



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**CARACTERIZACIÓN DE CLAUDINAS EN UN
MODELO MURINO DE COLITIS AGUDA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A

CECILIA ELENA MORENO BARRAGÁN



DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA

2016

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México



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.

El trabajo experimental del presente proyecto de tesis de licenciatura, fue realizado en el laboratorio de Inmunobiología, perteneciente al Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México y fue parcialmente financiado por Proyecto PAPIIT IN-210813 y CONACYT-177678

...en movimiento y armonía, ama lo
que haces, haz lo que amas.

Iván Nava 0101201

Agradecimientos

A la Doctora Erika Rendón por aceptarme en su laboratorio y ser mi mamá profesional, por guiarme durante todo el proceso de realización de la tesis y por escucharme siempre que lo he necesitado.

Al Doctor Luis Felipe Montaña por toda la enseñanza académica y de vida, por todos los consejos y las risas en el laboratorio.

Al Doctor Luis Ignacio Terrazas por el apoyo brindado para realización de este proyecto.

A Raquel Guerrero por todo el apoyo técnico, sin el cual este trabajo no se hubiera podido realizar.

Al Doctor Elías Piedra por enseñarme que nada en la biología tiene sentido si no se mira a través del prisma de la evolución.

Al Doctor Martín Martínez por hacer que me enamorara de la biología del desarrollo.

A mi maestra de Métodos y técnicas de investigación, de la Prepa 27. No recuerdo su nombre, pero recuerdo sus clases a la perfección.

A mi mamá por todo lo que sacrificó para poder cuidarme y criarme, por enseñarme a jugar rondas y juegos de manos, por dejarme jugar con tierra, paja, agua, aserrín y cualquier cosa que implicara echar a perder la ropa que trajera puesta, por enseñarme a rezar, que aunque ya no lo hago, me sacó de apuros alguna vez, por haber estudiado medicina veterinaria y ejercerla.

A mi papá, por dejarme tener cualquier tipo de mascota, por utilizar el sarcasmo y el bullying continuo para forjar mi carácter, por enseñarme “la mitad de un caballito” al microscopio. Por hacer mi mudanza una y otra vez, sin importar cuantas veces se me ocurra cambiar de casa. Por los Beatles, los Rolling, Genesis, King Crimson, Loa Who, Yes y por todas las grandes bandas que me enseñaste, gracias a ti mi vida tiene el mejor soundtrack.

A mi hermano Fidel, por estar siempre conmigo en los momentos más difíciles, por prestarme su bici favorita para hacer Down Hill, por los regaños cuando los he necesitado, por ser tan tierno cuando nadie más está viendo y por tener ese sentido del humor tan peculiar. Gracias por la buena música y los conciertos.

A mi hermana Regina (Rex), por enseñarme que las muñequitas también son rudas, por las pláticas, las peleas, por acompañarme a los conciertos aunque odieras la música, por todo lo que hemos vivido juntas y todo lo que nos falta. Gracias por hacer siempre lo que quieres, porque me sirves de ejemplo para no ponerme límites.

A Aldo, por todo el amor, los viajes (en avión, en carro, en autobús y en moto), las carreras, los conciertos, las decisiones importantes, las risas, por apoyarme siempre en cualquier decisión que he tomado y por enseñarme que si la mente está convencida, el cuerpo se prepara solo...incluso para correr 63 km dentro de una barranca. Eres el amor de mi vida.

A mis abuelitos Fidel y Mina por tener el mejor jardín del mundo y por enseñarme que el amor verdadero existe y es para siempre.

A mis tíos y tías. Julie: por mis acuarelas y mis clases de pintura, por no adoptarme cuanto te lo pedí y por prestarme aretes y collares siempre que quise. Mary: por mantener mi sonrisa perfecta, por regañarme siempre que lo necesité, por darme consejos y la prima tan linda que me diste. Emmy y Juan: por los consejos de belleza y los ángeles, por los buñuelos, los tamales de chocolate, los bollitos de plátano y por mi mordida tan sana (aunque sea muy profunda jajaja). Tere y Diego: por las risas, el chowí, el oso carpintero, el sapo cancionero y la muralla, las vacaciones en su casa, los viajes a las playas y por enseñarme que nunca debo quedarme con las ganas. Lilia y Carla, por adoptarme y cuidarme un semestre entero, las quiero.

A mi abuelo Luis por las lecciones de historia. A mi abuelita Imelda por todos los regalos, todos los juegos y todas las lecciones de buenos modales.

A Jimena y Marilyn por ser las mejores primas, por las intervenciones jajaja, los chats infinitos y el amor a los tatuajes.

A Adriana Montoya y a Diego De la Cruz, por ser mi segunda familia y compartir tantas experiencias, juntos. A mi "Primcesa" Paulina Lamas, por las cenas, las pláticas, los consejos, la confianza y el apoyo incondicional.

A Rodrigo "Poste", Cesar "Mosco", Efrén, Ramón y Joss, Karlita y Luis y a toda la banda de Satélite, mi vida sin ustedes sería muy aburrida.

A mis amigos del Laboratorio de Inmunobiología, en especial a Toño, quien me presentó al Dr. Montaña y de ahí empezó toda esta vida de investigación; a Anita, Pris, Marilú, Ashlin, Jane y Jaz, porque somos muy buen equipo de trabajo y un excelente grupo de apoyo ante desastres emocionales. A Hanen, Eli, Alhelí, Pris (chiquita), Jahaziel, Rouse, Luis, Paco y Christian por el apoyo técnico, las buenas discusiones académicas y el café.

A mis amigos de la FES Iztacala, a cada uno lo conocí en el momento en que más los necesitaba: Zayra, Joselyn, Jonathan "El chino", Luis "El Cuervo", Jorge "George", Iván, Germán, Rafa, Osvaldo "Pichón", Luis "Chowder", Dayann, Oscar, Tania "La china", Pablo "Pato", Héctor, Vero, Valentín, Baruc, Sandra "Sanch", Erick Morales, Erick "Panda", Hevyn "Pecas", Arlette, Laura y Karen. A Miguel, David, Geraldine, Vivi, Luis y Antonieta, lo mejor que me dejó Ciencias.

A mis Monis: Monicha, por alimentarme todo 1 semestre (o dos), por compartir conmigo tus danzas, por hacerme ver la vida de una forma espiritual, por mis "intenciones", por tu luz y tu fuerza y por quererme tanto. Te amo. A Moñi, por darme refugio (habitacional y emocional), por tomar las mejores decisiones juntas, por las prácticas de campo, los 31 minutos, las noches sin dormir, las perlas negras infinitas, por las fiestas más bizarras a las que he asistido jamás y por todo lo bueno que viene. Te amo.

P.D. Gracias Marilú, porque sin ti no hubiera logrado titularme jamás.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Enfermedad Inflamatoria del Intestino	1
1.2	Anatomía y fisiología del colon	4
1.3	UNIONES ESTRECHAS	6
1.3.1	Alteración de las uniones estrechas	8
1.4	Claudinas	9
2	Modelo experimental	12
2.1	<i>Taenia crassiceps</i>	13
3	ANTECEDENTES	16
4	JUSTIFICACIÓN	18
5	OBJETIVO GENERAL	19
5.1	OBJETIVOS PARTICULARES	19
6	METODOLOGÍA	20
6.1	Obtención del antígeno excretado/secretado de <i>Taenia crassiceps</i>	20
6.2	Grupos experimentales.	20
6.3	Obtención del colon.....	20
6.4	Cortes histológicos.....	21
7	RESULTADOS.....	23
7.1	Cambios histológicos observados en los grupos de estudio.....	23
7.2	Cambios en la expresión a nivel de proteína de claudinas.	26
8	DISCUSIÓN	34
9	CONCLUSIÓN	37
10	BIBLIOGRAFÍA.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Colitis Ulcerativa.....	2
Figura 2 Corte transversal de colon.....	5
Figura 3 Función de las Uniones Estrechas	6
Figura 4 Uniones estrechas y proteínas asociadas	7
Figura 5 Estructura de las claudinas.....	11
Figura 6 Ciclo de vida de Taenia crassiceps	15
Figura 7 Reconstrucción fotográfica de colon sano	24
Figura 8 Figura 8. Reconstrucción fotográfica de colon inoculado con TcES.....	24
Figura 9 Reconstrucción fotográfica de colon con inflamación inducida por DSS.....	25
Figura 10 Reconstrucción fotográfica de colon con inflamación inducida con DSS inoculado posteriorente con el antígeno TcES.....	25
Figura 11 Claudina 2.....	28
Figura 12 Claudina 3.....	29
Figura 13 Claudina 5.....	30
Figura 14 Claudina 6.....	31
Figura 15 Claudina 9.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1: *Activating Protein 1*

aPKA: *atypical Protein Kinase A*

BC: Base de las Criptas

Bves: *Blood Vessel Epicardial Substance*

C: Criptas en general

CAR: *Coxsackievirus and Adenovirus Receptor*

CDK4: *Cyclin-Dependent Kinase 4*

COOH: secuencia carboxilo terminal

Crb3: *Crumbs protein homologue 3*

CUCI: Colitis Ulcerativa Crónica Idiopática

DC: células dendríticas

DSS: dextran sulfato de sodio

EC: Enfermedad de Chron

ECP: Enterotoxina de *Clostridium perfringens*

EL: Epitelio Luminal

GA12: *G protein 12*

GEF-H1: *Guanine Nucleotide Exchange Factor-H1*

IBD: *Inflammatory Bowel Disease* Enfermedad Inflamatoria del Intestino

JAM: *Junctional Adhesion Molecule*

LP: Lamina Propia

M: Mucosa

MAGI: *Membrane-Associated Guanylate kinase with Inverted domain structure*

MARVEL D: *MAL and Related proteins for Vesicle trafficking and membrane Link*

MDSCs: células supresoras derivadas de mieloides

MUPP-1: *Multi-PDZ domain Protein 1*

NH2: secuencia amino terminal

PALS1: *Protein Associated with Lin Seven 1*

Par: *Partitioning defective*

PATJ: *PALS1-Associated Tight Junction protein*

PDZ: *Post synaptic Density ZO Protein*

Rab3b y Rab13: *Ras Related Proteins*

SM: Submucosa

TAMP: *Tight junction Associated MARVEL Protein*

TcES: *Taenia crassiceps Excreted/Secreted-*

TcES: *Taenia crassiceps Excreted/Secreted antigen*

TER: *Transepithelial Electric Resistance Resistencia Eléctrica Transepitelial*

TGF- $\beta\beta$: *Factor de crecimiento transformante- $\beta\beta$*

TM: *Transmembranales*

Treg: *T reguladoras*

VHC: *Virus de Hepatitis C*

WNK4: *Serine/threonine-Protein Kinase 4*

ZIM: *N-terminal ZO-1 interaction motif*

ZO: *Zonula Occludens*

ZONAB: *ZO-1-associated Nucleic Acid Binding protein*

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedad Inflamatoria del Intestino

La enfermedad inflamatoria del intestino, IBD por sus siglas en inglés (*Inflammatory Bowel Disease*), se refiere a condiciones inflamatorias crónicas recurrentes y progresivas que pueden afectar el tracto gastrointestinal completo. La colitis ulcerativa crónica idiopática (CUCI) y la enfermedad de Crohn (EC) son las dos formas principales, clínicamente descritas de la IBD (1).

La mayor incidencia y prevalencia de la IBD corresponde al norte de Europa, Reino Unido, Estados Unidos de América y Australia, que son las regiones geográficas a las cuales se ha ligado históricamente. Sin embargo, en los últimos años se ha informado un aumento en la incidencia y prevalencia en otras áreas del mundo como lo son Europa central, Europa del sur, Asia, África y Latinoamérica (2, 3).

Se ha observado que la incidencia y prevalencia de la IBD aumenta con el desarrollo y la modernización de las poblaciones. Durante la infancia, la exposición temprana a microbios, protege a los individuos de desarrollar CUCI en etapas posteriores de su vida. Esto concuerda con la noción de que el mejoramiento de la sanidad en países desarrollados puede conducir a que el sistema inmune de un individuo no madure durante su niñez y que se incremente la susceptibilidad a la colitis ulcerativa cuando crezca (4).

En México se han realizado estudios retrospectivos que muestran un aumento en la incidencia de casos de IBD en la última década, con una frecuencia mayor de la CUCI sobre la EC (5-7).

En la CUCI, la inflamación generalmente se limita a la mucosa del colon y aparece como una lesión continua, lo que ayuda a diferenciarle de la EC (Figura 1.) (8). Los pacientes típicamente presentan diarrea con sangre (a menudo nocturna y postprandial), salida de pus, moco o ambas y cólico abdominal durante los movimientos intestinales (1). La Fundación Americana para la Enfermedad de Crohn y la Colitis Ulcerativa, clasifica a la CUCI en proctitis, cuando la inflamación involucra solo la parte más distal del intestino y al recto; colitis distal o limitada, cuando involucra al colon descendente y en pancolitis cuando la inflamación involucra al colon completo (9).

En la EC la inflamación se caracteriza por ser transmural, es decir, se presenta en todas las capas funcionales del tracto gastrointestinal y puede presentarse en cualquier parte del tubo digestivo, pero generalmente afecta el intestino delgado distal y al colon (8, 10). La inflamación

transmural algunas veces conduce al desarrollo de fístulas, abscesos y constricciones intestinales. La mucosa adquiere el aspecto de un “empedrado”, porque la inflamación es discontinua con parches de tejido sano rodeado de lesiones (8). Frecuentemente los pacientes presentan dolor abdominal, fiebre, signos clínicos de obstrucción intestinal o diarrea con sangre, moco o ambas (11). La enfermedad de Crohn parece ser el resultado de una pobre interacción de la microbiota comensal del intestino, que normalmente se encuentra en un estado de mutualismo simbiote, con el sistema inmune del hospedero. A pesar del gran progreso que se ha hecho por entender las facetas de esta relación ancestral, distinguir entre los eventos que lo provocan y los que aparecen en segundo término es todo un reto (11).

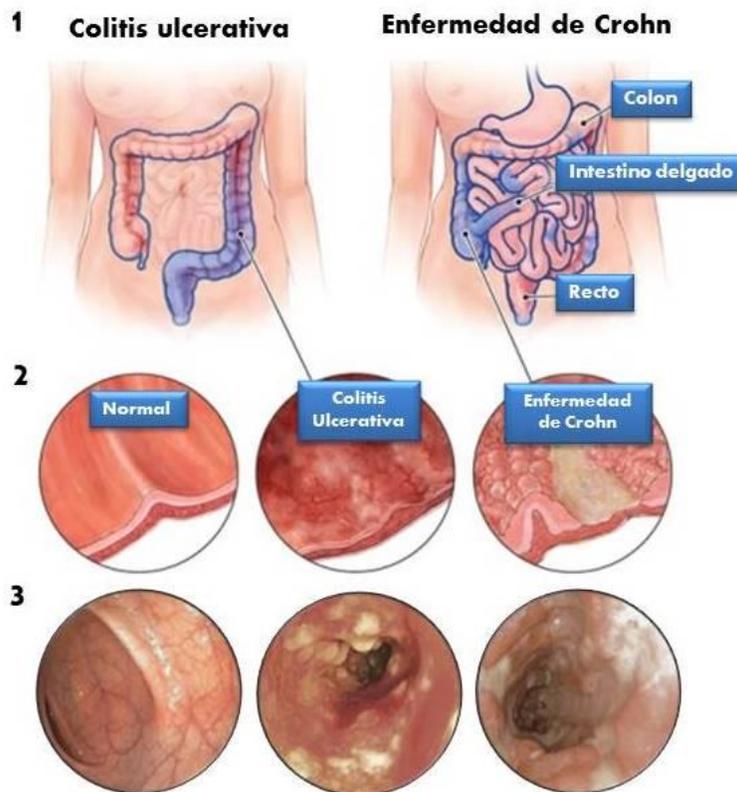


Figura 1 Colitis Ulcerativa.

La colitis ulcerativa crónica idiopática (CUCI) comienza en el recto y se puede extender poco a poco hasta afectar al colon completo. La enfermedad de Crohn (EC) afecta principalmente el final del intestino delgado, el inicio del colon y puede afectar cualquier parte del tracto gastrointestinal siguiendo un patrón de “parches” (1). La CUCI afecta sólo la pared interior del colon mientras que la EC afecta desde la mucosa hasta el músculo externo (2). El colon normal tiene una fina vasculatura que se pierde al inflamarse, en la CUCI pueden observarse hemorragias ocasionales y úlceras; en la EC se observan zonas de inflamación, también conocidos como “parches” que le dan al colon, apariencia de “empedrado” (3).

Aunque la patogénesis precisa aún se desconoce, se piensa que la etología de la IBD involucra un mal funcionamiento del sistema inmune de la mucosa, el cual se desarrolla a partir de interacciones complejas entre el sistema inmune de un hospedero genéticamente susceptible y los factores ambientales (3). Existen numerosos factores ambientales que pueden ser importantes en el desarrollo de esta enfermedad. Fumar reduce el riesgo de padecer CUCI pero duplica el riesgo de padecer EC (8). La dieta, los anticonceptivos orales, y los antiinflamatorios no esteroideos también han demostrado afectar a la IBD (12). La predisposición genética se ha demostrado en estudios con gemelos y es mayor en la EC que en la CUCI (8). La inflamación crónica es un factor de riesgo para la tumorigénesis, aunque el mecanismo preciso de esta asociación es desconocido (Tabla 1) (13).

Signo/Síntoma	CUCI	Crohn
Area afectada	Lesión continua de la mucosa del colon.	Lesión comúnmente en el ileon mas distal, pero puede afectar cualquier parte del tracto gastrointestinal, parches de tejido normal rodeados por tejido inflamado, lesión transmural.
Diarrea	Frecuente en pequeñas cantidades, con sangre. Se presenta tenesmo e incontinencia fecal.	4 episodios por día, mayor cantidad, con sangre, sin presencia de tenesmo.
Dolor / calambres abdominales	Dolor y sensibilidad media, calambres en abdomen bajo.	Dolor moderado a severo y sensibilidad en el cuadrante inferior derecho.
Fatiga	Resultado de la pérdida de sangre y anemia.	Resultado de la pérdida de sangre, anemia y malabsorción.
Fiebre	Presente en casos graves.	Presenta en casos graves
Examen físico	Irritación perianal, llagas, hemorroides, fistulas y abscesos en el recto.	Irritación peritoneal, abdominal y masa palpable. Fistulas y abscesos abdominales.
Pérdida de peso / anorexia	Pérdida de peso en casos graves.	Pérdida de peso y anorexia debido a un decremento en la digestión y en la absorción intestinal.
Riesgo de desarrollar cáncer de colon	Aumenta.	Aumenta.

Tabla 1. Comparación de características clínicas y patológicas de la colitis ulcerativa crónica inespecífica (CUCI) y la enfermedad de Crohn (EC). Modificado de Head y Jurenka (9).

1.2 Anatomía y fisiología del colon

El tubo digestivo que comprende el tracto gastrointestinal está hecho a base de capas funcionales que tienen tipos celulares especializados. La mayoría del epitelio gastrointestinal es columnar, donde una sola capa de células cilíndricas alargadas, separa el lumen de la víscera de las capas más profundas de la pared de la misma (14).

El epitelio intestinal en su totalidad está sujeto a una constante renovación, algo que no es común en los tejidos del cuerpo humano adulto. Se piensa que esta característica puede tener la finalidad de prevenir la acumulación de mutaciones genéticas en los compartimientos epiteliales, producidos por toxinas que entran al lumen, aunque esta “protección” puede también conferir un riesgo incrementado de malignidad (14).

Las células epiteliales gastrointestinales humanas, cambian cada 3 días, llevando a cabo un ciclo de división y diferenciación antes de entrar en apoptosis y ser descamadas hacia el lumen. Estas células surgen de células troncales localizadas permanentemente casi en la base de las criptas del intestino delgado, algunas de ellas migran hacia el fondo de la cripta para convertirse en células de Paneth, las cuales secretan péptidos antimicrobianos que son componentes importantes en el sistema de defensa del hospedero (14).

En el colon, las células troncales se encuentran en la base de las criptas y la mayoría de las células hijas diferenciadas que migran hacia el epitelio superficial, se diferencian en células epiteliales de absorción; sin embargo algunas otras se diferencian en células “goblet”, en células secretoras de moco o en células enteroendócrinas que responden a condiciones luminales y regulan las funciones de los otros tipos celulares tanto en el epitelio como en órganos más distantes (14).

El colon tiene seis segmentos (ciego, colon ascendente, colon transversal, colon descendente, colon sigmoideo y recto) y el apéndice. La histología de los 6 segmentos es casi idéntica. Su función es la absorción de agua y vitaminas, compactación y almacenamiento de materia fecal (15). La pared del colon está dividida en varias capas funcionales. La capa más interna es la mucosa que cumple las funciones de absorción, protección y lubricación. La capa celular más interna de la mucosa es el epitelio cilíndrico simple que está en contacto con la luz y cuya función es absorber principalmente agua (15).

Debajo del epitelio hay una membrana basal que cubre a una capa de tejido conectivo laxo conocido como lámina propia. Esta contiene terminaciones nerviosas, vasos sanguíneos así

como células del sistema inmune que contribuyen a la defensa del hospedero y al control de la fisiología normal del colon (14).

La capa más externa de la mucosa consiste en una fina capa de músculo liso conocida como *muscularis mucosae*, que es importante para proveer movimientos aislados a la mucosa. Debajo de esta capa se encuentra la submucosa compuesta de tejido conectivo denso irregular encargada de proveer sostén estructural. También existe un plexus de cuerpos celulares nerviosos llamados plexo submucoso o plexo mientérico, diseñado para transmitir información hacia y desde la mucosa, incluyendo a las células epiteliales (15).

La capa que se encuentra debajo de la submucosa se llama Muscularis propia y se divide en dos: la primera es una capa de músculo liso que presenta un arreglo circular, se encarga de reducir el diámetro del lumen del colon cuando se contrae. En la segunda capa muscular las fibras están arregladas de manera longitudinal y proveen el acortamiento intestinal. Ambas capas son las responsables del peristaltismo (Figura 2) (14).

La capa más externa de la pared colónica es la serosa; compuesta de tejido conectivo encargada de protección, aislamiento y aporte de neurovasculatura.

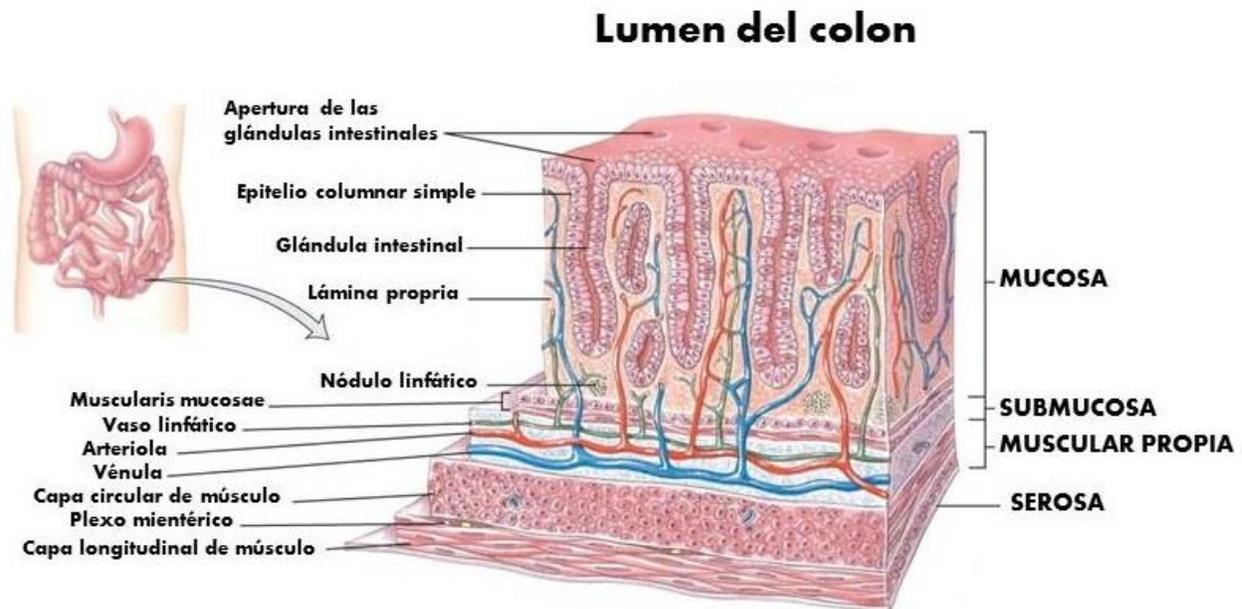


Figura 2 Corte transversal de colon.

Se visualizan y se señalan las capas funcionales y los tejidos que las componen.

1.3 UNIONES ESTRECHAS

Las UE están implicadas de manera importante en la regulación de 3 de las principales funciones de los epitelios: la función de barrera, de poro y de valla.

Las funciones de “barrera” y de “poro” están estrechamente relacionadas y se refieren al transporte selectivo de cationes, aniones y moléculas de agua regulando la difusión de moléculas cargadas a través del espacio intercelular. La función de “valla” se refiere a la habilidad que tienen las UE de restringir la difusión lateral de proteínas membranales a los compartimentos apical o basolateral de la célula, lo cual es determinante para establecer la polaridad celular y el transporte transcelular dirigido a través de los epitelios (Figura 3). (16, 17).

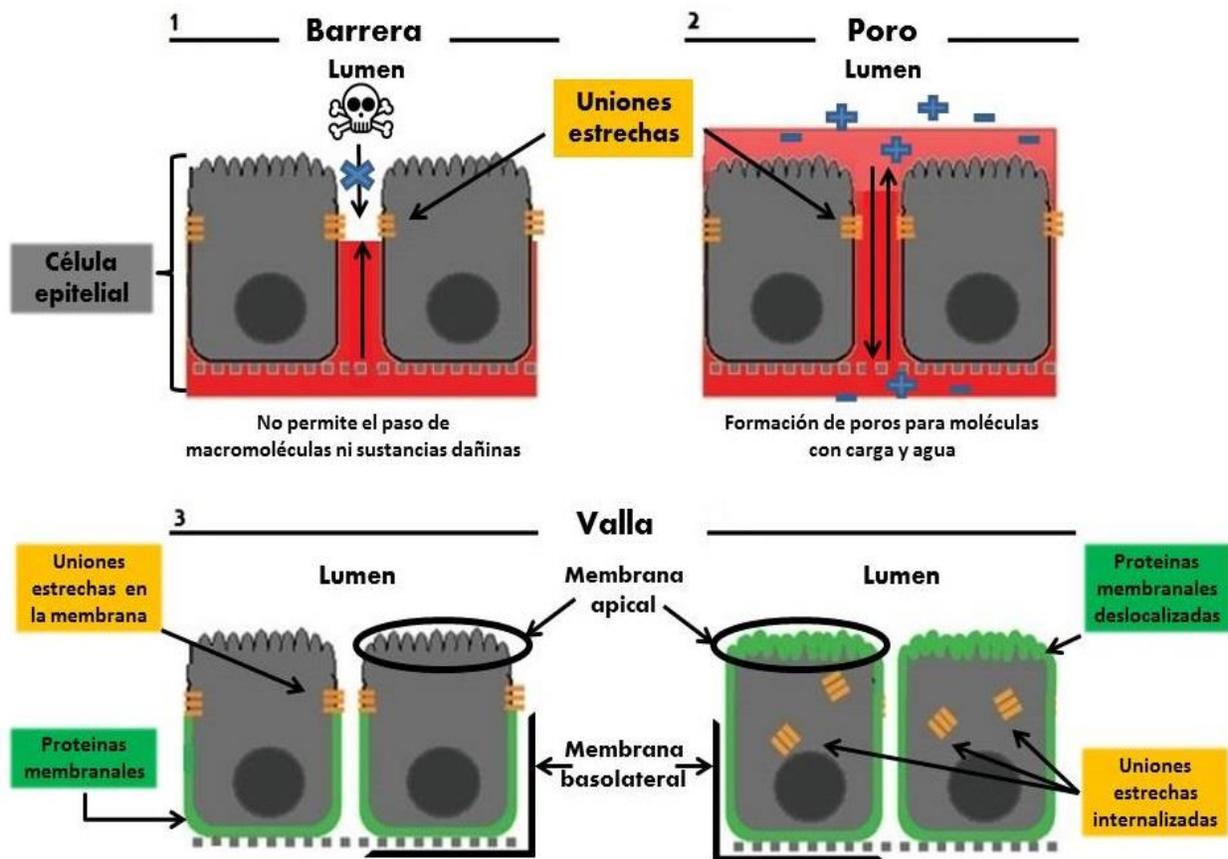


Figura 3 Función de las Uniones Estrechas

En los epitelios. 1) Función de barrera: Evita que macromoléculas y sustancias dañinas pasen de un lado a otro del epitelio a través del espacio paracelular. 2) Función de Poro: Crea canales selectivos para aniones, cationes y agua. 3) Función de valla: Evita que las proteínas integrales de membrana se difundan lateralmente a los compartimentos, apical y basolateral para mantener la polaridad celular. (Modificado de Gunzel & Fromm, 2012)

Las UE están compuestas de un complejo multiprotéico que incluye: proteínas transmembranales, proteínas reguladoras y proteínas adaptadoras, también llamadas de andamiaje, que se unen al citoesqueleto (Figura 4), (16, 17).

Existen 3 grupos de proteínas integrales de membrana que se clasifican de acuerdo al número de regiones transmembranales (TM) que poseen. El primer grupo corresponde a las proteínas de 1 solo dominio TM: JAM (*Junctional Adhesion Molecule*), Crb3 (*Crumbs protein homologue 3*) y CAR (*Coxsackievirus and Adenovirus Receptor*)(18). El segundo grupo incluye a la proteína Bves (*Blood Vessel Epicardial Substance*) que posee 3 dominios TM (19). El tercer grupo, donde se encuentran las proteínas de 4 dominios TM, incluye a la familia de las claudinas y a la familia de las proteínas TAMP (*Tight junction Associated MARVEL Protein*) de la cual son parte la ocludina también llamada MARVEL D1, la tricelulina o MARVEL D2 y la MARVEL D3 (*MAL and Related proteins for Vesicle trafficking and membrane Link*) (20).

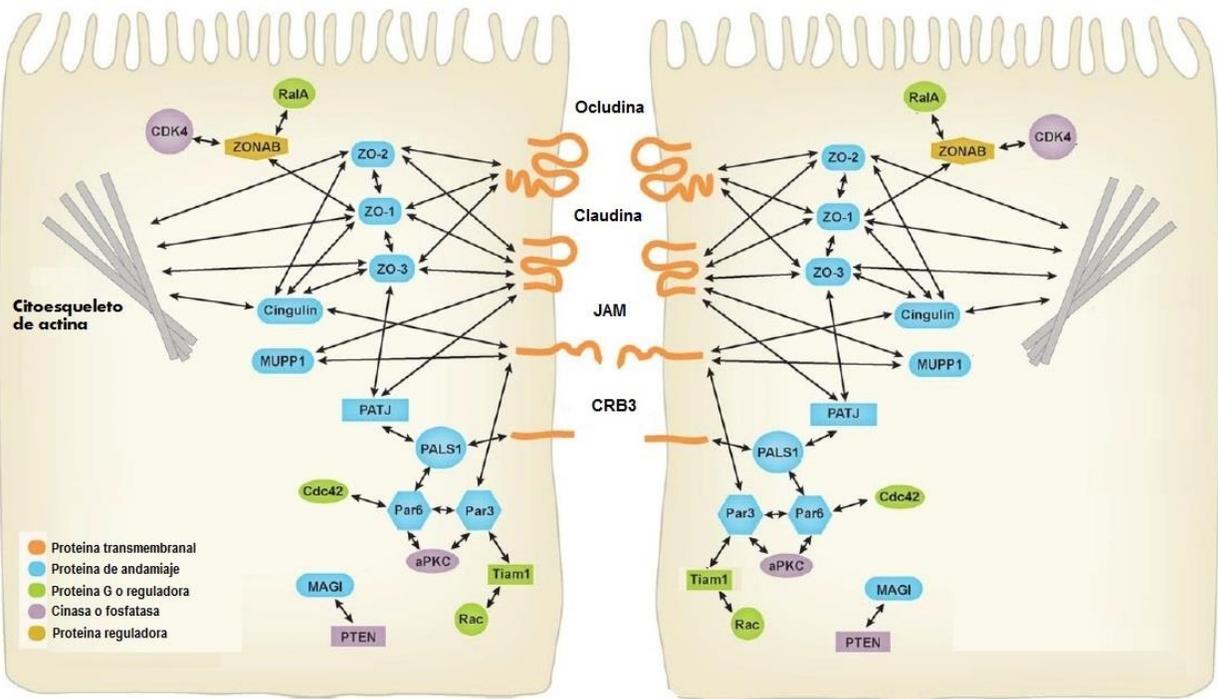


Figura 4. Uniones estrechas y proteínas asociadas

Las proteínas transmembranales como Claudina, Ocludina, JAM y Crb3 interactúan con las proteínas de andamiaje ZO-1, -2 o -3 a través de un motivo de unión PDZ, y con MUPP-1 y PATJ a través del extremo carboxilo terminal. Las proteínas de andamiaje a su vez, interactúan con el citoesqueleto de actina para estabilizar la estructura de las UE. Las proteínas reguladoras como ZONAB, aPKA, CDK4, GA12, GEF-H1, Rab3b, Rab13 y WNK4 interactúan con las proteínas de andamiaje para mantener la polaridad celular. (Gunzel & Yu, 2013).

Casi todas las proteínas de 4 dominios TM son capaces de interactuar con el citoesqueleto de actina a través de al menos una de las principales proteínas de andamiaje como son: ZO-1 (*Zonula Occludens*), -2 y -3, MAGI-1 (*Membrane-Associated Guanylate kinase with Inverted domain structure*), MUPP-1 (*Multi-PDZ domain Protein 1*), Par3 (*Partitioning defective 3*), Par6 (*Partitioning defective 6*), PALS1 (*Protein Associated with Lin Seven 1*) y PATJ (*PALS1-Associated Tight Junction protein*) (21). Las claudinas, con algunas excepciones, poseen un motivo de unión PDZ (*Post synaptic Density ZO Protein*) en la región carboxilo terminal, a través del cual interactúan con las proteínas de andamiaje, principalmente ZO, la cual a su vez interactúa con el citoesqueleto de actina (16, 17). La cingulina no posee dominio PDZ pero interactúa con ZO-1 a través de un motivo ZIM (*N-terminal ZO-1 interaction motif*) conservado, esta se une a actina y a miosina no muscular, las cuales anclan a todo el complejo proteico dentro del citoesqueleto (17).

Las proteínas reguladoras, como son, los factores de transcripción ZONAB (*ZO-1-associated Nucleic Acid Binding protein*)(22) y AP-1 (*Activating Protein 1*)(23), el factor regulador de la poliadenilación de la simplequina y las proteínas de señalización aPKA (*atypical Protein Kinase A*)(21), CDK4 (*Cyclin-Dependent Kinase 4*)(24), GA12 (*G protein 12*)(25), GEF-H1 (*Guanine Nucleotide Exchange Factor-H1*)(22), Rab3b y Rab13 (*Ras Related Proteins*)(26), y WNK4 (*Serine/threonine-Protein Kinase 4*) (27) están asociados a las UE por medio de la interacción con las regiones transmembranales y/o las proteínas de andamiaje y son las responsables de mantener la polaridad celular así como el ensamble y control de las UE, pero también están involucradas en procesos que regulan la proliferación y migración celular (17).

1.3.1 Alteración de las uniones estrechas

Se han identificado alteraciones en genes responsables del mantenimiento del fenotipo epitelial normal, como la principal causa de desregulación de la fisiología normal de los epitelios y se ha establecido que las mutaciones genéticas están correlacionadas con estímulos ambientales, como la exposición directa a carcinógenos, la cual se considera como la fuente más plausible para inducir neoplasia. La regulación de la activación de factores de crecimiento debido a la distribución diferencial de los receptores y sus respectivos ligandos se puede ver comprometida por las UE irregulares.

En general, los mamíferos tienen un comportamiento de absorción altamente selectivo que está regulado por el tamaño y carga de las moléculas a las que el cuerpo está expuesto. Las UE son las responsables de esta selección y cualquier desregulación cualitativa o cuantitativa en sus características pueden cambiar el equilibrio del epitelio, resultando en una fisiología celular anormal (28).

La alteración de la función de barrera y cambios en la permeabilidad están asociados con muchas condiciones patológicas como desordenes renales, IBD, edema pulmonar, diarrea e ictericia (29) así como en el desarrollo de neoplasia epitelial, pues las funciones que están profundamente involucradas en la biología celular del cáncer son la permeabilidad paracelular y la pérdida de polaridad de las células.

La falla en la barrera epitelial involucra la participación de los 3 elementos relacionados entre sí, que se consideran clave en el crecimiento neoplásico y su desarrollo: (1) Debido a la polaridad celular, los receptores funcionales del factor de crecimiento normalmente se encuentran en la superficie basolateral de la célula orientado al fluido intersticial y al torrente sanguíneo; (2) las proteínas del factor de crecimiento (los ligandos de estos receptores) están frecuentemente compartimentados en altas concentraciones en el fluido luminal dentro de los tejidos epiteliales; y (3) en los procesos tempranos de la neoplasia, ocurren distorsiones en las UE, como que solutos relativamente grandes puedan pasar a través de las barreras epiteliales que normalmente restringirían su movimiento (28).

El concepto que ahora se ha desarrollado es, que la alteración de las UE en tejido neoplásico premaligno puede incrementar la probabilidad de que se desarrolle un carcinoma por el continuo estímulo de división celular que reciben las células iniciadas (pre malignas) una vez que la barrera natural entre factores de crecimiento y sus receptores se rompe (28).

1.4 Claudinas

Las claudinas son proteínas que pertenecen a una familia multigénica constituida por 24 isoformas reportadas a la fecha en mamíferos. Poseen entre 207 y 305 aminoácidos y se les han calculado masas moleculares entre 21 y 34 kDa. Estas proteínas constituyen las barreras paracelulares y juegan un papel clave en la determinación de las propiedades de permeabilidad de células epiteliales y endoteliales (16, 17, 30, 31).

Las claudinas (Figura 5) tienen 4 dominios transmembranales, una secuencia amino terminal (NH₂) de 2 a 6 residuos de aminoácidos y una secuencia carboxilo terminal (COOH) que es más variable en longitud (entre 21 y 63 residuos de aminoácidos), ambas localizadas en el citosol (31, 32). Presentan dos asas extracelulares separadas por un dominio intracelular de 15 aminoácidos.

La primer asa extracelular, que tiene de 49 a 52 residuos, es quien determina el flujo de iones y pequeñas moléculas a través de la vía paracelular (16). Presenta una región altamente conservada (Gly-Leu-Trp-x-x-Cys-(8-10 aminoácidos)-Cys) que podría tener un papel importante, común a todas las claudinas, en estabilizar la estructura del asa extracelular y estabilizar las interacciones en *trans*, es decir, interacciones entre las proteínas membranales de una célula con otra(17). Además, se ha demostrado que sirve como correceptor para la entrada del virus de la Hepatitis C en el caso de las claudinas -1, -6 y -9 (16). También presenta 2 cisteínas conservadas, las cuáles se cree que pueden formar un puente disulfuro entre sí que funcionaría como barrera a iones pequeños y una arginina altamente conservada, antes de la segunda hélice transmembranal que se cree que es importante para el correcto plegamiento global de la claudina (17).

La segunda asa extracelular consta de 16 a 33 aminoácidos, es importante para las interacciones en *trans* porque media la interacción claudina-claudina y se ha reportado que en las claudinas -3 y -4 funciona como receptor de la enterotoxina de *Clostridium perfringens*, un agente causal del envenenamiento por comida en humanos (32).

El extremo carboxilo terminal de las claudinas es altamente divergente en secuencia y funciona como anclaje para proteínas citoplásmicas tales como ZO-1,-2 y -3, MUPP-1 (18) y PATJ (32-34). En algunos experimentos con claudina-1, -5 y -6, se ha observado que el extremo carboxilo terminal es necesario para el transporte de dichas proteínas del retículo endoplásmico a la membrana.

Es también en el extremo carboxilo terminal es donde se encuentra la región PDZ en las claudinas. Esta región es el blanco para varias vías de señalización que inducen modificaciones post-traduccionales, incluyendo la fosforilación (adición de un grupo fosfato), palmitoilación (adición de ácido palmítico a un residuo de cisteína), ubiquitinación (adición de la proteína ubiquitina), nitrosilación (adición de un grupo nitroxilo) y nedilación (conjugación de Nedd8 con su sustrato vía una ligasa sustrato-específica) (35). Las modificaciones post-traduccionales influyen en la actividad, localización e interacción de las proteínas (36).

Las claudinas pueden ser palmitoiladas y fosforiladas. La fosforilación causa alosterismo, endocitosis y cambios en la polaridad del epitelio, afectando la función de barrera. La palmitoilación es la modificación lipídica covalente de la cadena lateral de los residuos de cisteína, es la acilación más común en las proteínas eucariontes. Esta modificación provee un importante mecanismo para regular la localización subcelular, estabilidad, tráfico, traslocación hacia las balsas lipídicas, agregación, interacción con efectores y otros aspectos de la función de las proteínas (37).

Las UE también pueden ser remodeladas por medio de un proceso llamado endocitosis mediada por clatrina. Las claudinas son internalizadas por este mecanismo único, donde las membranas opuestas en una UE son endocitadas junto con una de las células adyacentes. Durante la internalización, las claudinas se separan de la ocludina, las JAM, la ZO-1 y se generan vesículas ricas en claudina, las cuales tienen el potencial de regular la composición de claudinas en las UE (37).

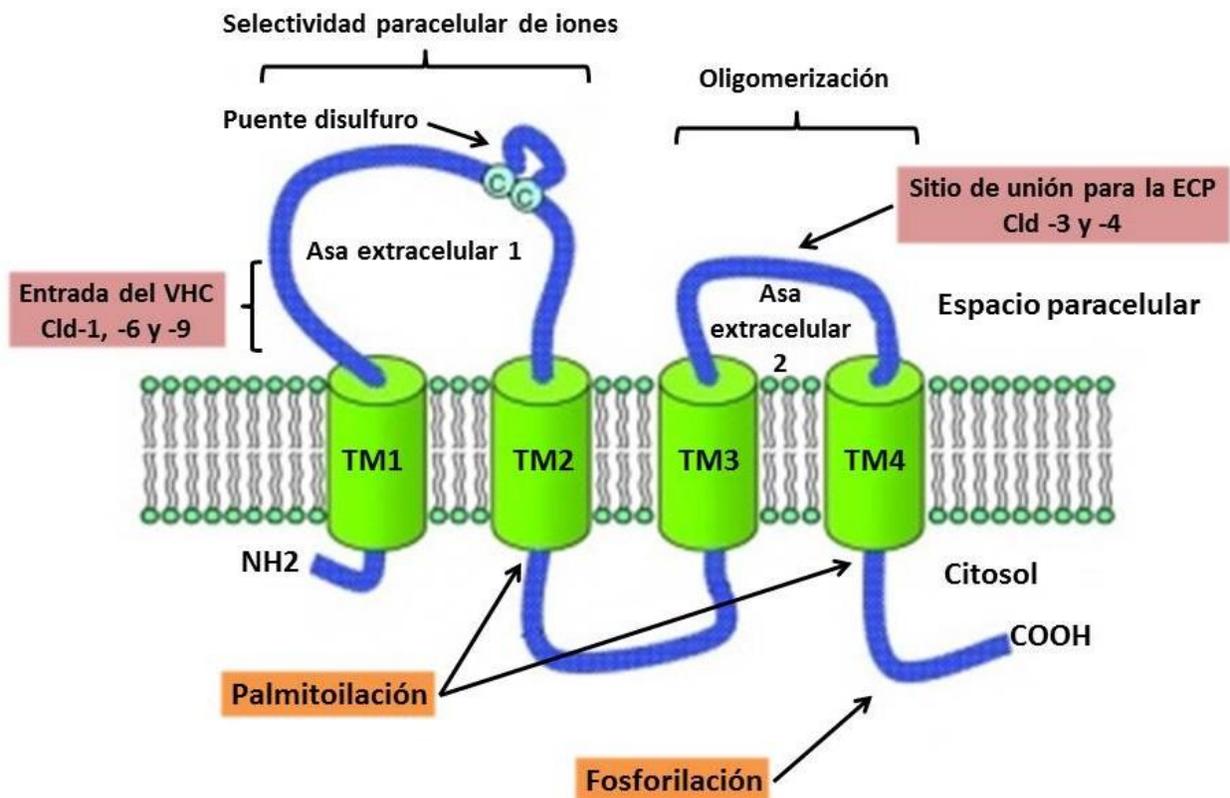


Figura 5 Estructura de las claudinas

Se muestran los cuatro cruces transmembranales (TM1-TM4), las asas extracelulares 1 y 2, las regiones citoplásmicas (amino y carboxilo terminal), los sitios de fosforilación, palmitoilación y de interacción con diferentes patógenos. (Morin P. J. y Lal-Nang M., 2009) ECP: Enterotoxina de *Clostridium perfringens*; VHC: Virus de Hepatitis C.

2 MODELO EXPERIMENTAL

Existen muchos cambios ambientales como consecuencia de la industrialización, pero el que tiene un impacto inmunológico inmediato es la pérdida de exposición a gusanos parásitos (helminths). Los inodoros en casa, los drenajes, caminos pavimentados y la regulación sanitaria de la industria de la comida influyen para prevenir la adquisición y transmisión de helminths (38).

Los helminths producen productos inmunoregulatorios e inducen circuitos regulatorios para ayudar a mantener su nicho. La pérdida de infecciones crónicas por helminths elimina un “gobernador inmune externo” y esto deriva en respuestas inflamatorias excesivas y patologías autoinmunes (38).

Probablemente la actividad que realizan los helminths para controlar la IBD es la inducción de varias vías de señalización independientes. Ellos promueven circuitos regulatorios involucrando componentes celulares tanto de inmunidad adaptativa como innata y estimulando la liberación de diferentes citocinas regulatorias (38).

Los helminths promueven, en sistema inmune del hospedero, la producción de interleucina (IL-10) y citocinas Th2 como IL-4 e IL-5, las cuales activan a macrófagos en forma diferente que los expuestos a citocinas Th1. Estos macrófagos llamados “macrófagos activados alternativamente” despliegan receptores de manosa e IL-4Ra en sus membranas externas y forman algunas moléculas únicas como arginasa-1, RELMa, Ym11, y algunas quitinasas (39). Los helminths han desarrollado estrategias para inducir respuestas inmunes llamadas “Respuestas inmunes Th2 estereotípicas”, caracterizadas por la secreción de altos niveles de citocinas anti inflamatorias como IL-6, IL-9, IL-10, IL-25, IL-33, y el Factor de crecimiento transformante- $\beta\beta$ (TGF- $\beta\beta$), para limitar la inflamación tipo Th1, pero las citocinas más importantes son IL-4 e IL-13 (40). Es así como los helminths pueden ayudar a proteger contra la IBD a través de la inducción de macrófagos activados alternativamente.

Es comúnmente aceptado que la inhibición de la respuesta pro inflamatoria y la inducción de la respuesta Th2 durante la infección, es dependiente de la habilidad de los parásitos para excretar/secretar antígenos con propiedades inmunoregulatorias, que tienen un efecto importante en las células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs), en el reclutamiento de eosinófilos y basófilos, en la disminución en la maduración de células dendríticas (DC), la

activación alternativa de macrófagos, en la disminución de la respuesta proliferativa de linfocitos y en algunos casos, inducción de células T reguladoras (Treg) (40).

La inyección *in vivo* de algunos antígenos derivados de los helmintos, es capaz de imitar algunas de las características inmunes inducidas por estas infecciones parasitarias, pero los mecanismos, receptores y vías de señalización involucradas, no están completamente reconocidas. La inyección del antígeno excretado/secretado de los metacéstodos de *Taenia crassiceps* (TcES) reclutan rápidamente a células MDSCs (CD11b+ F4/80+ Gr1+) las cuales poseen la capacidad de inhibir la respuesta proliferativa de los linfocitos activados y puede tener un papel importante en inhibir la respuesta Th1 inicial a este parásito (40).

2.1 *Taenia crassiceps*.

Taenia crassiceps es un helminto parásito de la clase Cestoda. En vida libre infecta a zorros, lobos y perros como hospederos definitivos y a pequeños roedores incluido el ratón como hospederos intermediarios(41).

Su ciclo de vida comienza con la etapa adulta que se encuentra en el intestino delgado de dichos caninos, el parásito sale al ambiente con las heces fecales en etapa de proglótide grávida que contiene a los huevos o embrióforos (Figura 6). Estos son ingeridos por los roedores, que fungen como hospederos intermediarios y dentro del intestino, el material cementante que cubre al huevo se degrada con las sales biliares y enzimas proteolíticas propias del intestino, liberando a la oncósfera o embrión hexacanto (nombrado así porque presenta 3 pares de ganchos de anclaje).

La oncósfera penetra en la sangre y en la linfa y se aloja en diferentes tejidos como la hipodermis, en músculo, en el cerebelo, la cavidad peritoneal y la cavidad pleural de los hospederos intermediarios. Ya en el tejido la oncósfera madura y se desarrolla la etapa larval intermedia llamada cisticerco o metacéstodo, que en esta especie tiene la capacidad de gemar asexualmente.

Cuando los caninos consumen roedores infectados, los metacéstodos evaginan el escólex, que es la porción cefálica del parásito y con ayuda de la corona de ganchos y de las 4 ventosas que posee, se ancla al intestino de los caninos y empieza a alimentarse de los nutrientes que el hospedero digiere. El escólex comienza a desarrollar proglótides, una tras otra hasta alcanzar la etapa de gusano adulto (42).

Por la cercanía actual del humano con los caninos, también es probable contraer la infección, fungiendo como hospedero intermediario (40). Actualmente se han reportado varios casos de infección por *T. crassiceps* en humanos tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos(43).

T. crassiceps se ha utilizado como modelo de estudio para cisticercosis, debido a la facilidad para mantenerlo en condiciones de laboratorio, a través de pasajes intraperitoneales de ratones infectados a ratones naïve (44). Existen 3 cepas de *T. crassiceps* que se han mantenido bajo condiciones de laboratorio: HYG y WFU las cuales son capaces de desarrollarse completamente hasta la etapa de adulto y la cepa ORF que crece más rápido pero no forma el escólex por lo que es incapaz de llegar a la etapa adulta (45-47). Debido a su rápida reproducción, los metacístodos de la cepa ORF son los más utilizados en trabajos experimentales (47).

Los ratones más utilizados para el estudio de la infección por parásitos es la cepa BALB/c, que ha demostrado ser la más susceptible a la infección y la más permisiva en cuanto al crecimiento del parásito (47).

El modelo de estudio para la IBD utilizado con mayor frecuencia es la administración por vía oral de dextran sulfato de sodio (DSS) a ratones. El DSS daña el epitelio intestinal, causando defectos en la integridad de la barrera epitelial, por lo tanto aumenta la permeabilidad de la mucosa del colon. Como la barrera física e inmunológica desaparece, se facilita el contacto directo de las células del sistema inmune del colon con los antígenos lumenales. Esto promueve un aumento en la síntesis de citocinas inflamatorias como TNF-alfa, IL-1beta e IFN-gamma (38).

El epitelio intestinal juega un rol crítico en el transporte de nutrientes y macromoléculas, al mismo tiempo que provee de una barrera para sustancias dañinas y microorganismos. En los epitelios, incluido el intestinal, las Uniones Estrechas (UE) conforman, junto con los Desmosomas, Uniones Adherentes y Uniones Comunicantes, uno de los complejos de unión intercelular determinantes para la regulación de la barrera epitelial que separa y evita el contacto del contenido intestinal con la cavidad abdominal.

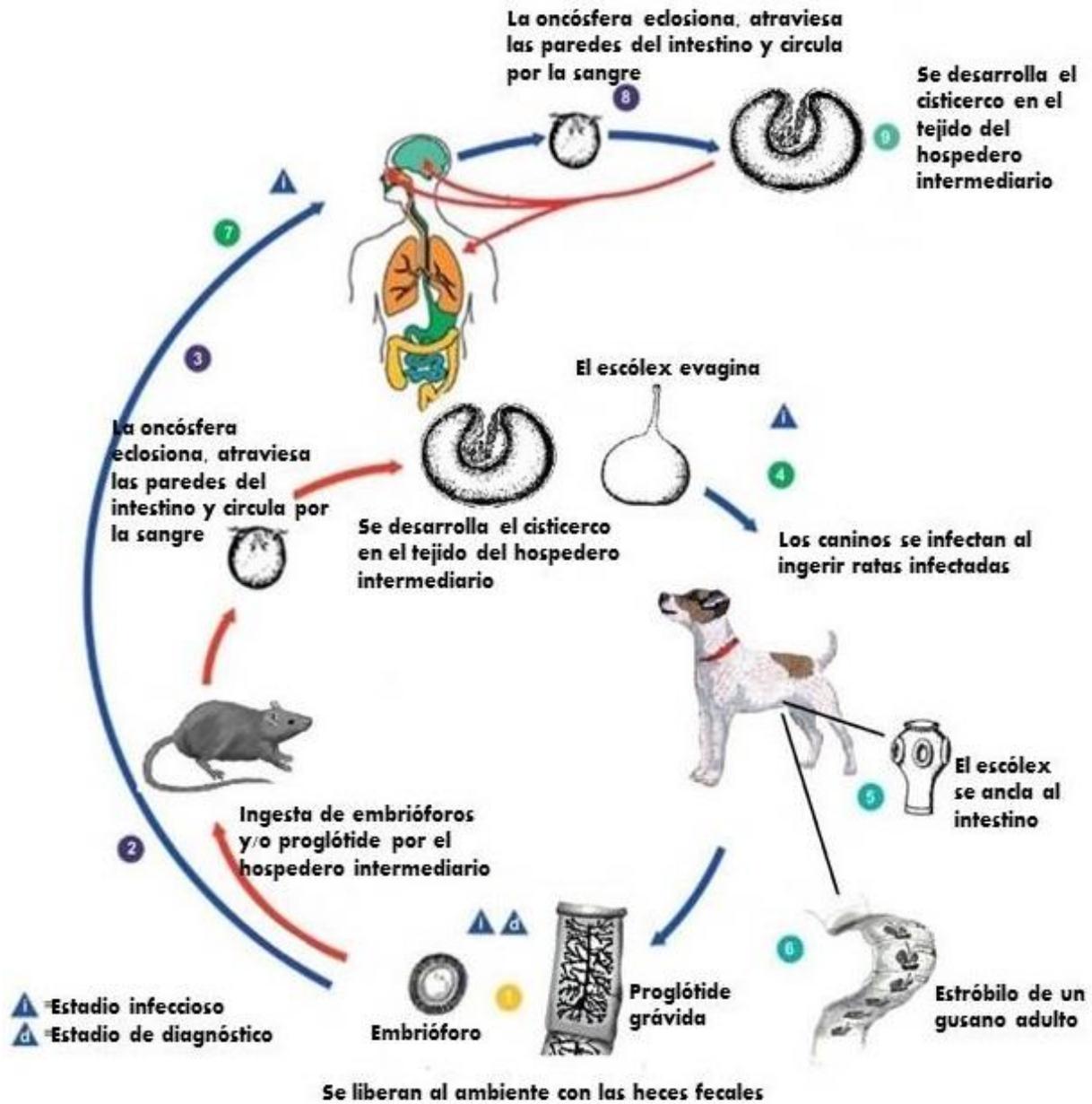


Figura 6 Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*

1) Las proglótides grávidas y los embríoforos salen al ambiente con las heces fecales del hospedero definitivo (canino). Esta es etapa de infección y de diagnóstico. 2) Ingesta de los embríoforos por el hospedero intermediario (roedor). 3) La oncosfera eclosiona, se infiltra en la sangre y la linfa, se aloja en músculo, cerebro, cavidad pleural y/o cavidad peritoneal. 4) La oncosfera se desarrolla en metacéstodo (cisticerco). 5) El hospedero definitivo adquiere al metacéstodo al ingerir al hospedero intermediario. El cisticerco evagina el escólex para anclarse al intestino del hospedero definitivo. Esta etapa es de infección. 6) El parásito forma estróbilos compuestos de proglótides. Las proglótides más distales, maduran, se autofecundan y se liberan al ambiente con las heces. 7) El humano adquiere la infección a través de las proglótides o de los embríoforos de las heces de sus mascotas, o de alimentos contaminados con heces de caninos, fungiendo como hospedero intermediario.

3 ANTECEDENTES

En colon de ratón se ha detectado la expresión de las claudinas 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 12, 13, 15 (48).

La claudina 1 es una proteína selladora de las UE. Su regulación ha sido examinada por varios grupos de investigación y los resultados han sido contrastantes. El grupo de Oshima y colaboradores, encontró una expresión constante de claudina 1 en biopsias de recto en pacientes con CU activa (49), mientras que el grupo de Poritz y colaboradores demostraron un incremento de la expresión de claudina 1 en tejido afectado de colon en pacientes con CU (50). Weber concluyó que la expresión de claudina 1 y 2 depende de la severidad del daño, pues se observa un incremento en su expresión en tejido sumamente inflamado pero no cuando el tejido tiene una ligera inflamación y se especula que este incremento pueda estar ligado al desarrollo de neoplasia durante la colitis ulcerativa (51).

La claudina 2 se expresa en tejidos de baja resistencia epitelial como el túbulo proximal del riñón y las criptas intestinales, forma poros selectivos e incrementa la permeabilidad paracelular a cationes orgánicos e inorgánicos pero no a aniones o a moléculas sin carga más grandes como el manitol, la lactosa o el dextran de 4kDa (16, 52-54).

En los estudios que se han hecho sobre claudina 2 sucede lo mismo que con claudina 1; Weber menciona que es casi indetectable en tejido sano del colon humano pero su expresión aumenta significativamente en la CU (51), mientras que Lameris y su grupo observaron que esta claudina se expresa tanto en células de las microvellosidades como en las criptas del intestino delgado, mostrando una disminución en su expresión conforme se acercan al lumen y que en el colon se restringe a las células indiferenciadas de las criptas en tejido sano (48).

La claudina-3 se expresa en un amplio número de epitelios, como el respiratorio, urinario y gastrointestinal y en glándulas mamarias y salivales. También es un constituyente de la barrera hematoencefálica y hematotesticular. Se considera que esta claudina es una proteína formadora de barreras en las uniones estrechas y que es capaz de interactuar con claudina 2 de manera heterofílica, por lo tanto, se piensa que la claudina 3 generalmente tensa el espacio paracelular (17). En el tracto gastrointestinal, se expresa principalmente en la parte distal, es decir en el colon, el sigmoides y el recto, se localiza tanto en las uniones estrechas como en la

membrana lateral de las células epiteliales y se puede observar mayor expresión en las células lumbinales que en las criptas del colon (48).

La claudina 4 se expresa en todo el intestino, en la membrana lateral de las células epiteliales de la superficie de las vellosidades. En el colon de ratón existe evidencia indirecta de que actúa para sellar el espacio paracelular, ya que su expresión se ha visto disminuida en condiciones que causan un aumento en la permeabilidad (16).

La claudina 5 es una de las 3 únicas claudinas que tienen un extremo amino terminal largo. Es la claudina predominante en las uniones estrechas endoteliales (54, 55). Rahner y colaboradores observaron una expresión de claudina 5 localizada estrictamente en las uniones estrechas de las células endoteliales y epiteliales en el intestino de rata (53), mientras que Menningen y su grupo, la encontraron tanto en la membrana lateral como en las uniones estrechas de las células epiteliales del colon con un gradiente de expresión de mayor a menor intensidad del lumen hacia las criptas (56).

La claudina 6 es una de las primeras moléculas que se expresan en el desarrollo temprano, durante la diferenciación de los epitelios y su expresión esta confinada esencialmente a la vida embrionaria y fetal (17, 57). En ratones se ha visto expresada como un marcador global del endodermo, y en células troncales pluripotentes importantes en el desarrollo endodermal y la epitelización. Se encuentra ausente en la mayoría de los tejidos adultos pero es altamente expresada en células indiferenciadas donde es importante para la sobrevivencia y autorenovación de las células troncales pluripotentes (31). Jing y colaboradores observaron a claudina 6 fosforilada, localizada en el colon en la zona lateral de las criptas y en el epitelio luminal, en ratas. Utilizaron el modelo de inducción de colitis con DSS y observaron que esta claudina aumenta su expresión en el día 4 y en el día 8 posteriores al inicio del DSS. Posteriormente dieron tratamiento con LPS, encontrando que la claudina 6 aumenta 72 horas después del tratamiento (58).

En ratones, la claudina 7 se expresa en la membrana apical y basolateral de las células epiteliales en el intestino delgado, mientras que claudina 8 se distribuye en la membrana basolateral de las células epiteliales en el íleon y el colon (36, 59).

La claudina 9 se expresa principalmente durante el desarrollo embrionario. Se expresa selectivamente en las uniones estrechas de la cóclea donde separa la endolinfa, alta en potasio, de la perilinfa, baja en potasio (16). En ratones se han detectado mRNAs de la claudina 9 expresadas débilmente a lo largo del tracto gastrointestinal (4).

La claudina 12 se localiza en la parte más apical de la membrana basolateral de las células epiteliales en el yeyuno, íleon y colon pero no en el duodeno. La claudina 13 en la membrana apical de los colonocitos y la claudina 15 se localiza también en la membrana apical de las células epiteliales tanto en el intestino delgado como en el colon (36).

4 JUSTIFICACIÓN

El conocimiento acerca de la función de las claudinas se ha incrementado en la última década, sin embargo aún existen preguntas sin resolver en cuestión de interacción y de expresión proteica en diversas patologías. Este trabajo pretende analizar los cambios en la expresión de claudinas en un modelo murino de colitis aguda, así como identificar las modificaciones que ocurren al utilizar el antígeno excretado/secretado de *T. crassiceps*, ya que se ha descrito que el epitelio sufre modificaciones y esto involucra directamente a las uniones estrechas y por consiguiente a las claudinas.

5 OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de las claudinas -2, -3, -5, -6 y -9 en un modelo murino de colitis aguda.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar la expresión a nivel de proteína, de las claudinas: -2, -3, -5, -6, y -9 en colon de ratones BALB/c divididos en los siguientes grupos:

1 Control	2 TcES	3 DSS	4 DSS + TcES
Ratones sanos	Ratones sanos inoculados con el antígeno secretado/excretado de <i>T. crassiceps</i> (200mg)	Con colitis aguda inducida con DSS al 4%	Con colitis aguda inducida con DSS al 4% y posteriormente inoculados con el antígeno excretado/secretado de <i>T. crassiceps</i> (200mg)

- Determinar cuantitativamente la expresión a nivel de proteína, de las claudinas -2, -3, -5, -6 y -9 de los 4 grupos de estudio.

6 METODOLOGÍA

Para cumplir los objetivos antes mencionados se utilizaron 320 cortes de colon de ratones BALB/c hembras de entre 8 y 9 semanas de edad, divididos en los cuatro grupos antes mencionados. El diseño experimental estuvo a cargo del Dr. Luis Ignacio Terrazas y se llevó a cabo por sus estudiantes en el Laboratorio #8 de la UBIMED en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Se menciona brevemente su metodología.

6.1 Obtención del antígeno excretado/secretado de *Taenia crassiceps*.

Los metacéstodos de *T. crassiceps* fueron recolectados de la cavidad peritoneal de ratones BALB/c hembras, 2 meses después haber sido infectados. Se lavaron con solución salina estéril. Se incubaron en solución salina estéril a 37°C durante 24 horas. Se recuperó el antígeno secretado/excretado (TcES) del sobrenadante y se filtró en tubos de corte Merck Millipore de 50 kDa, se le agregó inhibidor de proteasas y se pasó a través de un filtro de 0,22 micras.

6.2 Grupos experimentales.

1. Grupo Control. Los ratones tomaron agua estéril ad. lib. durante el experimento.
2. Grupo TcES. Los ratones fueron inyectados vía intra peritoneal con 200 ug de TcES diariamente durante un periodo de 10 días.
3. Grupo DSS. Se indujo colitis a los ratones, con la administración vía oral del compuesto químico Dextran Sulfato de Sodio (DSS) (P.M. 35000-50000 kD, MP Biomedicals), el cual se colocó al 4% en los bebederos con agua estéril durante un periodo de 10 días.
4. Grupo DSS+TcES. La colitis se indujo con la administración vía oral del DSS al 4% en los bebederos con agua estéril durante un periodo de 10 días, mismos en los que fueron inyectados vía intra peritoneal con 200 ug diarios de TcES.

6.3 Obtención del colon.

Los ratones se sacrificaron utilizando una cámara de CO₂ y se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el dolor. Posteriormente, se extrajo quirúrgicamente el colon completo de los ratones, se fijó en paraformaldehído al 4% y se incluyó en parafina.

6.4 Cortes histológicos.

A partir de estos bloques de parafina, se realizaron, en nuestro laboratorio, cortes histológicos de 4 µm de grosor para observar la expresión y localización de las claudinas -2, -3, -5, -6, -9 mediante inmunohistoquímica, la cual se describe a continuación: Se desparafinaron y rehidrataron los cortes de tejido con las siguientes soluciones:

- a) Xilol por 10 minutos
- b) Xilol por 5 minutos
- c) Xilol/alcohol (100% o 96% y 1:1) por 5 minutos
- d) Alcohol 100% por 5 minutos
- e) Alcohol 100% por 5 minutos
- f) Alcohol 96% por 5 minutos
- g) Alcohol 96% por 5 minutos
- h) PBS 1X por 5 minutos

Se realizó la recuperación antigénica con buffer de citratos pH6, en baño maría durante 5 minutos en microondas y se dejó enfriar por 30 minutos. Después de lavar con PBS 1x, se agregó a los tejidos, solución de tritón al 0.2% durante 10 minutos en cámara húmeda para permeabilizar.

Se agregó el bloqueador de peroxidasa endógena (Kit de Dako) y se incubó durante 15 minutos, después se realizaron 3 lavados con PBS 1x. Posteriormente se agregó el bloqueador de proteínas (BioCare) para bloquear los sitios de unión inespecífica, durante 15 minutos. Se lavaron los tejidos con PBS-Tween al 0.2%, 3 veces durante 5 minutos. Se incubó con los anticuerpos primarios correspondientes, diluidos en solución Verde Da Vinci (Biocare), durante 1 hora a 37°C.

A continuación se enlistan los anticuerpos primarios utilizados:

Anticuerpo	Concentración	Proveedor y lote
Rabbit Anti-claudina 2	0.2 mg/ml	Gene Tex. Lot: 54535
Rabbit Anti-claudina 3	0.2 mg/ml	Gene Tex. Lot: 32404
Mouse Anti-claudina 5	0.2 mg/ml	Gene Tex. Lot: 14846
Goat Anti-claudina 6	0.2 ug/ml	Santa Cruz. Lot: H2112
Goat Anti-claudina 9	0.2 ug/ml	Santa Cruz. Lot: A1112

Con mucho cuidado para no mezclar los anticuerpos, se lavaron los tejidos con PBS-Tween al 0.2% y se incubó con la solución universal biotinilada (DAKO) que contiene anticuerpo secundario anti-ratón, anti-conejo y anti-cabra, durante 30 minutos a temperatura ambiente en

cámara húmeda; posteriormente se lavaron e incubaron con estreptavidina acoplada a peroxidasa de rábano (HRP), durante 30 minutos.

Posterior a 3 lavados, se revelaron los tejidos con diaminobenzidina (DAB) y se enjuagaron con PBS-Tween 0.2%, con cuidado de verter los desechos en solución de hipoclorito para desactivarla. Se realizó la tinción de núcleos con hematoxilina de Harris durante 10 segundos y se enjuagó con agua destilada. Se deshidrataron los tejidos con el tren de alcoholes / xiloles y se montaron con resina hidrofóbica.

Los tejidos se revisaron con un microscopio Nikon Optiphot 2 y se tomaron entre 6 y 10 fotografías para posteriormente realizar la reconstrucción del tejido completo y no perder definición al analizar las fotografías. Posteriormente se tomaron fotografías de 6 campos aleatorios por cada corte, se obtuvo el porcentaje de marca positiva de cada claudina y se observó su localización en el epitelio. Las imágenes fueron analizadas con el software libre ImageJ para PC.

7 RESULTADOS

7.1 Cambios histológicos observados en los grupos de estudio

La morfología del colon en ratones inoculados con TcES, no mostró diferencias respecto al grupo control.

En la figura 7 se muestra la reconstrucción fotográfica de la estructura de colon sano de ratones BALB/c. Se puede observar la estructura normal de la capa serosa, de las capas longitudinal y circular de musculo liso, submucosa y la presencia de criptas. La figura 8 muestra la reconstrucción fotográfica de la estructura de colon de ratones BALB/c que fueron inoculados con el TcES. Como se puede observar, la estructura de cada una de las capas que componen el intestino no muestra cambios aparentes producto de la presencia del TcES.

Los cambios morfológicos en el colon de los ratones tratados con el DSS son diversos (Figura 9). Como puede observarse hay pérdida de continuidad en la capa de células epiteliales, identificado por pérdida de la estructura en el tejido, pérdida en la formación de las criptas, presencia importante de vacuolas en la mucosa, engrosamiento de la mucosa y separación de la mucosa de la capa muscular debido al desprendimiento de la submucosa.

En los ratones en los que se inoculó el TcES posterior a la inducción de colitis (Figura 10) se observó una recuperación en la continuidad del epitelio, disminución en el número de vacuolas, recuperación en la estructura de las criptas, la submucosa se observó íntegra en algunos puntos y la mucosa restableció el contacto con la capa muscular. Aunque se observaron diferencias notables respecto a la morfología del tejido sano, existe una gran mejoría respecto a los tejidos dañados por el DSS.

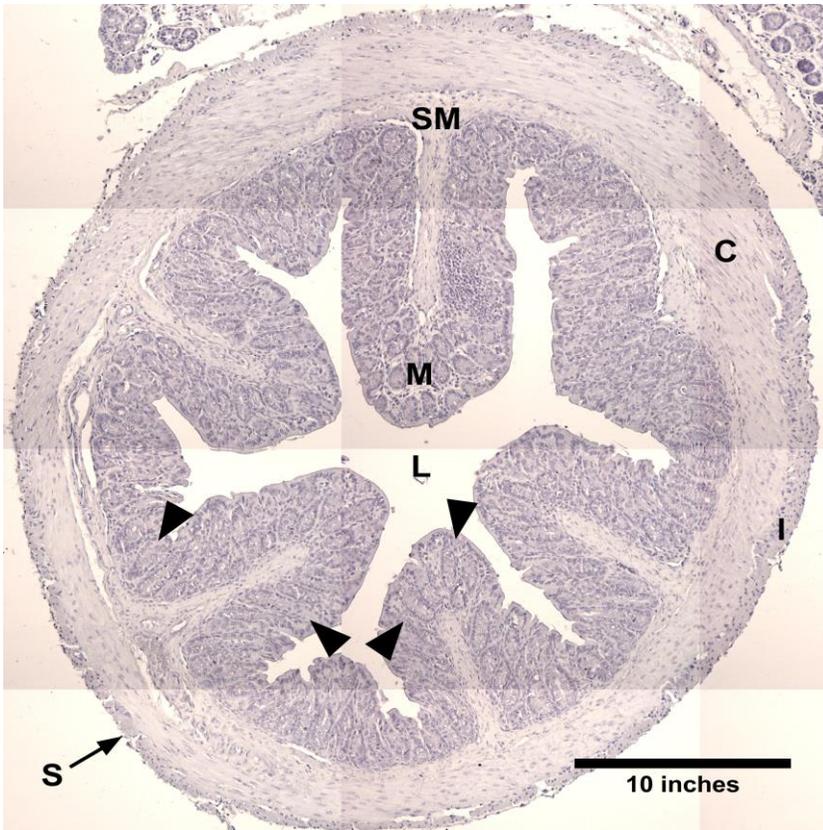


Figura 7 Reconstrucción fotográfica de colon sano

Mucosa (M), Submucosa (SM), Lumen (L), Capa circular de músculo liso (C), Capa longitudinal de músculo liso (I) y Serosa (S). Las criptas se indican con puntas de flecha Tinción con H&E.

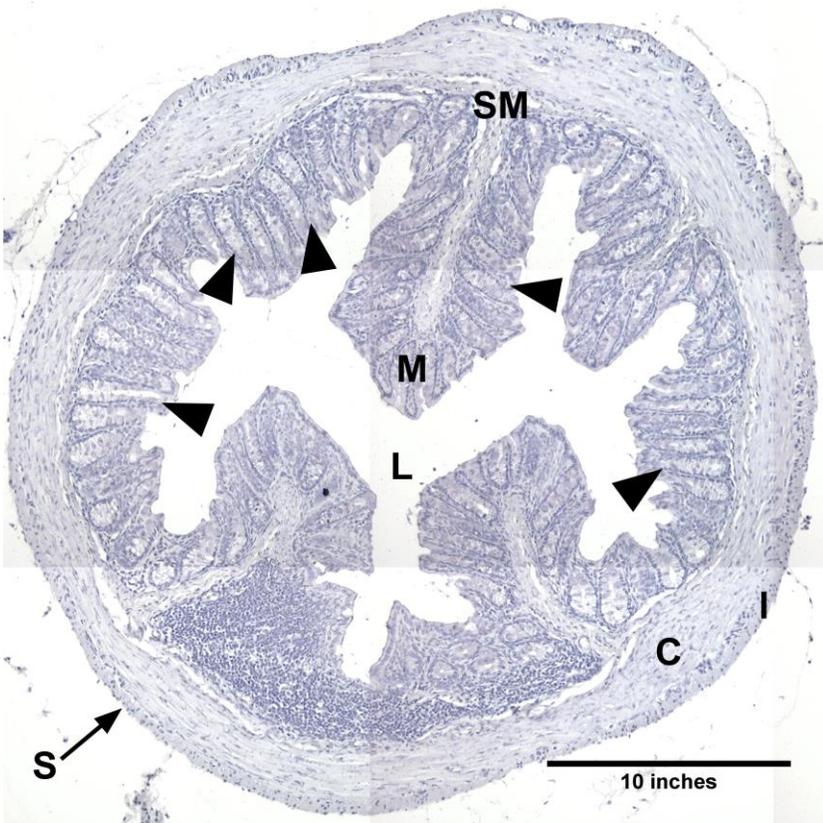


Figura 8 Reconstrucción fotográfica de colon inoculado con TcES.

Mucosa (M), Submucosa (SM), Lumen (L) Capa circular de músculo liso (C), Capa longitudinal de músculo liso (I) y Serosa (S). Se indican las criptas normales con puntas de flecha. Tinción con H&E.



Figura 9 Reconstrucción fotográfica de colon con inflamación inducida por DSS. La mucosa (M) presenta un daño severo (flechas en rojo), las criptas se acortan (punta de flecha roja) y se observan vacuolas (punta de flecha negra). La submucosa (SM) se desprende de la capa circular de músculo liso (C), la separación se indica con flecha negra. Lumen (L). Capa longitudinal de músculo liso (I) y Serosa (S). Tinción con H&E.

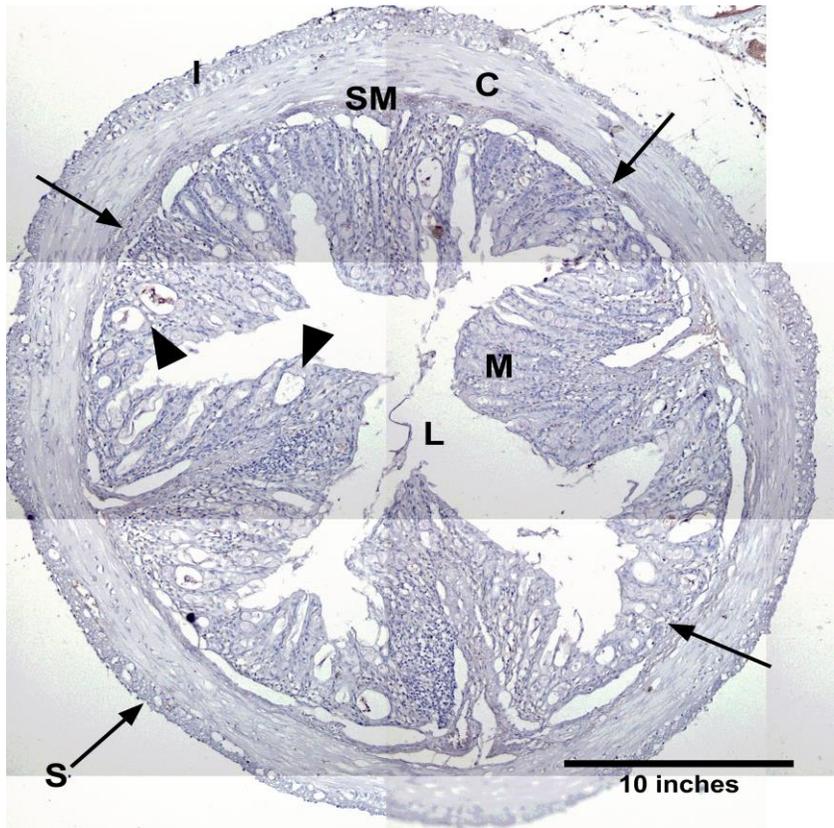


Figura 10 Reconstrucción fotográfica de colon con inflamación inducida con DSS inoculado posteriormente con el antígeno TcES. La mucosa (M) recupera su estructura normal en varias zonas, aunque todavía existen vacuolas (puntas de flecha). Se observan zonas de la submucosa (SM) nuevamente adheridas a la capa circular de músculo liso (C) (flechas). Lumen (L), Capa longitudinal de músculo liso (I) y Serosa(S). Tinción con H&E.

7.2 Cambios en la expresión a nivel de proteína de claudinas.

La expresión y localización de claudinas fue analizada utilizando anticuerpos específicos. Se utilizaron 3 ratones para el grupo control y 4 ratones para cada grupo de estudio; a cada ratón se le midieron 5 claudinas por triplicado. Se seleccionaron 15 tejidos por cada claudina para realizar el análisis estadístico. Posteriormente se realizaron 6 microfotografías por tejido obteniendo un total de 450 fotografías las cuales se analizaron con el programa Image J. Se generó una base de datos con el porcentaje promedio de expresión de cada claudina en todos los grupos de estudio. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para datos no paramétricos para analizar los datos.

En los ratones control y en los inoculados con el antígeno no se observó señal de claudina 2. En el grupo de ratones con colitis (DSS) y en el de ratones con colitis inoculados con el antígeno (DSS + TcES) se observó un máximo de 2% de células positivas en la mucosa (Fig. 11).

La claudina 3 presentó una localización exclusivamente luminal en el colon normal de ratón, con un promedio de 11.91% de células positivas (Fig. 12). Al inocular a los ratones con el TcES, la expresión se inhibe. En los ratones con colitis el porcentaje de células positivas disminuyó un 60% respecto al control, con un promedio de 4.66% de células positivas. En los ratones que tuvieron colitis y luego fueron inoculados con el antígeno, se observó un 7.38% de células positivas en el epitelio luminal y lateral de las criptas, lo que representa un aumento del 58% respecto al tejido con colitis.

La expresión de claudina 5 estuvo restringida al epitelio luminal con un promedio de 22.25% de células positivas (Fig. 13). Los ratones que fueron inoculados, presentaron una disminución del 50% en la expresión de la proteína con un promedio de 11.23% células positivas en el epitelio luminal. Los ratones con colitis mostraron en promedio, un 18% de células positivas en la mucosa. En los ratones con colitis que tuvieron tratamiento con TcES, tuvieron en promedio 6% de células positivas en el epitelio luminal, esto corresponde a una disminución del 67% con respecto al tejido inflamado.

En los ratones control, la claudina 6 mostró en promedio un 23% de células positivas en la base de las criptas (Fig. 14). En los ratones inoculados con TcES también se observó la marca en la base de las criptas con un promedio de 28.6% de células positivas. En el tejido del ratón con colitis la expresión de la claudina 6 se observó tanto en la base como en la parte media de las

criptas y corresponde, en promedio, al 8.07% de las células positivas. Esto corresponde a una disminución del 65% respecto al control. En los ratones tratados con TcES después de la colitis, la claudina 6 se encontró en vesículas y un poco en la lámina propia, con un promedio de 7.33% de las células; esto corresponde a una disminución del 9% con respecto al tejido con colitis.

La claudina 9 en ratones control presentó una localización parecida a la claudina 6, justo en la base de las criptas, con un promedio de 27.64% de células positivas (Fig. 15). Los ratones inoculados con antígeno presentaron 28.05% de células positivas en la base de las criptas. En los ratones con colitis se observó un 12.53% de células positivas localizadas en todo lo largo de las criptas, esto representó una disminución del 55% respecto al control. Los ratones con colitis que fueron inoculados con el antígeno, presentaron un 9.13% de células positivas localizadas en la lámina propia, que corresponde a una disminución del 27% con respecto al tejido inflamado.

En resumen, (Tabla 2) se observó que en el grupo TcES, la expresión de las claudinas 3 y 5 disminuyó, claudina-6 aumentó y claudinas 2 y 9 no se modificaron respecto al colon sano. La localización de claudina 3 fue la única que se vio alterada. En el grupo DSS, la expresión de las claudinas analizadas disminuye significativamente excepto para claudina 2, la localización se modificó en todas menos claudina 3. En el grupo DSS + TcES, la expresión de claudina 2 aumentó y todas las demás disminuyeron. La localización de claudina 2, 6 y 9 se alteró, la de claudina 3 permaneció igual y claudina 5 recuperó su localización respecto al control.

Se comparó la expresión y localización de claudinas en el grupo DSS + TcES respecto al grupo DSS (Tabla 3). Claudina 2 aumentó su expresión y cambió su localización. Claudina 3 aumentó su expresión pero se localizó en el mismo lugar que en el grupo DSS y el grupo control. Claudina 5 disminuyó su expresión pero recuperó su localización respecto al control. Claudina 6 mantuvo la misma expresión pero cambió su localización. Claudina 9 disminuyó su expresión y cambió su localización.

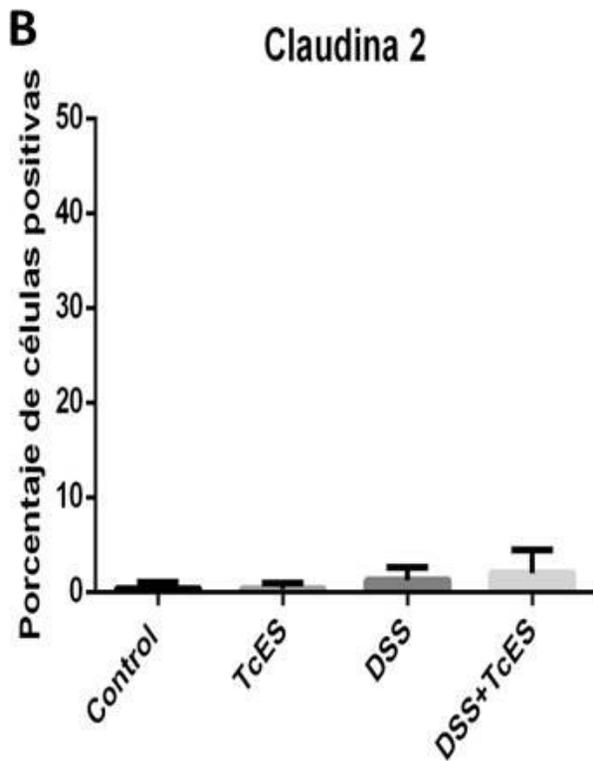
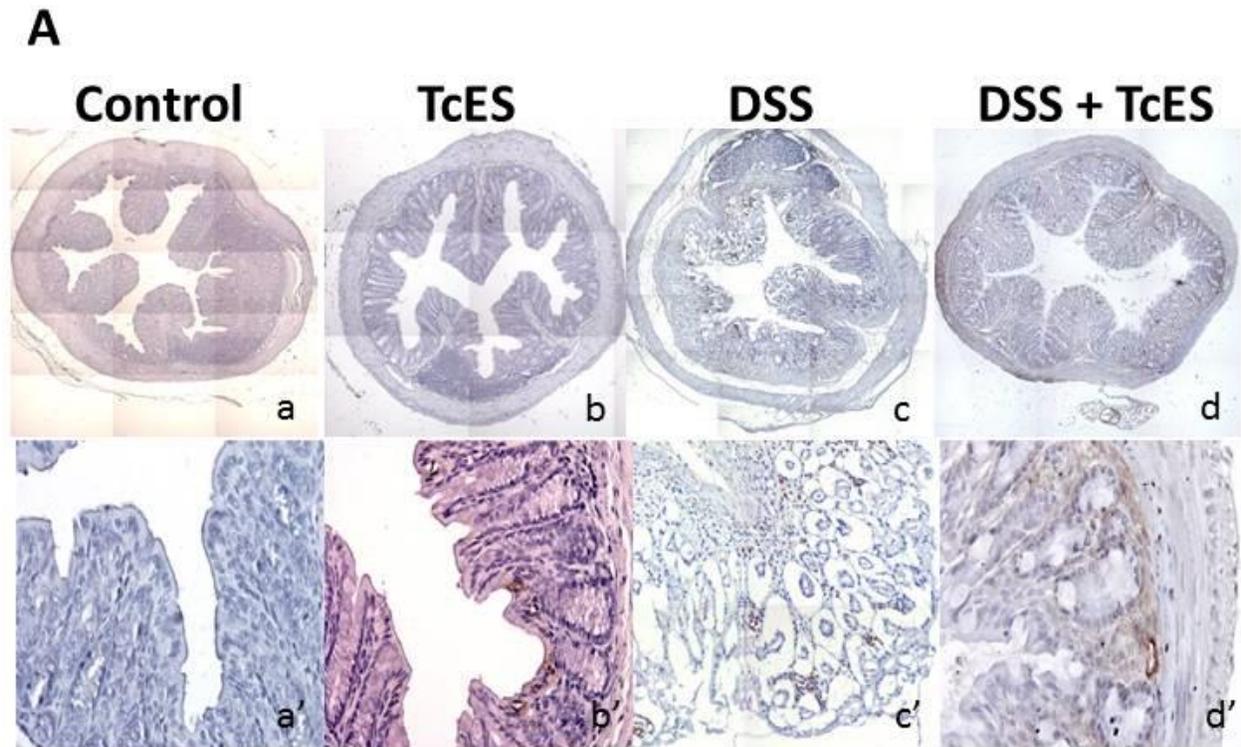


Figura 11 Claudina 2

A) Expresión diferencial de claudina 2 en colon de ratón control (a), ratón inoculado con antígeno de *T. crassiceps* (b), ratón con colitis inducida por DSS (c), ratón inoculado con el antígeno de *T. crassiceps* después de la inducción de colitis (d). Imágenes obtenidas de la reconstrucción de microfotografías tomadas a 40X.

Las imágenes a', b', c' y d' se observaron a 40X. En (c') se observa expresión en diferentes partes de la mucosa y en (d') la expresión se localiza en la submucosa.

B) Representación cuantitativa de la expresión de claudina 2 en los diferentes grupos de estudio.

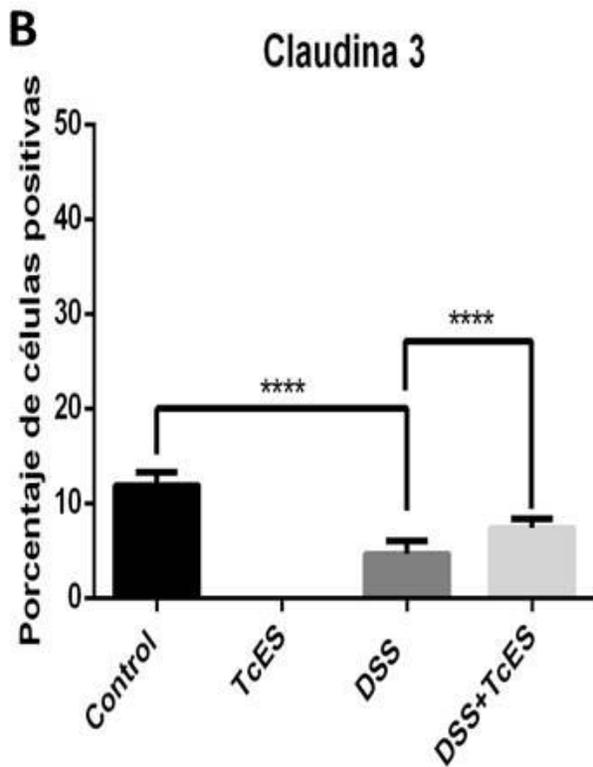
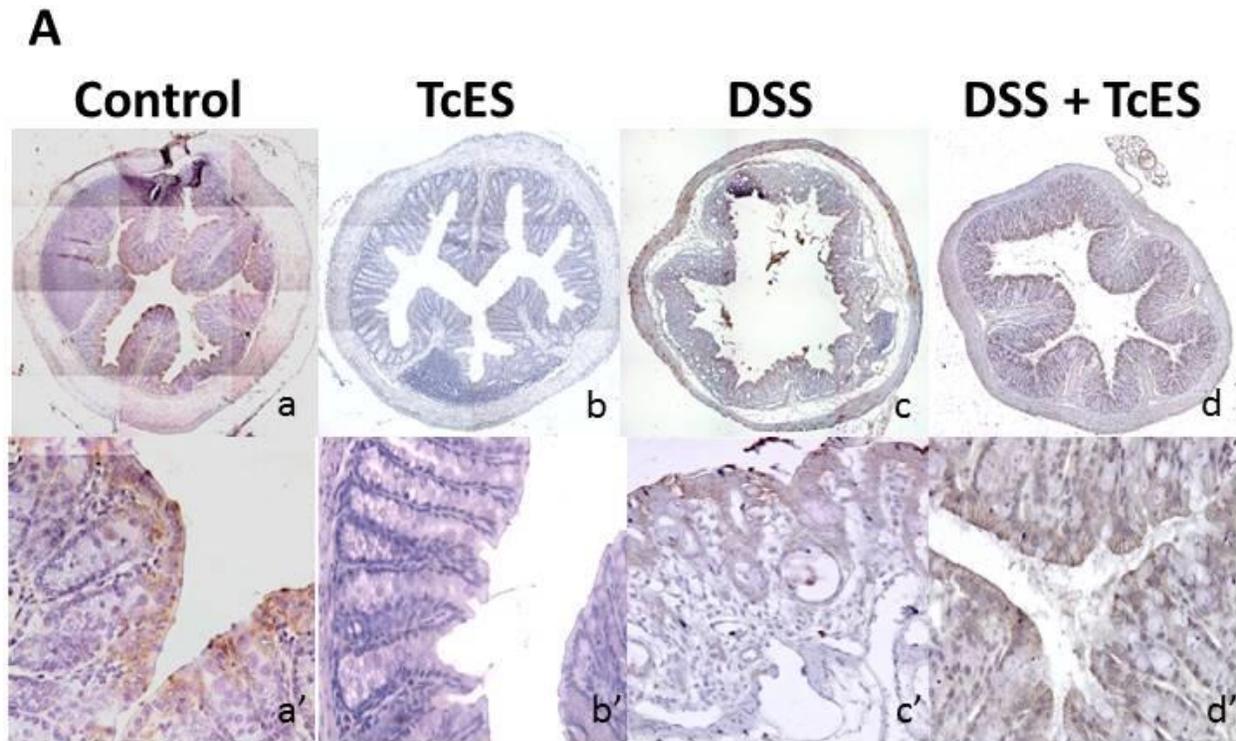


Figura 12 Claudina 3

A) Expresión diferencial de claudina 3 en colon de ratón control (a), ratón inoculado con antígeno de *T. crassiceps* (b), ratón con colitis inducida por DSS (c), ratón inoculado con el antígeno de *T. crassiceps* después de la inducción de colitis (d). Imágenes obtenidas de la reconstrucción de microfotografías tomadas a 40X.

Las imágenes a', b', c' y d' se observaron a 40X. En (a') se observa la expresión en el epitelio luminal. En (b') no se expresa la proteína. En (c') y en (d') se observa expresión en el epitelio luminal. B) Representación cuantitativa de la expresión de claudina 3 en los diferentes grupos de estudio (****P<0.0001).

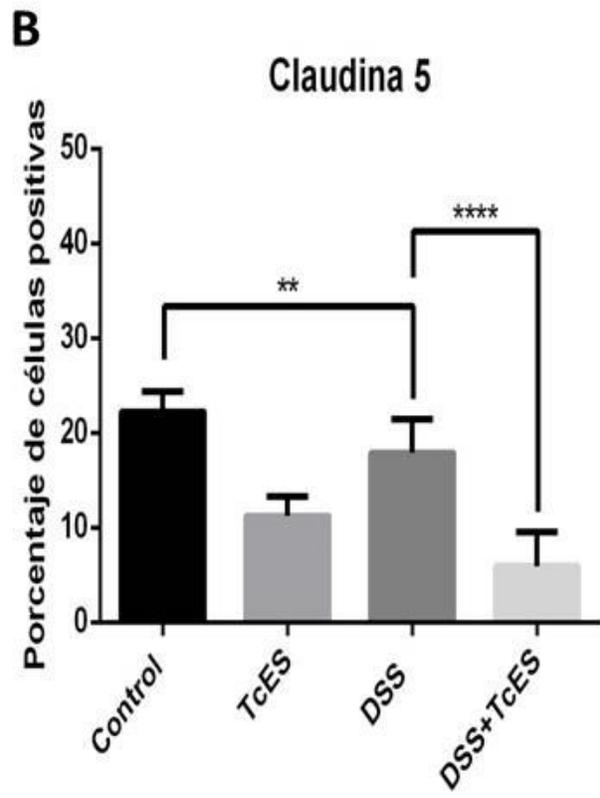
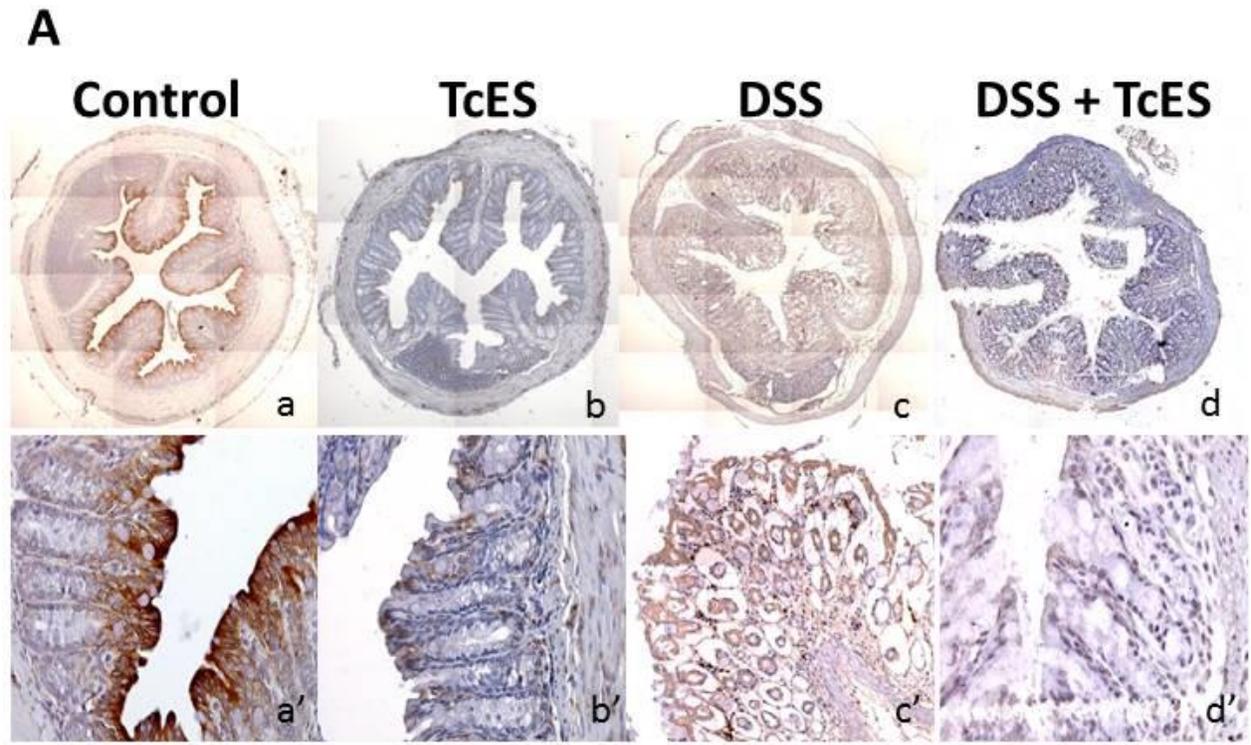


Figura 13 Claudina 5

A) Expresión diferencial de claudina 5 en colon de ratón control (a), ratón inoculado con antígeno de *T. crassiceps* (b), ratón con colitis inducida por DSS (c), ratón inoculado con el antígeno de *T. crassiceps* después de la inducción de colitis (d). Imágenes obtenidas de la reconstrucción de microfotografías tomadas a 40X.

Las imágenes a', b', c' y d' se observaron a 40X. En (a') se observa la expresión en el epitelio luminal. En (b') la expresión disminuye pero sigue apareciendo en el epitelio luminal. En (c') se observa la expresión en la mucosa y en (d') se observa en el epitelio luminal.

B) Representación cuantitativa de la expresión de claudina 5 en los diferentes grupos de estudio. (****P<0.0001) (**P<0.0010).

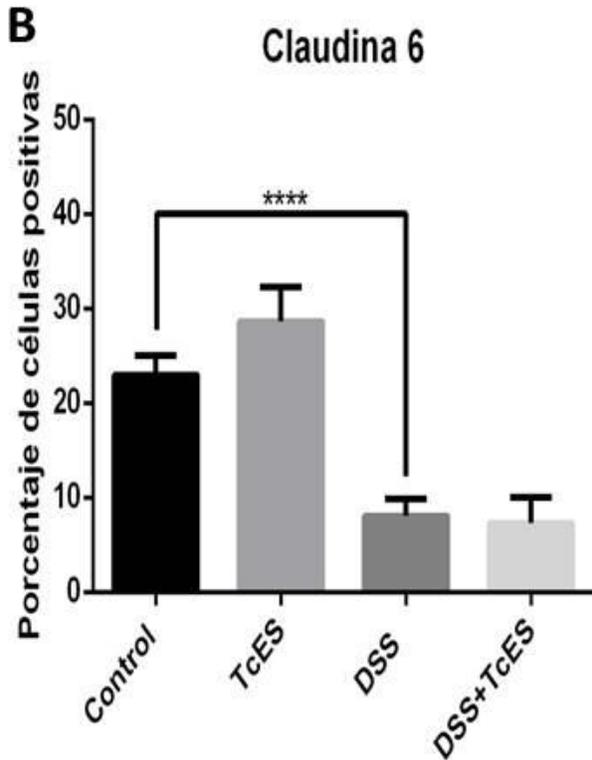
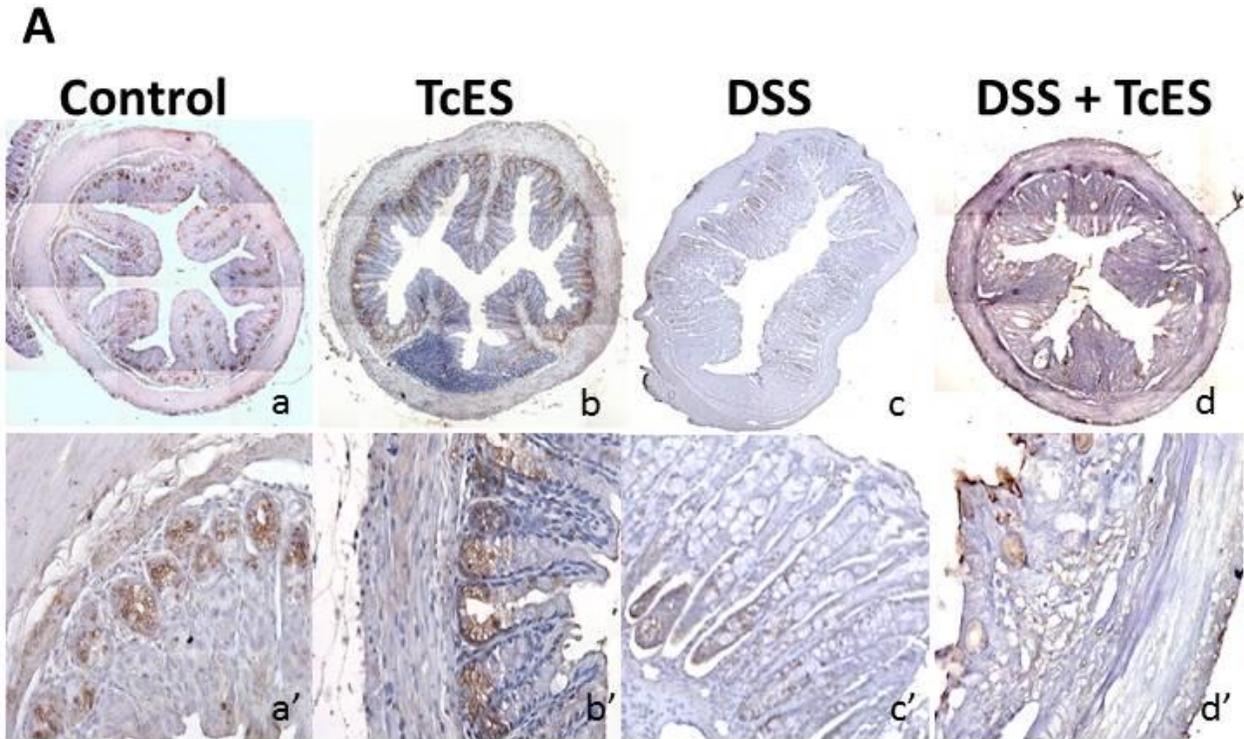


Figura 14 Claudina 6

A) Expresión diferencial de claudina 6 en colon de ratón control (a), ratón inoculado con antígeno de *T. crassiceps* (b), ratón con colitis inducida por DSS (c), ratón inoculado con el antígeno de *T. crassiceps* después de la inducción de colitis (d). Imágenes obtenidas de la reconstrucción de microfotografías tomadas a 40X.

Las imágenes a', b', c' y d' se observaron a 40X. En (a') y (b') se observa la expresión en la base de las criptas. En (c') se observa la expresión en toda la extensión de las criptas y en (d') se observa en vacuolas y en el epitelio.

B) Representación cuantitativa de la expresión de claudina 5 en los diferentes grupos de estudio. (****P<0.0001)

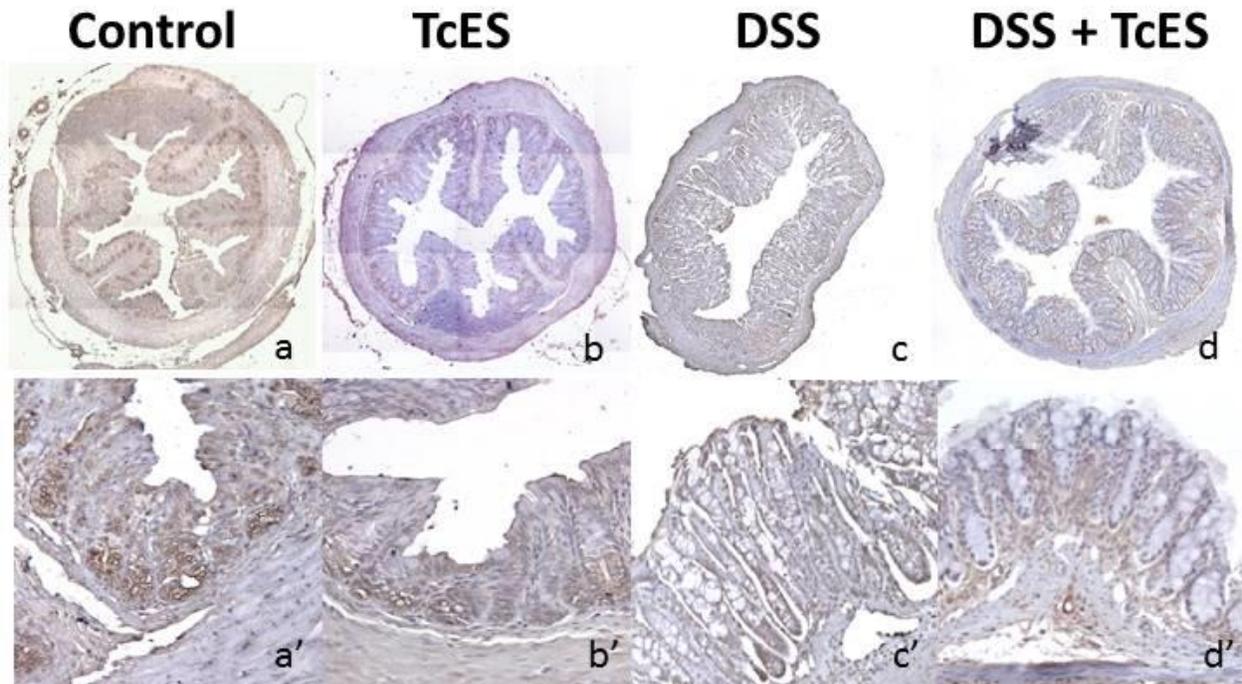
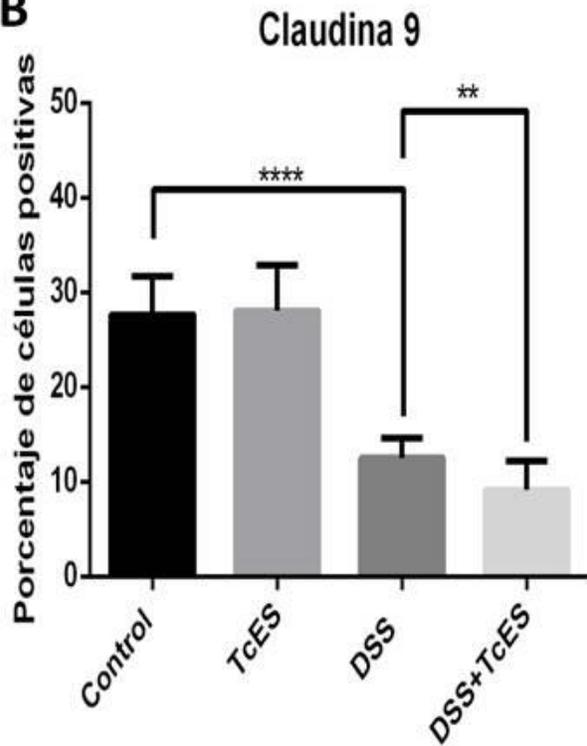
A**B**

Figura 15 Claudina 9

A) Expresión diferencial de claudina 9 en colon de ratón control (a), ratón inoculado con antígeno de *T. crassiceps* (b), ratón con colitis inducida por DSS (c), ratón inoculado con el antígeno de *T. crassiceps* después de la inducción de colitis (d). Imágenes obtenidas de la reconstrucción de microfotografías tomadas a 40X.

Las imágenes a', b', c' y d' se observaron a 40X. En (a') y (b') se observa la expresión en la base de las criptas. En (c') se observa la expresión en toda la extensión de las criptas y en (d') se observa en la lámina propia.

B. Representación cuantitativa de la expresión de claudina 9 en los diferentes grupos de estudio. (**** $P < 0.0001$) (** $P < 0.0010$).

Tabla comparativa de expresión y localización de claudinas en los 4 grupos experimentales.

	Control		TcES		DSS		DSS + TcES	
Claudina 2	-		=		↑	M	↑	SM
Claudina 3	+	EL	↓		↓	EL	↓	EL
Claudina 5	+	EL	↓	EL	↓	M	↓	EL
Claudina 6	+	BC	↑	BC	↓	C	↓	M
Claudina 9	+	BC	=	BC	↓	C	↓	LP

Tabla 2. En el grupo control se indica presencia (+) o ausencia (-) de la proteína correspondiente. En los demás grupos, se indica si el nivel de expresión de la proteína aumenta (↑), permanece (=) o disminuye (↓) respecto al control. La localización de la proteína se indica con siglas; Epitelio Luminal (EL), Base de las Criptas (BC), Criptas en general (C), Mucosa (M), Sub Mucosa (SM), Lamina Propia (LP). El color rojo indica alteración en la localización de la proteína respecto al control, el color verde indica que la proteína recupera su localización respecto al control.

Tabla comparativa de expresión y localización de claudinas, entre los grupos DSS y DSS + TcES.

	DSS		DSS + TcES	
Claudina 2	↑	M	↑	SM
Claudina 3	↓	EL	↑	EL
Claudina 5	↓	M	↓	EL
Claudina 6	↓	C	=	M
Claudina 9	↓	C	↓	LP

Tabla 3. En el grupo DSS, se indica si el nivel de expresión de la proteína aumenta (↑), permanece (=) o disminuye (↓) respecto al control. En el grupo DSS + TcES, se indica si el nivel de expresión de la proteína aumenta (↑), permanece (=) o disminuye (↓) respecto al grupo anterior. La localización de la proteína se indica con siglas; Epitelio Luminal (EL), Criptas en general (C), Mucosa (M), Sub Mucosa (SM), Lamina Propia (LP). El color rojo indica alteración en la localización de la proteína respecto al control, el color verde indica que la proteína recupera su localización respecto al control.

8 DISCUSIÓN

Se ha estudiado la función de las uniones estrechas en diversas patologías que involucran inflamación sobre todo en enfermedades intestinales, donde se ha visto que la principal afección es la pérdida de la función de barrera del epitelio (29, 56, 58, 60). Los cambios en abundancia y estructura molecular de las claudinas tienen tres efectos principales, sin que forzosamente sucedan simultáneamente: 1.-Disminución en la absorción de agua y pequeños solutos, 2.-Incremento en la secreción de agua y pequeños solutos y 3.-Incremento en la absorción de macromoléculas que pueden inducir inflamación (61).

El objetivo del presente trabajo estuvo enfocado en analizar los cambios en la expresión de claudinas en un modelo murino de colitis aguda, así como analizar si el tratamiento con el antígeno secretado/excretado de *T. crassiceps*, el cual se sabe que recupera la estructura del tejido, permite la expresión normal de dichas claudinas.

Los resultados obtenidos mostraron que la claudina 2 no fue detectada en los ratones sanos ni en los inoculados con el antígeno TcES; en el tejido inflamado y en el que tuvo tratamiento con antígeno después de la colitis, se detectó marca positiva pero sólo en el 2% de las células por lo que no se considera significativo. Esto concuerda parcialmente con las observaciones hechas por Weber, donde en tejido sano es indetectable la claudina 2 pero se sobre expresa en biopsias de colitis ulcerativa (51). La baja expresión de claudina 2 en nuestras biopsias de colitis, puede deberse al tiempo de exposición al detergente y al momento en el que se sacrificaron los ratones, pues existen estudios en ratas donde la expresión de diferentes claudinas fluctúa durante el tiempo de la exposición al DSS (58, 62). También hay estudios donde se considera que el aumento en la expresión de claudina 2 en la mucosa del intestino, representa un mecanismo de protección a antígenos extraños, pues con el aumento de claudina 2 aumenta la permeabilidad del agua hacia el lumen y el antígeno puede ser “lavado” fuera del intestino(60), partiendo de que en nuestro estudio el antígeno es administrado vía intraperitoneal y que por lo tanto no llega al lumen del intestino, no habría porqué aumentar la permeabilidad al agua.

Se observó que la claudina 3, en tejido sano se encuentra en el epitelio luminal del colon y al inocular el antígeno TcES la expresión se inhibe, el antígeno induce la producción de citocinas que le indican al sistema inmune que hay una infección por parásitos (40, 63), cuando esto ocurre la barrera aumenta para evitar que el antígeno atraviese el epitelio. En este caso el

antígeno no está en el lumen pero la respuesta no se está dando por una acción local sino sistémica debido a las citocinas. En el tejido inflamado también disminuye la expresión significativamente respecto al control, esta disminución se ha reportado anteriormente tanto en colitis ulcerativa como en enfermedad de Chron (58, 61), pues la permeabilidad del epitelio aumenta debido a la inflamación. Los ratones con colitis que recibieron tratamiento con TcES presentan un aumento significativo en la expresión de claudina 3 respecto al tejido con colitis, aunque no alcanza los niveles basales del control. Lo interesante de este último grupo es que la expresión de claudina 3 no disminuye como lo hace cuando tiene cada estímulo (TcES o DSS) por separado. Esto puede deberse a que si el tejido se encuentra sumamente afectado por el detergente y se ha perdido continuidad del epitelio, al inocular el antígeno se activa la respuesta inmune Th2 y esto contribuye a que el epitelio deje de estar bajo la influencia de citocinas pro inflamatorias y pueda regenerarse la mucosa(40).

La claudina 5 es el marcador por excelencia de los endotelios, también se encarga de sellar el espacio paracelular (17). Cuando se sobre expresa en epitelios de baja resistencia como en células Caco-2 (células de cáncer de colon) provoca un incremento en la TER (*Transepithelial Electrical Resistance*) haciendo menos permeable al intestino. En nuestras muestras de colon normal de ratón, se expresa en todo el epitelio luminal. Durante la colitis la expresión disminuye respecto al control pero al inocular el antígeno, tanto en tejido sano como después de la colitis inducida, la expresión baja aún más. Aún no se conoce por completo como los helmintos logran evadir la barrera intestinal para interactuar con el sistema inmune de la mucosa, pero existen algunos mecanismos posibles. Uno de ellos refiere que las células dendríticas extienden sus dendritas y atraviesan la barrera epitelial para “muestrear” las moléculas del helminto que se encuentra en el lumen intestinal (38), aunque en nuestro estudio el parásito no tiene una acción local en la mucosa del intestino, la inoculación del antígeno TcES promueve la respuesta inmune contra el helminto y los mecanismos de detección se activen, esto respondería por qué la claudina 5 disminuye en presencia del antígeno haciendo más permeable el epitelio en función de dar paso a las células dendríticas. En el caso de la colitis inducida, el DSS provoca daño físico en el epitelio y apoptosis (60) y por lo tanto una disminución en el número de células del epitelio y por esto disminuye nuestro porcentaje de área marcada.

La función del epitelio del colon es principalmente absorción de agua, esto se debe a que los colonocitos están diseñados para tal función. En las criptas del colon, las células de la base son células madre (60). Estas células forman una zona de proliferación a partir de la cual las células hijas diferenciadas migran hacia la superficie donde reemplazan a las células exfoliadas. Durante la migración hacia la luz, las células epiteliales, modifican su expresión de

transportadores de membrana y cambian de ser células predominantemente secretoras a ser absorptivas, manteniendo así la función del colon. Existen estudios en donde se observó que durante el desarrollo de carcinoma en el colon, la zona proliferativa se recorre hacia arriba y las células epiteliales cambian su expresión de proteínas transportadoras de iones y pueden expresar canales atípicos de calcio y cloro, por lo que cambia la función del epitelio y se convierte en un epitelio secretor más que de absorción (64). En este trabajo se observó que las claudinas 6 y 9, las cuales han sido previamente descritas como marcadores de células madre, se encuentran normalmente en la base de las criptas pero en el tejido inflamado ambas claudinas se observan no solo en la base sino hasta la mitad de las criptas y en el caso de claudina 9 la marca se observa incluso en la punta de las criptas, lo que podría considerarse un marcador temprano de malignidad (Fig. 14^a c' y 15A c'). Se ha estudiado que durante los procesos inflamatorios las células pluripotenciales sufren cambios en las uniones estrechas y en la expresión de claudinas, pues también se ha demostrado que claudina 6 y 9 están implicadas en procesos de desdiferenciación y migración celular en algunos tipos de cáncer gástrico (65).

El tejido inflamado que recibió tratamiento con TcES muestra el mismo porcentaje de células positivas a claudina 6 que el grupo de colitis, esto puede deberse a que el tejido todavía muestra signos de inflamación y la mucosa aún no recupera su arquitectura normal. Cuando existe un incremento en el transporte transcelular con una entrada persistente de antígenos al epitelio, se puede conducir a una actividad inflamatoria residual a pesar de tener una barrera intacta. Esto se ha demostrado en pacientes con IBD que muestran un aumento de antígenos en los colonocitos a pesar de que el tejido no muestre signos de inflamación (56). Respecto a su localización, podríamos pensar que se trata de células no diferenciadas que migran hacia el epitelio dañado para diferenciarse en células epiteliales, ya que las criptas no se han recuperado y la función principal del tejido no depende de las criptas sino de un epitelio sano que funciones como barrera física e inmunológica.

La localización de la claudina 9 en el grupo DSS + TcES se localiza en la lámina propia. La lamina propia es el tejido que se encuentra alrededor de las criptas, se compone de tejido conectivo laxo y contiene gran cantidad de células redondas, en su mayoría linfocitos y células T reguladoras, por lo que se le ha designado el nombre de tejido linfático difuso (66). No se ha reportado que claudina 9 se exprese en este tejido, pero se ha encontrado marca de claudina 2 en lámina propia en un modelo de infección por parásitos en intestino de rata, sin que se haya investigado acerca del tema (62).

9 CONCLUSIÓN

En resumen, las claudinas 2 y 3 que están involucradas en el transporte de iones, aumentan su expresión en los tejidos con colitis que tuvieron tratamiento con el TcES, lo que sugiere que la reestructuración del tejido inducida por el TcES promueve la recuperación de función fisiológica del colon. Por otra parte las claudinas 6 y 9, reportadas como marcadores de células madre, no solo no restablecen los niveles de expresión observados en los tejidos control sino que también cambia su localización, sugiriendo que el daño en el tejido promueve la migración de esta población celular.

La administración de TcES en tejido con colitis, promueve la reestructuración del tejido. Sin embargo, las poblaciones celulares no recuperan el nivel de expresión de claudinas. El cambio en la localización de claudina 6 y 9 podría indicar el inicio de una neoplasia de colon.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*. 2007;369(9573):1627-40.
2. Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004;126(6):1504-17.
3. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annual review of immunology*. 2010;28:573-621.
4. Low D, Nguyen DD, Mizoguchi E. Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research. *Drug design, development and therapy*. 2013;7:1341-57.
5. Bosques-Padilla FJ, Sandoval-Garcia ER, Martinez-Vazquez MA, Garza-Gonzalez E, Maldonado-Garza HJ. [Epidemiology and clinical characteristics of ulcerative colitis in north-eastern Mexico]. *Revista de gastroenterología de Mexico*. 2011;76(1):34-8.
6. Yamamoto-Furusho JK, Rodriguez-Bores L, Gonzalez-Contreras QH, Martinez-Benitez B. Prevalence and clinical features of indeterminate colitis in Mexico: a 17-year study. *Revista de gastroenterología de Mexico*. 2010;75(1):30-5.
7. Yamamoto-Furusho JK, Sarmiento Aguilar A. Frequency, Clinical Features and Factors Associated with Pouchitis after Proctocolectomy with Ileo-Pouch-Anal Anastomosis in Patients with Ulcerative Colitis: A Latin-American Country Retrospective-Cohort Study. *Digestive surgery*. 2015;32(6):489-95.
8. Horn AE, Ufberg JW. Appendicitis, diverticulitis, and colitis. *Emergency medicine clinics of North America*. 2011;29(2):347-68, ix.
9. Head KA, Jurenka JS. Inflammatory bowel disease Part 1: ulcerative colitis--pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*. 2003;8(3):247-83.
10. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*. 2007;369(9573):1641-57.
11. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet*. 2012;380(9853):1590-605.
12. Thoreson R, Cullen JJ. Pathophysiology of inflammatory bowel disease: an overview. *The Surgical clinics of North America*. 2007;87(3):575-85.
13. Hu B, Elinav E, Huber S, Booth CJ, Strowig T, Jin C, et al. Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(50):21635-40.
14. Barret KE. *Gastrointestinal Physiology*. 1 ed. Lange, editor. United States: McGraw-Hill; 2006. 295 p.
15. Lee LMJ. *Histología de bolsillo*. Lippincott Williams & Wilkins; 2014. p. 288.

16. Gunzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiological reviews*. 2013;93(2):525-69.
17. Gunzel D, Fromm M. Claudins and other tight junction proteins. *Comprehensive Physiology*. 2012;2(3):1819-52.
18. Coyne CB, Voelker T, Pichla SL, Bergelson JM. The coxsackievirus and adenovirus receptor interacts with the multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) within the tight junction. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(46):48079-84.
19. Reddy VK, Short SP, Barrett CW, Mittal MK, Keating CE, Thompson JJ, et al. BVES Regulates Intestinal Stem Cell Programs and Intestinal Crypt Viability after Radiation. *Stem cells*. 2016.
20. Mariano C, Sasaki H, Brites D, Brito MA. A look at tricellulin and its role in tight junction formation and maintenance. *European journal of cell biology*. 2011;90(10):787-96.
21. Shin K, Fogg VC, Margolis B. Tight junctions and cell polarity. *Annual review of cell and developmental biology*. 2006;22:207-35.
22. Citi S, Guerrera D, Spadaro D, Shah J. Epithelial junctions and Rho family GTPases: the zonular signalosome. *Small GTPases*. 2014;5(4):1-15.
23. Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of cell science*. 2004;117(Pt 25):5965-73.
24. Finn RS, Aleshin A, Slamon DJ. Targeting the cyclin-dependent kinases (CDK) 4/6 in estrogen receptor-positive breast cancers. *Breast cancer research : BCR*. 2016;18(1):17.
25. Chikumi H, Fukuhara S, Gutkind JS. Regulation of G protein-linked guanine nucleotide exchange factors for Rho, PDZ-RhoGEF, and LARG by tyrosine phosphorylation: evidence of a role for focal adhesion kinase. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(14):12463-73.
26. Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(8):513-25.
27. Tatum R, Zhang Y, Lu Q, Kim K, Jeanson BG, Chen YH. WNK4 phosphorylates ser(206) of claudin-7 and promotes paracellular Cl⁻ permeability. *FEBS letters*. 2007;581(20):3887-91.
28. Singh AB, Sharma A, Dhawan P. Claudin family of proteins and cancer: an overview. *Journal of oncology*. 2010;2010:541957.
29. Sawada N, Murata M, Kikuchi K, Osanai M, Tobioka H, Kojima T, et al. Tight junctions and human diseases. *Medical electron microscopy : official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan*. 2003;36(3):147-56.
30. Furuse M. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010;2(1):a002907.
31. Ben-David U, Nudel N, Benvenisty N. Immunologic and chemical targeting of the tight-junction protein Claudin-6 eliminates tumorigenic human pluripotent stem cells. *Nature communications*. 2013;4:1992.

32. Franke WW. Discovering the molecular components of intercellular junctions--a historical view. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009;1(3):a003061.
33. Oliveira SS, Morgado-Diaz JA. Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2007;64(1):17-28.
34. Lunardi C, Bason C, Dolcino M, Navone R, Simone R, Saverino D, et al. Antiflagellin antibodies recognize the autoantigens Toll-Like Receptor 5 and Pals 1-associated tight junction protein and induce monocytes activation and increased intestinal permeability in Crohn's disease. *Journal of internal medicine*. 2009;265(2):250-65.
35. Vallejo D, Codocedo JF, Inestrosa NC. Posttranslational Modifications Regulate the Postsynaptic Localization of PSD-95. *Molecular neurobiology*. 2016.
36. Fujita H, Chiba H, Yokozaki H, Sakai N, Sugimoto K, Wada T, et al. Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2006;54(8):933-44.
37. Findley MK, Koval M. Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB life*. 2009;61(4):431-7.
38. Elliott DE, Weinstock JV. Helminth-host immunological interactions: prevention and control of immune-mediated diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1247:83-96.
39. Kreider T, Anthony RM, Urban JF, Jr., Gause WC. Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Current opinion in immunology*. 2007;19(4):448-53.
40. Peon AN, Espinoza-Jimenez A, Terrazas LI. Immunoregulation by *Taenia crassiceps* and its antigens. *BioMed research international*. 2013;2013:498583.
41. Willms K, Zurabian R. *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. *Parasitology*. 2010;137(3):335-46.
42. Larralde C. Cisticercosis. Guía para profesionales de la salud. Económica FdC, editor. México: Fondo de Cultura Económica.; 2006. 252 p.
43. Ntoukas V, Tappe D, Pfütze D, Simon M, Holzmann T. Cerebellar cysticercosis caused by larval *Taenia crassiceps* tapeworm in immunocompetent woman, Germany. *Emerging infectious diseases*. 2013;19(12):2008-11.
44. Freeman RS. Studies on Biology of *Taenia Crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Can J Zoolog*. 1962;40(6):969-&.
45. Moguel B, Moreno-Mendoza N, Bobes RJ, Carrero JC, Chimal-Monroy J, Diaz-Hernandez ME, et al. Transient transgenesis of the tapeworm *Taenia crassiceps*. *SpringerPlus*. 2015;4:496.
46. Dorais FJ, Esch GW. Growth rate of two *Taenia crassiceps* strains. *Experimental parasitology*. 1969;25(1):395-8.
47. Frago G, Meneses G, Scitutto E, Fleury A, Larralde C. Preferential growth of *Taenia crassiceps* cysticerci in female mice holds across several laboratory mice strains and parasite lines. *J Parasitol*. 2008;94(2):551-3.

48. Lu Z, Ding L, Lu Q, Chen YH. Claudins in intestines: Distribution and functional significance in health and diseases. *Tissue barriers*. 2013;1(3):e24978.
49. Oshima T, Miwa H, Joh T. Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2008;23 Suppl 2:S146-50.
50. Poritz LS, Harris LR, 3rd, Kelly AA, Koltun WA. Increase in the tight junction protein claudin-1 in intestinal inflammation. *Digestive diseases and sciences*. 2011;56(10):2802-9.
51. Weber CR, Nalle SC, Tretiakova M, Rubin DT, Turner JR. Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2008;88(10):1110-20.
52. Holmes JL, Van Itallie CM, Rasmussen JE, Anderson JM. Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene expression patterns : GEP*. 2006;6(6):581-8.
53. Rahner C, Mitic LL, Anderson JM. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology*. 2001;120(2):411-22.
54. Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *The Journal of cell biology*. 1999;147(1):185-94.
55. Meertens L, Bertaux C, Cukierman L, Cormier E, Lavillette D, Cosset FL, et al. The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *Journal of virology*. 2008;82(7):3555-60.
56. Mennigen R, Nolte K, Rijcken E, Utech M, Loeffler B, Senninger N, et al. Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *Am J Physiol-Gastr L*. 2009;296(5):G1140-G9.
57. Abuazza G, Becker A, Williams SS, Chakravarty S, Truong HT, Lin F, et al. Claudins 6, 9, and 13 are developmentally expressed renal tight junction proteins. *American journal of physiology Renal physiology*. 2006;291(6):F1132-41.
58. Li J, Li YX, Chen MH, Li J, Du J, Shen B, et al. Changes in the phosphorylation of claudins during the course of experimental colitis. *Int J Clin Exp Patho*. 2015;8(10):12225-33.
59. Ding L, Lu Z, Foreman O, Tatum R, Lu Q, Renegar R, et al. Inflammation and disruption of the mucosal architecture in claudin-7-deficient mice. *Gastroenterology*. 2012;142(2):305-15.
60. Mankertz J, Schulzke JD. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Current opinion in gastroenterology*. 2007;23(4):379-83.
61. Barmeyer C, Schulzke JD, Fromm M. Claudin-related intestinal diseases. *Seminars in cell & developmental biology*. 2015;42:30-8.
62. Fernandez-Blanco JA, Estevez J, Shea-Donohue T, Martinez V, Vergara P. Changes in Epithelial Barrier Function in Response to Parasitic Infection: Implications for IBD Pathogenesis. *Journal of Crohn's & colitis*. 2015;9(6):463-76.

63. Becerra-Diaz M, Terrazas LI. Taenia crassiceps infection and its excreted/secreted products inhibit STAT1 activation in response to IFN-gamma. International journal for parasitology. 2014;44(9):613-23.
64. Kunzelmann K, Mall M. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. Physiological reviews. 2002;82(1):245-89.
65. Rendon-Huerta E, Teresa F, Teresa GM, Xochitl GS, Georgina AF, Veronica ZZ, et al. Distribution and expression pattern of claudins 6, 7, and 9 in diffuse- and intestinal-type gastric adenocarcinomas. Journal of gastrointestinal cancer. 2010;41(1):52-9.
66. Ross MH, Pawlina W. Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology. 5th ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. xvii, 906 p. p.