

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE UNIONES ESTRECHAS (*TIGHT JUNCTIONS*) DE CÉLULAS ACINARES DE GLÁNDULAS SALIVALES DE PACIENTES CON SÍNDROME DE SJÖGREN

PATRICIA EWERT MEDINA

PROFESORES DIRECTORES DE MEMORIA:

Dra. María Julieta González Burgos
Programa de Biología Celular y Molecular
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Dr. Sergio Aguilera Covarrubias
Clínica INDISA, Universidad Andrés Bello

PROFESOR PATROCINANTE:

Dra. María Antonieta Valenzuela
Depto. Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIOQUÍMICO

SANTIAGO-CHILE

2006

*A mi querida familia
por su inspiración y amor incondicional.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar un profundo agradecimiento a: Dra. Julieta González, Dra. Cecilia Alliende, Dr. Sergio Aguilera, Dra. Cecilia Leyton, Dr. Rafael Romo, Dra Nancy Olea, Yoon-Jeoung Kwon, Paola Pérez, Monica Brito, Isabel Castro, Claudio Molina, Sergio González, Claudio Figueroa y Javier Esparza, quienes contribuyeron tanto en el desarrollo de este trabajo científico como por su valiosa calidad humana; de ellos he aprendido mucho mas que ciencia.

A los integrantes de la comisión, María Antonieta Valenzuela, Dante Miranda y Lorena García por su contribución en mejorar esta memoria.

A los profesores Norbel Galanti y Jorge Sanz por su generosidad con los instrumentos y equipos.

A los anónimos pacientes, sin ellos este trabajo no habría sido posible.

A mi familia, Arturo Ewert, Ida Medina, Pamela Ewert , Judith Ewert, Ricardo González y a Claudio Muñoz por su gran apoyo, paciencia y por sobre todo, el cariño que me expresan día a día.

Esta memoria fue realizada en el laboratorio de Biología Celular del Programa de Biología Celular y Molecular del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo la dirección de los profesores: Dra. María Julieta González Burgos y Dr. Sergio Aguilera Covarrubias, quien además es el asesor médico de esta memoria. Financiada por los proyectos Fondecyt 1020755 y 1050192.

Todos los pacientes participantes en este estudio fueron diagnosticados y clasificados por el Dr. Sergio Aguilera Covarrubias, médico reumatólogo de la Clínica INDISA-Universidad Andrés Bello, y co-investigador de los proyectos mencionados. Esta institución facilita, sin costo, los pabellones quirúrgicos e insumos para realizar las biopsias de glándulas salivales labiales, que se practican gratuitamente a los pacientes con fines diagnósticos. Además, realiza los exámenes de laboratorio que no pueden ser cancelados por los enfermos.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
TABLA DE CONTENIDOS	v
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	xi
SUMMARY	xiii
INTRODUCCIÓN	1
1. Generalidades del síndrome de Sjögren	1
2. Breves antecedentes sobre la organización y función de las Uniones Estrechas	3
3. Características de las proteínas de Uniones Estrechas	5
4. Regulación de la organización de la Unión Estrecha en la mantención de la polaridad celular	10
5. Regulación de la estructura y función de las Uniones Estrechas por citoquinas	11
HIPÓTESIS	13
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
1. Materiales y sus procedencias	14
2. Pacientes	14
3. Obtención de glándulas salivales labiales (GSL)	15
4. Determinación de la expresión génica por RT-PCR semicuantitativo	15
4.1 Extracción de RNA total	15
4.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa-formaldehído	16
4.3 Síntesis de cDNA	16
4.4 Diseños de partidores específicos	17
4.5 PCR	17
4.5.1 Optimización de la PCR	18
4.5.2 Detección y análisis de los productos de amplificación	18
5. Extracción de proteínas	19
6. Cuantificación de proteínas	19

7. Análisis de las proteínas por inmunquímica	19
7.1 Preparación de la muestra	19
7.2 Separación electroforética de proteínas	19
7.3 Western blot	20
8. Análisis estadístico	21
9. Inmunohistoquímica	21
9.1 Detección por inmunohistoquímica de ZO-1 y claudina-4.	21
9.2 Detección por inmunofluorescencia de ocludina y claudina-3	22
10. Captura de la imagen digital	22
RESULTADOS	24
1. Eficiencia en la extracción y calidad del RNA de glándulas salivales labiales	24
2. Validación de la RT-PCR semicuantitativa para el estudio de expresión de genes de Uniones Estrechas en GSL humanas.	24
3. Niveles relativos de los mRNA de la Claudina-4 en GSL de individuos controles y de pacientes	26
4. Niveles relativos de proteínas de Claudina-1, -3, -4, Ocludina y ZO-1 en GSL de individuos controles y de pacientes	27
4.1 Niveles relativos de proteínas de Claudina-4	28
4.2 Niveles relativos de proteínas de Claudina-3	29
4.3 Niveles relativos de proteínas de Claudina-1	30
4.4 Niveles relativos de proteínas de Ocludina	32
4.5 Niveles de proteólisis de Ocludina	35
4.6 Niveles relativos de proteínas de ZO-1	37
5. Localización subcelular de proteínas de UE en GSL de controles y pacientes SS	38
5.1 Localización subcelular de Claudina-4 en GSL de controles y pacientes SS	38
5.2 Localización subcelular de Claudina-3 en GSL de controles y pacientes SS	40
5.3 Localización subcelular de Ocludina en GSL de controles y pacientes SS	41
5.4 Localización subcelular de ZO-1 en GSL de controles y pacientes SS	43
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	54
BIBLIOGRAFÍA	55

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

		Pág.
Tabla 1	Datos demográficos de los grupos estudiados	15
Tabla 2	Características de los partidores	17
Tabla 3	Condiciones de la PCR	18
Tabla 4	Condiciones del Western-blot	20
Tabla 5	Detalle de anticuerpos primarios y secundarios	22
Figura 1	Cambios estructurales en acinos y ductos de pacientes con síndrome de Sjögren (SS)	3
Figura 2	Componentes del complejo de unión y estructura básica de los epitelios	4
Figura 3	Esquema de las Uniones Estrechas	5
Figura 4	Organización molecular de la Unión Estrecha	5
Figura 5	Estructura de las Claudinas	6
Figura 6	Estructura de las Ocludinas	8
Figura 7	Estructura de las ZO	9
Figura 8	Detección electroforética de RNA de glándulas salivales labiales	24
Figura 9	Determinación de las condiciones para la reacción de PCR para Claudina-4	25
Figura 10	Niveles relativos de mRNA de Claudina-4 en GSL de individuos controles y pacientes	27
Figura 11	Detección y cuantificación proteica de Claudina-4	29
Figura 12	Detección y cuantificación proteica de Claudina-3	30
Figura 13	Detección y cuantificación proteica relativa de Claudina-1	31
Figura 14	Señales de intensidades densitométrica de Ocludina	32
Figura 15	Detección y cuantificación proteica de Ocludina	33
Figura 16	Clasificación morfológica de GSL de individuos controles y pacientes SS, según su porcentaje de parénquima	35
Figura 17	Evaluación de los niveles relativos de proteólisis de Ocludina	36

Figura 18	Señales de intensidades densitométricas de ZO-1	37
Figura 19	Detección y cuantificación proteica relativa de ZO-1	38
Figura 20	Localización subcelular de Claudina-4 en glándulas salivales labiales de controles y de pacientes SS	39
Figura 21	Localización subcelular de Claudina-3 en glándulas salivales labiales de controles y de pacientes SS	40
Figura 22	Localización subcelular de Ocludina en glándulas salivales labiales de controles y de pacientes SS	42
Figura 23	Localización subcelular de ZO-1 en GSL de controles y de pacientes SS	43
Figura 24	Formación de la saliva isotónica en acinos	49
Figura 25	Formación de la saliva hipotónica en los ductos	50
Figura 26	Esquema hipotético de la desorganización de las Uniones Estrechas y sus consecuencias	53

LISTA DE ABREVIATURAS

aPKC	Proteína Quinasa C atípica
C	Control
CAR	Receptor de adhesión a coxsakievirus (Coxsakievirus Adhesion Receptor)
cDNA	DNA complementario
cldn	claudinas
cldn-1	claudina-1
cldn-3	claudina-3
cldn-4	claudina-4
DEPC	Dietil-pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético
EGFR	Receptor de factor de crecimiento epidermal
EGTA	Ácido etilen-bis(oxietilenonitrilo)-tetraacético
EphA2	Receptor de la familia de Ephrina
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
GSL	Glándulas salivales labiales
GUK	Dominio tipo Guanilato Quinasa
INF- γ	Interferon gamma
JAM	Molécula de adhesión en uniones (Junction Adhesion Molecule)
L	Lumen
m	mucoso
mA	MiliAmperio
MAGUKs	Proteínas de Membrana Asociadas a Guanilato Quinasas
MEC	Matriz extracelular
MMP(s)	Metaloproteinasas de matriz extracelular
MOPS	Ácido 3-N-morfolino propano
mRNA	RNA mensajero
NOD	Diabético no obeso
ocln	occludina
P	Paciente
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDZ	PSD-95: post synaptic protein-95; DLG: disc large; ZO-1: zonula occludens
PKA	Proteína Quinasa A
PKC	Proteína Quinasa C
PP2A	Proteína Fosfatasa 2A
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, asociada a transcriptasa inversa
s	seroso
sm	seromucoso

scid	Inmuno-deficiencia severa combinada
SS	Síndrome de Sjögren
SSp	Síndrome de Sjögren primario
SSs	Síndrome de Sjögren secundario
TER	Resistencia eléctrica trans-epitelial
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UE	Uniones Estrechas
ZO-1	Zonula occludens-1, zona de oclusión

RESUMEN

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad inflamatoria, autoinmune, crónica de etiología desconocida, que compromete esencialmente a las glándulas salivales y lagrimales, generando xeroftalmia (sequedad ocular) y xerostomía (sequedad bucal).

Las glándulas salivales de los pacientes con este síndrome presentan cambios importantes en la estructura, organización y funcionalidad del parénquima glandular y de la matriz extracelular. En células acinares, pérdida de polaridad celular, pérdida de microvellosidades apicales, dilatación de lúmenes, redistribución de aquaporina 5 y presencia de colágenos de la matriz extracelular en el lumen de los acinos, son indicadores que la organización del polo apical y la polaridad de estas células está alterada. Un estudio mediante microarreglos de cDNA reveló que las glándulas salivales de pacientes SS presentan una sobreexpresión del mRNA de claudina-4, mientras que los niveles de mRNA de ocludina (ocln), ZO-1, claudinas (cldn)-1, -3, -5, -10, -18 y -23 fueron similares a los controles.

En los epitelios en general, y en los acinos en particular, una de las estructuras que participan en la regulación de la organización del polo apical y mantención de la polaridad celular son las Uniones Estrechas (UE) o *tight junctions*. Estos complejos de unión localizados en la porción más apical de las células epiteliales participan en la difusión de iones, a través de la vía paracelular. Sus funciones más relevantes son: 1) formar la primera barrera que evita el transporte paracelular de solutos y 2) restringir la difusión lateral de proteínas de membrana plasmática, y así mantiene la asimetría entre dominio apical y basolateral.

En esta memoria, se abordó el estudio de algunas proteínas de membrana plasmática que son componentes de la Unión Estrecha, claudina-1 -3, -4, ocludina y una proteína citoplasmática, ZO-1.

Estos antecedentes y otros, permiten postular la siguiente hipótesis de trabajo: "La pérdida de polaridad de células acinares de glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjögren, y la desorganización de su polo apical, están asociadas a los cambios en expresión génica y de niveles de proteínas de las Uniones Estrechas. Estos cambios en expresión están acompañados de una localización alterada de las proteínas constituyentes de la UE".

Para evaluar esta hipótesis, se determinaron los niveles de mRNA de claudina-4 y de proteínas de claudina-1, -3, -4, ocludina y ZO-1 en glándulas salivales labiales (GSL) de pacientes con síndrome de Sjögren y se compararon con los resultados obtenidos en individuos controles. Además, mediante inmunohistoquímica/inmunofluorescencia, se analizó la localización de claudina-3, -4, ocludina y ZO-1. Los niveles relativos de mRNA para claudina-4 no mostraron diferencias significativas entre pacientes y controles ($p=0,052$). Los niveles relativos de proteínas de claudina-3, ocludina sin fosforilar y ocludina total, no mostraron diferencias significativas entre el grupo total de pacientes y el grupo control ($p=0,052$, $p=0,06$

y $p=0,089$, respectivamente), sin embargo, al separar el grupo de pacientes de ocludina total en dos subgrupos, de acuerdo a su nivel de expresión, se encontró que sólo el grupo con niveles bajos de ocludina total mostraron diferencias significativas respecto al grupo control ($p=0,0008$). Los niveles de proteína de claudina-1 y -4 fueron significativamente mayores en pacientes SS, respecto a controles ($p=0,023$ y $p=0,04$, respectivamente). Sin embargo, los niveles proteicos relativos de ocludina fosforilada y ZO-1, fueron significativamente menores en pacientes SS que en controles ($p=0,034$ y $p=0,033$, respectivamente).

En pacientes SS, la localización subcelular de las proteínas que forman las UE, mostraron una marca intensa para claudina-3 y -4, en la superficie apical de acinos y ductos de GSL, y a diferencia de los controles, también se observó marca en la superficie basolateral de acinos. Mientras que ocludina y ZO-1 mostró una disminución marcada, sin modificar su localización en el polo apical de las células acinares y ductales.

Estos resultados apoyan la hipótesis, que acinos provenientes de GSL de pacientes SS presentan cambios en los niveles de algunas proteínas de UE y en su localización, los cuales explicarían las alteraciones en las UE. Más aún, estos resultados podrían explicar, en parte, la pérdida de organización detectada en el polo apical de los acinos, y podrían correlacionarse con la hipofuncionalidad secretora observada en pacientes SS.

SUMMARY

Sjögren`s syndrome (SS) is a chronic autoimmune, inflammatory disease of unknown etiology that essentially compromises lachrymal and salivary glands, producing xerofthalmia (ocular dryness) and xerostomía (oral dryness).

The salivary glands of SS patients present important changes in the structure, organization and functionality of the glandular parenchyma and extracellular matrix. In acinar cells, the loss of cell polarity, loss of apical microvilli, luminal dilatation, redistribution of aquaporin 5 and presence of collagens from extracellular matrix in acinar lumen, are indicators of alterations in the apical pole. A cDNA microarray analysis revealed that the salivary glands from SS patients present an overexpression of claudin-4, while the levels of gene expression of occludin, ZO-1, claudin -1, -3, -5, -10, -18 and -23 were similar to the levels found in samples from control individuals.

In epithelia and acini in particular, one of the structures that participate in the regulation of the organization of the apical pole and maintenance of cell polarity are the tight junctions (TJ). These union complexes are located in the apical zone of the epithelial cells participating in the diffusion of ions through the paracellular space. TJ most prominent functions are: 1) to form the first barrier that avoids the paracellular transportation of solutes and 2) to restrict the lateral diffusion of plasma membrane proteins, and thus maintain the asymmetry between the apical and basolateral compartments. In this thesis, the study of TJ components such as the plasma membrane proteins, claudin-1 -3, -4, occludin, and a cytoplasmic protein, ZO-1 was undertaken.

We thus postulated the following working hypothesis: "The loss of cell polarity in salivary glands of SS patients and the disorganization of their apical pole, are associated with changes in gene expression and protein levels of TJ. These changes in expression are associated with localization changes of proteins that are part the TJ".

To evaluate this hypothesis, the mRNA levels of claudin-4 and protein levels of claudin-1, -3, -4, occludin and ZO-1 in GSL were determined in salivary glands from SS patients and compared with those of control individuals. Using immunohistochemistry/immunofluorescence, the localization of claudin-3, -4, occludin and ZO-1 was also analyzed. The relative mRNA levels of claudin-4 did not show significant differences between patients and controls ($p=0.052$). The relative protein levels of claudin-3, non phosphorylated occludin and total occludin, did not show significant differences between patients and the control group ($p=0.052$, $p=0.06$ and $p=0.089$, respectively), nevertheless, when the patients group were divided in two sub-groups, according to their level of expression of total occludin, only the group with low levels of total occludin showed differences with the control group ($p=0.0008$). The protein levels of claudin-

1, and-4 were significantly higher in SS patients with respect to controls ($p=0.023$ and $p=0.04$, respectively). However, the relative protein levels of phosphorylated occludin and ZO-1, were significantly lower in SS patients compared to controls ($p=0.034$ and $p=0.033$, respectively).

In SS patients, the subcellular localization of the TJ proteins, showed an intense signal for claudin-3 and -4, in the apical surface of acini and ducts, and in contrast to the control group, it was also detected in the basolateral surface of acini. On the other hand, occludin and ZO-1 showed a decreased signal and maintaining their localization in the apical pole of acinar and ductal cells.

These results support the hypothesis, that acini from LSG of SS patients present changes in some TJ proteins levels and in their localization correlating with alterations in TJ. Moreover, the latter could explain in part, the loss of organization detected in the acini apical pole, which would correlate with the secretory hypofunctionality observed in SS patients.

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades del síndrome de Sjögren

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune, crónica de etiología desconocida, que compromete esencialmente a las glándulas salivales y lagrimales, generando xeroftalmia (sequedad ocular) y xerostomía (sequedad bucal). Esta enfermedad afecta más a mujeres que a hombres, en una relación 9:1, manifestándose preferentemente alrededor de los cincuenta años. Sin embargo, puede también presentarse a edades más tempranas e incluso en niños [1].

Varios factores se han asociado con la etiopatogenia de esta enfermedad, tales como: alteraciones en la remoción de células-T autorreactivas a nivel del timo [2] e incremento en los niveles de moléculas de adhesión asociadas a las células endoteliales. De esto resulta una infiltración de las glándulas con linfocitos autorreactivos, expresión de ciertos haplotipos de HLA, secreción de citoquinas pro-inflamatorias por los linfocitos y las células epiteliales y activación policlonal de linfocitos-B [3].

El SS puede desarrollarse solo (SS primario, SSp) o en asociación con otras enfermedades autoinmunes (SS secundario, SSs) como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, polimiositis, esclerosis sistémica y tiroiditis [1, 3, 4].

Las glándulas salivales y lacrimales de los pacientes SS presentan infiltración linfocitaria focal alrededor de ductos y difusa entre los acinos. Se ha postulado que las células acinares y ductales presentan muerte celular gatillada por la acción citotóxica de linfocitos T CD4+ y T CD8+, a través de la acción de Fas/FasL y granzima/perforina [5, 6].

Los mecanismos responsables de la disfunción secretora se han atribuido a la acción de anticuerpos anti-receptores muscarínicos del subtipo M3 [7], a la denervación glandular y a la redistribución de canales de agua (aquaporina 5) desde el polo apical al basolateral. Es también factible que se produzcan alteraciones en la destinación de estos canales que se acumularían en el citoplasma [8].

Con el propósito de determinar el papel del infiltrado linfocitario en el desarrollo de esta enfermedad se han utilizado modelos animales. El modelo murino más utilizado en el estudio del SS, es el de los ratones diabéticos no obesos (NOD), que presentan infiltración linfocitaria glandular similar a lo observado en los pacientes con SS. Las cepas de ratones NOD con inmunodeficiencia severa combinada (scid) no tienen linfocitos T y B activos, pero presentan un aumento en la expresión de Fas/FasL en células acinares y de los ductos, con un incremento en la actividad de proteasas que degradan la matriz extracelular (MEC). Con estos antecedentes se postuló que la enfermedad evolucionaría en dos etapas sucesivas: 1) fase inicial, independiente de linfocitos T y B que se caracteriza por la apoptosis de algunas

células epiteliales y por alteraciones en la limpieza de los restos apoptóticos que serían potenciales auto-antígenos y 2) la fase final es de carácter autoinmune, con infiltración linfocitaria y la formación de auto-anticuerpos [9-12].

Trabajos previos de nuestro laboratorio muestran que las glándulas salivales de los pacientes con SS presentan cambios importantes en la estructura, organización y función del parénquima glandular y de la MEC, tales como: un incremento en la actividad y expresión de metaloproteinasas (MMPs) de MEC, disminución de los inhibidores tisulares de estas enzimas, desorganización de la lámina basal de acinos y conductos, desanclaje de la célula acinar de su lámina basal, pérdida de la polaridad celular, dilatación de los lúmenes de los acinos, pérdida de microvellosidades de la superficie apical de las células acinares, presencia de fibras de colágeno estromales en el lumen acinar y, cambios en la cantidad y calidad de mucinas de secreción, Figura 1 [13, 14]. Debemos tener presente que la maquinaria molecular de exocitosis se localiza en el polo apical de las células acinares, en consecuencia, las alteraciones mencionadas podrían alterar su funcionamiento normal. La pérdida de microvellosidades, dilatación del lumen acinar, presencia de colágeno de la MEC en el lumen y la redistribución de aquaporina 5, son indicadores que sugieren que la polaridad de la célula acinar está alterada.

La polaridad celular determina la orientación de las estructuras intracelulares, especialmente con respecto al dominio apical y basolateral de la membrana plasmática, además de las interacciones que establecen las células epiteliales entre sí, y con la lámina basal. En los epitelios en general, y en los acinos en particular, las uniones estrechas (UE, *tight junctions*) participan en la regulación y mantención de la polaridad celular.

En un estudio reciente, en que se evaluó la expresión de alrededor de 4000 genes de glándulas salivales labiales (GSL) de pacientes SS, mediante microarreglos de cDNA, se encontró sobreexpresión de claudina-4 (*cldn-4*), mientras que los niveles de expresión génica de claudina-1, -3, -5, -10, -18, -23 y ocludina (*ocln*) fueron similares a los controles [15]. Ambas proteínas son componentes de las UE. Considerando todos los resultados mencionados es importante estudiar el efecto de la sobreexpresión de *cldn-4* y la eventual modificación de su localización subcelular. Los microarreglos no informan sobre cambios en la expresión de otra proteína de las UE, sin embargo, ZO-1 podría modificar sus niveles proteicos o localización subcelular, como consecuencia de la sobre expresión de *cldn-4*, ya que ambas proteínas interactúan por el lado citoplasmático.

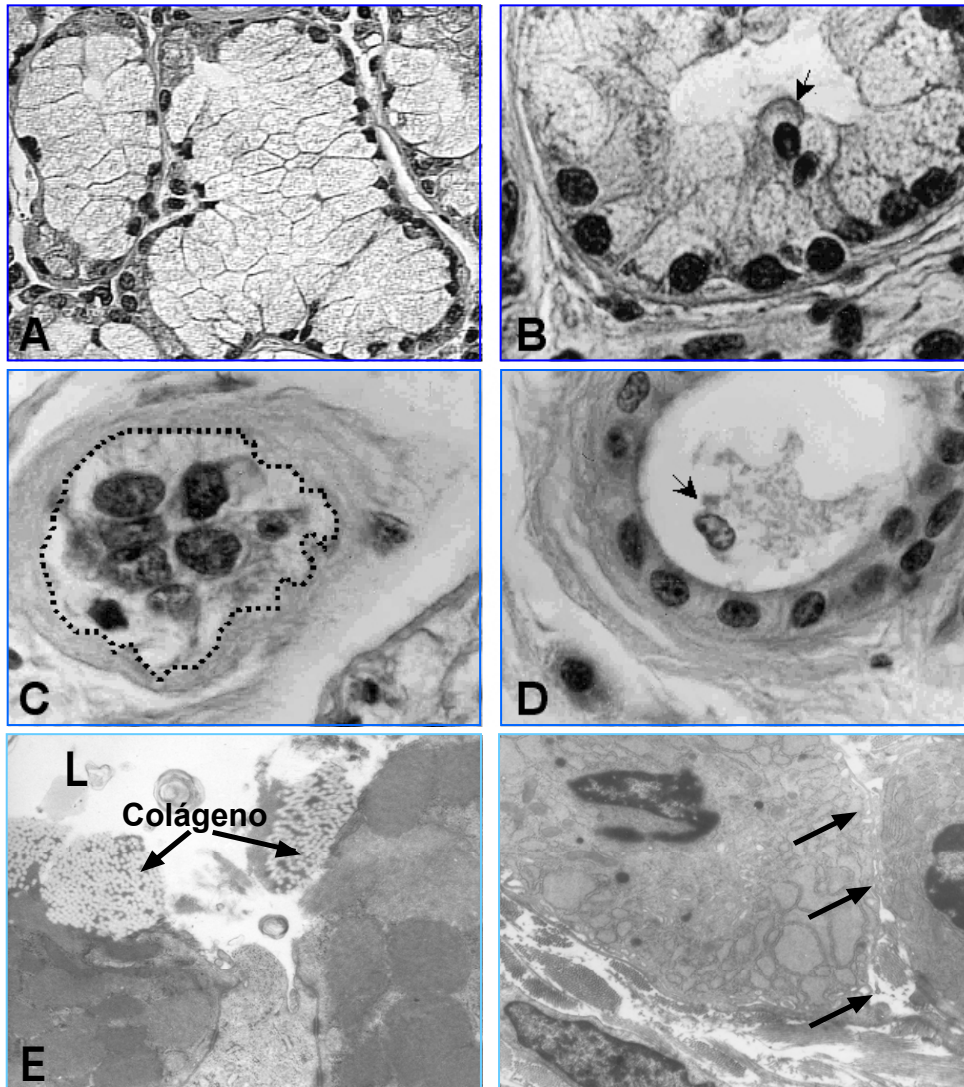


Figura 1. Cambios estructurales en acinos y conductos de pacientes con síndrome de Sjögren (SS). En A, se muestra un acino de un sujeto normal y en B, se muestra un acino de un paciente SS, donde se observa pérdida de polaridad celular producida por una falla en el anclaje a su lámina basal, en C hay pérdida total de anclaje, el probable límite de la lámina basal se indica con la línea segmentada, en D se observa un ducto con restos de células acinares, en E, lumen (L) acinar con haces transversales de fibras de colágeno estromal (flechas) y F las flechas indican la presencia de fibras colágenas estromales en la superficie lateral de dos células acinares [13]

2. Breves antecedentes sobre la organización y función de las Uniones Estrechas

En los epitelios, el transporte de iones, solutos y agua se realiza por medio de las rutas transcelular y paracelular. El transporte transcelular se lleva a cabo por medio de bombas y canales específicos y son responsables de la gradiente electrosmótica. La mantención de esta gradiente, depende de la difusión que se produce a través de la vía paracelular, la que está regulada por complejos de adhesión, que incluyen UE localizadas en la porción más apical de las células epiteliales [16].

La UE es un complejo de unión multiproteico especializado y cuyas funciones más relevantes son: formar la primera barrera que evita el transporte paracelular de solutos, restringir la difusión lateral de

proteínas de membrana, y así mantener la asimetría entre dominio apical y basolateral [17] y la capacidad de reclutar proteínas de señalización [18].

La observación por microscopía electrónica de epitelios sometidos a congelación-grabado (*freeze-etching*) y con técnicas convencionales muestra a las UE como una red continua de partículas filamentosas intermembranas (filamentos de UE). Cuando se observan cortes ultrafinos, las UE se ven como una serie de puntos de fusión entre las monocapas externas de las membranas plasmáticas de células adyacentes, Figura 2, [19].

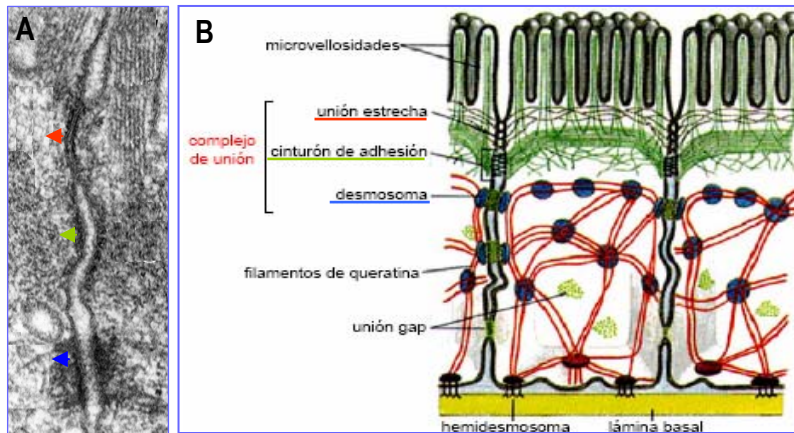


Figura 2. Componentes del complejo de unión y estructura básica de los epitelios. En la figura A, se muestra una microfotografía de microscopía electrónica donde se observan los distintos componentes del complejo de unión: unión estrecha (cabeza de flecha roja), desmosoma en banda (cabeza de flecha verde) y desmosoma en botón (cabeza de flecha azul). B corresponde a un modelo que muestra la estructura básica de los tejidos epiteliales, las células están estrechamente asociadas entre sí, y se sustentan sobre la lámina basal. Se destaca el complejo de unión que incluye la unión estrecha, unión adherente y desmosoma en botón. Adaptado de Alberts y cols [16].

Cada filamento de la UE está asociado lateralmente con otros filamentos de UE de la célula adyacente, para formar filamentos apareados, donde la distancia intercelular se restringe notablemente. Por el lado citoplasmático, estos filamentos están asociados con microfilamentos de actina, Figura 3. [20, 21].

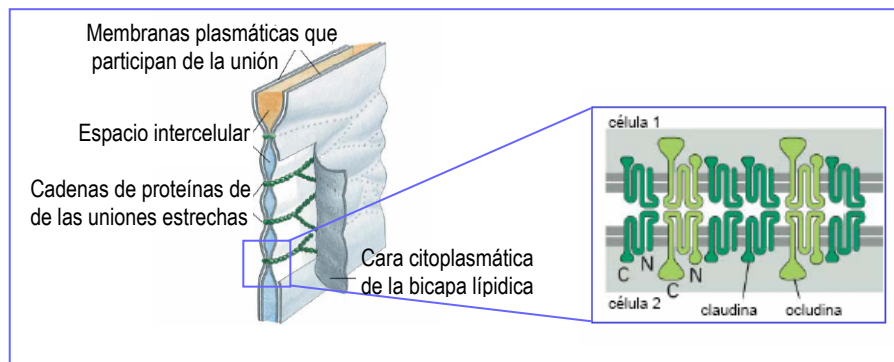


Figura 3. Esquema de las Uniones Estrechas. Este esquema muestra como los filamentos de proteínas de UE mantienen unidas las membranas plasmáticas de dos células adyacentes. Los filamentos se componen de las proteínas de transmembrana que hacen el contacto a través del espacio intercelular y crean un sello. En el recuadro, se muestra dos células adyacentes, donde las proteínas de transmembrana, claudina y ocludina, configuran un ensamblaje estrecho entre ellas. Adaptado de Alberts y cols [16].

3. Características de las proteínas de Uniones Estrechas.

Dentro de las proteínas de membrana plasmática que constituyen este complejo multiproteico, se encuentran: claudinas (cldn), ocludinas (ocln), JAM (*junction adhesion molecule*) y CAR (*Coxsackievirus adhesion receptor*), Figura 4.

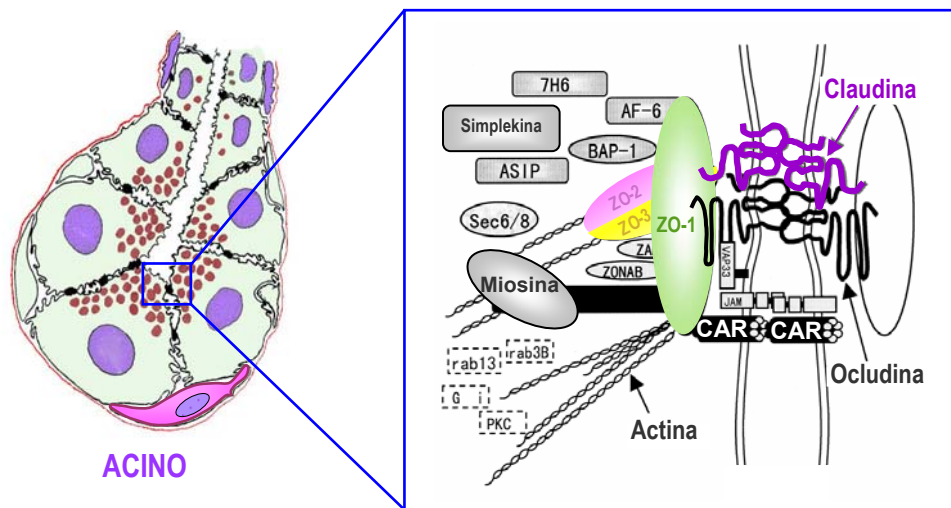


Figura 4. Organización molecular de la Unión Estrecha. Esta figura muestra un acino, unidad básica estructural y funcional de una glándula salival, organizado por células acinares que poseen una estructura piramidal, con su núcleo ubicado hacia la porción basal y sus gránulos de secreción hacia el polo apical, además se puede observar una célula mioepitelial (rosada) interaccionando con las células acinares. Las Uniones estrechas, encargadas de la polaridad celular, se ubican en la porción más apical entre dos células vecinas (recuadro azul). El recuadro de la derecha muestra con detalle las proteínas que forman este complejo, entre ellas, las proteínas de transmembrana: Claudinas (morado), Ocludinas (negro), JAM y CAR, proteínas citosólicas: ZO-1 (verde), ZO-2 (rosado) y ZO-3 (amarillo). Claudinas y ocludinas pueden formar complejos homo o heteroméricos, los cuales a través de su dominio C-terminal interaccionan con algunas de las ZO, las cuales se unen a los filamentos de actina. Las otras proteínas que aparecen en el esquema participan en transducción de señales. Adaptado de Mitic y cols [22].

Las **Claudinas** (cldn); son complejos multiméricos de tipo homo o heteroméricos, que forman poros iónicos selectivos o permisivos. A la fecha, forman una familia de 24 miembros y tienen una masa molecular entre 20-27 kDa (Figura 5). Su estructura terciaria está conformada por cuatro dominios transmembrana, hacia el extracelular presentan dos dominios, el dominio 1 en relación con el extremo amino terminal, y el dominio 2 hacia el extremo carboxilo terminal. Ambos extremos se orientan hacia el citoplasma. Intracelularmente, las cldn se asocian a proteínas con dominios PDZ (PSD-95= *post synaptic protein-95*, DLG=*discs large*, ZO-1=*zonula occludens*), a través de aminoácidos altamente conservados y localizados en la región C-terminal. Mutaciones en aminoácidos de la región C-terminal de ZO-1 impiden la asociación con cldn, y ZO-1 no se asocia a las UE [23].

En diversos epitelios, la presencia de complejos heteroméricos en una UE genera una gran variedad de combinaciones, hecho que explicaría la amplia heterogeneidad en la resistencia eléctrica y en la selectividad iónica paracelular hasta ahora descrita [19, 24].

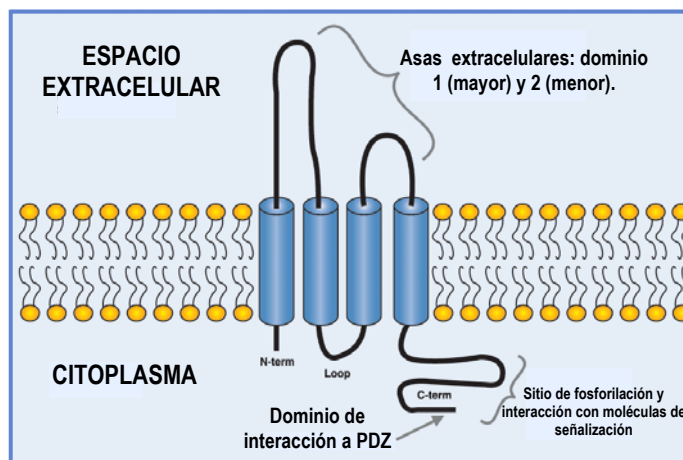


Figura 5. Estructura de las Claudinas. Las Claudinas son una familia de proteínas que contienen cuatro dominios transmembrana. Poseen dos asas extracelulares, una de mayor y otra de menor tamaño. La región C-terminal de las claudinas es fosforilada. Además, contiene dominios de unión a PDZ por donde interaccionan con las ZO que pueden estar implicados en la transducción de señales. Adaptado de Morin y cols [25].

Una expresión diferencial de las cldn se observa en los diferentes estadios embrionarios de la glándula submandibular de ratón en comparación con los recién nacidos. Así, en el estadio 16, cldn-4 se expresa en los ductos, y la marca se extiende hasta la vecindad de los acinos. Mientras que en los recién nacidos la expresión está restringida sólo a los ductos. De la misma forma, en el estadio 16, cldn-6 se expresa en ductos y en los de recién nacidos desaparece. La expresión de cldn específicas podría explicar las diferencias en resistencia eléctrica transepitelial y permeabilidad observada en ductos y acinos [26, 24, 27, 28]. Por otra parte, estas glándulas exhiben un incremento de permeabilidad en las UE después de la estimulación adrenérgica. Esta estimulación podría regular transientemente la expresión e interacción de los miembros de las cldn [29].

Los cultivos en monocapas de células MDCK II, transfectadas para sobreexpresar *cldn-4*, muestran un descenso en la conductancia eléctrica a través de la monocapa, concomitante a la disminución selectiva del paso de Na^+ a nivel paracelular. Esto ocurre sin una influencia significativa sobre la permeabilidad del Cl^- . Estos resultados son consistentes con el modelo propuesto para *cldn-4*, que sugiere su función como poro selectivo para el ión Na^+ [30]. La selectividad paracelular estaría determinada por el dominio 1 [31, 32]. Otros estudios muestran fuertes evidencias que *cldn-4* es la que modula la vía paracelular, en ellos también se emplearon las células MDCK II y se evaluó el efecto de su sobreexpresión y se encontró que: 1) la conductancia paracelular excede en forma importante la conductancia transcelular, lo que aumentaría la resistencia eléctrica transepitelial (TER) [33] y 2) la red de los filamentos que organizan las UE también aumentan, sin modificar los niveles de *cldn-1*, 2, 3, *ocln* y *ZO-1* [30]. Así, se concluye que los filamentos de *cldn-4* modulan las características de barrera de las UE. Nuevas evidencias indican que otras claudinas, también participan en esta función de barrera, así tenemos que en ratones *knock-out* para claudina-1 (*cldn-1*), la piel se encuentra deshidratada, concordante con un aumento en la pérdida de agua transepidermica [34].

La expresión de *cldn* se ha visto alterada en varios tipos de cáncer. Paradójicamente los niveles de expresión son contrastantes, algunos estudios muestran sobreexpresión de ellas, mientras otros presentan disminución. Un ejemplo de regulación negativa se ha observado en cáncer de mama y de colon, donde *cldn-1* se encuentra disminuída [35, 36]. La disminución de la expresión de proteínas de UE podría explicar el desensamblaje de éstas. Este desensamblaje se acompaña de una disminución en la adhesión célula-célula, pérdida de diferenciación celular y aumento en la invasividad. La disminución en los niveles proteicos de *cldn* se ha encontrado asociado a la fosforilación de las mismas, afectando la funcionalidad de las UE [25]. Así, la fosforilación de *cldn-3* y *cldn-4* en células de cáncer de ovario produce el desensamblaje de la UE [37]. Por otra parte, la disminución de *cldn-3* y *cldn-4* también ha sido relacionada a tumorigénesis, sin embargo en líneas celulares de cáncer ovárico, ambas *cldn* están sobreexpresadas [38].

Las **Ocludinas** (*ocln*): son proteínas de transmembrana de alrededor de 65 kDa. Esta molécula tiene 4 dominios transmembrana formando dos asas extracelulares; con sus extremos NH_2 y COOH terminal localizados hacia el citoplasma, un largo dominio C- terminal (150 aa), que contiene sitios de unión para proteínas de andamio como *ZO-1*, *ZO-2*, *ZO-3* y cingulina [19, 20, 24], Figura 6. La importancia funcional de *ocln* en la regulación de la barrera paracelular ha sido cuestionada. En experimentos de sobreexpresión de la *ocln*, los filamentos que constituyen las UE tienen una apariencia normal y la *ocln* se encuentra distribuida en el citoplasma, no asociada a las UE [39]. Cuando células troncales que han sufrido

mutaciones nulas para ocln fueron diferenciadas a células epiteliales, las redes de filamentos de las UE se desarrollaron normalmente entre las células adyacentes. Estudios en el epitelio intestinal de ratones knock-out para ocln mostraron que otras proteínas, como por ejemplo *cln-3*, no modifican sus niveles proteicos, y las UE presentan morfología y función de barrera normales [21, 40]. Por lo tanto, este grupo de evidencias indica que los filamentos de las UE se pueden formar en ausencia de ocln.

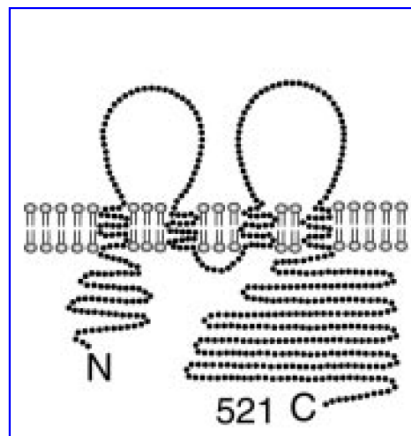


Figura 6. Estructura de las Ocludinas. Las ocludinas también pertenecen al grupo de proteínas de membrana, y su estructura es similar a la de la familia de las *cln* con la diferencia que *ocln* es de mayor tamaño, posee cuatro dominios transmembrana, dos asas extracelulares y un largo dominio C-terminal. Adaptado de Schneeberger y cols [41].

Ocludina es producto de un gen único. Sin embargo, varias isoformas de la proteína se han detectado en células epiteliales. Hasta el momento se han descrito 5 isoformas, producto de *splicing* alternativo: I, II, III, IV y TM4 [40]. Estas isoformas pueden presentar diferentes estados de fosforilación u otras modificaciones post-transcripcionales. Se ha sugerido que estas isoformas pueden estar implicadas en la regulación del ensamblaje de las UE [42, 43]. A pesar de lo mucho que se ha estudiado la *ocln*, su función es aún incierta.

La proteína **JAM** (molécula de adhesión que se asocia a proteína quinasa C atípica, aPKC), es glicosilada y tiene una masa molecular de 43 kDa. Posee tres dominios estructurales distintos: una región extracelular de 215 aminoácidos, que contiene dos dominios variable tipo inmunoglobulinas; un dominio único de transmembrana, y un corto tallo intracelular (45 aa) que es característico de un clásico motivo de unión tipo PDZ tipo II (Treo-X-aa hidrofóbico) [44]. A través de su carboxilo terminal las proteínas JAM interactúan con los dominios PDZ de AF6, ASIP/Par-3 y ZO-1. [19]. Se ha propuesto que esta proteína restringe la libre difusión de proteínas hacia el espacio intermembrana [45]. En procesos inflamatorios, se ha determinado que durante el paso de leucocitos desde la sangre al estroma, los dominios tipo inmunoglobulinas de las proteínas JAM interactúan con antígenos y así evitan el transporte paracelular de proteínas [46].

La proteína **CAR** (receptor de adhesión de *Coxsakiavirus*), es una proteína integral de membrana de 46 kDa, con sólo una región de transmembrana, un largo tallo citoplasmático [19], y una región extracelular compuesta de dos dominios del tipo inmunoglobulinas. En células epiteliales los CAR co-inmunoprecipitan con ZO-1 y co-localizan con las UE. El dominio carboxilo terminal contiene motivos de unión PDZ tipo I (Ser-X-aa hidrofóbico) [44], que pueden explicar la interacción observada entre JAM/ZO-1. CAR se une a IgG y IgM provenientes del suero [47] y es sobreexpresado en sitios de inflamación [48]. Por ello se especula que junto a las JAM participarían en la migración de células del sistema inmune [19]. La sobreexpresión de CAR en células epiteliales produce un incremento de TER que se acompaña por una disminución del flujo paracelular de macromoléculas [49].

Las proteínas citoplasmáticas que participan en la formación de las UE son las **MAGUKs** (*membrane associated guanylate kinases*), que juegan un papel en la formación y mantención de los dominios de membrana de varios tipos celulares. Estas moléculas contienen tres dominios PDZ, un dominio SH3, y un dominio tipo guanilato quinasa (GUK), Figura 7. Los dominios PDZ pueden unirse al C-terminal de varias proteínas, específicamente proteínas integrales de membrana (claudinas y ocludinas). Sus tres miembros son ZO-1, 2 y 3. ZO-1 tiene una masa molecular de 220 kDa, ZO-2 de 160 kDa y ZO-3 de 130 kDa. Se concentran exclusivamente en la superficie citoplasmática de las UE, en la vecindad inmediata de la membrana plasmática. ZO-1 o 2 se unen directamente a los microfilamentos de actina por su región C-terminal, sugiriendo que estas moléculas funcionan entrecruzando los filamentos de UE y los microfilamentos de actina. ZO-2 se puede asociar a ZO-1 por medio de una interacción PDZ1/PDZ2. ZO-3 también puede asociarse a ZO-1 pero no a ZO-2. Finalmente el dominio PDZ1 de las tres ZOs se une a la secuencia YV presente en el carboxilo terminal de las claudinas [19, 21].

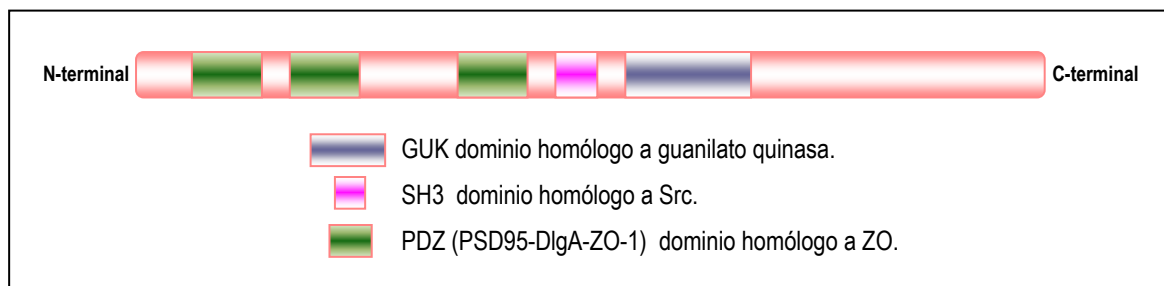


Figura 7. Estructura de las ZO. Las ZO-1, ZO-2 y ZO-3 son miembros de las MAGUKs y se reconocen ya que varían en su masa molecular, ZO-1 de 220 kDa, ZO-2 de 160 kDa y ZO-3 de 130 kDa. Su estructura se caracteriza por tener una distribución de los distintos dominios como se observa en el esquema. Cerca del N-terminal se ubican tres dominios PDZ, por medio de los cuales interaccionan las cldn y ocln, contiguo a estos dominios se disponen el dominio SH3 y el dominio GUK. La interacción con los filamentos de actina se produce por la región C-terminal. Adaptado de Balda y cols [50].

Un hecho interesante es que a pesar que las proteínas ZO-1 se han asociado específicamente con las UE en tejido epitelial, recientemente se han observado en el núcleo de células en proliferación [51], sugiriendo que la expresión de ZO-1 podría estar relacionada a estados de proliferación en células epiteliales [52]. Estudios en células MDCK confirman su participación en proliferación celular, donde el dominio SH3 de ZO-1 interacciona con el factor transcripcional ZONAB (factor transcripcional homólogo a proteínas Y-box y de localización nuclear), el cual es necesario para la activación de genes que participan en proliferación. En células en reposo proliferativo ZO-1 inhibe la transición de la fase G1/S por el secuestro citoplasmático del complejo CDK4-ZONAB. Así, la sobre expresión o disminución de ZO-1 y ZONAB también afectarían la densidad celular en cultivos celulares [50]. El homólogo humano de ZONAB (perro) es DbpA, que es un gen blanco del factor de transcripción E2F1 [53]. ZO-2 también se ha observado en el núcleo de células en proliferación, se une a hnRNP (ribonucleoproteínas inmaduras) SAF-B, y esta unión inhibe al factor de transcripción AP-1 y C/EBP [54, 55].

4. Regulación de la organización de la Unión Estrecha en la mantención de la polaridad celular

Como se mencionó la polaridad y arquitectura del polo secretor de las células acinares es dependiente de la organización de las UE. Esta organización es modulada por proteínas de señalización tales como: el complejo **aPKC/PAR3/PAR6, PKA y Rho GTPasas** [56, 57].

Diferentes vías de señalización y proteínas están implicadas en el ensamblaje de las UE: proteína quinasa A (PKA), proteína G mono y heterotrimérica, y varias isoformas de proteína quinasa C (PKC). Los efectos de PKA sobre el ensamblaje y desensamblaje de las UE son controversiales, como lo muestran algunos de los siguientes estudios. En cultivo de células tiroideas, privadas de calcio extracelular, TSH eleva los niveles de cAMP y en esas condiciones se inhibe la disociación de las UE. Postulándose que PKA tiene la capacidad de prevenir el desensamblaje de las UE [58]. Sin embargo, cuando células MDCK se incubaron con inhibidores de PKA también se inhibió la disociación de las UE [59]. Varias isoformas de PKC [60, 61], están localizadas en las UE. Sin embargo, el mecanismo molecular que mejor se conoce en la participación de ellas en el ensamblaje de las UE es el de **aPKC**. Esta enzima forma un complejo con **PAR3** (PAR3=**ASIP** en mamíferos) y **PAR6**, ambas proteínas poseen dominios PDZ y se cree que el reclutamiento de las proteínas de las UE estaría mediado por la unión de PAR3 a la proteína JAM [62]. PAR6 se une a Cdc42, una proteína Rho GTPasa que es esencial para la polaridad celular [63], y se piensa que participaría en la activación de aPKC [40, 63]. La actividad de aPKC es regulada negativamente por PP2A (*protein phosphatase 2A*), que interacciona directamente con aPKC desfosforilándola. La sobreexpresión de la subunidad catalítica de aPKC en células MDCK se correlaciona con la desfosforilación de las proteínas de UE y con un aumento en la permeabilidad paracelular. Ambos hechos

estarían indicando que PP2A es un regulador negativo de las UE [64]. Estos datos indican que tanto el complejo aPKC-PAR3-PAR6 y PP2A presentan vías de señalización opuestas que estarían regulando el ensamblaje y desensamblaje de las UE [56].

Las **Rho GTPasas** participan tanto en la regulación del ensamblaje como en la permeabilidad paracelular. El papel de las GTPasas en el ensamblaje fue inferido a partir de experimentos donde se observó que GTP γ inhibe el ensamblaje de UE [65]. La microinyección de la transferasa C3 (toxina que inactiva Rho) en células MDCK mostró una inhibición del ensamblaje de las UE [66]. Se ha sugerido que Rho-GTPasa estimula la fosforilación del dominio carboxilo terminal de ocln y favorece la distribución citoplasmática de esta proteína. La ocln fosforilada impide su interacción con microfilamentos de actina adyacentes a la membrana plasmática apical. Los autores asignan a Rho-GTPasa un papel regulador de la permeabilidad paracelular selectiva [67].

5. Regulación de la estructura y función de las Uniones Estrechas por citoquinas

Las células epiteliales de glándulas salivales humanas normales sintetizan citoquinas (IL-2, 4, 6, 10, TNF- α , TGF- β). Al comparar los niveles de expresión de estas citoquinas entre individuos controles y pacientes con SS, se encontró un desbalance en la expresión de sus mRNA [6, 68]. Los estudios en células HT-29/B6 (línea celular derivada de un cáncer de colon) han servido como modelo para analizar el efecto de la barrera paracelular. Se caracterizan por ser células epiteliales altamente polarizadas y exhiben TER comparable a la de células normales presentes en el colon. Cuando estas células son incubadas con TNF- α , se detecta una disminución en el número de filamentos que organizan UE [69]. Si estas células son incubadas en presencia de TNF- α e INF- γ , se altera la formación de los filamentos que organizan las UE de una manera dosis dependiente, y hay una disminución en la TER. Además, se encontró que estas citoquinas proinflamatorias ejercen una regulación hacia abajo sobre el promotor de ocln, disminuyendo los niveles de mRNA [70]. Células T84 (línea celular derivada de células epiteliales intestinales humana) tratadas sólo con INF- γ mostraron una disminución de TER y de los niveles de proteína de ZO-1. Esto último como consecuencia de un descenso en la síntesis y en la estabilidad de ZO-1. Como ZO-1 es la proteína que se relaciona con los microfilamentos de actina, podríamos postular que la pérdida de organización del citoesqueleto de actina incidiría en la organización del polo apical de la célula [71].

En esta memoria, se desea responder si la desorganización y la pérdida de polaridad de las células acinares, provenientes de glándulas salivales labiales de pacientes con síndrome de Sjögren, se

acompañan de cambios en la expresión génica, de proteína y en su distribución subcelular de proteínas constituyentes de las uniones estrechas. Se espera que este estudio suministre evidencias sobre la organización de las UE en los pacientes con síndrome de Sjögren.

HIPÓTESIS:

La pérdida de polaridad de células acinares de glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjögren, y la desorganización de su polo apical, están asociadas a los cambios en expresión génica y de proteínas de las Uniones Estrechas. Estos cambios se acompañan de una localización alterada de estas proteínas.

Corolario:

Si consideramos los resultados de otros investigadores podríamos pensar que los altos niveles de citoquinas presentes en las glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjögren, podrían ser responsables de los cambios propuestos en la hipótesis.

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar los cambios en la expresión de mRNA y de proteínas de las Uniones Estrechas de las células acinares de glándulas salivales labiales de pacientes con síndrome de Sjögren. Estos cambios en conjunto con la evaluación de la localización subcelular de estas proteínas darán información de la organización de las Uniones Estrechas de las células acinares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar los niveles de mRNA de los genes de claudina-1, -3, -4, ocludina y ZO-1 presentes en glándulas salivales labiales de pacientes con síndrome Sjögren primario y compararlos con los datos obtenidos de individuos controles.
2. Determinar los niveles de proteína de claudina-1, -3, -4, ocludina y ZO-1 en glándulas salivales labiales de pacientes con SS y compararlos con los datos obtenidos de con individuos controles.
3. Analizar la localización de claudina-3, -4, ocludina y ZO-1 en acinos de glándulas salivales labiales de pacientes con SS y comparar con individuos controles.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales y sus procedencias

Columnas de silica-gel RNeasy (Qiagen), QIAshredder (Qiagen), tampón de lisis RLT (Qiagen), tampón RW1 (Qiagen), Set RNase-free DNase (Qiagen), tampón RW1 (Qiagen), tampón RPE (Qiagen), oligo(dT) (Promega), dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Promega), Super script II (Invitrogen), DNA polimerasa Taq (Invitrogen), tampón de reacción de transcripción reversa (Invitrogen), agarosa (Biotools), Tween-20 (Winkler), EDTA (Winkler), NaCl (Winkler), formaldehído (Merck), ácido acético (Merck), metanol (Merck), MOPS (Merck), azul de bromofenol (Sigma), xileno cianol (Sigma), glicerol (Sigma), bromuro de etidio (Sigma), dietil-pirocarbonato(Sigma), Trisma Base (Sigma), Tritón X-100 (Sigma), β -mercaptoetanol (BioRad). Glicina (Sigma), reactivo de Bradford (BioRad).

2. Pacientes

Se seleccionaron 22 pacientes (P) con síndrome de Sjögren (SS) primario diagnosticados de acuerdo al criterio de consenso Americano/Europeo 2002 [71]. Este criterio considera seis categorías:

- I. Síntomas oculares, que es la manifestación subjetiva de la sequedad ocular.
- II. Síntomas orales, que corresponden a la sensación de sequedad bucal.
- III. Signos oculares, que es la evidencia objetiva de compromiso ocular.
- IV. Compromiso de glándulas salivales, que es la evidencia objetiva de compromiso salival.
- V. Características histopatológicas, que determina el número de focos de infiltrado linfocitario en glándulas salivales menores ($\geq 1/4\text{mm}^2$ de tejido glandular).
- VI. Detección de autoanticuerpos, que determina la presencia de anticuerpos anti Ro/SSA y/o anti La/SSB.

El diagnóstico definitivo de SS se establece cuando hay hallazgo positivo de 4 de los 6 parámetros anteriores, siempre y cuando la biopsia (V) o la serología (VI) sean positivas. También puede establecerse el diagnóstico cuando existen 3 de 4 de los parámetros objetivos de compromiso glandular (III, IV, V, y VI).

El grupo control estuvo formado por 15 individuos, cuyas biopsias estaban dentro de límites histológicos normales, infiltrado linfocitario ausente o leve y con parénquima glandular bien conservado y

sin signos clínicos de SS. Los datos demográficos de pacientes y de individuos controles están incluidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos demográficos de los grupos		
Grupos	N (Género)	Edad promedio \pm DS (Rango) en años
Controles	15 (14M, 1H)	48,8 \pm 13,5 (28 – 72)
Pacientes	22 (21M, 1H)	48,3 \pm 11,6 (33 – 68)

M = mujeres, H = hombres, N=número de individuos.

Las biopsias se obtuvieron luego del consentimiento informado de los pacientes, y la metodología empleada en este trabajo está aprobada por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

3. Obtención de glándulas salivales labiales (GSL)

Las GSL se obtuvieron bajo el efecto de anestesia local infiltrativa, realizando una incisión de 1,5 a 2 cm de longitud en la cara interna del labio inferior, paralela al borde bermellón y lateral a la línea media. Después, se llevó a cabo la disección roma de los márgenes de la incisión y a continuación se removieron algunas GSLs. Los bordes de la incisión se suturaron con seda 3-0, que fue retirada al cabo de 7-10 días. Las glándulas se congelaron inmediatamente en N₂ líquido para extraer RNA total o proteínas.

4. Determinación de la expresión génica por RT-PCR semicuantitativo

Para determinar y comparar los niveles de expresión de los genes en estudio, se empleó la técnica de RT-PCR semicuantitativo. El cDNA se obtuvo por transcripción reversa de una muestra de RNA total y luego se amplificó por PCR.

4.1 Extracción de RNA total

La extracción de RNA total se realizó empleando el método de extracción por afinidad en columnas de silica-gel RNeasy (Qiagen, Stanford, EEUU), de acuerdo a las instrucciones recomendadas por el

fabricante.

La concentración y pureza del RNA se estableció determinando las absorbancias a 260 y 280 nm, utilizando una dilución 1:200, en un espectrofotómetro de doble haz (Shimadzu UV-160A) y calculando la relación 260/280. Sólo se emplearon muestras de RNA total que presentaron una relación de absorbancia 260/280 de 1,8 a 2,0. La concentración del RNA se determinó usando la absorbancia a 260nm aplicando la regla de conversión convencional, donde $[RNA] = 200 \times (\text{Absorbancia } .260 \text{ nm}) \times 40 \mu\text{g/mL}$ [72].

4.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa-formaldehído

Esta técnica se realizó con el propósito de verificar la calidad del RNA extraído y descartar aquellas preparaciones que presentaran degradación y contaminación con DNA genómico.

El gel se preparó a partir de una solución que contenía 1% (p/v) agarosa y 8% (v/v) formaldehído en tampón MOPS (MOPS 0,2 M, acetato de sodio 0,05 M, EDTA 1 mM, pH 8,0). Las muestras se prepararon con 1 μg de RNA total en 3,5 μL de tampón de carga para RNA 6X (azul de bromofenol 0,04% p/v, xileno cyanol 0,04% p/v, formaldehído 6% v/v, formamida 40% v/v, glicerol 3% v/v, bromuro de etidio 0,1%, en tampón MOPS pH 8,0). Se denaturaron durante 10 min a 65°C en baño María y se enfriaron rápidamente introduciéndolas en hielo. Las muestras fueron depositadas sobre bolsillos del gel que contenían tampón de corrida (tampón MOPS 1X). La separación electroforética se realizó con la aplicación de 75 mA de corriente continua durante 45 min, hasta que el frente de corrida de azul de bromofenol alcanzó 2/3 del gel.

Todas las soluciones y materiales utilizados fueron tratados con dietil-pirocarbonato (DEPC) para inactivar las ribonucleasas. Los geles fueron fotografiados sobre un transiluminador UV-B.

4.3 Síntesis de cDNA

El cDNA se sintetizó a partir de los mRNA presentes en la muestra de RNA total, utilizando la enzima transcriptasa reversa. Se transcribieron 1 μg de RNA total utilizando partidores oligo(dT), random primers y el sistema comercial de transcripción reversa Super script II (Invitrogen, Brasil) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La reacción de transcripción reversa contiene 1,25 mM de cada desoxiribonucleótido dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Promega, Madison, EEUU), 3 mM de MgCl_2 , 1 mM de partidores oligo (dT), 2 U/mL RNasa out (Invitrogen, Brasil) y 10 U/mL de transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen, Brasil) en tampón de reacción (Tris-HCl 50 mM, KCl 75 mM, MgCl_2 3 mM, pH 8,0) en un volumen final de reacción de 20 μL . De esta reacción de transcripción, se utilizó 1 μL para estandarizar las condiciones de los PCR.

4.4 Diseños de partidores específicos

Para las reacciones de PCR se diseñaron partidores para cada gen en estudio, considerando que fueran específicos, no formaran estructuras secundarias y no dimerizaran. Se usaron las secuencias de los genes disponibles en el banco de genes (GenBank, NCBI, NIH) y se diseñaron los partidores utilizando el software Gene Runner Versión 3.00 (Hasting Software Inc., NY, EEUU). Las características de cada uno de los pares de partidores empleados en este estudio se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Características de los partidores		
Gen en estudio	Orientación	Secuencia
Claudina 4	Sentido	5'- ATT GTC ACC TCG CAG ACC ATC -3'
	Antisentido	5'- CTA TTG TAT TCA TCA GCA G -3'
Ocludina	Sentido	5'- TTT GTA TCA CTA CTG TGT TG -3'
	Antisentido	5'- CTA TTG TAT TCA TCA GCA G -3'
ZO-1	Sentido	5'- TAC AGT GAC GCT TCA CAG -3'
	Antisentido	5'- CTA CTT GCA CTT CTA TCC C -3'
GAPDH	Sentido	5'- ACT ACA CGA ACA ACA GCC - 3'
	Antisentido	5'- TCT TGT TGT CTC CTC GTC - 3'

4.5 PCR

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μ L conteniendo 0,05 U/mL de DNA polimerasa Taq (Invitrogen, Brasil), 0,2 mM de cada desoxinucleótido, $MgCl_2$ 1,5 mM, 1 μ L de templado, en 2,5 μ L de tampón de reacción (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, pH 8,3). Se emplearon ciclos de 30 seg de desnaturación a 94 °C, 30 segundos de apareamiento a la temperatura óptima de los partidores, un minuto a 72°C para la reacción de polimerización y para la extensión final 5 minutos a 72°C. Se optimizaron la temperatura de apareamiento, la concentración de los partidores y el número de ciclos para cada par de partidores a utilizar (ver Tabla 3). Se realizaron controles negativos para verificar probable contaminación de los reactivos, donde se incubaron todos los componentes excepto el cDNA, que fue reemplazado por 1 μ L de agua libre de ribonucleasa. También se controló la contaminación con DNA genómico realizando una PCR del RNA total.

4.5.1 Optimización de la PCR

Se estandarizaron las condiciones de reacción para que la amplificación fuera proporcional a la cantidad de mRNA específico presente en cada muestra. Para lograr este propósito, primero se determinó el punto de inflexión en la curva de amplificación (número de ciclos v/s cantidad de productos formados). Considerando este número de ciclos, se realizó una curva de saturación por sustrato con distintas diluciones de cDNA, y en ella se eligieron tres diluciones que estuvieran dentro del rango lineal de esta curva.

El cDNA se preparó a partir de 1 µg de RNA total y se diluyó desde 1:1 hasta 1:5000. Así una dilución 1:10 cDNA corresponde a la cantidad cDNA que se obtiene de 100 ng de RNA total.

Los resultados de la determinación de las condiciones para las reacciones de PCR para los distintos genes se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de PCR				
Gen	Temperatura de apareamiento (°C)	Concentración del partidor (pmol/µL)	Nº. Ciclos	RNA (ng)
Cla-4	62	10	36	200, 100 y 20
Ocln-1	46	10	35	200, 100 y 20
ZO-1	50	10	33	200, 100 y 20
GAPDH	50	10	25	200, 100 y 20

4.5.2 Detección y análisis de los productos de amplificación

Se prepararon geles de agarosa al 1% en presencia 0,1 µg/µL de bromuro de etidio en tampón TAE (Tris-HCl 0,04 M; ácido acético 0,04 M; EDTA 2 mM; pH 8,0). Se cargaron alícuotas de 5 µL de cada una de las reacciones de PCR preparadas con las diluciones determinadas a partir de la curva de saturación por sustrato. Además en el mismo gel se cargó el amplificado del gen de GAPDH como control. Todos los geles se hicieron en duplicados y fueron fotografiados sobre un transiluminador UV-B, y la cantidad de producto formado se midió por intensidad de fluorescencia emitida, que fue determinada densitométricamente utilizando el programa UN-SCAN-IT Gel para Windows, v4.1 (Silk Scientific Corporation, Utah, EEUU). Para cada gen en estudio, los valores de intensidad de fluorescencia se normalizaron respecto a la intensidad de fluorescencia emitida por GAPDH.

5. Extracción de proteínas

Las GSL se homogeneizaron en tampón de extracción RIPA (Tris-HCl 50 mM, Tritón X-100 1%, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, EDTA 5 mM, pH 7,4), en una relación 1:5 (p/v) a 4°C, en un mortero con N₂ líquido. Luego los homogeneizados se pasaron 5 veces a través de una jeringa de tuberculina y fueron sometidos a 3 ciclos de congelamiento/descongelamiento. Todo el procedimiento se realizó en presencia continua de un cóctel de inhibidores de proteasas, (PMSF 4 mM, benzamidina 61,8 μM, leupeptina 10 μM, aprotinina 2,82 μM). Las muestras fueron alicuotadas y guardadas a -20°C.

6. Cuantificación de proteínas

Se empleó el método descrito por Bradford [73], que consiste en la incubación de 50 μL del extracto con 200 μL de reactivo de Bradford (azul de Coomassie G-250) y 750 μL de solución de dilución (0,15 M NaCl), durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de doble haz (Shimadzu UV-160A). Para la curva de calibración se usó albúmina de suero bovino. Cada muestra se midió por triplicado.

7. Análisis de las proteínas por inmunquímica

Para resolver las proteínas de las muestras se usó electroforesis PAGE-SDS 6%, 8% y 13% en condiciones reductoras, según el método descrito por Laemmli [74]. Las proteínas en estudio fueron identificadas por inmunquímica (Western blot), empleando el método descrito por Towbin [75].

7.1 Preparación de la muestra

Las muestras a separar fueron diluidas en relación 1: 1 con tampón de muestra 2X (Tris-HCl 0,06 M, SDS 2% (p/v), glicerol 14% (v/v), azul de bromofenol 0,02%, β-mercaptoetanol 5%, pH 6,8). Posteriormente, las muestras fueron calentadas a 100°C por 3 minutos.

7.2 Separación electroforética de proteínas

Alicuotas de 15 μg o 50 μg de proteínas fueron depositadas dentro de los bolsillos del gel de concentración y cubiertas con tampón de corrida (Tris 0,025 M, Glicina 1,44% (p/v), SDS 0,1% (p/v), pH 8,3). La separación electroforética se inició con la aplicación de 10 mA de corriente continua hasta que el azul de bromofenol alcanzó el gel de separación. La separación de las proteínas se realizó aplicando 15 mA durante 3 horas.

7.3 Western blot

Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (MPS membrane filters cellulose nitrate, Japón, tamaño de poro 0,45 μm), empleando tampón de transferencia (Tris-HCl 20 mM, glicina 154 mM, metanol 20%, SDS 0,05%) aplicando corriente continua de 60 mA, durante 15 horas a 4°C. Después de la transferencia, las membranas de nitrocelulosa fueron lavadas en agua y teñidas con solución de Rojo Ponceau al 5% para controlar la eficiencia de la transferencia. Luego las membranas se lavaron en tampón de TBS-T (Tris-HCl 10 mM; NaCl 150 mM; Tween-20 0,05%; pH 7,4) hasta retirar completamente la tinción y se bloquearon durante 1 hora con leche libre de grasas y de proteasas, disueltas en el mismo tampón a temperatura ambiente. Las incubaciones con los anticuerpos primarios y secundarios fueron realizadas durante una hora a temperatura ambiente. En la Tabla 4 se muestran las condiciones experimentales utilizadas para cada proteína. Después de la incubación con cada anticuerpo se realizaron 5 lavados con el mismo tampón de dilución. El revelado se hizo por quimioluminiscencia (Supersignal West pico chemiluminescent substrat, Pierce N° 34080), tanto para las proteínas en estudio, como para la proteína de carga (β -actina). Se midió la densitometría de las bandas (UNI-SCAN-IT gel version para Windows 4.1, Silk Scientific Corporation, Utah, EEUU) y los niveles proteicos de cada proteína fueron normalizados en relación con los niveles de β -actina.

Tabla 4. Condiciones de Western-blot

Proteína detectada	Solución de bloqueo	Dilución del primer anticuerpo	Tampón de dilución del primer anticuerpo	Tiempo de incubación	Dilución de segundo anticuerpo	Tampón de dilución del segundo anticuerpo	Tiempo de incubación
cldn-4	5%	1:750	TD	1h	1:5000	SB 5%	1h
cldn-3	5%	1:700	TD	1h	1:10000	SB 5%	1h
cldn-1	5%	1:500	TD	1h	1:10000	SB 5%	1h
ocln	5%	1:500	TD	1h	1:10000	SB 5%	1h
ZO-1	8%	1:100	SB 5%	1h	1:20000	SB 8%	1h
β -actina	5%	1:20000	SB 5%	1h	1:10000	SB 5%	1h

TD: Tampón de dilución (sin bloqueo), SB: Solución de bloqueo, R: reducida, NR: no reducida

8. Análisis estadísticos

Para determinar si existían diferencias significativas entre los promedios de las mediciones entre el grupo control y los pacientes se utilizó el test de Mann-Whitney, que se emplea cuando las muestras no tienen distribuciones normales. Valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos [76, 77]. Los resultados se expresaron como el promedio \pm DS.

9. Inmunohistoquímica

Inmediatamente después de la biopsia, las GSL se fijaron en 1% paraformaldehído por 6 horas a temperatura ambiente, y luego se incluyeron en parafina en una estufa al vacío. Cortes de 4 μm se obtuvieron utilizando un micrótopo rotatorio Leitz Westlar, luego fueron adheridos sobre portaobjetos previamente tratados con silane al 2% (3-(Trimethoxisilyl) propyl methacrylate, Sigma). Posteriormente, fueron desparafinadas en xilol y rehidratadas en alcoholes decrecientes en concentración, hasta llegar a agua destilada. Luego se lavó en PBS por 5 minutos.

9.1 Detección por inmunohistoquímica de ZO-1 y claudina-4

Para la recuperación antigénica, se digirieron los cortes en pepsina al 0,35 y 0,4% en HCl 0,01N durante 15 minutos a 37°C, para ZO-1 y cln-4, respectivamente. Con el fin de evitar uniones inespecíficas del anticuerpo se bloqueó con caseína al 0,25% en PBS, durante 1 hora. Los cortes fueron incubados con anticuerpo primario anti-ZO-1 y anti- cln-4, diluido en BSA al 1% ,1:300 y 1:50 respectivamente, a 4°C durante 20 horas. Luego se lavaron con PBS 3 veces por 5 minutos, posteriormente fueron incubados con el anticuerpo secundario biotinilado, anti-inmunoglobulina de ratón o conejo según corresponda (Histotain® - Plus Kit, San Francisco, CA, EEUU), a temperatura ambiente, por 10 minutos. Posteriormente, fueron lavados en PBS e incubados en una solución de estreptavidina peroxidasa, a temperatura ambiente por 10 minutos, nuevamente se lavó con PBS. La reacción fue revelada con 3,3-diaminobencidina 0,05% (DAB), diluida en tampón Tris-HCl 0,05M, pH 7,6 en presencia de peróxido de hidrógeno 0,06%, durante 7 minutos a temperatura ambiente. La solución de DAB se preparó inmediatamente antes de usar y se mantuvo en hielo. Luego del revelado las muestras se lavaron en agua destilada a temperatura ambiente por 5 minutos. El contraste nuclear se realizó con hematoxilina de Mayer durante 90 segundos. Finalmente, las muestras fueron deshidratadas en etanol, aclaradas en xilol, y montadas con Entellan para luego ser observadas en un microscopio de luz. El control negativo de la reacción inmunohistoquímica fue procesado simultáneamente en el mismo portaobjetos, en lugar de los anticuerpos primarios anti-ZO-1 y cln-4 se agregó IgG de ratón o conejo (Control negativo DAK-GO1, isotipo IgG₁ de DAKO).

Los mismos anticuerpos primarios fueron utilizados para la detección inmunohistoquímica y para Western blot, se explicitan en la Tabla 5.

Tabla 5. Detalle de anticuerpos primarios y secundarios	
Anticuerpos Primarios	
Anti-claudina 4	anticuerpo monoclonal preparado en ratón (3E2C1), Zymed 32-9400
Anti-claudina 3	anticuerpo policlonal preparado en ratón (Z23.JM), Zymed 34-1700
Anti-claudina 1	anticuerpo policlonal preparado en conejo (JAY.8), Zymed 18-7362
Anti-occludina	anticuerpo policlonal preparado en conejo (Z-T22), Zymed 71-1500
Anti-ZO-1	anticuerpo policlonal preparado en conejo (Z-R1), Zymed 61-7300
Anti-β-actina.	anticuerpo policlonal preparado en ratón, ICN 691002
Anticuerpos Secundarios	
Anti-conejo	preparado en cabra IgG (H+L), Jackson 111-035-003
Anti-ratón	preparado en cabra IgG (H+L), Jackson 115-035-003

9.2 Detección por inmunofluorescencia de occludina y claudina-3

Para la recuperación antigénica, se digirió con pepsina 0,4% en HCl 0,01 N durante 15 minutos a 37°C para cldn-3 y para ocln se utilizó la proteasa tipo XIV (P-5147, Sigma) 1,2 mg/mL en tampón Tris 0.01 M pH 7,7 durante 3 minutos a 37°C, y luego se lavó 3 veces en PBS por 5 minutos cada vez. El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó con caseína 0,25% durante 1 hora. Para la detección de cldn-3 y ocln, se incubó con anticuerpo primario 1:70 y 1:250, respectivamente, en PBS a 4°C durante 20 horas, y luego se lavó 3 veces en PBS por 5 minutos cada vez. Se continuó con la incubación del anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 488 1:200 en PBS durante 45 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se realizaron 5 lavados en PBS por 5 minutos cada uno, y luego 2 lavados en agua destilada. El montaje se realizó en DABCO (1,4 diazobenceno [2,2,2] octano) y Mowiol. Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio 1:3000 por 5 minutos.

10. Captura de la imagen digital

Las muestras para ZO-1 y cldn-4, fueron evaluadas usando un microscopio fotométrico con objetivos planos, marca Zeiss, modelo MPM400. Las imágenes digitales de los acinos y ductos

provenientes de GSL por cada individuo del estudio fueron obtenidas usando un aumento de 40X y 100X. Se empleó una cámara Nikon 5400 con lente reductor de campo, modo manual, ISO 400, realizando para cada imagen un ajuste de blancos en alguna zona sin tejido. Para enfocar todo el campo se usó un zoom digital de 4,6X. Las imágenes de 1600 x 1200 píxeles (resolución fina) fueron almacenadas en formato jpg.

Para la detección de imágenes de las muestras de ocln y cldn-3, se usó un microscopio confocal, marca Zeiss, modelo LSM-410 Axiovert-100, realizando para cada muestra un ajuste del brillo y contraste. Las imágenes fueron almacenadas en formato tiff.

RESULTADOS

1. Eficiencia en la extracción y calidad del RNA de glándulas salivales labiales

En la extracción de RNA se utilizó un sistema de alta eficiencia, RNeasy de Qiagen (sistema comercial), en consideración al pequeño tamaño de las glándulas que se obtienen de cada paciente. Esta metodología de extracción asegura un alto rendimiento en la obtención de RNA total, en promedio 20 µg de RNA total a partir de 10 mg en peso húmedo por glándula. Además, esta técnica permite extraer RNA en forma rápida y libre de cualquier contaminación, tales como DNA genómico, proteínas y contaminantes químicos. Los valores de la razón de absorbancia 260/280 fueron iguales o mayores a 1,8. La Figura 8 corresponde a un gel denaturante de agarosa-formaldehído con muestras de RNA total representativas de GSL de individuos controles (C₁, C₂) y de pacientes (P₁, P₂). Se destacan dos bandas correspondientes a los rRNA de 28S y 18S, característicos por su abundancia en una fracción de RNA total de células eucarióticas.

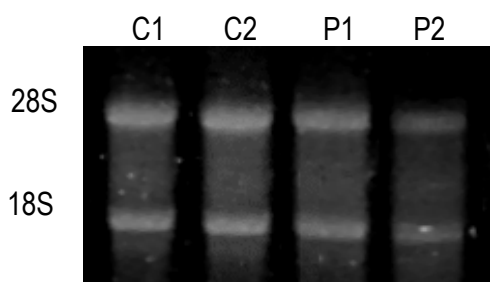


Figura 8. Detección electroforética de RNA de glándulas salivales labiales. El RNA total fue extraído en columnas de afinidad Qiagen como se especificó en Materiales y Métodos. Alícuotas de 1 µg de RNA total se sometieron a electroforesis en geles de agarosa en condiciones denaturantes. Los carriles contienen muestras representativas de RNA total de GSLs de sujetos controles (C₁, C₂) y de pacientes (P₁, P₂).

2. Validación de la RT-PCR semicuantitativa para el estudio de expresión de genes de UE en GSL humanas

Los niveles de expresión de un gen en particular, se determinaron mediante la RT-PCR semicuantitativa, empleando la relación entre la cantidad de mRNA problema y la cantidad de un mRNA codificado por un gen de expresión constitutiva. Sin embargo, la PCR no es cuantitativa ya que existen diversos factores que pueden modificar la cantidad de amplicón sintetizado. Por esta razón, para que los productos amplificados de la PCR fueran proporcionales a la cantidad de mRNA específico presente en la muestra, se ajustaron las condiciones de la PCR. Con este propósito, para cada gen en estudio se determinó el punto de inflexión de la curva de amplificación *versus* número de ciclos, y el rango lineal de la concentración de sustrato. A partir de este rango lineal, se eligieron tres diluciones de cDNA provenientes de GSL de cada individuo de la muestra para la realización de la PCR.

Para claudina-4 se observó un fragmento de 290 pb a partir de los 28 ciclos, Figura 9A. La curva de ciclos presentó una zona exponencial entre los 32 y 38 ciclos, el punto de inflexión de la curva se obtuvo a los 36 ciclos, Figura 9B. El producto de amplificación se detectó desde concentraciones de cDNA que corresponden a 60 ng de RNA total, Figura 9C. La curva densitométrica de sustrato mostró que los productos de amplificación fueron dependientes de la cantidad de sustrato hasta 3000 ng de RNA total, con un rango lineal entre 60 y 600 ng de RNA total, Figura 9D.

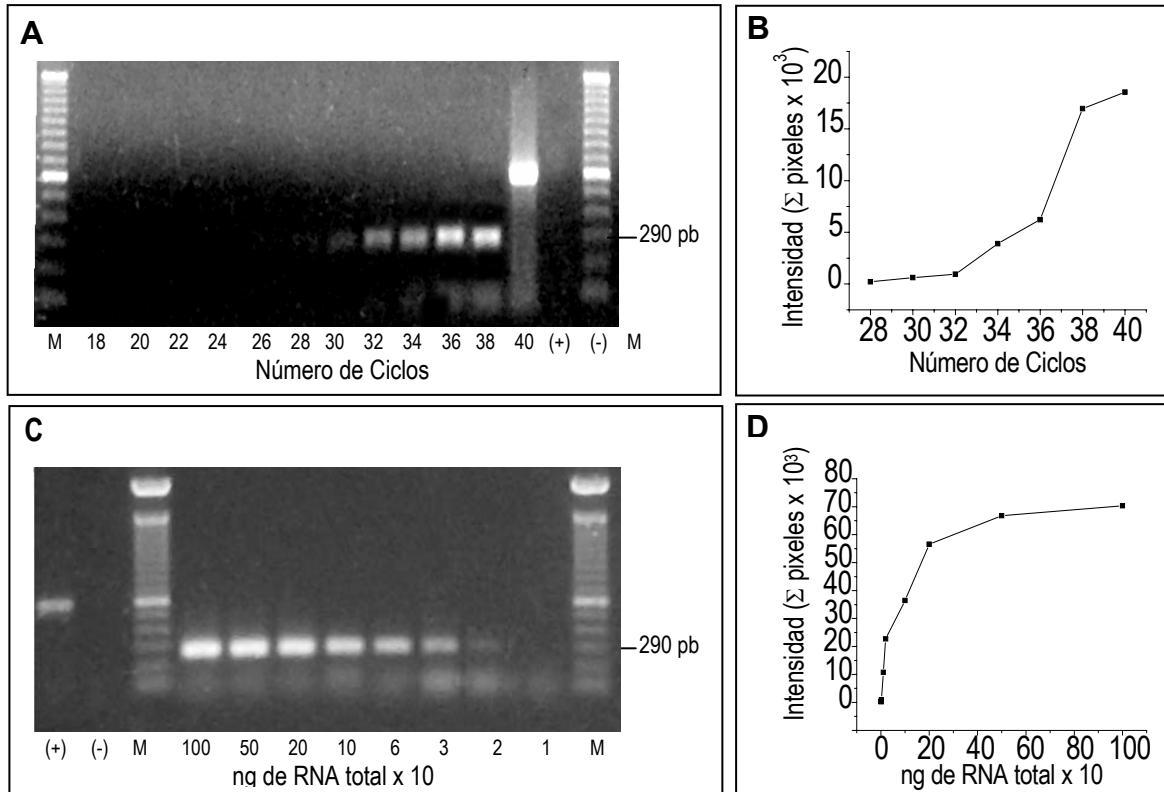


Figura 9. Determinación de las condiciones para la reacción de PCR para Claudina-4. A y C corresponden a geles de 1 % (p/v) de agarosa en presencia de bromuro de etidio. Cada carril fue cargado con una alícuota de 5 μ L de la PCR, desarrolladas con ciclos de 5 minutos a 94°C, 90 segundos a 60 °C y 90 segundos a 72°C. En A se muestra los productos de la PCR tomados a diferentes ciclos de amplificación. En C se muestra la cantidad de producto formado, a partir de distintas cantidades iniciales de sustrato. Estas PCR se prepararon con diluciones de cDNA correspondiente a la cantidad de RNA total inicial que se indica en las figuras 9C y 9D. Todas las reacciones se desarrollaron a 36 ciclos. En ambos geles se indica una banda de amplificación específica de 290 pb. B y D Densitometrías de los geles A y B, respectivamente. M: marcador de tamaño de fragmentos de DNA, donde la diferencia de tamaño entre cada banda corresponde a 100 pares de bases (pb). (+): control positivo de GADPH, 600 pb. (-): control negativo sin cDNA.

3. Niveles relativos de los mRNA de la Claudina-4 en GSL de individuos controles y de pacientes

La determinación de los niveles de cldn-4 se realizó para confirmar el aumento en mRNA observado en los microarreglos de cDNA, situación que no se observó para las otras claudinas. Los niveles de expresión de los genes de cldn-4 se expresaron como la cantidad de producto amplificado por PCR en relación a la cantidad de producto amplificado del gen de expresión constitutiva GADPH. Operacionalmente, los niveles relativos de mRNA se calcularon dividiendo la intensidad de la banda del gen problema por la intensidad de la banda del gen de GADPH. En consecuencia los niveles relativos de expresión corresponden a fracciones sin magnitud asociada.

Los niveles relativos de mRNA para cldn-4 se encontraron en el rango de 2,08 a 2,78 en el grupo control, con un promedio de $2,32 \pm 0,39$ y en un rango de 1,72 a 11,96 con un promedio de $7,09 \pm 3,28$ en el grupo de pacientes, Figura 10A y 10B. El análisis estadístico de los niveles de expresión observado en pacientes SS respecto a controles indicó que las diferencias no son significativas, $p=0,052$, Figura 10C.

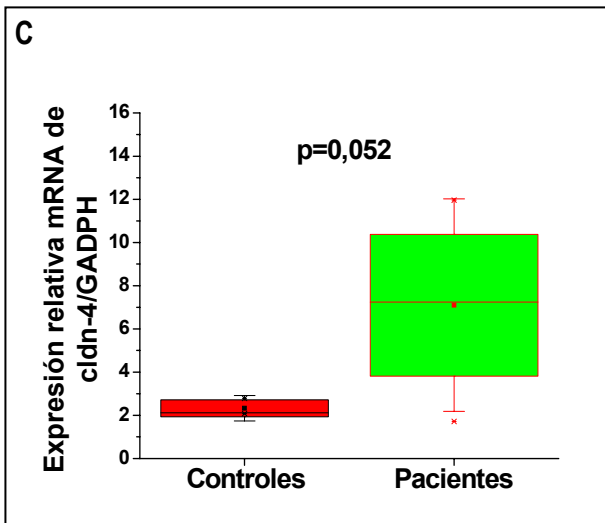
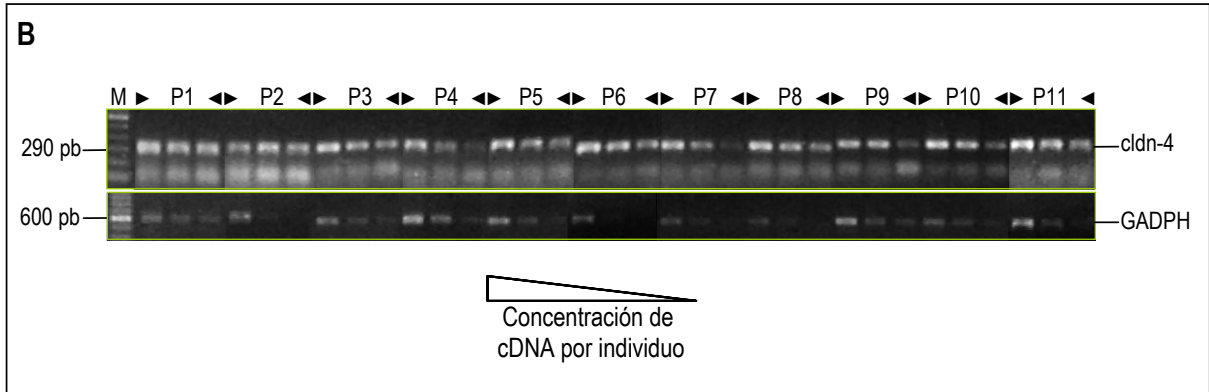
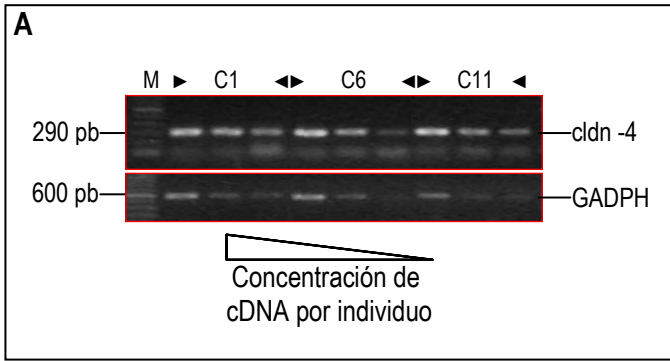


Figura 10. Niveles relativos de mRNA de Claudina 4 en GSL de individuos controles y pacientes. A y B muestran las reacciones de PCR realizadas con diluciones de cDNA correspondiente a 100, 20 y 10 ng de RNA total, (C=controles y P=pacientes SS). Las reacciones para cldn-4 se realizaron durante 36 ciclos de amplificación, con 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 62°C, y 60 segundos a 72°C. Para la GADPH se desarrollaron reacciones de 25 ciclos con 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50 °C y 1 min a 72°C. Los gels de agarosa se prepararon con dos corridas de bolsillos y se cargaron con alícuotas de 5 μ L de las reacciones de cldn-4 en la parte superior y de GADPH en la parte inferior del gel.

En C muestra el gráfico de los niveles de expresión relativa de cldn-4 de individuos controles y pacientes. Los resultados están expresados como la razón obtenida entre los productos de la reacción de PCR para cldn-4 *versus* los productos para GADPH. Las diferencias entre controles y pacientes no son significativas, según el test no paramétrico de Mann-Whitney ($p=0,052$).

4. Niveles relativos de proteínas de Claudina-4, Claudina-3, Claudina-1, Ocludina y ZO-1 en GSL de individuos controles y de pacientes

Para determinar la expresión proteica de las diferentes proteínas de UE en estudio, se realizó inmunodetección por *Western blot* a partir de extracto de proteínas de glándula completa. Los niveles de proteína se expresaron en magnitudes relativas, dividiendo los valores densitométricos de la señal

correspondiente a la proteína de UE por los de la proteína β -actina (~47 kDa), usada como control de carga.

4.1 Niveles relativos de proteínas de Claudina-4

La detección de cldn-4 se realizó bajo condiciones denaturantes y reductoras, en estas condiciones se detectó una única banda con un peso aparente de 22 kDa que corresponde al esperado para esta proteína, Figura 11A. Algunos pacientes mostraron una banda con una menor migración electroforética, en otros estudios se ha demostrado que esta banda corresponde a cldn-4 fosforilada.

Los niveles proteicos de cldn-4, en el grupo control, se encontraron dentro del rango de 0,01 a 0,34 con un promedio de $0,17 \pm 0,11$, mientras que en el grupo de pacientes SS, el rango fue de 0,01 a 1,18 con un promedio de $0,36 \pm 0,36$, Figura 11A. Al analizar los niveles de proteínas se encontraron diferencias significativas entre el grupo total de pacientes por sobre el grupo control ($p=0,04$), Figura 11B.

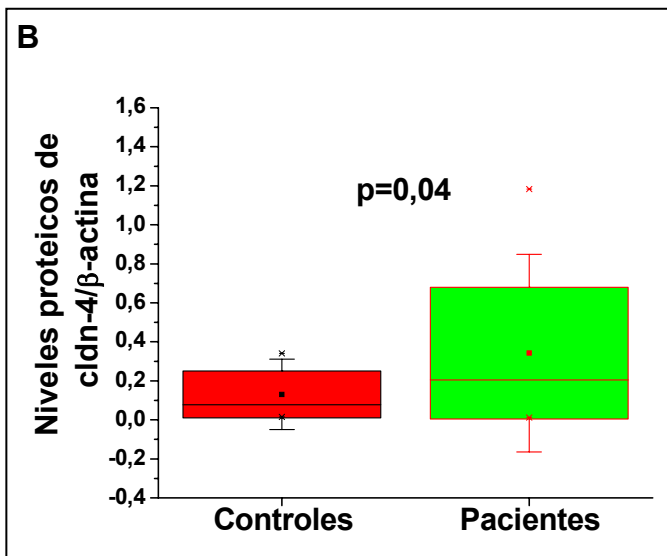
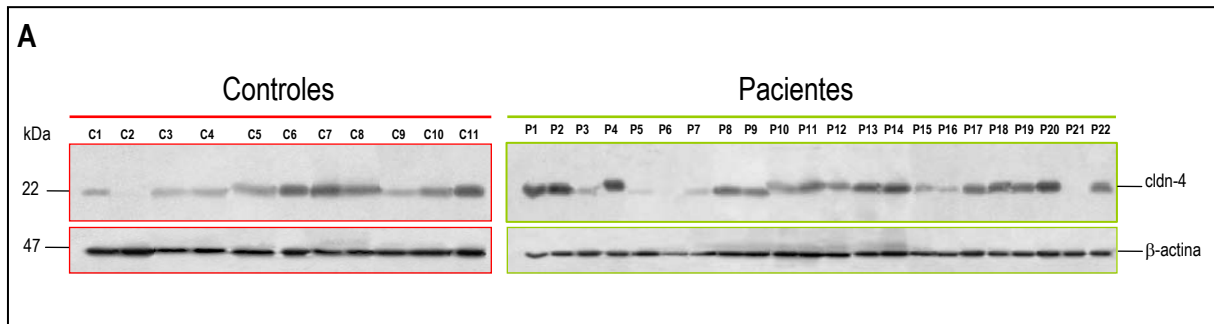


Figura 11. Detección y cuantificación proteica de Claudina-4. El análisis de proteínas mediante *Western blot* se realizó utilizando alícuotas de 15 μ g del extracto de proteína total de GSL. Previamente estas proteínas fueron resueltas en electroforesis en condiciones denaturantes y reductoras. Los carriles indicados con C corresponden a los individuos controles y con P a pacientes SS. Se indica la banda de 22 kDa correspondiente a la cldn-4, y con 47 kDa, la banda de β -actina, empleada como control de carga. B, Análisis densitométrico de la banda de cldn-4 normalizada contra β -actina. La evaluación estadística mostró diferencias significativas en los niveles relativos de la cldn-4, con una mayor expresión en el grupo de pacientes SS versus

el grupo control, según el test no paramétrico de Mann-Whitney ($p=0,04$).

4.2 Niveles relativos de proteínas de Claudina-3

De acuerdo a los estudios de microarreglos de cDNA, la expresión de mRNA de cldn-3 no mostró cambios significativos entre pacientes y controles. Con el propósito de validar estos resultados se analizó los niveles proteicos de cldn-3, mediante inmunodetección por *Western blot* a partir de extracto de proteínas totales de glándula completa. Los niveles de proteína se expresaron en magnitudes relativas, dividiendo los valores densitométricos de la señal de cldn-3 por los de la proteína β -actina (~47 kDa), usada como control de carga.

La detección de cldn-3 se realizó bajo condiciones denaturantes y reductoras, en estas condiciones se detectó una única banda con un peso aparente de 22 kDa que corresponde al esperado para esta proteína, Figura 12A.

Los niveles relativos de cldn-3, en el grupo control, se encontraron dentro del rango de 1,06 a 7,11 con un promedio de $2,31 \pm 1,76$, mientras que en el grupo de pacientes SS, el rango fue de 0,64 a 18,29 con un promedio de $6,11 \pm 5,18$. Al analizar los niveles relativos de proteínas, las diferencias no son significativas entre el grupo total de pacientes SS y el grupo control ($p=0,052$), Figura 12B.

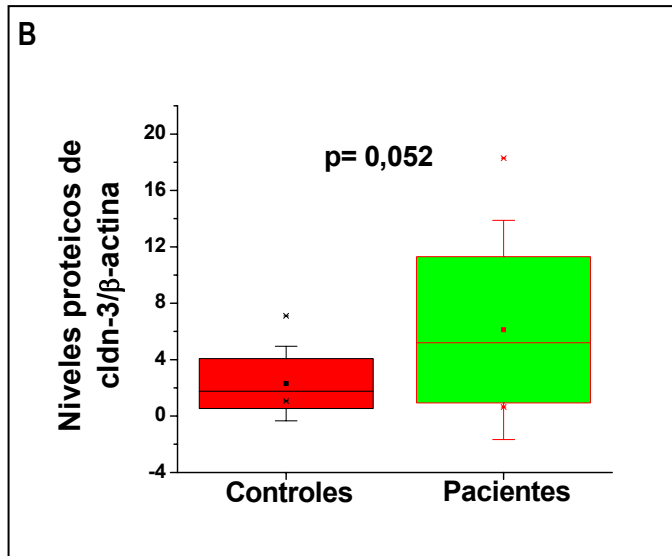
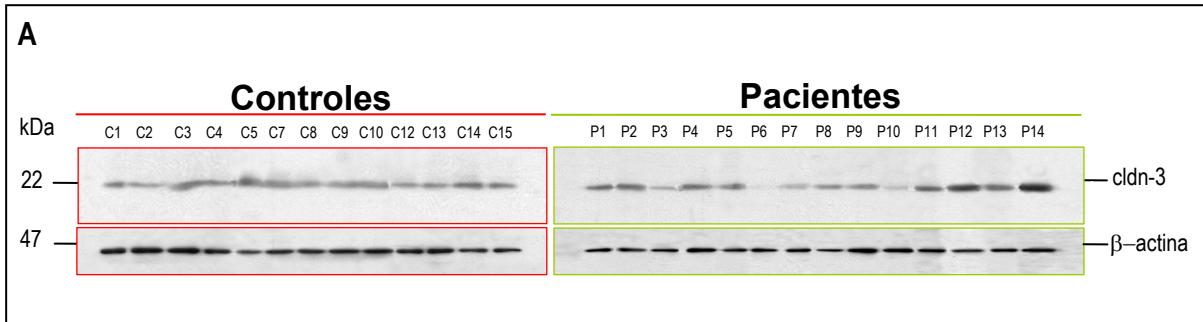


Figura 12. Detección y cuantificación proteica de Claudina-3. A, El análisis de proteínas mediante *Western blot* se realizó utilizando alícuotas de 15 μ g del extracto de proteína total de GSL. Previamente estas proteínas fueron resueltas en electroforesis en condiciones denaturantes y reductoras. Los carriles indicados con C corresponden a los individuos controles y con P a pacientes SS. Se indica la banda de 22 kDa correspondiente a la cldn-3, y con 47 kDa, la banda de β -actina, empleada como control de carga. B, Análisis densitométrico de la banda de cldn-3 normalizada contra β -actina. La evaluación estadística no mostró diferencias significativas en los niveles

relativos de cldn-3, según el test no paramétrico de Mann-Whitney ($p=0,052$).

4.3 Niveles relativos de proteínas de Claudina-1

El *Western blot* para cldn-1 se realizó bajo condiciones reductoras y denaturantes, se detectó una banda con masa molecular aparente de 22 kDa que corresponde a lo esperado para esta proteína, Figura 13A.

Se cuantificó la intensidad de la única banda de cldn-1 en relación con β -actina, y la cantidad relativa de cldn-1 en el grupo control, se encontró en el rango de 0,03 a 0,42 con un promedio de $0,20 \pm 0,16$, mientras que en el grupo de pacientes SS, el rango fue de 0,13 a 0,74 con un promedio de $0,42 \pm 0,17$. El análisis estadístico indicó que existe un aumento en la expresión proteica de cldn-1 en el grupo de pacientes SS en comparación al grupo control, siendo significativa esta diferencia, $p=0,023$, Figura 13B.

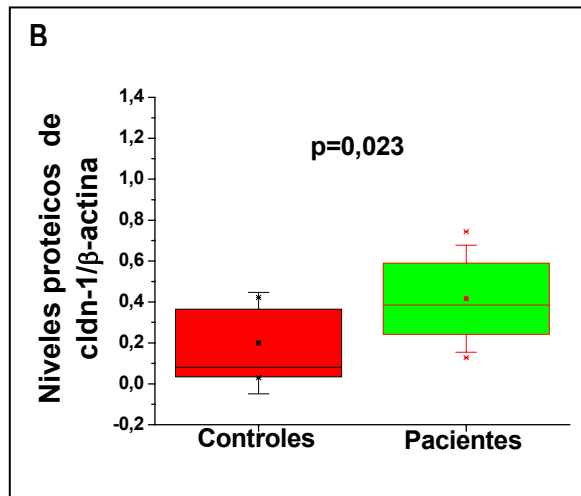
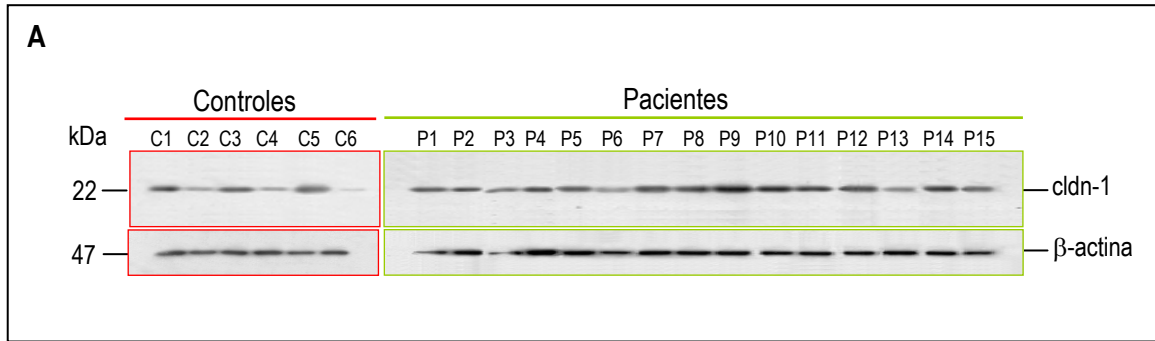
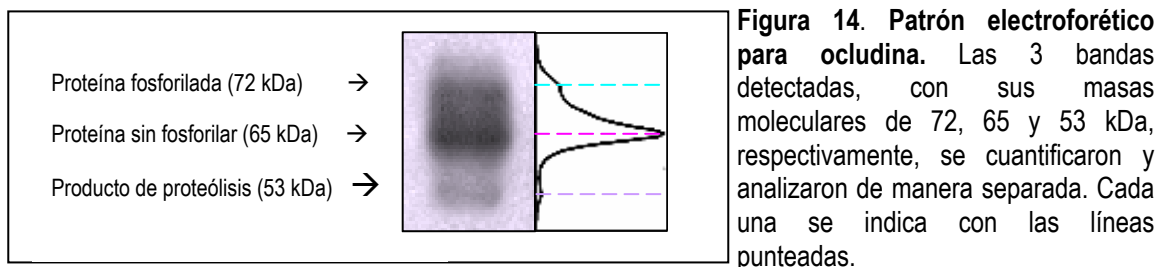


Figura 13. Detección y cuantificación proteica relativa de Claudina-1. A. El análisis de proteínas mediante *Western blot* se realizó utilizando alícuotas de 15 μ g del extracto de proteína total de GSL. Previamente estas proteínas fueron resueltas en electroforesis en condiciones denaturantes y reductoras. Los carriles indicados con C corresponden a los individuos controles y con P a pacientes SS. Se indica la banda de 22 kDa correspondiente a cldn-1, y con 47 kDa, la banda de β -actina, empleada como control de carga. B. Análisis densitométrico de la banda de cldn-1 normalizada contra β -actina. La evaluación estadística mostró un aumento de cldn-1 en el grupo de pacientes

SS por sobre el grupo control, esta diferencia es significativa según el test no paramétrico de Mann-Whitney ($p=0,023$).

4.4 Niveles relativos de proteínas de Ocludina

Al igual que las claudinas, ocludina es una proteína de transmembrana de las UE. Para determinar los niveles proteicos de ocln, se realizó inmunodetección por *Western blot* a partir de extracto de proteínas totales de glándula completa. Los niveles de proteína se expresaron en magnitudes relativas, dividiendo los valores densitométricos de la señal de ocln por los de la proteína β -actina (~47 kDa), usada como control de carga. La detección de ocln se realizó bajo condiciones denaturantes y reductoras, en estas condiciones se detectaron tres bandas de ~ 72, 62 y 53 kDa. Estas bandas han sido descritas en trabajos de otros investigadores y corresponderían a: ocln fosforilada, ocln sin fosforilar y ocln proteolizada, respectivamente, Figura 14 y 15A.



Para efectos de determinar los niveles relativos de proteína se midió la ocln total. Los niveles relativos de ocln, en el grupo control, se encontraron dentro del rango de 0,18 a 3,11 con un promedio de $1,08 \pm 1,15$, mientras que en el grupo de pacientes SS, el rango fue de 0,02 a 2,60 con un promedio de $0,53 \pm 0,73$. Al realizar la comparación entre el grupo control y el grupo total de pacientes SS no se encontró cambios estadísticamente significativos ($p=0,089$), Figura 15B, no obstante los niveles proteicos presentan dos tipos de señales en el grupo de pacientes SS, altos (P-Alto, carriles P1, P2, P3, P4, P8, P10, P11, P12 y P14) y bajos niveles de ocln (B-bajos, carriles P5, P6, P7, P9, P13 y P15). Cuando se comparó cada uno de estos grupos de pacientes, por separado, con los controles, se encontró que sólo el grupo con bajos niveles de ocln mostró diferencias significativas ($p=0,0008$), Figura 15C.

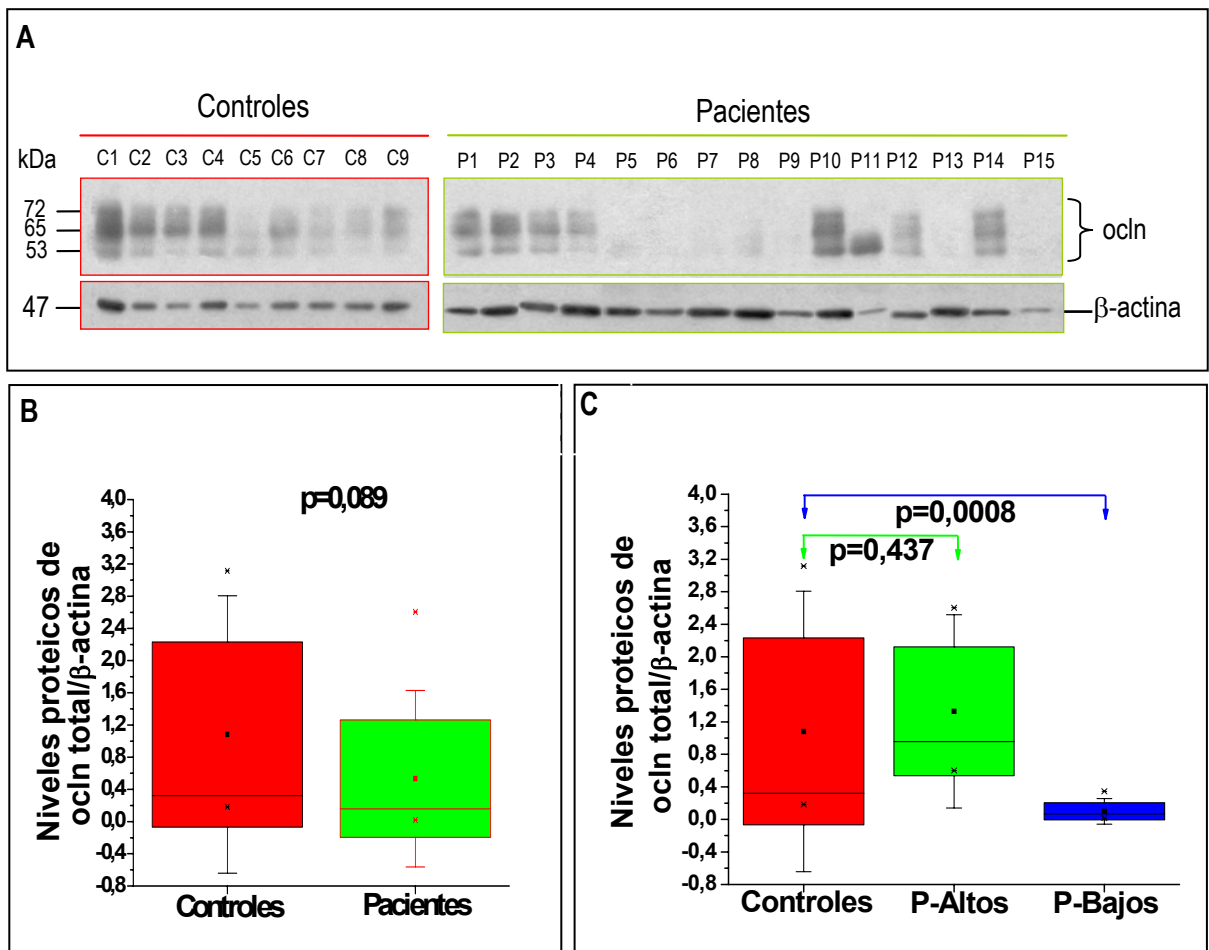


Figura 15. Detección y cuantificación proteica de Ocludina. El análisis de proteínas mediante *Western blot* se realizó utilizando alícuotas de 15 μ g del extracto de proteína total de GSL. Previamente estas proteínas fueron resueltas en electroforesis en condiciones denaturantes y reductoras. Los carriles indicados con C corresponden a los individuos controles y con P a pacientes SS. Se detectaron 3 bandas de 72, 62 y 53 kDa correspondientes a: ocln fosforilada, ocln sin fosforilar y ocln proteolizada, y con 47 kDa la banda de β -actina, empleada como control de carga. B, Análisis densitométrico de ocln total normalizada contra β -actina. La evaluación estadística, tomando en cuenta las tres bandas no mostró diferencias en los niveles relativos de la ocln, según el test no paramétrico de Mann-Whitney ($p = 0,089$). C, Comparación densitométrica de los niveles relativos de la ocln total entre pacientes SS con intensidad similares a los controles (P-Altos, carriles P1, P2, P3, P4, P8, P10, P11, P12 y P14), no mostraron diferencias significativas ($p=0,437$) y con los pacientes SS con intensidades no detectables (P-Bajos, carriles P5, P6, P7, P9, P13 y P15), mostraron una disminución significativa ($p=0,0008$).

A diferencia de cldn-4 cuyos niveles de proteína están aumentados en algunos pacientes, ocln mostró una disminución importante en los niveles de proteínas en los pacientes. Se observó una alta dispersión de las intensidades en ambos grupos, siendo mayor en pacientes SS, por este motivo se buscó una asociación con parámetros morfológicos, tales como: fibrosis, cantidad de parénquima y organización acinar, y parámetros clínicos como flujo salival, cintigrafía y niveles de anticuerpos Ro/La circulantes. Los parámetros morfológicos se determinaron a través de una clasificación visual mediante microscopía de luz de secciones de GSL de controles y pacientes SS, y se ordenó cada variable en forma ascendente (de menos organizado a más organizado, de menos parénquima a más parénquima y de menor a mayor grado de fibrosis), los parámetros clínicos se obtuvieron de exámenes de laboratorio. Los resultados para controles y pacientes SS solo arrojaron una correlación con la cantidad de parénquima (morfológicos), Figura 16. Los controles con mayores niveles de ocln son aquellos cuyas GSL presentaron un alto grado de integridad morfológica (carriles C1-C4 y 80% parénquima), mientras que los de menor intensidad mostraron un grado moderado de alteraciones en el parénquima (50% parénquima). Así, los pacientes con mayor cantidad de parénquima conservado y menor cantidad de células inflamatorias mostraron niveles de expresión de ocln similar a los controles (carriles P1-P4, P10, P14 y 50% parénquima), sin embargo los que presentaron niveles bajos de expresión tenían menor cantidad de parénquima, mayor número de células inflamatorias y presencia de tejido fibroso (carriles P5-P9, P11, P13, P15 y 20% parénquima). El paciente P11 mostró sólo la banda proteolizada, sus GSL presentaron una alta cantidad de infiltrado, moderada cantidad de parénquima con signos evidentes de alteración.

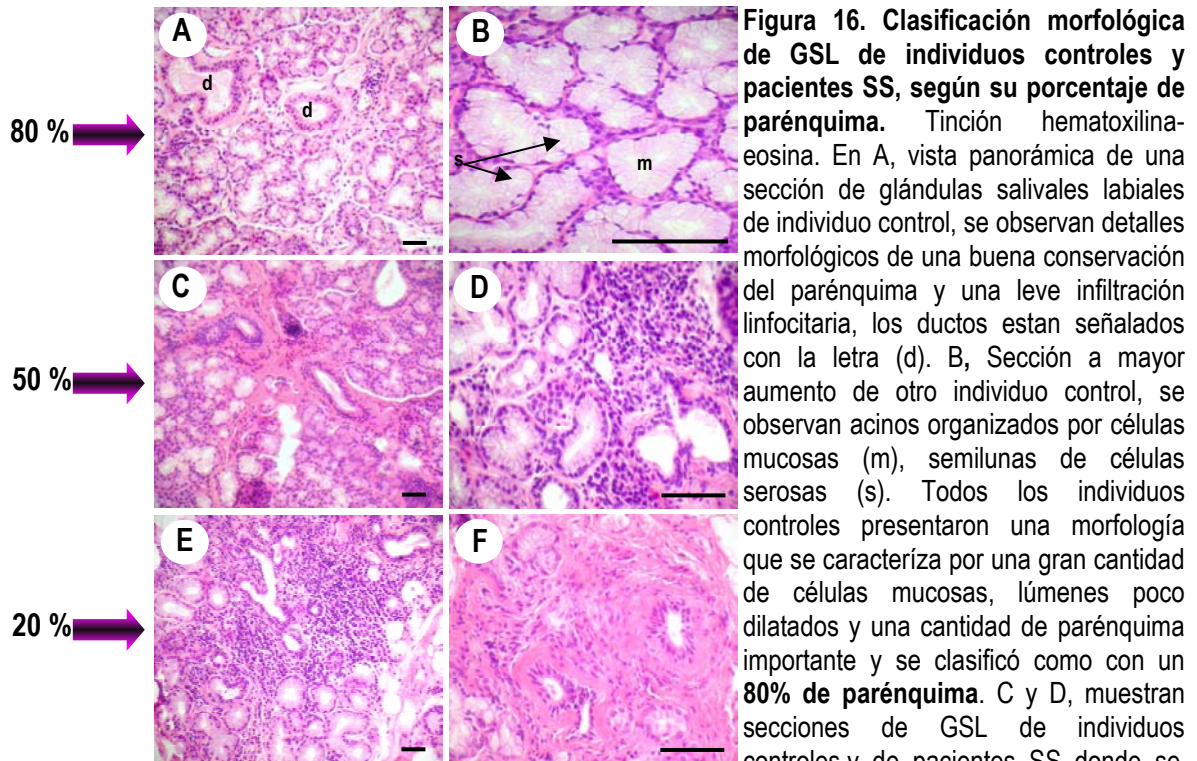


Figura 16. Clasificación morfológica de GSL de individuos controles y pacientes SS, según su porcentaje de parénquima. Tinción hematoxilina-eosina. En A, vista panorámica de una sección de glándulas salivales labiales de individuo control, se observan detalles morfológicos de una buena conservación del parénquima y una leve infiltración linfocitaria, los ductos están señalados con la letra (d). B, Sección a mayor aumento de otro individuo control, se observan acinos organizados por células mucosas (m), semilunas de células serosas (s). Todos los individuos controles presentaron una morfología que se caracteriza por una gran cantidad de células mucosas, lúmenes poco dilatados y una cantidad de parénquima importante y se clasificó como con un **80% de parénquima**. C y D, muestran secciones de GSL de individuos controles y de pacientes SS, donde se muestra una mayor cantidad de infiltrado linfocitario, el parénquima remanente aparentemente conservado pero una porción ha sido remplazado por fibrosis. Estos individuos fueron clasificados con un **50% de parénquima**. En E y F, se muestran secciones de GSL de pacientes SS con un patrón morfológico de mayor daño glandular. E, muestra una zona con intensa infiltración linfocitaria y F, muestra una zona intensamente fibrosa y atrofia acinar. Los pacientes SS con este patrón morfológico fueron clasificados con un **20% de parénquima**. Barras en A, C y E miden 70 μm, en D y F miden 35 μm y B mide 20 μm.

4.5 Niveles de proteólisis de Ocludina

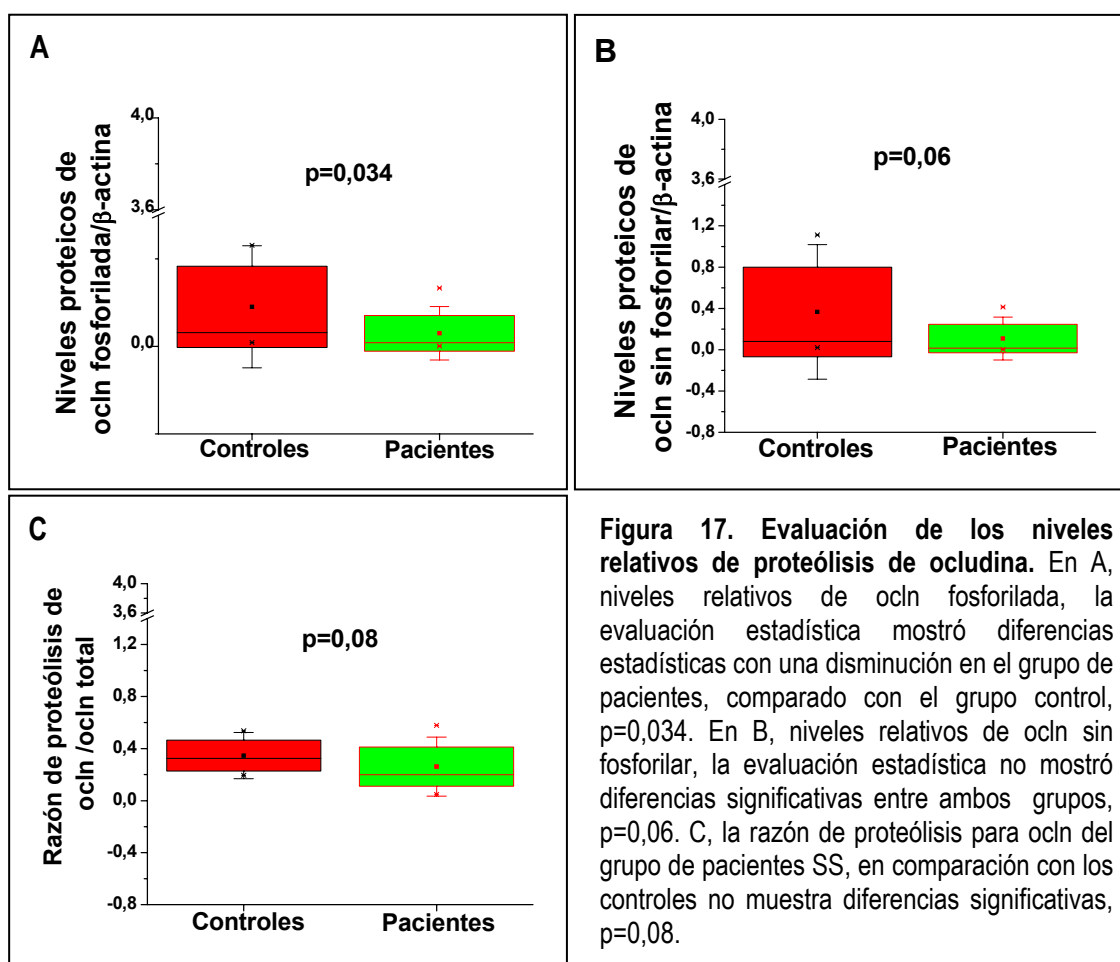
Considerando que un grupo de pacientes casi no presenta marca para ocln, decidimos evaluar el grado de proteólisis de esta proteína. Para ello se cuantificó de manera separada la señal de la proteína sin fosforilar, la proteína fosforilada y también la razón de proteólisis de esta proteína (Figura 15). El análisis se hizo de la siguiente manera:

1. Ocludina fosforilada = Banda superior (72 kDa)
2. Ocludina sin fosforilar = Segunda banda (65 kDa)
3. Razón de proteólisis = $\frac{\text{banda 72 kDa} + \text{banda 65 kDa}}{\text{Proteína total}}$

Al examinar este análisis de cada banda por separado, los resultados son los siguientes:

Los niveles relativos de ocln fosforilada, 72 kDa, en el grupo control, se encuentra en el rango de 0,009 a 0,23 con un promedio de $0,09 \pm 0,09$, mientras que en el grupo de pacientes, el rango es de 0,0008 a 0,13 con un promedio de $0,03 \pm 0,04$. El análisis estadístico realizado a la muestra indicó que

existe diferencia significativa entre ambos grupos, observándose una disminución de ocln fosforilada en el grupo de pacientes SS ($p=0,034$), Figura 17A. Los niveles relativos de ocln sin fosforilar, 65 kDa, en el grupo control, se encuentra en el rango de 0,02 a 1,11 con un promedio de $0,37 \pm 0,43$, mientras que en el grupo de pacientes, el rango es de 0,002 a 0,41 con un promedio de $0,10 \pm 0,14$. El análisis estadístico realizado a la muestra, indicó que no existe una diferencia significativa entre ambos grupos, con un valor de $p=0,06$, considerando que existe un grupo de pacientes (P5-P9) que no presentan una banda visible, Figura 17B. La razón de proteólisis se encontró en el rango de 0,19 a 0,53 con un promedio de $0,35 \pm 0,11$ en el grupo control, mientras que en el grupo de pacientes, el rango es de 0,05 a 0,58 con un promedio de $0,26 \pm 0,15$. El análisis estadístico realizado a la muestra indicó que no existe una diferencia significativa entre controles y pacientes SS ($p=0,08$), Figura 17C.



4.6 Niveles relativos de proteínas de ZO-1

Para determinar los niveles proteicos de ZO-1, se realizó inmunodetección por *Western blot* a partir de extracto de proteínas totales de glándula completa. Los niveles de proteína se expresaron en magnitudes relativas, dividiendo los valores densitométricos de la señal de ZO-1 por los de la proteína β -actina (~ 47 kDa), usada como control de carga. La detección de ZO-1 se realizó bajo condiciones denaturantes y reductoras, en estas condiciones se detectó dos bandas de ~ 235 y 225 kDa. Estas bandas han sido descritas como: ZO-1 $\alpha+$ y $\alpha-$, respectivamente. Las múltiples bandas inferiores corresponderían a ZO-1 proteolizada, Figuras 18 y 19A.

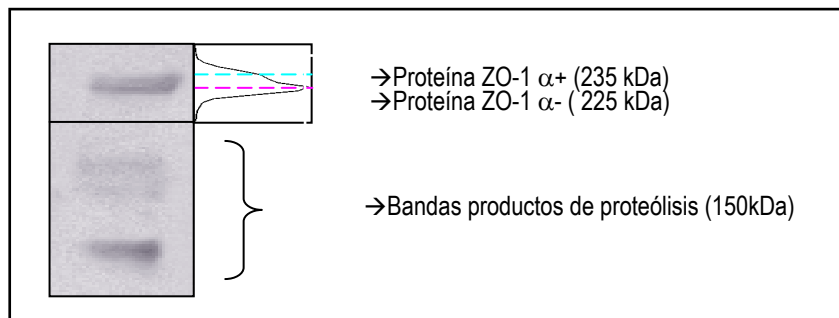


Figura 18. Patrón electroforético para ZO-1. Se muestra las múltiples bandas detectadas para ZO-1, en la parte superior ZO-1 $\alpha+$ y $\alpha-$, con sus masas moleculares de 235 y 225 kDa respectivamente (marcadas cada una con las líneas punteadas). En la parte inferior se observan varias bandas productos de proteólisis, bajo los 150 kDa (llave).

Los niveles relativos de ZO-1, en el grupo control, se encontraron dentro del rango de 0,05 a 1,73 con un promedio de $0,54 \pm 0,58$, mientras que en el grupo de pacientes SS, el rango fue de 0,02 a 0,48 con un promedio de $0,13 \pm 0,14$. Al analizar los niveles relativos de proteínas se encontraron diferencias significativas entre el grupo total de pacientes y el grupo control ($p=0,033$), observándose una disminución importante en el grupo de pacientes SS, Figura 19B.

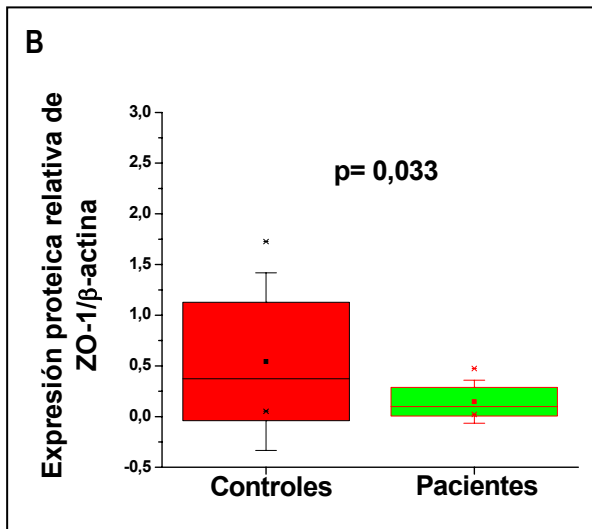
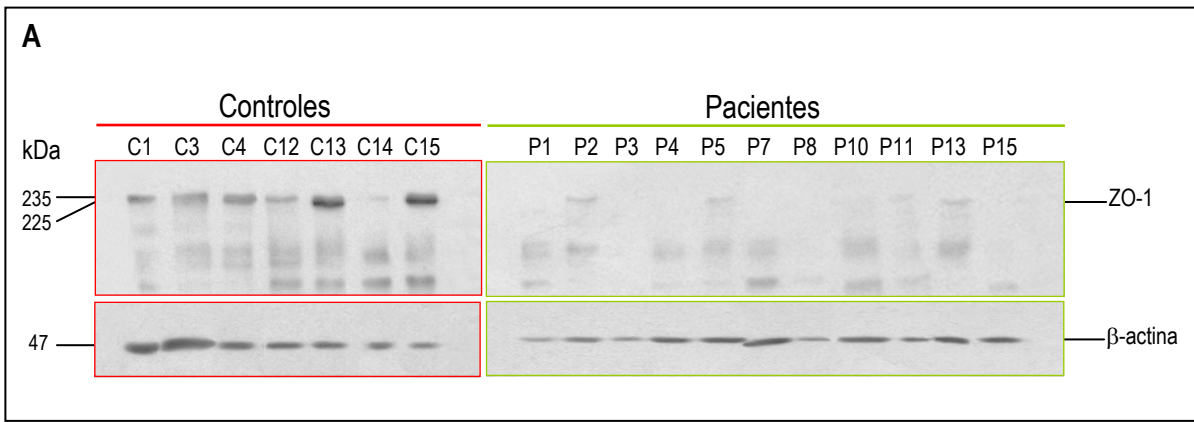


Figura 19. Detección y cuantificación proteica relativa de ZO-1. A. El análisis de proteínas mediante *Western blot* se realizó utilizando alícuotas de 50 μ g del extracto total de proteína de GSL. Previamente estas proteínas fueron resueltas en electroforesis en condiciones denaturantes y reductoras. Los carriles indicados con C corresponden a los individuos controles y con P a pacientes SS. Se indica la banda de 235 y 225 kDa correspondiente a la ZO-1 $\alpha+$ y $\alpha-$ respectivamente, y con 47 kDa, la banda de β -actina, empleada como control de carga. B. Análisis densitométrico de la banda de ZO-1 normalizada contra β -actina. La evaluación estadística mostró diferencias significativas en los niveles relativos de ZO-1, según

el test no paramétrico de Mann-Whitney ($p=0,033$), observándose un disminución en los niveles proteicos en el grupo de pacientes SS *versus* controles.

5. Localización subcelular de proteínas de UE en GSL de controles y pacientes SS

La localización subcelular toma real importancia cuando se estudia un complejo multiproteico, permitiéndonos evaluar si los cambios observados en la expresión proteica modifican el patrón de distribución de las proteínas que componen las UE. Para determinar la localización subcelular de las diferentes proteínas de UE en estudio, se realizó inmunodetección por inmunofluorescencia e inmunohistoquímica en corte de glándulas salivales labiales fijadas en paraformaldehído e incluidas en parafina.

5.1 Localización subcelular de Claudina-4 en GSL de controles y pacientes SS

En la Figura 20A-C se muestra la localización de *cldn-4* (café) en glándulas salivales labiales provenientes de un individuo control. Esta proteína fue detectada por inmunohistoquímica, empleando como anticuerpo primario el mismo utilizado en los *Western blot* y un anticuerpo secundario biotinilado. El contraste nuclear se realizó con hematoxilina de Mayer. La línea discontinua roja delimita la estructura de

acino mucoso, Figuras 20A y E, acino seroso, Figuras 20B y F, acino seromucoso, Figuras 20C y G, y ducto, Figuras 20D y H. Esta proteína se detecta en controles en la zona apical de las respectivas células presentando un patrón discreto y punteado, solo en ductos la marca se observa con mayor intensidad; esta localización corresponde a la región donde se ubican las UE. Las microfotografías de las Figuras 20E-H, corresponden a secciones de GSL de pacientes SS, mostrando las mismas estructuras señaladas anteriormente, y todas ellas tienen en común un aumento en inmunorreactividad y una marcada redistribución en la superficie basolateral en los acinos serosos. La mayor inmunorreactividad es más evidente en pacientes con mayor daño acinar, Figura 20F y en ductos, Figura 20H, donde se observa una notoria marca citoplasmática. La intensidad de señal detectada *in situ* se correlaciona con la encontrada por *Western blot*. Los núcleos se observan de color azul.

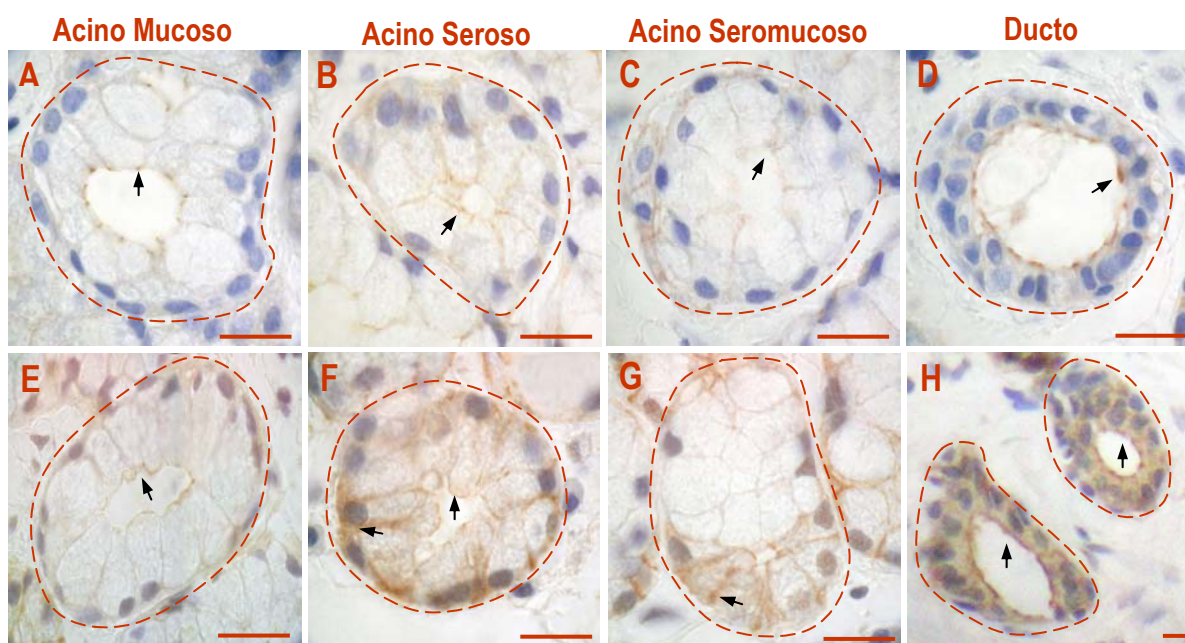


Figura 20. Localización subcelular de Claudina-4 en glándulas salivales labiales de controles y de pacientes SS. Las secciones A-D corresponden a GSL de controles y E-H a pacientes SS. La línea discontinua delimita el contorno de las respectivas estructuras. Las secciones A y E corresponden a acinos mucosos, B y F a acinos serosos, C y G a acinos seromucosos, D y H a ductos. En los controles se observa, en el polo apical, un punteo definido y discreto de clnd-4 en los distintas estructuras celulares, solo los ductos (Figura D) presentan una marca más intensa. En pacientes SS, los acinos mucosos muestran un patrón de inmunorreactividad similar al encontrado en los controles (Figura E y G), en cambio en los acinos serosos se observa mayor intensidad de la señal y una localización hacia la porción basolateral (Figura F y G). Los ductos muestran una marcada inmunorreactividad en la porción apical que se extiende hacia todo el citoplasma (Figura H). Barras: A, B, C, D, G 10 μm y H 25 μm . Las flechas indican las zonas con la marca más característica de cada estructura.

5.2 Localización subcelular de Claudina-3 en GSL de controles y pacientes SS

En secciones provenientes de GSL de individuos controles, Figuras 21A-D, la inmunofluorescencia para cldn-3 (verde) muestra una localización definida puntiforme en la zona apical de las células acinares, coincidente con la ubicación de las UE, y similar a la inmunoreactividad observada para cldn-4. Los acinos seromucosos presentan una disminución en la porción mucosa, Figura 21A. En pacientes SS, Figuras 21E-H, los acinos mucosos presentan una localización equivalente a los controles, Figuras 21E y F. En los acinos serosos, se observa un aumento evidente en la señal de inmunofluorescencia en apical y en basolateral, Figura 21G. Los ductos, muestran una localización conservada de cldn-3 en el polo apical, con un aumento leve de la inmunoreactividad, al mismo tiempo se observa una débil marca citoplasmática, Figura 21H. Los núcleos se observan de color rojo.

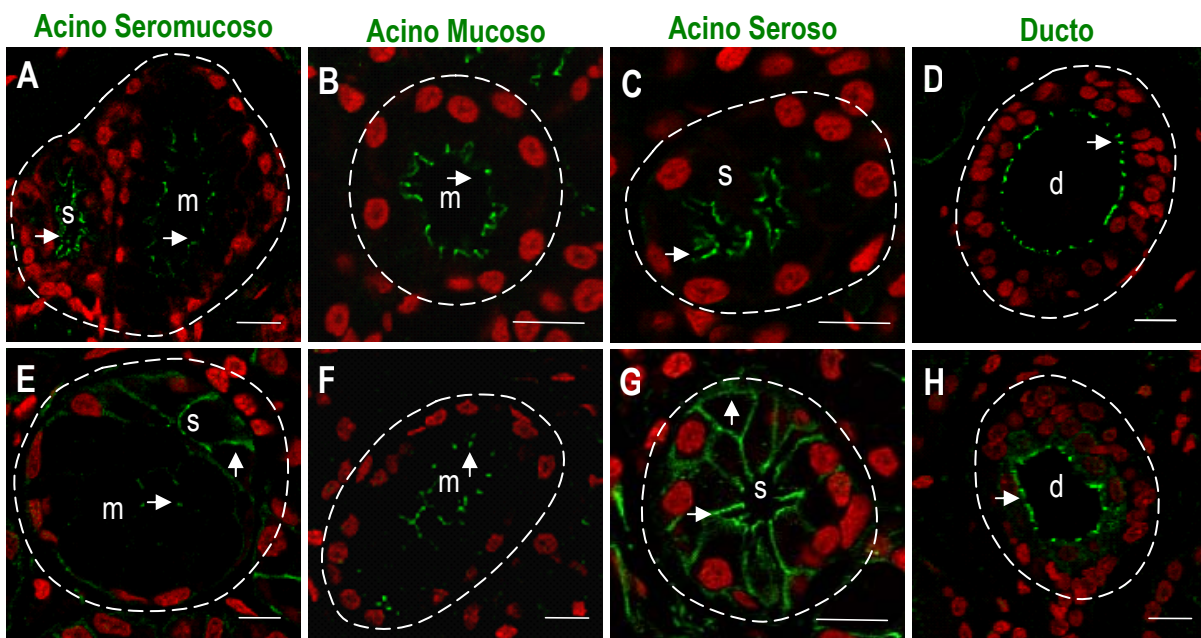


Figura 21. Localización subcelular de Claudina-3 en glándulas salivales labiales de controles y de pacientes SS. Las secciones A-D corresponden a GSL de controles y E-F a pacientes SS. La marca en color verde corresponde a la señal emitida para cldn-3 y en rojo para los núcleos. En A, acino seromucoso que muestra un punteo definido de cldn-3 en el polo apical de las células acinares. En B y C se muestra por separado la porción mucosa (m) y serosa (s), en ellas se puede ver más nítidamente la localización y nivel de expresión de esta proteína. En D se muestra la localización de cldn-3 en un ducto (d). En las GSL de pacientes SS de E-H se observan varios patrones de expresión, en E una disminución en la porción mucosa comparada con la serosa, en F una situación similar al control, sin embargo en G se observa un cambio marcado en la localización desde apical a zonas profundas tanto superficie lateral y basal, además de un aumento en la inmunoreactividad, en H los ductos mantienen un patrón de localización parecido al control, pero un leve aumento de la inmunoreactividad, además de marca citoplasmática. Las flechas blancas indican las diferentes zonas en donde se localiza cldn-3. Barras: en A, D, E, F y H 25 μ m, en B, C y G 10 μ m.

5.3 Localización subcelular de Ocludina en GSL de controles y pacientes SS

Continuando con el estudio de proteínas de membrana que componen las UE, se examinó la localización de ocln en corte de GSL tanto para controles como de pacientes, la línea discontinua blanca delimita la estructura de acino seroso, Figuras 22A, E, I, acino mucoso, Figuras 22B, F, J, acino seromucoso, Figuras 22C, G, K, y ducto, Figuras 20D, H, L. En la Figuras 22A-D se muestra la inmunorreactividad obtenida para ocln (verde) en controles, se destaca muy claramente la localización discreta y puntiforme en la superficie apical de las células acinares, los acinos seromucosos no presentan diferencias en la señal de la porción serosa y en la porción mucosa. Los ductos, conservan una marca inmunorreactiva muy definida en forma de puntos en la zona apical y la intensidad es equivalente tanto en controles, como en pacientes, Figuras 22D-H y L. Los núcleos se observan en rojo.

Si recordamos los resultados obtenidos por *Western Blot* para ocln, Figura 14, se puede observar que hay un grupo de pacientes que presentan niveles proteicos de ocln total altos y otros muy bajos, casi no detectables (15 μ g de proteínas totales por carril). Este mismo comportamiento puede observarse en las ocho secciones provenientes de diferentes pacientes, Figuras 22E-L. En Figuras 22E-G, se observa cuatro imágenes en donde la marca de ocln se localiza en la superficie apical de las células acinares, manteniéndose la ubicación y la intensidad de la reacción como la observada en los controles. Sin embargo, existe zonas en donde la inmunorreactividad para ocln esta disminuida, pero mantienen la localización en el polo apical de las células serosas, mucosas y seromucosas, Figuras 22I-K.

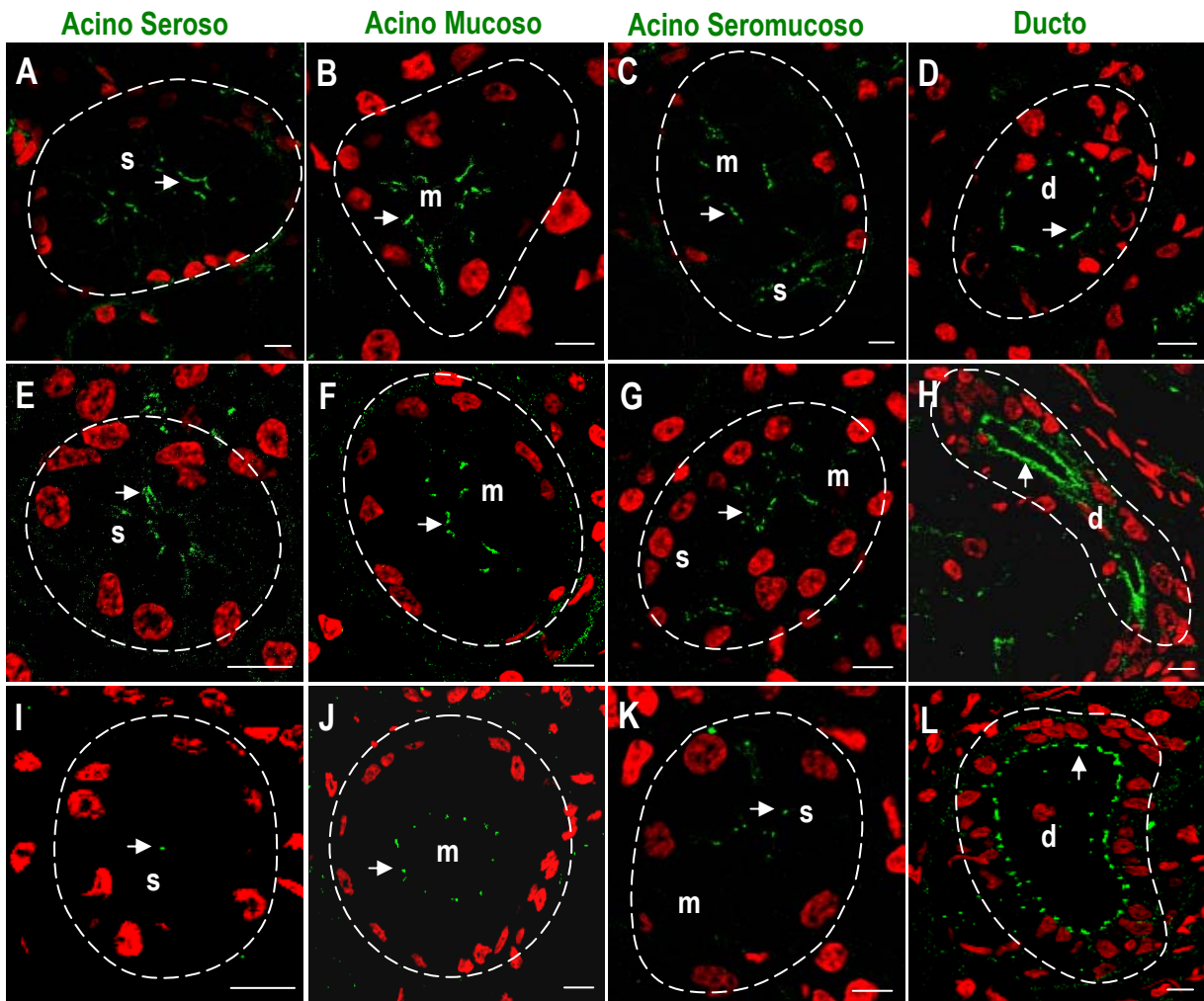


Figura 22. Localización subcelular de Occludina en glándulas salivales labiales de controles y de pacientes SS. La marca en color verde corresponde a la señal emitida para ocln y en rojo para los núcleos. Las secciones A-D corresponden a GSL de controles y E-L a pacientes SS. Imágenes A-C corresponden a acinos serosos, acinos mucosos y acinos seromucosos, respectivamente, en donde se observa un punteo definido de ocln en el polo apical. En D, I y L, corresponden a los ductos, la inmunorreactividad se concentra en la zona apical y no se observan diferencias entre los controles (D) y pacientes (I y L). Imágenes E-G, muestran las señales obtenidas en pacientes donde la localización e intensidad para ocln son equivalentes a las observadas en controles. Imágenes I-K, muestran las señales para ocln en pacientes, observándose una localización conservada en la zona apical, con una disminución importante en las intensidades. Las flechas blancas indican la marca de ocln. Barras: en A, C, H, I y L 25 μm , en B, D, F, G y K 15 μm , en E e I 10 μm .

5.4 Localización subcelular de ZO-1 en GSL de controles y pacientes SS

La proteína citoplasmática ZO-1 es fundamental para obtener el patrón polarizado de las células acinares, ya que es ella quien se asocia a los filamentos de actina, por ello su localización subcelular servirá como un marcador de la integridad de las UE. Las secciones de A-D corresponden a cortes de GSL provenientes de individuos controles, Figuras 23A-D, la inmunorreactividad para ZO-1 muestra una fuerte marca hacia la zona apical en los acinos seromucosos (sm), serosos (s), y en ducto estriado (de), Figuras 23B, C y D, respectivamente. Los ductos (d), Figura 23A, también presentan marca en el polo apical que difunde hacia el citoplasma. Todos los tipos celulares muestran marca en algunos núcleos. En pacientes SS, Figuras 23E-H, muestran una señal inmunorreactiva disminuida en el dominio apical de los acinos mucosos y seromucosos, en comparación con los controles, Figuras 23F, G y H, respectivamente. El patrón de localización de ZO-1 en los ductos es similar que los controles, Figura 23E. La intensidad y el número de núcleos con ZO-1 es mayor que en los controles.

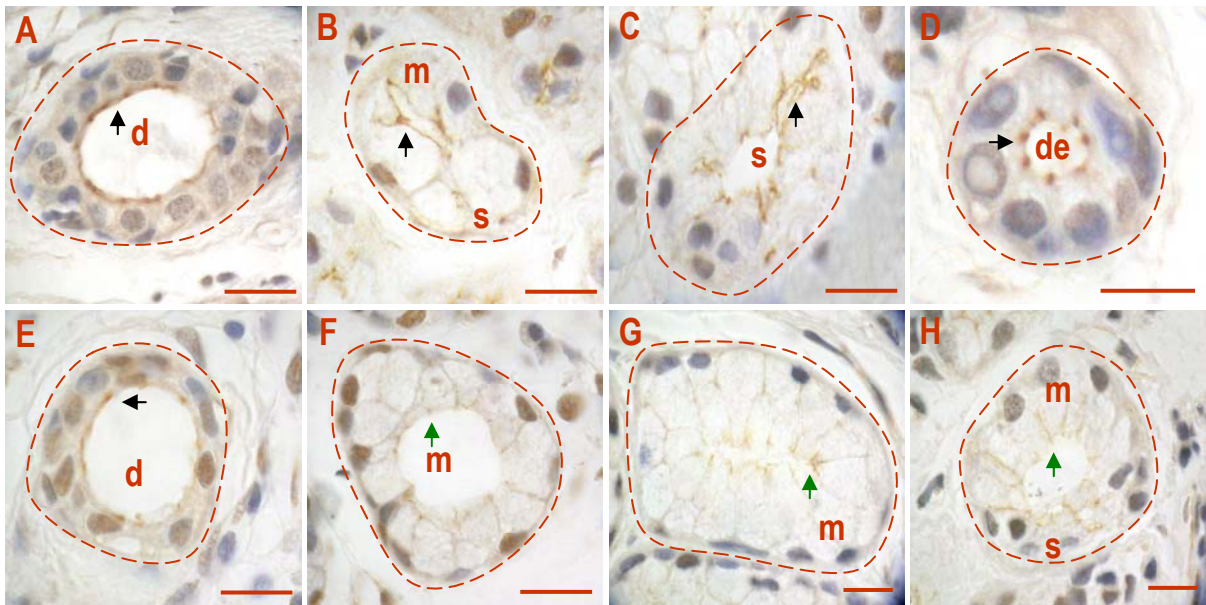


Figura 23. Localización subcelular de ZO-1 en GSL de controles y de pacientes SS. Las secciones A-D corresponden a GSL de controles y E-H a pacientes SS. A y E muestran ductos (d), donde se observa un punteo definido de ZO-1 en el polo apical y una señal difusa en el citoplasma y en algunos núcleos. En F y G se observan acinos mucosos (m), en B y H se muestran acinos seromucosos (sm), en C se muestra acino seroso (s) y en D se muestra un ducto estriado (de). La inmunorreactividad se concentra preferentemente en la zona apical y sólo se perciben diferencias en la intensidad de la marca entre los controles y pacientes. También se observa señal en núcleos. La línea discontinua delimita el contorno de cada estructura. Las flechas negras indican la marca para ZO-1 en controles y ductos de pacientes, mientras las flechas verdes indican una menor intensidad en los acinos serosos y mucosos de pacientes SS. Barras en A, B, C, E y F 15 μ m y en D 10 μ m.

DISCUSIÓN

En esta memoria se determinó si en GSL de pacientes con SS la pérdida de polaridad celular y la desorganización del polo apical, se acompañan de una sobreexpresión y/o redistribución de las proteínas que constituyen las UE. Resultados previos obtenidos en GSL de pacientes con SS muestran haces transversales de fibras de colágeno estromal, tanto en el lumen acinar, como en el espacio intercelular. También se ha observado una desorganización de las microvellosidades en el polo apical de las células acinares, región donde se encuentra la maquinaria secretora de estas células [13, 78]. La evaluación de la expresión génica, de un grupo importante de genes presentes en células acinares y ductales de GSL de pacientes SS, mediante microarreglos de cDNA, mostró que *cldn-4* se encontraba sobreexpresada no así otras proteínas de la familia de las claudinas (*cldn-1*, *-3*, *-5*, *-10*, *-18* y *-23*) y *ocln*.

Los antecedentes mencionados sustentan los estudios realizados en este trabajo. Se analizaron los niveles de mRNA y de proteínas que componen el complejo macromolecular de UE y su localización en las células acinares de GSL de pacientes con SS.

El análisis estadístico de los niveles relativos de mRNA de *cldn-4* a GADPH no arrojó diferencias significativas entre controles y pacientes SS ($p=0,052$). La falta de significancia se explicaría por la alta dispersión en los niveles de expresión de mRNA encontrada en el grupo de pacientes SS, cuyo rango fue de 1,72 a 11,96, con un promedio de $7,09 \pm 3,28$, este último es 3 veces mayor que los controles. Se debe mencionar que 6/11 pacientes presentaron un valor superior al promedio y 5/11 un valor bajo el promedio. Los pacientes con valores mayores al promedio de los controles presentaron una sobreexpresión de *cldn-4*, corroborando los datos obtenidos por microarreglos de cDNA.

A la fecha, son muy escasos los trabajos sobre la regulación de la expresión de proteínas de UE. En células de cáncer ovárico, se encontró en la región promotora de *cldn-4* dos sitios de unión a Sp1, que a pesar de ser necesaria, no es suficiente para regular su expresión. Por otra parte, se ha demostrado que el promotor de *cldn-4* es regulado por modificaciones epigénicas. En este contexto, células (OVCAR-5, OVCAR-4 y BG-1) que presentan una sobreexpresión de *cldn-4*, exhiben bajos niveles de metilación del DNA y una alta acetilación de histona H3 en la región promotora. Una relación inversa ocurre en células (UCI101, HEY y HOSE-B) que presentan una baja expresión de *cldn-4*, la cual está precedida de una alta metilación del DNA y una baja acetilación de la histona H3 [79]. Más aún, los factores de transcripción Snail y Slug tienen acción represora sobre la expresión de *cldn-1*, *-3*, *-4*, *-7* y *ocln* [80, 81]. Estas evidencias nos permiten postular que el promotor de *cldn-4* en las GSL de pacientes SS podría estar sujeto a regulaciones como las descritas.

Los *Western blot* para *cldn-4* mostraron una banda a los 22kDa, peso molecular esperado para *cldn-4* [82]. El análisis densitométrico mostró un aumento estadísticamente significativo en los pacientes SS en comparación a los controles ($p=0,04$), al analizar el *Western blot* de esta proteína, Figura 11A, es posible observar que algunas bandas poseen una menor movilidad electroforética, la cual ha sido descrita por otros investigadores como *cldn-4* fosforilada, en residuos de tirosina ubicados hacia el extremo C-terminal. Un receptor de la familia de las efrinas que posee actividad tirosina kinasa, EphA2, cuando es activado por su ligando, puede fosforilar a *cldn-4* en el residuo de tirosina-208. Este procesamiento causa una disminución en la asociación entre *cldn-4* y ZO-1, impidiendo la integración de *cldn-4* a los sitios de contacto célula-célula. El análisis del flujo paracelular en células MDCK revela que la activación de EphA2 retrasa el ensamblaje de las UE, pero no afecta la integridad de las UE previamente estructuradas [83]. Una sobreexpresión de mRNA de EphA2 también fue encontrada en el análisis de los microarreglos de cDNA de GSL de pacientes SS. Si *cldn-4* fuera sustrato de EphA2 en las GSL de los pacientes SS y hay una mayor cantidad de esta quinasa, su fosforilación podría retardar el ensamblaje de las UE, situación que podría explicar la presencia de colágenos estromales en el lumen acinar. En los pacientes SS que presentan una sobreexpresión de mRNA y de proteínas para *cldn-4*, podríamos postular que habría una regulación a nivel transcripcional y postranscripcional. No sabemos si esto ocurre por una mayor síntesis de su mRNA o una mayor estabilidad de éste. Esta información no es posible de obtener experimentalmente en seres humanos.

Los niveles de mRNA para *ocln* y ZO1 no fueron determinados por problemas técnicos. Los niveles de mRNA para *cldn-3*, determinados por microarreglos de cDNA, son similares entre y pacientes SS, por esta razón en esta memoria se emplearon como un control de referencia de los niveles de proteína de *cldn-4*. *Cldn-3* presentó una movilidad electroforética similar a *cldn-4*, una banda de aproximadamente de 22 kDa, como ha sido descrita en la literatura [82]. El análisis densitométrico de esta banda no mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los pacientes SS ($p=0,052$), corroborando los resultados obtenidos por microarreglos de cDNA. Sin embargo, ambos grupos presentaron una dispersión de los niveles relativos de esta proteína, que se correlacionó con una disminución del parénquima glandular, por ejemplo las glándulas de los pacientes P6 y P10 conservan sólo un 20% del parénquima. También se empleó *cldn-1* como control de expresión de *cldn-4*, ya que los microarreglos de cDNA no mostraron diferencias de expresión de mRNA entre pacientes SS y controles, obteniéndose una sola banda de 22 kDa. No obstante, el análisis estadístico mostró un aumento significativo de esta proteína en los pacientes SS ($p=0,023$), a diferencia de lo obtenido en los microarreglos de cDNA y tampoco mostraron correlación con la cantidad de parénquima glandular. En linfocitos de intestinos de ratón, se ha detectado la expresión mRNA y niveles de proteínas para ZO-1, JAM

y ocln, los autores de este estudio postulan una probable acción de barrera entre los linfocitos y la célula epitelial, el cual se desarrollaría como un mecanismo de defensa. Esta proposición se fundamenta en observaciones realizadas en colitis murinas, donde se encuentra aumentada la interacción de células epiteliales con células inflamatorias, ya que en esos tejidos inflamados hay una alteración en las barreras fisiológicas [84]. Cuando la lámina basal de los acinos y ductos de GSL de pacientes SS está desorganizada, se ha observado la invasión de linfocitos T CD4+ y T CD8+ y su interacción con la célula epitelial, fenómeno que ha sido interpretado como un mecanismo para la acción citotóxica del linfocito sobre la célula epitelial [85]. ¿Podría cldn-1 mediar esta interacción? En este trabajo no se detectó la localización subcelular de cldn-1, por lo que no se puede descartar si los niveles proteicos aumentados podrían también ser aportados por las células inflamatorias. Sin embargo, cldn-3 y -4 sólo fueron localizadas en estructuras glandulares.

Para la proteína ocln, se obtuvo un patrón de tres bandas, las dos primeras según sus masas moleculares aparentes, corresponderían a ocln fosforilada y ocln sin fosforilar; y un tercer producto, que por su patrón de migración, podría corresponder a ocln proteolizada. Se ha descrito que ocln puede ser degradada por caspasas en el dominio citoplasmático C-terminal (aspartato 320), generando un fragmento de 53 kDa y por MMPs probablemente en la primera asa extracelular [86]. En las GSL de estos pacientes se ha demostrado la presencia y actividad de caspasa 3, MMP-2 y -9 [13, 14, 87]. Al analizar los niveles totales de esta proteína, medida como la sumatoria de las tres bandas, no se obtuvo diferencias significativas entre controles y pacientes ($p=0,089$). Sin embargo, los valores en pacientes SS mostraron una alta dispersión, por esta razón se realizó un análisis, por separado, de los grupos con altos y bajos niveles de ocln comparados con los niveles del grupo control. El grupo de bajos niveles de ocln, mostró una diferencia muy significativa en relación a los controles, a diferencia de los pacientes SS con altos niveles de ocln que no mostraron diferencias respecto a los controles, Figura 15C. Al evaluar la intensidad de bandas de ocln, paciente a paciente, se encontró una relación directa con la cantidad de parénquima de sus glándulas, no así con parámetros clínicos (flujo salival, cintigrafía, autoanticuerpos) Figuras 15A y 16. Además, se analizó por separado cada una de las bandas correspondiente a ocln fosforilada, ocln sin fosforilar y la razón de proteólisis, encontrándose una disminución sólo en la forma fosforilada. Ocln, es blanco de varias proteínas quinasas, entre ellas, PKC ζ II un miembro de la familia de proteínas quinasas C atípicas y caseína quinasa epsilon I (CKI ϵ), que ejercen su función en diferentes residuos en el tallo citoplasmático C-terminal de ocln. En células MDCK, PKC fosforila a ocln en el residuo de serina 338 y su activación con ésteres de forbol inducen el reclutamiento hacia sitios de contacto célula-célula [88]. Cuando disminuye el grado de fosforilaciones en los residuos de tirosina se observa un aumento de la permeabilidad paracelular [89]. Evidencias contradictorias muestran que un aumento en la fosforilación de

este residuo produce una reducción en la capacidad de unión de ocln a las proteínas de andamio ZO-1, -2 y -3 [90]. Estas evidencias contradictorias no permiten postular cuáles serían las consecuencias de una menor fosforilación de ocln en el ensamblaje de las UE en las GSL de pacientes SS. Sin embargo, un antecedente que podría explicar la disminución de ocln en algunos pacientes SS, es la regulación hacia abajo que ejercen citoquinas proinflamatorias, tales como TNF- α e INF- γ sobre el promotor de ocln, lo cual ha sido demostrado en líneas celulares de intestino humano HT-29/B6 [69]. Los niveles de estas citoquinas se encuentran elevados en GSL de pacientes SS y podrían influir en la expresión de ocln [6, 68, 91].

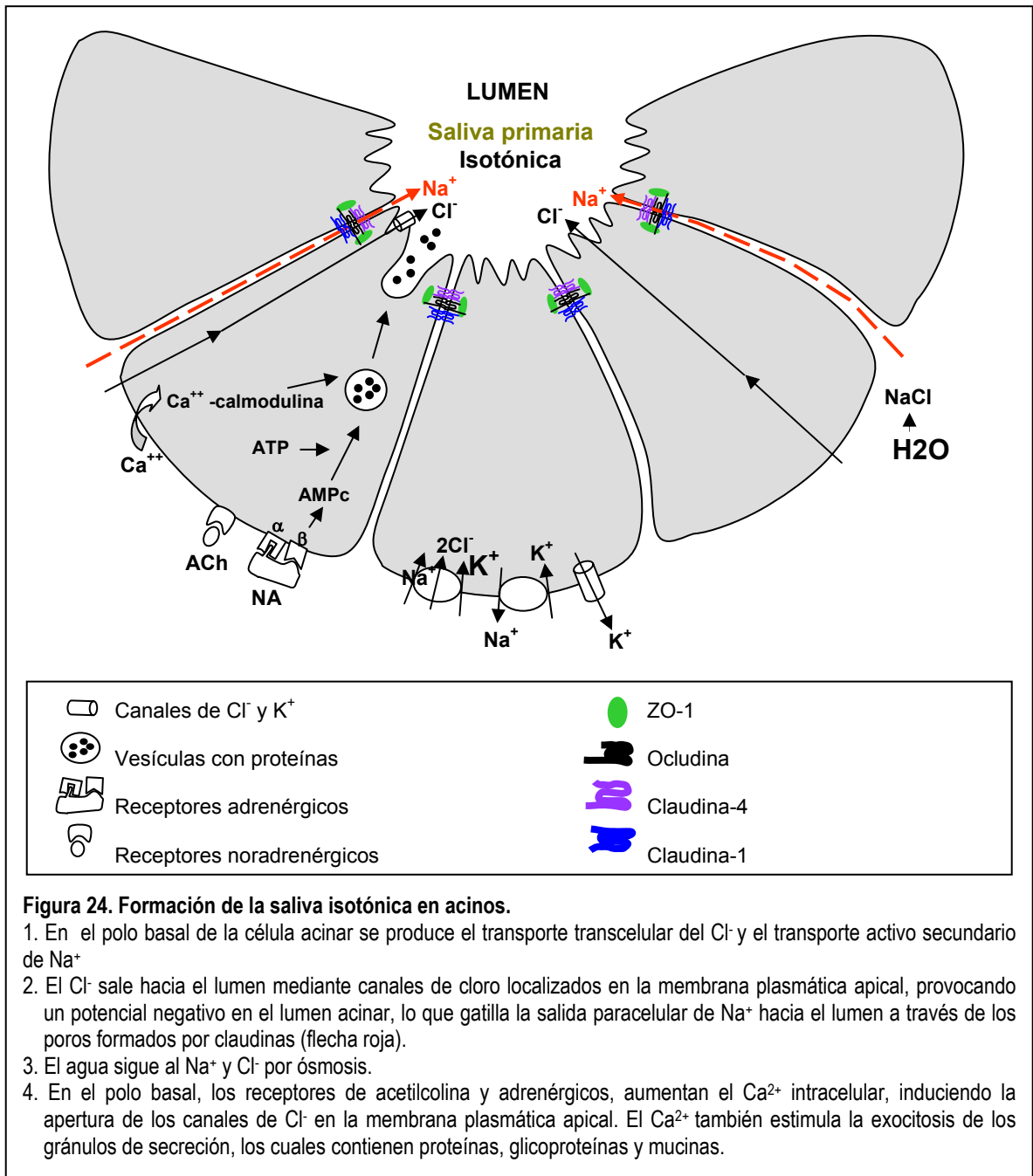
Para la proteína ZO-1 se obtuvo un patrón de múltiples bandas, Figura 18, de acuerdo a sus pesos moleculares descritos, sólo las dos bandas superiores corresponderían a las isoformas $\alpha+$ y $\alpha-$ [92]. Al igual que ocln, ZO-1 puede ser producto de proteólisis tanto de caspasas, como de MMP, así las bandas observadas bajo los 150 kDa podrían corresponder a los fragmentos proteolíticos generados por acción de estas enzimas [86]. El análisis estadístico mostró una marcada disminución de los niveles relativos proteicos de ZO-1 en los pacientes SS en comparación con los controles ($p=0,033$), Figura 19. ZO-1, al igual que ocln, se ve afectada por los niveles de citoquinas proinflamatorias, así lo demuestran estudios realizados en células derivadas de epitelio intestinal humano, T84 y Caco-2, en donde TNF- α e INF- γ afectan la función de barrera de las UE y disminuyen los niveles de ZO-1, provocando un aumento de la permeabilidad y perturbación en la organización de actina en la región apical de la célula [93, 70].

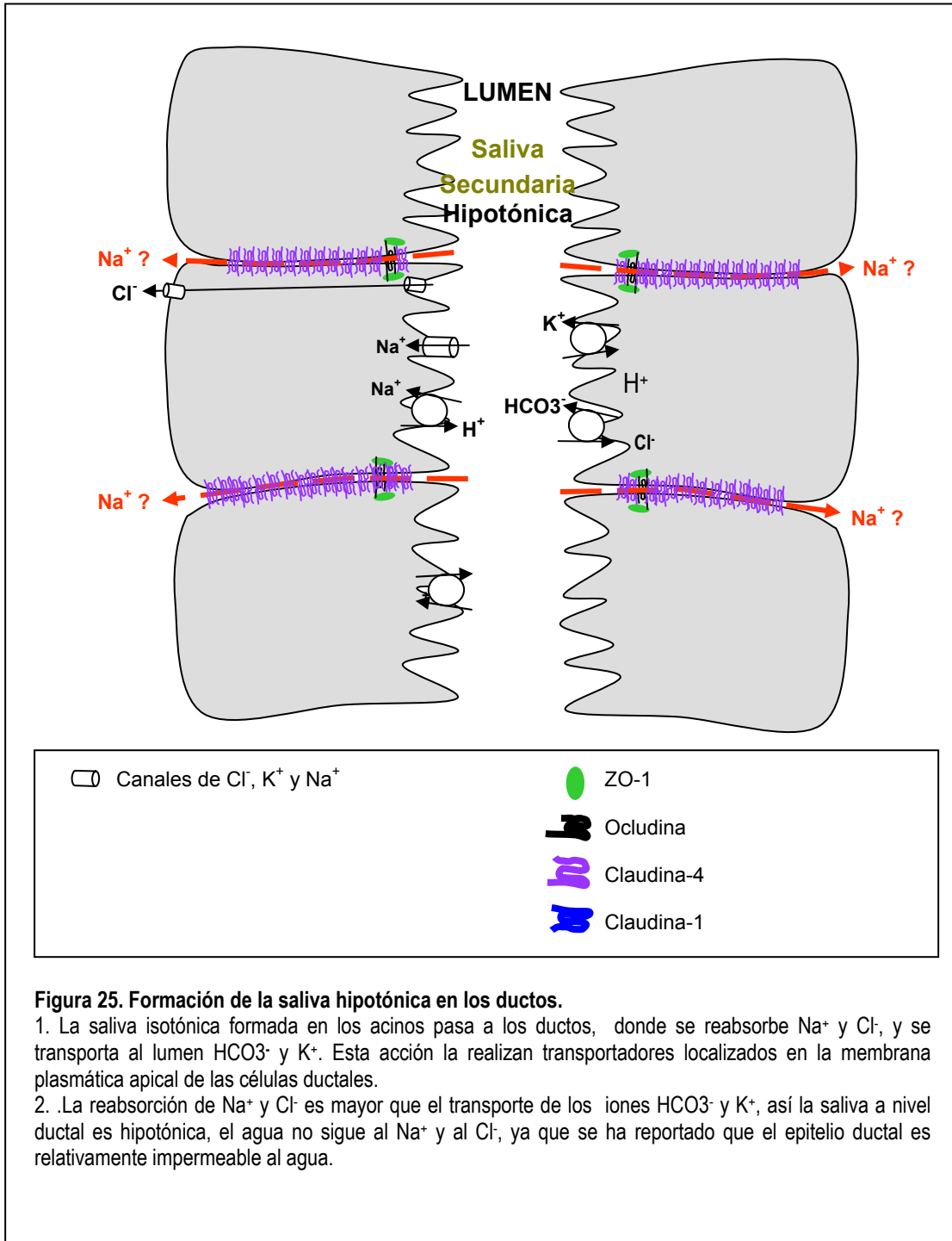
En síntesis, en las GSL de pacientes con SS se encontró una sobreexpresión de los niveles relativos proteicos de cldn-4, cldn-1 y los de cldn-3 estaban aumentados, pero no significativamente. La forma fosforilada de ocln, ocln total para algunos pacientes y ZO-1 se encontraron disminuidas. Estos resultados sugieren fuertemente alteraciones en el ensamblaje de las UE de GSL de pacientes SS. No obstante, ¿cómo podríamos interpretar los cambios en los niveles de expresión de las proteínas estudiadas si no conocemos su localización subcelular?

Para analizar la localización subcelular de las distintas proteínas que componen las UE, se hizo la detección por inmunofluorescencia/inmunohistoquímica de cldn-4, cldn-3, ocln y ZO-1, las cuales en condiciones fisiológicas sólo se localizan en el polo apical. Cldn y ocln organizan una red anastomosada con puntos de fusión, que se establecen entre membranas plasmáticas de células epiteliales vecinas. En controles, Figura 20, cldn-4 se observó en la superficie apical de los acinos y ductos, similar como ha sido descrita en glándulas salivales mayores [94]. En pacientes SS, la situación cambió notoriamente en los acinos serosos y ductos, no así en los acinos mucosos, Figura 20F-H, en donde la localización de cldn-4 no se encontró exclusivamente en la superficie apical, sino también en basolateral, e incluso se detectó en el citoplasma de los ductos. Las cldn, y en particular cldn-4, se consideran un canal catiónico para sodio.

En condiciones fisiológicas, el movimiento de Na⁺ en el acino se produce desde el estroma a nivel basal de las células acinares hacia el lumen a través de cldn, Figura 24, para luego ser reabsorbido a nivel de los ductos [95]. No existen antecedentes sobre la vectorialidad de los canales que forman las cldn, pero si su apertura fuera sólo dependiente de la concentración iónica, se podría esperar que el aumento en cldn-4 detectado en acinos serosos y ductos pudiera movilizar mayor concentración de iones sodio y ambas estructuras ejercerían un efecto compensatorio. Así, este proceso permitiría la formación de saliva hipotónica, Figura 25. Postulamos que la redistribución a basolateral podría generar un mayor número de interacciones célula-célula y probablemente ocurre para contrarrestar la disminución de ocln y ZO-1.

La localización de cldn-3 mostró un patrón similar a cldn-4, tanto en controles como en pacientes SS, Figura 21, localizándose en el polo apical de las células acinares y ductales, con una redistribución hacia basolateral en los acinos serosos y ductos, pero manteniendo la localización en los acinos mucosos. La activación del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) en células MDCKII induce el aumento en los niveles proteicos y redistribución celular de cldn-1, -3, y -4, [96]. En GSL de pacientes SS, se ha encontrado expresión de EGFR y EGF en acinos y ductos, especialmente en estos últimos en relación a un aumento de células inflamatorias [97]. El efecto autocrino de EGF sobre su receptor podría estimular la reparación de acinos y ductos, entre otros eventos, activando la interacción entre células a través de clns. En nuestro laboratorio también hemos encontrado que acinos y ductos conservan una cierta capacidad proliferativa, probablemente en respuesta de la acción de este factor de crecimiento [98].





A diferencia de *cln-3* y *-4*, la localización de *ocln* y ZO-1, tanto en controles, como en pacientes SS fue similar, la diferencia entre ambos grupos fue que los pacientes SS mostraron una señal disminuida, lo que se observa en las Figuras 22 y 23. No obstante, un hallazgo interesante es la localización de ZO-1 en algunos núcleos de células acinares y ductales de individuos controles y pacientes SS, siendo mayor en número e intensidad en pacientes (comparar en Figura 23). La localización nuclear de ZO-1 ha sido previamente reportada, ZO-1 presenta señales de localización nuclear (NLS) en el primer dominio PDZ y en el dominio GUK [99]. En células MDCK y LC-PK crecidas en condiciones de subconfluencias se ha demostrado la presencia de ZO-1 en núcleos, no así cuando las células han alcanzado la confluencia, estos investigadores postulan que la señal de acumulación nuclear de ZO-1 produce pérdida o reducción del contacto célula-célula, sugiriendo que la localización nuclear estaría inversamente relacionada con la cantidad o madurez de los contactos celulares [51]. Otros estudios han mostrado que en células MDCK, ZO-1 se asocia a ZONAB cuya acción inhibe la activación del promotor de ErbB-2, el cual participa en morfogénesis y diferenciación celular [100]. La sobreexpresión de ZONAB y de ZO-1 forma un complejo entre ambas proteínas y lo secuestra en las UE permitiendo la expresión de ErbB-2. La sobreexpresión de ZO1 estimula la actividad promotora en células subconfluentes, pero no afecta a células en confluencia. Estos resultados sugieren que tanto ZO-1 como ZONAB participan en el sistema de señales de diferenciación y morfogénesis epitelial [101]. No hay estudios sobre ZONAB en GSL, y menos aún provenientes de pacientes SS, por lo tanto difícilmente se pueden interpretar estos resultados a la luz de lo ya publicado. A pesar de ello, los antecedentes sobre la confluencia de los cultivos celulares son sugerentes en que la falta de ensamblaje de los contactos focales se relaciona con la presencia de ZO-1 en el núcleo. La función de ZO-1 a nivel nuclear es un tema interesante de estudiar, más aún cuando rompe paradigmas de antaño que proteínas que formaban parte de determinadas estructuras podrían participar en otros procesos celulares. La biología celular actual se ha enriquecido al descubrir la versatilidad funcional de algunas proteínas, como el ejemplo descrito.

En resumen, los niveles relativos de mRNA para *cln-4*, no presentaron diferencias significativas entre pacientes SS y controles; sin embargo, los niveles relativos de proteína mostraron un marcado aumento en pacientes SS, sugiriendo una regulación a nivel post-transcripcional. Los niveles proteicos relativos de *cln-3*, fueron similares entre controles y pacientes con SS, mientras que *cln 1* se encontró sobreexpresada en pacientes. Estos resultados sugieren una regulación diferencial en la expresión de las claudinas estudiadas.

Los niveles relativos de proteína de *ocln* total, no presentaron diferencias significativas entre pacientes SS y controles. Sin embargo, en el grupo de pacientes se detectaron dos subgrupos, uno con niveles proteicos bajos, y otro con niveles proteicos altos. El análisis estadístico de ambos grupos por

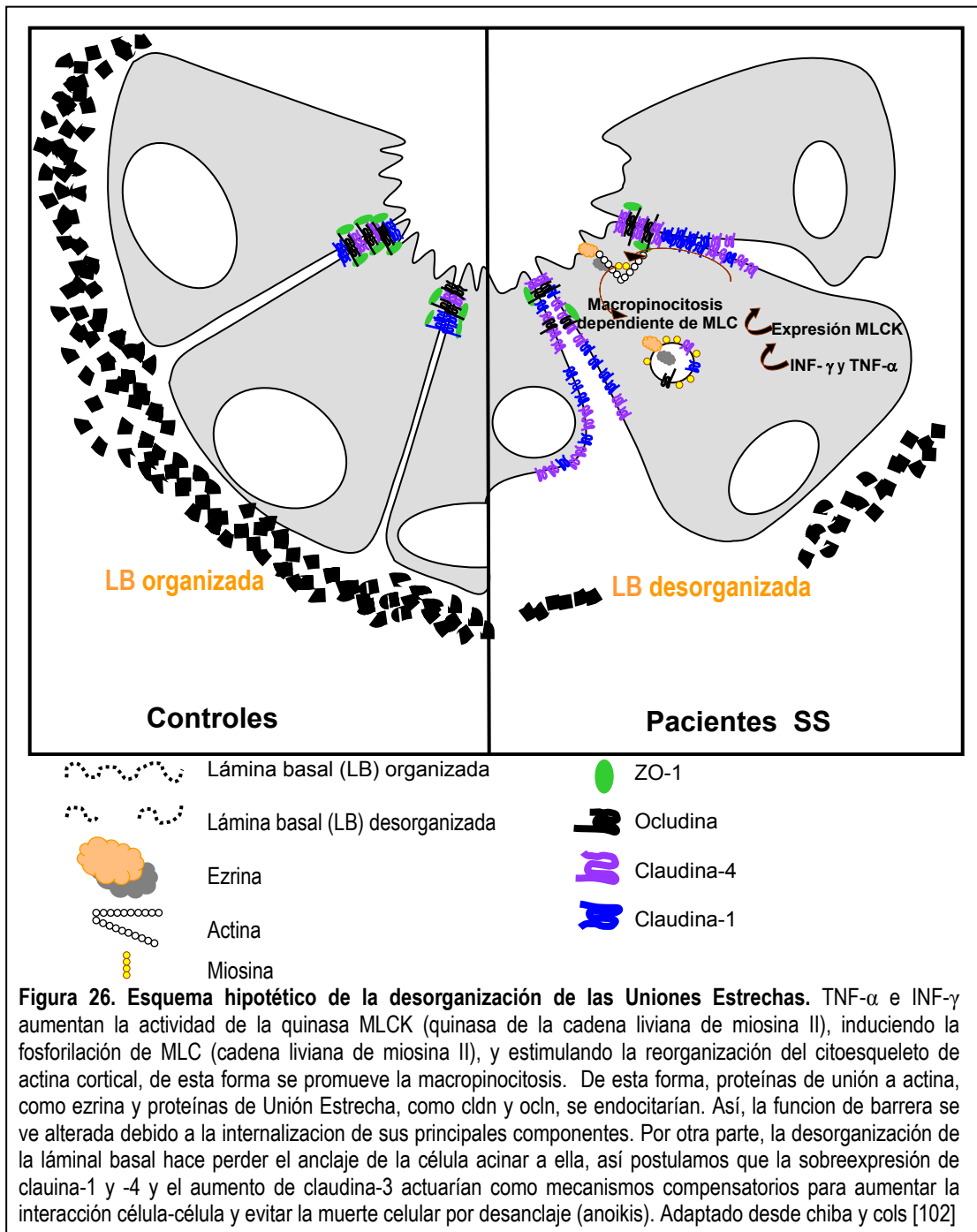
separado, mostró diferencias significativas entre el grupo de pacientes con bajos niveles proteicos y el grupo control, lo que se correlacionó con una baja cantidad de parénquima.

Al analizar los niveles proteicos de ocln sin fosforilar y ocln fosforilada, entre pacientes SS y controles, sólo esta última mostró diferencias significativas, encontrándose una disminución en pacientes SS. La menor fosforilación podría estar relacionada a una disminución en la actividad de kinasas/aumento en la actividad de fosfatasas. El péptido de ocln de menor masa molecular podría corresponder a un producto de proteólisis por caspasa. Al analizar la razón de proteólisis entre pacientes y controles, no se encontró diferencias.

Los niveles relativos de proteína ZO-1, mostraron una marcada disminución en pacientes SS comparado con los controles, esta disminución no podría relacionarse a los elevados niveles de citoquinas proinflamatorias en GSL de pacientes SS, las cuales aumentan la expresión de ZO-1, sino más bien a una acción proteolítica de MMPs y caspasas. Estas dos familias de enzimas están aumentadas en GSL de pacientes SS.

En pacientes SS, cldn-3 y cldn-4, se localizaron en la superficie apical de acinos y ductos, y a diferencia de los controles, también se detectó en la superficie basolateral en acinos serosos, e incluso a nivel citoplasmático en ductos. La localización basolateral podría resultar de una redistribución apico-basolateral, o bien una destinación directa a basolateral. El aumento en basal podría permitir la interacción de la célula epitelial con las células inflamatorias, especialmente a nivel de ductos, cuya proximidad ha sido previamente demostrada. En otros epitelios con inflamación, se ha demostrado que el aumento en cldn, ocurre en células epiteliales y en células inflamatorias permitiendo su interacción. Se postula que esta interacción tan particular, y poco ortodoxa, favorecería el tránsito de células inflamatorias al lugar de daño.

Para ocln y ZO-1, se observó una disminución de la marca en los pacientes SS, concentrándose la señal en la porción apical de los acinos, pero además ZO-1 mostró marca en núcleos. La localización lateral de cldn-3 y -4, podría correlacionarse con un aumento en un material electrón-denso entre la superficie lateral de células acinares vecinas, ya que ocln y ZO-1 no fueron detectadas en la superficie lateral. En la Figura 26, se muestra un esquema hipotético de la internalización que podrían sufrir cldn y ocln por efectos de citoquinas, generando vacuolas hacia la zona apical [102], este mecanismo podría asociarse a los resultados observados por microscopia electrónica.



CONCLUSIONES

Las claudinas (-1, -3 y -4) se encuentran aumentadas en las GSL de pacientes SS, mientras que ocludina y ZO-1 están disminuidas. Estos resultados sugieren un mecanismo diferencial en la regulación de la expresión y/o en la estabilidad de las diferentes proteínas que organizan Uniones Estrechas.

Ocludina y ZO-1 mantienen su localización apical, mientras que claudinas-3 y -4 se distribuyen en apical y basolateral de células acinares serosas de GSL de pacientes SS. Los cambios en localización observados para claudinas podrían ser interpretados como un mecanismo compensatorio para mantener las interacciones célula-célula, las cuáles estarían afectadas por la disminución de ocludina y ZO-1.

Los cambios en la organización de las Uniones Estrechas podrían correlacionarse con la hipofuncionalidad secretora que afecta a los pacientes SS, ya que ellas son fundamentales en la organización del polo apical de células acinares. La alteración de esta unión podría dar cuenta de los cambios previamente encontrados, tales como desorganización de las microvellosidades y cambios en polaridad celular.

La sobreexpresión proteica de claudina-1 y -4 y el aumento en claudina-3 en las GSL de pacientes, muy probablemente, modifique la calidad de electrólitos presentes en la saliva. En particular, claudina-4 su función como canal paracelular de Na⁺ ha sido bien estudiada en otros sistemas celulares. Así, el aumento de Na⁺ en saliva de pacientes SS, reportado por otros investigadores, podría ser explicado, en parte, por nuestros resultados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Szodoray P, Alex P, Brun JG, Centola M and Jonsson R. Circulating cytokines in primary Sjogren's syndrome determined by a multiplex cytokine array system. *Scand J Immunol* 2004;59(6):592-9.
2. Fox RI, Michelson P, Casiano CA, Hayashi J and Stern M. Sjogren's syndrome. *Clin Dermatol* 2000;18(5):589-600.
3. Rehman HU. Sjogren's syndrome. *Yonsei Med J* 2003;44(6):947-54.
4. Anaya JM, Ramos M and García M. Que es el Síndrome de Sjögren y por que es importante. In: Juan Manuel Anaya MRyMG, editor. *Síndrome de Sjögren*. Medellín, Colombia: Corporación para investigaciones biológicas; 2001. p. 6-9.
5. Alpert S, Kang HI, Weissman I and Fox RI. Expression of granzyme A in salivary gland biopsies from patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1994;37(7):1046-54.
6. Fox PC, Grisius MM, Bermudez DK and Sun D. Cytokine mRNA expression in labial salivary glands and cytokine secretion in parotid saliva in Sjogren's syndrome. *Adv Exp Med Biol* 1998;438:909-15.
7. Bacman S, Sterin-Borda L, Camusso JJ, Arana R, Hubscher O and Borda E. Circulating antibodies against rat parotid gland M3 muscarinic receptors in primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 1996;104(3):454-9.
8. Tsubota K, Hirai S, King LS, Agre P and Ishida N. Defective cellular trafficking of lacrimal gland aquaporin-5 in Sjogren's syndrome. *Lancet* 2001;357(9257):688-9.
9. Kong L, Robinson CP, Peck AB, Vela-Roch N, Sakata KM, Dang H, Talal N and Humphreys-Beher MG. Inappropriate apoptosis of salivary and lacrimal gland epithelium of immunodeficient NOD-scid mice. *Clin Exp Rheumatol* 1998;16(6):675-81.
10. Yamachika S, Nanni JM, Nguyen KH, Garces L, Lowry JM, Robinson CP, Brayer J, Oxford GE, da Silveira A, Kerr M, Peck AB and Humphreys-Beher MG. Excessive synthesis of matrix metalloproteinases in exocrine tissues of NOD mouse models for Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 1998;25(12):2371-80.
11. Humphreys-Beher MG, Peck AB, Dang H and Talal N. The role of apoptosis in the initiation of the autoimmune response in Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 1999;116(3):383-7.
12. Anaya JM and Talal N. Sjogren's syndrome comes of age. *Semin Arthritis Rheum* 1999;28(6):355-9.
13. Goicovich E, Molina C, Pérez P, Aguilera S, Fernández J, Olea N, Alliende C, Leyton C, Romo R, Leyton L and González MJ. Enhanced degradation of proteins of the basal lamina and stroma by

- matrix metalloproteinases from the salivary glands of Sjogren's syndrome patients: correlation with reduced structural integrity of acini and ducts. *Arthritis Rheum* 2003;48(9):2573-84.
14. Pérez P, Goicovich E, Alliende C, Aguilera S, Leyton C, Molina C, Pinto R, Romo R, Martinez B and González MJ. Differential expression of matrix metalloproteinases in labial salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2000;43(12):2807-17.
 15. Pérez P, Urzúa U, Munroe D, Aguilera S, Y-J. K, Molina C, Alliende C, Leyton C and Gonzalez MJ. Transcriptional profile of the salivary gland epithelium in Sjogren's syndrome patients. In: Annual European Congress of Rheumatology, EULAR, 2005; Viena Austria. *Annals Rheumatic Diseases* 64: (S III) Frio 165, page 306, 2005.
 16. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. In. 4^a ed. ed. New York ; London: Garland; 2002.
 17. Stevenson BR and Keon BH. The tight junction: morphology to molecules. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998;14:89-109.
 18. Mitic LL and Anderson JM. Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol* 1998;60:121-42.
 19. González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P and Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 2003;81(1):1-44.
 20. Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M and Tsukita S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 1999;147(6):1351-63.
 21. Furuse M, Sasaki H and Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol* 1999;147(4):891-903.
 22. Mitic LL, Van Itallie CM and Anderson JM. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279(2):G250-4.
 23. Ruffer C and Gerke V. The C-terminal cytoplasmic tail of claudins 1 and 5 but not its PDZ-binding motif is required for apical localization at epithelial and endothelial tight junctions. *Eur J Cell Biol* 2004;83(4):135-44.
 24. Tsukita S and Furuse M. Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* 2000;149(1):13-6.
 25. Morin PJ. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res* 2005;65(21):9603-6.

26. Hand AR, Coleman R, Mazariegos MR, Lustmann J and Lotti LV. Endocytosis of proteins by salivary gland duct cells. *J Dent Res* 1987;66(2):412-9.
27. Furuse M, Furuse K, Sasaki H and Tsukita S. Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol* 2001;153(2):263-72.
28. Tsukita S, Furuse M and Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(4):285-93.
29. Hashizume A, Ueno T, Furuse M, Tsukita S, Nakanishi Y and Hieda Y. Expression patterns of claudin family of tight junction membrane proteins in developing mouse submandibular gland. *Dev Dyn* 2004;231(2):425-31.
30. Van Itallie C, Rahner C and Anderson JM. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* 2001;107(10):1319-27.
31. Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C and Anderson JM. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283(1):C142-7.
32. Colegio OR, Van Itallie C, Rahner C and Anderson JM. Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284(6):C1346-54.
33. Cereijido M, Robbins ES, Dolan WJ, Rotunno CA, and Sabatini DD. Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J Cell Biol* 1978;77(3):853-80.
34. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A and Tsukita S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 2002;156(6):1099-111.
35. Tokes AM, Kulka J, Paku S, Szik A, Paska C, Novak PK, Szilak L, Kiss A, Bogi K and Schaff Z. Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res* 2005;7(2):R296-305.
36. Resnick MB, Konkin T, Routhier J, Sabo E and Pricolo VE. Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Mod Pathol* 2005;18(4):511-8.
37. D'Souza T, Agarwal R and Morin PJ. Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 2005;280(28):26233-40.

38. Balda MS, Whitney JA, Flores C, Gonzalez S, Cerejido M and Matter K. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol* 1996;134(4):1031-49.
39. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T and Tsukita S. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 2000;11(12):4131-42.
40. Ghassemifar MR, Sheth B, Papenbrock T, Leese HJ, Houghton FD and Fleming TP. Occludin TM4(-): an isoform of the tight junction protein present in primates lacking the fourth transmembrane domain. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 15):3171-80.
41. Schneeberger EE and Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286(6):C1213-28.
42. Mankertz J, Waller JS, Hillenbrand B, Tavalali S, Florian P, Schoneberg T, Fromm M and Schulzke JD. Gene expression of the tight junction protein occludin includes differential splicing and alternative promoter usage. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298(5):657-66.
43. Gonzalez-Mariscal L, Namorado MC, Martin D, Luna J, Alarcon L, Islas S, Valencia L, Muriel P, Ponce L and Reyes JL. Tight junction proteins ZO-1, ZO-2, and occludin along isolated renal tubules. *Kidney Int* 2000;57(6):2386-402.
44. Fanning AS and Anderson JM. PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *J Clin Invest* 1999;103(6):767-72.
45. Tice LW, Carter RL and Cahill MC. Tracer and freeze fracture observations on developing tight junctions in fetal rat thyroid. *Tissue Cell* 1977;9(3):395-417.
46. Lechner F, Sahrbacher U, Suter T, Frei K, Brockhaus M, Koedel U and Fontana A. Antibodies to the junctional adhesion molecule cause disruption of endothelial cells and do not prevent leukocyte influx into the meninges after viral or bacterial infection. *J Infect Dis* 2000;182(3):978-82.
47. Carson SD and Chapman NM. Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) binds immunoglobulins. *Biochemistry* 2001;40(48):14324-9.
48. Ito M, Kodama M, Masuko M, Yamaura M, Fuse K, Uesugi Y, Hirono S, Okura Y, Kato K, Hotta Y, Honda T, Kuwano R and Aizawa Y. Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor in hearts of rats with experimental autoimmune myocarditis. *Circ Res* 2000;86(3):275-80.
49. Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh JT and Bergelson JM. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(26):15191-6.

50. Balda MS, Garrett MD and Matter K. The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol* 2003;160(3):423-32.
51. Gottardi CJ, Arpin M, Fanning AS and Louvard D. The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(20):10779-84.
52. Hoover KB, Liao SY and Bryant PJ. Loss of the tight junction MAGUK ZO-1 in breast cancer: relationship to glandular differentiation and loss of heterozygosity. *Am J Pathol* 1998;153(6):1767-73.
53. Arakawa Y, Kajino K, Kano S, Tobita H, Hayashi J, Yasen M, Moriyama M and Hino O. Transcription of dbpA, a Y box binding protein, is positively regulated by E2F1: implications in hepatocarcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322(1):297-302.
54. Traweger A, Fuchs R, Krizbai IA, Weiger TM, Bauer HC, and Bauer H. The tight junction protein ZO-2 localizes to the nucleus and interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein scaffold attachment factor-B. *J Biol Chem* 2003;278(4):2692-700.
55. Betanzos A, Huerta M, Lopez-Bayghen E, Azuara E, Amerena J and González-Mariscal L. The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Exp Cell Res* 2004;292(1):51-66.
56. Matter K and Balda MS. Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4(3):225-36.
57. Behrens J, Birchmeier W, Goodman SL and Imhof BA. Dissociation of Madin-Darby canine kidney epithelial cells by the monoclonal antibody anti-arc-1: mechanistic aspects and identification of the antigen as a component related to uvomorulin. *J Cell Biol* 1985;101(4):1307-15.
58. Nilsson M, Fagman H and Ericson LE. Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent regulation of the thyroid epithelial junction complex by protein kinases. *Exp Cell Res* 1996;225(1):1-11.
59. Citi S, Volberg T, Bershady AD, Denisenko N and Geiger B. Cytoskeletal involvement in the modulation of cell-cell junctions by the protein kinase inhibitor H-7. *J Cell Sci* 1994;107 (Pt 3):683-92.
60. Balda MS, González-Mariscal L, Contreras RG, Macias-Silva M, Torres-Marquez ME, Garcia-Sainz JA and Cerejido M. Assembly and sealing of tight junctions: possible participation of G-proteins, phospholipase C, protein kinase C and calmodulin. *J Membr Biol* 1991;122(3):193-202.
61. Mellor H and Parker PJ. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J* 1998;332 (Pt 2):281-92.
62. Benais-Pont GEA. Tight Junction. In: Anderson. *J CM*, editor.; 2001. p. 367-394.

63. Kroschewski R, Hall A and Mellman I. Cdc42 controls secretory and endocytic transport to the basolateral plasma membrane of MDCK cells. *Nat Cell Biol* 1999;1(1):8-13.
64. Hirose T, Izumi Y, Nagashima Y, Tamai-Nagai Y, Kurihara H, Sakai T, Suzuki Y, Yamanaka T, Suzuki A, Mizuno K and Ohno S. Involvement of ASIP/PAR-3 in the promotion of epithelial tight junction formation. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 12):2485-95.
65. Nunbhakdi-Craig V, Machleidt T, Ogris E, Bellotto D, White CL and Sontag E. Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex. *J Cell Biol* 2002;158(5):967-78.
66. Nusrat A, Giry M, Turner JR, Colgan SP, Parkos CA, Carnes D, Lemichez E, Boquet P and Madara JL. Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(23):10629-33.
67. Hirase T, Kawashima S, Wong EY, Ueyama T, Rikitake Y, Tsukita S, Yokoyama M and Staddon JM. Regulation of tight junction permeability and occludin phosphorylation by RhoA-p160ROCK-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 2001;276(13):10423-31.
68. Poritz LS, Garver KI, Tilberg AF and Koltun WA. Tumor necrosis factor alpha disrupts tight junction assembly. *J Surg Res* 2004;116(1):14-8.
69. Mankertz J, Tavalali S, Schmitz H, Mankertz A, Riecken EO, Fromm M and Schulzke JD. Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J Cell Sci* 2000;113 (Pt 11):2085-90.
70. Youakim A and Ahdieh M. Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *Am J Physiol* 1999;276(5 Pt 1):G1279-88.
71. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, Daniels TE, Fox PC, Fox RI, Kassan SS, Pillemer SR, Talal N and Weisman MH. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61(6):554-8.
72. Maniatis TFE and Sambrook J. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. In: New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1982.
73. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
74. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227.(5259.):680-5.

75. Towbin H, Staehelin T and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76(9):4350-4.
76. Siegel S. Estadística no paramétrica aplicada a ciencias de la conducta. In; 1972; 1972. p. 226-244.
77. Taucher E. Bioestadística. In: Universitaria E, editor. 2ª edición ed. Santiago; 1999. p. capítulo 17:145-50; 22: 215-22.
78. Pérez P, Kwon YJ, Alliende C, Leyton L, Aguilera S, Molina C, Labra C, Julio M, Leyton C and González MJ. Increased acinar damage of salivary glands of patients with Sjogren's syndrome is paralleled by simultaneous imbalance of matrix metalloproteinase 3/tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and matrix metalloproteinase 9/tissue inhibitor of metalloproteinases 1 ratios. *Arthritis Rheum* 2005;52(9):2751-60.
79. Honda H, Pazin MJ, Ji H, Wernyj RP and Morin PJ. Crucial roles of Sp1 and epigenetic modifications in the regulation of the CLDN4 promoter in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 2006;281(30):21433-44.
80. Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M and Tsukita S. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 10):1959-67.
81. Martinez-Estrada OM, Culleres A, Soriano FX, Peinado H, Bolos V, Martinez FO, Reina M, Cano A, Fabre M and Vilaro S. The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochem J* 2006;394(Pt 2):449-57.
82. Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y and Tsukita S. Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol* 1999;147(1):195-204.
83. Tanaka M, Kamata R and Sakai R. EphA2 phosphorylates the cytoplasmic tail of Claudin-4 and mediates paracellular permeability. *J Biol Chem* 2005;280(51):42375-82.
84. Inagaki-Ohara K, Sawaguchi A, Sukanuma T, Matsuzaki G and Nawa Y. Intraepithelial lymphocytes express junctional molecules in murine small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331(4):977-83.
85. Molina C, Alliende C, Aguilera S, Kwon YJ, Leyton L, Martinez B, Leyton C, Pérez P and González MJ. Basal lamina disorganisation of the acini and ducts of labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome: association with mononuclear cell infiltration. *Ann Rheum Dis* 2006;65(2):178-83.

86. Bojarski C, Weiske J, Schoneberg T, Schroder W, Mankertz J, Schulzke JD, Florian P, Fromm M, Tauber R and Huber O. The specific fates of tight junction proteins in apoptotic epithelial cells. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 10):2097-107.
87. Jimenez F, Alba-Masago S, Al Hashimi I, Vela-Roch N, Fernandes G, Yeh CK, Talal N and Dang H. Activated caspase 3 and cleaved poly(ADP-ribose)polymerase in salivary epithelium suggest a pathogenetic mechanism for Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41(3):338-42.
88. Andreeva AY, Krause E, Muller EC, Blasig IE and Utepbergenov DI. Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin. *J Biol Chem* 2001;276(42):38480-6.
89. Chen YH and Lu Q, Goodenough DA, Jeansonne B. Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2002;13(4):1227-37.
90. Kale G, Naren AP, Sheth P and Rao RK. Tyrosine phosphorylation of occludin attenuates its interactions with ZO-1, ZO-2, and ZO-3. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;302(2):324-9.
91. Zoukhri D, Hodges RR, Byon D and Kublin CL. Role of proinflammatory cytokines in the impaired lacrimation associated with autoimmune xerophthalmia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(5):1429-36.
92. Willott E, Balda MS, Heintzelman M, Jameson B and Anderson JM. Localization and differential expression of two isoforms of the tight junction protein ZO-1. *Am J Physiol* 1992;262(5 Pt 1):C1119-24.
93. Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA and Said HM. TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286(3):G367-76.
94. Peppi M and Ghabriel MN. Tissue-specific expression of the tight junction proteins claudins and occludin in the rat salivary glands. *J Anat* 2004;205(4):257-66.
95. Dobrosielski-Vergona K. Biology of the Salivary Glands. In: Dobrosielski-Vergona K, editor. 107-12. Pennsylvania: CRC Press; 1993.
96. Singh AB and Harris RC. Epidermal growth factor receptor activation differentially regulates claudin expression and enhances transepithelial resistance in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 2004;279(5):3543-52.
97. Gorgoulis V, Giatromanolaki A, Iliopoulos A, Kanavaros P, Aninos D, Ioakeimidis D, Kontomerkos T and Karameris A. EGF and EGF-r immunoexpression in Sjogren's syndrome secondary to rheumatoid arthritis. Correlation with EBV expression? *Clin Exp Rheumatol* 1993;11(6):623-7.

98. Alliende C, Ledesma A, Molina C, Aguilera S, González M-J. Cell Proliferation in salivary glands from syndrome de Sjögren patients. In: XVI Annual Meeting of International Association for Dental Research.; 2003 7 y 8 Noviembre; Santiago; 2003.
99. Islas S, Vega J, Ponce L and González-Mariscal L. Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Exp Cell Res* 2002;274(1):138-48.
100. Alroy I and Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 1997;410(1):83-6.
101. Balda MS and Matter K. The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *Embo J* 2000;19(9):2024-33.
102. Chiba H, Kojima T, Osanai M and Sawada N. The significance of interferon-gamma-triggered internalization of tight-junction proteins in inflammatory bowel disease. *Sci STKE* 2006; (316):pe1.