



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

***“Modulación de la unión estrecha por la quinurenina”***

TESIS

Que presenta

**Q.F.I. Cynthia Saraí Sánchez González**

Para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

En la especialidad de:

**FISIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

Directores de tesis:

Dr. Rubén Gerardo Contreras Patiño

Dr. Fanis Missirlis

Ciudad de México

Agosto, 2024

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (CONAHCyT No.1237590), en los laboratorios 3 y 37 en el departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV Unidad Zacatenco, bajo la dirección del Dr. Gerardo Contreras y el Dr. Fanis Missirlis

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres Raúl y Zeferina por amarme, cuidarme y guiarme en cada etapa de mi vida, por apoyarme y alentarme a seguir cada uno de mis sueños y convertirlos en logros por lo cual viviré eternamente agradecida con ustedes. A mi hermano Jesús por ser una figura de admiración para mí, por demostrarme el valor de la perseverancia y la disciplina.

Al Dr. Fanis Missirlis por haberme brindado la oportunidad de ser parte de su maravilloso equipo de trabajo a pesar del reto que eso representaba para el laboratorio, por el tiempo, las experiencias, las enseñanzas, la dedicación y las largas pláticas que compartimos con el objetivo de ser una mejor científica y persona. Así como por todo el apoyo brindado durante los momentos más duros de mi formación académica, estoy segura de que sin sus palabras y su guía no lo hubiera logrado, gracias por todo lo que me ha transmitido a lo largo de este tiempo, porque estoy segura de que muchas de sus enseñanzas me guiarán a lo largo de la vida no solo en lo profesional, sino también en lo personal.

Al Dr. Gerardo Contreras por la guía para la elaboración de esta tesis, por sus invaluable conocimientos y todos sus valiosos comentarios para hacer de mi una mejor estudiante.

A mis asesores la Dra. María Eugenia Mendoza y el Dr. Antony Boucard por su valioso tiempo para revisar y aportar sus preciados comentarios para la mejora del presente trabajo, además de compartir conmigo sus conocimientos invaluable durante mi trayectoria escolar por CINVESTAV.

A los integrantes del laboratorio 3 y 37 del DFBN del Cinvestav. En especial a la Dra. Catalina por todo el apoyo académico y personal que me ha ofrecido a lo largo de muchos años, por ser una excelente mentora y por todas aquellas enseñanzas que me ha transmitido desde mi formación como Q.F.I.

A mis amigos: José Eduardo, Arizbeth, Oscar, Ariadna y compañeros de laboratorio con los que he compartido tantas experiencias y he recibido tanto apoyo a lo largo de esta como de otras etapas de mi vida, han sido y serán una parte importante en mi vida.

# Índice

Índice .....	IV
Índice de figuras .....	VI
Lista de abreviaciones .....	VII
RESUMEN .....	X
ABSTRACT .....	XI
INTRODUCCIÓN .....	1
Epitelios .....	1
Uniones estrechas (UEs).....	2
Claudinas .....	4
El epitelio renal.....	6
Quinurenina (KYN).....	8
Uniones estrechas y células MDCK .....	9
KYN y células MDCK .....	10
Receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) .....	11
El AhR y las patologías.....	12
Quinurenina y AhR .....	13
AhR y UE.....	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	16
HIPÓTESIS .....	17
OBJETIVOS .....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
1. Cultivo celular y suspensión celular .....	18
2. Resistencia eléctrica transepitelial (RET) .....	18
3. Inmunofluorescencia.....	19
4. Ensayo de permeabilidad.....	20
5. Formación de uniones estrechas .....	21
6. Ensayo de migración celular .....	22
RESULTADOS .....	23
1) Efecto de la KYN sobre la RET de células MDCK.....	23
2) Distribución de proteínas de la UE en células MDCK expuestas a KYN .....	24

3) Efecto de la KYN sobre el flujo transepitelial de fitc-dextran de 3-5 KDa.....	25
4) Efecto de la KYN sobre la formación de la unión estrecha: medición de RET .....	27
5) Efecto de la KYN sobre la localización de cldn-2 y cldn-4 durante la formación de la unión estrecha.....	28
6) Efecto de la KYN sobre la migración celular.....	30
DISCUSIÓN.....	31
CONCLUSIÓN .....	35
REFERENCIAS.....	36

## Índice de figuras

Figura 1. Vías de transporte transepitelial en un epitelio renal.....	2
Figura 2. Composición de la Unión Estrecha (UE).....	4
Figura 3. Distribución de claudinas a lo largo del túbulo renal de mamíferos adultos.....	7
Figura 4. Degradación del triptófano a través de la ruta de la KYN.....	8
Figura 5. Regulación de claudinas -2 y 4 por EGF.....	10
Figura 6. Las células MDCK sintetizan KYN en condiciones fisiológicas y estimuladas. ....	11
Figura 7. Mecanismo de acción del AhR. ....	12
Figura 8. Sobre activación del receptor de hidrocarburos de arilo en diferentes modelos de lesión renal en roedor. ....	13
Figura 9. KYN promueve la expresión genes que contienen en sus promotores elementos responsivos a dioxina (DRE). ....	14
Figura 10. Efectos de FICZ y TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ sobre la expresión y localización de proteínas de unión estrecha in vitro en células Caco-2. ....	15
Figura 11. Hipótesis experimental. ....	16
Figura 12. Diagrama de medición de la RET de células MDCK en ausencia y presencia de KYN. ....	19
Figura 13. Ensayo de permeabilidad en células MDCK en presencia y ausencia de KYN y FITC-Dextran.....	21
Figura 14. Ensayo de formación de uniones estrechas de células MDCK sembradas en presencia y ausencia de KYN. ....	21
Figura 15. Ensayo de migración celular en células MDCK sembradas en presencia y ausencia de KYN. ....	22
Figura 16. Efecto de la KYN sobre la RET de monocapas de células MDCK. ....	24
Figura 17. KYN modifica el patrón de expresión de las claudinas en células MDCK.....	25
Figura 18. Efecto de la KYN en el flujo de FITC-Dextran 3-5 kDa en monocapas de células MDCK..	27
Figura 19. Efecto de la KYN sobre la RET de monocapas en desarrollo de células MDCK. ....	28
Figura 20. KYN modifica el patrón de expresión de las claudinas en células MDCK durante la formación de la unión estrecha. ....	29
Figura 21. Efecto de la KYN en la migración celular.....	31

## Lista de abreviaciones

- °C: grados Celcius
- 3HAA: ácido 3-hidroxiantranílico
- 3HK:3-hidroxiquinurenina
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- AhR: receptor de hidrocarburos de arilo
- AHRE: elemento de respuesta a AhR
- AhRR: represor del receptor de aril hidrocarburo
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero
- ARNT: translocador nuclear del receptor de aril hidrocarburos
- ATCC: American type culture collection
- Ca<sup>2+</sup>: ion calcio
- CaCl<sub>2</sub>: cloruro de calcio
- cldn-2: claudina-2
- cldn-4: claudina-4
- cm<sup>2</sup>: centímetros cuadrados
- CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono
- C-terminal: grupo carboxilo terminal
- DMEM: medio esencial mínimo Eagle
- DRE: elemento de respuesta a dioxinas
- DSS: dextran sulfato de sodio
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
- EGF: factor de crecimiento epidérmico
- EEM: error estándar de la media
- EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico
- eNOS: enzima óxido nítrico sintasa
- ERC: enfermedad renal crónica
- FICZ: 6-formilindolo [3,2- *b*]carbazol
- h: horas

- HAH: hidrocarburos aromáticos halogenados,
- HAP: hidrocarburos aromáticos policíclicos
- HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil) etanosulfónico,
- Hsp90: Proteína de choque térmico 90
- IDO: indoleamina dioxigenasa
- IFN- $\gamma$ : interferón gamma
- JAM: moléculas de membrana asociadas a la unión
- KMO: enzima quinurenina 3-monooxigenasa
- KYN: quinurenina
- KynA: ácido quinurénico
- KYNA: ácido quinurénico neuroprotector
- KYNU: enzima quinureninasa
- LAT: transportador de aminoácidos neutros
- LRA: lesión renal aguda
- MAGI: guanilato cinasa asociada a membrana invertida
- MAGUK: membrane associated guanylate kinase
- MDCK: células de riñón canino Madin-Darby
- ml: mililitros
- mm: milímetros
- mM: millimolar
- NaCl: cloruro de sodio
- NAD<sup>+</sup>: dinucleótido de nicotinamida y adenina
- Na-Piruvato: sodio piruvato
- nM: Nanomolar
- N-terminal: grupo amino terminal
- PBS: tampón fosfato salino
- QA: ácido quinolínico
- QUINA: el ácido quinolínico
- RET: resistencia eléctrica transepitelial

- SBF: suero bovino fetal
- STAT: transductor de señal y activador de transcripción
- TAMP: proteínas asociadas a la unión estrecha
- TCDD: 2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina
- TDO2: enzima triptófano 2,3-dioxigenasa
- TF: factor tisular
- TGF- $\beta$ 1: factor de crecimiento transformante
- TM1, 2, 3 y 4: alfa-hélices transmembranales
- TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral
- TRP: triptófano
- U/ml: unidades por mililitro
- UE: uniones estrechas
- W-GLW-C-C: secuencia de aminoácidos Triptófano-Glicina-Leucina-Triptófano-Cisteína-Cisteína
- XAP: proteína 2 asociada a X
- ZO-1,2 y 3: zónula ocludens-1, -2 y -3
- $\mu$ l: microlitros
- $\mu$ m: micrómetros
- $\mu$ M: micromolar
- $\Omega$ .cm<sup>2</sup>: ohms por centímetro cuadrado

## RESUMEN

Las uniones estrechas (UEs) son estructuras dinámicas que modulan la formación de una barrera epitelial selectiva que separa medio interno y externo de los organismos. Se ha demostrado que varias sustancias, entre ellas el Factor de Crecimiento Epidérmico o el esteroide cardiotónico ouabaína, modulan la permeabilidad de la barrera epitelial a través de sus efectos sobre las TJ. La quinurenina (KYN) es un metabolito del catabolismo del triptófano que promueve la movilización del Receptor de Aril Hidrocarburos (AhR) al núcleo. En células Caco-2, se demostró que la activación del AhR contribuye a la reparación de las UEs tras un estímulo inflamatorio. Por otro lado, se cree que la activación de AhR en modelos murinos de enfermedad renal crónica tiene un efecto protector frente al daño epitelial. En este proyecto evaluamos el efecto del agonista endógeno del AhR, KYN, en la formación y mantenimiento de las UEs en células de riñón canino Madin-Darby (MDCK). Se observó que la aplicación de 10  $\mu$ M de KYN en cultivos confluentes de células MDCK aumenta la Resistencia Eléctrica Transepitelial (RET) del cultivo de 3,0 a 7,5 horas después de la administración, cuya posible explicación de este efecto es la disminución de la presencia del componente de la UE Claudina-2 permeable a los cationes. Además, el tratamiento con KYN no modificó la permeabilidad paracelular del cultivo confluyente MDCK a las macromoléculas. Además, observamos retrasos en la formación de la UEs en cultivos subconfluyentes tratados con KYN, asociados a una menor localización de Claudina-2 y -4 en la UE. Por lo que se propone que los cambios fisiológicos en la concentración de KYN podrían afectar a la permeabilidad de la barrera epitelial.

## **ABSTRACT**

Tight junctions (TJs) are dynamic structures that enable the formation of a selective epithelial barrier separating interior from exterior in bodies or organs. Several substances, including the protein ligand epidermal growth factor or the cardiotonic steroid ouabain, have been shown to modulate epithelial barrier permeabilities through their effects on TJs. Kynurenine (KYN) is a metabolite of tryptophan catabolism that promotes the mobilization of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) to nucleus. In Caco-2 cells, it was demonstrated that AhR activation contributes to the repair of TJs following an inflammatory stimulus. On the other hand, AhR activation in murine models of chronic kidney disease is thought to have a protective effect against epithelial damage. In this project we evaluated the effect of the endogenous agonist of the AhR, KYN, in the formation and maintenance of the TJs in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. We found that application of 10  $\mu$ M KYN in confluent cultures of MDCK cells increased the transepithelial electrical resistance (TER) of the culture from 3.0 to 7.5 hours post-administration and found that a possible explanation for this effect is through decreased presence of cation-permeable TJ component Claudin-2. Indeed, the KYN treatment did not modify the paracellular permeability of the MDCK confluent culture to macromolecules. Furthermore, we showed delays in the formation of TJs in sub-confluent cultures treated with KYN, associated with decreased localization of Claudin-2 and -4 in the TJ. Thus, we propose that physiological changes in KYN concentration could potentially affect epithelial barrier permeability.

# INTRODUCCIÓN

## Epitelios

Los epitelios son los tejidos que recubren el cuerpo, las cavidades y los ductos de los animales superiores. A su vez, los animales superiores intercambian materia y energía con el medio y se protegen de microorganismos patógenos, toxinas, traumas y de la evaporación de agua interna. Los epitelios se forman de una o varias capas de células epiteliales que exhiben dos propiedades fundamentales: se unen entre sí y al substrato con *uniones intercelulares* y *uniones a la matriz extracelular*, incluyendo las *uniones estrechas* (UE) (Farquhar y Palade, 1963), y se polarizan (Ussing, 1951), lo que significa que la membrana plasmática de las células epiteliales se divide en los dominios *apical*, *lateral* y *basal*, cada uno con estructura y composición específica (Cereijido *et al.*, 2004).

Esta adhesión y polarización tan peculiar, confiere a los epitelios su capacidad de transportar sustancias vectorialmente y, por lo tanto, de generar y mantener la composición específica de los fluidos que bañan las cavidades corporales.

El transporte vectorial se realiza a través de dos vías: *la transcelular* y *la paracelular* (Claude y Goodenough, 1973; Claude 1978; Cereijido *et al.*, 1989; Cereijido *et al.*, 1993). En la primera, las sustancias atraviesan la membrana plasmática y el citoplasma por medio de canales, transportadores, acarreadores o bombas distribuidos polarizadamente; en la segunda, las sustancias cruzan a través del espacio intercelular y la UE (Figura 1, Tang y Goodenough, 2003).

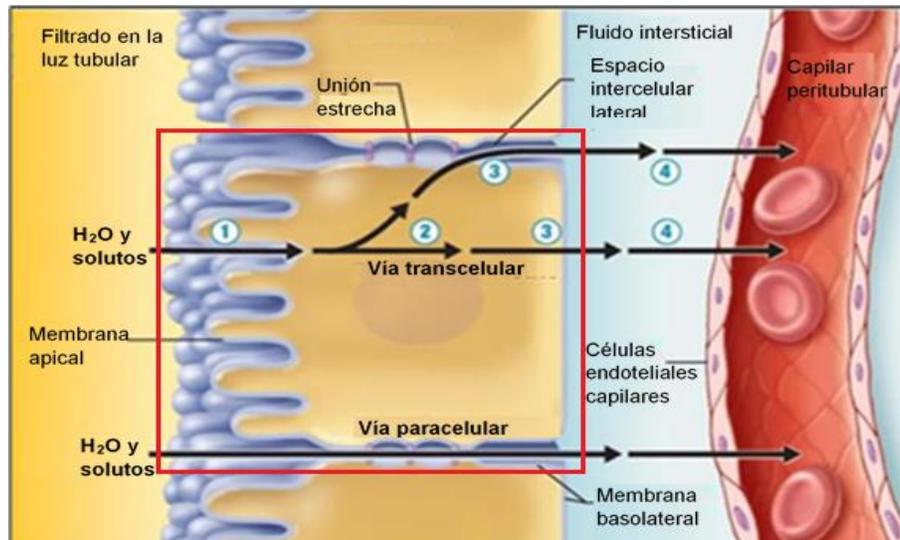


Figura 1. Vías de transporte transepitelial en un epitelio renal. La célula epitelial renal (recuadro rojo) está polarizada pues su membrana plasmática se divide en los dominios *apical* orientado hacia la luz del túbulo renal, *lateral* que contacta a células vecinas y *basal*, unido al substrato. Las células vecinas se contactan con uniones intercelulares, entre las que destaca la unión estrecha (UE). Una sustancia determinada puede ser transportada a través de la vía paracelular, formada por la UE y el espacio intercelular, o la transcelular (1-4), usando canales, bombas y acarreadores expresados polarizadamente (figura tomada de Cavila, 2019).

## Uniones estrechas (UEs)

Las UEs rodean a las células en forma de cinturón, se localizan en los contactos intercelulares en la región más apical de las células epiteliales, limitando el dominio apical del lateral y sellando el espacio intercelular (Farquhar *et al.*, 1963) y convierten al epitelio en una barrera contra la difusión libre, lo que se ilustra cuando los trazadores extracelulares paracelulares, como las sales de lantano y la peroxidasa de rábano, se detienen justo al nivel de la UE (Resse y Karnovsky, 1967).

Las UEs funcionan como una **compuerta** que permite el transporte paracelular de iones y agua (Claude y Goodenough, 1973; Diamond, 1977; Mandel *et al.*, 1993), y como una **cerca** que restringe la difusión lateral de los componentes específicos de los dominios apicales y laterales (Dragsten *et al.*, 1981; Spiegel *et al.*, 1985; van Meer y Simons, 1986).

Los componentes moleculares de la UE incluyen lípidos resistentes a la extracción con detergentes (Nusrat *et al.*, 2000, Calderón *et al.*, 1998), proteínas periféricas

como las de la familia MAGUK (por sus siglas en inglés Membrane Associated Guanylate Kinase) denominadas zónula ocludens-1, -2 y -3 (ZO-1,2 y 3; Stevenson *et al.*, 1986; Gumbiner *et al.*, 1991, Haskins *et al.*, 1998) y la cingulina, una proteína semejante a la miosina (Citi *et al.*, 1988), entre otras (González-Mariscal *et al.*, 2012), así como diversas proteínas de membrana que incluyen a las que contienen el dominio MARVEL asociadas a UE (TAMP: ocludina, trichelulina y MarvelD3; Steed *et al.*, 2014), moléculas de adhesión de unión con un solo dominio transmembranal (JAM; Martín-Padura *et al.*, 1998) y las claudinas (Furuse *et al.*, 1998).

Las UEs de vertebrados existen en dos variantes: las *bicelulares*, que se forman entre dos células vecinas y se observan, mediante microscopía electrónica de transmisión, como uno o varios puntos de fusión entre células vecinas (Farquhar y Palade, 1963) y en criofracturas, como una red de filamentos que se entrecruzan (Staehelin *et al.*, 1969) y las *trichelulares*, formadas en la frontera de la unión de tres células y aun cuando tienen aspecto ultramicroscópico similar se alargan a profundidades mayores que las bicelulares e invaden la membrana lateral (Staehelin *et al.*, 1969; Ikenouchi *et al.*, 2005).

Las UEs también suelen denominarse uniones ocluidoras en referencia a la propiedad de barrera descrita arriba, calificación que también incluye a las uniones septadas de animales inferiores como insectos, moluscos, gusanos y equinodermos, si bien éstas tienen una ultraestructura y composición molecular distintas (Furuse y Izumi, 2017). Evolutivamente, las uniones ocluidoras son características de los metazoarios y parecen surgir como una adaptación a la multicelularidad y la compartimentalización (Cereijido *et al.*, 2004).

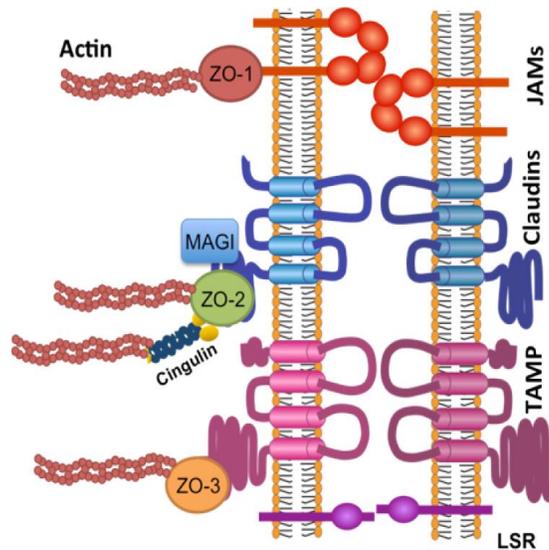


Figura 2. Composición de la Unión Estrecha (UE). Se esquematiza el punto donde dos células vecinas se unen. Las proteínas transmembranales que componen a la UE: **claudinas**, en color azul; **proteínas asociadas a la unión estrecha** (TAMP, guinda); **moléculas de membrana asociadas a la unión** (JAM) en naranja. Las proteínas periféricas: **guanilato cinasa asociada a membrana invertida** (MAGI) en azul, las **zónula occludens** en rojo, verde y naranja (ZO-1, ZO-2 y ZO-3 respectivamente), el citoesqueleto de actina en rojo y cingulina en azul marino (González-Mariscal *et al.*, 2012).

## Claudinas

La familia de las claudinas, en la mayoría de los mamíferos, consta de 27 proteínas integrales con cuatro dominios transmembranales, dos asas citosólicas, dos extracelulares y la secuencia W-GLW-C-C característica (Furuse *et al.*, 1988; Van Itallie *et al.*, 2006). Los grupos amino (N-terminal) y carboxilo terminal (C-terminal) son citoplasmáticos. El dominio C-terminal, puede ser fosforilado en residuos de serina y/o treonina, lo que regula la interacción con otras proteínas, la localización y la vida media de las claudinas (Van Itallie *et al.*, 2004).

La proteína de cuatro pasos transmembranales de Euglena, IP39, juega un papel importante en el movimiento ondulatorio característico de éste protista fotosintético. Además, IP39 es miembro de superfamilia PMP22/EMP/MP20/Claudin, junto con las claudinas. Estos hechos sugieren que las claudinas surgieron de un ancestro similar IP39, importante para el movimiento (Suzuki *et al.*, 2013).

Las claudinas se palmitoilan en su segunda asa intracelular, modificación que es importante para que se localicen en la UE (Van Itallie *et al.*, 2005).

Las claudinas son el constituyente principal de los filamentos de la UE que se observan en imágenes obtenidas por criofractura y Microscopía electrónica (Morita *et al.*, 1999; Morita *et al.*, 1999), también forman los canales paracelulares que transportan los iones y el agua (Simon *et al.*, 1999).

Según la estructura cristalina de la claudina-15 truncada en su carboxilo terminal, las alfa-hélices transmembranales (TM1, 2, 3 y 4) son ricas en aminoácidos de cadenas laterales cortas, como la glicina y la alanina y forman un grupo compacto; las TM1,2 y 4 son cortas, mientras que la TM3 es excepcionalmente larga y sobresale al medio extracelular. Los dos segmentos extracelulares confirman una cadena  $\beta$ -plegada extracelular, en su mayor parte y se estabilizan con un puente disulfuro (Suzuki *et al.*, 2015).

Por su función en el transporte paracelular, algunas claudinas se refieren como claudinas de *barrera*, pues impiden el transporte paracelular de un ión en particular; por ejemplo, la claudina-4 es una barrera al sodio; otras claudinas se denominadas de *poro*, ya que forman los canales paracelulares de transporte para iones; por ejemplo, la claudina-2 forma los poros paracelulares para sodio (Amashe *et al.*, 2002; Muto *et al.*, 2010), mientras que la -16 los forma para calcio y magnesio (Simon *et al.*, 1999).

Las claudinas se expresan de forma diferencial en el espacio y el tiempo durante el desarrollo; por ejemplo, la claudina-6 es típica de etapas embrionarias y su expresión en el humano joven o adulto, se relaciona con el desarrollo de cáncer de ovario lo que la ha convertido en un blanco terapéutico efectivo para combatir esta enfermedad (Reinhart *et al.*, 2020). Por otro lado, cuando hay defectos en la expresión de estas proteínas, se altera la permeabilidad iónica y la selectividad de la unión estrecha, produciéndose efectos que dependen del tipo de claudina alterada. Así, la deficiencia en la expresión de las claudina-16 y -19 conduce a la eliminación del calcio y el magnesio en la orina y la formación de cálculos renales, nefritis y cicatrización o fibrosis en los riñones, así como defectos en la visión (Simon

*et al.*, 1999); la de claudina-11, que normalmente se expresa en las células de Leydig testiculares y en la vaina de mielina de los nervios, provoca baja fertilidad y conducción nerviosa lenta (Morita *et al.*, 1999); la eliminación genética de la claudina-1, provoca deshidratación a través de la piel y muerte de ratones en 24 h (Furuse *et al.*, 2002) y la de claudina-2, produce natriuresis con un alto consumo de sal (Muto *et al.*, 2010). Por lo tanto, la cantidad y el tipo de claudinas en las UEs determinan la permeabilidad y selectividad de la vía paracelular.

## **El epitelio renal**

Desde hace tiempo se conoce que la permeabilidad paracelular disminuye según se progresa a lo largo de la nefrona por diversas causas, incluyendo la expresión de UEs cada vez más complejas, la disminución de la longitud de la ruta paracelular, la expresión de membranas con dominios laterales cada vez más rectos y la expresión diferencial de claudinas (Claude y Goodenough, 1973; Claude *et al.*, 1978; Cereijido *et al.*, 1989; Cereijido *et al.*, 1993).

Una técnica experimental que permite conocer el grado de sellado de la unión estrecha es la medición de la resistencia eléctrica transepitelial (RET); un epitelio puede representarse como un circuito de dos resistencias en paralelo: una correspondiente al transporte transcelular con valores en el orden de giga  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  y la otra al paracelular, es decir, a la UE, con valores en el orden de decenas a centenas de  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ . Entre más pequeño es el flujo transepitelial de iones, mayor es la RET. Puesto que la corriente eléctrica tiende a fluir por la vía de menor resistencia, la medición de la RET refleja, fundamentalmente, la permeabilidad de la UE.

Mientras en el túbulo contorneado proximal las células epiteliales exhiben una RET de  $10 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , las del túbulo contorneado distal tienen  $400 \Omega \cdot \text{cm}^2$  y las de la vejiga alcanzan hasta  $10000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Estas diferencias concuerdan con la necesidad de regular la eliminación de los iones y el agua con la expresión diferenciada de claudinas de los organismos (Figura 3). En los segmentos proximales de la nefrona existe con un alto transporte paracelular, la expresión de claudinas permeables a cationes como claudina-2,-10,-11 y exhiben una RET baja, mientras que, en las

secciones distales, la RET es elevada, con baja permeabilidad y una alta expresión de claudina-4,-7 y -8 que funcionan como barreras catiónicas (González-Mariscal *et al.*, 2003; Kahle *et al.*, 2004, Muto *et al.*, 2010).

El sistema renal ilustra la adaptación de las UEs a las necesidades fisiológicas, los retos farmacológicos, condiciones patológicas, estado diferenciación y las condiciones del medio interno. Entender los mecanismos que controlan estas adaptaciones es de importancia primordial y, en muchos casos, dichos mecanismos involucran a mensajeros químicos endógenos que regulan o modulan la permeabilidad renal y en específico la UE. Múltiples moléculas del medio interno modifican la expresión de las proteínas de las UEs, como el EGF o la ouabaína (Flores-Benítez *et al.*, 2007; Larre *et al.*, 2010). En este proyecto se propone a la quinurenina (KYN) como un modulador de la expresión de las proteínas de la unión estrecha.

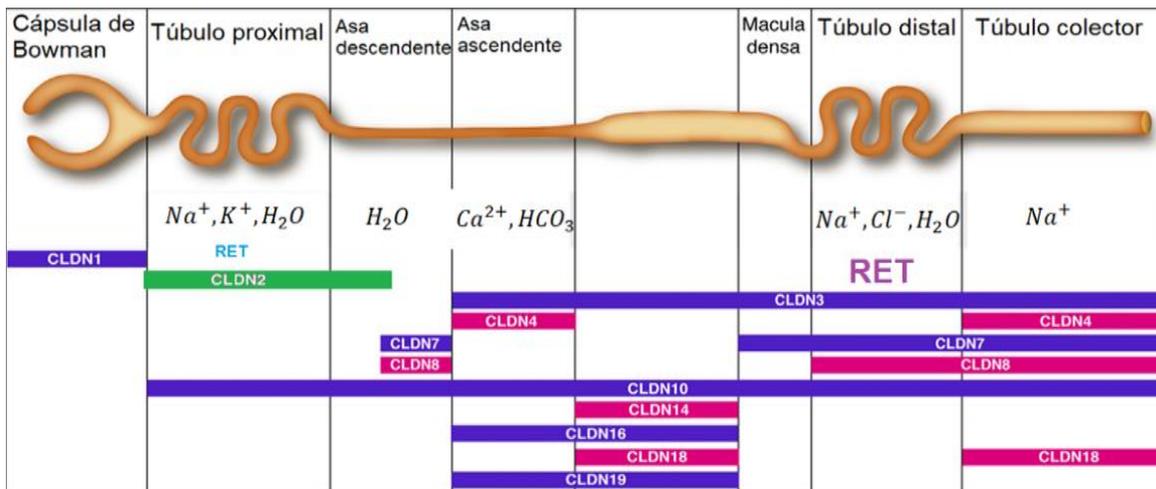


Figura 3. Distribución de claudinas a lo largo del túbulo renal de mamíferos adultos. En verde se visualiza la claudina-2, se localiza en el túbulo proximal donde la resistencia eléctrica transepitelial (RET) es baja. En el túbulo distal y colector la RET es alta. Los rectángulos en color morado indican claudinas impermeables mientras que los de color rosa indican claudinas permeables a ciertos iones y agua (Yu, 2014).

## Quinurenina (KYN)

La KYN es un catabolito del triptófano (TRP), producido en múltiples tipos celulares como los hepatocitos, células del sistema inmune, sistema nervioso y células renales. En condiciones fisiológicas, se convierte, sucesivamente, en 3-hidroxiquinurenina (3HK), ácido 3-hidroxi-antranílico (3HAA), ácido quinolínico (QA) y, finalmente, NAD<sup>+</sup>. Una cantidad apreciable de KYN se convierte también en ácido quinurénico por una vía lateral (KynA, Figura 4).

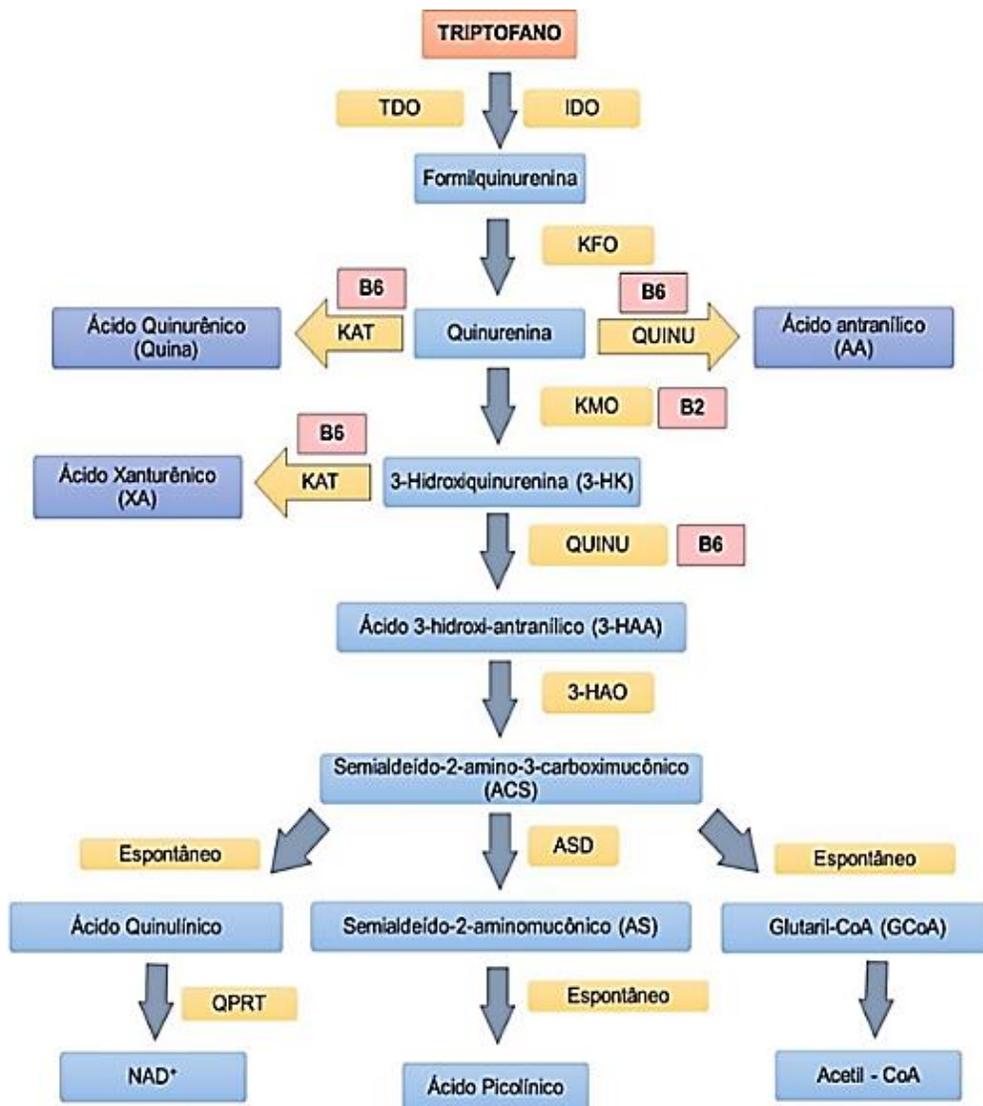


Figura 4. Degradación del triptófano a través de la ruta de la KYN. Se muestran en azul los productos resultantes de cada reacción enzimática, en amarillo las enzimas y en rojo los cofactores de las enzimas correspondientes (Carvalho *et al.*, 2017).

La KYN se transporta a través del transportador de aminoácidos neutros independientes de sodio (LAT) tipo 1 (LAT1), que se expresa en los tejidos nervioso, renal del túbulo proximal e intestinal (Fukui *et al.*, 1991; Bauch *et al.*, 2003).

Los catabolitos del triptófano regulan diversas funciones fisiológicas, por ejemplo, el KynA regula la respuesta inmune como agonista del AhR que induce la liberación de citocinas en los macrófagos (Opitz *et al.*, 2011).

### **Uniones estrechas y células MDCK**

Las células de Madin-Darby renales de perro (MDCK, por sus siglas en inglés) son un modelo ampliamente utilizado para estudiar los epitelios, desarrolla polaridad apico-basolateral y uniones celulares bien definidas (Cerejido *et al.*, 1978; Dukes *et al.*, 2011).

Diversos metabolitos modulan las uniones estrechas. Gallardo *et al.*, (2002) demostraron que la aplicación de un extracto de orina de perro al compartimento que baña la cara basolateral de células MDCK cultivadas sobre bastidores, aumenta la hermeticidad de la UE de una manera dependiente de la dosis, sin modificar la densidad celular ni el número de UEs en las células.

Posteriormente Flores-Benítez *et al.*, (2007) identificaron el componente activo del extracto de orina de perro, que resultó ser el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), pues anticuerpos contra este factor o contra su receptor, impiden que el extracto aumente la RET. Además, estos autores demostraron que el EGF disminuye el contenido de claudina-2 y aumenta el contenido de claudina-4 en las UEs.

García-Hernández *et al.*, (2015) demostraron que el EGF disminuye la cantidad de ARNm y la proteína de la claudina-2, a través de una vía de señalización intracelular que involucra la activación de las cinasas Src y ERK 1/2, así como la del factor de transcripción STAT3 que, ya activo, se translocan al núcleo. Los autores propusieron que el EGF disminuye la cantidad de ARNm de claudina-2 por que

STAT3 inhibe la transcripción de este gen al asociarse al promotor de dicha proteína (Figura 5).

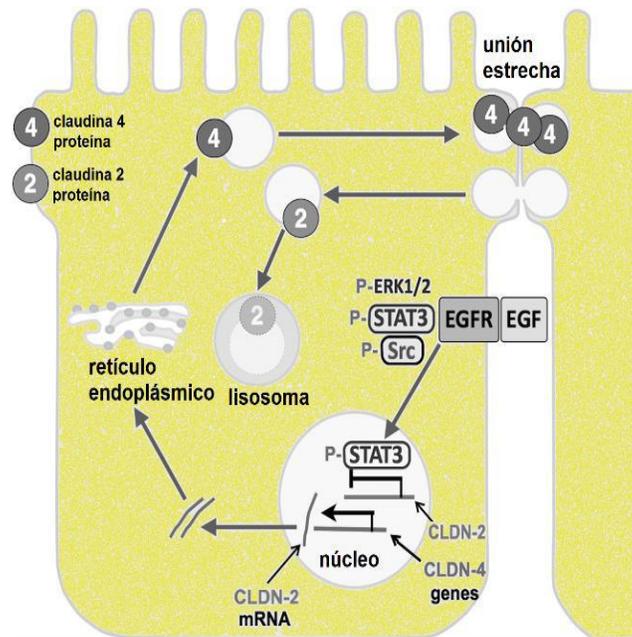


Figura 5. Regulación de claudinas -2 y 4 por EGF. EGF promueve la expresión de claudina-4 y disminuye la de claudina-2 por medio de la activación de la cascada de señalización que culmina con la translocación de STAT 3 al núcleo (García Hernández *et.al.*, 2015).

## KYN y células MDCK

Las células MDCK sintetizan KYN en condiciones basales, ya que la intensidad de fluorescencia de la Indoleamina dioxigenasa (IDO), enzima limitante para la formación de KYN en el riñón, aumenta cuando las células se estimulan con el factor de necrosis tumoral TGF- $\beta$ 1. Además, independientemente del estímulo, las MDCK liberan de forma basal una cantidad apreciable de KYN al medio, que no aumenta con el TGF- $\beta$ 1 (Figura 6, Matheus *et al.*, 2017).

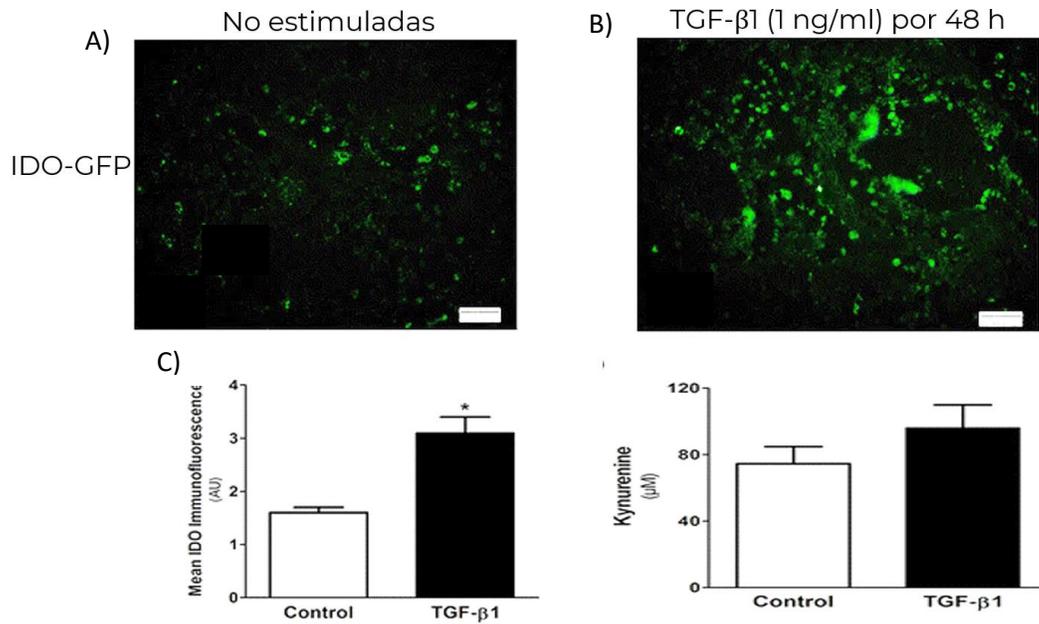


Figura 6. Las células MDCK sintetizan KYN en condiciones fisiológicas y estimuladas. Inmunofluorescencia para IDO de: A) células no estimuladas, B) Células estimuladas con TGF-β 1 (1 ng/ml) durante 48 h. C) Cuantificación de la fluorescencia y de las concentraciones de KYN, respectivamente. \* $p < 0,05$  frente al control (Matheus *et al.*, 2017).

## Receptor de hidrocarburos de arilo (AhR)

El AhR es un factor de transcripción activado por ligandos, tanto exógenos como endógenos, que regula la expresión de múltiples genes dependiendo de la naturaleza química del ligando.

El AhR inactivo se localiza en el citoplasma unido a chaperonas. Cuando se une su ligando, el AhR se libera y se transporta al núcleo, donde se heterodimeriza con el translocador nuclear del receptor de aril hidrocarburo (ARNT). El dímero AhR/ARNT se une al ADN en elementos de respuesta a AhR conocidos como elementos de respuesta a dioxinas (AHRE, 5'-GCGTG-3' o DRE) y regulan la expresión de genes como los citocromos P450: CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, el represor del receptor de aril hidrocarburo (AhRR), y las enzimas indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO2), quinureninasa (KYNU) y quinurenina 3-monooxigenasa (KMO), que son enzimas que regulan la síntesis de la KYN (Figura 7, Neavin *et al.*, 2018)

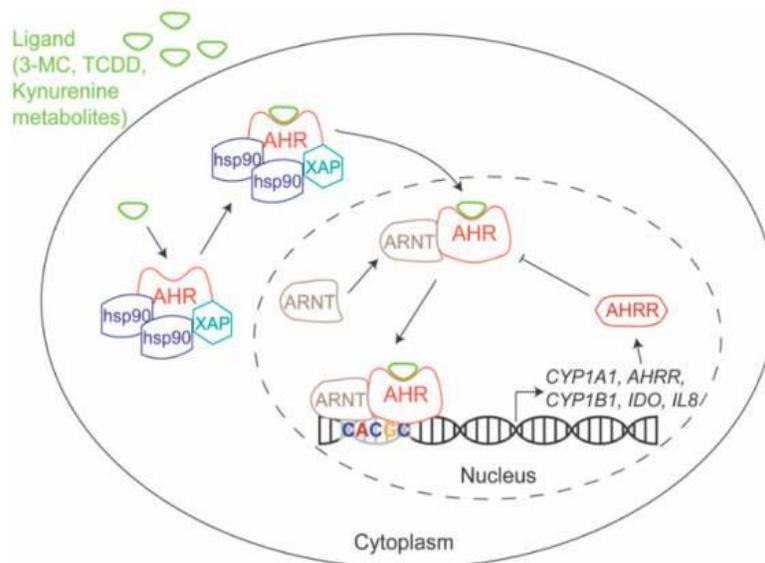


Figura 7. Mecanismo de acción del AhR. AhR se localiza en el citoplasma unido a las chaperonas Hsp90 y XAP. Después de la unión del ligando, se libera y se transporta al núcleo, donde se heterodimeriza con ARNT y se une al ADN (a menudo uniéndose a AHRE (5'-CACGC-3')) y regula la expresión génica. Las flechas muestran la secuencia de eventos que incluye interacción, transporte, unión al ADN, expresión génica y traducción del ARN. AhR: receptor de aril hidrocarburo; AHRE: elemento de respuesta AhR; AhRR: represor AHR; ARNT: translocador nuclear del receptor de aril hidrocarburos; Hsp90: proteína de choque térmico 90; XAP: proteína 2 asociada a X (Neavin *et al.*, 2018).

## El AhR y las patologías

La enfermedad renal crónica (ERC) afecta aproximadamente al 10% de la población adulta en todo el mundo y se caracteriza por la retención en la sangre de ciertos metabolitos, denominados solutos o toxinas urémicas, que pueden permanecer ahí incluso después de la hemodiálisis. Estos compuestos activan al factor tisular (TF) en las células endoteliales y vasculares del músculo liso, provocando efectos profibróticos y proinflamatorios en el tejido cardíaco y toxicidad en la microglía.

La vía del AhR podría mediar los efectos de las toxinas urémicas. En ratones transgénicos que expresan a la  $\beta$ -galactosidasa bajo el control del promotor de AHR, sometidos a lesión por administración de sulfato de indoxilo, la alimentación con adenina en el agua, procedimientos que representan la ERC, o sometidos a un protocolo de isquemia/reperfusión, procedimiento modelo de la lesión renal aguda (LRA), aumentan la  $\beta$ -galactosidasa en los túbulos renales proximales y distales, los

miocitos cardíacos, los hepatocitos y la microvasculatura en la corteza cerebral. El aumento persiste aun cuando el sulfato de indoxilo y el nitrógeno urémico en sangre disminuyen. Así, los resultados muestran una relación entre la activación de AhR en diversos tejidos de ratones con ERC o LRA (Figura 8, Walker *et al.*, 2020).

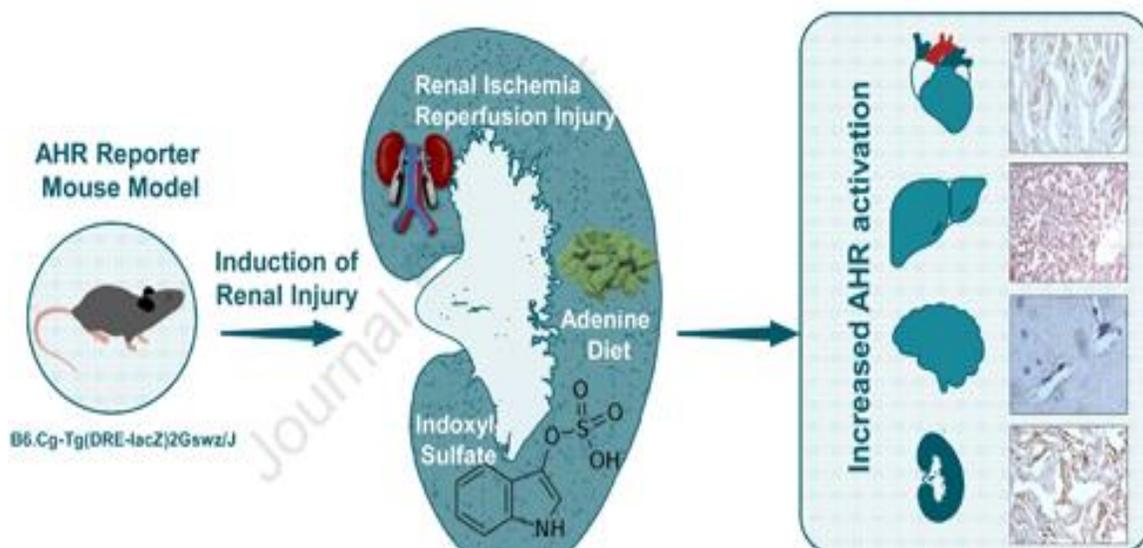


Figura 8. Sobre activación del receptor de hidrocarburos de arilo en diferentes modelos de lesión renal en roedor. Se indujo lesión renal por los métodos de: isquemia/reperfusión, adenona o indoxil sulfato. Se observó una sobreactivación del AhR en corazón, hígado, cerebro y riñón (Walker *et al.*, 2020).

## Quinurenina y AhR

La investigación de los graves efectos tóxicos y carcinogénicos de la dioxina llevaron al descubrimiento del AhR. Ahora se sabe que múltiples ligandos, estructuralmente distintos, también activan al AhR. Por ejemplo, el 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD), los hidrocarburos aromáticos halogenados relacionados (HAH) o los aromáticos policíclicos (HAP), el 6-formilindolo [3,2-*b*] carbazol (FICZ) y, un producto de L-triptófano, la L-quinurenina (L-KYN, Denison *et al.*, 2002; Soshilov *et al.*, 2008). La L-KYN es un ligando endógeno para el AhR, que regula la diferenciación de las células T (Mezrich *et al.*, 2010). Este metabolito se utiliza como sustrato para la síntesis de muchos otros ligandos como el ácido quinurénico neuroprotector (KYNA) o el ácido quinolínico neurotóxico (QUINA, Macchiarulo *et al.*, 2009).



En células de cáncer intestinal humano Caco-2, el tratamiento con 20 ng/ml de TNF- $\alpha$  más 10 ng/ml de IFN- $\gamma$  durante 48 h, disminuye significativamente la RET y la cantidad de ocludina, ZO-1 y claudina-1 en las UEs, procesos que pueden bloquearse si en el medio está presente el FICZ (Figura 10, Yu *et al.*, 2018).

Las evidencias anteriores, demuestran que la activación del AhR por un agonista tiene un efecto protector contra el daño epitelial. Estos resultados sugieren que, si la KYN activa al AhR, podría entonces mantener el estado sellado o acelerar el desarrollo de las UEs.

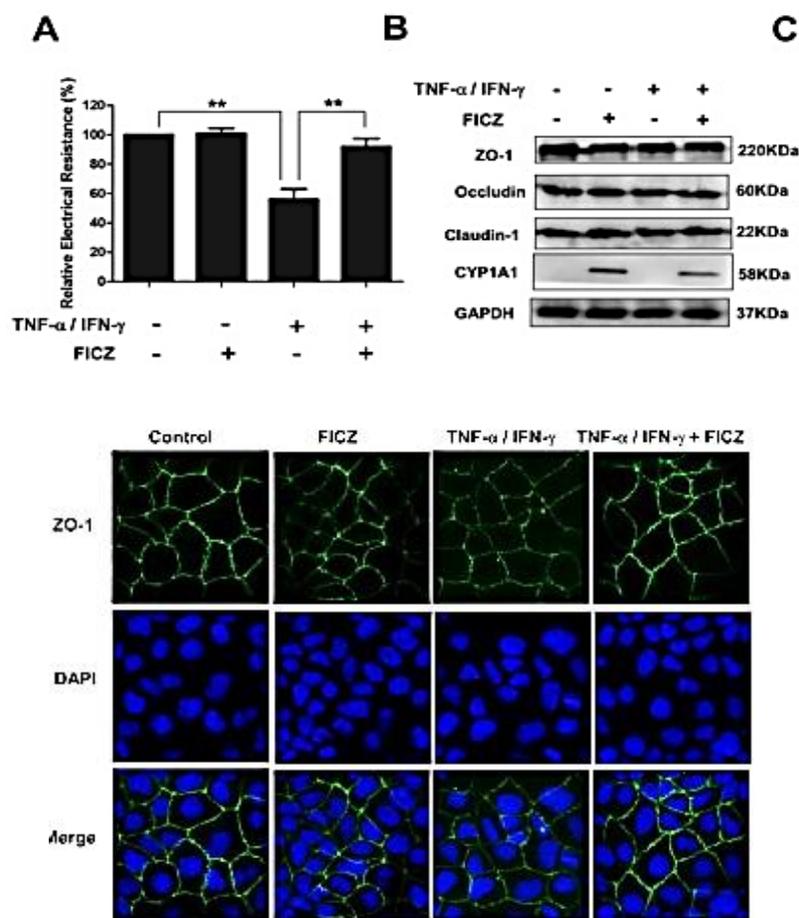


Figura 10. Efectos de FICZ y TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  sobre la expresión y localización de proteínas de unión estrecha in vitro en células Caco-2. A) RET de células tratadas con FICZ o TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  o ambos. Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar (n = 3). \*\*P<0,01. B) Western Blot que muestran la concentración de proteínas de la UE. C) Localización subcelular de proteínas de la UE mediante tinción por inmunofluorescencia (Yu *et al.*, 2018).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La activación del AhR impide la caída de la resistencia eléctrica transepitelial en epitelios dañados por citocinas proinflamatorias, toxinas urémicas o isquemia. Esto pone en evidencia que la activación del AhR participa en procesos de reparación del epitelio. Sin embargo, no se ha investigado si la KYN, un agonista endógeno del receptor de hidrocarburo de arilo, participa en los procesos de mantenimiento y formación de las UE en células MDCK.

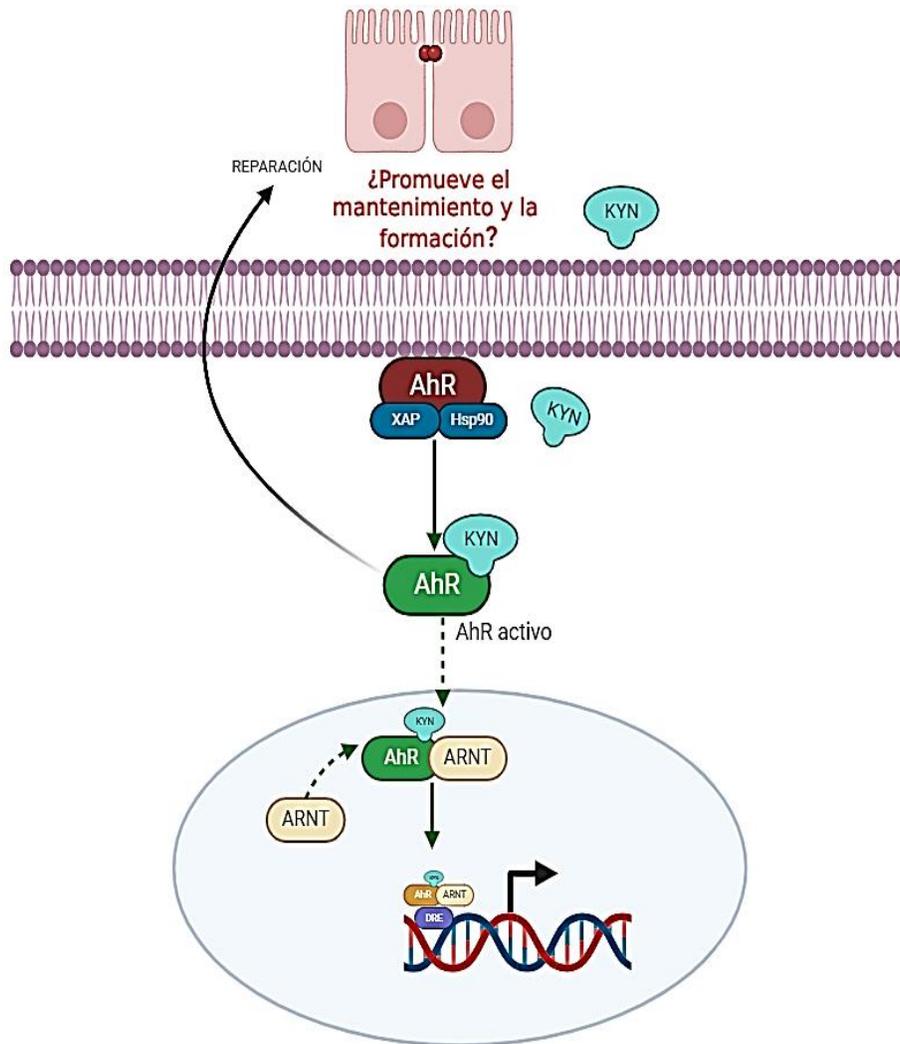


Figura 11. Hipótesis experimental. La KYN modula la unión estrecha en los procesos de mantenimiento y formación de esta a través del receptor de hidrocarburos de arilo.

## HIPÓTESIS

La quinurenina promueve la formación y el mantenimiento de la unión estrecha.

## OBJETIVOS

- GENERAL:
  - Elucidar si la KYN promueve la formación y/o el mantenimiento de la unión estrecha en células MDCK.
  
- PARTICULARES:
  - Elucidar si la KYN, en monocapas maduras de células MDCK:
    - Modifica la RET.
    - Altera la localización de las cldn-2 y -4 en la unión estrecha.
    - Varía el flujo transepitelial de FITC-Dextran 3-5 kDa.
    - Modula la migración celular tras la lesión de la monocapa.
  - Evaluar si la KYN, en monocapas de células MDCK subconfluentes:
    - Modifica el desarrollo de la RET.
    - Altera la localización de las cldn-2 y -4 en la unión estrecha.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Cultivo celular y suspensión celular

Células MDCK, obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC), se clonaron y cultivaron hasta el pase 15, las cuales se seleccionaron por su resistencia eléctrica estable y su respuesta ante factores como el EGF, las cuales se incubaron a 37°C, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% con medio DMEM alto en glucosa (GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, CA, 12800082) suplementado con suero bovino fetal (10371-029, Life Technologies) al 10% y 100 U/ml de penicilina y estreptomina, (10371-029, Life Technologies). A este medio se le denomina en adelante CDMEM.

Las células se expanden a partir de monocapas maduras de MDCK que se lavan tres veces con una solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS) sin calcio, (10051163), se incuban 20 minutos con 1.0 ml de tripsina-EDTA (etilendiaminotetraacetato de sodio, In vitro, 190846) a 37°C para disociar las células. La suspensión celular se diluye en 5 ml CDMEM. De esta suspensión celular se tomaron células  $2.25 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> para sembrar en los insertos o en las cajas de cultivo que se utilizaron en los experimentos posteriores. Se agregaron a 150 µl medio CDMEM en el compartimentó apical del bastidor (en contacto con la cara apical de las células) y 800 µl en el pozo de la multicámara (que baña la cara basolateral de las células).

## 2. Resistencia eléctrica transepitelial (RET)

Las células MDCK se sembraron a confluencia en bastidores de superficie permeable (policarbonato, tamaño de poro de 3.0 µm, diámetro de 6.5 mm, área de 0.33 cm<sup>2</sup>, Transwell 3415, marca Corning Costar) colocados en multicámaras de 24 pozos. Se agregaron 150 µl de medio DMEM complementado en el inserto (cara apical de las células) y 800 µl en el pozo (cara basolateral de las células). Las células se incubaron durante 48 horas como se indica arriba. Posteriormente se cambió el medio de cultivo a DMEM

con SBF al 1% y se incubaron por 18 horas adicionales. Pasado este tiempo, se agregaron los tratamientos de KYN (K8625-1G Sigma) a concentraciones de 0, 0.5, 1, 2, 4 y 10  $\mu\text{M}$  tanto por la cara apical como basolateral.

Se evaluó la RET con un medidor de voltímetro epitelial (EVOM2), equipado con las cámaras EndOhm-6, en condiciones de esterilidad, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (World Precision Instruments, Sarasota) en función del tiempo.

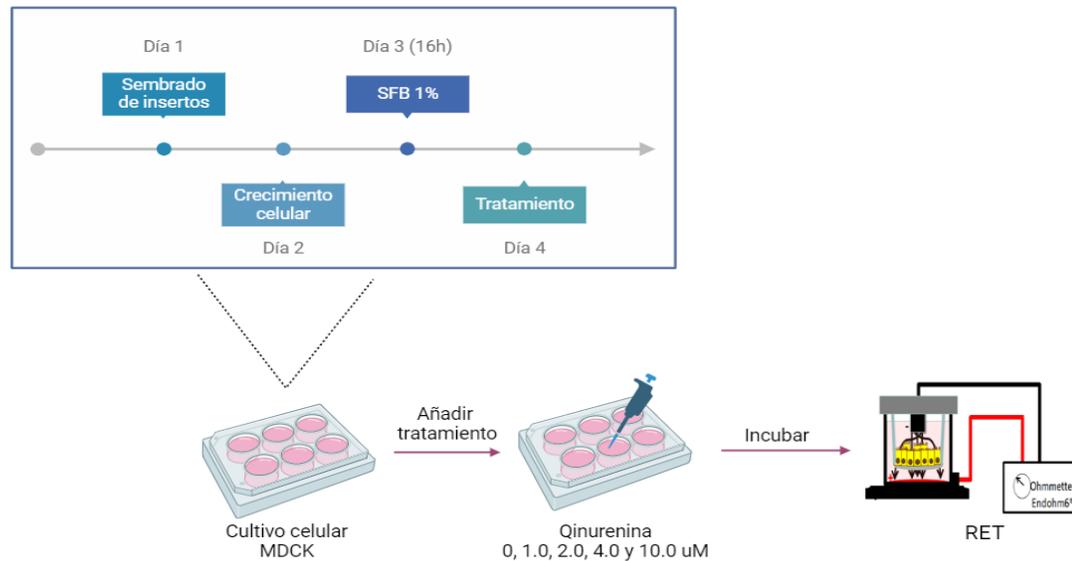


Figura 12. Diagrama de medición de la RET de células MDCK en ausencia y presencia de KYN.

### 3. Inmunofluorescencia

Las células MDCK tratadas con KYN en función de la concentración y el tiempo, luego de medir la RET, se lavaron tres veces con PBS con  $\text{Ca}^{2+}$  a 4°C. Posteriormente, se fijaron 3 min con metanol a -20 °C. Luego, los bastidores con las células se lavaron como se indica arriba y se incubaron 30 min, a temperatura ambiente, con solución de bloqueo que contenía 50 mM glicina, 0.05% Tween 20, 0.1% Tritón X-100 y SBF 2% (ASE). En seguida, a la cámara apical de los bastidores se les agregaron 50  $\mu\text{l}$  de solución con el anticuerpo anti claudina-2 1:1000 (100  $\mu\text{g/ml}$ ; Santa Cruz 516100) y anti

claudina-4 1:1000 (100 ug/ml; Santa Cruz 329400) disueltos en solución ASE, durante 18 h a 37°C en incubadora húmeda. Luego los bastidores se lavan nuevamente de la manera descrita y se incuban con la solución de los anticuerpos secundarios (Alexa Fluor 594 cabra anti-conejo, 100 ug/ml, A-21428; Alexa Fluor 488 cabra anti-ratón, 100 ug/ml, catálogo A31620), se incubo durante 60 min a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente se lavaron 3 veces de la manera usual y 2 veces con agua desionizada para posteriormente cortar el filtro del bastidor y montarlo entre cubre y portaobjetos, utilizando una gota de Vectashield® (Vector Laboratories, Inc., CA, USA). Los bordes expuestos del cubreobjetos se sellaron con barniz de uñas (Flores-Maldonado *et al.*, 2020). Las muestras se observaron con un microscopio confocal láser (SP8, Leica Microsystems) usando un objetivo planapocromatico con apertura numérica de 1.4. Las imágenes obtenidas se procesaron con el software Fiji (Image J).

#### **4. Ensayo de permeabilidad**

Las células MDCK crecidas sobre bastidores permeables y tratadas 3 h con KYN 10  $\mu$ M, se lavaron 2 veces con buffer P que contenía (mM): 145 NaCl, 10 HEPES (pH 7.4), 1.0 Na-Piruvato, 10 glucosa y 3 CaCl<sub>2</sub>, con la finalidad de retirar el medio DMEM residual de los insertos.

Para medir el flujo del dextrán fluorescente se administraron 200  $\mu$ l una solución de Dextran de 3-5 kDa, marcado con fluoresceína, a una concentración de 10  $\mu$ g/ml (60842-46-8, SIGMA, ALDRICH), en la cara apical, con o sin KYN. En el compartimento basolateral, se agregaron 1000  $\mu$ l de buffer P, con o sin KYN. Se incubaron las células durante 2 horas adicionales y se recolectó el medio del dominio basolateral y se congeló protegido de la luz para, posteriormente, medir la cantidad de dextran-fluoresceinado en un fluorometro (excitación 492 nm y emisión 520 nm, marca PTI QM-8075-21, se adquirieron lecturas durante 200 segundos), comparando contra una curva de calibración.

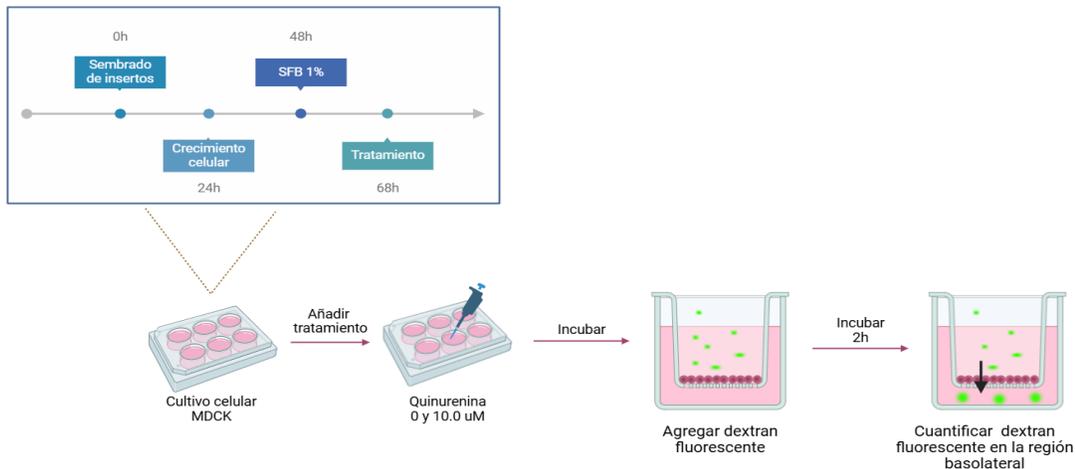


Figura 13. Ensayo de permeabilidad en células MDCK en presencia y ausencia de KYN y FITC-Dextran.

## 5. Formación de uniones estrechas

Las células MDCK se sembraron a confluencia en los bastidores de la manera ya mencionada. Las células se incubaron en presencia o ausencia de KYN 10  $\mu$ M desde el momento de sembrarlas. Se evaluó la RET en función del tiempo con un medidor de voltios ohmios epiteliales (EVOM2) y sistema EndOhm-6 en condiciones de esterilidad, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (World Precision Instruments, Sarasota) a diferentes periodos de tiempo hasta 96 horas.

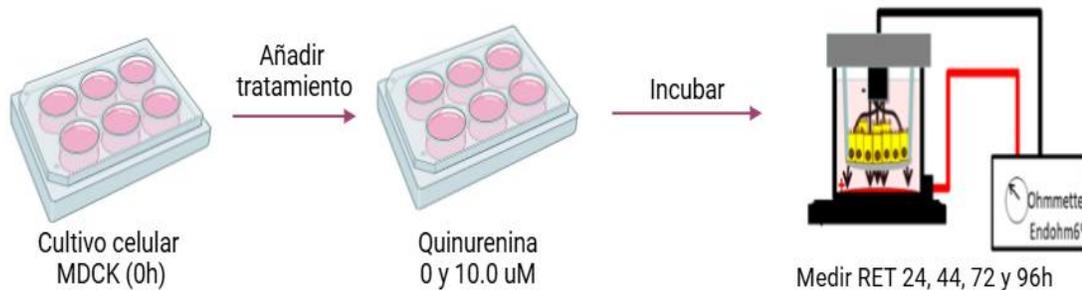


Figura 14. Ensayo de formación de uniones estrechas de células MDCK sembradas en presencia y ausencia de KYN.

## 6. Ensayo de migración celular

Las células MDCK se sembraron a confluencia en cajas de cultivo (área de 9 cm<sup>2</sup>, marca Corning Costar; 430165) y se incubaron en medio CDMEM durante 24 h. Posteriormente las células se transfirieron a DMEM con SBF al 1% y se incubaron por 18 horas adicionales, procedimiento que inhibe la proliferación celular. En seguida, las células se lavaron con PBS sin Ca<sup>2+</sup> y se practicaron las heridas con ayuda de una punta de micropipeta gris y se lavaron con medio DMEM con SBF al 1%. 30 min después, las monocapas se fotografiaron en un microscopio invertido usando un objetivo Zeiss (10x, 1.0 de apertura numérica) en modo de contraste de fase. Una vez obtenidas las fotografías se agregó KYN a una concentración de 10 µM y se incubaron las células durante 5 horas para tomar las fotografías finales y realizar el análisis de la distancia migrada para cada grupo experimental. Las fotografías se analizaron trazando líneas paralelas en 10 puntos distintos de la imagen al tiempo 0 y a las 5 horas posteriores (mismo campo de análisis), delimitando los bordes de las heridas, se obtuvo el promedio de la distancia migrada restando la distancia del tiempo final al tiempo inicial.

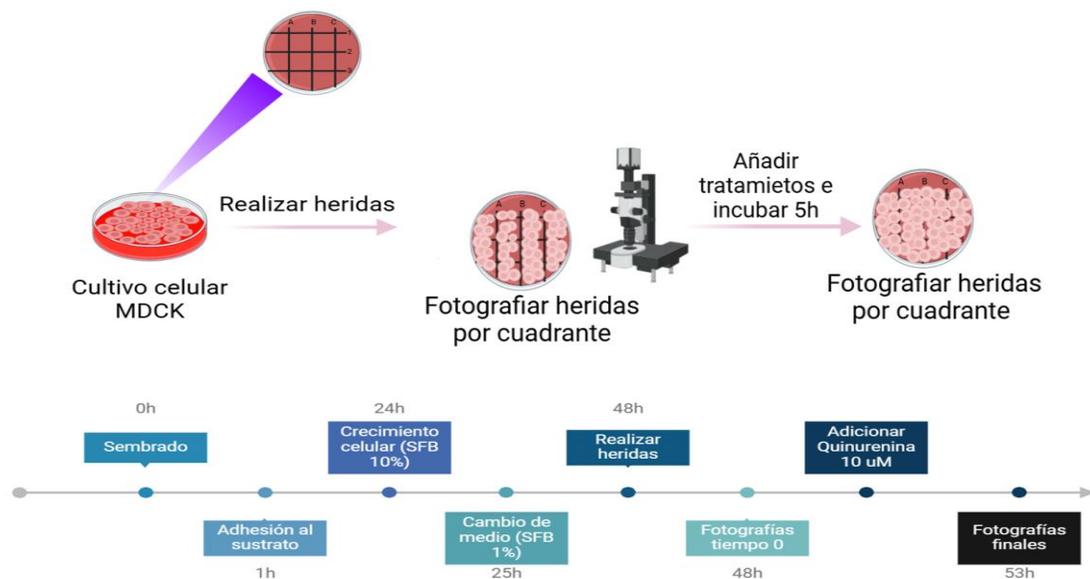


Figura 15. Ensayo de migración celular en células MDCK sembradas en presencia y ausencia de KYN.

## RESULTADOS

### 1) Efecto de la KYN sobre la RET de células MDCK

Primero investigamos si la KYN modifica el grado de sellado de las UE de monocapas maduras de células MDCK sembradas sobre bastidores. Se administró KYN en el tiempo 0 h, a concentraciones de 0, 1, 2, 4 y 10  $\mu\text{M}$  (Figura 16), tanto por la cara apical como basolateral y se midió la RET. Las concentraciones mencionadas se definieron considerando que, en diversos tejidos o fluidos biológicos, la concentración de KYN varía entre 0.5 a 10  $\mu\text{M}$ . Por ejemplo, el plasma contiene, en condiciones normales,  $2 \pm 0.5 \mu\text{M}$  de KYN (Badawy y Guillemin, 2019).

Se observa que, tanto en el grupo control (línea verde, 0  $\mu\text{M}$ ) como en los grupos experimentales expuestos a 1, 2 y 4  $\mu\text{M}$  de KYN, la RET se aumenta continuamente con valores indistinguibles del control. Sin embargo, el grupo incubado con KYN 10  $\mu\text{M}$  muestra un aumento significativo y transitorio de la RET desde la hora 3 hasta la 7.5.

Los cambios en la RET generalmente se deben a un cambio en la composición molecular de la UE, particularmente a un cambio en la expresión de las claudinas. La RET puede aumentar como resultado de que la UE expresa más cantidad de claudinas de barrera, como claudina-4, a que expresa menos claudinas de poro como la claudina-2 o a ambos fenómenos. Para explorar esta posibilidad observamos la distribución de las proteínas de la UE en las células mediante inmunofluorescencias de las claudinas -2 y -4.

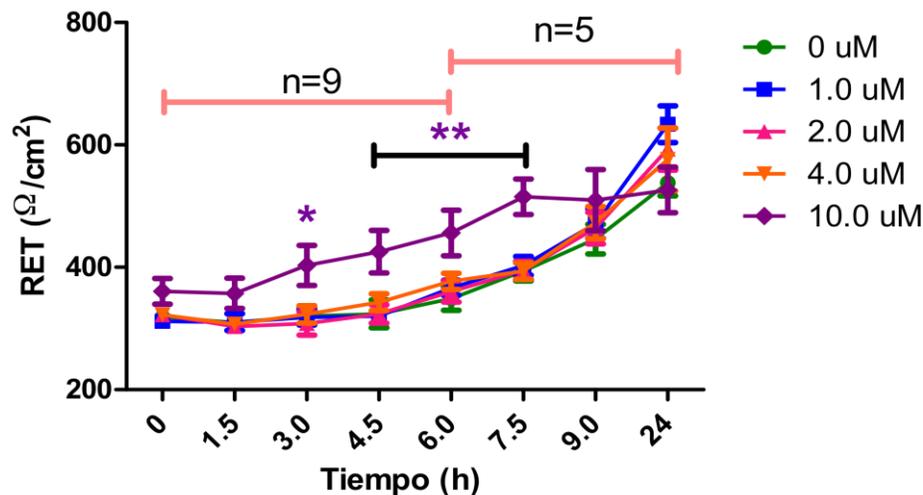


Figura 16. Efecto de la KYN sobre la RET de monocapas de células MDCK. **0 μM (círculos y línea verde)** = Células MDCK sin exposición a KYN **1.0, 2.0, 4.0 y 10.0 μM (círculos y líneas azules, rosas, naranjas y morados, respectivamente)** = células MDCK expuestas a KYN a las concentraciones indicadas. Se muestra la media con su error estándar (EEM), n=9 para todos los grupos experimentales hasta las 6 horas de exposición, n=5 para los grupos correspondientes a 7.5 a 24 horas de tratamiento. ANOVA bifactorial *a priori* y Bonferroni *a posteriori*. Los asteriscos representan diferencias significativas entre el grupo tratado con KYN y su respectivo grupo control. \*P<0.05, \*\* P<0.01.

## 2) Distribución de proteínas de la UE en células MDCK expuestas a KYN

La figura 17 muestra inmunofluorescencias de células en condiciones control (CTL) o expuestas a KYN 10 μM durante 7.5 h. En condiciones control, la claudina-4 (verde) se expresa en las zonas de contacto entre células vecinas, conformando el patrón semejante a una malla de gallinero. El mismo patrón de distribución la exhibe la claudina-2 (rojo). Como ya se ha descrito y se observa en la superposición de imágenes (Merge; Nusrat *et al.*, 2000; García-Hernández *et al.*, 2015), estas claudinas tienden a excluirse: las células que expresan más claudina-4, tienen menos claudina-2 y viceversa. La KYN no altera ni la distribución ni la cantidad de la claudina-4, sin embargo, claramente reduce el número de células que expresan claudina-2. Es necesario confirmar la disminución midiendo la cantidad de estas claudinas por electroforesis, inmunotransferencia e inmunodetección.

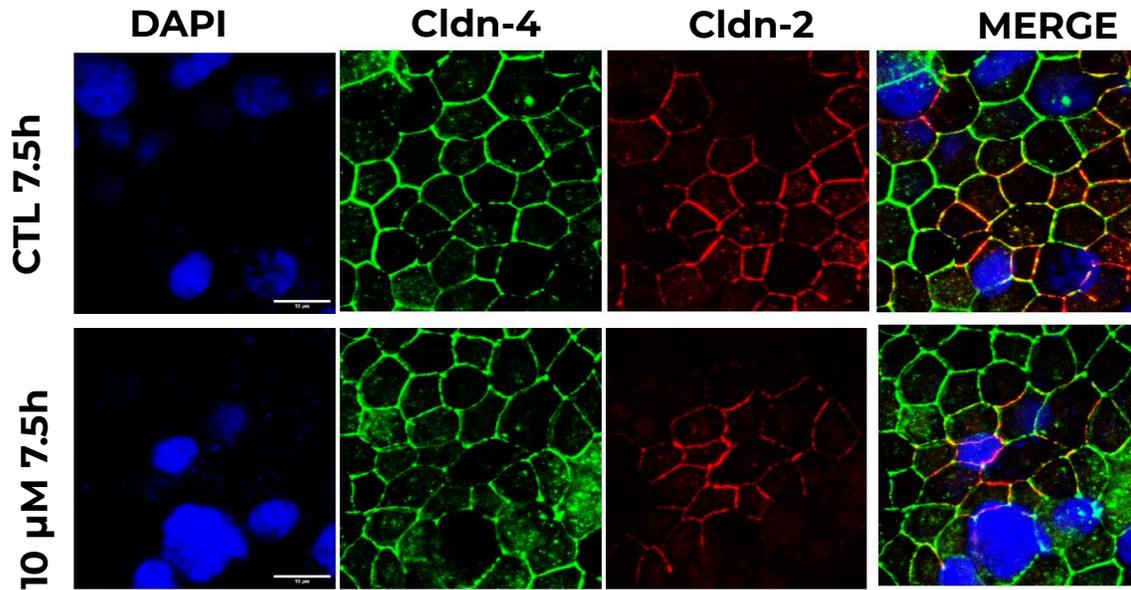


Figura 17. KYN modifica el patrón de expresión de las claudinas en células MDCK. Las células MDCK se cultivaron sin o con 10.0  $\mu\text{M}$  de KYN (apical y basolateral) durante 7.5 horas. En verde se muestra a la Cldn-4, en rojo a Cldn-2 y en azul los núcleos.

La evidencia anterior parece apuntar a que los cambios en la RET observados en la figura 16, podrían deberse a la disminución de claudina-2, una claudina que forma poros permeables al sodio y agua.

Es importante mencionar que un aumento de RET no se corresponde necesariamente con una disminución con la permeabilidad paracelular (ver en la discusión, Cereijido *et al.*, 2009). Así que, para investigar si la KYN modifica la permeabilidad paracelular es necesario medir el flujo de un trazador paracelular.

### 3) Efecto de la KYN sobre el flujo transepitelial de fitc-dextran de 3-5 KDa

A las monocapas maduras de células MDCK, cultivadas en condiciones control o con KYN 10  $\mu\text{M}$  por la cara apical y basolateral, durante 5 horas sobre bastidores permeables, se les midió el flujo paracelular de FITC-Dextran 3 a 5 kDa, aplicándolo en el compartimento apical del bastidor para

incubar durante 2h, y colectando, entonces, del medio del compartimento basolateral para medir el FITC-Dextran en un espectrofluorómetro.

El ensayo de permeabilidad paracelular es un indicador de la cantidad de una macromolécula que fluye de un compartimento a otro a través de la ruta paracelular en un periodo de tiempo determinado, en este caso, 2, La medición de la RET, en cambio sensa el flujo de iones provocado por la aplicación de un pulso de corriente en un instante. Cabe esperar que, al aumentar la RET, disminuya el flujo paracelular de iones, comportamiento que se extiende, erróneamente, a las moléculas no cargadas como el dextran. Aunque pudiera haber casos en los que esto se cumpla, con frecuencia, los flujos paracelulares de iones y moléculas no cargadas están disociados; así, las células MDCK que sobreexpresan una ocludina mutante que tiene truncado su carboxilo terminal, aumentan su RET y flujo paracelular de dextrán (Balda *et al.*, 1996) como lo hacen también las incubadas con EGF (Flores-Benitez *et al.* 2007).

En la figura 18 se muestra que el flujo de FITC-dextran 3-5 kDa no cambia en las células tratadas con KYN 10  $\mu$ M durante 5 h, comparadas con las monocapas controles. Así, la KYN provoca un cambio en la RET sin alterar la permeabilidad paracelular a moléculas no cargadas de alto peso molecular, indicando que el cambio que produce en la UE es fundamentalmente sobre el transporte de iones, principalmente el sodio. Este cambio concuerda con la disminución de la claudina-2 mostrada antes. Se conoce que las células MDCK que expresan una ocludina mutante que tiene truncado su carboxilo terminal, no cambian su RET, pero si aumentan el flujo paracelular de dextrán fluoresceinado (Balda *et al.*, 1996) pues son mecanismos diferentes.

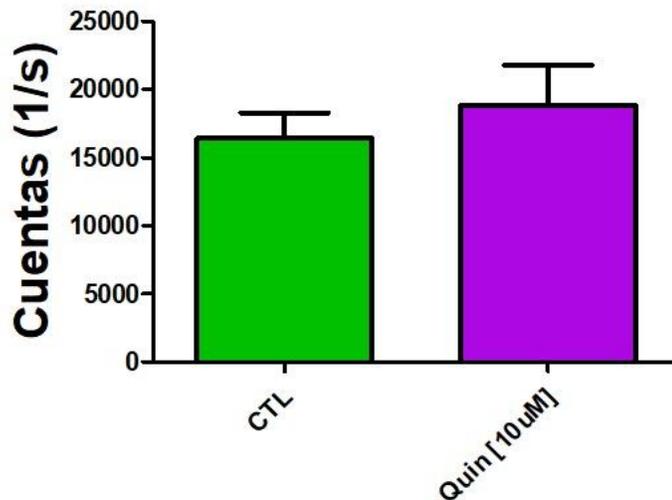


Figura 18. Efecto de la KYN en el flujo de FITC-Dextran 3-5 kDa en monocapas de células MDCK. Las células MDCK fueron administradas con KYN 10  $\mu$ M por 5h (apical y basolateral) y FITC-Dextran durante 2 horas. Se muestra la intensidad de fluorescencia del medio recolectado del dominio basolateral pasadas 2 horas de la administración con FITC-Dextran 3-5 kDa. En verde se muestra el grupo control y en morado el grupo administrado con KYN 10  $\mu$ M. Se muestra media y EEM, n=3 para todos los grupos experimentales Mann Whitney.

#### 4) Efecto de la KYN sobre la formación de la unión estrecha: medición de RET

En seguida investigamos si la KYN controla la formación de la UE. Para ello sembramos células MDCK a confluencia sobre bastidores en CDMEM. Medimos la RET de la manera usual en función del tiempo. La figura 19 muestra que las células control, desarrollan paulatinamente su RET, tal como está reportado, alcanzando un pico a las 44 h (Cerejido *et al.*, 1978). La KYN 10  $\mu$ M provoca dos efectos estadísticamente significativos: por un lado retrasa el desarrollo de la RET en un 63 % a las 44 h, por otro, incrementa la RET un 20% a las 96 h de tratamiento, cuando las monocapas expresan uniones con valores de RET estables. Estos resultados sugieren que la KYN retrasa la formación de la UE, pero en concordancia con su papel protector frente al daño epitelial, mantiene más selladas a las UE maduras. Cabe esperar que la KYN disminuya la claudina-4 o aumente para provocar la inhibición de la RET observada a las 44 h. A continuación, investigamos esta posibilidad.

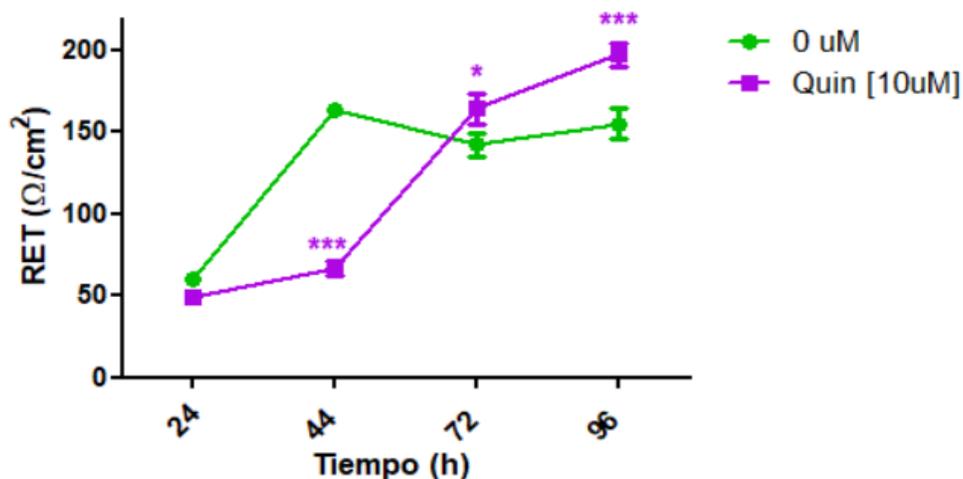


Figura 19. Efecto de la KYN sobre la RET de monocapas en desarrollo de células MDCK. **0  $\mu\text{M}$**  = Células MDCK sin exposición a KYN **Quin [10  $\mu\text{M}$ ]** = Células MDCK expuestas a KYN a la concentración indicada. Se muestra media y EEM, n=9 para todos los grupos experimentales. ANOVA bifactorial *a priori* y Bonferroni *a posteriori*. Los asteriscos representan diferencias significativas entre el grupo tratado con KYN y el grupo control. \*P<0.05, \*\*\* P<0.001.

### 5) Efecto de la KYN sobre la localización de cldn-2 y cldn-4 durante la formación de la unión estrecha

A las mismas células MDCK controles e incubadas 44 h con 10  $\mu\text{M}$  de KYN, a las que se les midió la RET en el experimento de la figura 19, se les fijó y tiñeron las claudinas -2 y -4 por inmunofluorescencia.

La figura 20 muestra que las células cultivadas en condiciones control expresan la claudina-4 y la -2 en las UE (imágenes del panel superior, verde y roja, respectivamente). La KYN indujo una disminución, pero no la desaparición de la claudina-4 en la UE, así como un aumento de la claudina-4 intracelular. Ambos cambios podrían explicar la disminución de la RET mostrada en la figura 19. La KYN también indujo una disminución de la claudina-2, lo que debería asociarse con un aumento de la RET. Aun cuando la RET es un parámetro que puede detectar la variación de una claudina en particular, estrictamente depende de la expresión de todas las claudinas en

el momento de la medición. En nuestro caso, pareciera que la disminución de la claudina-4 es el factor predominante sobre la disminución simultánea de la -2, probablemente porque las células MDCK expresan mucha más claudina-4 que -2, según lo sugieren las imágenes de las fluorescencias. Investigaremos estas alternativas mediante inmunotransferencia e inmunodetección en experimentos futuros.

El aumento de la RET a las 96 h de tratamiento con KYN, concuerdan con nuestras observaciones iniciales de que la KYN aumenta la RET de monocapas maduras, por efecto de una disminución de la presencia de claudina-2 (Figuras 16 y 17). Se tienen que realizar experimentos que lo corroboren.

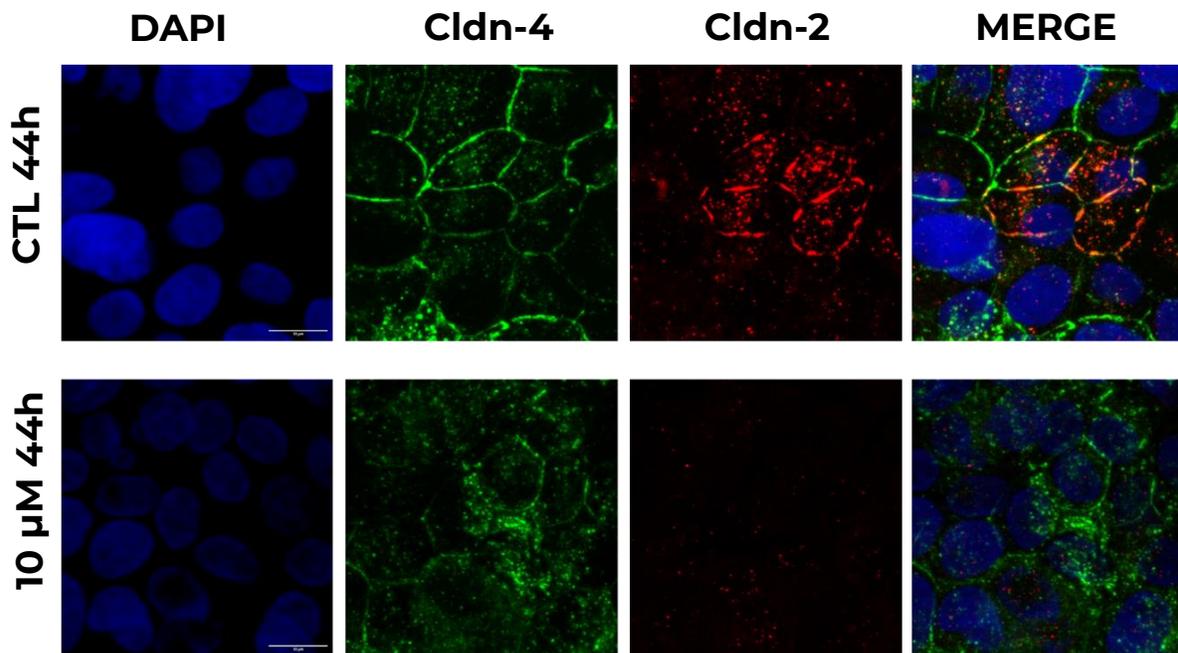
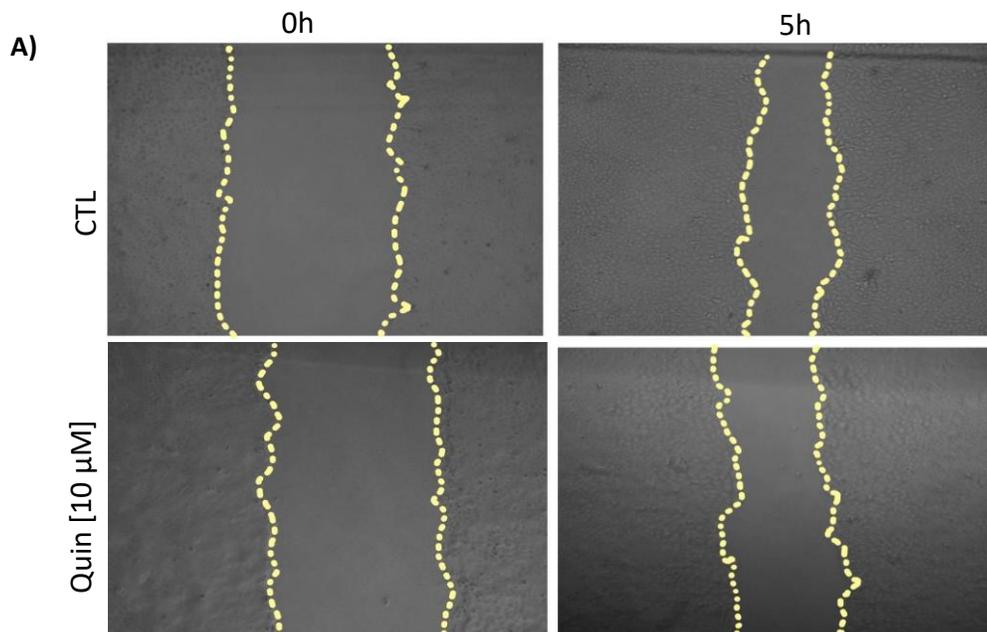


Figura 20. KYN modifica el patrón de expresión de las claudinas en células MDCK durante la formación de la unión estrecha. Las células MDCK se cultivaron sin o con 10.0  $\mu\text{M}$  de KYN (apical y basolateral) durante 44 horas. En verde se muestra a la cldn-4, en rojo a cldn-2 y en azul los núcleos.

## 6) Efecto de la KYN sobre la migración celular

La recuperación de la monocapa luego de una herida es una condición en la que las células se recuperan de un daño e involucra que las células migren y formen nuevas uniones. Basados en nuestros resultados, consideramos que era posible que la KYN, que protege al epitelio del daño por inflamación y toxinas urémicas, aceleraría la reparación de la monocapa epitelial luego de una herida.

Sembramos monocapas confluentes de células MDCK y las incubamos 24 h en CDMEM, luego cambiamos el medio por otro con 1 % e incubamos las células por 18 h adicionales en medio DMEM con 1 % de suero fetal bovino para reducir la proliferación celular. En seguida se practicaron las heridas y se fotografiaron. Entonces, se substituyeron los medios por DMEM 1 % de suero fetal control o conteniendo 10  $\mu$ M de KYN y las monocapas con heridas se incubaron por 5 h adicionales. En la figura 21 se muestra que el sellado de la herida no se cambia con la KYN. Nos falta aún investigar si, así y todo, las células expresan más claudina-4 y/o menos claudina-2 en la zona de la herida.



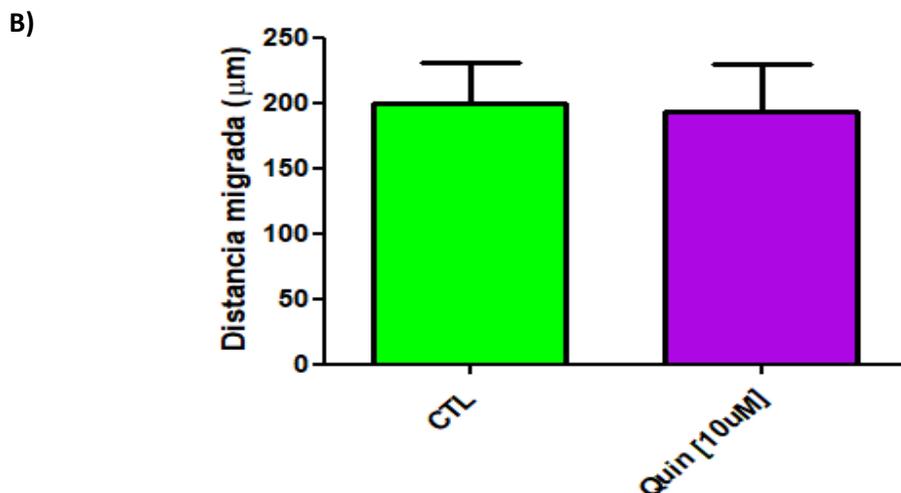


Figura 21. Efecto de la KYN en la migración celular. A) Imágenes representativas de migración de células MDCK al tiempo 0 y 5h posteriores a la herida. B) Cuantificación de la distancia migrada de células MDCK a las 5h posteriores a herida. CTL= Células MDCK sin exposición a KYN. Quin [10 µM]= Células MDCK cultivadas en presencia de KYN durante 5 horas. Las líneas punteadas representan el borde de la herida. Se muestra media y EEM, n=3 para todos los grupos experimentales. Mann Whitney.

## DISCUSIÓN

La KYN es un ligando endógeno del AhR, el FICZ, por otro lado, es un ligando exógeno clásico. Se ha demostrado que el FICZ promueve un aumento de la RET en células Caco-2 al ser dañadas por citocinas proinflamatorias (Yu *et al.*, 2018). Estos hechos sugieren que la KYN podría aumentar la RET en células MDCK. Nuestros resultados demuestran que, de hecho, la KYN induce un aumento transitorio de la RET de entre un 10 y 20 % del valor control (Figuras 16 y 19). Este aumento se debe, principalmente, a una disminución de la claudina-2, una claudina que forma canales paracelulares de sodio (Amashe *et al.*, 2002; Muto *et al.*, 2010).

La RET es un reflejo del grado de sellado de la unión estrecha en el instante mismo que se hace la medición y en respuesta a la aplicación de un pulso de corriente eléctrica en las monocapas celulares. La corriente aplicada permite medir la diferencia de potencial a través del epitelio y, conociendo la corriente

aplicada y la diferencia de potencial medida, se calcula la RET. La corriente podría fluir a través del epitelio siguiendo dos vías: la paracelular y la transcelular. En la primera, la resistencia está dada por la membrana apical y basolateral, así como el citoplasma, en la segunda, por la unión estrecha y el espacio intercelular. Las claudinas son proteínas transmembranales de las UE, son los componentes mayoritarios de estas estructuras y forman canales, como los de sodio de la claudina-2, o barreras paracelulares al paso de iones, como la claudina-4. Entre mayor sea el número de canales paracelulares, los iones fluirán a través de estos y la RET tenderá a caer; por el contrario, si la cantidad de canales paracelulares disminuye, la RET tenderá a aumentar. Así, cuando la cantidad de claudina-2 aumenta en la UE la RET disminuirá, mientras que si aumenta la cantidad de claudina-4, la RET aumentará. El aumento que produce la KYN en las monocapas maduras de células MDCK, puede explicarse por la reducción de la claudina-2 observada por inmunofluorescencia. Esta posibilidad debe ser investigada por electroforesis, inmunotransferencia e inmunodetección. La disminución de la claudina-2 podría ser el resultado de la inducción de su endocitosis y la degradación lisosomal consecuente, como lo hemos observado en el caso de altas concentraciones de ouabaína (Contreras *et al.*, 1999; Rincón-Heredia *et al.*, 2015) y por el EGF (García-Hernández *et al.*, 2015), pero en parte podría deberse, y de manera importante en los efectos a largo plazo, a una disminución en su síntesis.

Los murinos obesos tienen niveles elevados de KYN, lo que promueve la sobreactivación del AhR y un aumento de la transcripción y la fosforilación de STAT3, factor de transcripción que se transloca al núcleo para ejercer sus funciones (Huang *et al.*, 2022). García-Hernández *et al.*, (2015) demostraron que el EGF aumenta la fosforilación de STAT3 y, consecuentemente, su translocación al núcleo lo que, de alguna forma, promueve la inhibición de la transcripción de claudina-2. El aumento de la RET en células MDCK incubadas con KYN, podría deberse a una baja transcripción de la claudina-2 mediada por una sobreactivación del AhR y la consecuente síntesis, fosforilación y translocación de STAT3 al núcleo. Este efecto transcripcional, debería estar

asociado con un aumento de la endocitosis y degradación de la claudina- también dependiente de STAT3. Para demostrar lo anterior se propone utilizar el modelo de células MDCK en presencia y ausencia de KYN agregando inhibidores del AhR, como el resveratrol, o bien, el inhibidor de STAT3, STATIC y monitorear la RET y la localización de las claudinas -2 y -4.

Por otra parte, investigamos si las células MDCK estimuladas con KYN modifican su permeabilidad a macromoléculas como el FITC-Dextran 3-5 kDa, ya que si bien la RET es una medida del grado de permeabilidad iónica de la unión estrecha, el ensayo de permeabilidad permite conocer la permeabilidad a moléculas, que no fluyen a través de los poros de las claudinas, si no que por otras proteínas o mecanismos de las UE. Las células MDCK que sobreexpresan tricelulina en las UEs tricelulares, disminuye drásticamente la permeabilidad paracelular a macromoléculas (FITC-Dextran 4 kDa), sugiriendo que esta proteína forma una barrera al paso de moléculas distintas de los iones (Krug *et al.*, 2009). Como se observó en la figura 18 no hay cambios significativos en la permeabilidad de FITC-dextran, lo cual se puede deber a que no hay alteraciones en la expresión y localización de la tricelulina, sin embargo, en los ensayos realizados no se observó si se alteró la expresión de la tricelulina, por lo cual, sería importante evaluar que ocurre con esta proteína en presencia de KYN.

En los ensayos realizados en monocapas maduras de células MDCK se observó que KYN aumenta entre un 10 y 20 % la RET, en un periodo de tiempo de 3 a 7.5 h post administración, disminuye la señal fluorescente de la claudina-2 en el borde celular y no altera la permeabilidad a macromoléculas. No obstante, nos preguntamos si este catabolito del triptófano tiene efecto sobre la cinética de formación de la UE. Para investigar esta posibilidad se utilizó un protocolo donde no se expresan las UE y se forman paulatinamente. Se administro KYN en el medio de cultivo y se monitoreo la RET durante 96 horas. En la figura 19 se muestra que la RET es igual durante las primeras horas del ensayo. Sin embargo, a las 44 horas hay una disminución significativa de casi el 60 % con

respecto al grupo control. No obstante, al ser únicamente un punto el que muestra la diferencia, se plantea ampliar la frecuencia del muestreo, para obtener una descripción más clara y confirmar esta diferencia. Esta disminución de la RET se asocia con disminuciones en la intensidad de la señal fluorescente de las imágenes de las claudinas -2 y, en menor grado, -4, localizándose la claudina-4 tanto en el interior celular, como en la UE, mientras que la poca claudina-2 se detecta principalmente en el interior celular, donde no tendría ninguna consecuencia sobre la RET (figura 20). Es importante recordar que la resistencia eléctrica paracelular es la resultante de la sumatoria de todas las claudinas que se localizan en la unión estrecha, por lo que analizar otras claudinas es una estrategia a futuro para conocer cómo se afectan otras proteínas, así como otros componentes de las UE.

A las 72 y 96 horas, la KYN tiene el efecto contrario sobre la RET al descrito arriba, aumentando un 20 % con respecto al grupo control. Sin embargo, en estos tiempos, la monocapa ya se encuentra en un estado maduro y las UEs se han establecido completamente, por lo que la KYN realiza el efecto similar al observado en el mantenimiento de las UEs. Este resultado apoya la proposición de que la KYNp mantiene a las uniones estrechas selladas.

El cambio a calcio es un procedimiento frecuentemente usado para investigar la formación de las UEs. No obstante, al usar este protocolo, se enfrentaron dificultades metodológicas que impidieron obtener resultados claros, como el uso, por primera vez, de bastidores permeables comerciales y una concentración de glucosa normal en el medio (los experimentos publicados se realizaron en medios de alta glucosa comente usados para células cancerosas), además de usar una clona de células diferente a las del artículo original. Durante los ensayos de calcium-switch se, observó que los resultados se replican a tiempos más prolongados que los publicados y que las células alcanzan valores de RET muy inferiores a los reportados. Se continuará ajustando las condiciones experimentales para obtener resultados confiables.

Se puede observar la formación y el establecimiento de las UE nuevas después de un daño tisular, por ejemplo, el provocado por una herida. En ensayos clásicos de recuperación de una herida, se observó que la KYN no modifica la motilidad de las células MDCK.

## **CONCLUSIÓN**

La KYN disminuye la expresión de claudina-2 en la unión estrecha en monocapas maduras de células MDCK, lo que resulta en un incremento de la RET en un periodo de tiempo comprendido de 3-7.5 h post administración, sin modificar: la permeabilidad y la migración celular.

Por otra parte, la KYN retrasa la formación de uniones estrechas en monocapas subconfluentes de células MDCK y disminuye la expresión de claudina-2 -4 en el borde celular.

## REFERENCIAS

- 1) **Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schöneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M. (2002).** Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci.* Dec 15;115(Pt 24):4969-76. doi: 10.1242/jcs.00165. PMID: 12432083.
- 2) **Badawy AA, Guillemin G. (2019).** The Plasma [Kynurenine]/[Tryptophan] Ratio and Indoleamine 2,3-Dioxygenase: Time for Appraisal. *Int J Tryptophan Res.* Aug 21;12:1178646919868978. doi: 10.1177/1178646919868978. PMID: 31488951; PMCID: PMC6710706.
- 3) **Bauch C., Forster N., Loffing-Cueni D., Summa V., Verrey F. (2003).** Functional cooperation of epithelial heteromeric amino acid transporters expressed in madin-darby canine kidney cells. *J Biol Chem.* 2003; 10;278(2):1316-22. doi: 10.1074/jbc.M210449200.
- 4) **Calderón V, Lázaro A, Contreras RG, Shoshani L, Flores-Maldonado C, González-Mariscal L, Zampighi G, Cerejido M. (1998).** Tight junctions and the experimental modifications of lipid content. *J Membr Biol.* Jul 1;164(1):59-69. doi: 10.1007/s002329900393. PMID: 9636244.
- 5) **Cavila M. (2019).** Fisiología Renal. Procesos renales en la formación de la orina: Filtración glomerular, Reabsorción y Secreción tubular. (2019). [Internet] Consultado el: 5-Junio-2019. Disponible en: [https://nanopdf.com/download/fisiologia-renal-procesos-renales-en-la-formacion-de-orina\\_pdf](https://nanopdf.com/download/fisiologia-renal-procesos-renales-en-la-formacion-de-orina_pdf)
- 6) **Cerejido M, Contreras RG, Shoshani L. (2004).** Cell adhesion, polarity, and epithelia in the dawn of metazoans. *Physiol Rev.* Oct;84(4):1229-62. doi: 10.1152/physrev.00001.2004. PMID: 15383651.
- 7) **Cerejido M, Robbins ES, Dolan WJ, Rotunno CA, Sabatini DD. (1978).** Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J Cell Biol.* 1978 Jun;77(3):853-80. doi: 10.1083/jcb.77.3.853. PMID: 567227; PMCID: PMC2110138.
- 8) **Cerejido M, Ruíz O, Gonzalez-Mariscal L, Contreras RG, Susana Balda M, García-Villegas MR. (1993).** The Paracellular Pathway. In: *Biological Barriers to Protein Delivery.* 1st ed. Boston, MA: Springer US, pp. 49–69. (Pharmaceutical Biotechnology; vol. 4).
- 9) **Cerejido M., Gonzalez-mariscal L., Contreras G (1989)** Tight-junction: *barrier between higher organisms and environment.* *News Physiol* 4: 72–75.
- 10) **Cerejido M.Gonzalez-Mariscal L.Contreras R.G. (1989).** Tight junction: Barrier between higher organisms and environment.*NIPS.* 4: 72-75
- 11) **Citi S, Sabanay H, Jakes R, Geiger B, Kendrick-Jones J. (1988).** Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. *Nature.* 1988 May 19;333(6170):272-6. doi: 10.1038/333272a0. PMID: 3285223.
- 12) **Claude P, Goodenough DA. (1973).** Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J Cell Biol.* Aug;58(2):390-400. doi: 10.1083/jcb.58.2.390. PMID: 4199658; PMCID: PMC2109050.
- 13) **Claude P, Goodenough DA.(1973).** Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J Cell Biol.* Aug;58(2):390-400. doi: 10.1083/jcb.58.2.390. PMID: 4199658; PMCID: PMC2109050.
- 14) **Claude P. (1978).** Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol.* Mar 10;39(2-3):219-32. doi: 10.1007/BF01870332. PMID: 641977.
- 15) **Denison MS., Pandini A., Nagy SR., Baldwin EP., Bonati L. (2002).** Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem Biol Interact.* 20;141(1-2):3-24. doi: 10.1016/s0009-2797(02)00063-7.
- 16) **Diamond JM. (1977).** Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *Physiologist.* Feb;20(1):10-8. PMID: 16304.

- 17) **Dragsten PR, Blumenthal R, Handler JS. (1981).** Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane? *Nature*. Dec 24;294(5843):718-22. doi: 10.1038/294718a0. PMID: 7322203.
- 18) **Eckers A, Jakob S, Heiss C, Haarmann-Stemmann T, Goy C, Brinkmann V, Cortese-Krott MM, Sansone R, Esser C, Ale-Agha N, Altschmied J, Ventura N, Haendeler J. (2016).** The aryl hydrocarbon receptor promotes aging phenotypes across species. *Sci Rep*. 2016 Jan 21;6:19618. doi: 10.1038/srep19618. PMID: 26790370; PMCID: PMC4726214.
- 19) **Flores-Benítez D, Ruiz-Cabrera A, Flores-Maldonado C, Shoshani L, Cerejido M, Contreras R. (2007)** Control of tight junctional sealing: role of epidermal growth factor. *Am J Physiol Renal Physiol*. 292: F828–F836. doi: 10.1152/ajprenal.00369.2006
- 20) **Flores-Maldonado C, Albino-Sánchez ME, Rodríguez-Callejas JD, Estrada-Mondragon A, León-Galicia I, Maqueda-Alfaro R, Perez-Cruz C, Fuchs E, García-Carrancá A, Contreras RG, Missirlis F, Rosas-Arellano A. (2020).** A Low Cost Antibody Signal Enhancer Improves Immunolabeling in Cell Culture, Primate Brain and Human Cancer Biopsy. *Neuroscience*. Jul 15;439:275-286. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.01.009.
- 21) **Fukui S., Schwarcz R., Rapoport SI., Takada Y., Smith QR. (1991).** Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism. *J Neurochem*. 56(6):2007-17. doi: 10.1111/j.1471-4159.1991.tb03460.x.
- 22) **Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. (2002).** Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol*. Mar 18;156(6):1099-111. doi: 10.1083/jcb.200110122. Epub 2002 Mar 11. PMID: 11889141; PMCID: PMC2173463.
- 23) **Furuse M, Izumi Y. (2017).** Molecular dissection of smooth septate junctions: understanding their roles in arthropod physiology. *Ann N Y Acad Sci*. Jun;1397(1):17-24. doi: 10.1111/nyas.13366. PMID: 28636800.
- 24) **Furuse M., Fujita K., Hiiragi T., Fujimoto K., Tsukita S. (1998).** Claudin-1 and -2 novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*. 141 1998. 1539 1550a
- 25) **Gallardo J, Hernández J, Contreras G, Flores-Maldonado C, González-Mariscal L, Cerejido M. (2002).** Tight junctions are sensitive to peptides eliminated in the urine. *J Membrane Biol*. 188, 33-43. doi: 10.1007/s00232-001-0170-6
- 26) **García-Hernández V, Flores-Maldonado C, Rincon-Hereida R, Verdejo-Torres O, Bonilla-Delgado J, Meneses-Morales I, Gariglio P, Contreras R. (2015).** EGF Regulates Claudin-2 and -4 Expression Through Src and STAT3 in MDCK Cells. *Journal of Cellular Physiology*. doi: 10.1002/jcp.24687
- 27) **González-Mariscal, L., Quiros, M., Diaz-Coranguez, M., & Bautist, P. (2012).** Tight Junctions. *InTech*. doi: 10.5772/35166
- 28) **Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D. (1991).** Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Apr 15;88(8):3460-4. doi: 10.1073/pnas.88.8.3460. PMID: 2014265; PMCID: PMC51467.
- 29) **Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J, Stevenson BR. (1998).** ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol*. Apr 6;141(1):199-208. doi: 10.1083/jcb.141.1.199. PMID: 9531559; PMCID: PMC2132714.
- 30) **Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S. (2005).** Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol*. Dec 19;171(6):939-45. doi: 10.1083/jcb.200510043. PMID: 16365161; PMCID: PMC2171318.
- 31) **Kahle KT., Macgregor GG., Wilson FH., Van Hoek AN., Brown D., Ardito T., Kashgarian M., Giebisch G., Hebert SC., Boulpaep EL., Lifton RP. (2004).** Paracellular Cl<sup>-</sup> permeability is regulated by WNK4 kinase: Insight into normal physiology and hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12;101(41):14877-82. doi: 10.1073/pnas.0406172101.

- 32) **L González-Mariscal, A Betanzos, P Nava, B.E Jaramillo. (2003).** Tight junction proteins, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Volume 81, Issue 1, Pages 1-44, ISSN 0079-6107,
- 33) **M.G. Farquhar, G.E Palade.(1963).** Junctional complexes in various epithelia *J. Cell Biol.*, 17, pp. 375-412
- 34) **Macchiarulo A., Camaioni E., Nuti R., Pellicciari R. (2009).** Highlights at the gate of tryptophan catabolism: a review on the mechanisms of activation and regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), a novel target in cancer disease. *Amino Acids.* 37(2):219-29. doi: 10.1007/s00726-008-0137-3.
- 35) **Mandel LJ, Bacallao R, Zampighi G. (1993).** Uncoupling of the molecular 'fence' and paracellular 'gate' functions in epithelial tight junctions. *Nature.* Feb 11;361(6412):552-5. doi: 10.1038/361552a0. PMID: 8429911.
- 36) **Martín-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. (1998).** Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* Jul 13;142(1):117-27. doi: 10.1083/jcb.142.1.117. PMID: 9660867; PMCID: PMC2133024.
- 37) **Matheus LHG, Simão GM, Amaral TA, Brito RBO, Malta CS, Matos YST, Santana AC, Rodrigues GGC, Albejante MC, Bach EE, Dalboni MA, Camacho CP, Dellê H. (2017).** Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) increases during renal fibrogenesis and its inhibition potentiates TGF- $\beta$  1-induced epithelial to mesenchymal transition. *BMC Nephrol.* Sep 6;18(1):287. doi: 10.1186/s12882-017-0702-7. PMID: 28877670; PMCID: PMC5585959.
- 38) **Mezrich JD., Fechner JH., Zhang X., Johnson BP., Burlingham WJ., Bradfield CA. (2010).** An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol.* 15;185(6):3190-8. doi: 10.4049/jimmunol.0903670.
- 39) **Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. (1999).** Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 19;96(2):511-6. doi: 10.1073/pnas.96.2.511. PMID: 9892664; PMCID: PMC15167.
- 40) **Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. (1999).** Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol.* Oct 4;147(1):185-94. doi: 10.1083/jcb.147.1.185. PMID: 10508865; PMCID: PMC2164984.
- 41) **Muto S., Hata M., Taniguchi J., Tsuruoka S., Moriwaki K., Saitou M., Furuse K., Sasaki H., Fujimura A., Imai M., Kusano E., Tsukita S., Furuse M. (2010).** Claudin-2-deficient mice are defective in the leaky and cation-selective paracellular permeability properties of renal proximal tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 27;107(17):8011-6. doi: 10.1073/pnas.0912901107.
- 42) **Neavin DR., Liu D., Ray B., Weinshilboum RM. (2018).** The Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) in Immune and Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci.* 3;19(12):3851. doi: 10.3390/ijms19123851.
- 43) **Nusrat A, Turner JR, Madara JL. (2000).** Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Nov;279(5): G851-7. doi: 10.1152/ajpgi.2000.279.5.G851. PMID: 11052980.
- 44) **Opitz CA., Litztenburger UM., Sahn F., Ott M., Tritschler I., Trump S., Schumacher T., Jestaedt L., Schrenk D., Weller M., Jugold M., Guillemin GJ., Miller CL., Lutz C., Radlwimmer B., Lehmann I., von Deimling A., Wick W., Platten M. (2011).** An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature.* 5;478(7368):197-203. doi: 10.1038/nature10491.
- 45) **Reese TS, Karnovsky MJ. (1967).** Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol.* Jul;34(1):207-17. doi: 10.1083/jcb.34.1.207. PMID: 6033532; PMCID: PMC2107213.

- 46) **Reinhard K, Rengstl B, Oehm P, Michel K, Billmeier A, Hayduk N, Klein O, Kuna K, Ouchan Y, Wöll S, Christ E, Weber D, Suchan M, Bukur T, Birtel M, Jahndel V, Mroz K, Hobohm K, Kranz L, Diken M, Kühlcke K, Türeci Ö, Sahin U. (2020).** An RNA vaccine drives expansion and efficacy of claudin-CAR-T cells against solid tumors. *Science*. Jan 24;367(6476):446-453. doi: 10.1126/science.aay5967. Epub 2020 Jan 2. PMID: 31896660.
- 47) **Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP. (1999).** Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg<sup>2+</sup> resorption. *Science*. Jul 2;285(5424):103-6. doi: 10.1126/science.285.5424.103. PMID: 10390358.
- 48) **Soshilov, A., Denison MS. (2008).** Role of the Per/Arnt/Sim domains in ligand-dependent transformation of the aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* 283, 32995–3005. doi: 10.1074/jbc.M802414200.
- 49) **Spiegel S, Blumenthal R, Fishman PH, Handler JS. (1985).** Gangliosides do not move from apical to basolateral plasma membrane in cultured epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*. Dec 5;821(2):310-8. doi: 10.1016/0005-2736(85)90101-4. PMID: 4063368.
- 50) **Stahelin LA, Mukherjee TM, Williams AW. (1969).** Freeze-etch appearance of the tight junctions in the epithelium of small and large intestine of mice. *Protoplasma*. 67(2):165-84. doi: 10.1007/BF01248737. PMID: 5346995.
- 51) **Steed E, Elbediwy A, Vacca B, Dupasquier S, Hemkemeyer SA, Suddason T, Costa AC, Beaudry JB, Zihni C, Gallagher E, Pierreux CE, Balda MS, Matter K. (2014).** MarvelD3 couples tight junctions to the MEKK1-JNK pathway to regulate cell behavior and survival. *J Cell Biol*. Mar 3;204(5):821-38. doi: 10.1083/jcb.201304115. Epub 2014 Feb 24. PMID: 24567356; PMCID: PMC3941049.
- 52) **Steed E., Rodrigues NT., Balda MS., Matter K. (2009).** Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *BMC Cell Biol*. 2009; 22;10:95. doi: 10.1186/1471-2121-10-95.
- 53) **Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. (1986).** Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol*. Sep;103(3):755-66. doi: 10.1083/jcb.103.3.755. PMID: 3528172; PMCID: PMC2114282.
- 54) **Suzuki H, Ito Y, Yamazaki Y, Mineta K, Uji M, Abe K, Tani K, Fujiyoshi Y, Tsukita S. (2013).** The four-transmembrane protein IP39 of *Euglena* forms strands by a trimeric unit repeat. *Nat Commun*. 4:1766. doi: 10.1038/ncomms2731. PMID: 23612307; PMCID: PMC3644091.
- 55) **Suzuki H, Tani K, Tamura A, Tsukita S, Fujiyoshi Y. (2014).** Model for the architecture of claudin-based paracellular ion channels through tight junctions. *J Mol Biol*. 2015 Jan 30;427(2):291-7. doi: 10.1016/j.jmb.2014.10.020.
- 56) **Tang VW., Goodenough DA.(2003).** Paracellular ion channel at the tight junction. *Biophys J*. 2003;84(3):1660-73. doi: 10.1016/S0006-3495(03)74975-3.
- 57) **Turner JR. (2006).** Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol*. 2006;169(6):1901-9. doi: 10.2353/ajpath.2006.060681.
- 58) **Ussing H.H, Zerach K, (1951).** Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiolo. Scand*. 23:110-127
- 59) **Van Itallie CM, Anderson JM. (2006).** Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol*. 68:403-29. doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040104.131404. PMID: 16460278.
- 60) **Van Itallie CM, Colegio OR, Anderson JM. (2004).** The cytoplasmic tails of claudins can influence tight junction barrier properties through effects on protein stability. *J Membr Biol*. May 1;199(1):29-38. doi: 10.1007/s00232-004-0673-z. PMID: 15366421.
- 61) **Van Itallie CM, Gambling TM, Carson JL, Anderson JM. (2005).** Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization. *J Cell Sci*. Apr 1;118(Pt 7):1427-36. doi: 10.1242/jcs.01735. Epub 2005 Mar 15. PMID: 15769849.

- 62) **Van Meer G, Simons K. (1986).** The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *EMBO J.* Jul;5(7):1455-64. doi: 10.1002/j.1460-2075.1986.tb04382.x. PMID: 3743548; PMCID: PMC1166965.
- 63) **Walker JA, Richards S, Belghasem ME, Arinze N, Yoo SB, Tashjian JY, Whelan SA, Lee N, Kolachalama VB, Francis J, Ravid K, Sherr D, Chitalia VC. (2020).** Temporal and tissue-specific activation of aryl hydrocarbon receptor in discrete mouse models of kidney disease. *Kidney Int Mar*;97(3):538-550. doi: 10.1016/j.kint.2019.09.029. Epub 2019 Oct 30. PMID: 31932072; PMCID: PMC9721455.
- 64) **Yu M., Wang Q., Ma Y., Li L., Yu K., Zhang Z., Chen G., Li X., Xiao W., Xu P., Yang H. (2018).** Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Modulates Intestinal Epithelial Barrier Function by Maintaining Tight Junction Integrity. *Int J Biol Sci.* 11;14(1):69-77. doi: 10.7150/ijbs.22259.
- 65) **Zihni C., Mills C., Matter K., Balda MS. (2016).** Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 17(9):564-80. doi: 10.1038/nrm.2016.80.