(13)	962 ± 62(20)
- Ca	2629 ± 61(35)	955 ± 32(42)	2641 ± 62(45)	990 ± 47(37)

Las PIM se cuentan en fotografías magnificadas a 110 000 x trazando círculos de 4.5 cm^2 que representa un área de membrana de $3.7 \times 10^{-8} \text{ m}^2$.

Media ± error estandar (número de observaciones).

entre las caras P y $955 \pm 32(42)$ contra $990 \pm 47(37)$ entre las caras E de ambos dominios.

Como conclusión de estos experimentos, resulta que el calcio es esencial, tanto para que aparezcan las fibrillas de la unión oclusora, como para que se polaricen las PIM. (Partículas intramembranales).

6.6 Permeabilidad de la monocapa con la edad y número de células

Cuando la monocapa se tripsiniza y se resiembra, las células hacen uniones de nuevo (Cereijido y col. 1981), esto introduce un grado de sincronización en la edad de las uniones de la monocapa.

La figura 6.7 muestra la evolución de la resistencia eléctrica de la monocapa en función de su edad y número de células. Observamos que hay un rápido incremento inicial de la resistencia eléctrica y luego un decremento; este fenómeno puede estar asociado al número de células en la monocapa, esto es, cuando el número de células incrementa, hay más elementos conductivos en paralelo. Así, la longitud del espacio intercelular por unidad de área de monocapa, también incrementa. Entonces, es posible estudiar la resistencia eléctrica como una función de la densidad celular.

La figura 6.8 muestra, que mientras las monocapas de 2-3 días de sembradas la resistencia eléctrica cae con la densidad celular, como se esperaba (Claude 1978, Marcial 1984), en monocapas más jóvenes la tendencia es la opuesta. Esto puede ser debido al hecho que el selle de los espacios intercelu

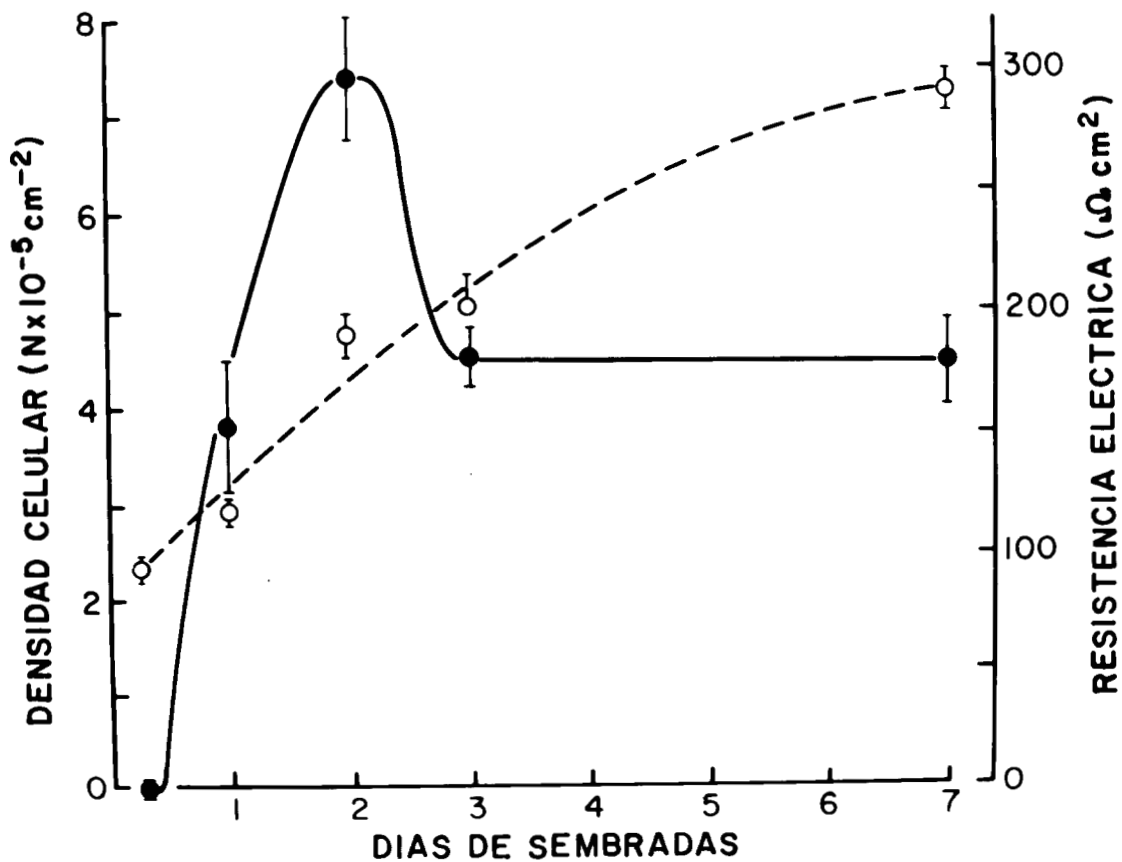


Fig. 6.7 Densidad celular (--- 0 ---) y resistencia eléctrica (_____ ● _____) a través de la monocapa de células MDCK como una función del tiempo de sembradas. - La densidad celular fué contada en el mismo disco en que se midió la resistencia eléctrica.

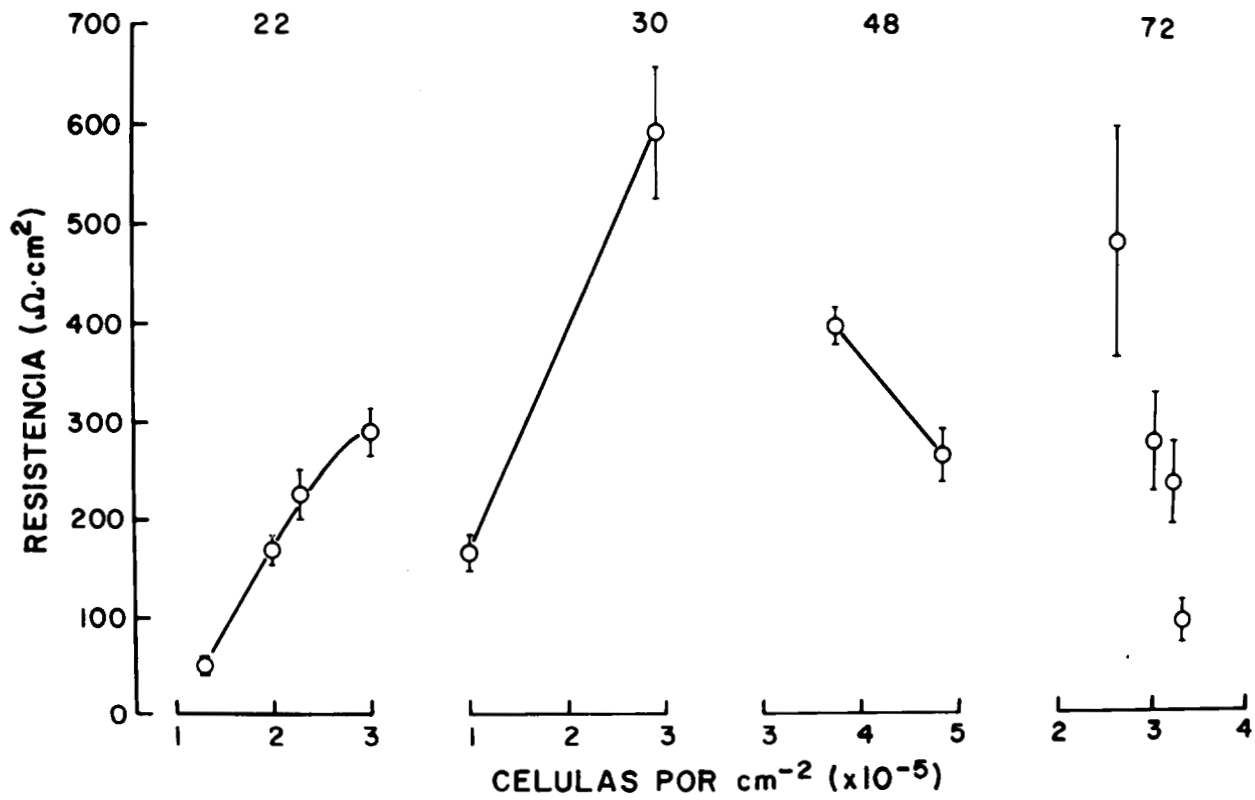


Fig. 6.8 Resistencia eléctrica como una función de la densidad celular en monocapas de células MDCK a las 22, 30, 48 y 72 horas de sembradas. La densidad celular fué contada en el mismo disco usado para medir la resistencia trans epitelial.

lares y la instalación de elementos conductivos sigue diferente curso de tiempo, o, que la permeabilidad iónica varíe con la edad.

Así, hemos observado que a las 24 horas después de sembradas, cuando la monocapa exhibe su máxima resistencia, su habilidad para discriminar entre sodio y cloro no está todavía desarrollada (Cereiido y col. 1978).

En la tabla 6.5 se muestran las permeabilidades de monocapas de 1 y 5 días de sembradas, y tenemos que la discriminación entre sodio y cloro es muy pequeña entre las de uno y 5 días de sembradas ($1.26 \pm 0.095(35)$ contra $0.91 \pm 0.06(35)$ respectivamente. Observamos también que no hay discriminación entre sodio y potasio en las de un día $R_{NaCl} = 128 \pm 7(29)$ y $R_{KCl} = 137 \pm 9(30)$ y en las de 5 días $R_{NaCl} = 73 \pm 6(31)$ y $R_{KCl} = 78 \pm 6(31)$ de sembradas. Pero sí existen diferencias en las permeabilidades de sodio y *POTASIO* entre las de un día y 5 días de sembradas, como se observa comparando los datos dados inmediatamente antes.

A fin de determinar cuánto contribuye la ruta paracelular al desarrollo de la resistencia transepitelial con la edad de la monocapa, se midió la resistencia transmembranal, en función del tiempo. Para esto se utilizó un microelectrodo intracelular de punta muy fina (resistencia de aproximadamente 100 Mega Ohm) (Stefani y Cereiido 1983). Con este procedimiento es posible mandar un pulso cuadrado de corriente y, al mismo tiempo, registrar la variación de voltaje producido. El curso de tiempo de esta variación permite la medida de la capacidad eléctrica.

TABLA 6.5

TIEMPO DE SEBRADAS (días)	1	5
P_{NaCl}	1.26 ± 0.095 (35)	0.91 ± 0.06 (35)
R_{CDMEM} (Ohm cm^2)	236 ± 18 (30)	162 ± 21 (31)
R_{NaCl} (Ohm cm^2)	128 ± 7 (29)	73 ± 6 (31)
R_{KCl} (Ohm cm^2)	137 ± 9 (30)	78 ± 6 (31)

Permeabilidades de monocapas de células MDCK de uno y cinco días de sembradas
 La resistencia transepitelial se midió en cámara de lucita de una ventana de
 0.23 cm^2 con una intensidad de corriente de 100 microAmpere/ cm^2 .
 Media \pm error standard (número de observaciones).

En la tabla 6.6 observamos que el potencial eléctrico encontrado en las células de al cabo de un día de sembradas -- fué de $-49 \pm 2(67)$ mV y de $-42 \pm 9(79)$ en las de 3-7 días. La resistencia eléctrica fué de $59 \pm 6(41)$ y de $89 \pm 7(67)$ y la capacidad de la membrana de $49 \pm 4(40)$ y $51 \pm 5(60)$ picofarad, en las de 1 y 3-7 días de sembradas, respectivamente. Entonces la resistencia de la membrana es significativamente menor en las células más jóvenes.

Esto no se debe a que exista diferente cantidad de -- membrana por célula, ya que la capacidad fué igual $49 \pm 4(40)$ para las de un día y $51 \pm 5(60)$ para las de 3-7 días de sembradas.

Como conclusión de estos experimentos podemos señalar que a nivel de ruta transcelular, la edad de la monocapa parece inducir la pérdida de canales, fenómeno que se contrapone -- con el curso temporal de la resistencia transepitelial. Esto -- indica que la ruta paracelular es la principal contribuyente -- y, la responsable del fenómeno observado a nivel de la resis-- tencia transepitelial.

6.7 Relación entre la estructura y función de la unión oclusora

Los estudios llevados a cabo en epitelios naturales -- han mostrado que en ciertas condiciones, las bandas de la -- unión oclusora (vistas por crio-fractura), varían su disposi-- ción, sugiriendo una correlación entre arreglo y permeabilidad (Bentzel y col. 1980; Meldolesi y col. 1978; Claude 1978; Clau-- de y Goodenough 1973; Wade y Karnovsky 1974). Existe controver--

TABLA 6.6

TIEMPO DE SEMBRADAS (días)	POTENCIAL INTRACELULAR (mv)	RESISTENCIA MEMBRANA (Mega Ohm)	CAPACIDAD MEMBRANA (pF)
1	-49 ± 2 (67)	59 ± 6 (41)	49 ± 4 (40)
3-7	-42 ± 9 (79)	89 ± 7 (67)	51 ± 5 (60)

Registro con microelectrodo en monocapas de células MDCK de uno y 3-7 días de sembradas sobre cubreobjetos de vidrio cubiertos con colágena, sobre la platina de un microscopio de contraste de fases Leitz. Solución de registro CDMEM. Temperatura 37 grados centígrados. Microelectrodo de acetato de potasio. Resistencia del microelectrodo de 100 - 150 Mega Ohm. Corriente menor que 0.5 microAmpere.

Media ± error standar (número de observaciones).

sia en si el número de bandas de la unión oclusora está relacionado con su permeabilidad (Martínez-Palomo y Erlij 1975; Cereijido y col. 1980 y 1982; Marcial y col. 1984). Los estudios llevados a cabo por Cereijido y col. (1983) sobre el efecto de la temperatura en la resistencia transepitelial y el arreglo de las bandas de la unión oclusora, muestran que el cambio de temperatura de 37 a 3 grados centígrados, hace que la resistencia de la monocapa cambie reversiblemente de 63 a 193 Ohm cm² y que la distribución estadística del número de bandas de la unión y su profundidad no varíe apreciablemente.

Se trata de determinar si la densidad celular en la monocapa confluyente modifica el número de fibrillas o la profundidad de la unión oclusora. La idea directriz del experimento era que posiblemente la célula sintetizara una cantidad -- aproximadamente constante de componentes de la unión, y que el hecho de tener que distribuirlos en un perímetro mayor (siembra a baja densidad) o menor (siembra a alta densidad) podría modificar el número de fibrillas que constituían en promedio la unión.

En el presente estudio, para analizar morfométricamente a la unión oclusora, se sigue el procedimiento mostrado en la figura 6.9. Primeramente se traza una línea paralela al -- eje principal de la unión, y a partir de ésta se trazan líneas perpendiculares cada 133 mm. y se cuenta el número de filamentos que intersectan a dichas líneas. La profundidad de la -- unión está dada como la distancia entre los filamentos superior e inferior.

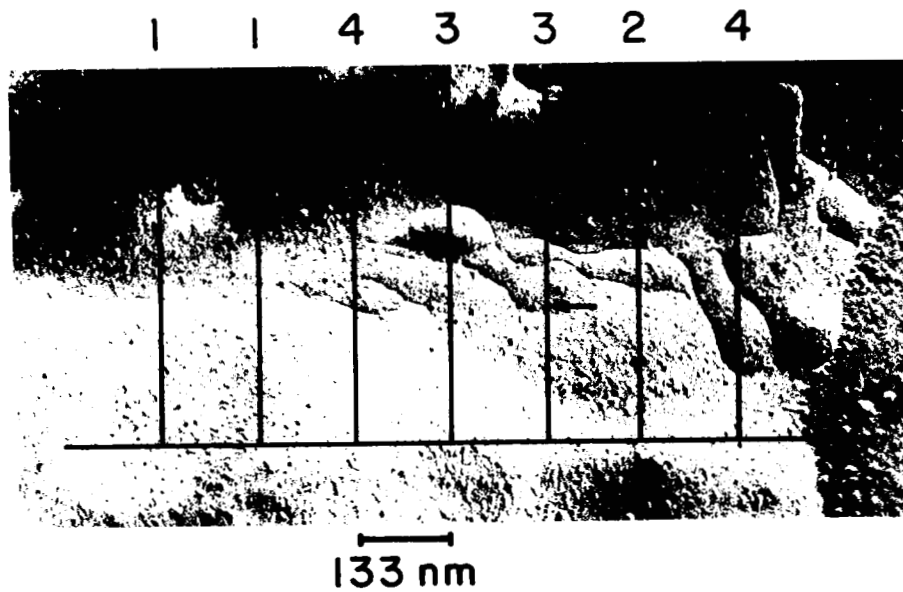


Fig. 6.9 Método para evaluar el número de filamentos y la profundidad de la unión oclusora. Se traza una línea paralela al eje principal de la unión y las líneas perpendiculares a éstas se dibujan cada 133 nm. Se cuenta el número de filamentos que intersectan a cada una de estas líneas. La distancia entre los filamentos superior e inferior (flechas) se toma como profundidad de la unión. Un solo filamento se considera profundidad cero.

A fin de determinar si existe alguna relación entre la edad y número de células de la monocapa y/o el número de bandas y su profundidad, se contó el número de bandas y se evaluó su profundidad, en monocapas de 24 y 72 horas de sembradas, con diferente número de células en la monocapa.

La tabla 6.7 muestra que no existe diferencia significativa en el número de bandas o en la profundidad de la unión oclusora, entre monocapas con alta y baja densidad celular a las 24 y 72 horas de sembradas, a pesar de su diferencia en la resistencia transepitelial. Así, en las monocapas con alta densidad (53×10^4 y 58×10^4 células/cm² a las 24 y 72 horas de sembradas respectivamente), a los tiempos marcados en el paréntesis, no muestran diferencias en el número de bandas ($3.30 \pm 0.41(27)$ y $3.12 \pm 0.24(33)$), ni en la profundidad de las bandas; ($0.137 \pm 0.03(27)$ y $0.148 \pm 0.02(33)$) pero sí en la resistencia ($138 \pm 22(6)$ y $118 \pm 17(7)$). Lo mismo sucede con las monocapas que tienen baja densidad celular a las 24 y 72 horas de sembradas (32×10^4 y 48×10^4 respectivamente) ya que no hay diferencia significativa entre el número de bandas ($2.62 \pm 0.19(134)$ y $3.17 \pm 0.33(23)$) y la profundidad de éstas ($0.03 \pm 0.01(134)$ y $0.123 \pm 0.02(23)$) pero sí en la resistencia ($56 \pm 15(6)$ y $235 \pm 21(7)$).

TABLA 6.7

	ALTA DENSIDAD		BAJA DENSIDAD	
	24 Hrs.	72 Hrs.	24 Hrs.	72 Hrs.
NUMERO DE BANDAS	3.30 ± 0.41 (27)	3.12 ± 0.24(33)	2.62± 0.19(134)	3.17 ± 0.33(23)
PROFUNDIDAD (m)	0.137± 0.03 (27)	0.148 ± 0.02(33)	0.103± 0.01(134)	0.123 ± 0.02(23)
R _{CDMEM} (Ohm cm ²)	138 ± 22 (6)	118 ± 17 (7)	56 ± 15 (6)	235 ± 21 (7)

Número de bandas y profundidad de monocapas de células MDCK a alta y baja densidad y a las 24 y 72 horas de sembradas. Se cuantifica como se describe en la figura 6.7 Media ± error estandar (número de observaciones)

Alta densidad a cada tiempo, respectivamente = 53×10^4 y 58×10^4 células/cm²

Baja densidad a cada tiempo, respectivamente = 32×10^4 y 48×10^4 células/cm²

CAPITULO VII: CONCLUSIONES

- 7.1 Desarrollo de un protocolo experimental apto para diseccionar el proceso de ensamblaje de la unión oclusora de otros procesos celulares simultáneos.
- 7.2 Desarrollo de la unión oclusora desde el punto de vista funcional y estructural
- 7.3 Evolución de la unión oclusora con la edad de la monocapa

VII CONCLUSIONES

7.1 Desarrollo de un protocolo experimental, apto para diseccionar el proceso de ensamblaje de la unión oclusora de otros procesos celulares simultáneos.

Resultados: cuando las células son sembradas en la forma habitual, pero una vez que se adhieren al sustrato se mantienen 20 horas libres de calcio, al cabo de este lapso, carecen de uniones oclusoras y de resistencia.

Es importante señalar que la puesta a punto de este protocolo experimental, provee de un modelo particularmente apto para atacar la difícil pregunta, de si existe alguna relación entre la unión oclusora y el desarrollo de la polaridad, ya que permite disponer de una preparación de monocapa confluyente y madura que carece de uniones -- oclusoras y de resistencia. En esta preparación pueden -- estudiarse distintas manifestaciones de la polaridad: -- anatómicas (microvellosidades), estructurales (distribución de las partículas intramembranales), bioquímicas -- (distribución de enzimas marcadoras como la ATPasa) y -- funcionales (gemación asimétrica de virus).

7.2 Desarrollo de la unión oclusora desde el punto de vista funcional y estructural

Resultados: cuando a las monocapas mantenidas 20 horas sin calcio, se les añade 2 mM de calcio, la resistencia alcanza los valores control en aproximadamente 4 horas. Desde el punto de vista estructural se observa:

a) que en este lapso las monocapas dejan de ser permeables al rojo de rutenio y, que la polaridad anatómica, - dada por la presencia de microvellosidades, es independiente de la formación de la unión oclusora. El desarrollo de la resistencia no es afectado por la cicloheximida, ni por la presencia o ausencia de suero, indicando - que los elementos de la unión oclusora ya estaban sintetizados, y que el calcio es esencial, no para la síntesis, sino para el ensamblaje de la misma. En cuanto a la polaridad estructural, juzgada por la distribución asimétrica de las partículas intramembranales, se observa que el desarrollo de la unión oclusora es necesario para la aparición de la polaridad estructural.

De estos datos podemos concluir, que el fenómeno de polarización no sigue la ley del todo o nada, puesto que - en esta condición experimental (ausencia de uniones oclusoras), se manifiesta polaridad anatómica pero no estructural.

7.3 Evolución de la unión oclusora con la edad de la monocapa

Resultados: los datos experimentales indican que la resistencia de la monocapa cae gradualmente con el tiempo, a partir de las 24 horas de sembradas. Se determinó que el número de células aumenta monótonamente a partir del momento de la siembra, y que existe una relación directa entre la resistencia y la densidad celular durante las - primeras horas de sembradas y, una relación inversa entre estos parámetros a tiempos mayores.

Estos datos indican que, a tiempos largos el aumento de

la densidad celular implica la institución de nuevos elementos conductores, en paralelo, que disminuyen la resistencia transepitelial, pero que a tiempos cortos son otros parámetros, distintos a la densidad celular, los que determinan el valor de la resistencia.

El análisis de las permeabilidades de la ruta paracelular no arroja mayores cambios, en cuanto a capacidad de discriminar a medida que pasa el tiempo, aunque se observa un notorio aumento en la permeabilidad a sodio y potasio con el tiempo de sembrado, lo cual explica el curso temporal de la resistencia.

El análisis de la ruta transcelular indica que la resistencia de la membrana celular aumenta con el tiempo.

La conclusión de estos experimentos es, que la ruta paracelular es la que determina el curso temporal de la resistencia y, por lo tanto, la más importante de este tipo de preparación.

Finalmente, no existe correlación aparente entre el número de filamentos o la profundidad de la unión oclusora y la densidad celular de la monocapa, aunque es posible modular la resistencia transepitelial modificando la densidad de siembra.

CAPITULO VIII: BIBLIOGRAFIA

VIII BIBLIOGRAFIA

- ACEVES, J. and ERLIJ, D. (1971). Sodium transport across the isolated epithelium of the frog skin. *J. Physiol.* 212:195
- ANDERSEN, B. and USSING, H.H. (1957). Solvent drag on non-
- electrolytes during osmotic flow through isolated toad skin
and its response to antidiuretic hormone. *Acta Physiol.* --
Scand. 39:228
- AUGUSTUS, J., BIJMAN, J., VAN OS, C.H. and SLEGERS, J.F.G. -
(1977). High conductance in a epithelial membrane not due to
extracellular shunting. *Nature* 268:18
- BARKER, G. and SIMMONS, N.L. (1981). Identification of two -
strain of cultured canine renal epithelial cells (MDCK cells)
wich display entirely different physiological properties. -
Quarterly J. of Exp. Physiol. 66:61
- BARTH, C.A. and SCHUARZ, L.R. (1982). Transcellular trans --
port of fluorescein in hepatocyte monolayers: evidence for -
functional polarity of cells in culture. *Proc. Natl. Acad.* -
Sci., U.S.A. 79:4985
- BEATY, G. (1978). Efecto de los cationes alcalinos y alcali-
nos-térreos sobre las uniones estrechas de una monocapa de -
células epiteliales en cultivo. Un estudio del desarrollo, -
sellado y estado estacionario de la Zónula Occludens. Tesis
para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Depto. de Fisio-
logía del Instituto de Investigación y Estudios Avanzados --
del I.P.N. México, D.F.

- BENEDETTI, E.L., DUNIA, I. and BLOEMENDAL, Hans (1974) Development of junctions during differentiation of lens fiber. - P.N.A.S., U.S.A. 171:5073

- BENTZEL, C.J., HAINAU, B., HO, S., HUI, S.W., EDELMAN, A., - ANAGNOUSTOPOULOS, T. and BENEDETTI, E.L. (1980). Cytoplasmic regulation of tight junctions permeability: effect of plant cytokinins, Am. J. Physiol. 239: C 75

- BENTZEL, C.J., PARSA, B. and HARE, D.K. (1969). Osmotic flow across proximal tubule of Necturus. Correlation of physiologic and anatomic studies. Amer. J. Physiol. 217:570

- BIBER, T. (1971). Transepithelial transport on the uptake of sodium across the outer surface of the frog skin. J. Gen. - Physiol. 58:131

- BIBER, T., ACEVES, J. and MANDEL, L.J. (1972). Potassium uptake across serosa surface of isolated frog skin epithelium. - Am. J. Physiol. 222:1366

- BINDSLEV, N., McTORMEY, J., and WRIGHT, E.M. (1974). The -- effect of electrical and osmotic gradient on lateral interce llular spaces and membrane conductance in a low resistance - epithelium. J. Memb. Biol. 19:357

- BLUM, A.L., HIRSCHOWITZ, B.I., HELANDER, H.F. and SACHO, G. (1971). Electrical properties of isolated cells of Necturus gastric mucosa. Biochim. Biophys. Acta 241:261

- BOULPAEP, E.L. and SEELY, J.F. (1971). Electrophysiology of proximal and distal tubules in the auto perfused dog kidney Am. J. Physiol. 221:1084

- BRANTON, D., BULLIVANT, S., GILULA, N.B., KARNOVSKY, M.J., MOOR, H., MUHLETHALER, K., NORTHCOTE, D.F., PACKER, L., SATTIR, P., SPETH, V., STAEHELIN, L.A. STEERE, R.L. and WEINSTEIN, R.S. (1975). Freeze-etching nomenclature, Sci. 190:54

- CEREIJIDO, M. and MEZA, I., (1982). The control of tight junctions in tissue culture. F.F. Purcell, Editors. Tosiah Mary J. Foundation. New York, pp. 83

- CEREIJIDO, M., STEFANI, E. and MARTINEZ-PALOMO, A. (1980) - Occluding junctions in a culture transporting epithelium: - structural and functional heterogeneity. J. Memb. Biol. -- 53:19

- CEREIJIDO, M. and CURRAN, P.F. (1965). Intracellular electrical potentials in frog skin. J. Gen. Physiol. 48:543

- CEREIJIDO, M. and ROTUNNO, C.A. (1968). Fluxes and distribution of sodium in frog skin. A new model. J. Gen. Physiol. 51:280

- CEREIJIDO, M. ROBBINS, E.S., DOLAN, W.J., ROTUNNO, C.A. and SABATINI, D.D. (1978). Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable a translucent support. J. Cell Biol. 77:853

- CEREIJIDO, M., MEZA, I. and MARTINEZ-PALOMO, A. (1981) -- Occluding junctions in cultured epithelial monolayers. Am. J. Physiol. 240:C90
- CEREIJIDO, M., GONZALEZ-MARISCAL, L. and BORBOA, L. (1983) Occluding junctions and paracellular pathways studied in monolayers of MDCK cells. J. Exp. Biol. 106:205
- CEREIJIDO, M., ROTUNNO, C.A. ROBBINS, E.S. and SABATINI, D.D. (1978) ⁶. Polarized epithelial membrane produced in vitro. Membrane transport process Vol. I.
- CIVAN, M.M. and DIBONA, R.D. (1978). Pathways for movement of ions and water across toad urinary bladder. J. Memb. Biol. 38:359
- CIVAN, M.M. KEDEM, O. and LEAF, A. (1966). Effect of vasopresin on toad bladder under condition of zero net sodium transport. Am. J. Physiol. 211:569
- CLARKSON, T.W. (1967). The transport of salt and water -- across isolated rat ileum. Evidence for at least two dis -- tinct pathways. J. Gen. Physiol. 50:695
- CLAUDE, P. (1978). Morphological factors influencing trans epithelial permeability: A model for the resistance of the Zonula Occludens. J. Memb. Biol. 39:219
- CLAUDE, P. and GOODENOUGH, D.A. (1973). Fracture faces of zonula occludentes from tight and leaky epithelium, J, Cell Biol. 58:390

- CHAMBARD, M., GABRION, J. and MAUCHAMP, J. (1981). Influence of collagen gel on the orientation of epithelial cell polarity: follicle formation from isolated thyroid cells and from preformed monolayers. *J. Cell Biol.* 91:157
- CHALCROFT, J.P. and BULLIVANT, D. (1970). On 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
- DECAMILLI, P. PELUCHETTI, D. and MELDOLESI, J. (1974). Structural difference between luminal and lateral plasmalemma in pancreatic acinar cells. *Nature* 248:245
- DIAMOND, J.M. (1962 a). The reabsorptive function of the gallbladder. *J. Physiol. London* 161:442
- DIAMOND, J.M. (1962 b). The mechanism of solute transport by the gallbladder. *J. Physiol. London* 161-474
- DIAMOND, J.M. (1962 c). The mechanism of water transport by the gallbladder. *J. Physiol. London* 161:503
- DIBONA, D.R. and CIVAN, M.M. (1973). Pathways for movement of ions and water across toad urinary bladder: I anatomic site of transepithelial shunt pathways. *J. Memb. Biol.* 12:101
- DERMIETZEL, R. MELLER, K. TETZLAFF, W. and WAELSCH, M. (1977). In vivo and In vitro formation of the junctional complex in choroid: a freeze-etching study. *Cell Tis. Res.* 181:427

- DOBSON, J.G. Jr. and KIDDER, G.W. III (1968). Edge damage - effect in In Vitro frog skin preparation Am. J. Physiol. -- 214:719
- ERLIJ, D. and MARTINEZ-PALOMO, A. (1972). Opening of tight junctions in frog skin by hypertonic urea solutions. J. -- Memb. Biol. 9:229
- ELIAS, P.M. and FRIEND, D.S. (1976). Vitamin a induced -- mucous metaplasia. J. Cell Biol. 68:173
- EPSTEIN, M.L. SHERIDAN, J.D. and JOHNSON, R.G. (1977). For-
mation of low resistance junctions In Vitro in the absence
of protein synthesis and ATP production. Exp. Cell. Res. --
104:25
- FIDELMAN, M.L., MAY, J.M. BIBER, T.U.L. and WATKINGTON, C.
O. (1982). Insulin stimulation of sodium transport and glu-
cose metabolism in cultured kidney cells. Am. J. Physiol. -
242:C121
- FINN, A.L. (1974). Transepithelial potential difference in
toad urinary bladder is not due to ionic diffusion. Nature
(London) 250:495
- FORTE, J.G. and NAUSS, A.H. (1963). Effect of calcium remo-
val on bullfrog gastric mucosa. Amer. J. Physiol. 205:631

- FRAZIER, H. S. (1962). The electrical potential profile of the isolated toad bladder. *J. Gen. Physiol.* 45:515.
- FRIEND, D. S. and GILULA, N.B. (1972). Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues. *J. Cell. Biol.* -- 53:758
- FROMTER, E. (1972). The route of passive ion movement -- through the epithelium of *Necturus* gallblader. *J. Memb. -- Biol.* 8:259
- FROMTER, E. and DIAMOND, J. (1972). Route of passive impermeation in epithelia. *Nature, New Biology* 235:9
- FROMTER, E., MULLER, C. W. and WICK, T. (1971). Permeability properties of proximal tubular epithelium of the rat -- kidney as studied with electrophysiological methods. *Electrophysiology of epithelial cells.* Ed. G. Giebisch Stutt -- gart Schattauer. Pag. 119.
- FUJIMOTO, T. and OGAWA, K. (1982). Energy dependent transformati n of mouse gallbladder espithelial cells in a Ca depleted medium. *J. Ultrast.* 79:327
- GALLI, P., BRENNNA, A., DeCAMILLI, P. and MELDOLESI, J. -- (1976). Extracellular calcium and the organization of -- tight junctions in pancreatic acinar cells. *Exp. Cell Res.* 99:178
- GONZALEZ MARISCAL, L. (1984). La unión estrecha de las células MDCK: formación y efecto de la temperatura. Tesis para

ra obtener el grado de Maestro en Biología Experimental. --
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

- GOODENOUGH, D.A. and REVEL, J.P. (1970). A fine structural analysis of intercellular junctions in the mouse liver. *J. Cell Biol.* 45:272
- GREEN, R.F., MEISS, H.K. and RODRIGUEZ BOULAN, E. (1981). Glycosylation does not determine degregation of viral envelope proteins in the plasma membrane of epithelial cells. *J. Cell Biol.* 89:230
- GRIEPP, E.B., DOLAN, W.J. ROBBINS, E.S. and SABATINI, D.D. (1983). Participation of plasma membrane proteins in the formation of tight junctions by culture epithelial cells. *J. Cell Biol.* 96:693
- HANDLER, J.S., PERKINS, F.M. and JOHNSON, J.P. (1980). Studies of renal cell function using cell culture techniques *Am. J. Physiol.* 238:F1
- HELMAN, S.I. and MILLER, D.A. (1971). In Vitro techniques for avoiding edge damage in studies of frog skin. *Sci.* -- 173:146
- HERZLINGER, D.A. and OJAKIAN, G.K. (1984). Studies on the development and maintenance of epithelial cell surface polarity with monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.* 98:1777

- HOI SANG, U. and EVANS-LAYNG, M. (1983). Polar redistribution of Na-K ATPase in aggregating MDCK cell. Exp. Cell Res. 146:192
- HOI SANG, U., SAIER, M.H. Jr. and ELLISMAN, M.H. (1979). Tight junction formation is closely linked to the polar redistribution of intramembranous particles in aggregating MDCK epithelia. Exp. Cell Res. 122:384
- HOI SANG, U., SAIER, M.H. Jr. and ELLISMAN, M.H. (1980). Tight junctions in the establishment of intramembranous particle polarity in aggregating MDCK cells. Effects of drug treatment. Exp. Cell Res. 128:223
- HUMBERT, F., MONTESANO, R., PERRELET, A. and ORCI, L. (1976). Junctions in developing human and rat kidney: a freeze-fracture study. J. Ultrast. Res. 56:202
- HERZLINGER, D.A., EASTON, T.G. and OJAKIAN, G.K. (1982). The MDCK epithelial cell line expresses a cell surface antigen of the kidney distal tubule. J. Cell Biol. 93:269
- HOSHI, T. and SAKAI, F. (1967). A comparison of the electrical resistances of surface cell membrane and cellular wall in the proximal tubule of the newt kidney. Jap. J. Physiol. 17:627
- KACHAR, B. and PINTO DaSILVA (1981). Rapid massive assembly of tight junctions in stratified epithelia. Sci. 213:541

- KAIHO, M. (1977). Development of junctional complex in cultured cells. *Develop. Growth and Differ.* 19:257
- KEYNES, R.D. (1969). From frog skin to sheep rumen: a survey of transport of salt and water across multicellular structures. *Quart. Rev. Biophys.* 2:177
- KOEFOED-JOHNSEN, V., USSING, H.H. and SERAHLN, K. (1952). The origin of the short circuit current adrenaline stimulated frog skin. *Acta Scand.* 27:38
- KOEFOED-JOHNSEN, V. and USSING, H.H. (1953). The contributions of diffusion and flow to the passage of D₂O through living membranes. *Acta Physiol. Scand* 28:60
- KOEFOED-JOHNSEN, V. and USSING, H.H. (1958). The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol. Scand.* 42:298
- KOGA, A. and TODO, S. (1978). Morphological and functional changes in the tight junctions of the bile canaliculi induced by bile duct ligation. *Cell Tis. Res.* 195:267
- LAMB, J.F., OGDEN, P. and SIMMONS, N.L. (1981). Autorradiographic localization of (3H) ouabain bound to cultured epithelial cell monolayers of MDCK cells. *B.B.A.* 644:333
- LEIGHTON, J., BRADA, Z., ESTES, L.W. and JUSTH, G. (1969). Secretory activity and oncogenicity of a cell line (MDCK) derived from canine kidney. *Sci.* 158:472

- LEIGHTON, J., ESTES, L.W., MAUNSUKHANI, S. and BRADA, Z. - (1970). A cell line derived from normal dog kidney (MDCK) inhibiting qualities of papillary adenocarcinoma and of renal tubular epithelium. *Cancer* 26:1022
- LEVER, J.E. (1979). Regulation of dome formation in differentiated epithelial cell culture. *J. Supramol. Struct.* -- 12:259
- LOUWARD, D. (1980). Apical membrane aminopeptidase appear at site of cell-cell contact in cultured kidney epithelial cells. *P.N.A.S.* 77:4132
- LUNDBERG, A. (1957). The mechanism of establishment of -- secretory potential in sublingual gland cells. *Acta Physiol Scand.* 40:351
- MADIN, S.H. and DARBY, N.B. (1958). *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 98:574
- MARTINEZ PALOMO and ERLIJ, D. (1975). Structure of tight - junctions in epithelia with different permeability. *P.N.A.S* 72:4487
- MARTINEZ PALOMO, A., ERLIJ, D. and BRACHO, H. (1971). -- Localization of permeability barrier in the frog skin -- epithelium. *J. Cell Biol.* 50:277
- MARTINEZ PALOMO, A., MEZA, I., BEATY, G. and CEREIJIDO, M. (1980). Experimental modulation of occluding junctions in a culture transporting epithelium. *J. Cell Biol.* 87:736

- MEZA, I., IBARRA, G., SABANERO, M., MARTINEZ PALOMO, A, and CEREIJIDO, M. (1980). Occluding junctions and cytoeskeletal components in a culture transporting epithelium. J. Cell -- Biol. 87:746

- MACHEN, E.T., ERLIJ, D. and WOODING, F.B.P. (1972). Permeable junctional complexes. The movement of lanthanum across rabbit gallbladder and intestine. J. Cell Biol. 54:302

- MARCIAL, M.A., CARLSON, S.L. and MADARA, J.L. (1984). Partitioning of paracellular conductance along the ileal crypt-villus axis: a hipotesis based on structural analysis with detailed consideratio of tight junction structure-function relationships. J. Memb. Biol. 80:59

- McNUTT, N.S. and WEINSTEIN, R.S. (1970). The ultrastructure of the nexus. J. Cell. Biol. 47:666

- McROBERTS, J.A., TAUB, M. and SAIER, H.M. Jr. (1981). The - Madin-Darby canine kidney (MDCK). cell line. Functionally - Differentiated Cells lines. Ed. Sato, G. (Liss, New York), pp.117

- MELDOLESI, J., CASTIGLIONI, G., PARMA, R., MASSIVERA, N. -- and DeCAMILLI, P. (1978). Ca-dependent disassembly and -- reassembly of occluding junctions in guinea pig pancreatic acinar cells: effect of drugs. J. Cell Biol. 79:156

- METZ, J., AOKI, A., MERLO, M. and FORSEMAN, W.G. (1977). -- Morphological alterations and functional changes of interhe patocellular functions induced by bile duct ligation. Cell tis. Res. 182:299

- MILLER, F. (1960). Hemoglobin absorption by the cell of the proximal convoluted tubule in mouse kidney. *J. Biophysic and Biochem. Cytol.* 10:529
- MISFELDT, D.S., HAMAMOTO, S.T. and PITELKA, D.R. (1976). - Transepithelial transport in cell culture. *P.N.A.S.* 73:1212
- MISFELDT, D.S. and SANDERS, M.J. (1981). Transepithelial - glucose transport in cell culture. *Am. J. Physiol.* 240:C92
- MONTESANO, R., FRIEND, D.S., PERRELET, A. and ORCI, L. -- (1975). In vivo assembly of tight junctions in fetal rat - live. *J. Cell. Biol.* 67:310
- MONTESANO, R., GABBIANI, G., PERRELET, A. and ORCI, L. -- (1976). In vivo induction of tight junctions proliferation in rat liver. *J. Cell Biol.* 68:793
- MURPHY, C.R., SWIFT, J.G., MURKHERJEE, T.M. and ROGERS, A. W. (1981). Effects of ovarian hormones on cell membranes - in rat uterus. II freeze fracture studies on tight junc -- tions of the luminal epithelium. *Cell Biophysics* 3:57
- MURPHY, C.R., SWIFT, J.G., MURKHERJEE, T.M. and ROGERS, A. W. (1980). Ovarian hormones alter tight junctions structure in uterine luminal epithelial cells. *Micron* 11:375
- MURPHY, C.R., SWIFT, J.G., MURKHERJEE and ROGERS, A.W. -- (1982). The structure of the tight junctions between uteri- ne luminal epithelial cells at different stages of pregnancy in the rat. *Cell Tis. Res.* 223:281

- ORCI, L. and AMHERDT, M. (1973). Pronase effect on pancreatic beta cell secretion and morphology. *Sci.* 180:647
- PINTO DaSILVA, P. and BRANTON, D. (1970). Membrane splitting in freeze etching covalently bound ferritin as a membrane marker. *J. Cell Biol.* 45:598
- PISAM, M. and RIPOCHE, P. (1976). Redistribution of surface macromolecules in dissociated epithelial cells. *J. Cell Biol.* 71:907
- PITELKA, D.R., TAGGART, B.N. and 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
- PITELKA, D.R. and TAGGART, B.N. (1983). Mechanical tension induces lateral movement of intramembrane components of -- the tight junctions studies on mouse mammary cells in culture. *J. Cell Biol.* 96:606
- PITELKA, D.R., HAMAMOTO, S.T., DUAFALA, J.G. and 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
- POLAK-CHARCON, S., SHOHAM, J. and BEN-SHAUL, Y. (1978). -- Junction formation in trypsinized cells of human adenocarcinoma cell line. *Exp. Cell Res.* 116:1

- RABITO, C.A. and TCHAO, R. (1980). (3H) ouabain binding - during the monolayers organization and cell cycle in MDCK cells. Am. J. Physiol. 238:C 43
- RINDLER, M.J., CHUMAN, L.M. and SAIER, M.H. Jr. (1977). -- Hormone responsiveness of an established but differentia-- ted kidney epithelial Cell line (MDCK). Fed. Proc. 36:911
- RINDLER, M.J., McROBERTS, J.A. and SAIER, M.H. Jr. (1982). (Na-K) cotransport in the Madin Darby canine kidney cell - line kinetics characterization of the interaction between Na and K. J. Biol. Chem. 257:2254
- RINDLER, M.J., CHUMAN, L.M., SHAFFER, L. and SAIER, M.H. - Jr. (1979). Retention of differentiated properties in an - established dog kidney epithelial cell line MDCK. J. Cell Biol. 81:635
- REVEL, J.P. and KARNOVSKY, M.J. (1967). Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. J. Cell Biol. 33:C 7
- ROBENEK, H., DOLDISSON, M. and THEMANN, H. (1980). Morpho- logical changes of thight junctions in the rat liver after chronic administration of N-nitroso morpholine (NNM) as - reveled by freeze-fracturing. J. Ultrast. Res. 70:82
- ROBENEK, H., THEMANN, H. and OTT, K. (1979). Carbon tetra- chloride induced proliferation of tight junctions in the -- rat liver as revealed by freeze-fracturing. Eur. J. Cell - Biol. 20:62

- RODRIGUEZ-BOULAN, E. and PENDERGAST, M. (1980). Polarized distribution of viral envelope proteins in the plasma membrane of infected epithelial cells. Cell 20:45
- RODRIGUEZ BOULAN, E.R. and SABATINI, D.D. (1978). Asymmetric budding of viruses in epithelial monolayers: a model system for study of epithelial polarity. P.N.A.S., U.S.A. -- 75:5071
- RODRIGUEZ BOULAN, E.R., PASKIET, K.T. and SABATINI, D.D. - (1983). Assembly of envelope viruses in Madin-Darby canine kidney cells: polarized budding from single attached cells and from clusters of cells in suspension. J. Cell Biol. - 96:866
- ROSTGARD, J. and MOLLER, O. (1980). Localization of Na-K - ATPase to the inside of the basolateral cell membrane of - epithelial cells of proximal and distal tubules in rabbit kidney. Cell Tis. Res. 212:17
- ROTH, M.G., FITZPATRICK, J.P. and COMPANS, R.W. (1979). - Polarity of influenza and vesicular stomatitis maturation in MDCK cells: lack of requirement for glycosylation of - viral glycoprotein. P.N.A.S., U.S.A. 76:6430
- ROTHMAN, J.E. and LENARD, J. (1977). Membrane asymmetry, -- Sci. 195:743
- SEEDS, N.W. and HAFFKE, S.C. (1978). Dev. Neurosc. 1:69
- SIMMONS, N.L. (1981). Ion transport in tight epithelia -

- monolayers of MDCK cells. *J. Memb. Biol.* 59:105
- STAEHELIN, L.A., MUKHERJEE, T.M. and WILLIAMS, A.M. (1969) Freeze-etch appearance of the tight junctions in the epithelium of small and large intestine of mice. *Protoplasma* 67:165
 - STEFANI, E. and CEREIJIDO, M. (1983). Electrical properties of cultured epithelioid cells (MDCK). *J. Memb. Biol.* --- 73:177
 - TALMON, A. and BEN-SHAUL (1979). Tight junctions of dissociated and reaggregated embryonic lung cells. *Cell Diff.* - 8:437
 - USSING, H.H. (1949). The distinction by means of tracer -- between active transport and diffusion. *Acta Physiol. -- Scand.* 19:43
 - USSING, H.H. and ZERAHAN, K. (1951). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand.* 23:110
 - USSING, H.H., KRUIHOFFER, P., HESS THAYSEN, J. and THORN, - N.A. (1960). The alkali metal ions in biology. *Handbook -- exp. Pharmacol* Vol. 13. Ed. O. Eichler, A. Farah. Heidelberg: Springer.
 - USSING, H.H. (1960). The alkali metal ions in isolated -- systems and tissues. *The alkali metals in biology.* Berlin: Springer. pp. 195

- USSING, H.H. and WINDHAGER, E.E. (1964). Nature of shunt - path and active sodium transport path through frog skin - epithelium. Acta Physiol. Scand. 61:484

- VALENTICH, J.D. (1981). Morphological similarities between the dog kidney cell line MDCK and the mammalian cortical - collecting tubule. Ann. New York Acad. Sci. Vol. 372. Walter N. Scott and David B. P. Goodman. pp. 384

- WANSON, J.C., DROCHMANS, P., MOSULMANS, R. and RONVEAUX, - M.F. (1977). J. Cell Biol. 74:858

- WADE, J.B. and KARNOVSKY, M.J. (1974). Fracture faces of - osmotically disrupted Zonulae occludentes. J. Cell Biol. - 62:344

- WADE, J.B., REVEL, J.P. and DISCALA, U.A. (1973). Effect - of osmotic gradient on intercellular function of the toad bladder Am. J. Physiol. 224:407

- WHITTEMBURY, G. and RAWLINS, F.A. (1971). Evidence of a -- paracellular pathways for ion flow in the kidney proximal tubule: electromicroscopic demonstration of lanthanum -- precipitate in the tight junction. Pflugers. Arch. 330:302

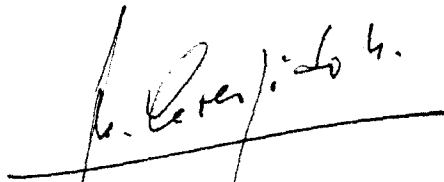
- WINDHAGER, E.E., BOULPAEP, E.L. and GIEBISH, G. (1967). -- Electrophysiological studies on single nephrons. Proc. -- Third international congress nephrol. 1:35. Karger, Basle.

- WADE, J.B. and KARNOVSKY, M.J. (1974). The esturcture of - the zonula occludens. A single fibril model based on freeze fracture. J. Cell Biol. 60:168

- WALSER, (1970). Role of edge damage in sodium permeability of toad bladder and means of avoiding it. Am. J. Physiol. 219:252

- WEINSTEIN, R.S. and McNUTT, N.S. (1972). Cell junctions. - New England J. of Med. 286:521

El Jurado designado por el Departamento de Ciencias de la Salud de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa aprobó la presente Tesis de Maestría a los veintinueve días del mes de abril de mil novecientos ochenta y seis.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Cereijido' with a horizontal line drawn across it.

DR. MARCELINO CEREIJIDO

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Graciela' in a cursive style.

DRA. GRACIELA BEATY P.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Rosario Lopez Vancell' in a cursive style.

M. EN C. ROSARIO LOPEZ VANCELL