



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA,
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**Efecto del INF-Alfa PEG y Ribavirina sobre la
expresión de claudinas en células HepG2.**

T E S I S

Para obtener el título de:

B i ó l o g o

PRESENTA:

Torres Martínez Ana Cristina

Directora: Dra. Erika P. Rendón Huerta

Asesor interno: Dr. Edelmiro Santiago Osorio

México D. F.

Octubre 2008





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres:

Porque solo la superación de mis ideales me han permitido comprender cada día mas la difícil posición de ser padres. Mis conceptos, mis valores morales y mis superación se las debo ustedes, esto será la mejor de las herencias; lo reconozco y lo agradeceré eternamente. En adelante pondré en práctica mis conocimientos. Y el lugar que en mi mente ocupan los libros también será de ustedes, esto, por todo el tiempo que les robe pensando en mi.

GRACIAS

A mis tutores Dra. Erika Rendón y Dr. Edelmiro Santiago:

Gracias por sus enseñanzas y por el tiempo que me dedicaron.

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por permitirme llegar hasta este punto, por estar en mi mente y guiarme.

A mis padres:

Por todo el apoyo moral que me brindaron a lo largo de mi formación académica, por la confianza que depositaron en mí para terminar mi carrera con mucho orgullo, por el gran esfuerzo que han hecho siempre para darme todas las herramientas y el soporte para continuar y por el cariño incondicional que constantemente me ofrecen. Créanme que ustedes son el motivo más grande que tengo para seguir adelante Muchas gracias!!!!!!!!!! LOS QUIERO MUCHO

A mi hermanita:

Por darme ánimos y apoyarme en todo momento y por tenerme confianza, aunque siempre me enojo contigo pero sabes que te quiero mucho y tomo mucho en cuenta las cosas y los consejos que me dices. Muchas gracias por estar a mi lado. TE QUIERO MUCHO

A Gabriel:

Por el enorme apoyo que me has ofrecido a lo largo de todo este tiempo, por los consejos que me ayudaron mucho en mi formación, por creer en mí y darme tu confianza, porque has hecho de esta larga jornada algo diferente y especial. Muchas gracias. TE QUIERO MUCHO

A mis amigos:

A Juan Carlos que siempre ha estado conmigo y que me apoya en todo momento.

A Bere que durante mucho tiempo estuvimos juntas y continuamente me brindo su ayuda, me dio su confianza y su tiempo.

A Oswaldo que con sus consejos y enseñanzas aprendí que para lograr tus propósitos debes hacer un mayor esfuerzo, gracias por ofrecerme tu apoyo y por estar cerca de mí.

A Christian y Verdecita con quienes estuve desde que inicié la carrera y que pasamos por momentos difíciles pero logramos afrontarlos y seguir adelante.

A Ricardo que con su simpatía y su alegría llenó el salón de clases de un ambiente agradable colmado de sonrisas y carcajadas haciendo más amena mi estancia en la Fes.

A Yorch y Paco que de igual forma le dieron un toque divertido y gracioso a las clases, gracias por esas palabras de ánimo y de apoyo.

A Noe que a pesar de su seriedad siempre sabía en que momento romper su silencio.

A Sara, Karen, a quienes les he tomado mucho cariño y que también me alientan a seguir adelante.

A Luisillo y Chucho por compartir tantos momentos divertidos durante la carrera.

A Vero a quien aprecio mucho y me dio siempre su ayuda incondicional, sus enseñanzas fueron muy importantes en mi estancia en el laboratorio y en el desarrollo de mi tesis.

A la Dra. Erika a quien le agradezco mucho el haberme aceptado y todo el apoyo que me brindo, por darme su confianza, por compartir su experiencia y sus conocimientos los cuales me han servido para tener una mejor formación.

Al Dr. Edelmiro con quien aprendí las bases para desarrollarme en el camino de la investigación.

A todos mis amigos y tutores GRACIAS... LOS QUIERO MUCHO.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	1
Resumen.....	2
I.- Introducción	3
1.1 Uniones Celulares	3
1.1.1 Uniones Gap	4
1.1.2 Desmosomas.....	5
1.1.3 Hemidesmosomas	6
1.1.4 Uniones Adherentes	7
1.1.4.1 Caderinas.....	7
1.1.4.2 Cateninas	8
1.1.4.3 Nectinas.....	8
1.1.5 Uniones Estrechas	9
1.1.5.1 ZO (zonula ocludens)	12
1.1.5.2 JAM.....	13
1.1.5.3 Ocludina.....	14
1.1.5.3 Claudinas	14
1.1.6 Claudinas y permeabilidad paracelular	16
1.1.7 Regulación de las claudinas	17
1.1.8 Expresión de claudinas en tumores humanos	18
1.1.9 Papel de las claudinas en el desarrollo de tumores	20
1.2 Hepatitis C, papel de las claudinas	21
1.3 Tratamientos utilizados actualmente contra el virus de la Hepatitis C.....	23
1.3.1 Interferón –Alfa (INF- α)	24
1.3.2 Interferón-Alfa-pegilado (INF- α -PEG)	24
1.3.3 Ribavirina	25
II.- Justificación	27

III.- Hipótesis	28
IV.- Objetivos	29
4.1 Objetivo general.....	29
4.1 Objetivos particulares	29
V.- Método	30
5.1 Cultivos celulares.....	30
5.2 Mantenimiento y propagación de la línea celular HepG2.	31
5.2.1 Descongelamiento de células HepG2	31
5.2.2 Propagación de células HepG2	31
5.2.3 Congelamiento de células HepG2.....	32
5.3 Tratamiento de células HepG2 con PEG INF-α 2a y 2b Y Ribavirina.....	33
5.4 Obtención de las fracciones subcelulares.....	34
5.5 Cuantificación de proteína.....	35
5.5.1 Determinación de la concentración de proteína en las células HepG2.....	35
5.6 Análisis de la expresión de proteínas por ensayos de Inmunoblots.	37
5.6.1 Electroforesis para el análisis de proteína	37
5.7 Revelado	39
VI.- Resultados.....	40
6.1 Caracterización de claudinas en las células HepG2	42
6.2 Expresión de claudinas en células tratadas con PEG-INF-α 2a (Roche) y 2b (Shering Plough) y Ribavirina (Roche, Shering Plough y Sigma).....	41
6.2.1 Efecto del PEG-INF-α 2b (SP) y Ribavirina (SP) sobre la expresión de claudina-1.....	41
6.2.1.1 Efecto del PEG-INF- α 2b (Roche) y Ribavirina (Roche) sobre la expresión de claudina- 1.....	43

6.2.2 Efecto del PEG-INF-α 2b (SP) y Ribavirina (SP) sobre la expresión de claudina-3.....	46
6.2.2.1 Efecto del PEG-INF- α 2b (Roche) y Ribavirina (Roche) sobre la expresión de claudina-3.....	48
6.2.3 Efecto del PEG-INF-α 2b (SP) y Ribavirina (SP) sobre la expresión de claudina-4	50
6.2.3.1 Efecto del PEG-INF- α 2b (Roche) y Ribavirina (Roche) sobre la expresión de claudina-4.....	52
6.2.4 Efecto del PEG-INF-α 2b (SP) y Ribavirina (SP) sobre la expresión de claudina-5.....	55
6.2.4.1 Efecto del PEG-INF- α 2b (Roche) + Ribavirina (Roche) sobre la expresión de claudina-5.....	57
6.2.5 Efecto del PEG-INF-α 2b (SP) + Ribavirina (SP) sobre la expresión de claudina-9.....	60
6.2.5.1 Efecto del PEG-INF- α 2b (Roche) + Ribavirina (Roche) sobre la expresión de claudina-9.....	62
6.2.6 Efecto del PEG-INF-α 2b (SP), 2a (Roche) + Ribavirina (SP, Roche y Sigma) sobre la expresión de ocludina.....	64
6.2.7 Efecto del PEG-INF-α 2b (SP) + Ribavirina (SP) sobre la expresión de E-Caderina.....	67
6.2.7.1 Efecto del PEG-INF- α 2a (Roche) y Ribavirina (Roche) sobre la expresión de E-Caderina.....	69
VII.- Discusión de resultados.....	70
VIII.- Conclusiones.....	79
IX.- Perspectivas.....	80
X.- Bibliografía.....	81
XI.- Anexo I	88

ABREVIATURAS

- AF6:** Afadina- 6
- BBB:** Barrera hemato-encefálica
- CDC42:** Proteína involucrada en la regulación del ciclo celular
- CMSP:** células mononucleares de sangre periférica
- CHC:** cirrosis hepática
- CD81:** proteína de superficie celular
- DMSO:** dimetil sulfóxido
- EGF:** Factor de Crecimiento Epidérmico
- EDTA:** Acido etilendiamintetracético
- EGTA:** Acido etilenglicoltetracético
- GUK:** Cinasa guanilato
- HCC:** Hepatocarcinoma celular
- HepG2:** Células epiteliales positivas al virus de la hepatitis B derivadas de humano
- IgG:** Inmunoglobulinas
- INF- α :** Interferón alfa
- INF- γ :** Interferón gama
- IL-3:** Interleucina 3
- JAM:** Molécula de adhesión
- Jun:** Oncoproteína importante dentro de los factores de transcripción AP-1
- KD:** Kilodaltones
- LLC-PK1:** Células epiteliales derivadas de riñón porcino
- LDLr:** Receptor a lipoproteínas de baja densidad
- Myc:** Oncogén
- MAGUK:** Cinasas guanilato asociadas a membrana
- MMP-7:** Metaloproteínasa de matriz-7
- MDCK:** Células epiteliales derivadas de riñón canino
- MUPP:** multi-PDZ domain
- MAPK:** Proteínas cinasas activadas por mitógenos
- NK:** Células asesinas naturales
- PAR-3:** Partitioning-defective proteins
- PALS-1:** Protein associated with Lin-7
- PATJ:** Associated tight junctions protein
- PKA:** Proteína cinasa A
- PKC:** Proteína cinasa C
- PTEN:** Proteína supresora de tumores
- P13K:** Proteína promotora de tumores
- PEG:** Polietilenglicol
- Src:** Proteína cinasa tirosina
- SAF-B:** DNA binding protein scaffold attachment factor-B
- SR-B1:** Scavenger Receptor class B type 1
- SP:** Shering Plough
- SFB:** Suero fetal de Bovino
- SDS:** Duodecil sulfato de sodio
- TCF-LEF:** Factor de crecimiento linfoide/Factor de células T
- TER:** Resistencia eléctrica transepitelial
- TGF- β :** Factor de crecimiento transformante beta
- TNF- α :** Factor de necrosis tumoral alfa
- UA:** Uniones adherentes
- UE:** Uniones estrechas
- UG:** Uniones gap
- VAP-33:** Proteína de unión a ocludina
- VHB:** Virus de la hepatitis B
- VHC:** Virus de la hepatitis C
- ZO:** Zonula ocludens
- ZONAB:** Proteínas de unión a ácido nucleico asociadas a ZO-1
- SP:** Shering Plough
- BSA:** Albumina sérica de bovino

RESUMEN

La infección causada por el virus de la hepatitis C es una de las más comunes alrededor del mundo siendo el hepatocarcinoma celular la secuela más letal en los pacientes infectados. Aproximadamente el 2% de la población mundial se encuentra infectada con VHC. Estos pacientes son sometidos a tratamientos específicos para controlar la infección empleando principalmente la combinación de Interferón-Alfa-pegilado (INF- α -PEG) y Ribavirina. Actualmente, han sido poco estudiados los mecanismos por los cuales se lleva a cabo el anclaje y la entrada del virus a la célula huésped, debido a la falta de modelos funcionales. Recientemente se han reportado algunos coreceptores para el virus, localizados en la membrana celular como SR-B1, CD81, LDLr, claudina-1, claudina-9 entre otros. Por otro lado, se ha observado que la expresión diferencial de claudinas así como la función de barrera de las uniones estrechas puede ser regulada por diversas moléculas como factores de crecimiento y citocinas, asociadas con procesos de inflamación a nivel post y transcripcional. De acuerdo a lo anterior el objetivo del presente estudio radica en determinar si uno de los mecanismos por los cuales el Interferón-Alfa-pegilado (INF- α -PEG) y la Ribavirina retardan los efectos de la infección causada por el virus de la Hepatitis C, es la alteración en la expresión de las claudinas o de otras proteínas importantes en el mantenimiento de las uniones intercelulares como E-caderina y ocludina. Para lograr los objetivos planteados se realizaron tratamientos a las células HepG2 (humanas + VHB) con los diferentes antivirales ya sea en forma separada o conjunta. De aquí se obtuvieron fracciones citosólicas, membranales y de citoesqueleto para evaluar la expresión y/o localización de dichas proteínas por ensayos de Western Blot. Los resultados obtenidos mostraron una disminución en la expresión de claudinas -1, -3,-4,-5,-9 a nivel de membrana y citoesqueleto así como también en aquellas proteínas que forman parte de las uniones intercelulares en este caso E-caderina y ocludina.

I.- INTRODUCCION

1.1 UNIONES CELULARES

La existencia de compartimientos separados con diferente composición molecular es particularmente importante para el desarrollo y el mantenimiento de los organismos multicelulares. Casi todos los órganos del cuerpo se hallan cubiertos o revestidos por capas continuas de células llamadas epitelios, las cuales funcionan como barreras para mantener el ambiente interno de cada compartimiento. Dentro de estas capas, las células están enlazadas mecánicamente para mantener la integridad estructural. De igual forma, el espacio intercelular entre células adyacentes permanece sellado evitando la difusión de solutos a través de este sitio. [1]

Los complejos de uniones intercelulares de las células epiteliales están localizados en las membranas laterales y están formados por: las uniones gap (UG) que proveen de comunicación intercelular, los desmosomas, las uniones adherentes (UA) y las uniones estrechas (UE), (Figura. 1). La disposición de estos complejos y la intercomunicación con el citoesqueleto intracelular puede variar de acuerdo a la abundancia de las proteínas que expresen en la membrana lateral. [1] Las proteínas transmembranales que constituyen a cada una de estas uniones se relacionan con componentes del citoesqueleto estableciendo sitios de adhesión sustrato-célula y célula-célula. De igual forma, el aumento en el número de moléculas de anclaje citoplásmicas (“*scaffolding molecules*”) asociadas a estas uniones, se encuentran involucradas en diversos procesos tales como la transcripción de genes, la proliferación celular, la polaridad celular y la formación de barreras de difusión específicas. [1]

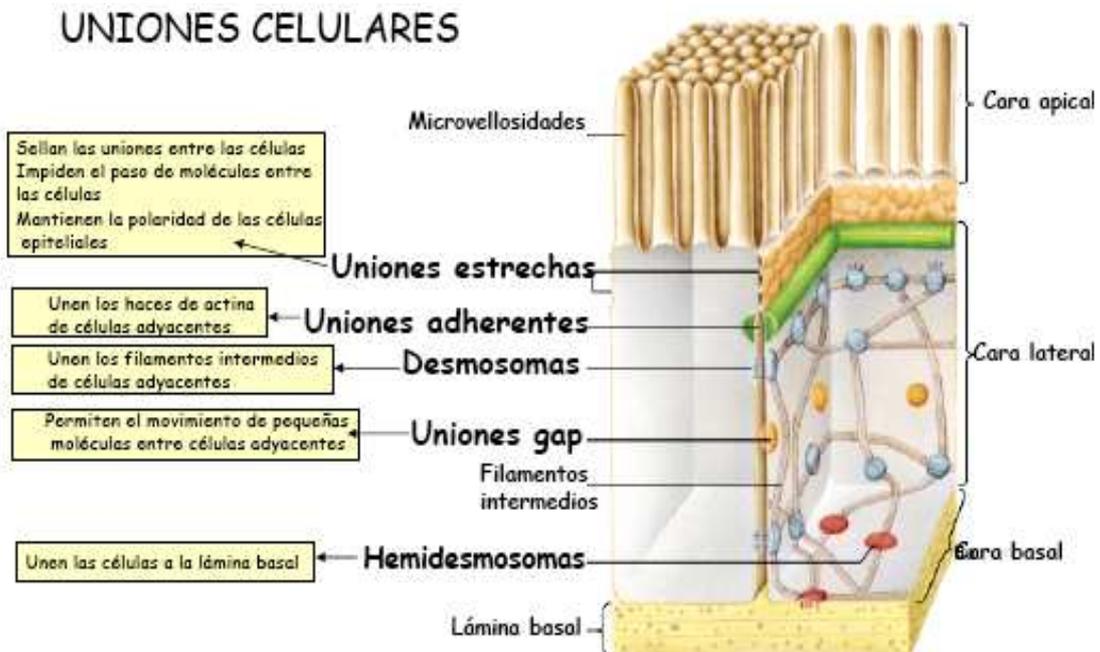


Figura 1. Esquema de las células epiteliales del intestino mostrando los principales tipos de uniones intercelulares. Como en todos los epitelios la superficie basal de las células descansa sobre la lámina basal (constituida por fibras de colágeno y proteoglicanos). La superficie apical da a la luz intestinal. (Alberts 2002)

1.1.1 UNIONES GAP

Las uniones Gap (UG) se distribuyen en los límites intercelulares de células adyacentes. Se observan como regiones en las que las membranas de dos células adyacentes se encuentran separadas por un espacio uniforme de 2 a 4 nm. Las uniones Gap median la comunicación intercelular al permitir el paso de pequeñas moléculas entre las células, como iones inorgánicos, además de otras pequeñas moléculas hidrosolubles, azúcares, aminoácidos, nucleótidos y vitaminas. Esta comunicación intercelular mediada por las uniones gap juega un papel muy importante en procesos como; el desarrollo embrionario, cooperación metabólica, control del crecimiento, proliferación y diferenciación celular [2].

Las uniones Gap están organizadas con base en proteínas transmembranales que forman estructuras llamadas conexones. Cada conexon está compuesto por un anillo de 6 subunidades proteicas idénticas nombradas conexinas.

Cada conexina tiene 4 hélices alfa que atraviesan la membrana formando un canal mayor y más permeable que los canales para neurotransmisores. Cuando los conexones de las membranas plasmáticas de dos células adyacentes están alineados forman un canal acuoso continuo (de 1.5nm) conectando ambos citoplasmas. Los canales de unión se alternan entre estados abiertos y cerrados y están controlados por el descenso en el pH o el incremento en la concentración de Ca^{+2} (Figura. 2.) [2].

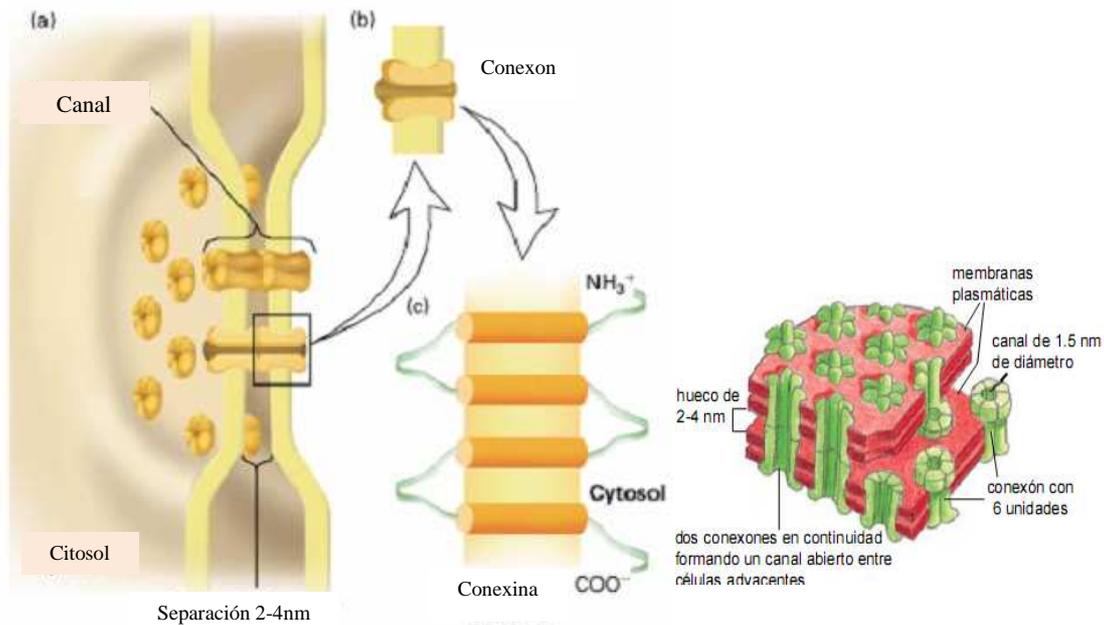


Figura 2. Estructura de las uniones Gap. a) Las uniones Gap forman una asociación de canales entre dos membranas plasmáticas. b) Un canal es un cilindro formado por seis subunidades llamadas conexinas. c) Cada conexina contiene cuatro α -hélices transmembranales. (Alberts 2002)

1.1.2 DESMOSOMAS

Los desmosomas son uniones puntiformes entre las células epiteliales adyacentes las cuales se localizan debajo del cinturón adhesivo, distribuidos de forma irregular. Están formados por proteínas del tipo de las caderinas que atraviesan la membrana celular, las cuales hacia el exterior celular se unen a caderinas de la célula adyacente y, por la parte interior (citosol) a filamentos de queratina.

Los desmosomas unen fuertemente las células epiteliales entre sí y forman una red transcelular continua con los filamentos de queratina por todo el epitelio, por lo que le confieren una gran resistencia mecánica (Fig.3). El tipo de filamento anclado al desmosoma depende del tejido: queratina (células epiteliales), desmina (fibras músculo cardíaco). A mayor tensión o estiramiento al que debe ser sometido un epitelio, mayor número de desmosomas contendrá éste [2,3].

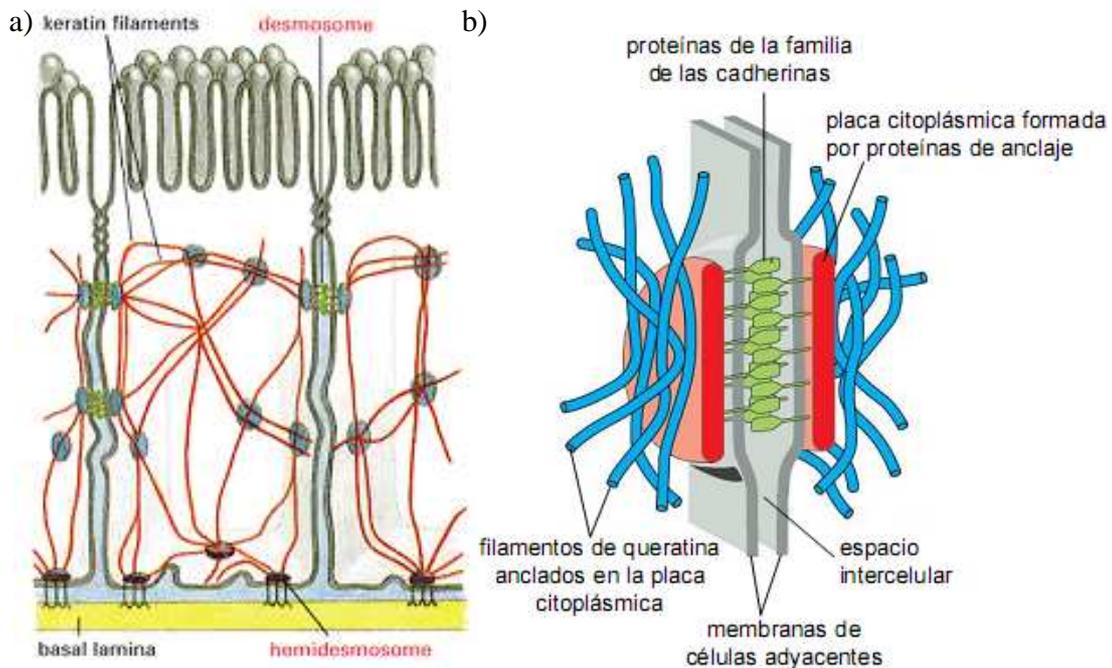


Figura.3 Desmosomas. a) Los desmosomas y hemidesmosomas son uniones de anclaje que involucran al citoesqueleto de filamentos intermedios. b) Estructura de un desmosoma. En el lado citoplasmático hay una placa densa de proteínas de anclaje intracelulares. Proteínas de adhesión transmembranal se unen a las placas e interaccionan a través de sus dominios extracelulares para mantener a las membranas adyacentes unidas mediante un mecanismo dependiente de calcio. (Albert's 2002)

1.1.3 HEMIDESMOSOMAS

Son semejantes morfológicamente a los desmosomas. Difieren tanto a nivel funcional como bioquímico; se encargan de unir el dominio basal de las células con la lámina basal. Los contactos focales para la adhesión celular están constituidos por proteínas de unión como las integrinas, receptoras de la matriz extracelular (Figura.3). [2]

1.1.4 UNIONES ADHERENTES

Las uniones adherentes se encuentran localizadas exactamente debajo de las uniones estrechas y realizan diversas funciones como por ejemplo la iniciación y estabilización de la adhesión célula-célula formando un “cinturón de adhesión continuo” lo que permite la transmisión de fuerzas mecánicas a lo largo de la lamina epitelial, la regulación del citoesqueleto de actina, la señalización intracelular y la regulación transcripcional (Figura.4). El funcionamiento de las uniones adherentes se lleva a cabo por la interacción entre glicoproteínas transmembranales de la superfamilia de las caderinas como E-caderina, y de la familia de las cateninas como p120-catenina, β -catenina y α -catenina. Todas estas proteínas controlan la formación, mantenimiento y función de las uniones adherentes [4].

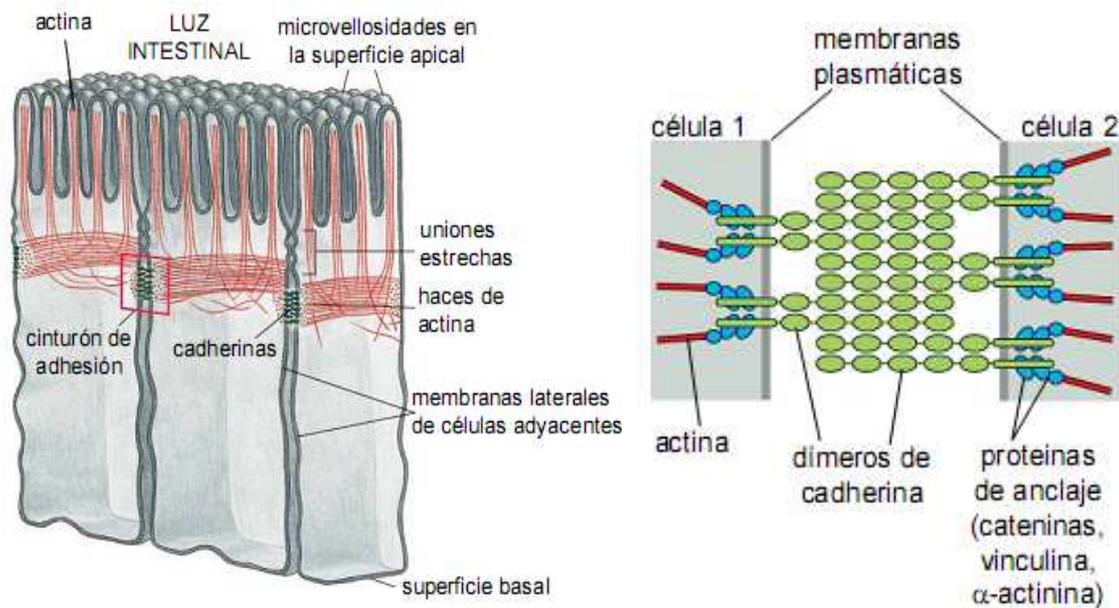


Figura 4. Las uniones adherentes forman cinturones adhesivos por debajo de las uniones estrechas y vinculan al citoesqueleto de actina entre células adyacentes. (Darnell, James E.,)

1.1.4.1 Caderinas

Son las principales moléculas de adhesión. Son glicoproteínas con un solo dominio transmembranal, con 700-750 aa, plegadas en 5 dominios, cada uno con 100 aa. Cuatro de estos dominios contienen sitios de unión a Ca^{+2} , lo cual se correlaciona con los principales

procesos morfogénicos en la segregación tisular (Figura.5). E-Caderina se concentra en las bandas de adhesión en tejidos epiteliales. E-, N-, P-Caderinas conectan los filamentos de actina del citoesqueleto de las células adyacentes, manteniéndolas unidas. Tienen una unión homofílica en la cual participa un dominio citoplasmático que interactúa con la actina por medio de la unión con proteínas intracelulares como las cateninas [4,5].

1.1.4.2 Cateninas

Las cateninas son proteínas citoplásmicas que conectan a las caderinas con el citoesqueleto de actina y con diversas rutas de señalización. Se componen de tres dominios extracelulares, un dominio transmembranal y un dominio citoplásmico con un residuo C-terminal con sitios de unión a dominios PDZ (Figura. 5) [5].

1.1.4.3 Nectinas

La familia de las nectinas, consta de 4 miembros, nectina-1, -2, -3, -4, y funcionan como receptores de adhesión semejantes a IgG. Las nectinas forman homodimeros laterales que pueden llevar a cabo interacciones homofílicas y heterofílicas con otras nectinas o con receptores semejantes a nectinas aunque con variable afinidad y especificidad. Consisten de un dominio extracelular incluyendo tres asas semejantes a IgG, una sola región transmembranal y un dominio citoplasmático con un extremo C-terminal con regiones de unión PDZ (Figura.5) [5,].

Las nectinas forman una unidad adhesiva estructural con la proteína de unión afadina conocida también como “AF-6”, proporcionando un enlace directo con el citoesqueleto de actina [5].

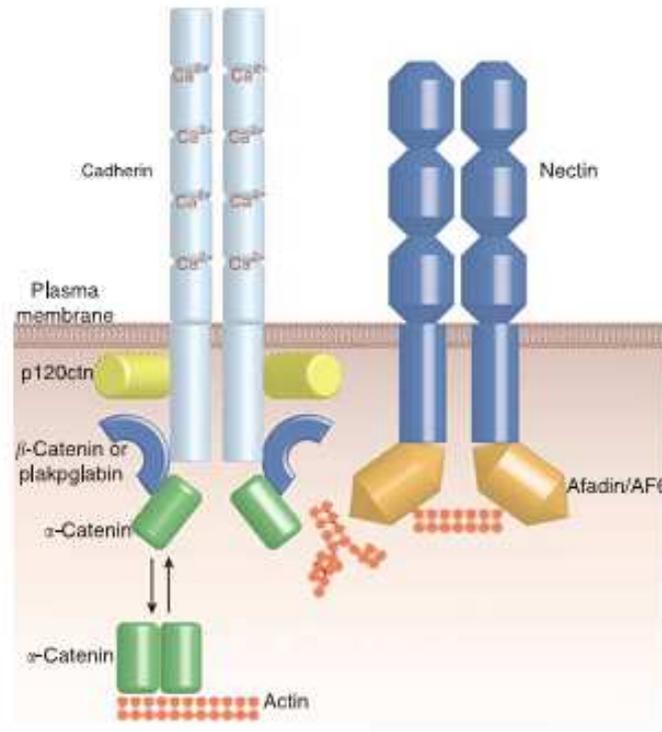


Figura 5. Representación de la estructura básica de las uniones adherentes. (Niessen, C.M., 2007)

1.1.5 UNIONES ESTRECHAS

Las uniones estrechas (UE), forman parte del complejo de uniones intercelulares de las células epiteliales y endoteliales. Las UE juegan un papel muy importante por un lado, regulando la permeabilidad paracelular de solutos mediante gradientes electrosmóticos y por otro, en la polaridad de las células, manteniendo la composición diferencial de los dominios apical y basolateral evitando la libre difusión de lípidos y proteínas entre estos compartimientos [1, 6]. Esta función permite a la membrana celular reorganizar direccionalmente las señales y transportar materiales a través del epitelio [1,6].

Pero muchos procesos fisiológicos requieren que algunos materiales como solutos, iones y moléculas de agua sean selectivamente transportados a través de las capas celulares. El transporte epitelial ocurre a través de dos rutas: la vía paracelular y la vía transcelular. El transporte transcelular es direccional y depende de energía. El movimiento

de materiales se lleva a cabo a través de las membranas celulares por medio de un gran número de canales y transportadores localizados asimétricamente sobre las membranas basolateral y apical [6]. En contraste, el transporte paracelular es pasivo y resulta de la baja difusión, electrodifusión u osmosis de los gradientes creados por mecanismos transcelulares o por gradientes generados externamente, como aquellos creados durante la ingestión de algunas sustancias como aminoácidos, vitaminas, ácidos biliares etc, dentro del tracto gastrointestinal. La ruta paracelular no muestra discriminación en cuanto a la dirección del transporte, sin embargo esto varía enormemente entre epitelios en términos de resistencia eléctrica ya que muestra pequeñas diferencias en cuanto a la selectividad iónica. La ruta paracelular complementa y funciona de manera coordinada con los mecanismos transcelulares definiendo el grado de selectividad, en el mantenimiento de la homeostasis celular, en la salida y regreso de iones y de solutos [6]. De esta manera las UE no son simplemente barreras impermeables sino que muestran una selectividad específica de iones y de moléculas de diferentes tamaños dependiendo del tipo celular.

Además de la función de barrera, las uniones estrechas funcionan como una cerca. La membrana plasmática esta dividida funcionalmente en los dominios basolateral y apical definiendo al compartimiento basal y luminal respectivamente. Los dominios de las membranas basolateral y apical difieren en la composición de lípidos y proteínas integrales de membrana. Sin embargo, debido a que estas proteínas pueden difundir lateralmente dentro del plano de la membrana plasmática modificando la polaridad celular, las UE tienen una función importante delimitando la difusión entre estos dominios [6].

La estructura de las UE ha sido evidenciada utilizando diversas metodologías. En micrografías de transmisión electrónica las uniones estrechas se observan como una serie de fusiones entre las membranas laterales de células adyacentes llamados “*kissing points*”. En micrografías electrónicas por criófractura aparecen como una serie de fibrillas o hebras de partículas intramembranas, en donde cada hebra dentro de la membrana plasmática esta asociada lateralmente con la otra hebra de la célula adyacente formando así pares de hebras entre las cuales el espacio intercelular esta borrado. La relación entre el número de hebras-uniión estrecha, así como la frecuencia de sus ramificaciones varia notablemente

dependiendo del tipo celular produciendo una marcada variación en la morfología de estas redes (Figura.6) [7].

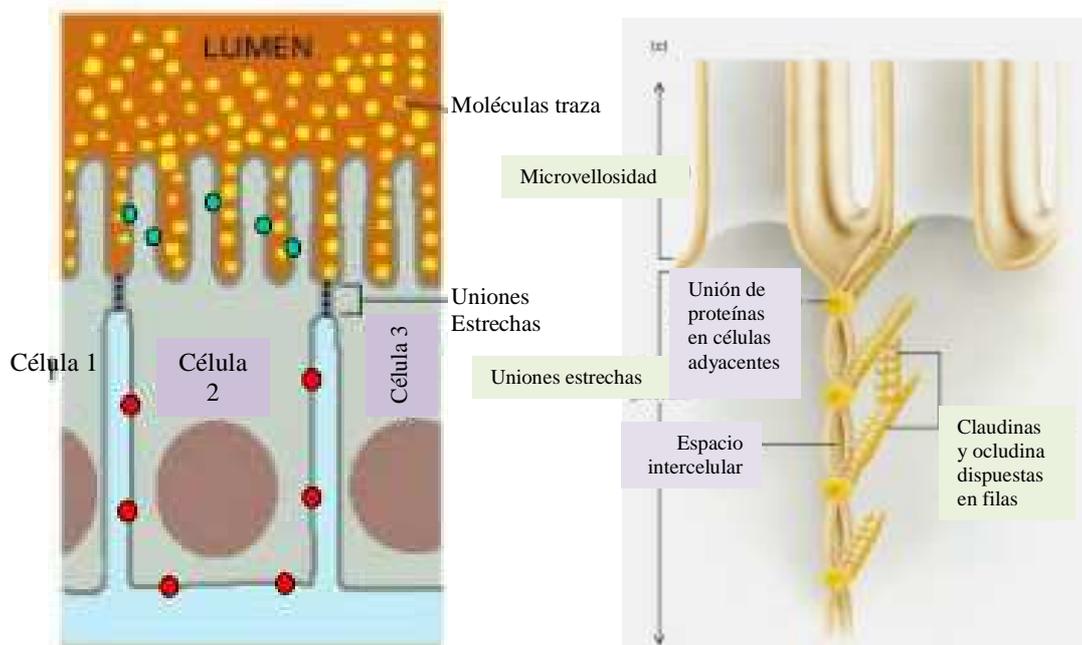


Figura 6. Localización de las uniones estrechas en las membranas. (Albert's 2002)

Desde la identificación en 1986 de ZO-1 como la primera proteína asociada a las uniones estrechas, alrededor de 30 proteínas adicionales han sido descritas. Ellas pueden ser agrupadas en 4 grandes categorías. Las primeras son proteínas de anclaje (*scaffolding proteins*) asociadas con otras proteínas citosólicas, como ZO-1, ZO-2, ZO-3, AF6 y cingulina, que parecen organizar a las proteínas transmembranales y reclutar a las proteínas citosólicas con los filamentos de actina. Las segundas son numerosas proteínas de señalamiento las cuales están involucradas en regular procesos como el ensamble y desensamble de las uniones estrechas, la regulación de las funciones de barrera, la regulación de la transcripción de genes específicos y otras rutas que en la actualidad no están bien definidas. El tercer grupo de proteínas propuesto, son aquellas cuya acción se lleva a cabo sobre la regulación del tráfico vesicular de membrana, tales como sec6/8 y la proteína de unión a ocludina, VAP-33. Por último se encuentran tres diferentes tipos de proteínas transmembranales, la proteína JAM (*junctional adhesion molecule*), la ocludina y

las claudinas. Estas son probablemente los principales candidatos para regular las barreras paracelulares (Figura. 7) [8].

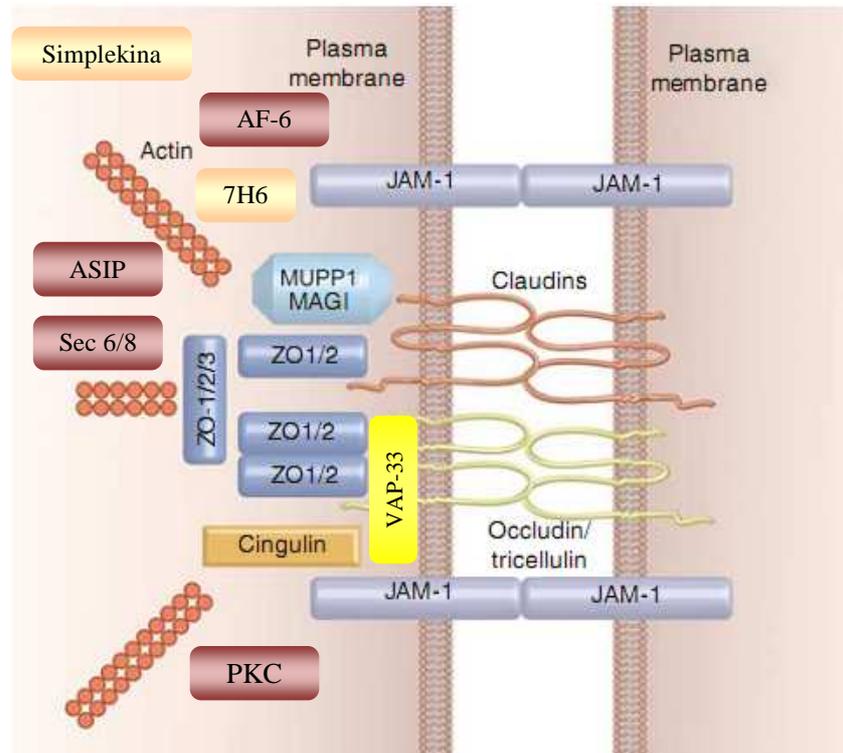


Figura 7. Modelo esquemático de las interacciones de las proteínas de las Uniones Estrechas. (Mitic, L. L, 2000)

1.1.5.1 ZOs (Zonula Occludens)

Las ZOs (ZO-1, ZO-2 y ZO-3) son proteínas que forman parte de las uniones estrechas, son miembros de una familia de proteínas llamada MAGUK (guanilato cinasa asociada-membrana), las cuales se caracterizan por poseer en su extremo N-terminal tres dominios PDZ, un dominio SH3 homologa a Src y un dominio guanilato cinasa (GUK). Estos dominios pueden unirse a GMP pero sin actividad catalítica. Estas proteínas pueden interactuar con ocludina y claudinas vía sus dominios PDZ, mientras que su extremo C-terminal puede asociarse con actina, proporcionando un enlace directo con el citoesqueleto [5, 9].

La mayoría de las proteínas MAGUK se localizan en regiones específicas de las células tales como uniones o sinapsis y actúan como proteínas de membrana asociadas a la

periferia. Estas proteínas interactúan juntas y anclan a proteínas de membrana como claudinas, ocludinas y JAMs al citoesqueleto de actina. También estas proteínas establecen numerosas interacciones proteína-proteína que reclutan en las UE a diversas cinasas, fosfatasa, proteínas G pequeñas y factores de transcripción [9].

ZO-1 se localiza en las uniones estrechas de las células endoteliales y epiteliales y también se encuentran en células no epiteliales como fibroblastos, astrocitos y células Schwann. ZO-1 además posee dos señales; una de localización nuclear y otra región carboxilo con diferentes regiones ricas en prolina. Algunos estudios muestran que ZO-1 se localiza en el núcleo durante la maduración de la monocapa epitelial y regula la proliferación interactuando con la caja-Y del factor de transcripción ZONAB. ZO-1 juega un papel importante en el ensamble y función de las uniones estrechas, ha sido implicada en la formación de las UE durante la formación del blastocisto en ratón. En células epiteliales T84 la reducción en la expresión de ZO-1 disminuye la función de barrera inducida por INF- γ [10].

ZO-2 y ZO-3 fueron identificados como compañeros de unión de ZO-1. ZO-2 también posee dos señales de localización nuclear localizadas una en el primer dominio PDZ y la segunda en el dominio GUK y algunos estudios muestran que ZO-2 se localiza en el núcleo en células epiteliales subconfluentes donde interacciona directamente con varias proteínas nucleares como Fos, Jun, C/EBP y KyoT2 y el componente de la cromatina SAF-B involucrado en el ensamble de transcritosomas, entre otros [10].

1.1.5.2 JAM

La JAM (*Junction Adhesion Molecule*) es una proteína glicosilada que ha sido localizada junto con la ocludina y claudina en las UE. Pertenece a una superfamilia de inmunoglobulinas y tiene un solo dominio transmembranal. Su porción extracelular está plegada dentro de dos dominios similares a inmunoglobulinas tipo V, y posee un dominio carboxi-terminal intracelular corto (Figura. 8). Las proteínas JAM están involucradas en la

transmigración celular y en el ensamble de las uniones celulares, así como en los mecanismos de adhesión de células epiteliales y endoteliales [8, 10].

1.1.5.3 Ocludina

Esta proteína fue identificada como la primera proteína integral de membrana localizada en las uniones estrechas. Su peso molecular aproximado es de 60 kDA, tiene cuatro dominios transmembranales y tres regiones intracitoplasmáticas (un dominio carboxilo terminal largo, un dominio amino terminal corto y una asa intracelular corta). El dominio carboxilo terminal es rico en residuos de serina, treonina y tirosina los cuales son blancos para diferentes tipos de proteínas de anclaje y proteínas cinasas (Figura. 8) [8, 9, 10]. En estudios de microscopia electrónica por inmunoréplica se ha podido medir la presencia de las UE utilizando anticuerpos contra ocludina indicando que esta proteína se incorpora directamente en estas uniones. La ocludina puede ser fosforilada en residuos de serina/treonina y la forma fosforilada parece ser preferencialmente expresada en las UE, mientras que la ocludina no fosforilada se detecta a lo largo de la membrana basolateral. Sin embargo se ha demostrado también que las UE pueden formarse sin ocludina, como es el caso de las células endoteliales, en tejidos no neuronales y en algunas especies las células de sertoli. [7, 10].

Diversos estudios muestran que la ocludina participa en las funciones de barrera de las uniones estrechas. Por ejemplo, la sobreexpresión de ocludina en monocapas de células MDCK (células epiteliales derivadas de riñón canino) incrementa el número de UE aumentando los valores de resistencia transepitelial [11].

1.1.5.4 Claudinas

Las claudinas son proteínas de 20 a 27 KDa y pertenecen a una familia multigénica constituida hasta la fecha de 24 isoformas en mamíferos. Las claudinas, comparten la misma topología con la ocludina, sin embargo no tienen ninguna similitud en cuanto a secuencia [12].

Son proteínas integrales de membrana con cuatro dominios transmembranales, una secuencia amino terminal muy corta (de 2 a 6 residuos de aminoácidos) y una secuencia carboxilo terminal, ambas localizadas en el citosol, y dos asas extracelulares separadas por un dominio intracelular de ~15 aminoácidos. Las regiones citoplásmicas son las más diversas en secuencia y varían en longitud de 21 a 63 residuos de aminoácidos [12, 13]. La primer asa extracelular, constituida de 49 a 52 residuos, contiene una secuencia altamente conservada (GLWxxC), la cual se ha reportado que determina el flujo de iones y pequeñas moléculas a través de la vía paracelular (Figura.8). Diversos estudios han demostrado que la segunda asa extracelular (constituida por 16 a 33 residuos de aminoácidos) de las claudinas 3 y 4 funciona como receptor para la enterotoxina de *C. perfringens*, y por último, la secuencia carboxilo terminal funciona como anclaje para proteínas citoplásmicas tales como proteínas ZO-1, -2, -3, proteínas con dominios PDZ (MUPP) y PALS-1, una proteína asociada a las uniones estrechas (PATJ) [13].

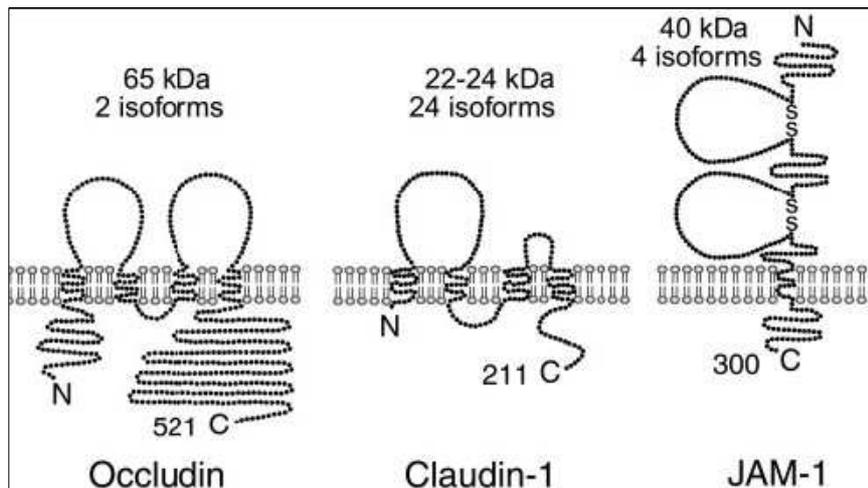


Figura. 8. Proteínas integrales de membrana constituyentes de las Uniones Estrechas. Ambas proteínas ocludina y claudina presentan cuatro dominios transmembranales pero no existe homología en cuanto a su secuencia. La primer asa extracelular de ocludina es rica en residuos de glicina y tirosina y la segunda tiene un gran número de residuos de aminoácidos cargados. En contraste, el contenido de aminoácidos en las dos asas de claudina varía notablemente en las distintas isoformas. La proteína JAM presenta dos asas extracelulares tipo Ig, en donde la primer asa, en la cual se encuentra la región NH₂-terminal, interacciona con otro miembro homólogo de la célula adyacente. (Schneeberger, E. E., 2004)

La región carboxilo terminal de las claudinas parece influir en la estabilidad de la proteína alterando la rotación de ésta y por ende afectando la permeabilidad paracelular [13, 14].

En la membrana las claudinas pueden formar oligómeros muy dinámicos estabilizados por interacciones homotípicas y heterotípicas y la estabilidad de estas interacciones puede variar de acuerdo al tipo celular [14].

1.1.6 Claudinas y permeabilidad paracelular

Se ha reportado que las claudinas son los principales constituyentes de las uniones estrechas y reguladores importantes de la permeabilidad paracelular. La ausencia en la expresión normal de claudina-1 en la epidermis de ratón resulta en una dramática pérdida de agua transepitelial, lo que sugiere que la proteína es indispensable para crear y mantener la barrera epidérmica [15, 16]. Estudios *in vitro* usando monocapas de diversas células epiteliales (p.e. MDCK o LLC-PK1) muestran que la expresión de claudina-1, -4, -7, -8, -14 y -15 incrementa dramáticamente la resistencia eléctrica transepitelial (TER) [15]. En modelos de cultivos celulares, se ha observado que las claudinas que son capaces de inducir un aumento en la TER (resistencia transepitelial) se encuentran frecuentemente *in vivo* en tejidos epiteliales con alta resistencia por ejemplo, en los segmentos de la nefrona distal. De manera contraria, claudina-2 por ejemplo, la cual se ha reportado que induce una disminución en la resistencia transepitelial, *in vivo* se localiza en epitelios laxos tales como el túbulo renal proximal y la criptas intestinales [15,17, 18]. Estos estudios pueden explicar las diferentes propiedades de barrera de las uniones estrechas observadas alrededor de diferentes tejidos epiteliales como una consecuencia de la heterogeneidad de la composición de las claudinas en la membrana plasmática.

Un modelo que explica la selectividad de los iones mediados por claudinas sugiere que las cargas de estos iones se fijan sobre las asas extracelulares de las claudinas regulando electrostáticamente el paso de los mismos. El reemplazo de algunos aminoácidos con carga negativa por aminoácidos cargados positivamente en la primer asa extracelular de claudina-15 y -4 convierte al poro selectivo de cationes en un poro selectivo de aniones [19]. Estos resultados son importantes principalmente porque demuestran que las claudinas no regulan simplemente la permeabilidad paracelular, sino también tienen un papel directo en las rutas de permeación, actuando probablemente como poros paracelulares.

1.1.7 Regulación de las claudinas

En los sistemas biológicos, las modificaciones postraduccionales de una proteína pueden determinar el estado de la actividad, localización e interacciones con otras proteínas. La fosforilación, la nitrosilación, la asilación y la glicocilación son algunos ejemplos de estas modificaciones. Las modificaciones postraduccionales de las claudinas por fosforilación pueden inducir alteraciones en la permeabilidad paracelular para iones y moléculas no cargadas, ya que estas son moduladas por diferentes mecanismos de señalización. En células de ovario, se ha mostrado que claudina-3 y -4 son sustratos de la proteína cinasa A (PKA) y proteína cinasa C (PKC), respectivamente [20]. En este estudio, las claudinas fosforiladas en residuos de treonina no se encontraron localizadas a lo largo de la membrana celular, sino en el citosol. Se sugiere que esto es causado por un incremento en la permeabilidad paracelular, probablemente debido a la pérdida de claudinas en la membrana. En células epiteliales la fosforilación de claudina-1 se requiere para que se lleve a cabo una apropiada función de barrera, [20].

La palmitoilación es otra modificación presente en claudinas. Esto promueve un aumento en la asociación de las claudinas con las membranas y regiones ricas en caveolas. Como las UE son consideradas microdominios de membrana, la palmitoilación puede incrementar la asociación de las claudinas a las UE. Además las claudinas al no ser palmitoiladas no son capaces de incrementar la resistencia de la misma manera que las que si lo están [21].

La expresión de claudinas puede ser regulada por diversas moléculas como factores de crecimiento y citocinas, dando una respuesta diferencial dependiendo de la combinación del estímulo y del tipo de claudina analizada. Se ha encontrado por ejemplo, que en monocapas de células epiteliales renales tratadas con el factor de crecimiento epidermal (EGF) la expresión de claudina-3 y -4 se incrementa mientras que la de claudina-2 disminuye. Estos cambios fueron mediados por la activación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) [15, 22].

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es capaz de inducir un incremento en la expresión de claudina-1 y reducir la permeabilidad paracelular en células epiteliales. Las células epiteliales transformadas con Ras (las cuales presentan constitutivamente activa a MAPK) pierden la señal de claudina-1 en los contactos célula-célula pero ésta se relocaliza en el citoplasma [15, 23].

Existen evidencias que apoyan la idea de que la función de barrera en las uniones estrechas esta regulada negativamente por citocinas asociadas con los procesos de inflamación a nivel post y transcripcional. La expresión de claudinas también se ha visto afectada por estos mecanismos. En pacientes con enfermedades inflamatorias del intestino se observa un aumento en la expresión de claudina-2 a lo largo de las criptas intestinales, mientras que el colon normal presenta niveles bajos de ésta claudina [15]. En contraste, claudina-3 y -4 están presentes en todo el epitelio del colon normal pero estas reducen su expresión y modifican su distribución en el epitelio en condiciones de inflamación. También citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), el interferón-gama (INF- γ) y la interleucina-13 (IL-13), regulan negativamente a las claudinas e inducen un marcado incremento en la permeabilidad paracelular en células epiteliales en cultivo [24, 25].

1.1.8 Expresión de claudinas en tumores humanos

La estructura y función de las UE se encuentran frecuentemente alteradas en carcinomas humanos, donde la pérdida de estas uniones puede favorecer, como muchos otros mecanismos, al progreso del cáncer. Los cambios en la expresión de las claudinas durante el desarrollo del tumor concuerda con la idea de que este proceso se acompaña por el desensamble de las UE y la pérdida de la adhesión célula-célula, proceso que puede jugar un papel muy importante en la pérdida de la diferenciación, de la cohesión celular, la proliferación incontrolada y en la invasividad. [15, 26]

La alteración en las UE durante la transformación celular, se ha visto reflejada en cambios en la expresión y localización de las claudinas. Claudina-1, por ejemplo, está reducida en cáncer de mama y se ha sugerido que tiene un papel como supresor de

tumores. En cáncer de colon esta claudina se ha asociado con recurrencia y baja supervivencia [27]. Por otro lado, se ha observado una regulación positiva de claudina-4 en células pancreáticas causada por una invasividad reducida, desarrollo del tumor y un elevado potencial metastásico. Claudina-3 y -4 también se han encontrado positivamente reguladas en cáncer colorectal, de ovario, gástrico, de mama, de próstata y pancreático [28]. La expresión de claudina-7 fue reportada como casi indetectable en células normales pero altamente inducida en tumores primarios de mama y metastásicos y esta expresión fue también elevada en la carcinogénesis hepatocelular, inducida por la sobreexpresión del EGF [28].

Hasta la fecha no se conocen las razones por las cuales la expresión de claudinas es diferencial en cada tejido, sin embargo esto puede estar relacionado con las características específicas de cada uno de ellos. (Tabla 1)

CLAUDINA	NEOPLASIA	EXPRESIÓN	LOCALIZACIÓN
Cldn-1	Colón	↑	Citoplasma
	Mama	↓	ND
	Esófago de Barret		ND
	Cervix	↑	ND
Cldn-3	Ovario	↑	Membrana plasmática y citoplasma
	Próstata	↑	¿? Difuso
	Mama	↑	ND
Cldn-4	Ovario	↑	Membrana plasmática y citoplasma
	Páncreas	↑	Membrana plasmática

	Estómago	↓	ND
	Mama	↑	ND
	Próstata	↑	ND
Cldn-6	Glándula mamaria	↓	ND
Cldn-7	Cabeza y cuello	↓	ND
	Mama	↓	Membrana citoplásmica
	Esófago (fenotipo invasivo)	↓	Membrana plasmática
	Estómago	↑	ND
	Cérvix	↑	ND
Cldn-10	Hígado	↑	ND
	Tiroides	↑	ND
Cldn-16	Ovario	↑	ND
Cldn-23	Estómago	↓	ND
	Mama	↓	ND
	Páncreas	↓	ND

Tabla 1. Expresión de claudinas en diferentes tumores. (Zavala, Z. 2007)

1.1.9 Papel de las claudinas en el desarrollo de tumores.

La pérdida de propiedades importantes para los epitelios como la inhibición por contacto, reflejada en la alteración de las rutas de transducción celular que modulan a las interacciones célula-célula, es típica de los estadios temprano (pérdida de polaridad celular y control de crecimiento) y tardío (invasión y metástasis) durante el progreso del tumor. Las uniones estrechas juegan un papel muy importante en la adhesión intercelular, la cual está involucrada en la proliferación, diferenciación y polarización celular, además participan en los procesos que involucran el tráfico y la fusión vesicular [28]. En este contexto es interesante hacer notar que las UE reclutan a diferentes tipos de proteínas como

es el caso de la fosfatasa homóloga a la tensina (PTEN, una proteína supresora de tumores), la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K, una proteína promotora de tumores) y proteínas importantes en la polaridad celular tales como PAR-3, PAR-6, CDC42 y PATJ, entre otras [28].

Estudios recientes muestran que las claudinas pueden estar asociadas con la activación de algunas rutas que controlan el ciclo celular, por ejemplo, la sobreexpresión de claudina-1 favorece la activación del complejo TCF-LEF (*T-cell factor/Lymphoid Enhancing Factor*)/beta-catenina. Este complejo es conocido por actuar como un factor transcripcional, induciendo la expresión de oncogenes importantes, relacionados con la proliferación celular, invasión y sobrevivencia (myc, cyclin D1, MMP-7). Sin embargo el mecanismo por el cual la sobreexpresión de claudinas puede causar la activación de esta vía de señalización aun es desconocido. [30].

1.2 Hepatitis C, papel de las claudinas.

El carcinoma hepatocelular (HCC) es una neoplasia maligna muy frecuente y es considerada uno de los cinco cánceres con mayor letalidad alrededor del mundo y la tercera causa más común de enfermedades relacionadas con cáncer. Aproximadamente el 2% de la población global se encuentra infectada por el VHC causando hepatitis crónica, cirrosis y hepatocarcinoma celular. En los pacientes con infección crónica por el VHC, el 20% desarrolla cirrosis y de estos el 5% carcinoma hepatocelular. El VHC esta generalmente confinado al hígado, sin embargo, hay una fuerte evidencia que sugiere que el VHC puede replicarse en tejidos extrahepáticos incluyendo células mononucleares de sangre periférica (CMSP) [31].

El HCC es más común en hombres que en mujeres con una incidencia aproximada de 3:1, la cual incrementa con la edad presentándose usualmente raro antes de los 40 años. La cirrosis y el daño hepático crónico, como se manifiesta en la hepatitis activa crónica, representan un factor fundamental para la predisposición al desarrollo de la cirrosis hepática crónica (CHC) (>80%). Aproximadamente de 75 a un 80% de estos casos en todo

el mundo están relacionados con infección crónica con el virus de la Hepatitis B (VHB) y C (VHC) [31].

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus de RNA pequeño que pertenece a la familia *Flaviridae*. El genoma del HCV codifica a una sola poliproteína de 3000 aa, la cual es fragmentada en 10 proteínas maduras incluyendo 2 glicoproteínas de envoltura E1 y E2, las cuales se cree que interactúan con receptores putativos en la membrana de la célula huésped [32].

Las glicoproteínas de la envoltura E1 y E2 forman heterodímeros sobre la superficie de las partículas de VHC infecciosas y restringen el tropismo viral hacia hepatocitos. CD81, una proteína con cuatro dominios transmembranales, fue identificada como el receptor putativo para la proteína E2. Subsecuentemente, debido a que algunas líneas celulares humanas, incluyendo diversas células de hepatoma, son positivas a CD81 pero resistentes a la entrada de VHC, se mostró que la expresión de CD81 es necesaria pero no suficiente para la entrada del virus en las células huésped. [33].

Otros factores celulares juegan un papel importante en la entrada del VHC, incluyendo el receptor HDL, SR-B1 (*human scavenger receptor class B type I*), LDLr (*Low-density lipoprotein receptor*) y los glicosaminoglicanos. SR-B1 inicialmente fue implicado en la entrada de VHC por su capacidad de asociarse también con la forma soluble de E2. LDLr también promueve la entrada de VHC a través de interacciones de E2 con lipoproteínas. Estas observaciones sugieren que los receptores a lipoproteínas pueden facilitar la entrada del VHC modulando el contenido lipídico de las membranas de las células blanco [34].

En lo que se refiere a las claudinas y la infección causada por el virus de la hepatitis C, se ha reportado que claudina-1 funciona como un coreceptor para el anclaje del virus con la membrana de la célula huésped. Después de interactuar con CD81, el VHC interactúa con claudina-1, resaltando la importancia de esta proteína en la regulación de la fusión entre las membranas lipídica celular y viral. La participación de claudina-1 sobre

el aumento de la entrada del VHC esta estrechamente relacionada con la patogénesis del hepatocarcinoma. Por otro lado, se ha demostrado que, para la mayoría de los cánceres humanos incluyendo el hepatocarcinoma celular, la pérdida de los contactos célula-célula favorece la transformación maligna alterando la expresión de claudina-1 y otras proteínas de la misma familia [32, 33, 34].

Estudios similares muestran que claudina-6 y -9 también se encuentran expresadas en células de hepatocarcinoma humano (Bel7402) y que los residuos N38 y V45 de la primer asa extracelular (EL1) de claudina-9 son necesarios para la entrada del VHC [33, 34].

1.3 Tratamientos utilizados actualmente contra el Virus de la Hepatitis C.

Existen diversas estrategias antivirales con las cuales se puede interferir con la habilidad de los virus para infiltrarse en las células blanco. Para realizar esto el virus tiene que pasar a través de diversas etapas, comenzando con la unión a receptores específicos en la membrana de la célula huésped y terminando con el desempaquetamiento del mismo en la célula y la liberación de su contenido. Una estrategia antiviral utilizada es el uso de agentes que interfieran con la habilidad del virus para entrar a la célula huésped. Una segunda aproximación es bloqueando el proceso por el cual se sintetizan los componentes del virus después de que éste invade la célula y por último, se pueden utilizar estrategias en la etapa final del ciclo de vida del virus, para bloquear la liberación de las formas virales completas [35].

El INF- α (pegilado o no pegilado) y la ribavirina, son compuestos que se utilizan en forma combinada para bloquear la síntesis de los virus en la célula huésped. Esta combinación es exitosa tan solo en el 50% de todos los sujetos, con una velocidad de respuesta dependiente del genotipo viral que se encuentra en el paciente [35].

1.3.1 Interferón –Alfa (INF- α)

Los interferones pertenecen a la clase de las glicoproteínas como las citocinas y se producen de manera natural por el sistema inmunológico como respuesta a agentes externos. Existen tres tipos de interferones normalmente producidos por el cuerpo como respuesta a la infección de los cuales el interferón alfa es el de mayor actividad antiviral. El interferón sintético o “convencional” ha sido la droga más utilizada para el tratamiento de la hepatitis C crónica. Hasta ahora, el interferón alfa se ha utilizado durante más de 10 años para tratar adultos con el VHC [36].

1.3.2 Interferón-Alfa-pegilado (INF- α -PEG)

Este es un interferón alfa de efecto prolongado unido a moléculas de polietilenglicol (PEG). Este tipo de interferón proporciona un nivel más constante de la droga en la sangre en comparación con el interferón “convencional”. A la fecha, se han desarrollado y estudiado dos tipos de interferones pegilados en importantes ensayos clínicos en adultos: el peginterferón- α 2a (Pegasys®, Roche) y el peginterferón α -2b (Pegintron®, Schering-Plough). Aunque las dosis utilizadas de estos dos productos difieren ligeramente, son muy parecidos con respecto a su eficacia y seguridad. Y más importante aún, es que estos productos aparentemente inhiben con mayor eficacia la replicación del VHC en comparación con los interferones “no modificados” y se les relaciona con mayores índices sostenidos de erradicación viral, por lo cual los interferones pegilados han sustituido a los interferones “no modificados” para el tratamiento de la hepatitis C crónica en adultos [37, 38,39,40].

El peginterferón α -2a (Pegasys®, Roche) y el peginterferón α -2b (Pegintron®, Schering-Plough) se forman por conjugación del interferón α -2a y α -2b respectivamente con bis-monometoxipolietilenglicol. Ambos, son producidos de forma biosintética empleando tecnología de DNA recombinante, son el producto de un gen interferónico de leucocitos humanos clonado, insertado y expresado en bacterias de la especie *E. coli*. La estructura del polietilenglicol (PEG), como el tamaño y la ramificación del grupo PEG de

40 KD determina las características de absorción, distribución y eliminación del medicamento [39, 40].

Los interferones realizan sus actividades celulares mediante su unión a receptores de membrana específicos en la superficie celular y ponen en marcha una vía intracelular de transducción de señales que activa rápidamente la transcripción génica. Los genes estimulados por los interferones regulan multitud de efectos biológicos; entre ellos, la inhibición de la replicación viral en las células infectadas, la inhibición de la proliferación celular y la inmunomodulación, por ejemplo, el incremento de la actividad fagocítica de los macrófagos y el aumento de la citotoxicidad específica de los linfocitos hacia las células blanco [36, 41].

Pegasys® promueve la maduración de células inespecíficas de la respuesta inmune como son los macrófagos y los “asesinos naturales” (NK) así como la estimulación de los linfocitos TCD4 y TCD8 de forma directa e indirectamente a los linfocitos B, ayudando así a la depuración viral por parte del huésped.

1.3.3 Ribavirina

La ribavirina es un nucleósido sintético con aceptable biodisponibilidad, que posee actividad antitumoral y probablemente inmunomoduladora. Fue una de las primeras drogas que demostró su eficacia para reducir la capacidad de reproducción de los virus. La ribavirina es eficaz contra diferentes tipos de virus, especialmente contra los virus del “ARN” tales como el VHC. La ribavirina pertenece al grupo de las carboxamidas, y puede funcionar como un nucleósido nativo parecido a la guanosina o adenosina dependiendo de su rotación. Por esta razón la ribavirina es incorporada al RNA como una base análoga de guanina o adenina, que se aparean equitativamente con cada citosina o uracilo induciendo mutaciones en la replicación dependiente de RNA en los virus de RNA. Tal hipermutación puede ser letal para los virus de RNA [42].

Existen reportes en los cuales se sabe que la ribavirina amplifica la inmunidad mediada por las células T en el hospedero, contra la infección viral a través de cambios en el fenotipo de células T tipo 2 a tipo 1. Esto puede explicar la actividad antiviral de la ribavirina contra algunos virus como el de la hepatitis C en dosis en las cuales no interfiere con la replicación de los virus cuando el tratamiento se utiliza sin interferón [43].

Con respecto a la Ribavirina y algunas proteínas de adhesión, se ha reportado que en pacientes con hepatitis C crónica y fibrosis la forma soluble de la molécula de adhesión intercelular (sICAM-1) se encuentra incrementada. El pretratamiento con interferón- α y ribavirina produjo una disminución significativa en los niveles de esta molécula en suero. De acuerdo a estos hallazgos podría pensarse que la ribavirina puede regular indirectamente la síntesis de algunas proteínas [43, 44, 45].

II.- JUSTIFICACIÓN

La infección causada por el virus de la hepatitis C es una de las más comunes alrededor del mundo siendo el hepatocarcinoma celular la secuela más letal en los pacientes infectados. Sabemos que estos pacientes son sometidos a tratamientos específicos para controlar esta infección, empleando principalmente la combinación de Interferón-Alfa-pegilado (INF- α -PEG) y Ribavirina.

Actualmente, han sido poco estudiados los mecanismos por los cuales se lleva a cabo el anclaje y la entrada del virus a la célula huésped, debido a la falta de modelos. Recientemente se ha reportado algunos coreceptores para el virus los cuales se encuentran en la membrana celular como SR-B1, CD81, LDLr, claudina-1, claudina-9 entre otros.

Por otro lado, existen estudios en los cuales se muestra que la función de barrera de las uniones estrechas así como la expresión diferencial de claudinas, son reguladas por citocinas. De acuerdo, a lo anterior nosotros proponemos estudiar si uno de los mecanismos por los cuales el Interferón-Alfa-pegilado (INF- α -PEG) y la Ribavirina retardan los efectos de la infección causada por este virus, es la alteración en la expresión de las claudinas o de otras proteínas importantes en el mantenimiento de las uniones intercelulares.

III.- HIPOTESIS

Con base en los hallazgos de que claudina-1 y claudina-9 son importantes como coreceptores para la entrada del VHC, proponemos que un mecanismo por el cual el IFN-PEG y la Ribavirina disminuyen o retardan los efectos de la infección en pacientes infectados con el VHC, podría ser que éstas moléculas regulen indirectamente la expresión de claudinas en la membrana, evitando así la entrada del virus.

Por lo anterior, se espera que al tratar a los cultivos de células epiteliales con combinaciones de PEG IFN-alfa y Ribavirina o en forma separada a concentraciones y tiempos diferentes se observarán cambios en la expresión y/o en la localización de alguna de las claudinas y de otras proteínas que forman parte de las uniones intercelulares como Ocludina y E-caderina.

IV.- OBJETIVOS

4.1 GENERAL

- Determinar si el tratamiento con IFN-PEG y Ribavirina produce cambios en la expresión y/o en la localización de claudinas en células epiteliales.

4.2 PARTICULARES

- Determinar cual de las isoformas de claudinas se expresan de manera endógena en las líneas celulares HepG2.
- Por ensayos de Inmunoblot, determinar si el tratamiento con IFN-PEG y ribavirina de manera separada o conjunta produce algún cambio en la expresión y/o en la localización de dichas claudinas.
- Determinar si los cambios en la expresión de estas proteínas son dependientes de la concentración y tiempo de exposición con el IFN-PEG y la ribavirina.
- Evaluar de manera general, si se producen cambios en la expresión de alguna otra proteína que forme parte de las uniones intercelulares como E-caderina y ocludina.

V.- METODOS

5.1 CULTIVOS CELULARES

Uno de los modelos mas utilizados actualmente para estudiar diversos procesos celulares es el cultivo celular. Este proceso se fundamenta en el mantenimiento “in vitro” de células vegetales o animales de diferentes órganos, colocadas en condiciones especiales, propicias para su sobrevivencia y multiplicación, manteniendo para esto todas sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas además de sus funciones metabólicas, semejantes a las que tenía en el huésped.

El cultivo en monocapa se basa en la adherencia de las células al sustrato y en esa forma inician la proliferación aumentando notablemente la masa celular del cultivo a lo largo de las generaciones. Muchas líneas celulares son anclaje-dependientes, es decir no inician la proliferación hasta que se han adherido al sustrato. Este es el modo normal de proliferación de la mayor parte de las células, con excepción de las células hematopoyéticas maduras [46].

Cuando el cultivo proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original tomado de un órgano de un animal, reciben el nombre de Cultivo Primario. Cuando éste cultivo primario es sometido a procesos de transformación que le confiere capacidad ilimitada de multiplicación, reciben el nombre de Líneas Celulares [46].

Las Líneas Celulares continuas están formadas por células que se diferencian genética y morfológicamente de las células de las cuales se originaron. El paso de un cultivo primario a línea se denomina transformación. Las líneas celulares pueden provenir de células que se derivan de tumores o de un proceso de transformación de un cultivo primario mediante transfección con oncogenes o con tratamiento con carcinogénicos, lo que les confiere un nuevo fenotipo.

5.2 MANTENIMIENTO Y PROPAGACIÓN DE LA LINEA CELULAR HEPG2

Para el presente trabajo se utilizó la línea celular HepG2 derivadas de hematoma humano y que son positivas al virus de la hepatitis B.

5.2.1 Descongelamiento de células HepG2

- Se descongeló un críovial de células HepG2 y se colocó su contenido en un tubo cónico. Posteriormente se adicionó 3 ml del medio de cultivo respectivo, DMEM (Sigma-Aldrich) para HepG2, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min, se descartó el medio, para posteriormente resuspender el botón celular con 1 ml de medio de cultivo, y se colocó la suspensión celular en la caja respectiva con el medio de cultivo DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado con: 0.1 ml de Insulina de SIGMA de 10 mg/ml (10 µg/ml o 0.1 U/ml), 0.2 ml de Piruvato de Sodio de GIBCO 100mM (2mM), 1.0 ml de L-Glutamina de GIBCO 200 mM (2mM), 1.0 ml de Penicilina/Estreptomicina de GIBCO 10,000U/ml/10,000 µg/ml (100U/ml/100 µg/ml), 5.0 ml de Suero Fetal Bovino de GIBCO (5%), (caja de petri p-100 (7-10 ml aprox.)), finalmente se incubaron en condiciones de 37°C y 5% de CO₂.

5.2.2 Propagación de células HepG2

- Para poder realizar los experimentos correspondientes se procedió a propagar la línea celular HepG2, se retiró el medio de cultivo, se lavaron dos veces con 5 ml de PBS 1X, y se desecho. Se adicionó 1 ml de tripsina-EDTA 1X, se incubó hasta el desprendimiento total de las células, posteriormente se inactivó la tripsina con 5 ml de medio de cultivo y se resuspendieron suavemente hasta deshacer el botón celular, posteriormente se colocó la suspensión en tubos cónicos, y se centrifugo a 1500 rpm durante 5 min, se eliminó el medio, y nuevamente se adicionaron 2 ml de medio DMEM (Sigma-Aldrich) y resuspendieron nuevamente hasta eliminar el botón celular, finalmente se tomó una alícuota para contar en la cámara de Newbauer, y se colocaron aproximadamente 7x10⁵ células por caja de petri a sembrar.

5.2.3 Congelamiento de células HepG2

Es importante disponer de alícuotas de células almacenadas en congelación con el fin de evitar la senescencia y la transformación en las líneas finitas, y evitar la pérdida accidental de una línea por muerte o contaminación.

En la actualidad el mejor método de almacenamiento es la congelación en nitrógeno líquido. Las células crecidas hasta un 70-80% de confluencia (fase logarítmica del cultivo) se resuspenden según alguno de los métodos clásicos. La suspensión celular, idealmente de alta concentración celular, debe ser congelada lentamente (descenso de aproximadamente 1°C/min) en presencia de un agente preservante como el glicerol o el dimetilsulfóxido (DMSO). Las células son transferidas rápidamente a nitrógeno líquido (-196°C) cuando alcanzan una temperatura inferior a -50°C donde se almacenan sumergidas en nitrógeno o en la fase gaseosa superior durante largos periodos de tiempo (años) sin deterioro celular apreciable. El almacenamiento a temperaturas tan bajas como -80°C es posible aunque se detecta deterioro de las células a las pocas semanas y/o meses [46].

- Para la congelación de las células, se retiró el medio de cultivo de las cajas petri a congelar, se lavó dos veces con 5 ml de PBS 1X, se retiró el PBS y se adicionó 1 ml de tripsina-EDTA 1. Se incubó hasta el desprendimiento total de las células llevando un control del tiempo para evitar que las células se dañen al estar expuestas a la tripsina. Posteriormente se inactivó la tripsina con 5 ml de medio de cultivo, se resuspendió y se colocó en tubos cónicos, se centrifugó a 1500 rpm por 5 min y se eliminó el medio. Se adicionó el volumen necesario de Cell Culture Freezing Medium-DMSO (GIBCO) o medio + Glicerol al 10% para congelar aproximadamente 5×10^6 células por vial o 1 caja de petri. Posteriormente se resuspendió y se colocó en crioviales marcados y en hielo, y al día siguiente se colocaron en ultracongelación (-70°C).

5.3 TRATAMIENTO DE CÉLULAS HepG2 CON PEG INF- α 2a y 2b Y RIBAVIRINA

Con el fin de comparar si la fuente de la cual fue preparado el antiviral, se utilizaron antivirales de diferentes marcas farmacéuticas: PEG-INF- α 2a (Roche), PEG-INF- α 2b (Schering Plough), Ribavirina (Schering Plough) y Ribavirina (Roche).

- Para evaluar si la expresión de claudinas es regulada por PEG-INF- α 2a o 2b y/o por Ribavirina se realizaron los tratamientos correspondiente. Una vez que las células se encontraron en confluencia se lavaron dos veces con PBS 1X, se retiro el medio, se colocó medio DMEM (Sigma-Aldrich) nuevo sin suero fetal de bovino (SFB) y se dejó incubar durante toda la noche. Al día siguiente se cambio a medio fresco y se adicionaron las diferentes combinaciones de PEG-INF- α 2a y 2b (10, 50, 100 y 200ng/ml) y de Ribavirina (10, 50, 100 y 200 μ g/ml) según el cuadro siguiente:

Tratamiento	Proveedor
PEG-INF- α 2b	Schering Plough
Ribavirina	Schering Plough
PEG-INF- α 2b + Ribavirina	Schering Plough
PEG-INF- α 2a	Roche
Ribavirina	Roche
PEG-INF- α 2a+ Ribavirina	Roche
Ribavirina	Sigma
Ribavirina + PEG-INF- α 2b	Sigma/ Schering Plough

Cada tratamiento se incubó a diferentes tiempos (4 y 8 hrs). Concluido el mismo, se sacó la cajita de la incubadora, se retiró el medio lavando dos veces con PBS 1X y finalmente se colocó a -70°C hasta su procesamiento.

5.4 OBTENCION DE LAS FRACCIONES SUBCELULARES

Para determinar en que región subcelular se encuentra una proteína determinada, el primer paso es la lisis celular y posteriormente la utilización de un amortiguador adecuado para la solubilización de las proteínas de interés. Pueden utilizarse amortiguadores específicos para proteínas solubles o bien que contengan detergentes si se desea separar proteínas asociadas a membrana. Para evitar o minimizar factores de manipulación que puedan dañar o desnaturalizar a las proteínas como cambios bruscos de pH, ácidos y bases fuertes, temperaturas extremas y la acción de las proteasas, el procedimiento se lleva a cabo en soluciones a bajas temperaturas (4°C) y es necesario un amortiguador de extracción que posea agentes protectores de grupos funcionales específicos de la proteína o bien inhibidores de proteasas.

- Para realizar la caracterización de las claudinas en la línea celular HepG2 y con el fin de verificar en que fracción subcelular se encuentran estas proteínas, se llevo a cabo la separación de las proteínas de citosol, de membrana (fracción soluble en Triton X-100) y de citoesqueleto (fracción insoluble en tritón X-100).

Para esto se descongelaron las cajas con los cultivos celulares, se adicionó 1 ml de amortiguador A (20 mM Tris base, 0.25 M Dextrosa anhidra, 10 mM EGTA, 2 mM EDTA) con inhibidores de proteasas y fosfatasas (leupeptina 12 µg/ml, inhibidor de tripsina 1mg/ml, coctel I y coctel II de inhibidores de fosfatasas 10 µl/ ml) a 4°C.

Se levantaron las células manualmente y se recuperó la suspensión celular en un tubo de polipropileno previamente marcado, se sonicó por 1 min a un 25% de amplitud y posteriormente se centrifugo a 39,000 rpm, 30 minutos a 4°C. Terminado el tiempo se colocó el sobrenadante (Fracción Citosólica) en tubos eppendorf previamente marcados y mantenidos en hielo y el precipitado se resuspendió con 150 µl de amortiguador A en presencia de 1% de Tritón X-100 con inhibidores de proteasas y fosfatasas como se describió anteriormente Se incubo 1 h a 4°C con agitación suave, se centrifugo a 39,000 rpm, 30 min. a 4°C, y se colocó el sobrenadante (Fracción Membranal) en tubos eppendorf previamente marcados y colocados en hielo. El precipitado resultante se resuspendió en 150 µl

de amortiguador de lisis (150 mM NaCL, 50 mM tris base, 1mM EGTA, 1mM EDTA, IGEPAL 1%, Desoxicolato de sodio 0.1%, Dodecil sulfato de sodio 0.1% (SDS)) con inhibidores de proteasas y fosfatasas a 4°C. Se incubo 1 h a 4°C con agitación suave y se centrifugó a 39,000 rpm, 30 min a 4°C. El sobrenadante resultante (Fracción de Citoesqueleto) se colocó en tubos eppendorf previamente marcados y colocados en hielo.

Finalmente se tomaron alícuotas de cada fracción para la cuantificación de proteína y se almacenaron en tubos eppendorf nuevos previamente marcados, y a cada fracción restante se adiciono amortiguador de Laemli 4X en las proporciones adecuadas y se almaceno en congelación hasta su procesamiento.

5.5 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR EL METODO DE BIO-RAD “Protein Assay” (Modificado de Bradford)

5.6.1 Determinación de la concentración de proteína en las células HepG2.

Determinar la concentración de proteína en una muestra es una técnica básica cuando se aborda un esquema de separación de una proteína en particular. Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas, muchos de los cuales se basan en: a) la propiedad intrínseca de la proteína para absorber la luz UV, b) la formación de derivados químicos, o c) la capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes.

El método utilizado en este trabajo es el método de Bradford (Bio-Rad), el cual se basa en la unión del colorante Comassie Blue G-250 a las proteínas. El colorante existe en dos formas en solución ácida, una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible (1-10 µg), simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación. Entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas.

- Para poder realizar la cuantificación de proteína generalmente se realizan diluciones de acuerdo a la fuente de la misma. En este trabajo se procedió a preparar diluciones con amortiguador A. Una dilución 1:50 para las fracciones de Membrana y Citoesqueleto (para 10 μ l de muestra se añadieron 490 μ l de amortiguador A) y para la fracción de Citosol se diluyo 1:20 (para 25 μ l de muestra se añadieron 475 μ l de amortiguador A). Todas las diluciones se colocaron en tubos limpios marcados y en hielo.
- Para una cuantificación de proteína adecuada es necesario elaborar una curva patrón, para la cual se utilizó una solución stock de albúmina de 100 μ g/ml. Esta dilución se preparo a partir de una solución de albumina de 1 mg/ml, esto es, se colocaron 500 μ l de la solución de albúmina de 1 mg/ml y se coloco en un tubo cónico nuevo, y se adicionaron 4500 μ l de agua desionizada o buffer A para obtener una concentración final de 100 μ g/ml.

Curva patrón de Albúmina (BSA)

Concentración (μ g/ml)	Volumen de Albúmina (μ l) (100 μ g/ml)	Volumen de amortiguador A (μ l)
0.0	0	1000
1	10	990
2	20	980
3	30	970
4	40	960
5	50	950
6	60	940
7	70	930
8	80	920
9	90	910
10	100	900
20	200	800
30	300	700
40	400	600
50	500	500
60	600	400

- Posteriormente se colocaron 80 µl de cada muestra problema y de las muestras de albúmina en una placa de 96 pozos por duplicado y a continuación se colocaron 20 µl del reactivo de BIO-RAD. Se mezcló y se incubó la placa a temperatura ambiente 15 min, y se registraron las lecturas en el equipo Victor2 1420 Multilabel Counter de Wallac a 560 nm. Finalmente se calcularon las concentraciones de proteína específica para cada muestra tomando en cuenta los factores de dilución realizados.

5.6 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR ENSAYOS DE INMUNOBLOT

5.6.1 Electroforesis para el análisis de proteína

La electroforesis es un método en el cual se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa.

Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta es colocada en un campo eléctrico, estas moléculas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta. Dejando transcurrir cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (el polo negativo) y aquellas cargadas negativamente se desplazarán hacia el ánodo (el polo positivo).

La electroforesis de proteínas en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada electroforesis en poliacrilamida (PAGE), se trata de un tipo de electroforesis la cual se basa en añadir compuestos que alteren las condiciones nativas de las proteínas en presencia de calor, de agentes reductores como el β-mercaptoetanol, que reduce los puentes disulfuro, duodecil sulfato de sodio (SDS) que desnaturaliza, recubre a la proteína, y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas. En este caso el método es conocido como SDS-PAGE.

El SDS es un detergente de acción desnaturalizante que se une a las cadenas polipeptídicas desnaturalizadas con una relación de 1.4 g de SDS por g de proteína, uniéndose

aproximadamente una molécula de SDS por cada dos aminoácidos de la cadena. Esta unión masiva de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas acomplejadas con SDS viajen hacia el ánodo.

- Para analizar los posibles cambios en la expresión de las claudinas y de otras proteínas que forman parte de las uniones intercelulares en los diferentes tratamientos se realizó un análisis por inmunoblot. Para esto, previamente a la realización de la electroforesis, a cada muestra de proteína se le adicionó 5% de β -Mercaptoetanol y se colocaron en ebullición durante 5 min. Se cargaron 50 μ g de proteína en geles de poliacrilamida al 12.5% en presencia de SDS y enseguida se aplicó una corriente de 50 mA por cada gel durante 1 h para geles pequeños, y de 3 a 4 h para geles grandes. Una vez terminada la electroforesis, se incubó el gel con amortiguador de transferencia durante 10 min a temperatura ambiente con agitación suave, posteriormente la proteína se transfirió a membranas de nitrocelulosa utilizando la metodología especificada para el equipo Semidry transfer (BIORAD), durante 1 h a 120 mA.
- La transferencia consiste en la inmovilización de las proteínas sobre membranas sintéticas a través de la migración de las mismas mediante un campo eléctrico. Transcurrido el tiempo se tiñó la membrana con Rojo de Ponceau para verificar la transferencia de las proteínas y se lavó con TBS 1X para retirar el colorante. El siguiente paso es la saturación de todos los lugares de unión de proteínas de la membrana no ocupados para evitar la unión no específica de anticuerpos, por lo que se bloquearon los sitios inespecíficos utilizando 5% de leche descremada en TBS 1X, durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave.
- Terminada la etapa de bloqueo, cada membrana se incubó con los anticuerpos primarios correspondientes para cada proteína durante toda la noche a 4°C con agitación suave.

Anticuerpo	Origen	Concentración	Marca
Claudina-1	Rabbit, Mouse	1µg/ml	ZYMED
Claudina-2	Rabbit	1µg/ml	ZYMED
Claudina-3	Rabbit	1µg/ml	ZYMED
Claudina-4	Mouse	1µg/ml	ZYMED
Claudina-5	Rabbit	1µg/ml	ZYMED
Claudina-6	Goat	1:500	Sta. Cruz
Claudina-7	Rabbit	1µg/ml	ZYMED
Claudina-9	Goat, Rabbit	1:500, 1µg/ml	Sta.Cruz,ZYMED
Claudina-10	Goat, Rabbit	1:500, 1µg/ml	Sta. Cruz, ZYMED
α- Actina	Mouse	1:1000	-----
Ocludina	Rabbit	1µg/ml	ZYMED
ZO-1	Rabbit	1µg/ml	ZYMED
E-caderina	Mouse	1µg/ml	ZYMED

- Al día siguiente se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con 10 ml de TTBS 1X con agitación suave. Posteriormente se incubaron con el segundo anticuerpo en TTBS 1X durante 2 h a temperatura ambiente y con agitación suave.

Anticuerpo	Dilución	Marca
Rabbit anti-Goat IgG-HPR	1: 10 000	ZYMED
Goat anti-Mouse IgG-HPR	1: 4000	ZYMED
Goat anti-Rabbit IgG-HPR	1: 10 000	ZYMED

- Finalmente se lavaron las membranas tres veces con TTBS 1X y una vez con TBS 1X para proceder a la detección de las señales específicas para cada proteína.

5.7 REVELADO

- Para evidenciar las bandas específicas de cada proteína se utilizó el protocolo reportado para el Kit de quimioluminiscencia de GE-Amersham Biosciences. La reacción quimioluminiscente ocurre cuando la energía de una reacción química se emite en forma de luz. Se emplea la peroxidasa de rábano (HRP) para catalizar la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno. Inmediatamente después de la oxidación el luminol se encuentra en un estado excitado del que pasa a la situación basal, reducida, más estable, emitiendo luz. La luz emitida tiene un máximo de emisión entre 15 y 20 minutos después de iniciada la reacción y una emisión que se puede prolongar de 2 a 3 hrs Si esta reacción se produce sobre una membrana en contacto con una película de autoradiografía ésta queda impresa.

VI.- RESULTADOS

6.1 Caracterización de claudinas en las células HepG2

Tomando en cuenta que el objetivo general del presente trabajo radica en determinar si el tratamiento con IFN α -PEG y ribavirina tienen algún efecto sobre la expresión de claudinas, y con el conocimiento de que la expresión de estas es tejido específica, en primera instancia, se determinó el tipo de claudinas que se expresan de manera endógena y en que fracción subcelular se encuentran en la línea celular HepG2 derivada de hepatoma humano, además de algunas otras proteínas que forman parte de las uniones intercelulares. Para ello se realizaron ensayos de Western blot utilizando anticuerpos específicos contra las claudinas -1,-2,-3,-4,-5,-6,-7,-9,-10, así como Ocludina, E-Caderina y ZO-1. De acuerdo a los resultados obtenidos se detectó la expresión de las claudinas -1, -3, -4, -5, -7 y -9. Las primeras cuatro claudinas se detectaron en las tres fracciones subcelulares analizadas siendo mayor la expresión en la fracción de membrana. La claudina -7 se observó en citosol y citoesqueleto y claudina-9 solo se detectó en citoesqueleto. (Figura 9)

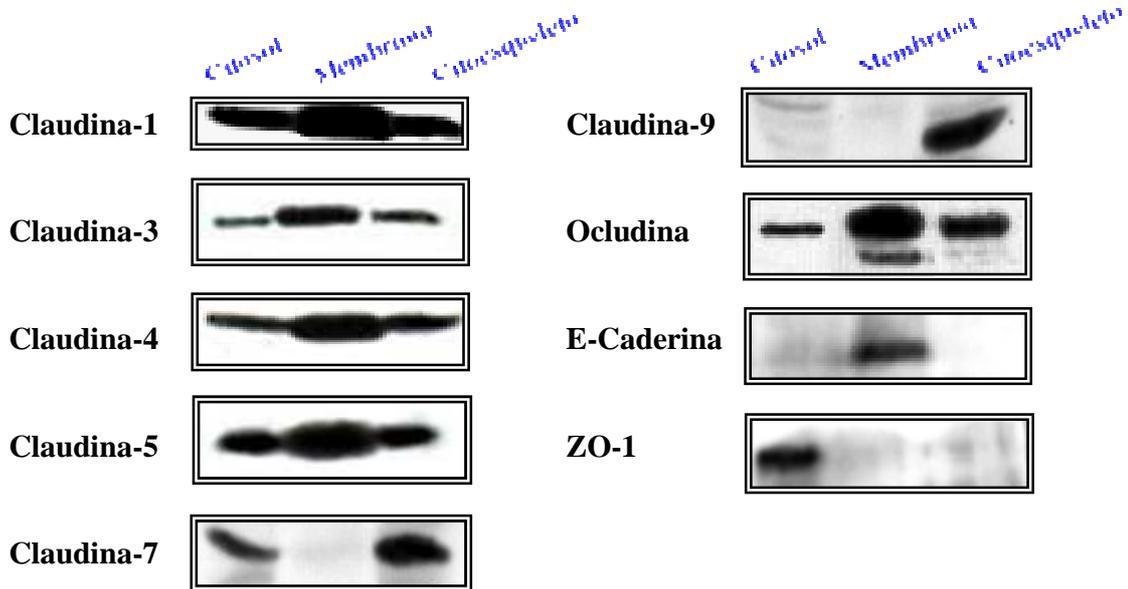


Figura 9. Expresión de diferentes tipos de claudinas en Células HepG2

De la misma manera se detectó a ocludina en las tres fracciones subcelulares, mayoritariamente en membrana, E-caderina en la fracción de membrana y finalmente ZO-1 se observó en la fracción de citosol (Figura 9).

6.2 Expresión de claudinas en células tratadas con PEG-INF- α 2a (Roche) y 2b (Shering Plough) y Ribavirina (Roche, Shering Plough y Sigma).

De acuerdo a las claudinas encontradas en las células HepG2 las cuales fueron claudina -1, -3, -4, -5, -7 y -9 y considerando que las claudinas se localizaron en las tres fracciones subcelulares a excepción de claudina-7 y -9, los siguientes objetivos fueron determinar si existía algún cambio en la expresión y/o localización de dichas proteínas con el tratamiento de PEG-INF- α 2a y 2b y Ribavirina en forma conjunta o de forma separada y determinar si los efectos que se llegaron a encontrar eran dependientes de la concentración. Para lo cual las células HepG2 se incubaron con concentraciones crecientes de PEG-INF- α 2a y 2b (10, 50 100 y 200 ng/ml) y Ribavirina (10, 50 100 y 200 μ g/ml), y se realizaron ensayos de Western Blot para determinar los posibles cambios en la expresión de dichas proteínas. Con el fin de corroborar si la concentración de proteína cargada en los geles era equivalente en todas las muestras, se utilizó como control de carga Actina para todos los tratamientos.

6.2.1 Efecto del PEG-INF- α 2b (SP) y Ribavirina (SP) sobre la expresión de claudina-1

Con el fin de determinar si el **PEG-INF- α 2b (SP) y Ribavirina (SP)** tenían algún efecto sobre las claudinas, se realizaron ensayos de Western blot utilizando muestras de fracciones celulares a partir de células HepG2 tratadas con concentraciones crecientes de los mismos. La Figura 10, muestra los resultados obtenidos para la claudina-1 cuando las células fueron tratadas únicamente con **PEG-INF- α 2b**. Como puede observarse la cantidad de claudina-1 detectada no fue modificada por este tratamiento en ningún tiempo aún a concentraciones de 200 ng/ml.

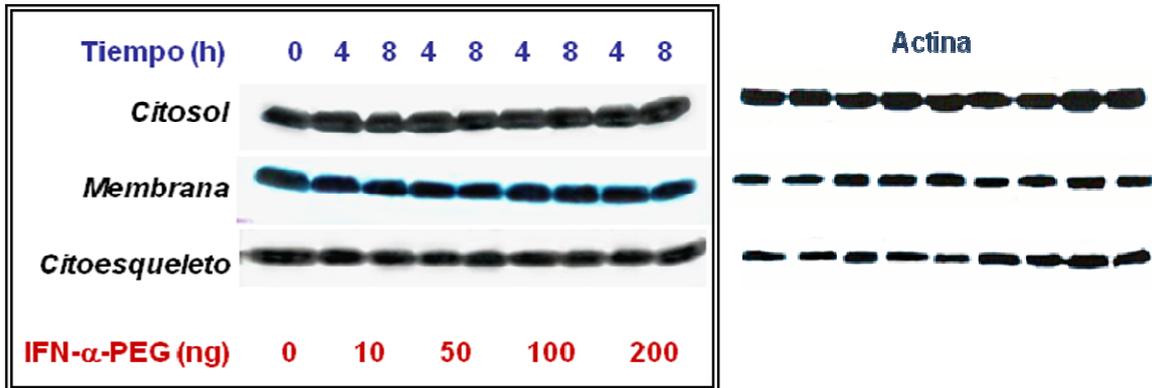


Figura 10. Expresión de claudina-1 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng de **PEG-INF-α 2b (SP)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

Para el caso del tratamiento de las células con **Ribavirina (SP)** sola los resultados no mostraron ningún cambio en la expresión de claudina-1 en ningún tiempo ni aún a 200 µg/ml (Figura 11).

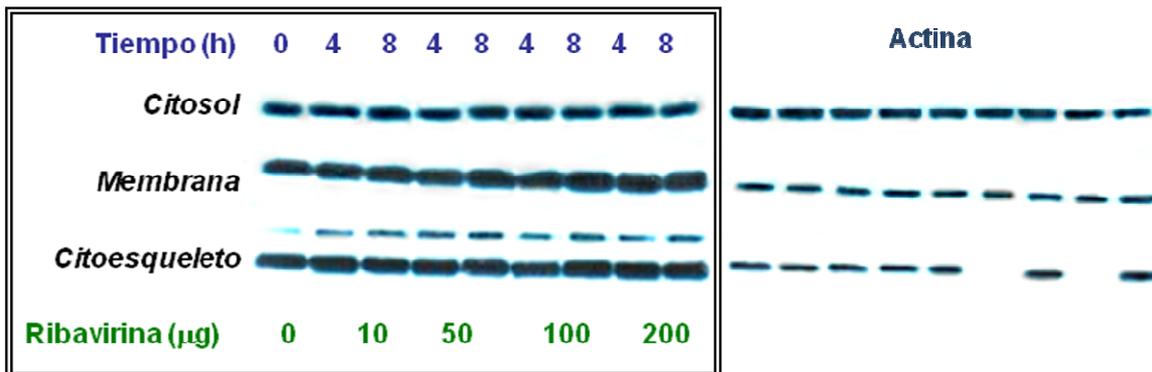


Figura 11. Expresión de claudina-1 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 µg de **Ribavirina (SP)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

Sin embargo, al tratar a las células con **PEG-INF-α 2b (SP) + Ribavirina (SP)** se observó una clara disminución en la expresión de claudina-1. Esta disminución se observó en la fracción membranal desde los 50ng/ml y 50ug/ml respectivamente a las 8 horas de incubación y la disminución fue cada vez mayor conforme se incrementaba la concentración y el tiempo de incubación. La cantidad de claudina-1 observada en las fracciones de citosol y de citoesqueleto no mostraron ningún cambio (Figura 12).

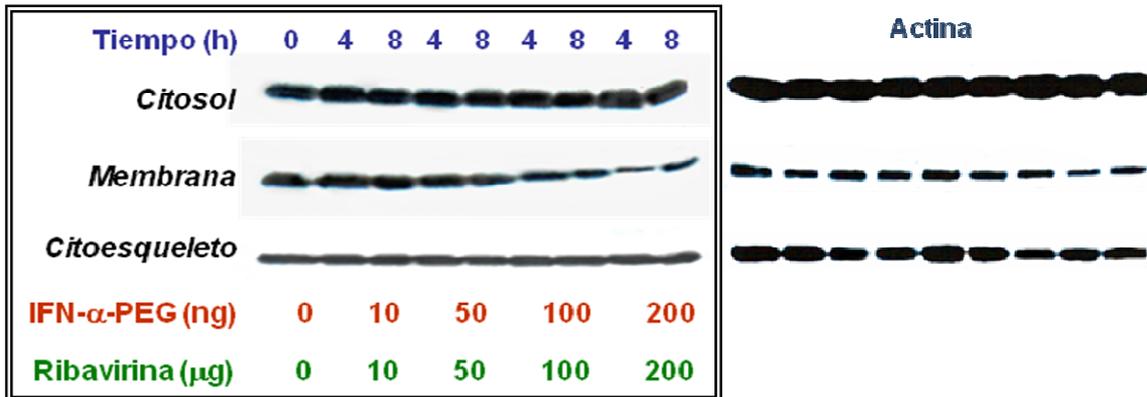


Figura 12. Expresión de claudina-1 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng y/o μg de **PEG-INF-α 2b+Ribavirina (SP)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

6.2.1.1 Efecto del PEG-INF-α 2a (Roche) y Ribavirina (Roche) sobre la expresión de claudina-1

En el caso del tratamiento de las células HepG2 con **PEG-INF-α 2a (Roche)** se observó una clara disminución en la expresión de claudina-1 en la fracción de citoesqueleto (Figura 13) a partir de 10ng a las 4h de tratamiento. En este caso se observó que a medida que aumentó la concentración del **PEG-INF-α 2a**, disminuyó la expresión de claudina-1 hasta casi desaparecer la señal. No se observó ningún cambio en la fracción de membrana y de citosol.

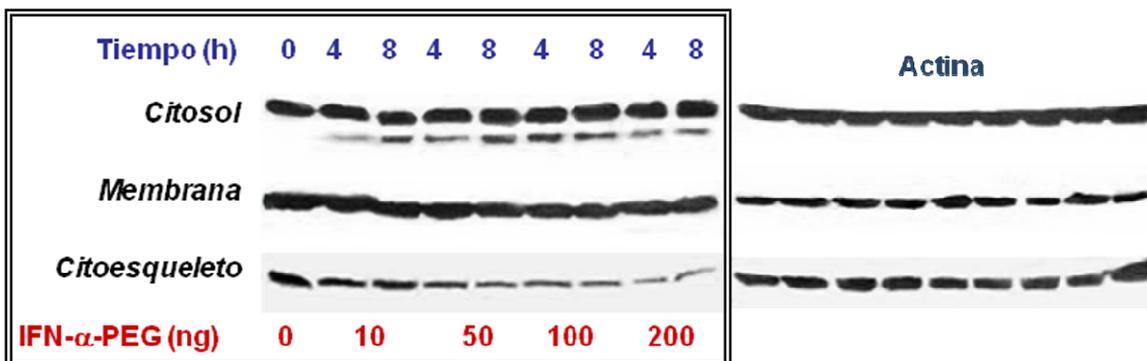


Figura 13. Expresión de claudina-1 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng de **PEG-INF-α 2a (Roche)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

Para el tratamiento con **Ribavirina (Roche)** (Figura 14), las células HepG2 mostraron cambios en la expresión de claudina-1 en las fracciones de citosol y membrana. En la

fracción de citosol se observó un aumento de claudina-1 proporcional al aumento en la concentración y fue muy evidente a partir de 100 μg de Ribavirina a las 4h. En la fracción de membrana se observó una ligera disminución a partir de 50 μg de Ribavirina a las 8h de tratamiento y esta fue más evidente a 100 μg y 8h de tratamiento. En la fracción de citoesqueleto no se detecto ningún cambio (Figura 14).

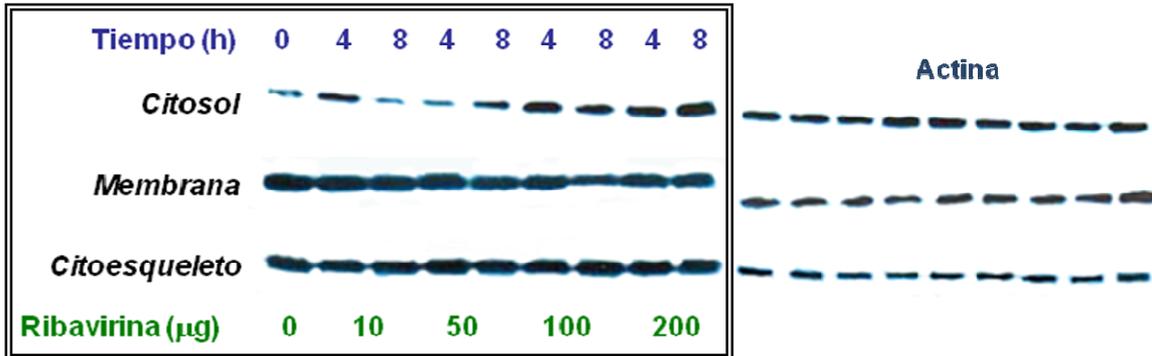


Figura 14. Expresión de claudina-1 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng de **Ribavirina (Roche)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

El tratamiento combinado con **PEG-INF- α 2a y Ribavirina (Roche)** generó cambios en la cantidad de claudina-1 en la fracción de citoesqueleto (Figura 15), siendo mas evidente a 10ng/10 μg y a las 8h de tratamiento; la pérdida de señal de claudina-1 es proporcional al aumento en la concentración y en el tiempo mas largo que es de 8h. Por otro lado, en las fracciones de citosol y membrana no se observó ningún cambio en la expresión de esta proteína.

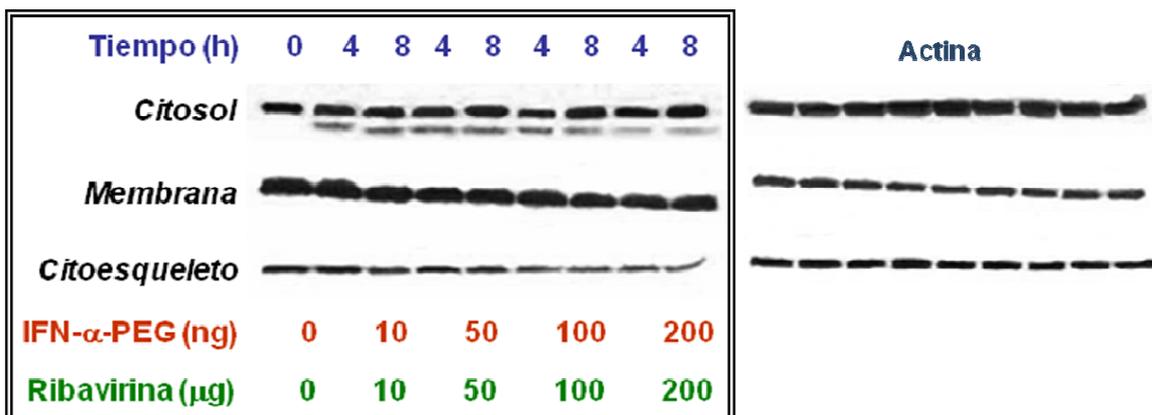


Figura 15. Expresión de claudina-1 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng y/o μg de **PEG-INF- α 2a + Ribavirina (Roche)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

Posteriormente el tratamiento con **Ribavirina (Sigma)** no mostro ningún cambio significativo en la expresión de claudina-1 (figura 16).

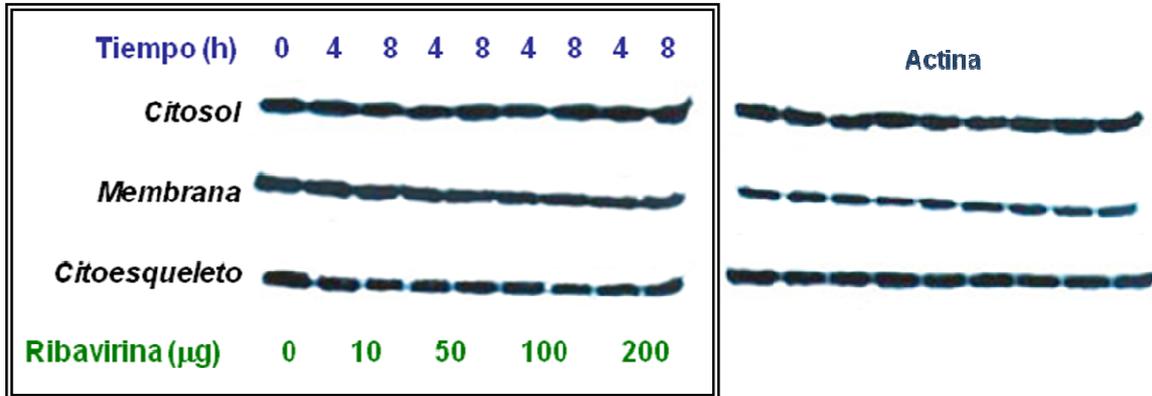


Figura 16. Expresión de claudina-1 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 µg de **Ribavirina (Sigma)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

Para finalizar los experimentos con claudina-1, se realizó el tratamiento con **PEG-INF-α 2b (SP) + Ribavirina (Sigma)** el cual generó cambios en la expresión de esta proteína en las fracciones de citosol y citoesqueleto (Figura 17). En ambos casos hubo una disminución en la expresión, sin embargo la concentración y el tiempo a la cual se observó fue diferente. Para el caso de la fracción de citosol el efecto se observó a partir de 10ng/10µg y 4h de tratamiento. En el caso de la fracción de citoesqueleto se observó una disminución de la expresión desde los 50ng/50µg y 8h de tratamiento. Aún cuando en 100ng/100µg se detectó un ligero aumento, preferentemente tiende a disminuir.

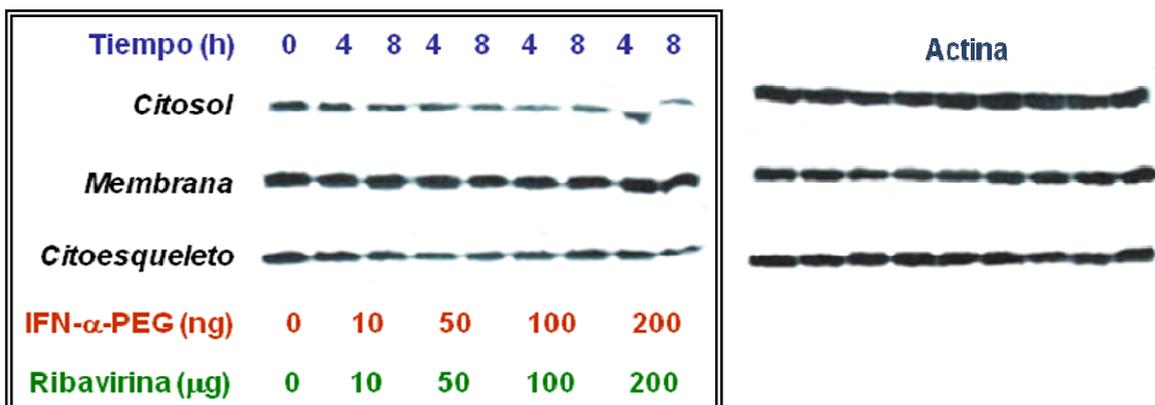


Figura 17. Expresión de claudina-1 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng y/o µg de **PEG-INF-α 2b (SP) + Ribavirina (Sigma)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

6.2.2 Efecto del PEG-INF- α 2b (SP) y Ribavirina (SP) sobre la expresión de claudina-3

Siguiendo la secuencia de las claudinas encontradas en la línea celular HepG2 los siguientes ensayos de western blot se realizaron para claudina-3. De acuerdo a estos ensayos, se observó un cambio en la expresión de claudina-3 en todos los tratamientos, mismos que se desglosarán a continuación.

Como se muestra en la (Figura 18), el tratamiento con **PEG-INF- α 2b (SP)**, tuvo un claro efecto en la fracción de citoesqueleto donde se observó una disminución de la expresión de claudina-3 a partir de 100ng a 4h de tratamiento hasta desaparecer a 200ng y 8h. Por su parte en la fracción de membrana se observó una disminución en 100ng y 200ng, sin embargo en la fracción de citosol no se observó algún cambio significativo.

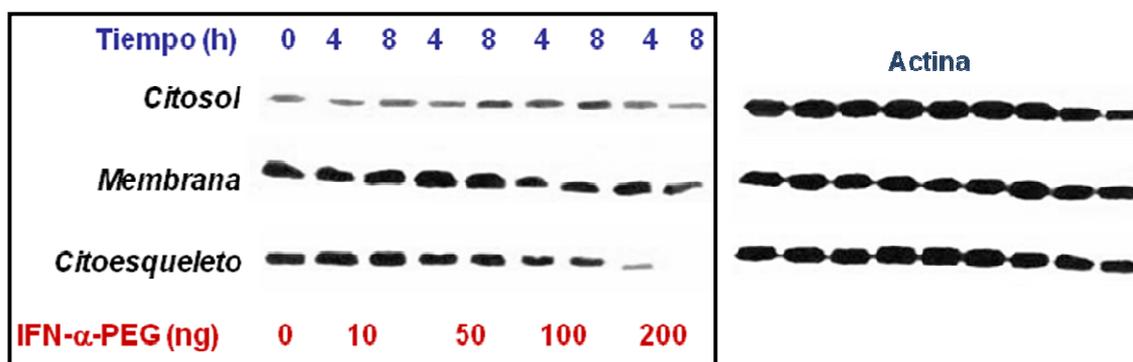


Figura 18. Expresión de claudina-3 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng de **PEG-INF- α 2b (SP)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

En segundo término se muestra el tratamiento con **Ribavirina (SP)** (Figura 19) en donde se observó una ligera disminución de la expresión de claudina-3 en la fracción de citosol a 10 μ g y a las 4h de tratamiento. En cuanto a la fracción de citoesqueleto se observó una disminución a 100 y 200 μ g y 4 horas de tratamiento, misma que se restableció a las 8 h de la misma concentración. La fracción de membrana no mostró ningún cambio.

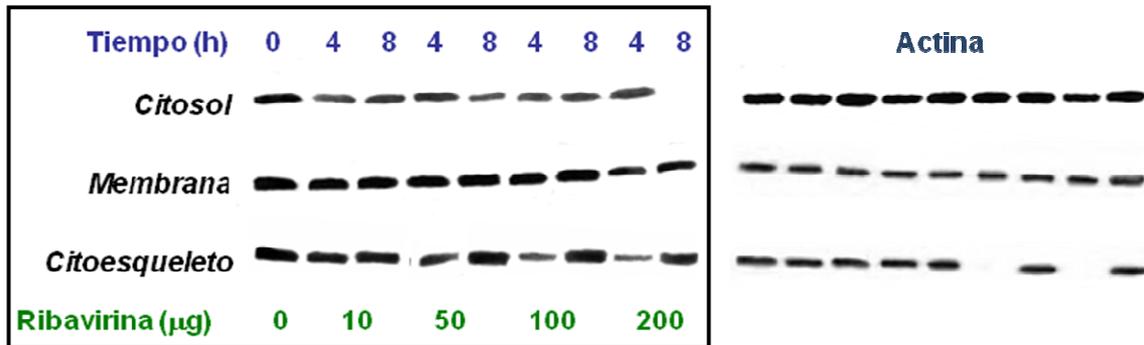


Figura 19. Expresión de claudina-3 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 µg de **Ribavirina (SP)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

En contraste con los tratamientos anteriores, en el caso del tratamiento con **PEG-INF-α 2b + Ribavirina (SP)** (Figura 20), no se observó ningún cambio.

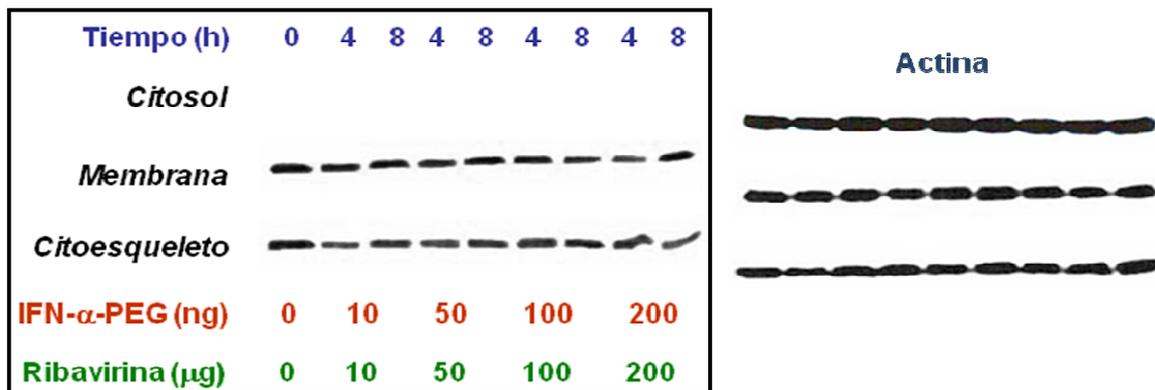


Figura 20. Expresión de claudina-3 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng y/o µg de **PEG-INF-α 2b + Ribavirina (SP)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

6.2.2.1 Efecto del PEG-INF- α 2a (Roche) y Ribavirina (Roche) sobre la expresión de claudina-3.

En la (Figura 21) se muestran los resultados obtenidos con el tratamiento con **PEG-INF- α 2a (Roche)**, en donde no se detecto cambio en la expresión de claudina-3 en las fracciones de membrana y citoesqueleto. Únicamente en la fracción de citosol se pudo observar un aumento en la expresión de esta proteína a 100ng y 8 h de tratamiento.

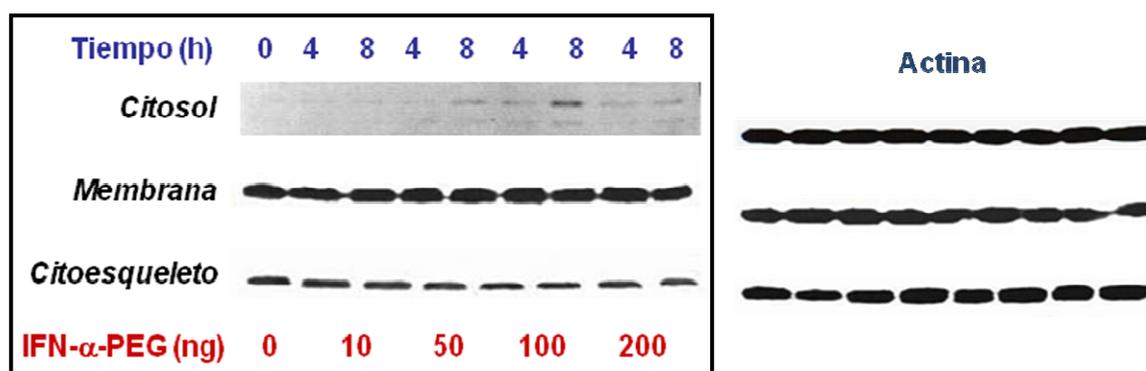


Figura 21. Expresión de claudina-3 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng de **PEG-INF- α 2a (Roche)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

En cuanto al tratamiento con **Ribavirina (Roche)** (Figura 22), la expresión de claudina-3 aumenta en la fracción de citosol a partir de los 50 μ g a las 8h y éste aumento fue proporcional al aumento en la concentración de la Ribavirina. Por otro lado, disminuyó en la fracción de citoesqueleto a partir de los 100 μ g a las 4h de tratamiento. Cabe mencionar que la proteína se detecto en forma de doblete en la fracción de citosol, lo cual sugiere que se pueda tratar de formas con modificaciones postraduccionales.

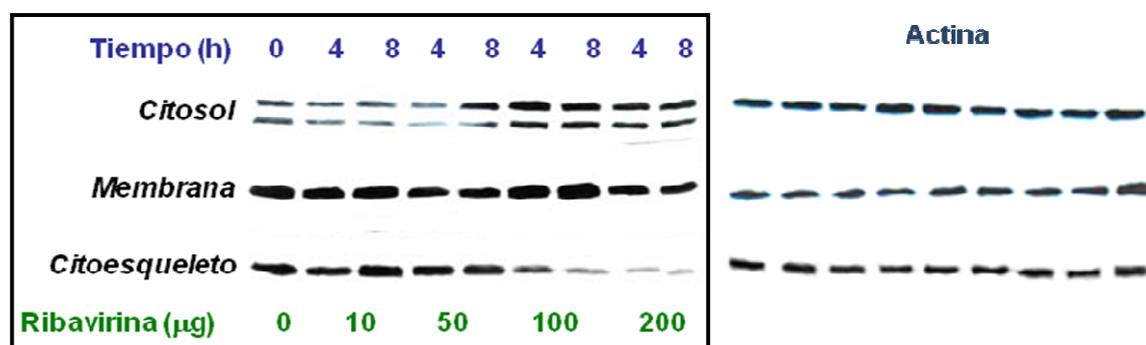


Figura 22. Expresión de claudina-3 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 μ g de **Ribavirina (Roche)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

En lo que se refiere al tratamiento con **PEG-INF- α 2a + Ribavirina (Roche)** (Figura 23), en la fracción de membrana se observó una pequeña disminución de la expresión en concentraciones de 200ng/200 μ g a las 8h de tratamiento y en la fracción de citoesqueleto hubo una disminución a partir de concentraciones de 10ng/10 μ g a 8h de tratamiento tendiendo a desaparecer en concentraciones de 200ng/200 μ g.

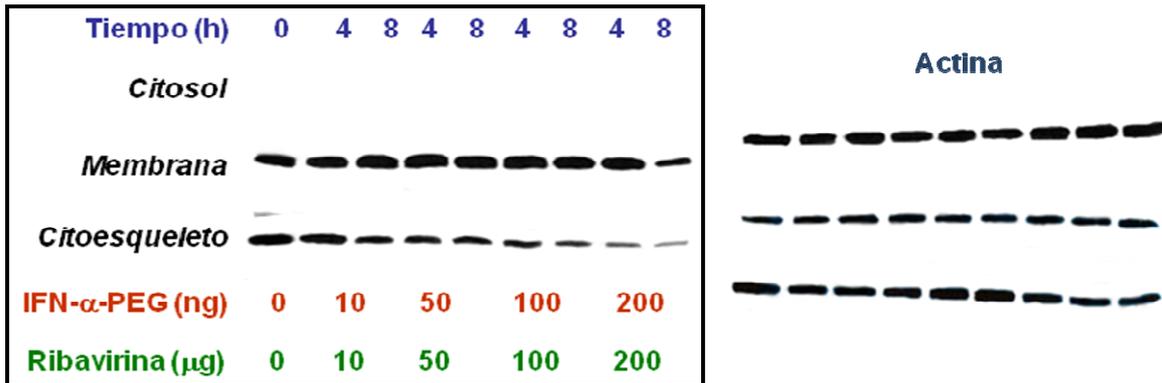


Figura 23. Expresión de claudina-3 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng y/o μ g de **PEG-INF- α 2a + Ribavirina (Roche)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

El tratamiento con **Ribavirina (Sigma)** produjo una ligera disminución en la fracción de citoesqueleto a partir de 100 μ g a las 4h. En las fracciones de citosol y membrana no hubo cambios (Figura 24). Finalmente, en lo que respecta al tratamiento con **PEG-INF- α 2b + Ribavirina (Sigma)**, se detectó una ligera disminución en la fracción de citosol a partir de 100 ng/ μ g a las 4h (Figura 25), sin embargo, estos cambios en los dos tratamientos no son significativos.

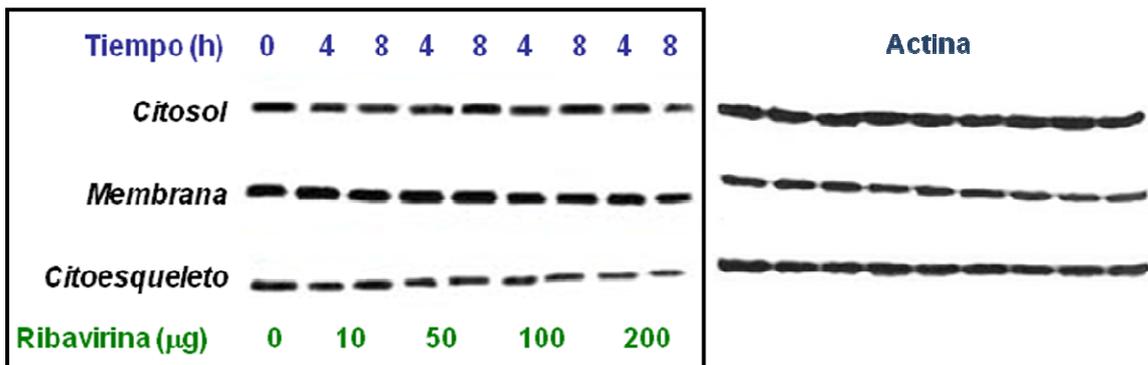


Figura 24. Expresión de claudina-3 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 μ g de **Ribavirina (Sigma)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

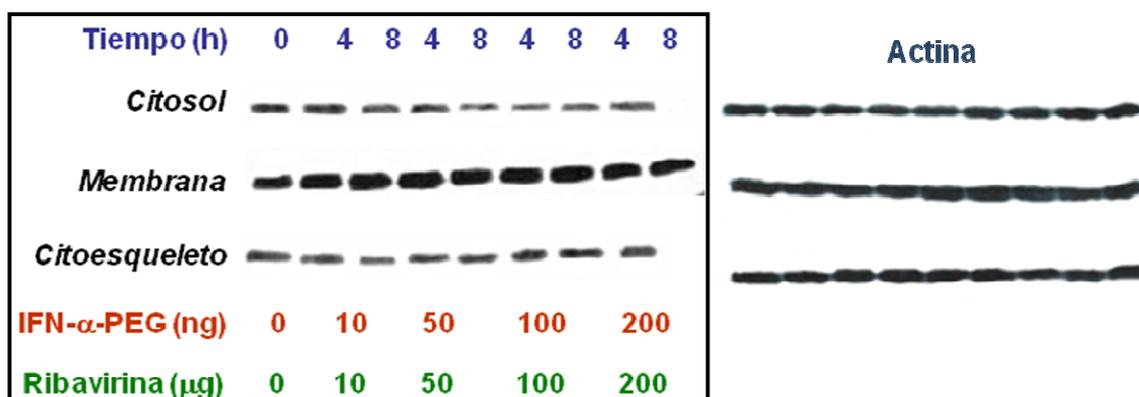


Figura 25. Expresión de claudina-3 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng y/o μg de **PEG- $\text{INF-}\alpha$ 2b + Ribavirina (Sigma)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

6.2.3 Efecto del PEG- $\text{INF-}\alpha$ 2b (SP) y Ribavirina (SP) sobre la expresión de claudina-4

Continuando con el análisis de la expresión y localización de proteínas que forman parte de las uniones estrechas, se analizó si los tratamientos con estos antivirales tenían algún efecto sobre la claudina-4. De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que esta claudina responde diferencialmente a cada uno de los tratamientos. En primer lugar cuando se realizó el tratamiento con **PEG- $\text{INF-}\alpha$ 2b (SP)** se observó un ligero aumento en la fracción de citosol a los 10 ng y 8h de tratamiento mismo que disminuyó después de los 100 ng y 4 horas de incubación. En contraste, se detectó una disminución en su expresión en la fracción de membrana a partir de los 50 ng y 8 horas de tratamiento (Figura 26).

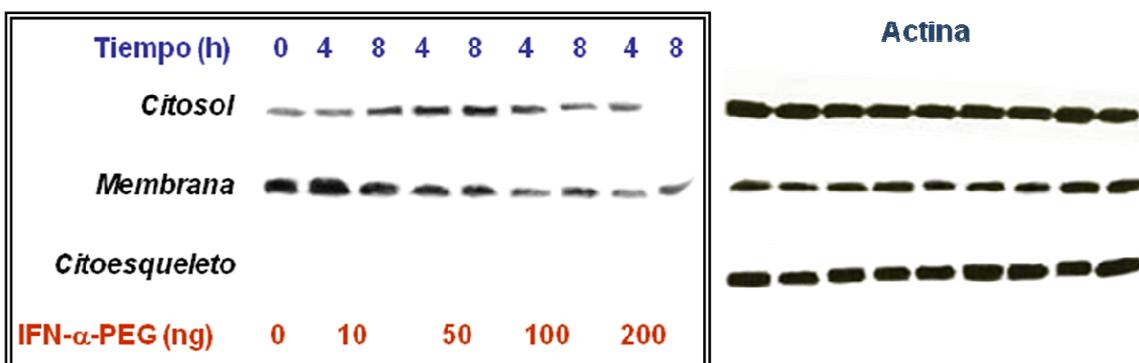


Figura 26. Expresión de claudina-4 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng de **PEG- $\text{INF-}\alpha$ 2b (SP)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

Posteriormente, cuando las células HepG2 se trataron con **Ribavirina (SP)** se observó una ligera disminución en la detección de esta proteína en la fracción de membrana a 100µg a las 8h y en 200µg a las 4 y 8h de tratamiento. Interesantemente, en la fracción de citoesqueleto se observó la expresión de esta proteína a partir de los 50µg de incubación con la Ribavirina (Figura 27).

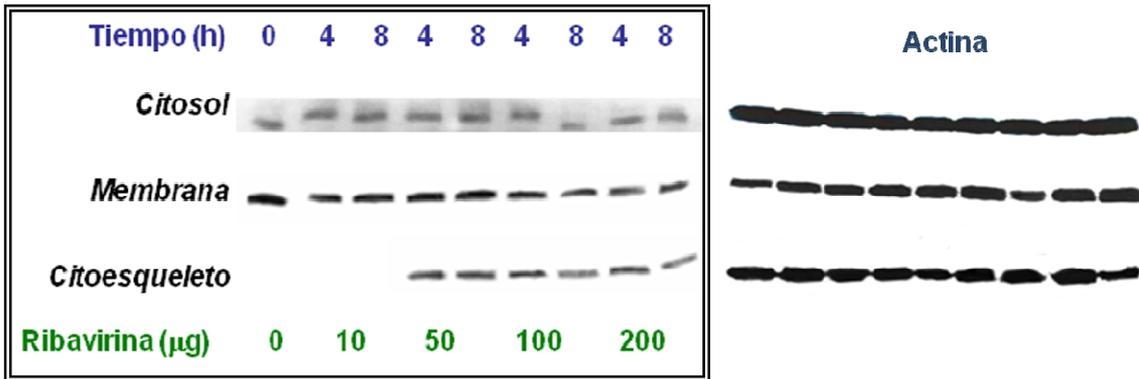


Figura 27. Expresión de claudina-4 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 µg de **Ribavirina (SP)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

En el caso del tratamiento en forma conjunta con **PEG-INF-α 2b + Ribavirina (SP)**, la expresión de claudina-4 no se modificó en las fracciones de citosol y de membrana (Figura 28). Sin embargo, en la fracción de citoesqueleto se observó una disminución de la expresión a partir de 50ng/50µg a las 4h, desapareciendo casi en su totalidad con 200ng/200µg y 8h de tratamiento.

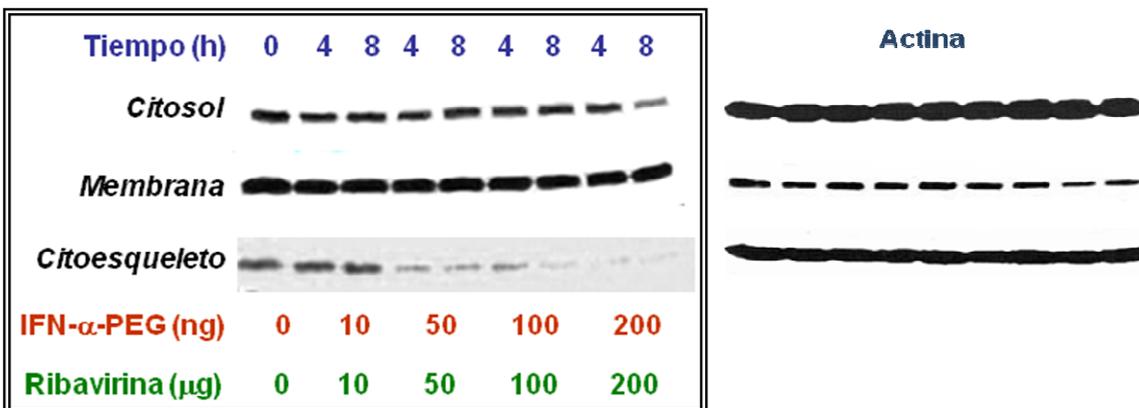


Figura 28. Expresión de claudina-4 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng y/o µg de **PEG-INF-α 2a + Ribavirina (Roche)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

6.2.3.1 Efecto del PEG-INF- α 2b (Roche) y Ribavirina (Roche) sobre la expresión de claudina-4.

Al igual que con el tratamiento con PEG-INF- α 2b (SP), el tratamiento con PEG-INF- α 2a (Roche) produjo un aumento de esta proteína con 50ng y 100ng desde las 4h en la fracción de citosol, pero en 200ng disminuyó en ambos tiempos (Figura 29). Por otro lado y a diferencia de los tratamientos anteriores, en la fracción de membrana no se observó la expresión de claudina-4 en ninguna concentración, lo cual puede sugerir una posible relocalización de esta proteína. Finalmente en la fracción de citoesqueleto no se observó algún cambio en la expresión de claudina-4.

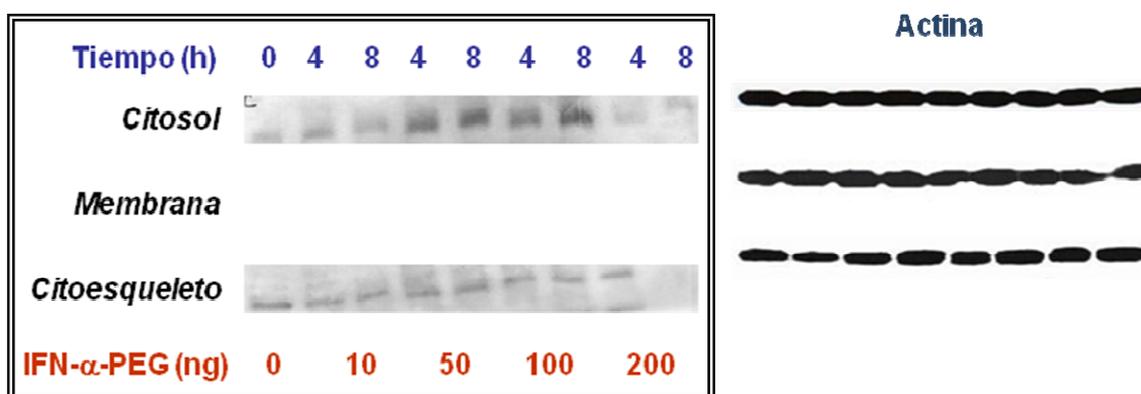


Figura 29. Expresión de claudina-4 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng de PEG-INF- α 2a (Roche) a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

Continuando con el tratamiento con Ribavirina (Roche), se detectaron algunos cambios en membrana y citoesqueleto, sin embargo estos no fueron muy claros ya que se observó una ligera disminución en la fracción de membrana a partir de 50 μ g a 4h de tratamiento y en la fracción de citoesqueleto no se observó expresión de la proteína en 100 μ g y 200 μ g a 4 h de tratamiento únicamente (Figura 30).

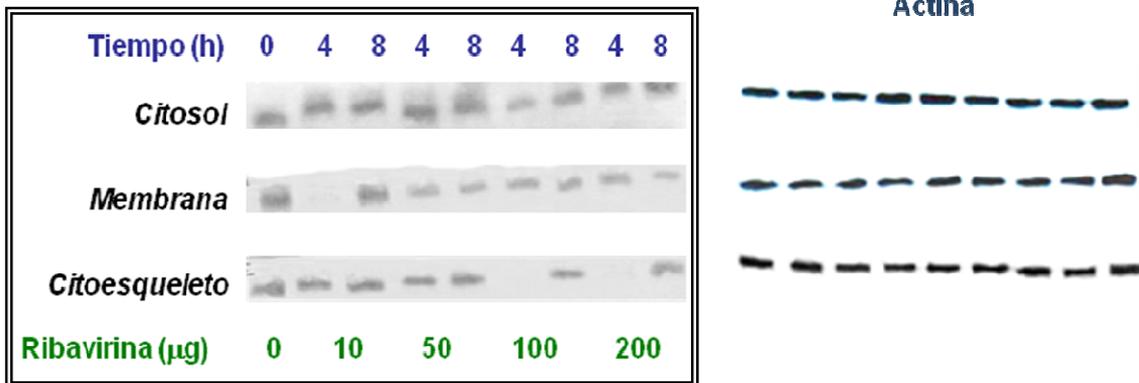


Figura 30. Expresión de claudina-4 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 µg de **Ribavirina (Roche)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

En el caso del tratamiento en forma conjunta con **PEG-INF-α 2a + Ribavirina (Roche)**, se observó una disminución de la expresión de claudina-4 en las fracciones de citosol en 100ng/100µg a 4h y 200ng/200µg a 4h, en membrana se observó una ligera disminución en 200ng/200µg a las 8h, finalmente en citoesqueleto no se observó ningún cambio significativo (Figura 31).

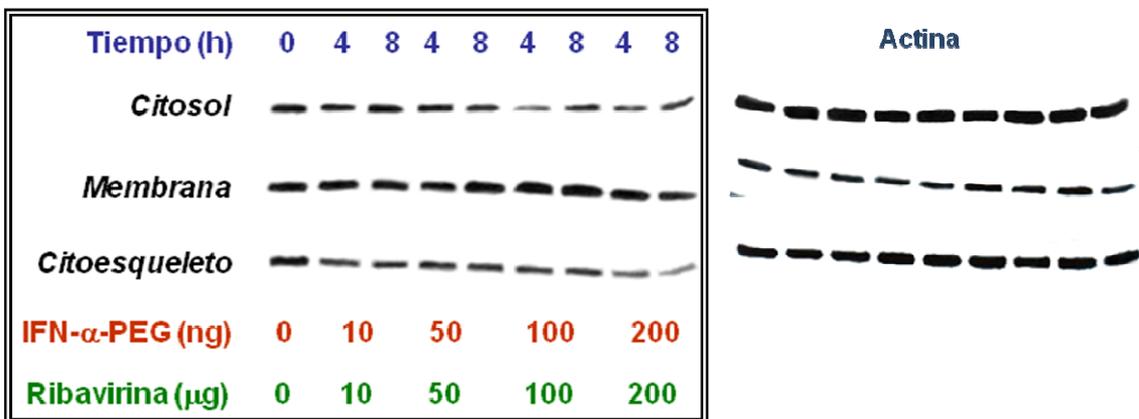


Figura 31. Expresión de claudina-4 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng y/o µg de **PEG-INF-α 2a + Ribavirina (Roche)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

El siguiente tratamiento para claudina-4 fue el de **Ribavirina (Sigma)**, en donde se observó un aumento significativo a partir de 50µg y 8h de tratamiento en la fracción de citosol. Por otra parte, en la fracción de citoesqueleto se observó un ligero aumento con 50µg y 4h de tratamiento (Figura 32).

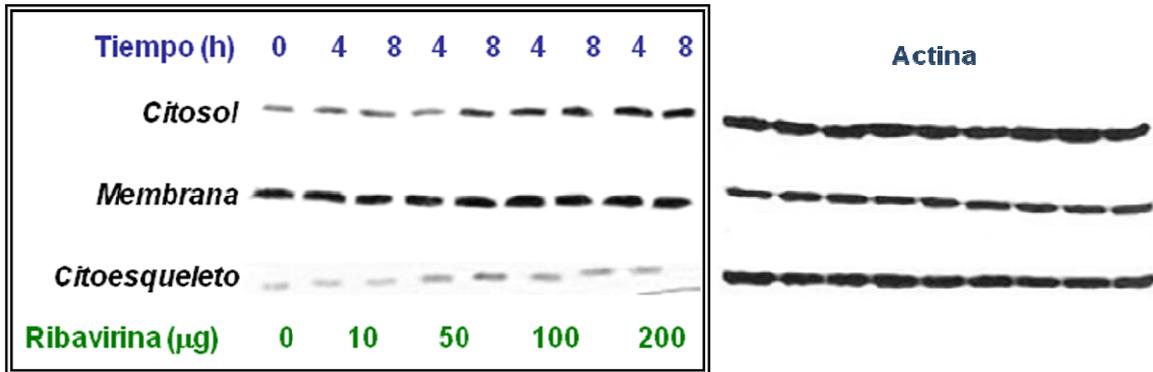


Figura 32. Expresión de claudina-4 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 µg de **Ribavirina (Sigma)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

Por ultimo la (Figura 33) muestra el tratamiento en forma conjunta con **PEG-INF-α 2b (SP) + Ribavirina (Sigma)** en el cual se observaron algunos cambios en la fracción de membrana y de citoesqueleto. En la fracción de membrana la expresión de claudina-4 se vio disminuida rápidamente a partir de 10ng/10µg a las 8h de tratamiento. En lo que se refiere a la fracción de citoesqueleto se observo un ligero aumento de la proteína en la concentración de 200ng/200µg de tratamiento a las 4h.

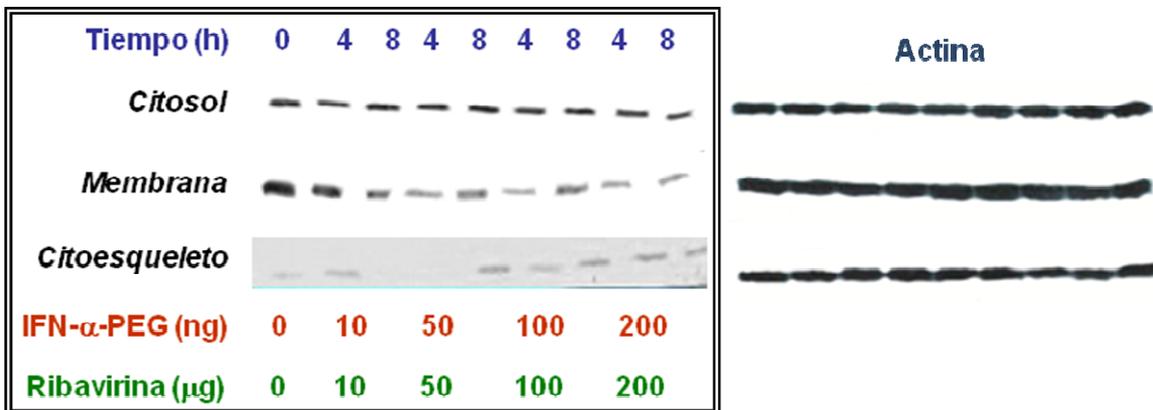


Figura 33. Expresión de claudina-4 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng y/o µg de **PEG-INF-α 2b + Ribavirina (Sigma)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

6.2.4 Efecto del PEG-INF- α 2b (SP) y Ribavirina (SP) sobre la expresión de claudina-5

Continuando con la caracterización de las claudinas, la siguiente proteína analizada en las células HepG2 fue claudina-5. Para esta proteína, al igual que algunas de las anteriormente mostradas, se observó un efecto claro en la disminución de esta proteína con el tratamiento conjunto de **PEG-INF- α 2b (SP)** y **Ribavirina SP**.

En primer término tenemos al tratamiento con **PEG-INF- α 2b (SP)** en donde la expresión de claudina-5 sufrió cambios en las fracciones de membrana y citoesqueleto (Figura 34). En el primer caso se observó un aumento muy evidente con 50ng del IFN, la cual disminuyó a partir de 100ng a las 4h de tratamiento. En el caso de la fracción de citoesqueleto se observó una disminución a partir de 50ng a 8h. Cabe mencionar que la señal de la proteína se detectó como doblete lo cual nos podría hablar de que probablemente se estén induciendo cambios postraduccionales en estas proteínas.

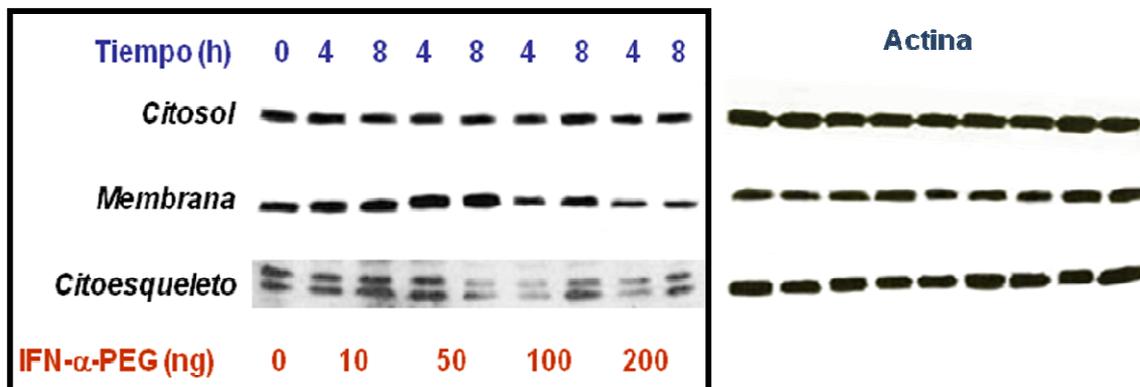


Figura 34. Expresión de claudina-5 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng de **PEG-INF- α 2b (SP)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

En el caso del tratamiento con **Ribavirina SP**, la expresión de claudina-5 presentó cambios en la fracción de citosol (Figura 35). En la fracción de citosol la proteína sufre una primera reducción en 50 μ g a las 4h y posteriormente la reducción fue más evidente en 100 μ g a las 4h y hasta los 200 μ g de tratamiento. En las fracciones de membrana y citoesqueleto no se observaron cambios significativos.

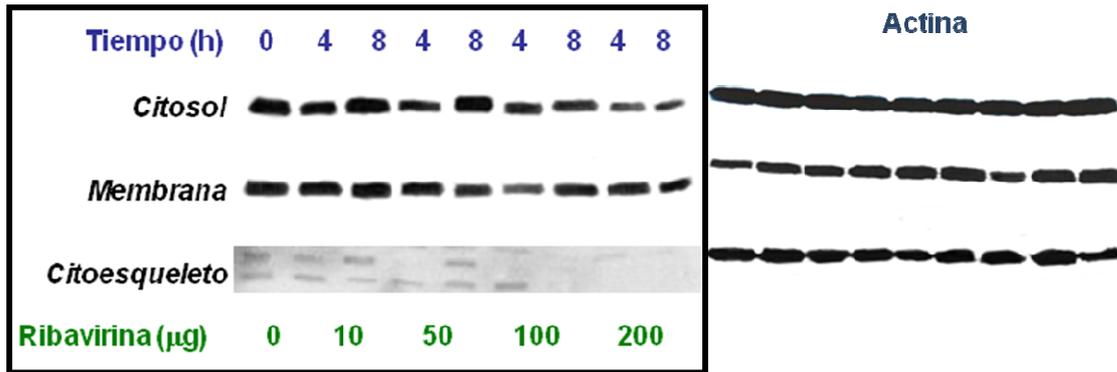


Figura 35. Expresión de claudina-5 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 µg de **Ribavirina (SP)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

Y en lo que se refiere al tratamiento con el **PEG-INF-α 2b (SP) + Ribavirina (SP)** se observó disminución de la proteína en las tres fracciones analizadas (Figura 36). En las fracciones de citosol y membrana hubo una reducción evidente a partir de 50ng/50µg y 4h de tratamiento. En la fracción de citoesqueleto esta reducción se observa a partir de los 10ng/10µg y 4h de tratamiento.

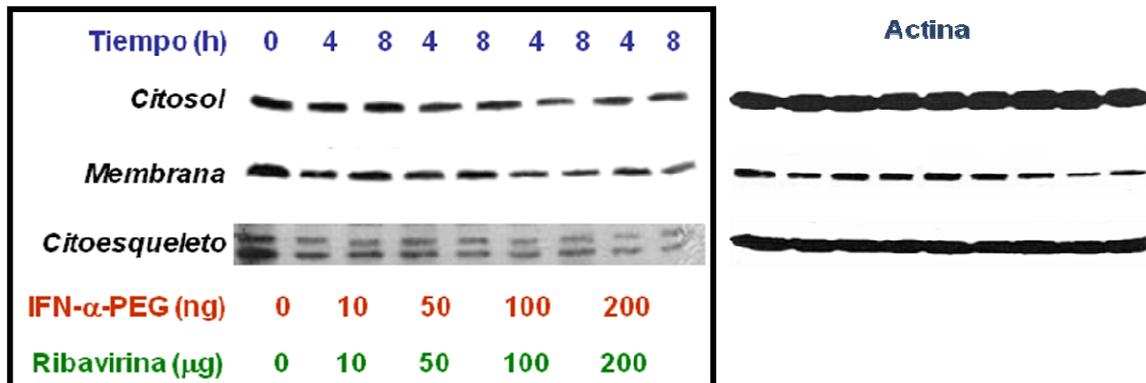


Figura 36. Expresión de claudina-5 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng y/o µg de **PEG-INF-α 2b + Ribavirina (SP)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

6.2.4.1 Efecto del PEG-INF- α 2b (Roche) + Ribavirina (Roche) sobre la expresión de claudina-5

En cuanto al tratamiento con **PEG-INF- α 2a (Roche)** (Figura 37), se observó un aumento en la expresión de claudina-5 en las fracciones de citosol y membrana a 100ng y 50ng y 4 horas de tratamiento respectivamente. En el caso de la fracción de citoesqueleto no se observó ningún cambio significativo.

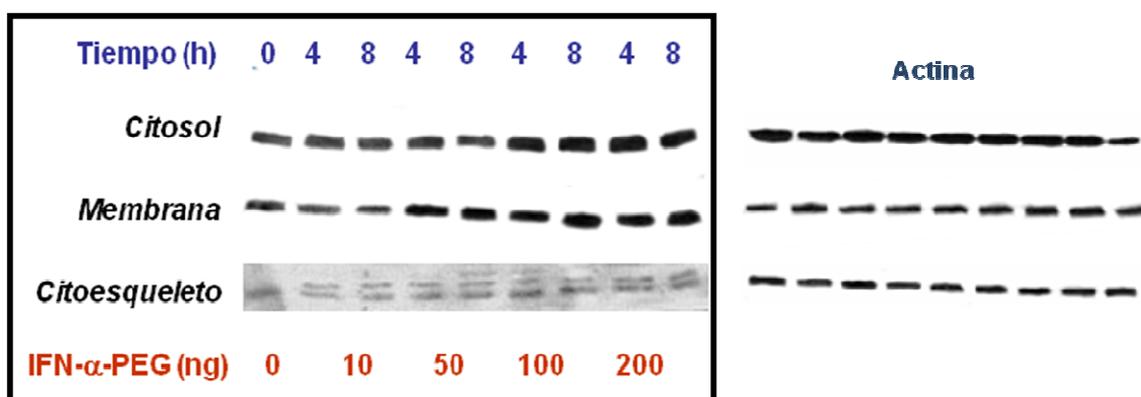


Figura 37. Expresión de claudina-5 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng de **PEG-INF- α 2a (Roche)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

De manera contraria al efecto del PEG-INF- α 2a en el tratamiento con **Ribavirina (Roche)** (Figura 38) se observó disminución de la proteína en las fracciones de citosol y citoesqueleto, a partir de 50 μ g a las 8h y a 100 μ g a las 4 y 8h de tratamiento para citosol, y de 50 μ g a las 4h para la fracción de citoesqueleto.

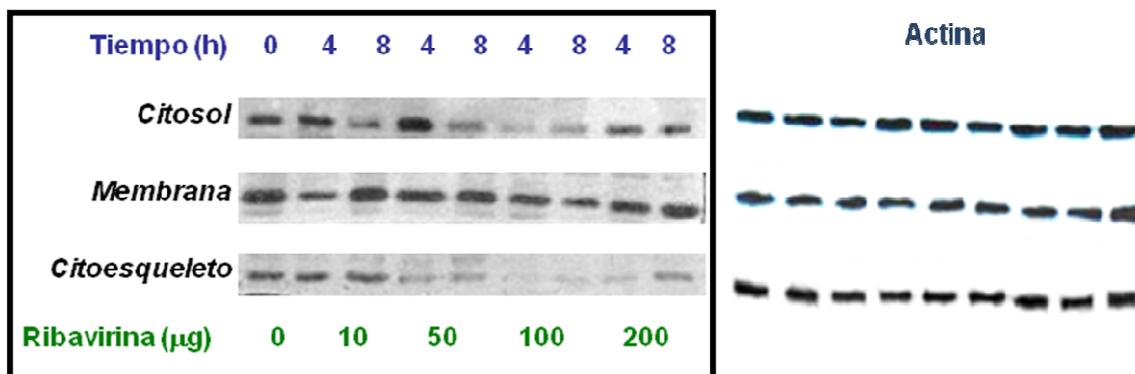


Figura 38. Expresión de claudina-5 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 μ g de **Ribavirina (Roche)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

El tratamiento con **PEG-INF- α 2a + Ribavirina (Roche)** produjo una reducción en la expresión de claudina-5 en las fracciones de membrana y citoesqueleto (Figura 39). En la fracción de membrana esta reducción se dio a partir de los 200ng/200 μ g a las 4h y en la de citoesqueleto a los 100ng/100 μ g a las 4h desapareciendo por completo la señal en 200ng/200 μ g a las 8h.

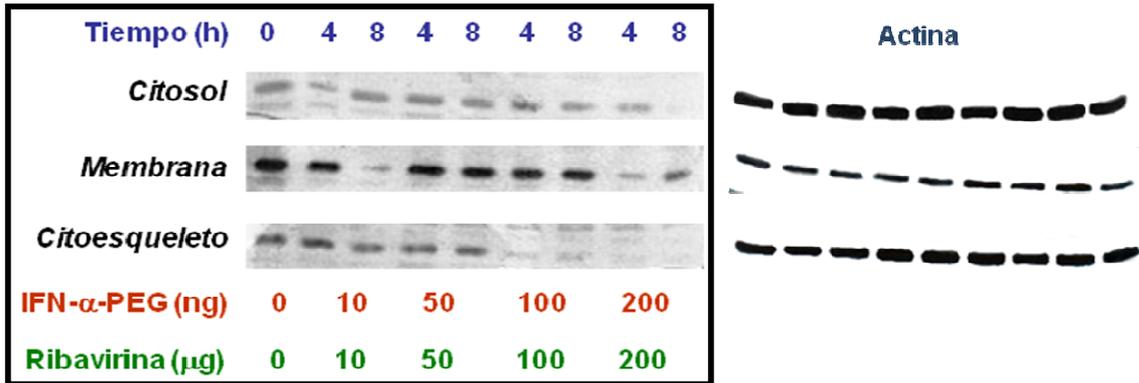


Figura 39. Expresión de claudina-5 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng y/o μ g de **PEG-INF- α 2a + Ribavirina (Roche)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

Posteriormente, el tratamiento con **Ribavirina (Sigma)**, produjo una disminución en las fracciones de membrana y citoesqueleto (Figura 40), en la fracción de membrana fue más evidente a las 8h a partir de 50 μ g mientras que en citoesqueleto la disminución fue proporcional al aumento en la concentración del tratamiento así como del tiempo.

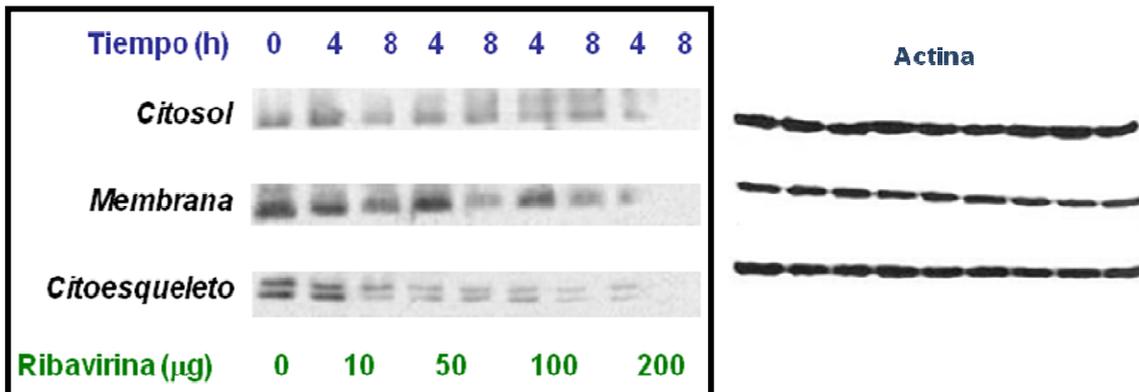


Figura 40. Expresión de claudina-5 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 μ g de **Ribavirina (Sigma)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

Finalmente el tratamiento con **PEG-INF- α 2b (SP) + Ribavirina (Sigma)** (Figura 41), produjo un ligero aumento de la proteína en la fracción de citosol la cual comienza a partir de 50 μ g a las 8h. En la fracción de citoesqueleto no hubo cambios significativos y no se detectó proteína en la fracción de membrana.

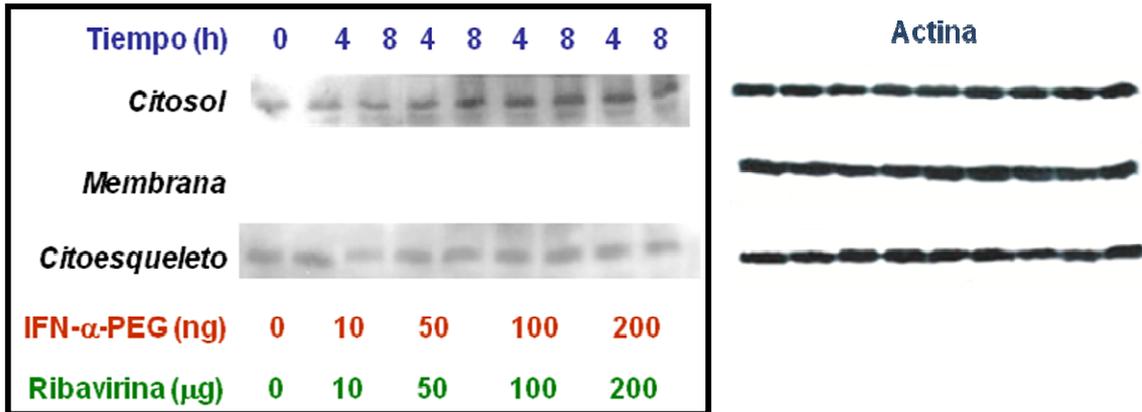


Figura 41. Expresión de claudina-5 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng y/o μ g de **PEG-INF- α 2b + Ribavirina (Sigma)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

6.2.5 Efecto del PEG-INF- α 2b (SP) + Ribavirina (SP) sobre la expresión de claudina-9

Finalmente, otra proteína que también se encuentra dentro de la familia de las claudinas y que fue detectada en las células HepG2 fue claudina-9. Aún cuando en el apartado de la caracterización de la línea celular se encontró que esta proteína se localizó únicamente en la fracción de citoesqueleto, se analizaron los posibles cambios en su expresión en las tres fracciones subcelulares obtenidas.

Como se observó en el tratamiento con **PEG-INF- α 2b (SP)** (Figura 42), claudina-9 se detectó solo en la fracción de citosol, con 10 ng a las 8h disminuye la expresión y a partir de 50 ng de tratamiento desapareció la señal.

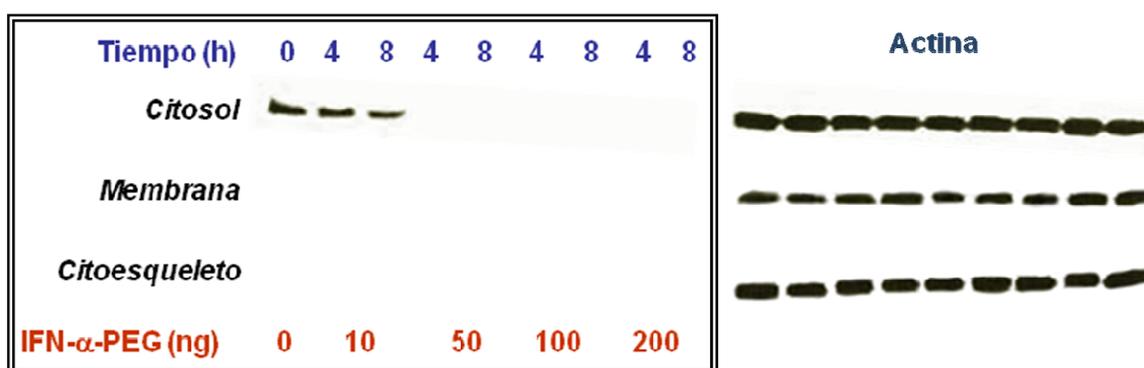


Figura 42. Expresión de claudina-9 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng de **PEG-INF- α 2b (SP)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

De la misma forma que para el tratamiento con **PEG-INF- α 2b (SP)**, en el tratamiento con **Ribavirina (SP)** (Figura 43) la señal fue detectada solo en una fracción subcelular. En este caso fue la fracción de citoesqueleto en donde se detectó una disminución de la expresión en 10 μ g a las 4h y a partir de 50 μ g desapareció la señal.

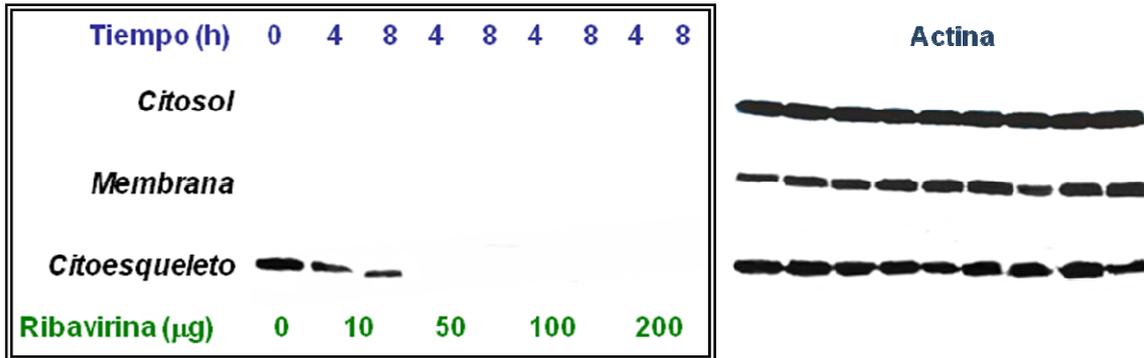


Figura 43. Expresión de claudina-9 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 µg de **Ribavirina (SP)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

En el tratamiento con **PEG-INF-α 2b (SP) + Ribavirina (SP)** (Figura 44), esta proteína fue detectada solo en la fracción de citoesqueleto y disminuyó su expresión desde los 10ng/10 µg a las 4h de tratamiento con respecto al control.

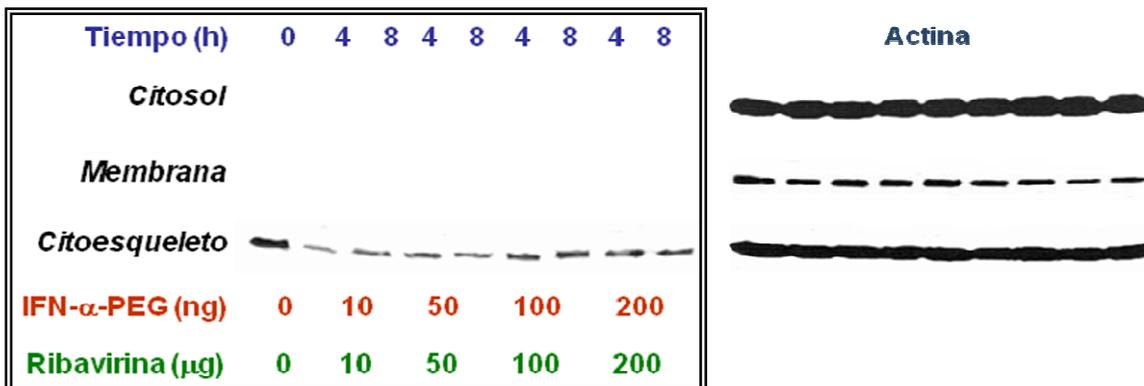


Figura 44. Expresión de claudina-9 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng y/o µg de **PEG-INF-α 2b (SP) + Ribavirina (SP)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

6.2.5.1 Efecto del PEG-INF- α 2b (Roche) + Ribavirina (Roche) sobre la expresión de claudina-9

En lo que se refiere al tratamiento con **PEG-INF- α 2a (Roche)**, (Figura 45), **Ribavirina (Roche)**, (Figura 46) y **PEG-INF- α 2a + Ribavirina (Roche)**, (Figura 47), se detectó a claudina-9 solo en la fracción de citoesqueleto y en todos los tratamientos no se observó ningún cambio significativo.

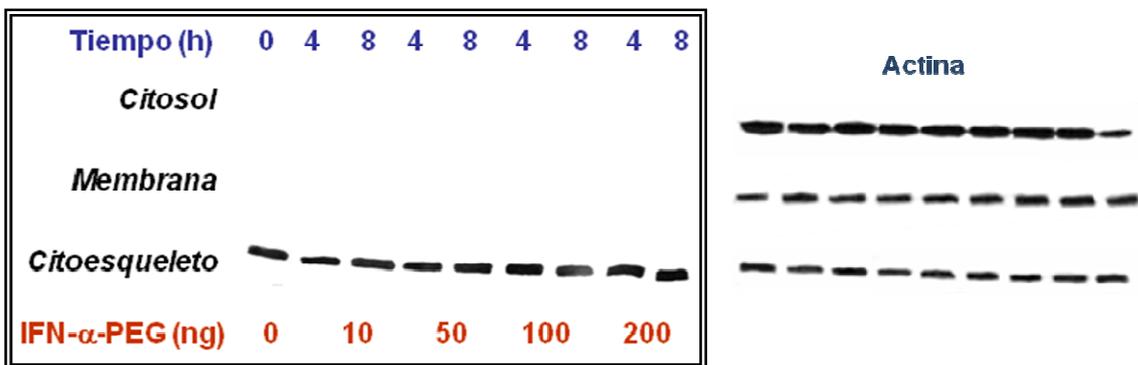


Figura 45. Expresión de claudina-9 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng de **PEG-INF- α 2a (Roche)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

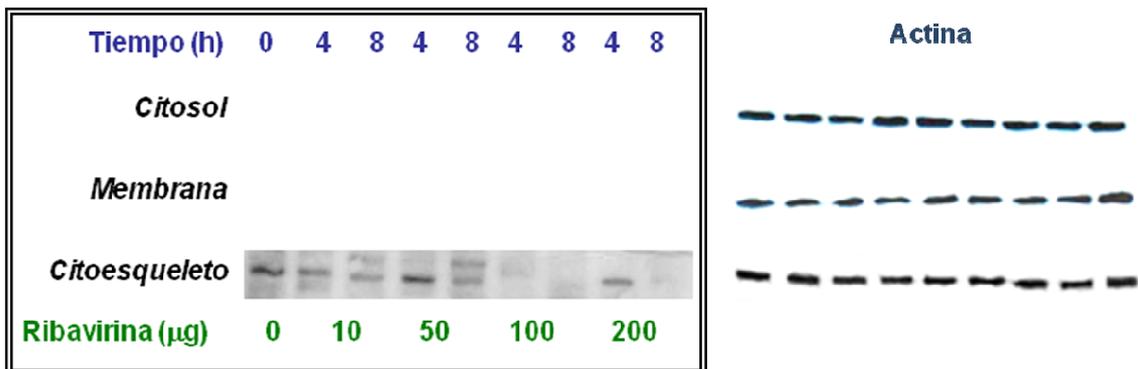


Figura 46. Expresión de claudina-9 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 μ g de **Ribavirina (Roche)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

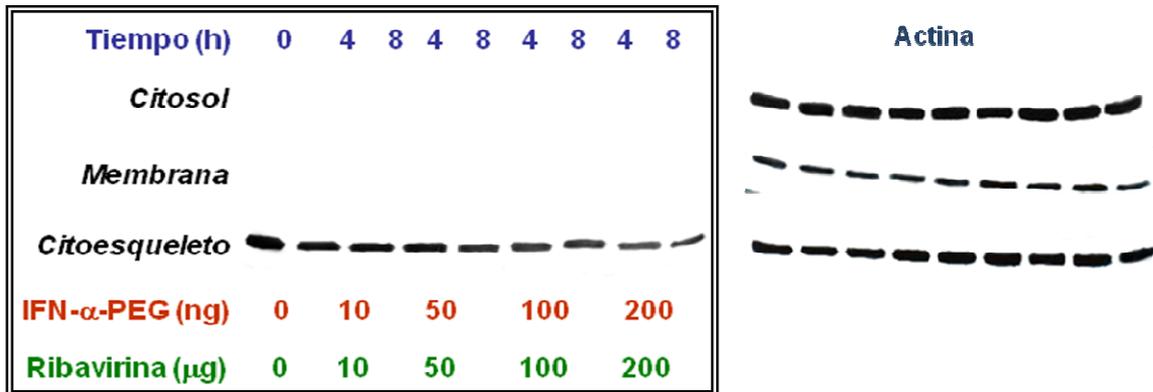


Figura 47. Expresión de claudina-9 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng y/o μ g de **PEG- $\text{INF-}\alpha$ 2a + Ribavirina (Roche)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

El tratamiento con **Ribavirina (Sigma)** permitió la detección de esta proteína en las fracciones de citosol y citoesqueleto, sin embargo no se observó ningún cambio con este tratamiento (Figura 48) ni en combinación con el **PEG- $\text{INF-}\alpha$ 2b** (Figura 49).

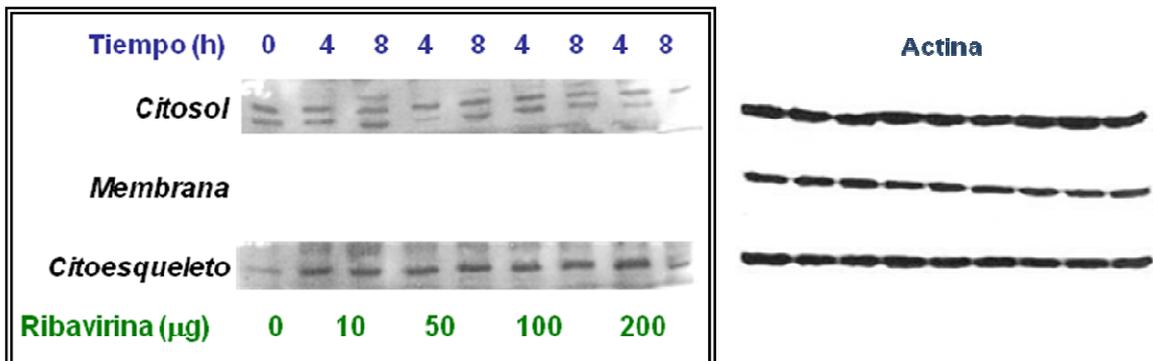


Figura 48. Expresión de claudina-9 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 μ g de **Ribavirina (sigma)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

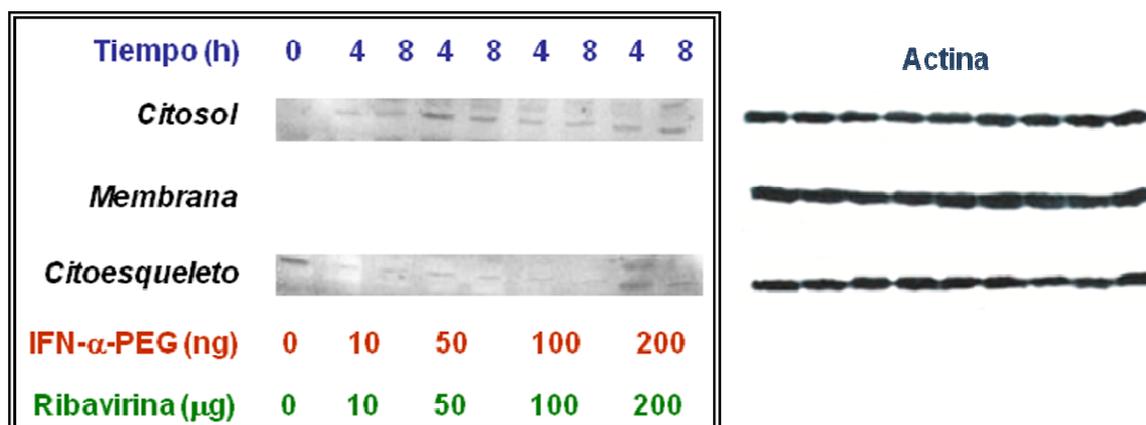


Figura 49. Expresión de claudina-9 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng y/o μ g de **PEG- $\text{INF-}\alpha$ 2b (SP) + Ribavirina (sigma)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

6.2.6 Efecto del PEG- $\text{INF-}\alpha$ 2b (SP y Roche) y Ribavirina (SP, Roche y Sigma) sobre la expresión de ocludina.

Dentro de los objetivos del presente trabajo, se incluyó también el determinar si otras proteínas de uniones estrechas eran afectadas por el tratamiento de estos antivirales. Una de estas proteínas es ocludina, una proteína transmembranal que comparte la misma topología con las claudinas, sin tener ninguna semejanza en secuencia. Ocludina es una proteína de aproximadamente 60 KDa cuya actividad es también modulada por fosforilación y de acuerdo a esta puede modificarse su localización en la célula.

La proteína fue detectada en todas las fracciones subcelulares y aún cuando el tratamiento con **Ribavirina (Sigma)** parece que produjo un aumento en la fracción de citosol a 50ng/50 μ g a las 4h y una disminución a 200ng/200 μ g a las 4h, se observó que todos los tratamientos realizados no mostraron cambios significativos (Figuras 50 a la 54).

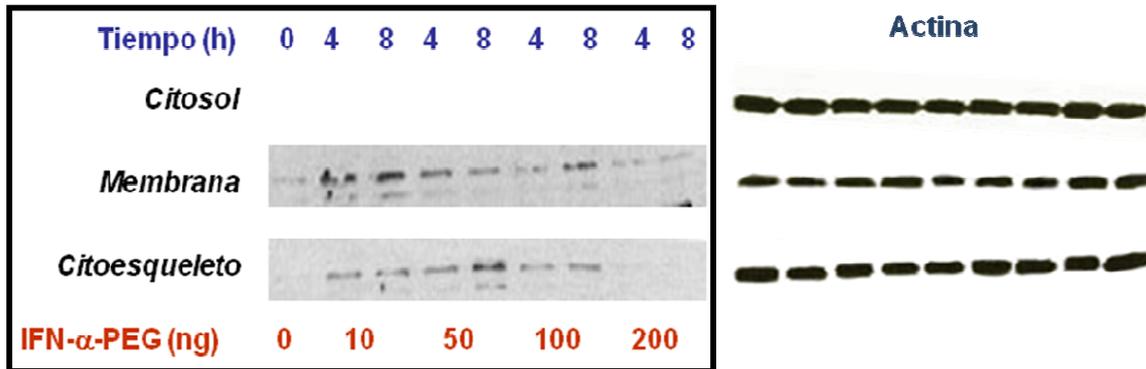


Figura 50. Expresión de ocludina en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng de **PEG- α -2b (SP)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

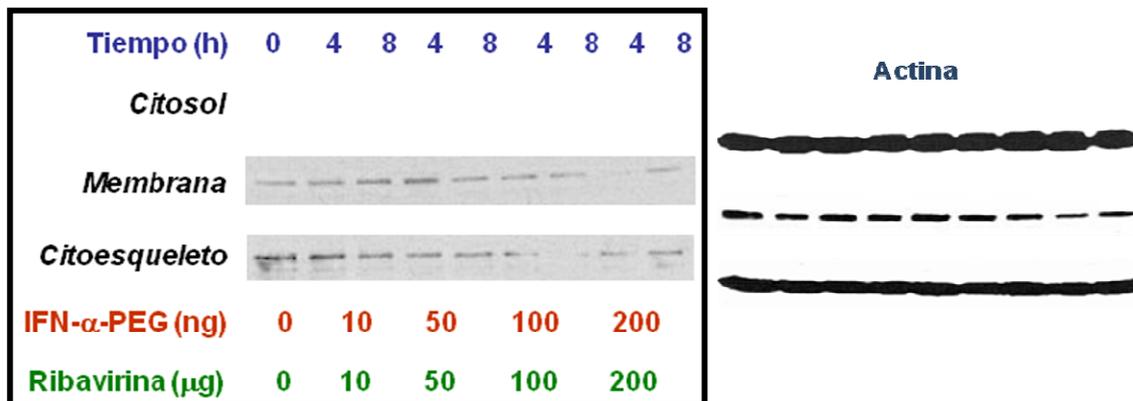


Figura 51. Expresión de ocludina en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng y/o μg de **PEG- α -2b (SP) + Ribavirina (SP)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

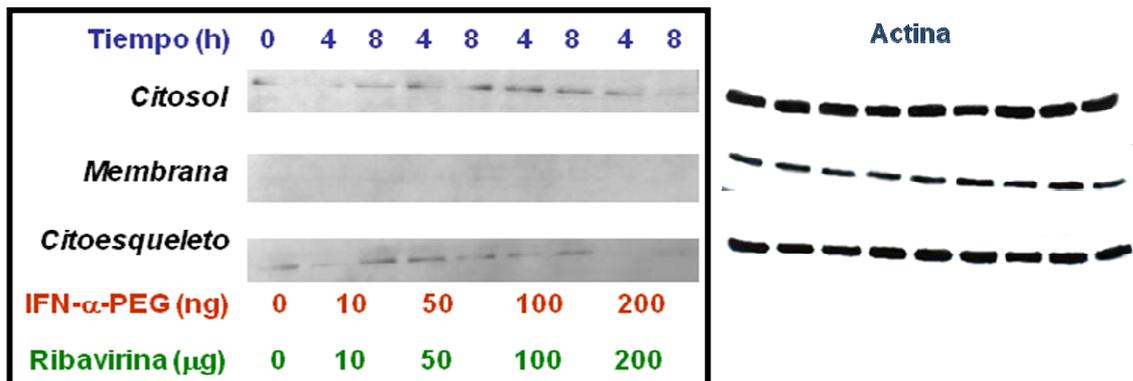


Figura 52. Expresión de claudina-5 en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng y/o μg de **PEG- α -2a + Ribavirina (Roche)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

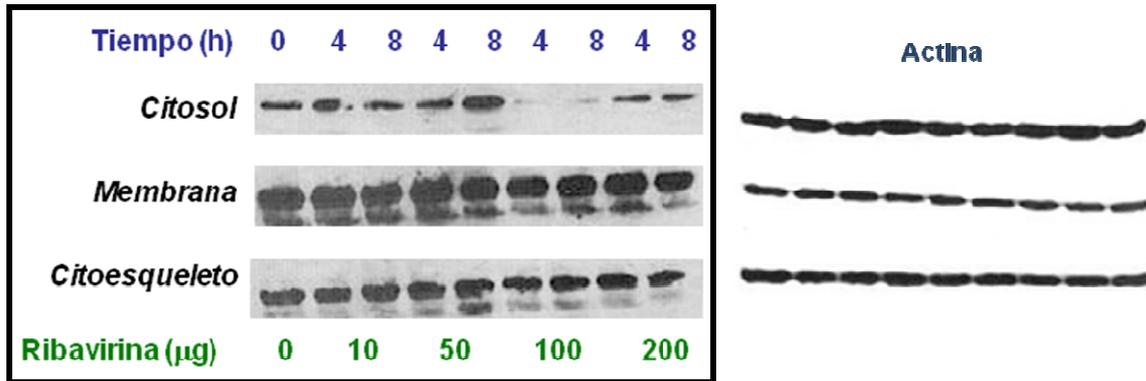


Figura 53. Expresión de ocludina en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 µg de **Ribavirina (sigma)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

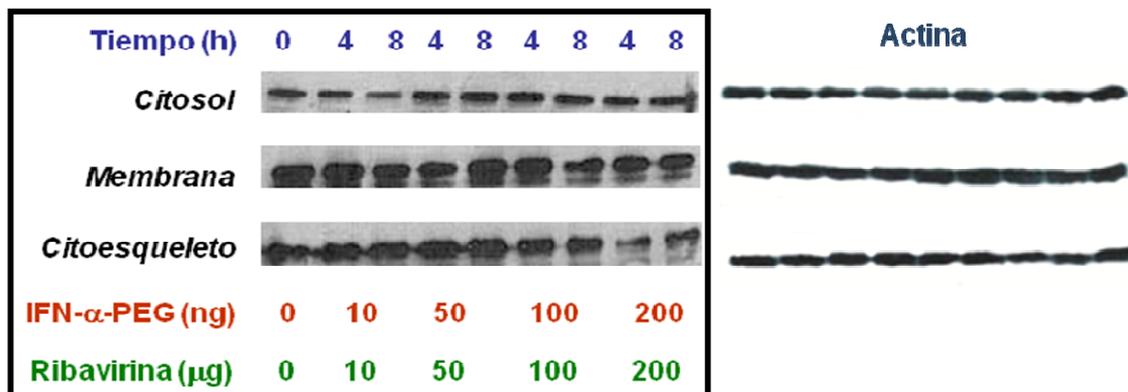


Figura 54. Expresión de ocludina en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng y/o µg de **PEG-INF-α 2b (SP) + Ribavirina (sigma)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

6.2.7 Efecto del PEG-INF- α 2b (SP) + Ribavirina (SP) sobre la expresión de E-Caderina.

Otra de las moléculas analizadas fue E-caderina. E-caderina es una de las principales moléculas de adhesión y por ello se decidió evaluar si el tratamiento con estos antivirales producía algún cambio. Los resultados obtenidos fueron muy interesantes ya que, como lo muestra la Figura 55, cuando las células son tratadas con el **PEG-INF- α 2b (SP)** la expresión de esta proteína en la fracción membranal disminuye significativamente a partir de los 50ng a las 8h de tratamiento y esta disminución es proporcional conforme aumenta la concentración y se acentúa mas a las 8h.

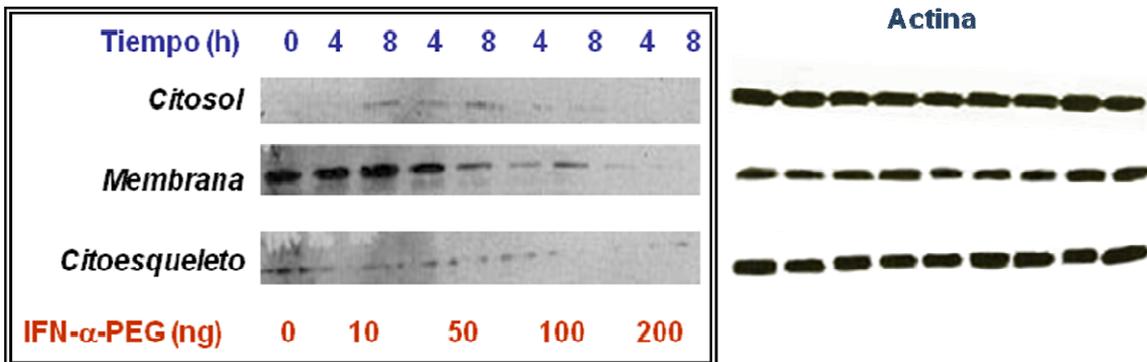


Figura 55. Expresión de E-caderina en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng de **PEG-INF- α 2b (SP)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

El tratamiento con la **Ribavirina (SP)** produjo un aumento significativo en la expresión a 10 μ g a las 4h de tratamiento y este se mantuvo hasta los 50 μ g a las 8h. Posteriormente se observó una disminución en la expresión (Figura 56).

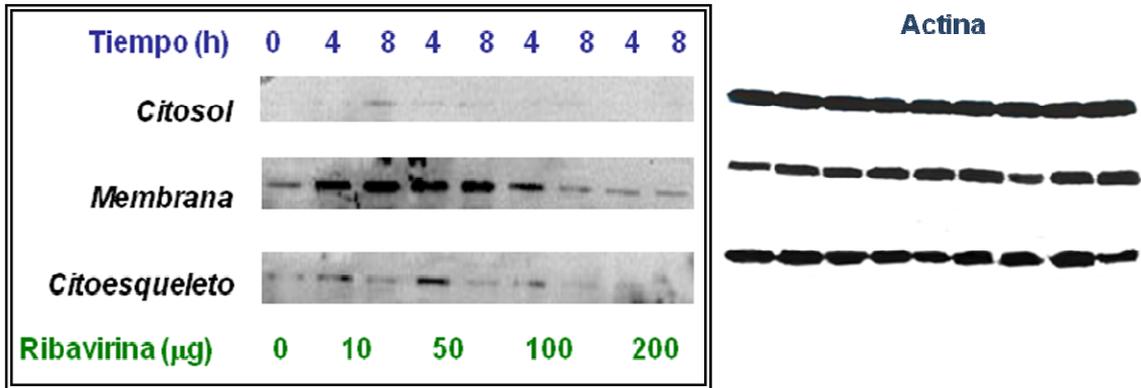


Figura 56. Expresión de E-caderina en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 µg de **Ribavirina (SP)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

Interesantemente el tratamiento en conjunto con **PEG-INF-α 2b** y **la Ribavirina (SP)** en la fracción de membrana produjo un aumento en 10 y 50 ng/µg en ambos tiempos comparado con el control, y posteriormente fue disminuyendo a partir de los 100 ng/µg a las 8h de tratamiento. Esta disminución fue también evidente para la proteína que se encontraba en las fracciones de citosol y citoesqueleto (Figura 57).

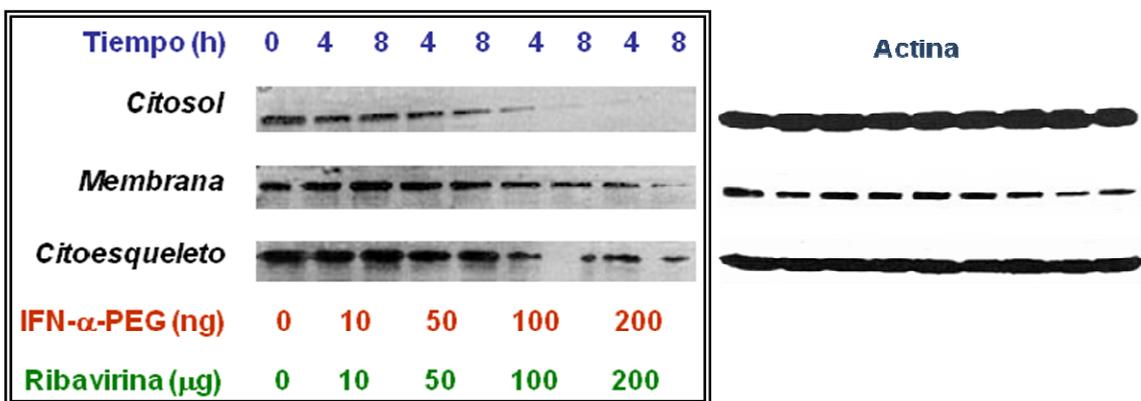


Figura 57. Expresión de E-caderina en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng y/o µg de **PEG-INF-α 2b (SP) + Ribavirina (SP)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

6.2.7.1 Efecto del PEG-INF- α 2a (Roche) y Ribavirina (Roche) sobre la expresión de E-Caderina.

En contraste con el tratamiento anterior, los resultados obtenidos con **Ribavirina (Roche)** no produjeron cambios significativos en ninguna de las fracciones analizadas (Figura 58) y con **PEG-INF- α 2a + Ribavirina (Roche)** se observó una disminución en la fracción de citosol y membrana a partir de 10ng/ μ g a las 4h y 8h de tratamiento respectivamente (Figura 59).

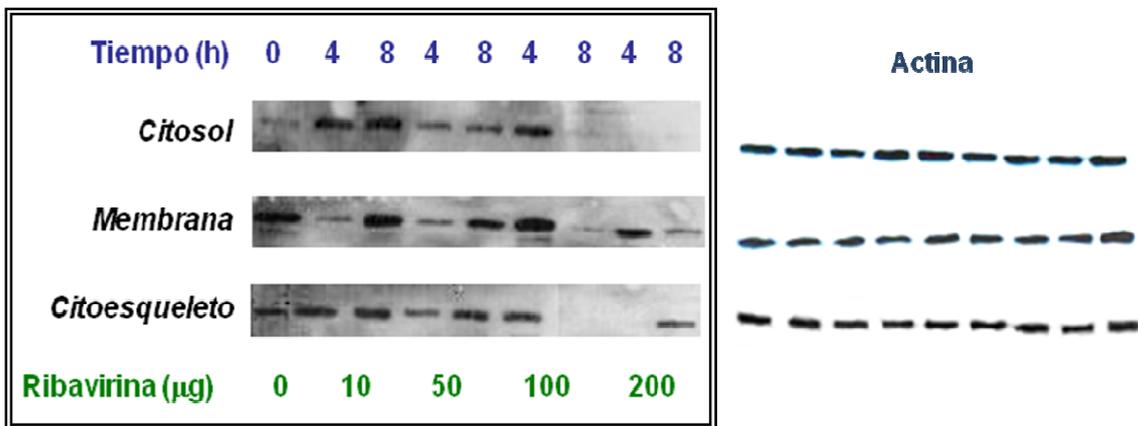


Figura 58. Expresión de E-caderina en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 μ g de **Ribavirina (Roche)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

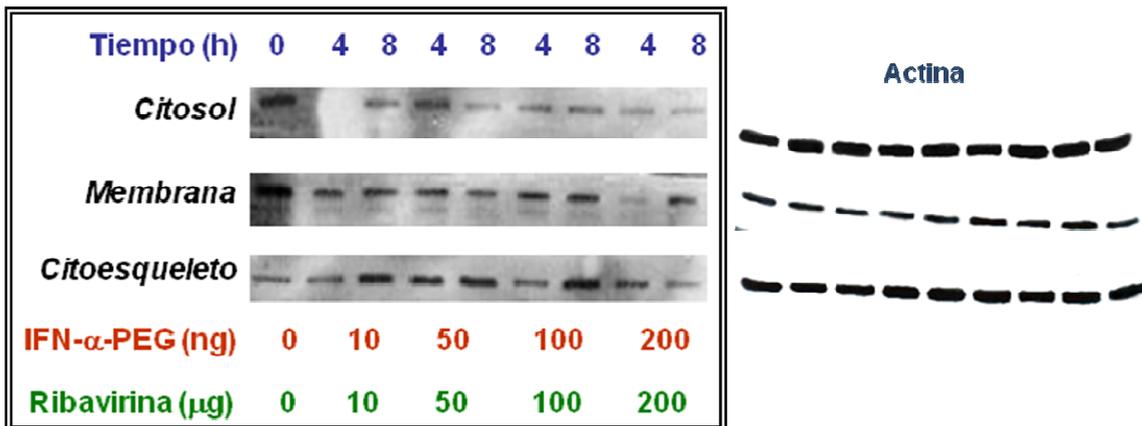


Figura 59. Expresión de E-caderina en tres fracciones subcelulares de células HepG2 tratadas con concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 ng y/o μ g de **PEG-INF- α 2a + Ribavirina (Roche)** a 4h y 8h de tratamiento. (Derecha) Expresión de Actina como control de carga.

VII.- Discusión de resultados

Las UE juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la polaridad celular y en la permeabilidad selectiva de iones en los epitelios por lo que son fundamentales para mantener la homeostasis en los tejidos. Se sabe que las UE están constituidas por diversas proteínas entre las que se encuentran las claudinas, proteínas transmembranales cuyo patrón de expresión es específico de cada tejido [47]. Se ha reportado que la expresión de estas proteínas se encuentra alterada en diferentes tipos de cáncer, en algunos casos aumentada y en otros disminuida [29] y que juegan un papel importante en los procesos de transformación y carcinogénesis [48].

A la fecha se han reportado diversos estudios en los que se ha observado la participación de algunas proteínas de uniones intercelulares en diferentes tejidos. En relación a hígado por ejemplo, se ha publicado que el mRNA de ZO-1 y ocludina sufre pérdida de actividad y posterior degradación (downregulation) en células de hepatocarcinomas y las proteínas son expresadas débilmente en hepatocitos de hígados normales [49]. Por otro lado, aunque claudina-4 no se ha visto expresada en hepatocitos normales ni en células tumorales de carcinoma hepatocelular, se ha propuesto como marcador de cáncer del tracto biliar diferenciado derivado de carcinomas hepatocelulares [50].

Claudinas 1 y 2 se expresan en células fetales derivadas de hepatoblastoma humano y parecen ser buenos candidatos como marcadores tempranos durante la diferenciación de células fetales y embrionarias que darán lugar a este hepatoblastoma. Sin embargo, claudinas 3, 4 y 7 no se detectaron ni en células fetales ni en embrionarias [51]. Otros estudio en el que se bloqueó la expresión de la molécula de adhesión (JAM) en células HepG2, se observó una redistribución de la localización de claudina-1 y de ocludina hacia el núcleo y se indujo una fuerte actividad transcripcional de la proteína E-caderina [52].

Un hallazgo muy importante reportado recientemente es que las claudinas 1, 6 y 9 son utilizadas por el virus de la Hepatitis C como receptores para la entrada a las células

blanco. Ese trabajo demostró que claudina-1 es indispensable para la interacción del virus con la membrana celular y aun cuando las claudinas 6 y 9 no son indispensables, también favorecen la entrada del virus [32,33].

En este sentido, dado que en este trabajo se utilizaron células HepG2, uno de los objetivos fue determinar que claudinas se expresaban de manera endógena en estas células. Las células HepG2 son derivadas de hepatoma humano y son positivas al virus de la hepatitis B. Como tales, estas células crecen en forma de cúmulos o islas y no forman monocapas como lo hacen las células no transformadas. Las claudinas detectadas fueron la claudina -1, -3, -4, -5, -7 y -9, las cuales se encontraron en su mayoría en las tres fracciones subcelulares analizadas, la función que desempeñan específicamente cada una de ellas en estas células no se conoce aun, sin embargo, se ha reportado por ejemplo que claudina-1 tiene un papel muy importante en la función de barrera en el epitelio de mamíferos [53], pero se encuentra sobreexpresada en carcinoma colorectal [54], además recientemente se ha propuesto como un posible coreceptor para la entrada del virus de la hepatitis C. Para el caso de claudina-3 se sabe que existe una pérdida selectiva de esta proteína en las UE de la barrera hemato-encefálica (BBB) bajo condiciones patológicas como glioblastoma [55], además de que se ha encontrado sobreexpresada en cáncer de ovario [56]. Por otro lado claudina-4 reduce la permeabilidad paracelular a cationes en células MDCKII [57], pero en adenocarcinoma de ovario [58], adenocarcinoma colorectal humano [59] y carcinoma de postata [60] se ha detectado sobreexpresada, y en lo que respecta a hígado como se menciono anteriormente, no se ha detectado su expresión en tejido hepático normal [61] pero sí en cánceres de tracto biliar derivados de carcinomas hepatocelulares [50]. En el caso de claudina-5 se consideró inicialmente como un marcador de uniones intercelulares en los endotelios [62], en estudios mas recientes se ha observado que claudina-5 reduce la permeabilidad paracelular de cationes en células MDCKII [63].

Por lo anterior se ha observado que células derivadas de diferentes tipos de cáncer muestran expresión y localización alterada de algunas claudinas. En nuestro caso para las células HepG2 que son transformadas también observamos una expresión diferencial de las claudinas, en particular estas células muestran la expresión de claudina-4 y -5 que no se han

detectado en tejido hepático sano. Dado que estas claudinas están implicadas en la permeabilidad paracelular de iones como Na^+ y Cl^- [64,65], probablemente los cambios observados en estas proteínas alteren la permeabilidad en estas células, provocando un desequilibrio en la entrada y/o salida de ciertas moléculas haciendo más permeable la membrana celular modificando así su microambiente.

También se evaluó la localización de ocludina, la cual está presente en las tres fracciones subcelulares pero preferentemente en la fracción de membrana. ZO-1 se detectó en la fracción de citosol y E-caderina, una proteína muy importante para el mantenimiento de la polaridad celular, se localizó en la fracción de membrana.

Otro de los objetivos del presente trabajo fue determinar si la incubación de células HepG2 con concentraciones crecientes de PEG IFN- α y Ribavirina, dos antivirales utilizados en pacientes con hepatitis C, afecta la expresión y localización de claudinas, ocludina y E-caderina, además de determinar si los cambios son dependientes de la concentración y del tiempo de exposición. Los resultados obtenidos (tablas I y II) mostraron que el tratamiento con IFN- α 2b + Ribavirina (SP) produjo cambios más significativos comparado con el IFN- α 2a + Ribavirina (Roche). Aún cuando se ha reportado que el tratamiento de estas dos marcas comerciales no muestra ninguna diferencia en pacientes a los que se les ha administrado [66], nuestro estudio claramente mostró que las células en cultivo responden de manera diferencial a estos. El tratamiento de IFN- α 2b + Ribavirina (SP) en las células HepG2 indujo una disminución significativa en la expresión membranal de las claudinas 1 y 5. Esta disminución fue proporcional al aumento en la concentración de ambos compuestos, lo que sugiere que la expresión de estas proteínas se ve modificada a concentraciones altas de los mismos, a partir de 50 ng y/o μg . Por otro lado, como ya se mencionó claudina-5 está involucrada en el paso paracelular de cationes, por lo tanto, al disminuir la expresión de esta proteína puede tener un efecto directo y proporcional con la permeabilidad paracelular.

Con respecto a lo anterior se han reportado algunas vías por las cuales se puede regular la localización de las proteínas que constituyen las uniones intercelulares, una de

ellas es la comunicación entre estas proteínas. Como se mencionó anteriormente, la ausencia de JAM altera la localización de ZO-1 y ocludina e induce la expresión de E-caderina [52]. Otro factor que determina la distribución y localización de estas proteínas es la composición lipídica de la membrana. Se ha demostrado que las UE se localizan en microdominios de membrana que juegan un papel muy importante en la organización espacial de las proteínas y la regulación de la permeabilidad paracelular [67]. Diversas citocinas pueden alterar la composición lipídica en los microdominios de las uniones estrechas. El IFN- γ y TNF- α inducen cambios en la composición lipídica y promueven sustituciones de fosfolípidos en los microdominios de las UE en células T84. Estos cambios provocan una deslocalización de ocludina, sin embargo, no se observaron cambios en la claudina-1 y claudina-4 [68]. Por otra parte, el IFN- α es capaz de inducir apoptosis en células epiteliales de túbulo renal sin alterar la integridad de la barrera epitelial. Se ha propuesto que este mecanismo se puede llevar a cabo por una reestructuración del complejo de unión [69]. IFN- α induce también una redistribución intracelular de E-caderina y de ocludina [70].

De acuerdo a lo antes mencionado, nuestros resultados sugieren que en estas células quizá se este alterando la composición lipídica en la membrana celular y por ende los microdominios donde se localizan las UE, y como consecuencia se este induciendo una modificación en la expresión y/o localización de las claudinas por efecto de los antivirales, sin embargo, se requiere realizar estudios posteriores para corroborar esta hipótesis.

Cabe señalar, en el caso de claudina-3 y claudina-5, se mostró que la expresión en citosol y citoesqueleto respectivamente se detecto en forma de doblete, lo cual indica que posiblemente se este llevando a cabo alguna modificación postraducciona, como fosforilación o palmitoilación ya que se ha reportado que se presentan en claudinas, sin embargo, se requeriría realizar algunos otros estudios para confirmar dicha teoría, por ejemplo utilizando anticuerpos dirigidos contra las proteínas fosforiladas.

Un hallazgo importante fue el observado con E-caderina. Únicamente el tratamiento con IFN- α 2b + Ribavirina (SP) mostró cambios dependientes de la concentración de estos

compuestos en la fracción de membrana. Concentraciones bajas produjeron un aumento de E-caderina y concentraciones mayores una disminución. Otro hallazgo importante es que la incubación con IFN- α 2b (SP) o con Ribavirina (SP) de manera separada produjo cambios en la expresión de esta proteína, lo que sugiere que cada uno de estos compuestos puede estar ejerciendo una regulación directa en la reorganización de E-caderina lo que puede influenciar la expresión de las otras claudinas analizadas.

Por otro lado, se sabe que el daño provocado por citocalasinas en el citoesqueleto, específicamente en los microfilamentos en células epiteliales MDCK, provoca una disminución en la Resistencia Eléctrica Transepitelial [71] y en células T84 se incrementa la permeabilidad de moléculas pequeñas en las uniones estrechas lo que sugiere una relación directa entre los microfilamentos y las uniones estrechas [72]. De manera general nosotros observamos claramente una reducción en la fracción de citoesqueleto de claudina-1, -3, -4, -5- -9 y E-caderina con todas las marcas de antivirales utilizadas (tablas I, II y III), lo cual nos sugiere que los cambios que se estén presentando en el citoesqueleto puedan afectar la permeabilidad de las uniones estrechas y por lo tanto se pueda llevar a cabo una redistribución de alguna claudina o de E-caderina.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el tratamiento con IFN- α 2b + Ribavirina (SP) regula la expresión de claudinas en la membrana celular. Este hallazgo es muy importante ya que se ha propuesto que estas proteínas son utilizadas como receptores por el virus de la hepatitis C para entrar a las células blanco. Por lo anterior nosotros proponemos que uno de los mecanismos que estos antivirales utilizan para retardar la infección, es la disminución en la expresión de las claudinas en la membrana celular. El mecanismo por el cual esto se lleva a cabo se podrá estudiar en experimentos futuros. En primera instancia sugerimos que estos antivirales podrían estar bloqueando la síntesis de claudinas y/o modificando la reorganización de fosfolípidos en los microdominios de las UE afectando la expresión de estas proteínas. Sin embargo no podemos descartar otras vías de acción, por ejemplo la vía de MAPKs, la cual se ha reportado que esta implicada en la regulación de la localización de las claudinas.

Es importante mencionar que en los resultados de las figuras 20, 23, 26, 27, 42, 50, 51, 52 la cantidad de proteína detectada en los controles internos referidos como tiempo 0 y concentración 0 no se observaron igual que en la figura 1 en donde se muestra las claudinas que se expresan de manera endógena. La explicación para esto es que los cultivos utilizados como controles que no fueron sometidos a ningún tratamiento con los antivirales si se incubaron el mismo tiempo (24 h) que las células con tratamiento en medio sin suero fetal de bovino. Diversos reportes y resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que la localización de las claudinas puede verse afectada por variaciones en respuesta a diferentes concentraciones de factores de crecimiento, por lo que la ausencia de los mismos pudo haber generado diferencias en la localización de estas proteínas.

VIII.- Conclusiones

1. Las claudinas encontradas en las células HepG2 fueron claudina-1, -3, -4, -5, -7 y -9, en las tres fracciones subcelulares, a excepción de claudina-7 que se detectó en citosol y citoesqueleto y claudina-9 solo en citoesqueleto. Además se identificaron otras proteínas que forman parte de las uniones intercelulares como ocludina, ZO-1 y E-caderina.
2. En la línea celular HepG2 en particular, se detectó la expresión de claudina-4 y -5 que no se encuentran en tejido hepático sano.
3. Los tratamientos administrados con los diferentes antivirales PEG-INF- α 2a y 2b y Ribavirina si mostraron cambios en la expresión de claudinas a nivel de membrana y citoesqueleto así como en la expresión de E-caderina.
4. El tratamiento en forma conjunta con IFN- α 2b + Ribavirina (SP) mostró efectos más pronunciados en comparación con el tratamiento con IFN-alfa2a + Ribavirina (Roche) en membrana.
5. Los cambios observados en la expresión de las claudinas fueron dependientes en su mayoría de la concentración y no del tiempo de tratamiento.

PERSPECTIVAS

Nuestros resultados mostraron que el tratamiento de células HepG2 con INF α y Rivabirina provoca la disminución en la expresión de claudinas 1, 4 y 5 en la membrana celular. Este hallazgo es muy importante ya que se ha propuesto a claudina 1 como coreceptor, entre otros, para la entrada del virus de la hepatitis C a las células blanco.

Con base en lo anterior, y tomando en consideración que una de las vías de señalización que regula la distribución de las claudinas es la de las PKC y MAPKs, se pretende estudiar el papel de estas en la expresión y localización de las claudinas, utilizando activadores o inhibidores de los efectores de estas vías, para conocer los mecanismos por los cuales estos antivirales alteran la expresión de estas proteínas.

Por otro lado se pretende analizar si estos cambios en las claudinas afectan la función de barrera de las uniones estrechas con ensayos de Resistencia Eléctrica Transepitelial.

Además de examinar si existen formas fosforiladas de las claudinas por efecto de estos antivirales.

IX.- BIBLIOGRAFÍA

1. Tsukita, S., Furuse, M., Itoh, M. 2001. Multifunctional Strands in Tight Junction. *Nat Rev. / Mol Cell Biol.* 2:285-293.
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. 2002. *Mol Biol cell.* Garland Science. New York, USA. 1463 p.
3. Simpson, L. C., Green, J. K. 2007. Desmosomes: New Perspectives on a classic. *J. Invest. Derm.* 127:2499-2515.
4. Nelson, J. W., Hartsock, A., 2007. Adherents and Tight Junctions: structure, function and connection to the actin cytoskeleton. *Bio et Biophys A.* 660-669.
5. Niessen, C.M. 2007. Tight junctions/Adherens junctions: Basic structure and function. *J. Invest. Derm.* 127: 2525-2532.
6. Anderson, J. M. 2001. Molecular structure of Tight Junctions and their role in epithelial transport. *New Physiol. Sci.* 15: 126-130.
7. Mitic, L.L., Van Itallie, C. M. Anderson, J. M. 2000. Molecular Physiology and Pathophysiology of tight junctions. *J. Physiol Gast. Liver.* 279: G250-G254.
8. Schneeberger, E. E., Lynch, R. D. 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *J. Cell Physiol.* 286: C1213-C 1228.
9. Margolis, B., Shin, K., and Fogg, V. C., 2006. Tight Junctions and cell Polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22:207-35
10. Mariscal, G. L., Tapia R., Chamorro D., 2007. Crosstalk of Tight Junction components with signaling pathways. *Bio et Biophys A.* 1778:729-256.
11. Balda, M. S. *et. al.* 1996. 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.* 134: 1031-1049
12. Turksen, K., Troy, T. C. 2004. Barriers built on claudins. *J. Cell Sci.* 117: 2435-2458.

13. Tsukita, S., Furuse, M. 2000. The structure and Function of Claudins, cell adhesion molecules at tight junctions. *Ann. N. Y. Ac. Sci.* 915:129-135.
14. Van Itallie, C. M., Anderson, J. M. 2006. Claudins and Epithelial Paracellular Transport. *Annu. Rev. Physiol.* 68:403-426.
15. Oliveira, S. S., Morgado-Díaz, J. A. 2007. Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. *Cell and Mol. L. Sci.* 64:17-28.
16. Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., et al. 2002. Claudin- based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lessons from claudin-1 deficient mice. *J. Cell Biol.* 156: 1099-1111.
17. Li, W., Huey, C. L., and Yu, A. S., 2004. Expression of claudin-7 and -8 along the mouse nephron. *J. Physiol. R. Physiol.* 286:1063-1071.
18. Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., and Tsukita, S., 2001. Conversion of zonula occludents from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J.l Cell Biol.* 153: 263-272.
19. Colegio, O. R., Van Itallie, C. M., McCrea, H. J., Rahner, C., Anderson, J. M., 2002. Claudins creater charge-selective channels in the paracellular pathways between epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283: 142-147.
20. D' Souza, T., Agarwal, R., and Morin, P. J., 2005. Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP- dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *J. Biol. Chem.* 289: 26233-26240.
21. Nusrat, A., et al. 2000. Tight junctions are membrane microdomains. *J. Cell Sci.* 113: 1771-1781.
22. Sing, A.B. and Harris, R. C. 2004. Epithermal growth factor receptor activation differentially regulates claudins expression and enhances transepithelial resistance in Madin- Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 279: 3543-3552.
23. Howe, K. L., Reardon, C., Wang, A., Nazli, A. and Mc Kay, D. M. 2005. Transforming growth factor- beta regulation of epithelial tight junction proteins

- enhances barrier function and blocks enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-induced increased permeability. *Am. J. Pathol.* 167:1587-1597.
24. Prasad, S., Mingrino, R., Kaukinen, K., Hayes, K., Powell, R. M., Mc Donald, t. t., and Collins, J. E. 2005. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab. Invest.* 85: 1139-1162.
25. Ye, D., Ma, I., Ma, Y. T. 2005. Molecular mechanism of tumor necrosis factor- α modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *AJP- Gastrointesr Liver Physiol.* 290: G496-G504.
26. Morin, J. P. 2005. Claudins proteins in Human Cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res.* 65: 9603-9603.
27. Resnik, M. B., Konkin, T., Routhier, J., Sabo, E. and Pricolo, V. E. 2005. Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Mod. Pathol.* 18: 511-518.
28. Hewitt K. J., Agarwal, R. Morin, P.T. 2006. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC. Cancer.* 6:186.
29. Zavala, Z. V., 2007. Alteración de la integridad de las uniones estrechas en la propagación del cáncer. El papel de las claudinas. *Bioquim.* 33: 19-29.
30. Dhawan, P. Singh, A. B., Deane, N. G., No, Y., Shiou, S. R., Schmidt, C., Neff, J., Washington, M. K., and Beauchamp, R. D. 2005. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J. Clin. Invest.* 115: 1765-1776.
31. Mckillop, I. H. et. al. 2006. Molecular Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. *J. Sur. Res.* 1(136):125-135.
32. Evans, M. J. et al. 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature.* 446: 801-5.

33. Zheng A, Yuan F, Li Y, Zhu F, Hou P, Li J, Song X, Ding M, Deng H. 2007. Claudin-6 and claudin-9 as additional co-receptors for Hepatitis C virus. *J. Virol.*doi. 81:12465-71
34. Dragic, T. et. al. 2008. The tight junction proteins claudin-1, -6 and -9 are entry cofactors for the Hepatitis C virus. *J. Virol.* 10:1128.
35. Helle F., Dubuisson, J. 2007. Hepatitis C virus entry into host cells. *Cell. and Mol. Life Sci.* 65(1):100-12
36. Borden, C. E., et. al. 2007. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *N. Rev./Drug Disc.* 6: 975-990.
37. Delic, 2006. Efficacy and safety of peginterferon alpha-2a and ribavirin in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Med. Pregl.* 59: 415-9.
38. Parise, E. R., de Oliveira, A. C., Conceição, R. D., Amaral A. C., Leite K. 2006. Response to treatment with interferon-alpha and ribavirin in patients with chronic hepatitis C virus genotypes 2 and 3 depends on the degree of hepatic fibrosis. *Braz J Infect Dis.* 10: 78-81.
39. Zeuzem, S., et. al. 2004. Peginterferon Alpha- 2a (40 kilodaltons) and Ribavirin in patients with chronic Hepatitis C and normal aminotransferase levels. *Gastroenterology.* 127: 1724-1732.
40. Yano, H., Basaki, Y., Oie, S., Ogasawara, S., Momosaki, S., Kuratomi, K., Fukahori, S., Kuwano, M., Kojiro M. 2007. Effects of INF-alpha on alpha-fetoprotein expressions in hepatocellular carcinoma cells. *J Interferon Citokine Res.* 27: 231-8.
41. Kovarik, P., Sauer, I., Schaljo, B., 2007. Molecular mechanisms of the anti-inflammatory functions of interferons. *Immunobiology.* 212: 895-901.
42. F. George Njoroge, Kevin X. Chen, Neng-yang Shih, and John J. Piwinski. 2007. Challenges in Modern Drugs Discovery: A case study of boceprevir, and HCV protease inhibitor for the treatment of Hepatitis C virus infection. *Accounts of Chemical Research.* 41:50-59.

43. Radu C., 2003. Correlation of sICAM-1 and sVCAM-1 level with biochemical, histological and viral findings in chronic hepatitis C after interferon-alpha + ribavirin therapy. *Gastroenterol.* 12: 91-5.
44. Granot E., 2001. Cell adhesion molecules and hyaluronic acid as markers of inflammation, fibrosis and response to antiviral therapy in chronic hepatitis C patients. *Mediators Inflamm.* 10: 253-8;
45. Dejica D., 2002. Serum levels of soluble intercellular-1 and vascular cell-1 adhesion molecules in chronic hepatitis C and the influence of interferon-alpha + ribavirin therapy. *Gastroenterol.* Dec; 11: 277-83.
46. Butler, M. 2004. Animal cell culture & technology. 2th. Edicion. *Bios Sci. Pub.* London and New York.
47. L. González-Mariscal, A. Betanzos, P. Nava, B. E. Jaramillo. 2003. Tight Junctions Proteins. *Biophysies* : 1-44.
48. Swisshelm K., Macek R., Kubbies M. 2005. Role of claudins in tumorogenesis. *Elsevier.* 57:919-928.
49. Orbán E, Szabó E, Lotz G, Kupcsulik P, Páska C, Schaff Z, Kiss A. 2008. Different Expression of Occludin and ZO-1 in Primary and Metastatic Liver Tumors. *Pathol Oncol Res.*
50. Lódi C, Szabó E, Holczbauer A, Batmunkh E, Szíjártó A, Kupcsulik P, Kovalszky I, Paku S, Illyés G, Kiss A, Schaff Z. 2006. Claudin-4 differentiates biliary tract cancers from hepatocellular carcinomas. *Mod Pathol.* 19: 460-9.
51. Halász J, Holczbauer A, Páska C, Kovács M, Benyó G, Verebély T, Schaff Z, Kiss A. 2006. Claudin-1 and claudin-2 differentiate fetal and embryonal components in human hepatoblastoma. *Hum Pathol.* 37: 555-61.
52. Konopka, G., Tekiela J., Iverson, M., Wells C., Duncan S., 2007. Junctional Adhesion Molecule-A is critical for the formation of pseudocanaliculi and modulates E-Cadherin expression in hepatic cells. *J. Biol. Chem.* 282: 28137-28148.
53. Furuse M., Hat M., Furuse K., Yoshida, Y., Harata K. A., Sugitani Y., Noda T., Kubo A., Tsukita S. 2002. Claudin-basen tight junctions are crucial for the

- mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1 deficient mice. *J. Cell Biol.* 156: 1099-111.
54. Miwa, M., Furuse M., Tsukita S., Niikawa, N., Nakamura Y., Furukawa Y. 2001. Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol. Res.* 12: 469-476
55. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Kraus J, Rascher-Eggstein G, Liebner S, Hamm S, Duffner F, Grote EH, Risau W, Engelhardt B. 2003. Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neurophatol.* 105(6):586-92
56. Y. Zhu, M. Brannstrom, P.O. Janson, K. Sundfeldt. 2006. Differences in expression patterns of the tight junction proteins, claudin 1, 3, 4 and 5, in human ovarian surface epithelium as compared to epithelia in inclusion cysts and epithelial ovarian tumours. *Int. J. Cancer.* 118: 1884-1891
57. Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM. 2001. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J. Clin. Invest.* 107:1319-27.
58. Zhu Y., Brannstrom M., Janson P.O., Sundfedlt K. 2006. Differences in expression patterns of the tight junction protein, caludin-1, -3, -4 and -5 in human ovarian surface epithelium as compared to epithelial in inclusion cysts and epithelial ovarian tumors. *Int. J. Cancer.* 118: 1884-1891.
59. Sheehan, G.M., Kallakury B.V., Sheehan C. E., Fisher H.A., Kaufman R.P., Ross J.S. 2007. Loss of claudin-1 and -7 and expression of claudin-3 and -4 correlate with prognostic variables in prostatic adenocarcinomas. *Pthol.* 38:564-569.
60. Oliveira de S.S., Oliveira de I.M., De Souza W., Morgado-Diaz J.A. 2005. Claudins upregulation in human colorectal cancer. *FEBS Lett.* 579: 6179-6185.
61. Rahner C., Mitic L. L., Anderson M. J. 2001. Heterogeneity in expression and subcelular localization of claudins 2, 3, 4 and 5 in the rat liver, pancreas and gut. *Gastroenterology.* 120:411-422.
62. Morita, K., Sasaki, H., Furuse M., Tsukita S., 1999. Endothelial claudin-5/TMVCF constitutes tight junctions strands in endothelial cells. *J. Cell Biol.* 147: 185-194.
-

63. Wen H., Watry D.D., Marcondes M.C.G., Fox H.S. 2004. Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5. *Mol. Biol. Cell.* 24: 8408-8417.
64. Van Itallie C. M., Fanning A. S., Anderson J. M. 2003. Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F1078–F1084.
65. Hou J., Gomes A. S., Paul D. L., Goodenough D. A. 2006. Study of Claudin Function by RNA Interference. *J. of Biol. Chem.* 281: pp. 36117–36123
66. Sporea I, Danila M, Sirli R, Popescu A, Laza A, Baditoiu L. 2006. Comparative study concerning the efficacy of Peg-IFN alpha-2a versus Peg-IFN alpha-2b on the early virological response (EVR) in patients with chronic viral C hepatitis. *J Gastrointestin Liver Dis.*15: 125-30.
67. Nusrat C. A., Parcos, P., Verkade, C.S., Foley, T. W., Liang, W., Innis-Whitehouse, K. K., Eastburn, J.L., Madara. 2000. Tight junctions are membrane microdomains. *J. Cell Sci.* 113: 1771-1781.
68. Li, Q. et. al. 2008. INF- γ and TNF- α disrupt epithelial barrier function by altering lipid composition in membrane microdomains of TJ. *Clinical Immunol.* 126: 67-80.
69. Lechner, J. Malloth, N. Seppi, T., Beer, B., Jennings, P., Pfaller W. 2007. INF- α induces barrier destabilization and apoptosis in renal proximal tubular epithelium. *J. Physiol Cell Physiol*, 249: 153-160.
70. Lechner, J., Krall, M., Netzer, A., Radmayr, C., Ryan M., Pfaller, W. 1999. Effects of Interferon alpha-2b on barrier function and junctional complexes of renal proximal tubular LLC-PK1 cells. *Kidney Int.* 55: 2178-2191.
71. Turner J., 2000. ‘Putting the squeeze’ on the tight junction: understanding cytoskeletal regulation. *Cell and Develop. Biol.* 11: 301-308.
72. Patrick M. D., Leone K. A., Shellenberger J.J., Dudowicz A. K., King M. J. 2006. Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- α and interferon- γ modulate epithelial barrier function in Madin-Darby canine kidney cells through mitogen activated protein kinase signaling. *Bio Med central.* 6:2

ANEXO I

Soluciones, medios de cultivo, amortiguadores y reactivos utilizados.

Medio de cultivo para HepG2

D-MEM solo

Disolver un sobre del medio en aproximadamente 800 ml de agua tratando de no dejar nada de medio en el sobre

Adicionar 2 g de NaHCO₃ y disolver

Ajustar a pH = 7.4 (puede quedar 0.1 o 0.2 abajo)

Levar a 1 L de volumen con agua

Esterilizar por filtración separando en botellas de 500 ml etiquetadas

Por cada 100 ml de medio DMEM solo adicionar:

0.1 ml de Insulina de SIGMA de 10 mg/mL (10 µg/ml o 0.1 U/ml)

0.2 ml de Piruvato de Sodio de GIBCO 100mM (2mM)

1.0 ml de L-Glutamina de GIBCO 200 mM (2mM)

1.0 ml de Penicilina/Estreptomocina de GIBCO 10,000U/ml/10,000 µg/ml (100U/ml/100 µg/ml)

5.0 ml de Suero Fetal Bovino de GIBCO (5%)

DMEM + GLICEROL 10%, para congelar células HepG2.

DMEM + GLICEROL 10% Para 10 ml de medio total:

1.25 ml de Glicerol al 80%

8.75 ml de DMEM suplementado.

PBS 1X pH = 7.5, para lavado de los cultivos celulares.

Para 1L:

Pesar 9.6 g de PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) de GIBCO

Disolver en 900 ml de agua

Ajustar el pH

Aforar con ddH₂O, esterilizar por filtración y guardar en refrigeración.

BUFFER A pH = 7.5, para extracción y cuantificación de proteínas.

Para preparar 100 ml:

0.242 g de Tris base (PM = 121.14 g/mol, $C_4H_{11}NO_3$) de SIGMA (20 mM)
4.506 g de Dextrosa Anhidra (PM = 180.16 g/mol, $C_6H_{12}O_6$) de SIGMA (0.25 M)
0.38 g de EGTA (PM = 380.4 g/mol, $C_{14}H_{24}N_2O_{10}$) de SIGMA (10 mM)
0.058 g de EDTA (PM = 292.2 g/mol, $C_{10}H_{16}N_2O_8$) de SIGMA (2 mM)

Disolver los compuestos y ajustar el pH
Aforar a 100 ml con agua
Almacenar en Refrigeración

Antes de emplear adicionar los siguientes inhibidores, por cada ml de Buffer a emplear:

4 μ l de Leupeptina 5 mg/mL (20 μ g/ml)
10 μ l de Coctail de Inhibidores de Fosfatasas I de SIGMA (dil 1:100)
10 μ l de Coctail de Inhibidores de Fosfatasas II de SIGMA (dil 1:100)
1 mg de Inhibidor de Tripsina de SIGMA (1mg/ml)

Una vez adicionados los inhibidores dejar el buffer en hielo para su uso.

BUFFER DE LISIS pH = 7.5, para extracción de proteínas.

Para preparar 100 ml:

0.8766 g de NaCl (150 mM)
0.6057 g de Tris base (PM = 121.14 g/mol, $C_4H_{11}NO_3$) de SIGMA (50 mM)
0.038 g de EGTA (PM = 380.4 g/mol, $C_{14}H_{24}N_2O_{10}$) de SIGMA (1 mM)
0.029 g de EDTA (PM = 292.2 g/mol, $C_{10}H_{16}N_2O_8$) de SIGMA (1 mM)
1.0 ml de IGEPAL (1%)
1.0 ml de Solución de Desoxicolato de Sodio al 10% (0.1%)
0.1 g de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) (0.1%)

Disolver los compuestos y ajustar el pH
Aforar a 100 ml con agua
Almacenar en Refrigeración

Antes de emplear adicionar los siguientes inhibidores, por cada ml de Buffer a emplear:

4 μ l de Leupeptina 5 mg/mL (20 μ g/ml)
10 μ l de Coctail de Inhibidores de Fosfatasas I de SIGMA (dil 1:100)
10 μ l de Coctail de Inhibidores de Fosfatasas II de SIGMA (dil 1:100)
1 mg de Inhibidor de Tripsina de SIGMA (1mg/ml)

Buffer de Laemli 4X

Para 50 ml: 20 ml de SDS al 10% (4%)
12.5 ml de Tris 0.5 M pH = 6.8 (0.125M)
10 ml de Glicerol (20%)
0.02 g de Azul de Bromofenol (0.04%)

Disolver y aforar a 50 ml
Alicuotar en tubos de 15 ml
Almacenar en congelación

Usar la mitad del volumen de este buffer en el volumen de la muestra.
Antes de emplear la muestra para corrimiento electroforético adicionar β -Mercaptoetanol para tener una concentración del 5%.

Acrilamida 30.8%

Para 100 ml: 30 g de Acrilamida (BIO-RAD) (30%)
0.8 g de Bis N, N'- metilen bis acrilamida (BIO-RAD) (0.8%)

Disolver poco a poco la acrilamida en 50 ml de ddH₂O y posteriormente disolver la bis acrilamida.
Llevar a 100 ml con ddH₂O y guardar en refrigeración.

Tris 1.5M pH=8.8

Para 100 ml: 18.171g de Tris
Disolver poco a poco en 50 ml de ddH₂O, ajustar el pH y posteriormente aforar a 100ml.

Tris 0.5M pH= 6.8

Para 100ml: 6.057g de Tris
Disolver poco a poco en 50 ml de ddH₂O, ajustar el pH y posteriormente aforar a 100ml.

Gel Separador al 12.5%

12.5 ml de Acrilamida 30.8%
7.5 ml de Tris 1.5 M pH = 8.8
9.55 ml de ddH₂O
150 μ l de SDS al 20%
15 μ l de TEMED
150 μ l de Persulfato de Amonio al 10%

Gel Concentrador

2.5 ml de Acrilamida 30.8%
3.75 ml de Tris 0.5 M pH = 6.8
8.55 ml de ddH₂O
75 µl de SDS al 20%
15 µl de TEMED
150 µl de Persulfato de Amonio al 10%

Amortiguador para Electroforesis, pH = 8.3

Para 4L: 12.13 g de Tris (25 mM)
57.65 g de Glicina (192 mM)
4 g de SDS (0.1%)

Aforar con ddH₂O

Amortiguador de Transferencia, pH = 8.3

Para 1 L: 3.03 g de Tris (25 mM)
14.4 g de Glicina (192 mM)
200 ml de Metanol (20%)

Nota: No ajustar pH con ácidos o bases, el pH de 8.3 se obtiene si se pesan correctamente los ingredientes.

Aforar con ddH₂O y guardar en refrigeración.

Para lavados de membranas se utilizó TBS 1X, pH = 7.6

Para 1L:
2.423 g de Tris (20 mM)
8 g de NaCl (136 mM)

Aforar con ddH₂O y guardar en refrigeración.

Para lavados e incubaciones con anticuerpos de membranas se utilizó TTBS 1X, pH = 7.6

Para 1L:
2.423 g de Tris (20 mM)
8 g de NaCl (136 mM)
1 ml de Tween 20 (0.1%)

Aforar con ddH₂O y guardar en refrigeración.

Tabla I. Cambios observados en la expresión de claudinas y proteínas de uniones celulares, por efecto de los tratamientos con **INF- α 2b** y **Ribavirina de Schering Plough (SP)**. (\uparrow) Aumento, (\downarrow) Disminución.

	INF- α 2b (ng) (SP)								Ribavirina (μ g) (SP)								INF- α 2b + Ribavirina (ng/ μ g) (SP)							
	10		50		100		200		10		50		100		200		10		50		100		200	
Tiempo (h)	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8
Cldn-1	C																							
	M																							
	E																							
Cldn-3	C																							
	M																							
	E																							
Cldn-4	C																							
	M																							
	E																							
Cldn-5	C																							
	M																							
	E																							
Cldn-9	C																							
	M																							
	E																							
Ocludina	C																							
	M																							
	E																							
E-Caderina	C																							
	M																							
	E																							

C= citosol, M=Membrana, E=Citoesqueleto

Tabla II. Cambios observados en la expresión de claudinas y proteínas de uniones celulares, por efecto de los tratamientos con **INF-α 2a** y **Ribavirina de Roche**. (↑) Aumento, (↓) Disminución.

	INF-α 2a (ng) (Roche)								Ribavirina (µg) (Roche)								INF-α 2b + Ribavirina (ng/ µg) (Roche)								
	10		50		100		200		10		50		100		200		10		50		100		200		
Tiempo (h)	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	
Cldn-1	C																								
	M																								
	E																								
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓									↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
Cldn-3	C																								
							↑																		↓
	M																								
	E																								
																	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
Cldn-4	C																								
	M																								
	E																								
Cldn-5	C																								
	M																								
	E																								
Cldn-9	C																								
	No		Hubo		cambios		en		ninguna		fracción		con		ningún		trata		miento						
	M																								
	E																								
Ocludina	C																								
	No		Hubo		cambios		en		ninguna		fracción		con		ningún		trata		miento						
	M																								
	E																								
E-Caderina	C																								
									No		Hubo		cambios		Con										
									este		Trata		miento												
	M																								
	E																								

C= citosol, M=Membrana, E=Citoesqueleto

Tabla III. Cambios observados en la expresión de claudinas y proteínas de uniones celulares, por efecto de los tratamientos con **INF- α 2b** y **Ribavirina de Sigma**. (\uparrow) Aumento, (\downarrow) Disminución.

	Ribavirina (μ g) (Sigma)								INF- α 2b + Ribavirina (ng/ μ g) (Sigma)							
	10		50		100		200		10		50		100		200	
	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8
Cldn-1	C								\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow
	M															
	E										\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow
Cldn-3	C											\downarrow	\downarrow	\downarrow		
	M															
	E				\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow								
Cldn-4	C			\uparrow	\uparrow	\uparrow	\uparrow	\uparrow								
	M								\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow
	E			\uparrow	\uparrow									\uparrow	\uparrow	
Cldn-5	C										\uparrow	\uparrow	\uparrow	\uparrow	\uparrow	\uparrow
	M				\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow								
	E		\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow								
Cldn-9	C		No	hubo	cambios	Significa	tivos									
	M															
	E															
Ocludina	C		No	hubo	cambios	Significa	tivos									
	M															
	E															

C= citosol, M=Membrana, E=Citoesqueleto.