



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

FACULTAD DE MEDICINA

HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO FEDERICO GÓMEZ

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CLAUDINAS EN HUESO CON
OSTEOGÉNESIS IMPERFECTA**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE: MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS

P R E S E N T A

ALHELÍ LUCÍA BREMER AZTUDILLO

TUTOR: DR. LUIS FELIPE MONTAÑO ESTRADA

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**CIUDAD DE MEXICO, ENERO DEL 2017
CIUDAD UNIVERSITARIA**



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.

*No tengas miedo de tus miedos. No están ahí para asustar.
Están ahí para hacerte saber que algo vale la pena.*

*Isaac Hernández
Bailarín principal del English National Ballet.*

AGRADECIMIENTOS.

Gracias a Dios, es muy grato respirar todos los días.

A mis padres y mi hermana por soportarme y escucharme en todas mis locuras y sueños.

A CONACYT por creer en mis proyectos y apoyarme por estos dos años. Muchas gracias por no dejarme sin comer.

A mi tutor, y a la Dra. Erika Rendón por jalarme las orejas cuando debía e introducirme en este mundo de la investigación.

A todos mis compañeros de laboratorio: Cristian, Priss, Anita, Paco, Marilú, Ceci, Haziél, Gaby. Por que a pesar de ser una bata blanca me recibieron, me quisieron, me explicaron y no se desesperaron conmigo, he aprendido tanto de ustedes. Mil gracias.

Al Dr. Francisco López Sosa y al Dr. Eduardo Miranda López no tengo palabras para agradecer todo lo que han hecho por mí.

A Rombito... te amo tanto, gracias por seguirme en mis locuras, entenderme, buscar en Wikipedia lo que digo para darme alguna opinión, por desvelarte conmigo y entender que necesito todo esto para ser yo.

Y a mis angelitos de cristal... esta tesis esta dedicada a cada uno de esos niños tan frágiles pero con un gran corazón, lo cual me impulsa a seguir adelante.

INDICE.

RESUMEN	5
MARCO TEÓRICO	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	23
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	24
MATERIAL Y MÉTODO	24
RESULTADOS	28
CONCLUSIONES	39
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

RESUMEN.

Las uniones intercelulares están lejos de ser estructuras estáticas que mantienen la barrera paracelular simplemente por la unión de células, están compuestas por varias proteínas transmembranales como claudinas, ocludinas y tricelulinas, las cuales son importantes para el desarrollo y mantenimiento de varios tejidos. En términos de regulación ha sido demostrado que la expresión y la función de las claudinas controlan factores transcripcionales, hormonas y citocinas. El rol más importante de las claudinas es crear barreras y/o poros que regulen la permeabilidad paracelular de iones o moléculas pequeñas, también se ha observado que algunas claudinas controlan la proliferación celular y la diferenciación.

En la Osteogénesis imperfecta (OI), también conocida como enfermedad de los huesos frágiles o niños de cristal, es un desorden clínico heterogéneo hereditario del tejido conectivo, relacionado con el colágeno tipo I. En últimos años se ha visto que mutaciones en Bone Morphogenetic protein 1 (por sus siglas en inglés BMP1) y en la proteína WNT1 también producen osteogénesis imperfecta.

La vía de señalización mediada por WNT1/Beta-catenina mejor conocida como regulador de la homeostasis ósea, tiene relación con claudina 1 y son esenciales para el desarrollo y formación ósea postnatal.

Las claudinas tipo -1, -2, -5, -11, -14, -15 y -16 conforman las uniones estrechas en osteoblastos de ratas pero no se ha documentado el patrón de expresión de estas claudinas en osteoblastos humanos y mucho menos en Osteogénesis imperfecta, por lo tanto sería importante conocer la expresión de claudinas en osteoblastos humanos y su posible alteración en pacientes con Osteogénesis Imperfecta, ya que se ha visto que las claudinas en el tejido óseo son la barrera más importante que restringe el paso de iones y agua a través del espacio paracelular. Además las uniones constituidas por claudina-16 juegan un papel importante en el tráfico vesicular de las proteínas de la matriz ósea, mantienen la polaridad del osteoblasto durante la secreción de matriz extracelular, resultando en una deposición organizada de matriz en el hueso.

MARCO TEÓRICO:

Estructura de los tejidos

Las células epiteliales y endoteliales forman barreras continuas que protegen y mantienen a los órganos, cavidades y canales del organismo en subcompartimentos funcionales¹. Este aislamiento y compartimentalización es crucial para la función de los órganos en todos los organismos multicelulares ya que forman la barrera de difusión paracelular, el aislamiento del ambiente externo, el ensamblaje y organización de la lámina basal del epitelio, la correcta manutención de la integridad epitelial durante la contracción y migración celular y el mantenimiento de compartimentos celulares. Las células controlan estas barreras selectivas regulando el movimiento de agua, iones y otras proteínas a través de las monocapas, favoreciendo la polaridad y la función celular. El movimiento de iones y moléculas a través del espacio intercelular es conocido como permeabilidad paracelular y es regulada por las proteínas que se localizan en los sitios de contactos célula-célula o uniones intercelulares².

Uniones intercelulares

Las uniones intercelulares están lejos de ser estructuras estáticas que mantienen la barrera paracelular simplemente por la unión de células. De acuerdo con la abundancia de proteínas que conforman las uniones intercelulares en las membranas laterales, la disposición de estas uniones y la comunicación con el citoesqueleto puede variar sustancialmente ya que se regulan a la alta o a la baja dependiendo de la necesidad homeostática de los iones que requiere dicho tejido. Este aumento o disminución en el número de proteínas asociadas a las uniones está directamente relacionado con la regulación de la función celular. La constante remodelación de estos contactos permite la muerte, eliminación de células por apoptosis así como la incorporación de nuevas células epiteliales diferenciadas derivadas de células progenitoras sin la pérdida de la función de barrera³.

El complejo de uniones intercelulares (Figura 1), es una estructura formada por cuatro principales estructuras dependiendo de su función: Uniones comunicantes (UC), Desmosomas y hemidesmosomas, Uniones adherentes (UA) y Uniones estrechas (UE)^{4,5}.

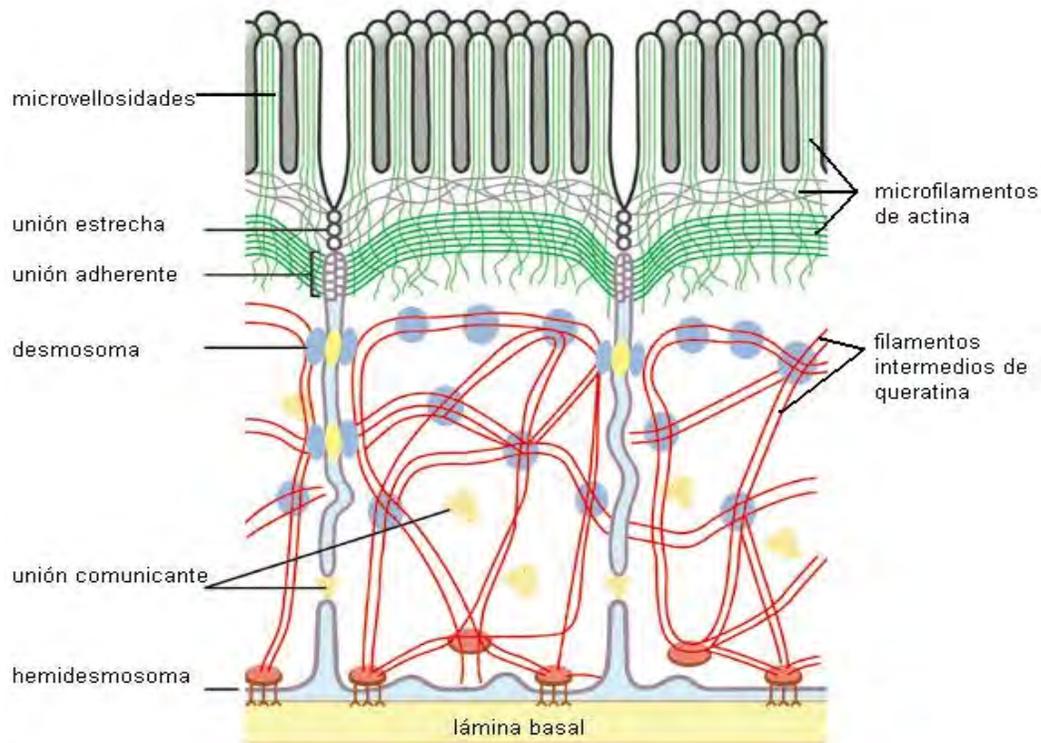


Figura 1. Uniones intercelulares en los epitelios. Staehelin A and Hull B. Uniones Intercelulares. Editorial: Revista "Investigación y Ciencia".

Uniones Comunicantes

Las uniones comunicantes, también conocidas con el nombre de uniones en hendidura, son canales llamados conexones formados por 6 subunidades de proteínas unidas a través de interacciones hidrofóbicas llamadas conexinas. Los conexones forman un poro acuoso entre el citoplasma de dos células adyacentes, y dan paso directo de citoplasma a citoplasma^{6,7}(Figura 2).

Median la comunicación entre las células permitiendo el paso de iones y pequeñas moléculas aproximadamente de 1,000 Da, dando lugar al acoplamiento metabólico y eléctrico entre las células. Están encargadas de mediar el paso intercelular permitiendo conexiones eléctricas cuando se requieren señalizaciones de gran rapidez y facilitan la sinapsis⁸.

Uniones adherentes

Son un cinturón continuo de glicoproteínas que le proporciona la fuerza mecánica al epitelio manteniendo juntas a las células vecinas a través de familias de proteínas dependientes de Ca^{2+} ⁸. Es una estructura que une a la membrana y a los componentes del citoesqueleto en regiones de contacto discretas, permitiendo la trasmisión de fuerzas

mecánicas a lo largo de la lámina epitelial. Su dominio citoplasmático se encuentra asociado a proteínas intracelulares, tales como filamentos de actina. Están formadas por un complejo de proteínas membranales y factores asociados, entre los que se encuentran las cadherinas, integrinas, nectinas y cateninas siendo altamente específicas⁹.

- Cadherinas.

Fue la primera familia de proteínas descrita en las uniones adherentes. Se caracterizan por tener grandes dominios citoplasmáticos y extracelulares e interaccionan de manera homofílica con proteínas de la célula adyacente y con cateninas en la región citosólica, lo cual es crucial para una adhesión muy fuerte⁹.

- Cateninas.

Participan como intermediarios para unir a las cadherinas con el citoesqueleto y es un componente importante de la vía de señalización *Wnt*. Existen tres tipos de cateninas α , β y p120 las cuales interactúan con el dominio intracelular de las cadherinas⁸.

- Nectinas.

Son miembros de la superfamilia de proteínas de adhesión IgG. Con al menos cuatro miembros de nectinas, están encargadas de formar homodímeros de manera lateral y pueden interaccionar con proteínas homofílicas y heterofílicas de otras nectinas o receptores de las mismas⁹.

- Integrinas.

Son una familia de glicoproteínas formadas por heterodímeros que consisten de una subunidad α asociada a una subunidad β . Cada subunidad consta de un dominio transmembranal largo y uno corto localizado en el citoplasma. Se conocen 18 subunidades α y 8 subunidades β los cuales pueden dimerizarse para formar alrededor de 24 diferentes receptores de integrinas⁹. Su función radica en unir a la matriz celular con el citoesqueleto¹⁰.

¹¹.

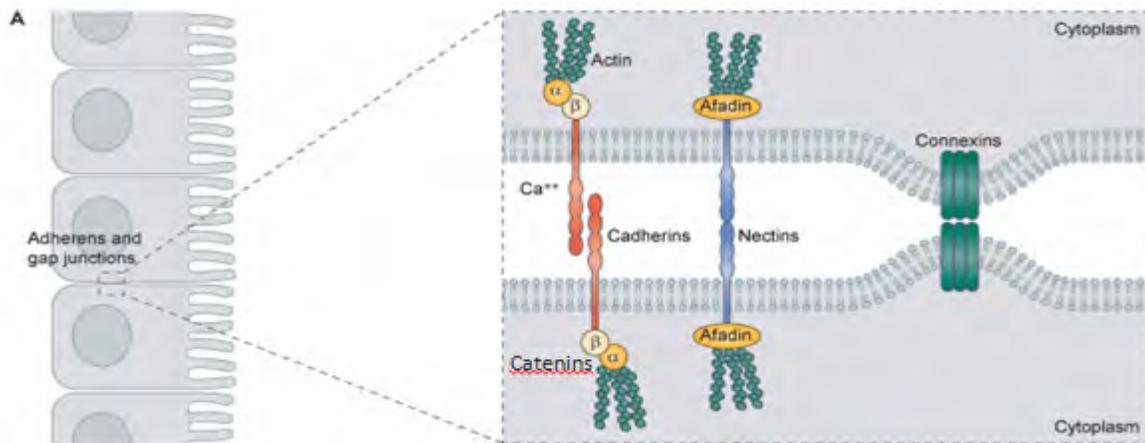


Figura 2. Uniones Gap y Uniones adherentes. Estructura de las uniones Gap (Modificado de Matteo Bonazzi (2011) The Journal of Cell Biology (3); 349-358.

Desmosomas y hemidesmosomas.

Los desmosomas y hemidesmosomas son uniones de anclaje intercelulares que proveen de gran adhesión mecánica intercelular, especialmente en tejidos que se encuentran sometidos a mecanismos de estrés. Dichas uniones anclan a los filamentos intermedios y puntos de contacto que fijan a las células adyacentes¹². Están compuestos por varias proteínas transmembranales entre ellas las caderinas desmosomales, las desmogleinas, las desmocollinas, las placoglobinas, las placofilinas y las desmoplaquinas¹³(Figura 3).

Miden de 0.2 a 0.5 micrómetros de diámetro en epidermis humana y consisten de densas placas acomodadas simétricamente en la región citosólica adyacente a la membrana plasmática, mostrando una organización perpendicular⁸. Los dominios estructurales de las células adyacentes interactúan entre sí de manera dependiente de Ca^{2+} y sus dominios intercelulares se unen a las placoglobinas y desmoplaquinas que anclan a las proteínas del citoesqueleto^{14,15}.

La diferencia entre los desmosomas y los hemidesmosomas es que los desmosomas forman complejos de unión entre células epiteliales adyacentes y los hemidesmosomas anclan la cara basal de las células epiteliales a la lámina basal. Los desmosomas son cruciales para la rigidez y en los procesos de remodelación de la adhesión célula célula son regulados por la proteína cinasa C^{15,16}.

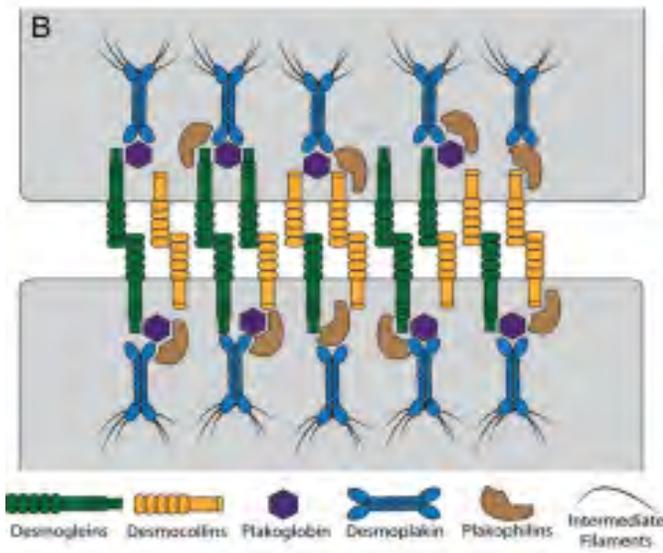


Figura 3. Desmosoma. Componentes estructurales de un desmosoma. (Modificado de Matthew A Brooke (2012). *Journal of Pathology*. (226); 158–171).

Uniones estrechas

La función de barrera en la mucosa gástrica es esencial para prevenir el libre acceso de elementos potencialmente dañinos como microorganismos patógenos, presentes en el lumen gástrico y que ingresan hacia la mucosa gástrica¹⁷. Esta función de barrera es controlada por uniones apicales denominadas *estrechas* (UE) y su alteración se asocia con una variedad de enfermedades humanas, incluyendo cánceres del tracto gastrointestinal^{18,19}.

Las uniones estrechas forman parte de los complejos de uniones intercelulares. Se encuentran localizadas rodeando la región apical de las células epiteliales y endoteliales, formando un cinturón continuo que actúa como barrera fisiológica para restringir el libre movimiento de proteínas y lípidos así como regular el transporte paracelular de agua, iones, pequeñas moléculas no iónicas, en el plano de las membranas entre las superficies basolateral y apical, manteniendo la polaridad celular²⁰ (Figura 4). Esto permite conservar la diferencia de gradientes entre la membrana basal y lateral y previene el intercambio libre de la mayoría de los solutos entre el lumen y el espacio intersticial a lo largo de la ruta paracelular²¹.

Las uniones estrechas también participan en cascadas de señalización, regulación transcripcional, control del ciclo celular y tráfico vesicular. Debido a la gran variedad de funciones que regulan las UE, su estructura y composición resultan más complejas que otras uniones intercelulares²².

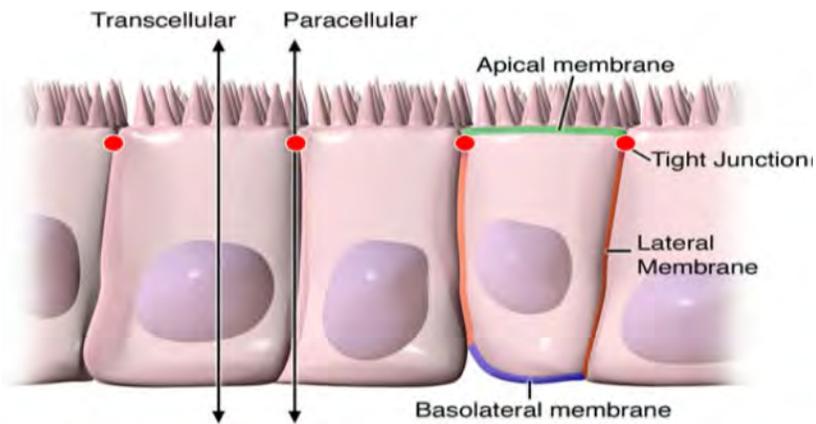


Figura 4. Uniones estrechas (UE). Las uniones estrechas se localizan en la parte apical de las monocapas celulares. (Katherine R. Groschwitz, BS and Simon P. Hogan, PhD (2009) Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. Clinical reviews in allergy and immunology. 124: 3-19.

Las uniones estrechas están formadas por aproximadamente 50 proteínas (Figura 5). Dentro de las cuales se encuentran:

- a) Proteínas transmembranales (claudinas, ocludina, tricelulina y JAM *junction adhesión molecule*).
- b) Proteínas citoplásmicas, que cumplen papeles de anclaje al citoesqueleto (ZO-1, ZO-2, ZO-3, cingulina)
- c) Proteínas asociadas a vías de transducción celular (MAPK) y factores transcripcionales ZONAB, ASIP, Afadin, ZAK y GEF-H1.

Mientras que las proteínas citoplasmáticas, también denominadas proteínas adaptadoras, regulan el ensamblaje y la función de las uniones estrechas, así como la proliferación y la diferenciación celular, las proteínas transmembranales interactúan con sus homologas en la célula adyacente para regular la función de barrera^{23,24}.

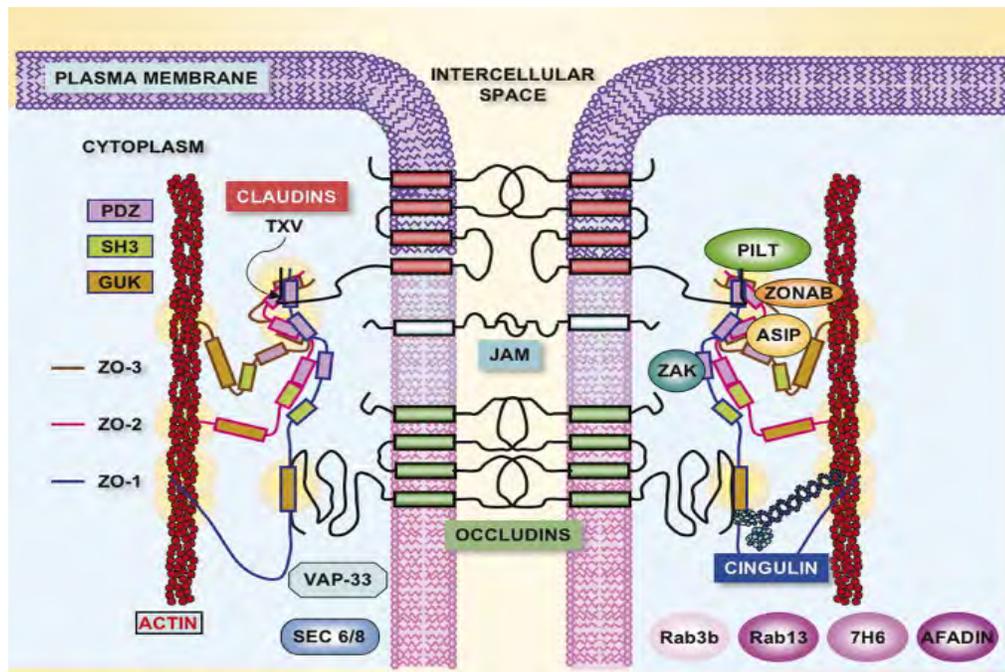


Figura 5. Uniones Estrechas. Estructura molecular de las uniones estrechas. (Marcelino Cerejido, et al. (2007). Archives of Medical Research (38) 465-478)

- Ocludinas.

El nombre Ocludina deriva del latín *occludare*, que significa ocluir. Esta proteína transmembranal de 62-82 kDa forma los filamentos de la UE. Presenta cuatro dominios transmembranales, formando dos asas extracelulares de tamaño similar y tres dominios citoplasmáticos: los dominios amino y carboxilo terminal y una asa citoplásmica^{25,26}. Las dos asas extracelulares tienen una composición inusual de aminoácidos, ya que la primera contiene un alto contenido de tirosinas y glicinas (61%) y la segunda solo mantiene un 18% de tirosinas. La región C terminal es rica en los aminoácidos serina, treonina y tirosina favoreciendo su fosforilación mediada por cinasas como PKC, CK2, P34^{cdc42}/ciclina B, y la tirosina cinasa c-Yes²⁶. La sobreexpresión de esta proteína en células derivadas de riñón canino MDCK incrementa la resistencia transepitelial (TER) y el silenciamiento de la ocludina altera la funcionalidad de la barrera epitelial, sin modificar el ensamblaje de la red normal de UE²⁷.

La región carboxilo terminal de la ocludina puede interactuar directamente con F-actina, con las proteínas ZO-1, ZO-2, ZO-3 y con las proteínas de señalización PCK- ζ , c-Yes, la fosfatidilinositol 3 cinasa y con la conexina 26²⁸.

- Proteínas JAM (*junction adhesion molecule*).

JAM es una familia de glicoproteínas perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas que median la adhesión independiente de Ca^{2+} . Dentro de esta familia se encuentran las proteínas CAR (*coxsackievirus and adenovirus receptor*), JAM-1, JAM-2, JAM-3, ESAM (*endothelial cell specific adhesion molecule*) y CLMP (*coxsackievirus and adenovirus*

receptor-like membrane protein) encontradas en gran cantidad de tejidos. Tienen un peso molecular que va de 40 kDa a 43 kDa y se caracterizan por tener tres dominios estructurales:

1. Una región extracelular de 215 aa que contiene dos dominios variables tipo Inmunoglobulina.
2. Un dominio transmembranal.
3. Una cola corta intracelular de 45 aa con un dominio de unión a PDZ.

Las proteínas JAM interactúan con los dominios PDZ de AF6, ASIP/Par-3 y ZO-1. JAM-1 establece interacciones homotípicas, regula la permeabilidad de las UE y el tráfico de linfocitos, y sirve como receptor para retrovirus. JAM-2 es una molécula que se expresa en células endoteliales y linfáticas y regula la migración transendotelial. JAM-3 se expresa en plaquetas humanas y media las interacciones entre leucocitos y plaquetas. JAM-4 se localiza en las UE de las células de yeyuno e íleon y en los túbulos renales proximales, donde regula la permeabilidad²⁹.

Claudinas.

El nombre Claudina deriva de la palabra en latín *claudere* que significa cerrado. Las claudinas forman una familia de proteínas integrales de membrana consideradas como el esqueleto de las uniones estrechas y las principales determinantes del flujo paracelular de solutos a través de epitelios y endotelios³⁰. A la fecha se han reportado alrededor de 24 isoformas en mamíferos, y sus patrones de expresión son tejido-específico (Figura 6). Tienen un peso molecular de 20 a 27 kDa y se clasifican en dos grupos: las claudinas “clásicas” y las “no clásicas”, de acuerdo al análisis de similitud en sus secuencias³⁰. Presentan cuatro dominios transmembranales (TMD-1, TMD-2, TMD-3 y TMD-4), dos asas extracelulares y su región amino y carboxilo terminal están localizados en el citosol. La región carboxilo terminal es variable en tamaño y secuencia, típicamente tiene de 21 a 63 residuos de aminoácidos, es altamente conservada y contiene un motivo de unión a PDZ, que es un dominio de interacción entre proteínas, y que permite a las Claudinas interactuar con proteínas citosólicas de andamiaje como ZO-1, ZO-2, ZO-3, MUPP-1 y PATJ, todas ellas involucradas en diferentes vías de señalización³¹.

Así mismo esta región es blanco de varias modificaciones postraduccionales, como la fosforilación en residuos de serina /treonina y tirosina y la palmitoilación que pueden alterar la localización, estabilidad y función en las claudinas como la permeabilidad paracelular³¹. La fosforilación afecta la localización en la membrana plasmática y da lugar a cambios en la permeabilidad paracelular. La fosforilación de las claudinas ocurre por acción de la proteína cinasa A (PKA), la proteína cinasa C (PKC) y las proteínas activadas por mitógenos (MAPK).

La primer asa extracelular es más larga (aprox. 52 residuos de aminoácidos) que la segunda (aprox. 16 a 33 residuos de aminoácidos) y muestra una considerable variación en la

secuencia de aminoácidos. Esta asa contiene aminoácidos cargados, creando un filtro con selectividad electrostática que controla la resistencia general y la selectividad de carga del flujo paracelular. También contiene dos residuos de cisteínas altamente conservadas que forman un enlace disulfuro intramolecular promoviendo la estabilidad de la conformación proteica. Se ha reportado que la primera asa extracelular de Claudina 1 y 3 funcionan como co-receptor para el anclaje del virus de la hepatitis C²⁹.

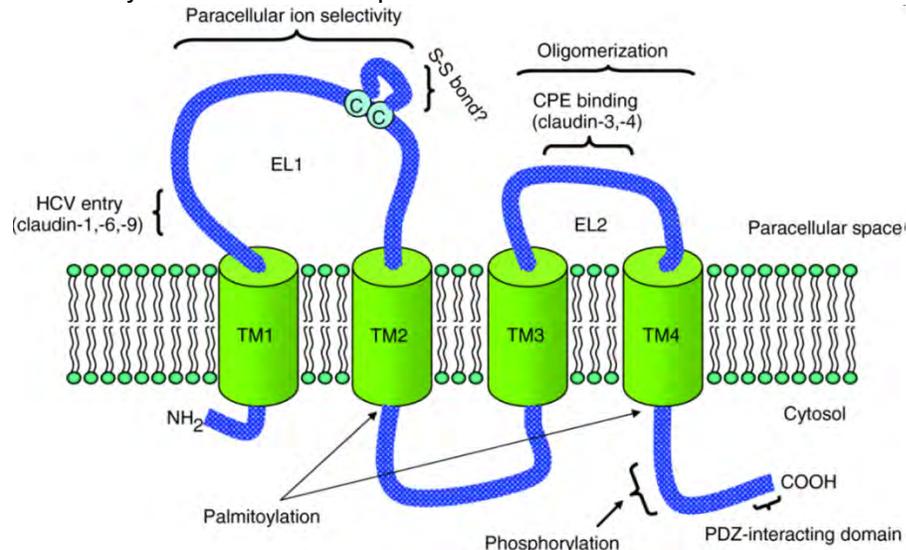


Figura 6. Claudina. Estructura de un monómero de claudina. (Madhu Lal-Nag and Patrice J Morin (2009) Genome biology (10): 227-235).

La segunda asa extracelular por su conformación hélice-giro-hélice, se ha sugerido que puede formar dímeros entre Claudinas de membranas celulares adyacentes, a través de interacciones hidrofóbicas. En las Claudinas 3 y 4 esta asa funciona como receptor para la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (CPE)³².

Como se muestra en la Figura 7, las claudinas mantienen interacciones tipo “cis” con claudinas a lo largo de la membrana plasmática de la misma célula, e interacciones tipo “trans” con claudinas de la membrana de la célula adyacente. La interacción de una claudina con otra de su mismo tipo se conoce como interacción *homotípica* (por ejemplo cldn4-cldn4); y cuando la interacción se lleva a cabo con una claudina de otro tipo se le conoce como interacción *heterotípica* (por ejemplo cldn4-cldn1)³³.

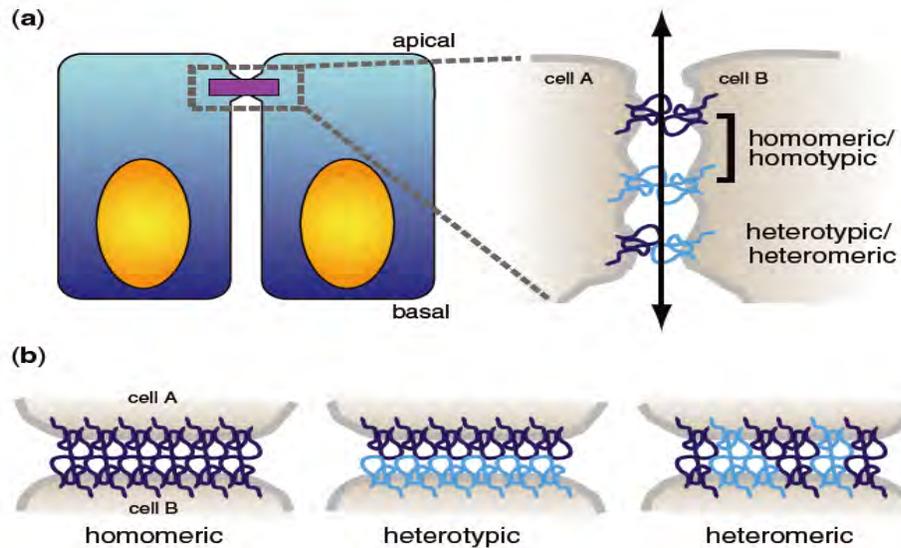


Figura 7. Tipos de interacciones entre claudinas. A) Interacciones “cis” homotípicas y heterotípicas y b) Interacciones “trans” homoméricas y heteroméricas. (Jacques L. Michaud and Olivier Pourquié (2010) *Developmental Biology: Frontiers for Clinical Genetics*. Clin Genet, 77: 314–325.

Claudinas en el hueso.

Como es bien conocido la formación ósea es mediada por osteoblastos, los cuales son derivados de las células mesenquimales, por otro lado la reabsorción ósea es mediada por los osteoclastos, los cuales son generados a partir de las células hematopoyéticas. La diferenciación de osteoblastos y osteoclastos es un proceso dividido en múltiples etapas y regulado por varios genes, además de un gran número de hormonas y factores locales.

Las uniones intercelulares (tight junctions) están compuestas por varias proteínas transmembranales como claudinas, ocludinas y tricelulinas, las cuales son importantes para el desarrollo y mantenimiento de varios tejidos, literatura sugiere que las claudinas son las proteínas principales responsables de la formación de las uniones celulares. En términos de regulación ha sido demostrado que la expresión y la función de las claudinas controlan factores transcripcionales, hormonas y citocinas. El rol más importante de las claudinas es crear barreras y/o poros que regulen la permeabilidad paracelular de iones o moléculas pequeñas, también se ha observado que algunas claudinas controlan la proliferación celular y la diferenciación³⁴.

Los perfiles de expresión de las claudinas en las uniones estrechas en osteoblastos no han sido estudiados, pero se ha visto que las claudinas juegan un papel importante en la regulación del transporte de iones, ya que mantienen un gradiente iónico a través de la membrana celular del osteoblasto, regulando el transporte paracelular, además de mantener la adhesión celular. De las 24 claudinas detectadas a la fecha, la claudina-16 es importante en la fisiología del hueso porque es la proteína que regula el transporte de calcio y magnesio³⁵. En el estudio de Wongdee y cols. en el 2008, se reportó la expresión de Claudinas-5, -11, -14, -15 y -16 en tibia de rata. Cabe resaltar que contrario a lo que se presumía que la claudina-16 solo se expresaba en el Asa de Henle del riñón, se ha observado que también se expresa en

osteoblastos primarios incluso en concentraciones más altas que en tejido renal, lo cual reafirma la heterogeneidad de expresión de las claudinas en diversos tejidos^{35,36}.

Se ha demostrado que las células óseas de rata expresan niveles de claudinas, además se ha estudiado la expresión de claudina 18 en osteoclastos, gracias a ratas knock out de claudina 18 se ha visto un fenotipo de osteopenia, marcada por decremento en la densidad mineral, corticales delgadas y volumen trabecular disminuido.

También se ha determinado que la claudina 1 es un regulador de la proliferación y diferenciación de los osteoblastos además de que regula muchos factores osteoregulatorios, La delección de claudina 1 reduce los niveles de Beta catenina , lo cual sugiere un importante regulación de la osteoblastogenesis³⁴.

Las claudinas tipo -1, -2, -5, -11, -14, -15 y -16 conforman las uniones estrechas en osteoblastos de ratas pero no se ha documentado el patrón de expresión de estas claudinas en osteoblastos humanos y mucho menos en Osteogénesis imperfecta, por lo tanto sería importante conocer la expresión de claudinas en osteoblastos humanos y su posible alteración en pacientes con Osteogénesis Imperfecta, ya que se ha visto que las claudinas en el tejido óseo son la barrera más importante que restringe el paso de iones y agua a través del espacio paracelular. Además las uniones constituidas por claudina-16 juegan un papel importante en el trafico vesicular de las proteínas de la matriz ósea, mantienen la polaridad del osteoblasto durante la secreción de matriz extracelular, resultando en una deposición organizada de matriz en el hueso³⁶.

En el estudio de Mankert y cols. en el 2004 se reportó una relación entre expresión de claudinas, polaridad celular y algunas funciones de señalización importantes para el crecimiento y diferenciación de osteoblastos, en la que la señal de la vía Wnt regula directamente a los promotores de claudina-2 por la vía LEF-1/beta catenina, induciendo a la alta la expresión de los genes de claudina-2, aumentando así su expresión en la membrana celular del osteoblasto³⁷.

Osteogénesis Imperfecta

La Osteogénesis imperfecta (OI), también conocida como enfermedad de los huesos frágiles o niños de cristal, es un desorden clínico heterogéneo hereditario del tejido conectivo., relacionado con el colágeno tipo I. La OI dominante es causada por defectos en la cantidad o estructura del procolágeno tipo I, mientras que la osteogénesis imperfecta recesiva es causada por deficiencia en las proteínas (CRTAP, P3H1, PPIB, Serpin H1 y FKBP10) que interactúan con el colágeno y afectan las modificaciones postraduccionales o el ensamblaje³⁸. En últimos años se ha visto que mutaciones en Bone Morphogenetic protein 1 (por sus siglas en ingles BMP1) y en la proteína WNT1 también producen osteogénesis imperfecta.³⁹

La incidencia mundial de esta enfermedad es de aproximadamente 1 en 15,000 a 20,000 recién nacidos⁴⁰, en México aun no se ha reportado alguna incidencia. Se han

identificado cerca de 1500 mutaciones dominantes en los genes *COL1A1* y *COL1A2* que codifican las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la colágena tipo I.³⁸

Cada molécula de colágeno tipo I es formada por cadenas de procolágeno, que es un heterodímero compuesto por dos cadenas $\text{pro}\alpha 1$ y una cadena $\text{pro}\alpha 2$, cada región helicoidal del colágeno es flanqueada por un dominio globular y un extremo carboxilo terminal. El aminoácido glicina es obligatorio en cada tercer residuo (Gly-X-Y) para darle al colágeno la conformación espacial de triple hélice (Figura 8).³⁸

Las cadenas α que conforman las hélices no son todas iguales. Su tamaño varía entre 600 y 3000 aminoácidos.⁴¹

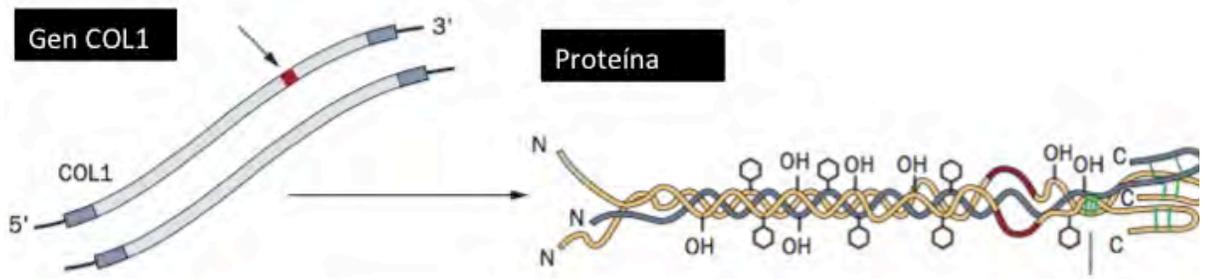


Figura 8. Estructura del colágeno. (Forlino, A., Cabral, W., Barnes, A., Marini, J. (2011) **New perspectives on osteogenesis imperfecta**. Nature Reviews (7): 540-557.)

Una característica funcional importante del colágeno reside en las modificaciones postraduccionales a las que ésta es sometido (Figura 9); que incluyen la hidroxilación de residuos específicos de prolina y lisina así como la O-glucosilación de la hidroxilisina y el consecuente entrecruzamiento covalente intermolecular⁴².

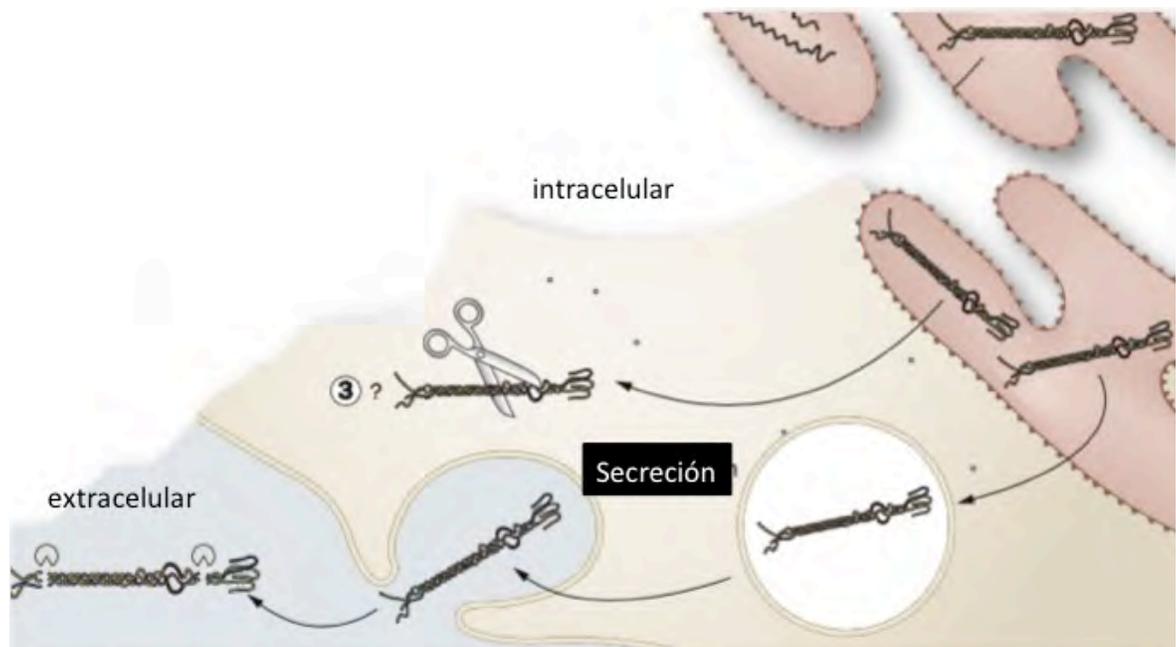


Figura 9 Formación y modificación del colágeno. Los transcritos de *COL1A1* y *COL1A2* son traducidos en el retículo endoplásmico a cadenas de pro α 1 y pro α 2. El extremo c-terminal contiene puentes disulfuro, los cuales son importantes para la correcta alineación y ensamblaje del heterodímero formado por dos cadenas pro α 1 y una cadena pro α 2. Este proceso es realizado por la interacción en el retículo endoplásmico de moléculas chaperonas como la GRP78 (immunoglobulin-heavy chain binding protein, Serpin F1) y el complejo de prolina 3-hidroxilación (P3H1). Después de que el procólageno es secretado al espacio pericelular los propéptidos terminales son removidos por proteasinas específicas. (Forlino, A., Cabral, W., Barnes, A., Marini, J. (2011) **New perspectives on osteogenesis imperfecta**. Nature Reviews (7): 540-557.)

Las anomalías en los procesos de las modificaciones postraduccionales, alteraciones en el ensamblaje, transporte intracelular o incorporación a la matriz extracelular genera una insuficiente cantidad de colágeno que resultan en fragilidad ósea, haciendo al hueso más susceptible a fracturas, deformidades y retraso en el crecimiento⁴³.

La OI tipo I a la IV son causa de mutaciones en los genes *COL1A1* y *COL1A2* y presentan herencia autosómica dominante, mientras que la OI tipo V y VI con herencia autosómica recesiva con mutaciones en los genes *IFITM5* y *SERINF1* y es causado por mutaciones en las chaperonas (el complejo CRTAP/P3H1/PP1B, Serpin H1 y FKBP10) que transportan las cadenas α hélice al retículo endoplásmico y al aparato de Golgi; esto afecta las modificaciones postraduccionales o el ensamblaje de la triple hélice (Figura 10).

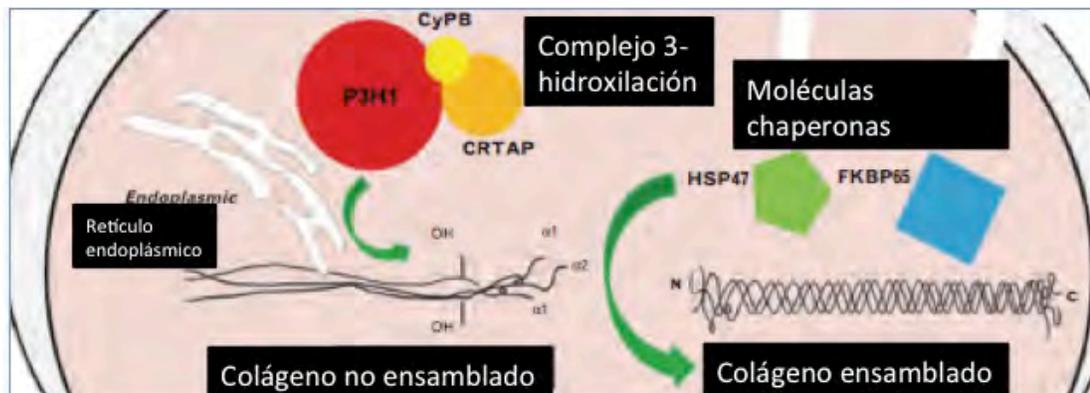


Figura 10. Modificaciones postraduccionales del colágeno. (Marini, J., Reich, A., Smith, S. (2014) **Osteogenesis imperfecta due to mutations in non-collagenous genes: lessons in the biology of bone formation.** Curr Opin Pediatr (26): 500-507.)

La osteogénesis Imperfecta tipo I se considera la forma más leve de la enfermedad, caracterizado por la siguiente triada: Fracturas, escleras azuladas y pérdida de la audición. Las fracturas comúnmente comienzan en la edad ambulatoria y disminuyen después de la pubertad. Estos individuos tienen mínima deformidad ósea y estatura cerca de lo normal. La insuficiencia en la matriz extracelular de estos pacientes resulta por la terminación prematura en la lectura de un codón durante la transcripción del *COL1A1*, lo cual activa un mecanismo de vigilancia NMD (por sus siglas en inglés nonsensemediated decay). Este proceso reduce transcripciones mutantes, lo que conduce a la síntesis de la mitad de la cantidad de colágeno³⁸.

La Osteogénesis Imperfecta tipo II es perinatal y letal. Los neonatos afectados presentan: talla baja in útero, cráneosinostosis, huesos largos arqueados, fracturas in útero y al nacimiento, escleras azules. Las causas más comunes de muerte son⁴⁴:

- Falla respiratoria asociada con tórax corto.
- Fracturas costales.
- Neumonía.
- Anormalidades de los alvéolos pulmonares secundarios a pobre distensión de los mismos por alteraciones en la colágena.

La Osteogénesis Imperfecta tipo III ó progresiva deformante, es la forma más severa de la enfermedad, pero a pesar de ello no es letal. Los individuos afectados presentan múltiples fracturas, cara triangular, frente amplia, escleras azules o grises, dentinogénesis imperfecta, compresiones vertebrales y escoliosis. Estos pacientes son de talla extremadamente baja.

La Osteogénesis Imperfecta tipo IV, tiene expresividad variable la cual se sobrepone con los tipos I y III. Los individuos afectados presentan dentinogénesis imperfecta, pérdida auditiva progresiva, impresión basilar, talla baja y múltiples fracturas de huesos largos, sin embargo, la mayoría de ellos son ambulatorios.

La Osteogénesis imperfecta tipo V y VI cursan con defectos en la mineralización ósea causados por mutaciones de los genes interferón inducido transmembranaes (*IFITM5*) que codifica para BRIL (por sus siglas en inglés Bone Restrcted Ifitm-Like protein, previamente conocido como Ifitm5) la cual es una proteína transmembranal enriquecida en osteoblastos durante la mineralización REF. La OI tipo VI se debe a mutaciones en el gen inhibidor de la peptidasa de Serapin F1 (*SERPINF1*) codifica a PEDF (por sus siglas en inglés Pigment Epithelium-Derived Factor) el cual es un potente factor anti-angiogenico que inhibe el crecimiento tumoral y la metástasis⁴⁴.

Los tipos VII-IX de la OI tienen un defecto en el complejo CRTAP/P3H1/ CyPB que sirve para 3-hidroxilar la prolina en la posición 986 de la cadena alfa1 del colágeno tipo I alterando así las modificaciones postraduccionales del colágeno.

El tipo X y XI de la OI son secundarias a que el ensamblaje del colágeno, su conformación tridimensional y la función de los chaperones de la colágena, causado por mutaciones en *SERPINH1*, *HSP47*, *FKBP65* y *FKBP10*, están alteradas. En estos tipos también hay defectos en el factor de transcripción SP7, en WNT1, TRIC-B y OASIS que afectan el desarrollo del osteoblasto⁴⁴.

Clasificación de la Osteogénesis Imperfecta

Sillence y cols. en 1979 clasificaron en 4 tipos a la Osteogénesis imperfecta dependiendo de los criterios clínicos, radiográficos y tipo de herencia mendeliana, los cuales se enlistan en la tabla 1.⁴³

TIPO	HERENCIA	APARICIÓN	CLÍNICA
IA	AD	INFANCIA	Fragilidad ósea variable, escleras azules, fracturas generalmente después del año, sordera, talla baja, laxitud articular (IA con dentinogénesis imperfecta)
IB			
II	AD y mutaciones de novo	IN UTERO	Letalidad perinatal, dentinogénesis imperfecta, micrognatia, fragilidad del tejido conectivo, fracturas en útero 100%
III	AD y AR	UTERO/NEONATAL	Dentinogénesis imperfecta, escleras azules, fracturas 50%

			en útero, deformidades, fragilidad severa
IVA	AD	INFANCIA	Moderadamente severa, talla baja variable, acortamiento de huesos largos, iv a con dentinogénesis imperfecta
IVB			

Tabla 1. Clasificación Original de Silience 1979. AD: Autosómica Dominante; AR: Autosómico Recesivo referencia

Forlino y cols. en 2011 proponen 11 tipos de Osteogénesis Imperfecta (Tabla 2), basados en la mutación de las proteínas que realizan las modificaciones postraduccionales en el colágeno. La clasificación comprende: 4 tipos autosómico dominantes, 7 tipos autosómico recesivos y finalmente 3 enfermedades asociadas a colagenopatias³⁷. Marini y cols. agregan la número doce, que se basa en una mutación en el gen BMP-I (Bone Marrow Protein tipo I), que afecta la conformación terciaria de la molécula de colágeno⁴³.

TIPO DE OSTEOGÉNESIS IMPERFECTA	HERENCIA	FENOTIPO	DEFECTO GENÉTICO
TIPOS CLASICOS DE SILIENCE			
I	AD	MODERADO	<i>COL1A1/ COL1A2</i>
II	AD	LETAL	<i>COL1A1/COL1A2</i>
III	AD	PROGRESIVAMENTE DEFORMANTE	<i>COL1A1/COL1A2</i>
IV	AD	MODERADO	<i>COL1A1/COL1A2</i>
ETIOLOGÍA DESCONOCIDA			
V	AD	HISTOLOGIA DISTINTIVA	DESCONOCIDO
DEFECTOS EN LA MINERALIZACIÓN			
VI	AR	DEFECTOS EN LA MINERALIZACIÓN	<i>SERPINF1</i>
DEFECTOS EN LA 3-HIDROXILACIÓN			
VII	AR	SEVERO LETAL	<i>CRTAP</i>
VIII	AR	SEVERO A LETAL	<i>LEPRE1</i>
IX	AR	MODERADO A LETAL	<i>PPIB</i>
DEFECTOS EN LAS MOLECULAS CHAPERONAS			
X	AR	SEVERO A LETAL	<i>SERPINH1</i>

XI	AR	PROGRESIVAMENTE DEFORMANTE	<i>FKBP10</i>
NO CLASIFICADAS O ENFERMEDADES BASADAS EN COLAGENA			
SINDROME DE BUCK 2	AR	CONTRACTURAS ARTICULARES	<i>PLOD2</i>
ENFERMEDAD DE CAFFEY	AD	EXOSTOSIS CORTICAL	<i>COL1A1</i>
DEFECTOS EN LA MADURACION DEL OSTEOBLASTO	AR	MODERADA	<i>SP7</i>

Tabla 2. Clasificación de Osteogénesis imperfecta del 2011. Realizan la clasificación según gen y función general. Algunas publicaciones⁽⁴²⁾ tienen un tipo XII de OI, en donde existe una mutación en el gen *BMP1* afectando el procesamiento de la colágena.

Shaker y cols. en 2015 agregan más tipos a la clasificación de la osteogénesis imperfecta, la número XIII en donde se encuentran mutaciones en el gen *BMP1* que codifica la proteína BMP1 la cual es una proteasa que se adhiere al propeptido C del colágeno tipo I. La número XIV en donde se encuentran mutaciones en el gen *TMEM38B* que codifica la proteína TRIC-B colabora con la señalización intracelular de calcio y por ultimo la número XV con mutaciones en el gen *WNT1* en donde se reportan pacientes con osteoporosis temprana. La proteína WNT1 es importante en el sistema beta catenina, el cual estimula la formación ósea.

Entre más avanzada es la investigación genómica, se van adicionando tipos de osteogénesis imperfecta, pues hemos visto que un gran numero de pacientes portan una mutación puntual en diferentes partes del exón.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La vía de señalización mediada por WNT mejor conocida como regulador de la homeostasis ósea, en conjunto con la señalización mediada por beta catenina (B-catenina), tienen relación con claudina 1 y son esenciales para el desarrollo y formación ósea postnatal, ha demostrado que mutaciones en el gen *WNT1* causa osteogénesis imperfecta autosómica recesiva, así como osteoporosis en edad temprana con herencia autosómica dominante, estos hallazgos nos hablan de que *WNT1* es un importante regulador de la homeostasis ósea.

En el estudio realizado por Joeng Et. al., en ratones con mutación en *Wnt1* por la delección de Guanina en el sitio 565, demostró en el análisis histomorfométrico que el fenotipo óseo de la Osteogénesis imperfecta es causado por la actividad disminuida del osteoblasto, y el análisis histológico de los huesos largos (tibias) demostró una disminución del hueso trabecular y una cortical delgada, sin embargo la actividad de la placa de crecimiento fue normal⁴⁵.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Será la expresión de Claudinas en hueso de pacientes con osteogénesis imperfecta diferente a la expresión de Claudinas en hueso sin patología?

JUSTIFICACIÓN

Los mecanismos fisiopatológicos en la Osteogénesis imperfecta con herencia autosómica dominante, resultan de la alteración de la síntesis de colágeno y la disfunción de la matriz extracelular. La composición y organización de la matriz ósea es importante porque regula la secreción de factores de crecimiento y de citocinas por parte de los osteoblastos, importantes para la proliferación y diferenciación de las células óseas, los cuales confieren rigidez ósea.

Cabe resaltar el hecho de que entre las proteínas de las uniones estrechas, que son las que regulan entre otras muchas cosas el intercambio de sales e iones importantes para mantener la rigidez ósea, sobresale la claudina-2, cuya función es favorecer a la diferenciación del osteoblasto y al parecer regular la secreción de metaloproteasas por parte de los osteoclastos para intentar mantener una homeostasis ósea normal.

En modelos de ratones con Osteogénesis imperfecta se ha visto que hay un incremento en la actividad del osteoclasto, estrés en el retículo endoplásmico y apoptosis, los cuales pueden ser nuevos blancos terapéuticos⁵.

HIPÓTESIS

La expresión y el tipo de claudinas en las muestras óseas de fémur y tibia de pacientes con Osteogénesis Imperfecta es diferente al de las muestras óseas de fémur y tibia de tejido óseo sin patología.

OBJETIVO GENERAL

Comparar la expresión de claudinas en muestras óseas de pacientes con Osteogénesis Imperfecta y en muestra de pacientes sin patología ósea

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Determinar la expresión de Claudina-1, -2, -5, -6, -9, -11, -14 y -16 en muestras óseas de hueso sin patología.
- Determinar la expresión de Claudina-1, -2, -5, -6, -9, -11, -14 y -16 en muestras óseas de pacientes con osteogénesis imperfecta.
- Determinar la expresión de claudinas estudiadas y compararlas entre ambos grupos

MATERIAL Y MÉTODO.

Diseño del estudio: Transversal, descriptivo.

Población en estudio:

Universo:

- Todas las muestra óseas de niños de 0 a 17 años de edad con Osteogénesis imperfecta y muestras óseas de niños sin patología ósea previa, que se sometan a un procedimiento quirúrgico para corrección y tratamiento de la enfermedad, atendidos en el Hospital Infantil de México Federico Gómez de marzo del 2015 a marzo del 2016.

Criterios de inclusión del grupo de estudio:

- Pacientes con osteogénesis imperfecta de los tipo I, III y IV, que requieran colocación del clavo telescopado y realización de osteotomías alineadoras.

Criterios de no inclusión :

- Pacientes con alguna otra enfermedad en la que se presente disminución de la densidad ósea como alteraciones metabólicas u otra displasia.

Criterios de eliminación:

- Pacientes en los que haya un error diagnóstico
- Pacientes en los que se haya tomado la muestra, pero no este bien almacenada (formol bufferado) o la muestra corresponda a cartílago.

Criterios de inclusión grupo control:

- Pacientes sin patología ósea, genética y tumoral previa que sean sometidos a cirugía por deformidad angular, discrepancia ósea o fractura reciente de miembros pélvicos y requieran alguna osteotomía alineadora u osteosíntesis.

Previa carta de consentimiento informado del padre o tutor y carta de asentimiento para pacientes mayores de 6 años. Se obtuvieron las muestras de la siguiente manera:

- Del lugar de la osteotomía correctora, se tomara una muestra de 5 mm de longitud.
- La muestra ósea se lavó con solución salina hasta dejar el fragmento sin restos hemáticos y se introdujo en formol amortiguado 4% para ser fijada y se descalcifico en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 3% por 15 días
- Las muestras descalcificadas se montaran en bloques de parafina para realizar los cortes.

Cortes histológicos:

A partir de los bloques de parafina, se realizaron, en el laboratorio de Inmunobiología del Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM. , cortes histológicos de 4 μ de grosor y mediante técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos específicos se evaluaron las características del hueso, la expresión y localización de claudinas -1, -2, -5, -6, -9, -11, -14 y -16.

La metodología que se utilizó para desparafinar y rehidratar los cortes de tejido se describe a continuación:

1. Xilol por 5 minutos.
2. Xilol por 5 minutos.
3. Xilol/alcohol (100% o 96%) (1:1) por 5 minutos.
4. Alcohol 100% por 5 minutos.
5. Alcohol al 100% por 5 minutos.
6. Alcohol al 96% por 5 minutos.
7. Alcohol al 96% por 5 minutos.
8. PBS 1x por 5 minutos.
9. Agua corriente por 5 minutos.

Se realizó la recuperación antigénica con buffer-EDTA pH9. Para hacer esto, se colocó un recipiente con 250 ml de agua en el horno de microondas por 5 minutos, se sacó el recipiente del horno de microondas y el agua caliente se utilizó para que las laminillas que contienen los cortes y que estuvieron depositadas en un vaso de Koplín fueron sometidas a baño maría por 30 minutos. Al término de ese periodo, las laminillas se lavaron con PBS 1X, e incubaron con

Nonidet NP 40 al 2% durante 20 minutos en cámara húmeda; esto último con el objeto de permeabilizar los tejidos de la laminilla.

Al finalizar la permeabilización se agregó el bloqueador de peroxidasa endógena (kit de Dako) durante 15 minutos, se lavó con PBS 1X durante 5 minutos y posteriormente se incubó con los anticuerpos primarios correspondientes, diluidos en Verde Da Vinci (Biocare), durante toda la noche a 4 grados centígrados.

A continuación se enlistan los anticuerpos primarios utilizados:

Anticuerpo	Dilución	Provedor
Rabbit Anti-claudina 1	1:25	Gene-Tex
Rabbit Anti-claudina 2	1:100	Invitrogen
Rabbit Anti-claudina 5	1:50	Invitrogen
Goat Anti-claudina 6	1:100	Santa Cruz, Biotechnology, Inc.
Goat Anti-claudina 9	1:100	Santa Cruz, Biotechnology, Inc
Rabbit Anti-claudina 11	1:50	Invitrogen
Rabbit Anti-claudina 14	1:25	Thermo scientific
Rabbit Anti-claudina 16	1:100	Novex

Posteriormente se lavaron las laminillas con PBS-Tween al 0.2% y se incubaron con solución universal biotinilada (DAKO) que contiene anticuerpo secundario anti-ratón, anti-conejo y anti-cabra, durante 20 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda; posteriormente se lavaron con PBS y se incubaron con estreptavidina acoplada a peroxidasa de rábano (HRP, DAKO), durante 20 minutos.

Posterior a 3 lavados con PBS-Tween 20 0.2%, se revelaron las reacciones antígeno-anticuerpo de los tejidos con diaminobenzidina (DAP) y se enjuagaron con PBS-Tween 0.2%, teniendo cuidado de verter los desechos en solución de hipoclorito para desactivar la DAP. Se realizó una contratinción para teñir núcleos celulares con hematoxilina de Harris por 30 segundos y posterior enjuague con agua amoniacal 1%. Se deshidrataron los tejidos con el tren de alcoholes/xiloles y se montaron con resina hidrofóbica.

Las laminillas se revisaron con un microscopio Nikon eclipse 80i, fotografiando los campos más representativos. La evaluación y conteo del porcentaje de células que expresaron la proteína de interés en cada muestra se efectuó con el programa independiente Densilv de libre acceso en la UNAM.

Se registraron las siguientes variables:

Variable	Tipo de Variable	Tipo de Variable	Medición
Expresión de Claudinas	Cuantitativa discreta	Dependiente	Cantidad de Pixeles
Edad	Cuantitativa discreta	Independiente	Numero de años
Género	cualitativa	Independiente	Masculino/femenino
Tipo de Osteogénesis Imperfecta	Ordinal	Independiente	Escala de Sillence

ANALISIS ESTADISTICO.

Se obtuvieron 527 cortes histológicos de hueso, 257 cortes de muestras de hueso de pacientes con Osteogénesis imperfecta y 270 muestras del grupo control.

De cada muestra procesada por inmunohistoquímica se obtuvieron tres fotografías al microscopio (40X) de campos representativos, de las cuales se cuantificó la intensidad de color, para posteriormente realizar un promedio de cada muestra.

Posteriormente se realizó una comparación del grupo control contra el grupo de osteogénesis imperfecta, con estadística no paramétrica (U de Mann-Whitney) al ser una muestra pequeña.

El grupo de osteogénesis imperfecta se dividió de acuerdo de la clasificación de Sillence, y se generaron tres grupos: OI tipo 1, OI tipo 3 y OI tipo 4, posteriormente se compararon contra el grupo control.

RESULTADOS.

Se obtuvieron 13 muestras de hueso con osteogénesis imperfecta y 14 muestras de hueso sano (Tabla 3).

	Muestras con OI n:13	Muestras sin patología n:14
Edad en años	10 (5)	9 (3)
Masculinos	7 (53%)	6 (43%)
Femeninos	6 (46%)	8 (57%)

Tabla 3. Variables demográficas de los pacientes con muestras óseas tomadas. La mediana de la edad de los pacientes con osteogénesis imperfecta fue de 5 años, mientras los pacientes sanos fue de 3 años.

El tipo de Osteogénesis imperfecta se clasifico según Sillence. El tipo más frecuente en los pacientes con Osteogénesis imperfecta, fue el tipo 3 en 8 pacientes (tabla 4).

Tipo de OI según Sillence	Numero de muestras
I	2
III	8
IV	3

Tabla 4. Tipos de Osteogénesis Imperfecta. Clasificación de los pacientes según Sillence, a los cuales se les tomo una muestras óseas (Revisión de expedientes, nota de genética)

Dentro del tipo de herencia de los 13 casos estudiados, 9 casos mostraron ser casos de Novo, sol 4 casos mostraron ser autosómicos dominantes, esto se obtuvo en una entrevista con los padres en hospitalización (Tabla5).

Tipo de OI según Sillence	Autosómicos dominante	Novo
Tipo I	0	2
Tipo III	3	4
Tipo IV	1	3

Tabla 5. Tipo de herencia de la OI. Se observa numerosos casos de Novo, en familiares no consanguíneos, de ahí la importancia del estudio genético.

La tinción de H&E de cada muestra ósea, mostró diferencias morfológicas en cuanto al número de osteoblastos por campo. En las muestras de pacientes con osteogénesis imperfecta había 3 veces mas de osteoblastos comparado con las muestras de hueso sin patología ósea (Tabla 6-7) . En las muestras óseas de hueso sin patología ósea la matriz extracelular se aprecia organizada, en comparación a la muestra con osteogénesis imperfecta en donde la matriz extracelular se observa desorganizada (Figura 11-13).

Muestras óseas con Osteogénesis Imperfecta.			
	Mediana	IC 95%	DE
Osteoblastos	35	27.12-54.16	22.45
Osteoclastos	2	1.90-3.17	1.05

Tabla6. Conteo de células por campo. Se realizó conteo de células óseas por campo 20X en todas las muestras de osteogénesis imperfecta.

Muestras óseas sin patología			
	Mediana	IC 95%	DE
Osteoblastos	11	8.83-14.17	4.62
Osteoclastos	0	0-.497	.497

Tabla7. Conteo de células por campo. Se realizó conteo de células óseas por campo 20X en todas las muestras óseas sin patología.

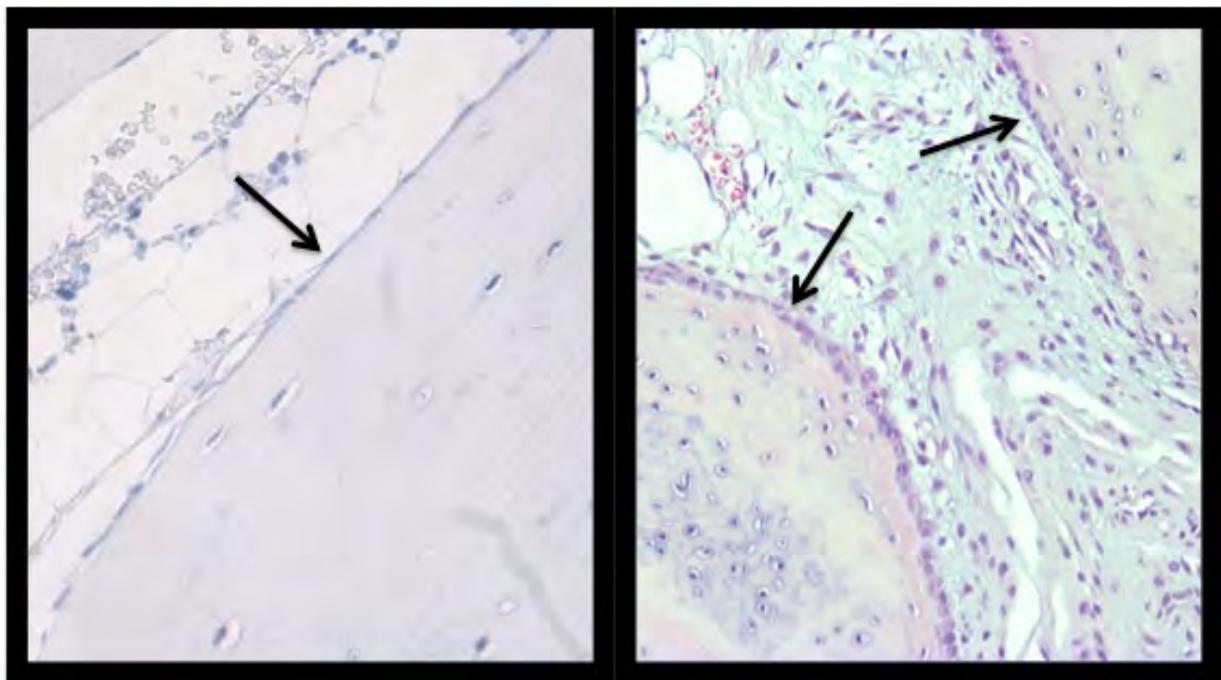


Figura11. Presencia de osteoblastos en muestras control y de Osteogénesis imperfecta tipo III a través de la tinción de H&E con lente objetivo 20X. El encuadre de la izquierda muestra hueso sin patología ósea (control), el encuadre de la derecha muestra hueso con osteogénesis imperfecta. Las flechas marcan la línea de osteoblastos, nótese que en la muestra de osteogénesis imperfecta hay un mayor número de osteoblastos.

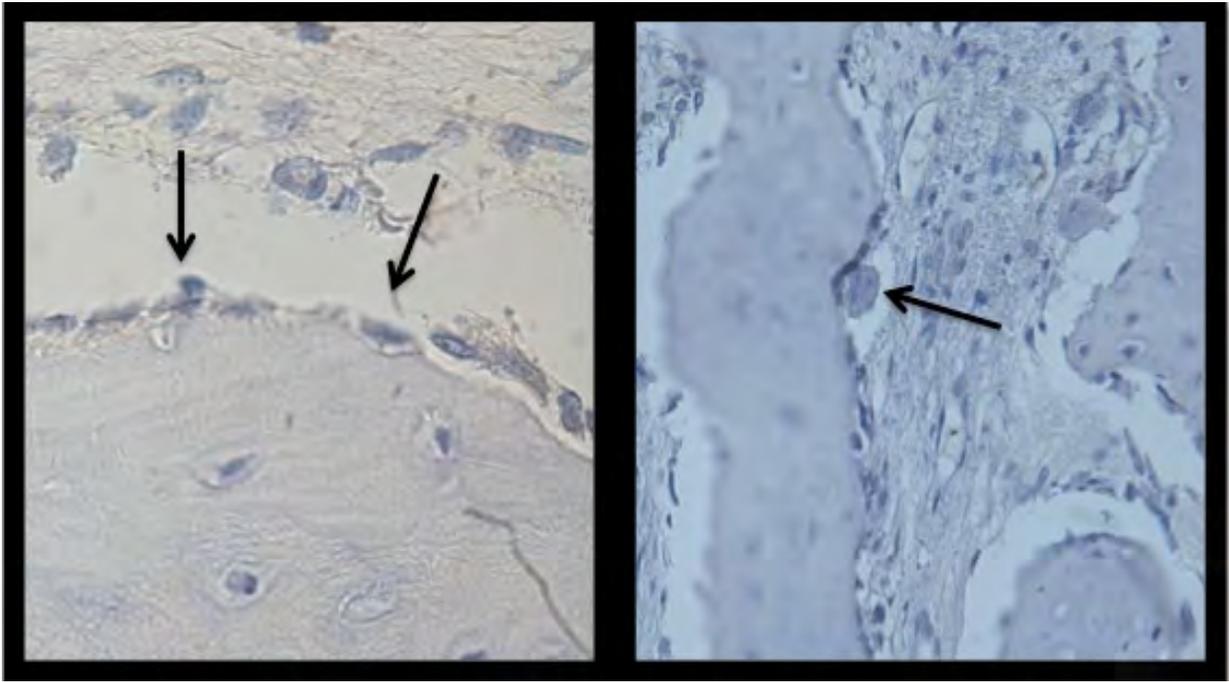


Figura12. Presencia de osteoblastos y osteoclastos en muestras con osteogénesis imperfecta tipo IV a través de la tinción H&E con lente objetivo 40X. El encuadre de la izquierda muestra el borde de osteoblastos, se aprecia el aspecto alargado y mononucleado, en el encuadre de la izquierda se observa un osteoclasto, se aprecia el aspecto multinucleado con borde de cepillo y múltiples prolongaciones.

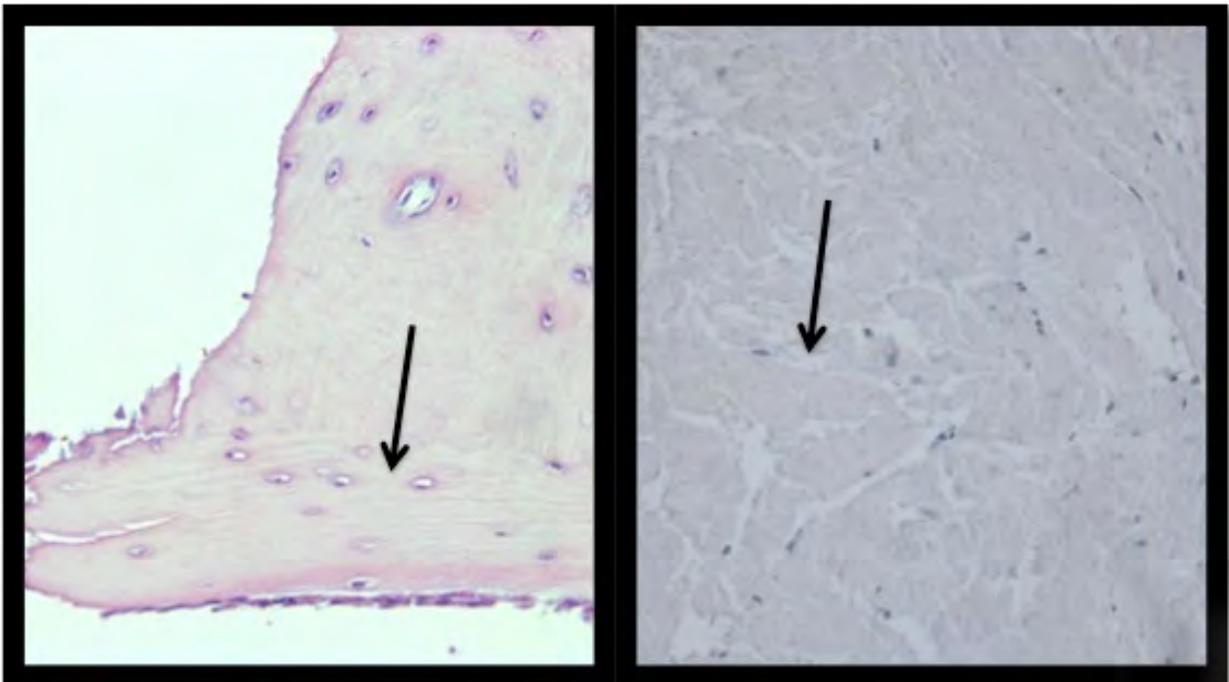


Figura 13. Presencia de matriz extracelular en muestras control y de osteogénesis imperfecta IV a través de la tinción H&E con lente objetivo 20X. El encuadre de la izquierda muestra hueso sin patología ósea, el encuadre de la derecha muestra hueso con osteogénesis imperfecta, la flecha marca la diferencia entre matriz extracelular, en la muestra con osteogénesis imperfecta la matriz ósea se encuentra desorganizada.

Con la tinción especial de Masson se corroboró que la estructura de las fibras de colágeno en el hueso con osteogénesis imperfecta son festinadas y maduras, y con una gran desorganización de la matriz extracelular, en comparación con las fibras de colágeno del hueso sin patología ósea, en donde se aprecia la matriz extracelular inmadura y con fibras de colágeno de apariencia lisa (Figura 14).

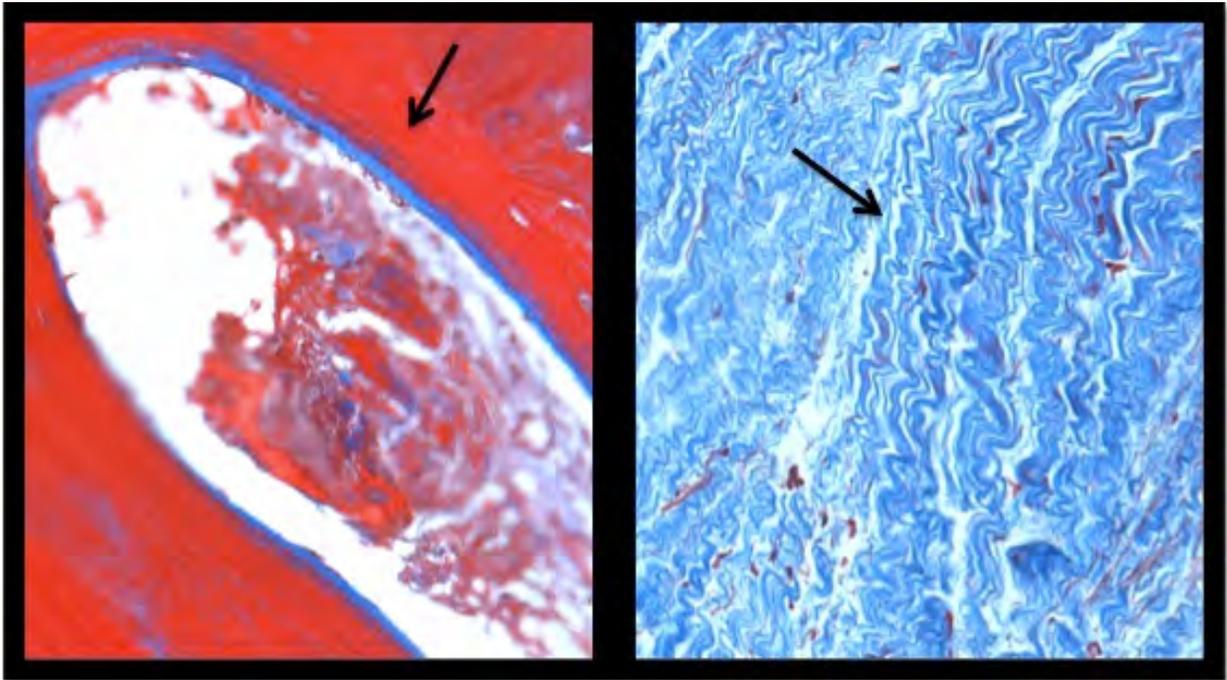


Figura 14. Presencia de fibras de colágena en muestras control y de osteogénesis imperfecta tipo III a través de la tinción de Masson con lente objetivo 20X. El encuadre de la izquierda muestra fibras de colágeno teñidas con técnica Masson en hueso sin patología, la tinción se observa roja por la inmadurez de las fibras. En el encuadre de la derecha se muestran fibras de colágeno en hueso con osteogénesis imperfecta, la tinción se observa azul por la madurez de las fibras, obsérvese lo festoneado de las fibras de colágeno.

Dentro de la búsqueda de Claudinas en osteoblastos, obtuvimos marcaje en los osteoblastos de todas las muestras en diferentes intensidades. Todas las muestras mostraron marcaje positivo en medula ósea. Realizamos una comparación entre los píxeles obtenidos entre muestras de hueso sin patología ósea y muestras con Osteogénesis imperfecta y evaluamos las diferencias utilizando pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney) pareadas (Tabla 8). Los resultados mostraron diferencias significativas en la expresión de claudina-6, claudina-14 y claudina-16.

Claudina	Grupo OI n:13	Grupo S n:14	P (U de mann-whitney)
Cld-1	34,139	14,239	.430
Cld-2	25,163	14,182	.375
Cld-5	4,227	5,277	.943
Cld-6	27,117	52,753	.054
Cld-9	183,951	86,248	.085
Cld-11	241,934	270,529	.519
Cld-14	46,739	327,529	.00001
Cld-16	53,729	17,379	.025

Tabla 8. Expresión de claudinas expresado en pixeles en el grupo control y el grupo con osteogénesis imperfecta. Diferencia entre los ambos grupos.

Se estadifico el grupo de osteogénesis imperfecta por medio de la clasificación de Sillence en 3 grupos: el primer grupo con 2 muestras con osteogénesis imperfecta, el segundo grupo con 8 muestras de osteogénesis imperfecta tipo III, y el tercer grupo con 3 muestras de osteogénesis imperfecta tipo IV. Se realizo un análisis, mediante U de Mann-Whitney para grupos independientes, entre cada uno de los grupos comparándolos con los pixeles obtenidos dentro del grupo de muestras sanas (Tablas 9-)

Los resultados del análisis mostraron que la expresión de claudina-14 fue significativamente menor en la osteogénesis imperfecta tipo que los controles de hueso sin patología ósea, sin embargo la expresión de claudina-16 fue significativamente mayor.

En la osteogénesis imperfecta tipo III el resultado es idéntico en cuanto a la menor expresión de claudina-14 y mayor expresión de la claudina-16 sin embargo en este tipo se observó también una importante disminución en la expresión de claudina-6. Finalmente, en la osteogénesis imperfecta tipo IV se repite la observación de menor expresión de claudina-14 y mayor expresión de claudina-16 pero a diferencia de el tipo III, en el tipo IV la expresión de claudina-9 es mucho mayor que los controles (Figuras 15-22).

	OI tipo I n:2	Muestras sanas n:14	p
Cld-1	687,038	14,239	.021
Cld-2	777,158	14,182	.021
Cld-5	24,237	5,277	.859
Cld-6	48,284	52,753	.859
Cld-9	227,772	86,248	.362
Cld-11	154,016	270,026	.768
Cld-14	23,176	327,529	.021
Cld-16	27,731	17,379	.021

Tabla 9. Tabla comparativa. Expresión de claudinas expresado en pixeles. Comparación de grupo control contra grupo con osteogénesis imperfecta tipo I. En rojo las P significativas

	OI tipo III n:8	Muestras sanas n:14	P
Cld-1	25,803	14,239	.616
Cld-2	24,161	14,182	.764
Cld-5	4,017	5,277	.869
Cld-6	18,034	52,753	.008
Cld-9	119,695	86,248	.330
Cld-11	299,457	270,026	.616
Cld-14	44,782	327,529	.001
Cld-16	45,487	17,379	.042

Tabla 10. Tabla comparativa. Expresión de claudinas expresado en Pixeles. Comparación de grupo control contra grupo con Osteogénesis imperfecta tipo III. En rojo las P significativas

	OI tipo IV n:3	Muestras sanas n:14	P
Cld-1	34,139	14,239	.017
Cld-2	14,136	14,182	.267
Cld-5	1,633	5,277	.333
Cld-6	42,707	52,753	1.00
Cld-9	692,895	86,248	.013
Cld-11	241,934	270,026	.700
Cld-14	54,095	327,529	.013
Cld-16	175.674	17,379	.021

Tabla 11. Tabla comparativa. Expresión de Claudinas expresado en pixeles. Comparación de grupo control contra grupo con osteogénesis imperfecta tipo IV. En rojo las P significativas.

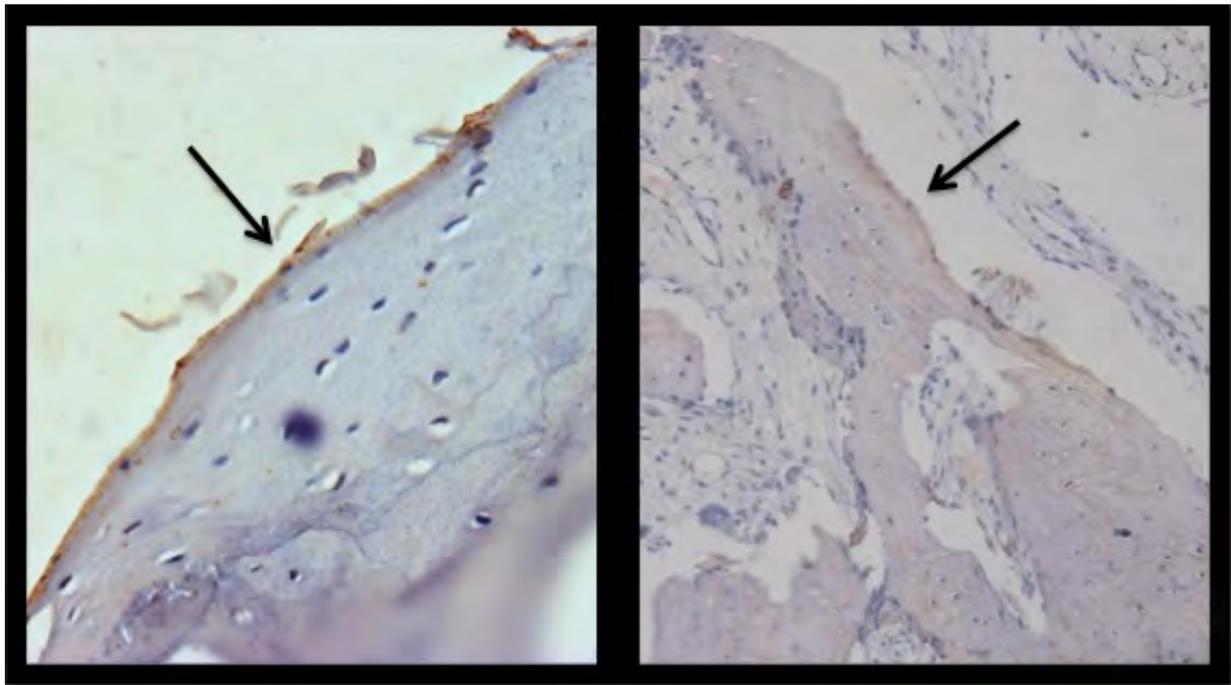


Figura 15. Expresión de Claudina-1 en osteoblastos. En el encuadre de la izquierda se observa en objetivo 40X el marcaje de Claudina-1 de osteoblastos sin patología ósea, comparado con la poca expresión del encuadre de la derecha, en hueso con osteogénesis imperfecta tipo I (objetivo 20X)

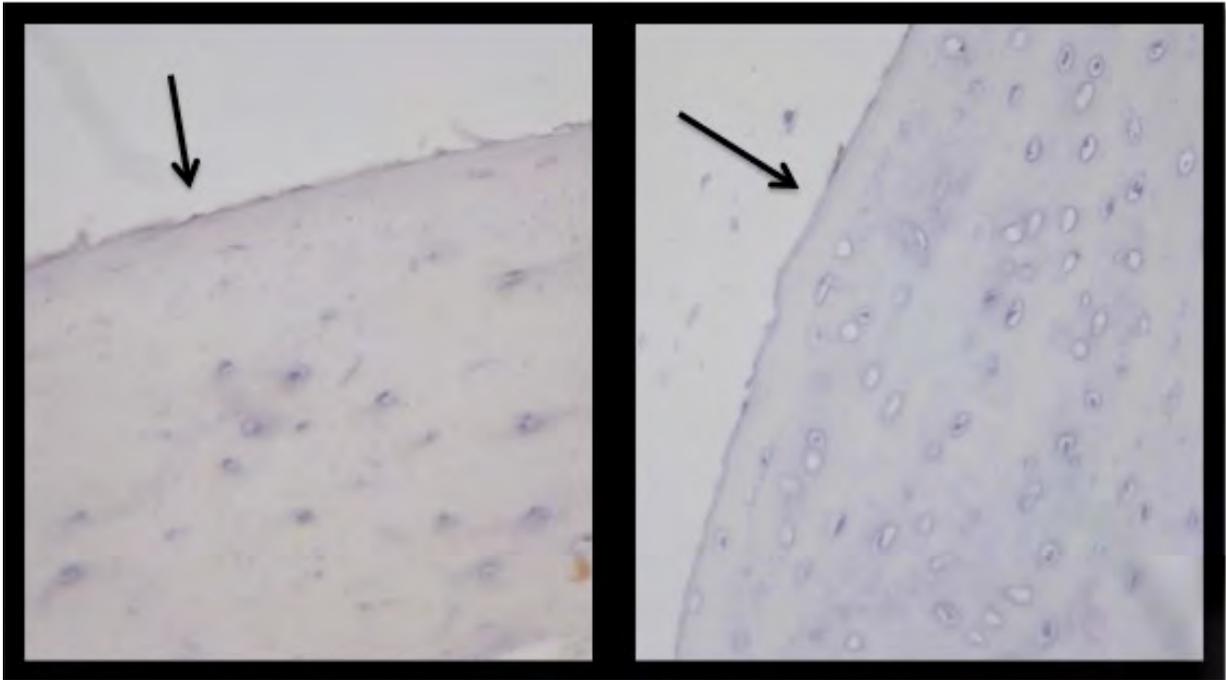


Figura 16. Expresión de Claudina-2 en osteoblastos. Se observa el poco marcaje con Claudina-2 en ambas muestras óseas. Izquierda muestra sin patología ósea, derecha muestra con osteogénesis imperfecta tipo I. Visión en lente objetivo 40X

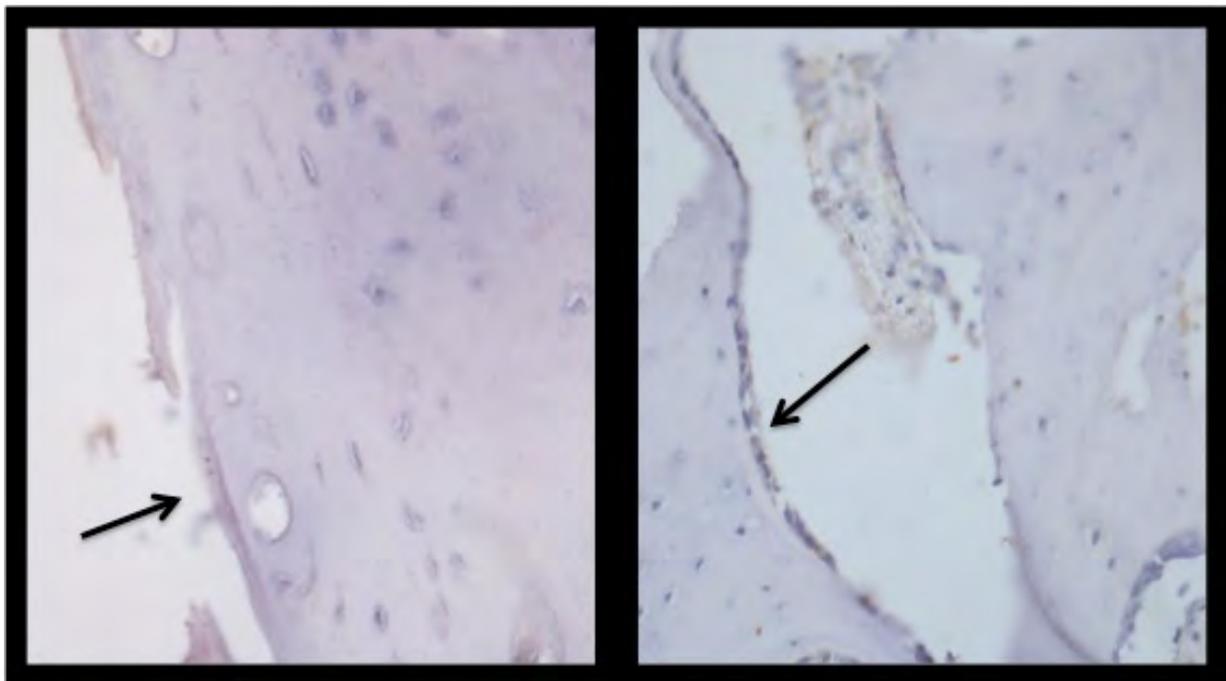


Figura 17. Expresión de Claudina-5 en osteoblastos. Inmunohistoquímica en hueso control comparada con hueso con osteogénesis imperfecta tipo III. Marcaje con Claudina-5, se observa la diferencia de marca entre el hueso de la izquierda (muestra ósea sin patología) y hueso de la derecha (muestra ósea con osteogénesis imperfecta). Visión con lente objetivo 20X

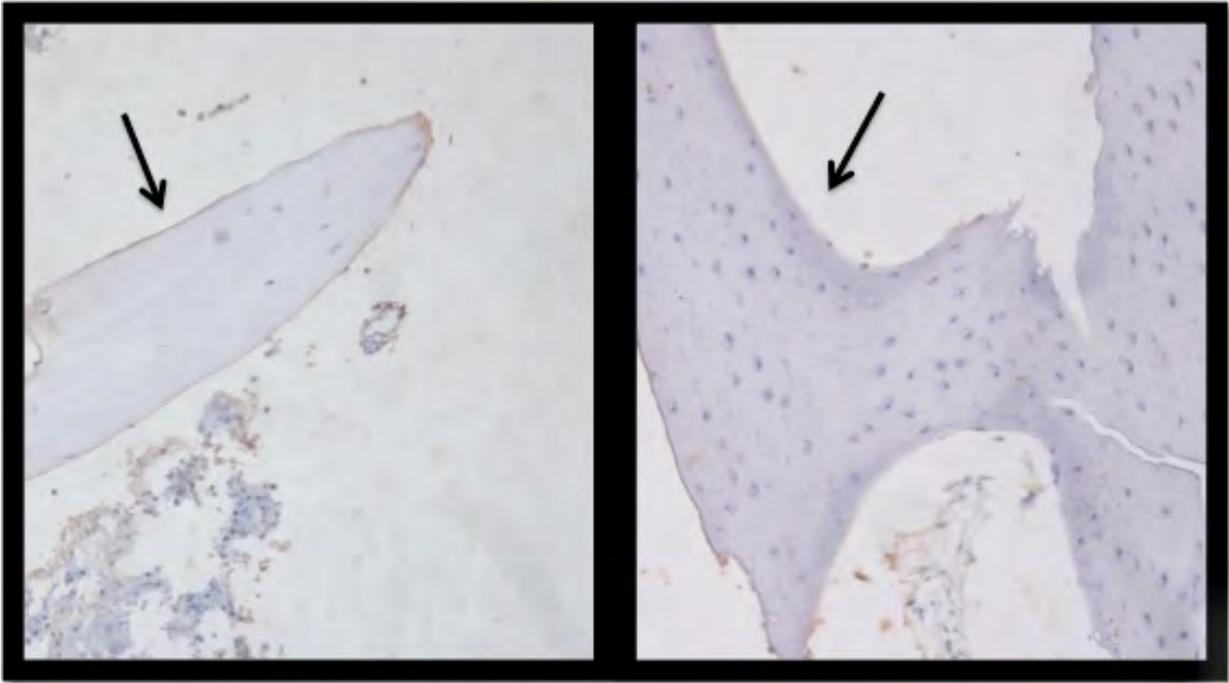


Figura 18. Expresión de Claudina-6 en osteoblastos. Inmunohistoquímica en hueso control comparada con hueso con osteogénesis imperfecta IV. Marcaje con Claudina-6, se observa la diferencia de marca entre el hueso de la izquierda (muestra ósea sin patología) y hueso de la derecha (muestra ósea con osteogénesis imperfecta). Visión con lente objetivo 20X

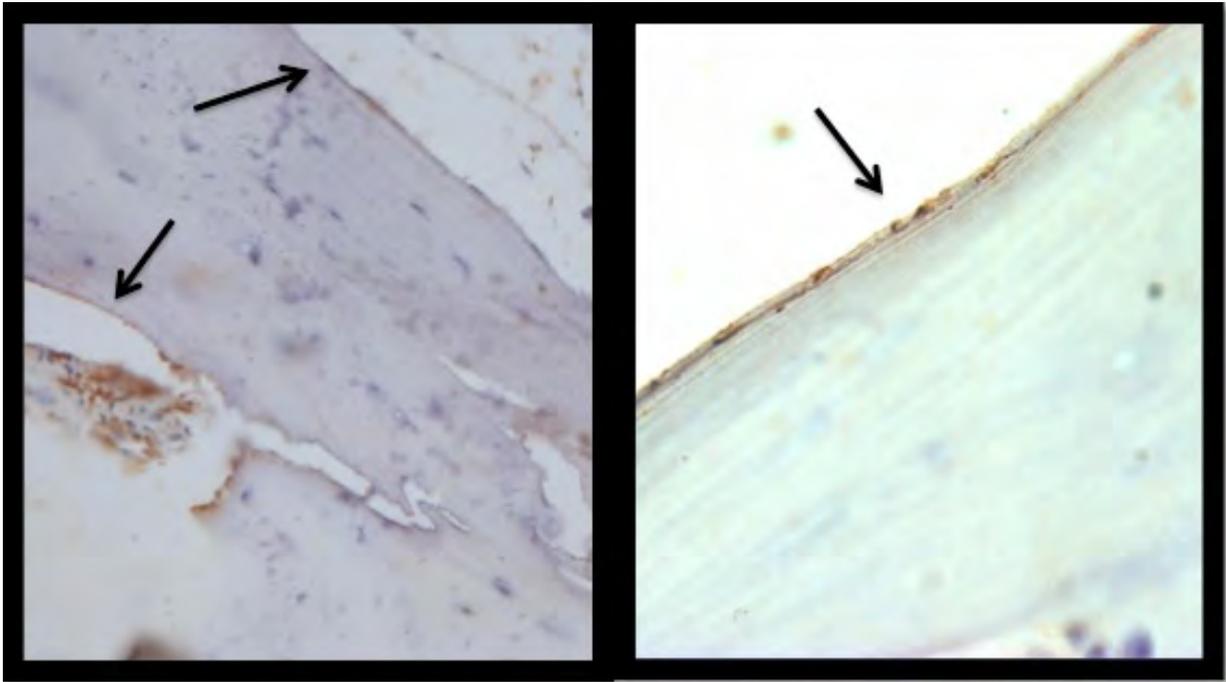


Figura 19. Expresión de Claudina-9 en osteoblastos. Se observa la diferencia de marca entre el hueso de la izquierda (muestra ósea sin patología) y hueso de la derecha (muestra ósea con osteogénesis imperfecta tipo IV). Visión con lente objetivo 20X

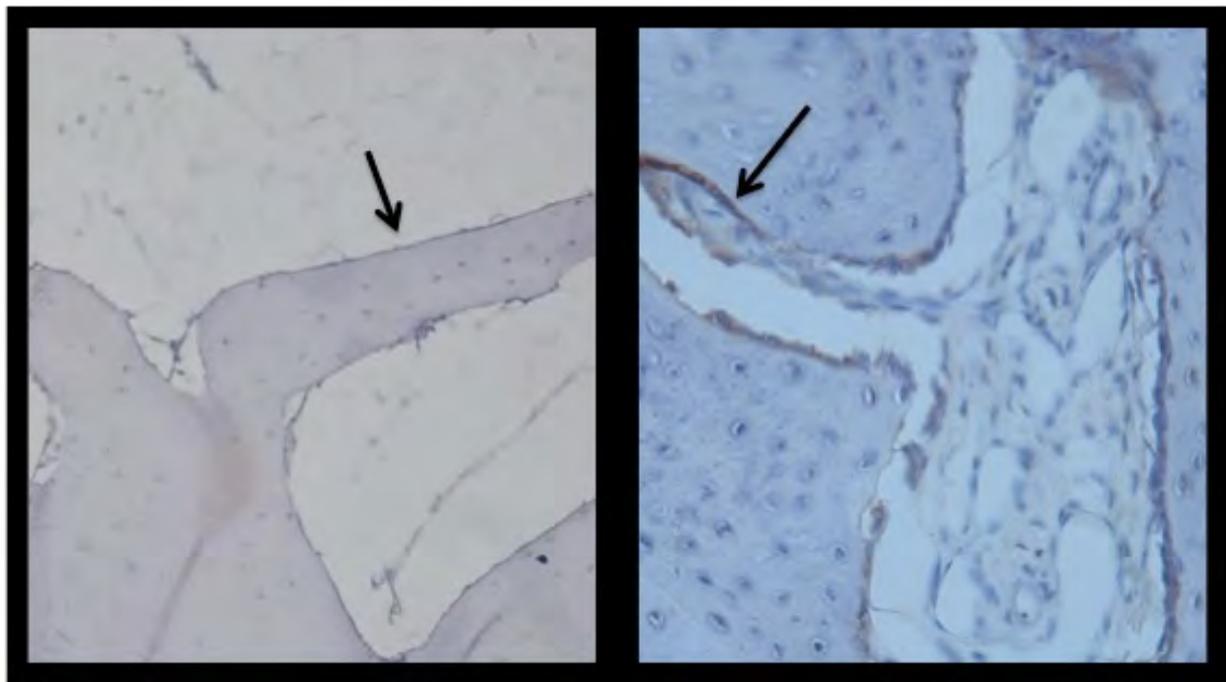


Figura 20. Expresión de Claudina-11 en osteoblastos. Se observa la diferencia de marca entre el hueso de la izquierda visión con lente objetivo 20X (muestra ósea sin patología) y hueso de la derecha visión con lente objetivo 40X (muestra ósea con osteogénesis imperfecta tipo III).

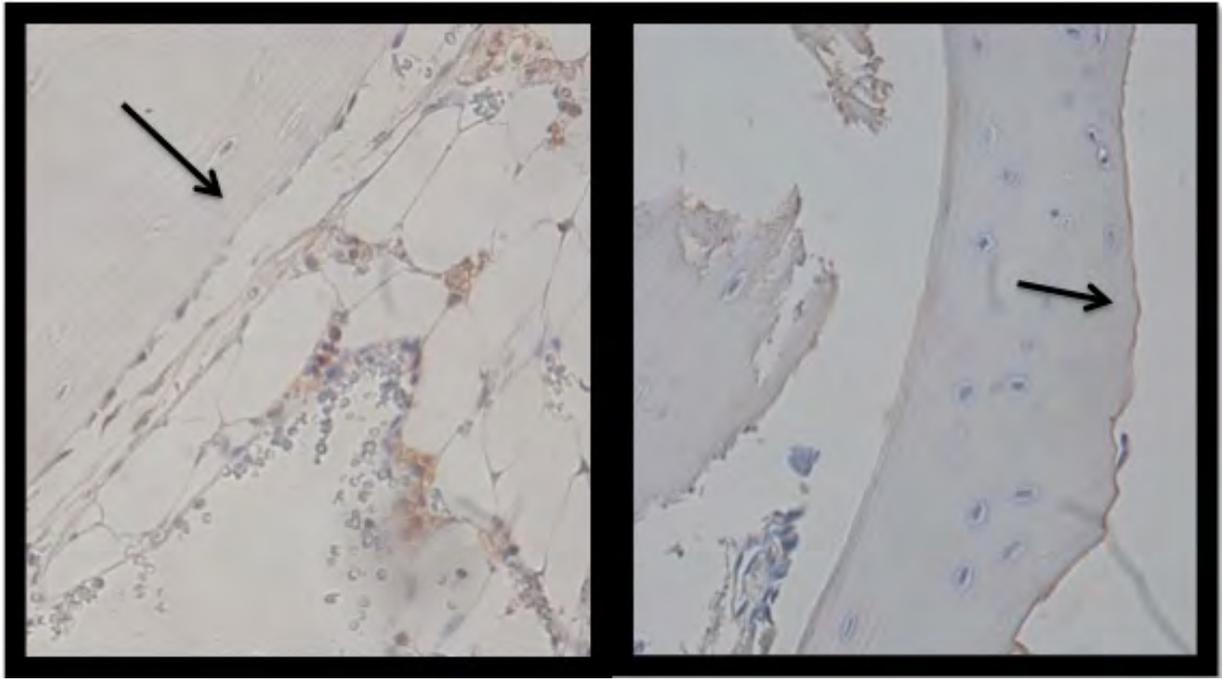


Figura 21. Expresión Claudina-14 en osteoblastos. Se observa la diferencia de marca entre el hueso de la izquierda (muestra ósea sin patología) y hueso de la derecha (muestra ósea con osteogénesis imperfecta III). Visión con lente objetivo 20X

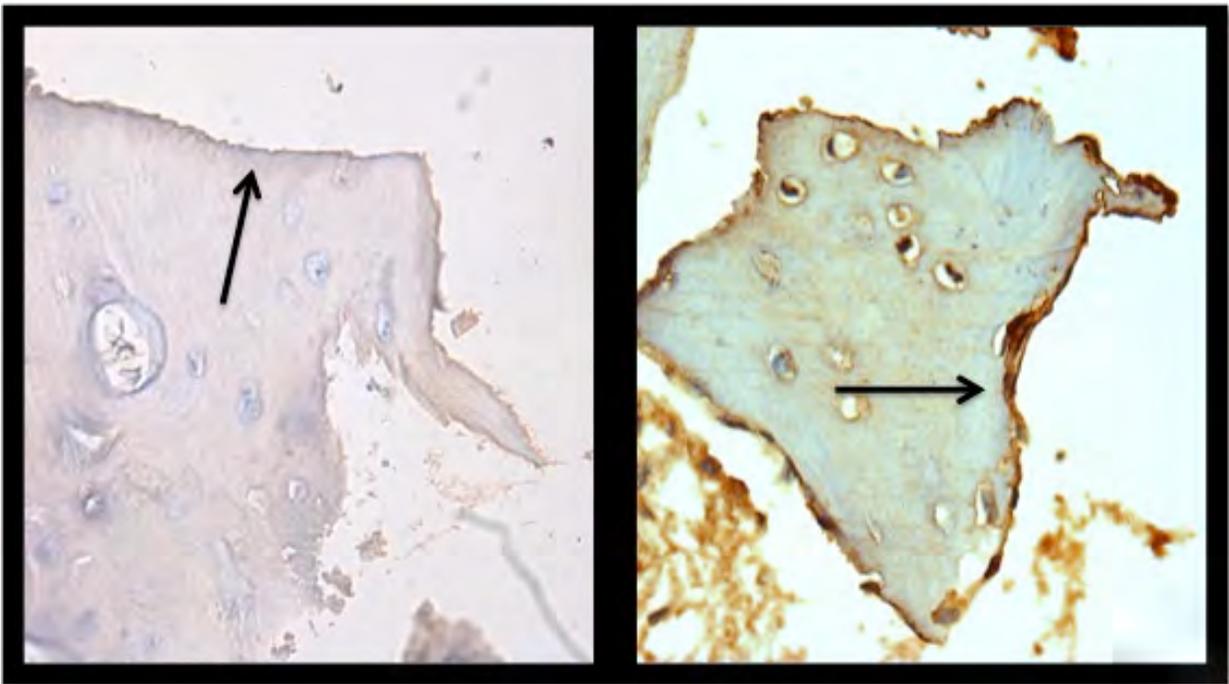


Figura 22. Expresión de Claudina-16 en osteoblastos. Se observa la diferencia de marca entre el hueso de la izquierda (muestra ósea sin patología) y hueso de la derecha (muestra ósea con osteogénesis imperfecta I). Visión con lente objetivo 20X

CONCLUSIONES.

Nuestros resultados demostraron que existen alteraciones en la expresión de diferentes claudinas dependiendo del tipo de osteogénesis imperfecta. La claudina-14 es responsable de la formación de la barrera catión selectiva y también tiene que ver con proliferación celular y angiogénesis; la claudina-16 es la responsable de formar poros para facilitar el paso de cationes a la región intercelular y también tiene que ver con la movilidad celular y migración de células tumorales. La claudina-6 y la -9 tienen una función similar a la de la claudina-16 sin embargo debemos recordar que la expresión de las claudinas es tejido-especifico aunque la claudina-6 tiene como función la de facilitar la diferenciación celular mientras que la -9 no tiene dicha función³⁵.

El común denominador de la expresión de las claudinas en los osteoblastos de las biopsias de pacientes con osteogénesis imperfecta fue que la claudina-14 disminuyo su expresión mientras que la claudina-16 la aumento. Dentro de la gran clasificación de cationes uno de los mas importantes es el calcio; muchas de las proteínas de las uniones estrechas, principalmente en la regulación de la función de las cateninas, son dependientes de calcio. Sin embargo el aumento de la expresión en claudina-16 podría estar relacionado con la función de inducción de migración de células que podría explicar el porque se observo un aumento tan importante en el deposito de osteoblastos en la región basal del hueso. Esta posibilidad se vería reforzada por el hecho de que la cantidad de osteoclastos en estos pacientes no se modifico con relación a las muestras control.

Lo anterior significa que los mecanismos de señalización inducidos por el colágeno están incrementados y por ende el excesivo reclutamiento de osteoblastos. En la osteogénesis imperfecta no hay un proceso inflamatorio crónico que sería, en condiciones normales, el encargado de favorecer la llegada de osteoclastos a la zona de lesión. Todo esto significa que el reclutamiento de osteoblastos es mediado por colágeno anormal y que la modificación en la expresión de claudinas 14 y 16 es consecuencia de este proceso.

Algo similar aunque no tan intenso ocurrió con la expresión de claudina-6 y -9. La primera tiene una función similar a la claudina-14 mientras que la segunda se asemeja mas a la función de la claudina-16. Estas dos claudinas además de su función de mantener la barrera intercelular se les considera como marcadores de células mesénquimas por lo que es muy probable que los osteoblastos que son positivos para estas claudinas sean células inmaduras en diferentes estadios, menos inmaduras las de claudina-6 que las de claudina-9. Esta observación nos permitiría sugerir que la expresión de estas dos claudinas puede tener una función de pronostico en relación a otras de las 255 patologías óseas en las que el deposito de colágena esta alterado.

A pesar de esto existen numerosas posibilidades que deben ser evaluadas en esta patología. Por ejemplo, recientemente se encontró que el gene de la claudina-2 es un blanco del receptor de vitamina D a través del factor de transcripción Cdx1 lo cual sugiere que esta

vitamina, importante para la activación de osteoblastos, puede ser un novedoso regulador de las barreras epiteliales óseas⁴⁶.

En esta tesis hemos vislumbrado el aporte de las claudinas en el desarrollo y fisiología del hueso, las cuales no solo son señalizadores para la polaridad de los osteoblastos, si no también contribuyen en el intercambio de solutos en el tejido óseo⁴⁴. La etiología de la osteogénesis imperfecta se basa en alteraciones genéticas de las cadenas de colágeno las cuales favorecen que su distribución y forma dentro de la estructura tisular ósea este alterada; todo esto afecta la migración y polaridad de los osteoblastos lo cual hasta este momento no ha sido estudiado en profundidad, el estudio de la osteogénesis imperfecta solo se ha centrado en las alteraciones genéticas, olvidando las interacciones con el microambiente.

La interacción célula con célula es importante para el desarrollo y el mantenimiento todos los tejidos. Existe suficiente material relacionado con el rol tan significativo que tienen las Claudinas en la regulación de la remodelación ósea, sin embargo hay poco material relacionado con la expresión de Claudinas y sus interacciones en hueso humano. A pesar de que existen algunos estudios relacionados con osteoporosis no hay prácticamente nada en relación a patologías complejas como la osteogénesis imperfecta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Findley M. K, Kpval M. (2009) **Regulation and Roles for Claudin-family Tight Junctions Proteins**. IUBMB Life 61(4): 431-437.
2. Trejo Cordova, A., Navarro Maldonado, M.C., Rosado García, A. (2009) **Catenina β : características estructurales y funcionales**. Contacto S. (75). 15-20.
3. Brennan K., Offiah G., McSherry E.A., Hookins A.M. (2010) **Tight Junctions: A Barrier to the Initiation and Progression of Breast Cancer**. J Biomed Biotechnol. 2010:460-607.
4. Glick, A. B., Yusp, S. H. (2005) **Tissue homeostasis and the control of the neoplastic phenotype in epithelial cancers**. Semin. Cancer (15): 75-83.
5. Giepmans, N., Ben, G., Sven C., Van IJzendooms, G. (2008) **Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains**. Biochimica et Biophysica Acta (12); 4C: 2, 3.
6. Yoshimi T., Hiroyuki N. (2003) **Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions**. Journal of Cell Science (116): 17-27.
7. Elias, L., Wang, D., Kriegstein, A., (2007). **Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex**. Nature (448): 23.
8. Spray, D. (2005) **Illuminating gap junctions**. Nature methods (2): 1.
9. Baum B., Georgiou M.(2011) **Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance and remodeling**. J. Cell Biol. (192) 6: 907-917.
10. Niessen, C., Gottardi, C. (2008) **Review Molecular components of the adherens junction**. Biochim Biophys Acta. (1778) 3: 562-571.
11. Calderwood D., Huttenlocher A., Kiosses W., Rose D.M., Woodside D.G., Schwartz M.A., Ginsberg M. (2001) **Increased filamin binding to β -integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration**. Nature cell biology (39): 256-566.
12. Thomason H., Scothorn A., Mcharg S., Garrod D. (2010) **Desmosomes: adhesive strength and signaling in health and disease**. Biochem. J. (429): 419-433.
13. Garrod D.(2010) **Review Desmosomes in Vivo**. Dermatology Research and Practice (17): 356-362.
14. Simpson, L. C., Green, J. K. (2007) **Desmosomes: New Perspectives on a classic**. J. Invest Derm. (127): 2499-2515.

15. Huber O. (2003) **Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and disease.** Cell. Mol. Life Sci (60): 1872-1890.
16. Waschke, J. (2008) **The desmosome and pemphigus.** Histochem Cell Biol. (130): 21-54.
17. Turksen, K., Troy, T. (2004) **Barriers built on claudins.** Journal of Cell Science (12) 117: 2435-2447.
18. Findley, M., Koval, M. (2009) **Regulation and Roles for Claudin-family Tight Junction Proteins.** IUBMB Life, 61(4): 431-437.
19. Oliveira, S.S., Morgado-Díaz, J.A. (2007) **Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer.** Cell. Mol. Life Sci. (64): 17-28
20. Cereijido, M., Valdes, J., Shoshani, L., Contreras, R. G. (1998) **Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity.** Annu. Rev. Physiol. (60): 161-177.
21. Schneeberger, E. E., Lynch, R. D. (2004) **The tight junction: a multifunctional complex.** Cell Physiol. (286): 1213-1228.
22. Tsukita, S., Yamazaki, Y., Katsuno, M., Tamura, A., Tsukita, A. (2008) **Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation.** Oncogene (27): 6930-6938.
23. Cereijido, M., Contreras, M., Flores-Benítez, D., Flores-Maldonado, C., Larre, I., Ruiz, A., Shoshani, L. (2007) **New Diseases Derived or Associated with the Tight Junction.** Archives of Medical Research (38): 465-478.
24. Cereijido, M., Contreras, R., Shoshani, L., Flores-Benitez, D., Larre, I. (2008) **Tight junction and polarity interaction in the transporting epithelial phenotype.** Biochimica et Biophysica Acta (8) 770-793.
25. Mullin, J.M. (2004) **Epithelial Barriers, Compartmentation, and Cancer.** Sci. STKE (216), pe2.
26. Van Itallie, C., Fanning, A., Holmes, J., Anderson, J.M. (2010) **Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers.** Journal of Cell Science (123): 2844-2852.
27. 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 mutant tight junction membrane protein.** J. Cell Biol. (134): 1031-1049.

28. Gonzalez- Mariscal, L., Betanzos, A, Nava, P., Jaramillo, B. E. (2003) **Tight junction proteins**. Prog. Biophys. Mol. Biol. (81): 1-44.
29. Miyoshi, J., Takai, Y. (2005) **Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity**. Adv. Drug Deliv. Rev. (57): 815-855.
30. Ghislin, S., Obino, D., Middendorp, S., Boggetto, N., Alcaide-Loridan, C., Deshayes, F. (2011) **Junctional adhesion molecules are required for melanoma cell lines transendothelial migration in vitro**. Pigment Cell Res. (24): 504-511.
31. Lal-Nag, M., Morin, P. (2009) **Protein family review the claudins**. Genome Biology (10): 235.
32. Angelow, S., Ahlstrom, R., Yu, A. (2008) **Biology of Claudins**. AJP: Renal Physiology F867-F876.
33. Piontek J, Winkler L, Wolburg H, Müller SL, Zuleger N, Piehl C, Wiesner B, Krause G, Blasig IE. (2008) **Formation of tight junction: determinants of hemophilic interaction between classic claudins**. FASEB J. 22 (1): 146-158.
34. Alshbool F, Subburaman M. (2014) **Differential expresión of claudin family members during osteoblast and osteoclast differentiation: Cldn-1 is a novel positive regulator of osteoblastogenesis**. PLOS ONE 9(12): e114357 DOI: 10.1371/journal.pone.0114357
35. Wongdee, K., Pandaranandaka, J., Teerapornpantakit, J., Tudpor, K., Thongbunchoo, J., Thongon, N., Jantarajit, W., Krishnamra, N., Charoenphandhu, N. (2008) **Osteoblast express claudins and tight junction-associated proteins**. Histochem Cell Biol (130): 79-90.
36. Alshbool, F., Mohan, S. (2014) **Emerging multifunctional roles of Claudin tight junction proteins in bone**. Endocrinology 155 (7): 2363-2376
37. Mankertz, J., Hillenbrand, B., Tavalali, S., Huber, O., Fromm, M., Schulzke, J. (2004) **Functional crosstalk between WNT signaling and Cdx-related transcriptional activation in the regulation of the claudin-2 promoter activity**. Biochemical and Biophysical Research Communications (314) 1001-1007
38. Forlino, A., Cabral, W., Barnes, A., Marini, J. (2011) **New perspectives on osteogenesis imperfecta**. Nature Reviews (7): 540-557.
39. Shaker, J. Albert, C. Fritz, J. Harris, G. **Recent developments in osteogenesis imperfecta** (2015) F1000 Research 2015, 4(F1000 faculty Rev): 680.

40. Marini, J.C. in Nelson Textbook of Pediatrics (eds Behrman, R.E., Kliegman, R.M. Jansen, R.M.) 2336-2338 Saunders, Philadelphia, 2004.
41. Ross, M., Pawlina, W., Ross Histología texto atlas correlación con biología molecular y celular. Wolters Kuber. 7ª edición. Barcelona. España. 2016.
42. Terajima. M., Perdivara, I., Sricholpech, M., Deguchi, Y., Pleshko, N., Tomer, K., Yamauchi, M. (2014). **Glycosylation and cross-linking in bone type I collagen**. Journal of Biological Chemistry. (289): 22636-22647.
43. Montoya, A., Ros, S. (2007) **Osteogénesis imperfecta (revisión bibliográfica)**. Revista medica de Costa Rica y Centroamerica (580): 161-165
44. Marini, J., Reich, A., Smith, S. (2014) **Osteogenesis imperfecta due to mutations in non-collagenous genes: lessons in the biology of bone formation**. Curr Opinion Pediatr (26): 500-507.
45. Joeng, K., Lee, Y., Jiang, M., Bertin, T., Chen, Y., Abraham, A., Ding, H., Bi, X., Ambrose, C., Lee, B. (2014) **The swaying mouse as a model of osteogenesis imperfecta caused by WNT1 mutations**. Human Molecular Genetics (23): 4035-4042.
46. Zhang, Y.G., Wu, S., Lu, R., Zhou, D., Zhou, J., Carmeliet, G., Petrof, E., Claud, E.C., Sun, J. (2015) **Tight junction CLDN2 gene is a direct target of the vitamin D receptor**. Sci. Rep (5): 10642.