

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS UNIONES ESTRECHAS EN LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA (TEM) Y LA TUMORIGÉNESIS DEL CÁNCER DE MAMA HUMANO*

Javier Esteban Jiménez-Salazar^{1*}, Leticia González-Núñez¹, Mina Königsberg-Fainstein², Luis Enrique Gómez-Quiroz², Alejandro Zentella-Dehesa^{3,4} y Pablo Damián-Matsumura¹

Departamentos de ¹Biología de la Reproducción y ²Ciencias de la Salud, Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM). México D.F. Tel: 5804-4701.

³Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, IIB, UNAM y

⁴Departamento de Bioquímica, INCMNSZ, México D. F. MÉXICO.

Correo E: javier840221@yahoo.com.mx. *Posgrado en Biología Experimental, UAM.

RESUMEN

El cáncer de mama constituye la primera causa de muerte oncológica en la población femenina mexicana mayor de 25 años. Afortunadamente, si es diagnosticado oportunamente puede ser controlado y el tiempo de supervivencia excede los 10 años. El pronóstico es más favorable cuando se detectan los sitios de migración antes de que se establezca la metástasis; por esta razón, el estudio de las uniones intercelulares ha cobrado gran interés. La unión estrecha (TJ, por sus siglas en inglés) es uno de los componentes de las uniones célula-célula que contribuye en el mantenimiento de la polaridad de células epiteliales. Recientemente, algunos estudios han sugerido que componentes del complejo ocluyente están relacionados en la activación de señales asociadas con el aumento en la proliferación celular y con la transición epitelio-mesénquima (TEM) en el cáncer de mama, por lo que pueden servir de marcadores para su detección temprana. En esta revisión se presenta una visión general de la importancia de las proteínas que componen el complejo ocluyente de las TJ en los procesos antes mencionados, especialmente aquellas que se asocian directamente al fenotipo metastático invasivo en la glándula mamaria humana.

ABSTRACT

Breast cancer is the leading cause of cancer death among Mexican women above 25 years old. Fortunately, with early detection the survival rate for breast cancer exceeds 10 years. To enable improvements in its prognosis, early sites of cell migration should be detected before the onset of metastasis; consequently, the study of the intercellular junctions has gained considerable attention. The tight junction (TJ) is one component of cell-to-cell adhesion in epithelial cells that contributes to maintain its polarity. Recently several lines of evidence have suggested that proteins of the occludens complex regulates signaling for favoring cell proliferation, and has more recently been implicated in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) during the breast cancer process, and therefore can be used as markers for early detection. In this review the significance of tight junctions and its proteins is discussed, with a focus on the proteins forming the occludens complex directly associated to the human breast cancer metastatic phenotype.

INTRODUCCIÓN

El término cáncer es genérico y designa un amplio grupo de enfermedades en donde las células de

cualquier parte del cuerpo se vuelven anormales, proliferan rápidamente y sin control, además de que adquieren la capacidad de invadir partes adyacentes del cuerpo y pueden propagarse a

PALABRAS

CLAVE:

Cáncer de mama, uniones estrechas, metástasis, transición epitelio-mesénquima (TEM), transducción de señales

KEY WORDS:

Breast Cancer, tight junctions, metastasis, epithelium-mesenchyme transition (EMT), signal transduction

otros órganos. Este proceso es conocido como metástasis, por lo que cuando una célula pierde la capacidad de regular su proliferación se convierte en neoplásica o maligna. La acumulación de estas células malignizadas forma tumores, entre éstos los malignos se distinguen porque adquieren la capacidad de desprenderse del tejido que los originó y pueden viajar por la sangre o linfa para invadir otros tejidos y formar nuevos tumores. La metástasis es la causa más común de muerte en pacientes con cáncer (1).

De los diferentes tipos de cáncer, el de mama es considerado la primera causa de muerte en México en mujeres mayores de 25 años. Los especialistas han señalado que el principal obstáculo en la lucha contra este tipo de cáncer es el diagnóstico tardío, ya que la mayoría de las pacientes llegan a los servicios de salud en las etapas muy avanzadas de la enfermedad; por el contrario, si es detectado antes de que se presente la metástasis, la prognosis es muy favorable, pues el tiempo de supervivencia puede exceder los 10 años (2).

El cáncer de mama es una enfermedad que se puede desarrollar principalmente en las células de los lóbulos, lobulillos y alveolos o en los conductos formadores de leche. Cada glándula mamaria tiene de 15 a 20 lóbulos que a su vez están compuestas de secciones más pequeñas denominadas lobulillos que terminan en bulbos minúsculos (alveolos) que son los que producen la leche. Los lóbulos, los lobulillos y los bulbos están conectados por tubos ramificados y delgados denominados conductos lactóforos que desembocan en el pezón. Los principales tejidos donde se desarrolla el cáncer de mama son en lóbulos, lobulillos y bulbos (carcinoma lobulillar; 20%) y en los conductos (carcinoma ductal; 70%), siendo este último el más frecuente (3).

Cabe destacar que la mayoría de los tipos de cáncer, incluyendo el de mama, son originados a partir de tejido epitelial, como el que recubre el interior de los ductos lactóforos, y se caracterizan por el control aberrante en la proliferación celular, así como la pérdida de la diferenciación y la arquitectura del tejido de donde son originados. Estos cambios son propiedades fundamentales de las células cancerosas, en donde la disminución de las interacciones entre células, permite a las cancerosas perder la polaridad, ocasionando que algunas células se desprendan. Aunado a estos procesos, se presenta la pérdida en la inhibición de crecimiento por contacto, la cual refleja el desorden en las vías de transducción de señales que están directamente relacionadas con las interacciones intercelulares, y el proceso de transición del fenotipo original, epitelial, a uno de tipo mesenquimal. Estas

características son típicas de los primeros estadios de progresión del tumor antes de que inicie la metástasis (4) y es el tema que trataremos aquí.

INHIBICIÓN POR CONTACTO DEL CRECIMIENTO CELULAR

Se ha demostrado que cuando las células crecen *in vitro*, se adhieren al sustrato y proliferan hasta que al tener contacto entre sí detienen su movimiento y duplicación, proceso que se le conoce como inhibición por contacto; asimismo, cuando el crecimiento celular alcanza su máximo sobre una superficie se denomina confluencia. La inhibición por contacto implica la participación de receptores de membrana y de moléculas de adhesión celular que activan inhibidores de la mitosis, bloquean el ciclo celular, por lo que las células pueden mantenerse en este estado, relativamente estacionario, incluso durante varias semanas (5). Las células cancerosas suelen perder la capacidad de inhibición por contacto en cultivos celulares a confluencia, debido principalmente a la sobre expresión de factores de transcripción asociados al proceso denominado transición epitelio-mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés de Epithelium-Mesenchyme Transition) y, por consecuencia, acelerar la proliferación celular (6).

Los contactos célula-célula son una forma crítica de controlar las funciones de endotelios y epitelios. Estas uniones intercelulares están formadas por complejos proteínicos que restringen el movimiento y la migración celular, inhiben la proliferación, la apoptosis y contribuyen al mantenimiento de la polaridad celular y del tejido, así como también regulan la permeabilidad y selectividad al paso de solutos a través de endotelios y epitelios (Fig. 1).

Aunque la composición de los diferentes tipos de uniones varía, generalmente están formadas por proteínas con regiones transmembranales (occludina, claudina, tricelulina, JAM, etc.) y proteínas intracelulares (ZO-1/2/3, ZONAB, etc.). En cada unión, las proteínas de adhesión forman dímeros y se unen a otro complejo idéntico en la célula adyacente. Por otro lado, los sitios de reconocimiento entre ambos dímeros o puntos de adhesión, son las regiones donde se registra gran parte de la información extracelular, la cual se envía hacia el interior de la célula por señales citoplasmáticas y, en menor proporción, transmembranales. De esta manera, las uniones intercelulares se comportan como verdaderos complejos de señalización, por lo que la falta de estímulos causa que las células detengan su división mediante la activación de inhibidores de la progresión celular, particularmen-

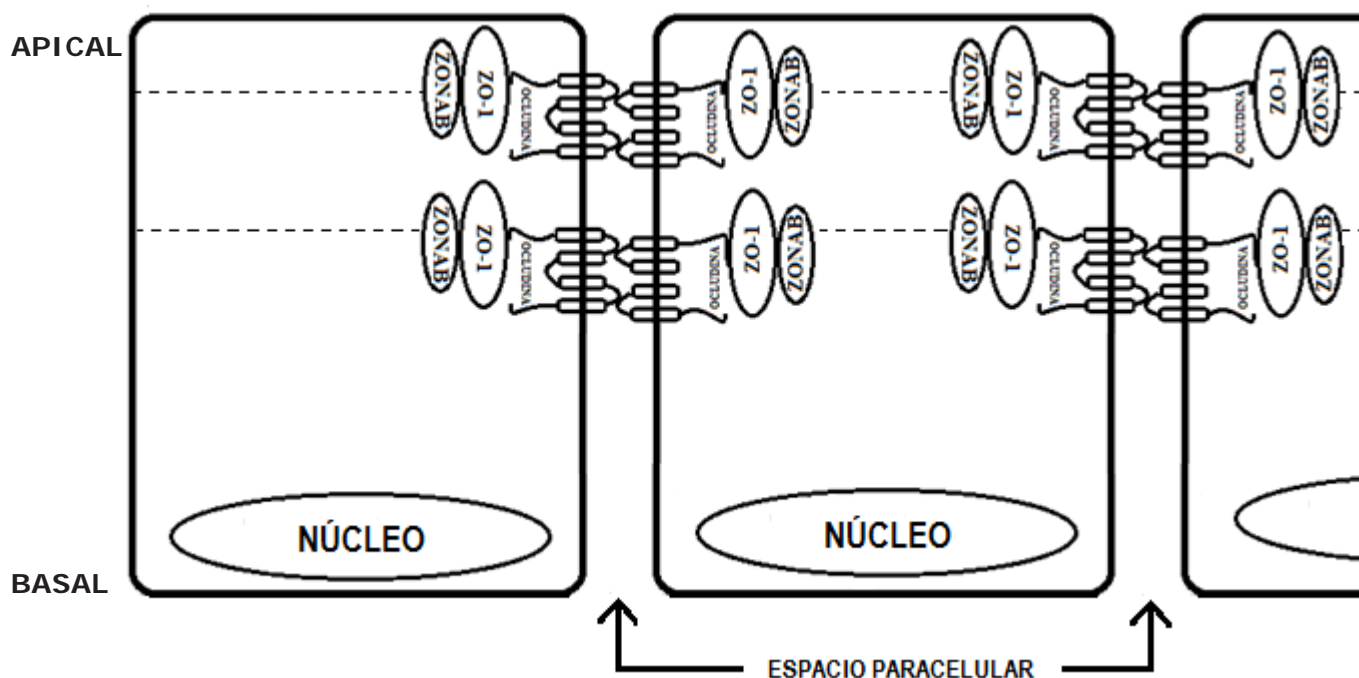


Figura 1. Las células que forman epitelios se unen entre sí a través de contactos célula-célula, lo que ocasiona la formación de una zona apical y otra basal (polaridad). Estas uniones impiden la permeabilidad de solutos a través del espacio paracelular desde la zona apical a la basal del epitelio. Los componentes de las uniones de oclusión son las proteínas transmembranales (occludina) y las citoplasmáticas (ZO-1 y ZONAB).

te los inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas (CDK, por sus siglas en inglés) (7).

La mayoría de las células epiteliales adultas, no cancerosas, tienen la capacidad de detectar el microambiente que las rodea y responder a los cambios en el mismo; por ejemplo, si una célula detecta que está rodeada en todos sus costados por otras células, ésta frenará su división. De esta forma, las células crecen cuando es necesario, pero se detienen cuando el espacio ha sido ocupado. Las células cancerosas han perdido los mecanismos de inhibición por contacto, permaneciendo independientes unas de otras, ya que continúan multiplicándose y migrando, aún cuando se encuentran rodeadas por otras células, haciendo que se forme una masa de células o tumor. Esta autonomía de las células tumorales se relaciona con la ausencia de intercambio de información intercelular; así, las células transformadas carecen de los mecanismos que rigen la proliferación de las células no cancerosas. En este sentido, las células malignizadas inmortalizadas (líneas celulares cancerosas) proliferan más rápidamente que las normales al no depender de factores de crecimiento presentes en el medio de cultivo, además, la mayoría de las líneas celulares en cultivos en confluencia han perdido su capacidad de crecer en monocapas,

es decir, no tienen la necesidad de una superficie sólida a la cual adherirse (8).

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS UNIONES ESTRECHAS

Como se ha mencionado, las interacciones célula-célula son de crucial importancia en el desarrollo de organismos multicelulares, así como en la integridad y la función de tejidos en adultos. Como se muestra en la figura 2, en los tejidos epiteliales estas uniones intercelulares se caracterizan por presentar un complejo apical que contiene uniones estrechas (TJ, "tight junctions"), uniones adherentes (AJ, "adherens junctions") y desmosomas, donde cada una de ellas posee características morfológicas y funcionales únicas (9). Tanto las TJ como las AJ se unen al citoesqueleto, el cual es remodelado durante la diferenciación y polarización epitelial; es importante notar que las primeras son esenciales para la función de todos los epitelios y endotelios.

Las TJ están formadas por microdominios de la membrana plasmática, compuestos de múltiples puntos fusionados ("kissing points") entre las caras exteriores de las membranas plasmáticas de células adyacentes, de tal manera que rodean el

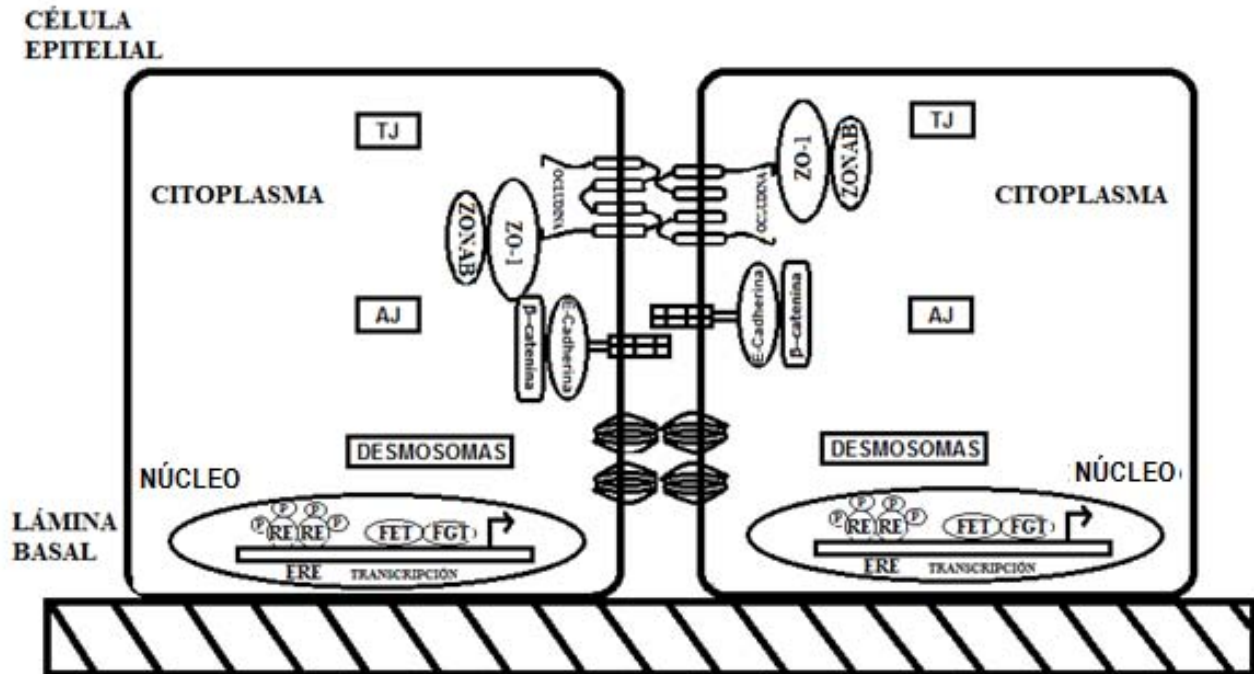


Figura 2. La figura muestra los diferentes tipos de uniones intercelulares: uniones estrechas u ocluyentes (TJ, "tight junctions"), uniones adherentes (AJ, "adherens junctions") y desmosomas, los dos primeros tipos de unión están compuestas por proteínas integrales de membrana como ocludina o E-cadherina que genera la unión entre las células epiteliales, proteínas citoplasmáticas ZO-1, β-catenina que estructuran los complejos y proteínas de señalización ZONAB que induce la activación transcripcional de diferentes blancos nucleares.

polo apical de cada célula en forma de una franja continua. Esta estructura separa el lado apical del basolateral en el epitelio, generando compartimentos con diferentes composiciones, por lo que los epitelios y las mismas TJ actúan como barrera a la difusión de fluidos entre dos compartimentos, pero con permeabilidad selectiva a los iones, factores de crecimiento, agentes patógenos y otros solutos. La barrera formada por las TJ tiene selectividad con respecto al tamaño molecular y el tipo de iones, donde las diferencias en permeabilidad dependen del tipo de epitelio y las condiciones en las que se encuentran. Asimismo, las TJ también impiden la difusión de las proteínas y los lípidos de la membrana plasmática que se encuentra en la región apical a la basolateral y viceversa, manteniendo la composición diferencial en cada zona. En el caso de las TJ presentes en los epitelios de la glándula mamaria, se han descrito como estructuras altamente dinámicas cuando se lleva a cabo la producción de leche en los lóbulos y lobulillos (lactogénesis) y se ha reportado que su estructura y función, especialmente la permeabilidad paracelular, son reguladas por hormonas como prolactina y progesterona. En este caso, la integridad de las TJ es crucial para que se realice la secreción de leche

durante la lactancia, ya que las TJ del epitelio de los conductos son impermeables e impiden la fuga de leche del lumen. Por lo que éste es un ejemplo de cambios dinámicos en la función de barrera que cumplen las TJ e indica su importancia durante el mantenimiento de la homeostasis en este tejido (10).

A la fecha se han identificado una gran cantidad de proteínas que componen a las TJ. Estas pueden ser categorizadas dentro de tres grupos: 1) proteínas integrales de membrana (occludina, E-cadherina y claudinas, principalmente); 2) proteínas citoplasmáticas asociadas a la periferia (ZO-1/2/3, PATJ, etc.), que organizan a las proteínas integrales de membrana y las conectan a los filamentos de actina o a otras proteínas citoplasmáticas; y 3) proteínas de señalización (β-catenina, ZONAB, etc.), que pueden estar involucradas en el proceso de ensamble de las uniones, cuya función es activar ciertas vías de señalización en el interior de la célula y además regular la transcripción de diferentes genes asociados con el movimiento y la proliferación celular (11).

Estudios recientes han puesto en evidencia la participación de los componentes de las TJ en la transición epitelio-mesénquima, la inducción de

la proliferación celular y la metástasis entre otros procesos, por lo que la presente revisión se enfoca en analizar la participación de las proteínas componentes de este complejo en el proceso tumorigénico.

La proteína ocludina fue la primera molécula de las uniones estrechas identificada como proteína integral de membrana. Con un peso aproximado de 60 kDa, la ocludina presenta cuatro dominios transmembranales, un dominio carboxilo-terminal largo y uno amino-terminal corto, ambos citoplasmáticos, así como dos asas extracelulares que son similares en tamaño y ricas en residuos de tirosina (12).

La familia de proteínas denominada *Zonula Occludens* (ZO) está compuesta por tres variantes, ZO-1, ZO-2 y ZO-3, que son proteínas citoplasmáticas asociadas a la periferia de la membrana. ZO-1 fue el primer componente de las TJ en ser identificado y cuenta con una masa molecular de 220 kDa. Cuando se inmunoprecipitó ZO-1, con ella coprecipitaron otras dos proteínas con masas moleculares de 160 y 130 kDa, que también mostraron localización específica en las TJ, por lo que estas proteínas fueron designadas ZO-2 y ZO-3. Existen dos variantes de la proteína ZO-1 resultado del corte alternativo de intrones ("splicing"), que se caracterizan por la presencia de un dominio de 80 aminoácidos denominado dominio α . La isoforma que contiene dicho dominio ($\alpha+$) está presente en las células epiteliales, mientras que la isoforma $\alpha-$ se limita a las células endoteliales y células de Sertoli (13).

Diversos experimentos han mostrado que ZO-1 puede tener una potencial función como supresor de tumores en tejidos epiteliales de mamíferos. Se ha observado en diversas líneas celulares invasivas y en muestras de tumor de cáncer de mama humano, que cuando disminuye la expresión de ZO-1, existe una correlación directamente proporcional con la pérdida en la diferenciación. Un estudio usando la línea celular tumorigénica de carcinoma mamario humano MCF-7, mostró que la activación del receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-IR) induce el incremento en la expresión de ZO-1; en el mismo estudio se demostró que la activación de IGF-IR amplifica la expresión de la E-cadherina, proteína que media la adhesión célula-célula y reduce la capacidad invasiva de las células tumorigénicas (14). Estos resultados sugieren que ZO-1 puede reducir la habilidad metastásica de cierto tipo de células de cáncer de mama en respuesta a la señalización de factores de crecimiento, lo que sugiere que las proteínas de andamiaje localizadas en las uniones estrechas tienen efectos potenciales como

supresores de tumores en células ductales de la glándula mamaria.

El tercer componente del grupo de proteínas que conforman a las TJ son las proteínas de señalización, que pueden estar relacionadas en el ensamble de las uniones, además funcionan como moléculas de señalización intracelular y como factores de transcripción de diferentes genes como es el caso de β -catenina y ZONAB (factor de transcripción asociado a ZO-1); este último es un componente clave en las TJ, pertenece a un grupo de factores de transcripción que contienen un dominio central de choque térmico, seguido de un dominio rico en residuos de arginina y prolina, se une a ciertos promotores a través del dominio de unión a cajas Y. Se le ha relacionado con la organización de la transducción de señales de genes relacionados con procesos cancerosos, regula la proliferación e incrementa la densidad de células epiteliales (15).

TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMA (TEM)

Durante la cascada de eventos que preceden al desarrollo de la metástasis, el primer proceso es la invasión, el cual es el menos conocido y estudiado. Ésta ocurre por el movimiento de algunas células malignas desde el cúmulo de células donde se originó el tumor, hacia los tejidos circundantes y queda implícita las capacidades de pérdida de la adhesión celular, inhibición de la apoptosis al salir del epitelio, mayor proliferación celular y adquisición de la capacidad de migrar (16). Es importante recordar que los carcinomas mamarios se originan principalmente de células epiteliales cohesivas, unidas entre sí por las TJ y AJ, e inicialmente están separadas del estroma por la matriz extracelular y la membrana basal, ésta última es una estructura especializada que proporciona el soporte adecuado para realizar las funciones y le brinda la estabilidad al epitelio. Para que las células neoplásicas puedan acceder al compartimiento del estroma y convertirse en invasivas, tienen que superar la restricción física generada por la adhesión entre las células y con la membrana basal (17).

A pesar de la importancia clínica que representa comprender los mecanismos de la progresión hacia metástasis, aún no es claro cómo las células del carcinoma realizan la invasión, ni cómo se lleva a cabo el primer evento responsable de iniciar dicho proceso. Cada vez existen más evidencias de que el desprendimiento de células cancerosas conlleva su invasión, preferentemente el estroma, en lugar de salir al lumen de los conductos mediante el proceso de TEM, el cual permite a las células epiteliales fijas convertirse en células móviles, cambiando su fenotipo epitelial por uno semejante al del tejido

mesenquimal, lo cual le permitirá llegar a otros tejidos. Las células que experimentan el proceso de TEM pierden las propiedades epiteliales características, tales como la adhesión con otras células y la polaridad apical/basolateral, adquiriendo mayor capacidad para migrar e invadir, ya que secretan enzimas que hidrolizan las proteínas de la matriz extracelular de la membrana basal, propiedad característica de los tejidos mesenquimales. Molecularmente, el proceso de TEM se asocia con la pérdida de expresión y cambios en la localización de las proteínas implicadas en la formación de las uniones estrechas y adherentes, principalmente E cadherina, ZO-1, ocludina y claudinas, así como el incremento en la expresión de proteínas del mesénquima, como la proteína específica de fibroblastos 1 (FSP-1, por sus siglas en inglés de Fibroblast-Specific Protein-1), fibronectina, y las integrinas. El proceso de TEM también se asocia con cambios en la expresión de filamentos intermedios, queratinas, vimentina y la pérdida de expresión de E-cadherina, como un acontecimiento frecuente durante la progresión del cáncer de mama (18).

Si bien la TEM por sí misma no es suficiente para inducir espontáneamente a una célula neoplásica a que realice metástasis, es considerada como un interruptor que permite a estas células, no invasivas, adquirir capacidades de infiltración en tejidos circundantes que podrían generar metástasis, ya que si múltiples células activan la TEM, algunas de ellas pueden sobre expresar genes asociados con la proliferación celular e inactivar aquellos que permiten que las células que se desprenden de un epitelio activen la muerte celular por apoptosis, amplificando las posibilidades de progresión del tumor y, por consecuencia, la metástasis (19).

METÁSTASIS

En el cáncer de mama, la metástasis es un proceso muy complejo que implica la desregulación de la interacción entre proteínas y genes que son responsables de la invasión, la angiogénesis (de la que se hablará mas adelante), y la intravasación de las células cancerosas en los vasos sanguíneos o linfáticos, la colonización a sitios secundarios de otro órgano, principalmente pulmón, cerebro y hueso, junto con la evasión de los sistemas de defensa del organismo. La diseminación a través del sistema linfático y, en menor medida el vascular, es previa a la etapa final de esta enfermedad, que hasta la aparición de metástasis se desarrolla en un lapso de entre 5 y 20 años. Por tal motivo, la detección de las células que se encuentran en transición de precancerosas a

carcinoma invasivo y metastático, es un objetivo importante para detener el cáncer de mama y, en general de cualquier tipo de cáncer; por lo que es necesario identificar nuevos blancos moleculares que estén asociados con la adquisición de la propiedad invasiva de las células, sin que se haya presentado la metástasis.

Cuando un tumor primario crece, necesita un suministro de sangre, que transporta oxígeno y nutrientes para apoyar sus necesidades metabólicas y lograr desarrollarse, por lo que es necesaria la generación de nuevos vasos sanguíneos, a partir de los existentes, a este proceso se le conoce como angiogénesis. Es importante mencionar que los nuevos vasos sanguíneos formados, también pueden proporcionar una ruta de escape por la cual las células pueden dejar el tumor y entrar en el sistema circulatorio (intravasación). Otra forma por la cual las células tumorales pueden pasar al sistema circulatorio, de manera indirecta, es a través del sistema linfático. Las células tumorales individuales o agregadas necesitan sobrevivir en la circulación después de haber entrado en ella, por lo que deben evadir diferentes mecanismos de la respuesta inmune (por ejemplo, la acción de linfocitos T y B, neutrófilos, macrófagos y células asesinas (NK; por sus siglas en Inglés de "Natural Killer") o el sistema de complemento), así como sortear el ambiente vascular, entre turbulencias y la disminución del calibre de los vasos. El flujo sanguíneo o linfático arrastra a las células metastásicas pasivamente hacia órganos y tejidos distantes, donde deben salir (extravasación) para que puedan adherirse y establecerse para formar más lesiones (cáncer secundario). Una vez en el nuevo sitio a colonizar, las células deben iniciar y mantener la proliferación para formar micrometástasis, este crecimiento también debe mantenerse mediante el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos para formar un tumor macroscópico (20).

Un tumor se considera como maligno cuando hay metástasis y las células presentan fenotipos más resistentes y agresivos que las del tumor primario; en éste último la proliferación sostenida no es la característica primordial, ya que el crecimiento por sí solo no implica que una neoplasia pueda llegar a ser maligna. La verdadera amenaza del tumor maligno es el comportamiento de las células, su propensión a infiltrar y usurpar la estabilidad de las células del órgano o tejido al cual invade (21). El crecimiento celular por sí mismo no causa metástasis, se necesitan mutaciones genéticas adicionales que induzcan tanto la proliferación descontrolada como la pérdida de las uniones intercelulares.

Los genes que son necesarios para la remodela-

ción vascular del tumor primario también pueden propiciar el ambiente metastático. Se han reconocido cerca de 18 genes derivados de células de cáncer de mama que favorecen la diseminación hacia los pulmones, entre los que se encuentran la heparanasa, epiregulina (EREG), la ciclooxigenasa 2 (COX-2), el gen supresor de tumores de cáncer de mama de inicio temprano 1 y 2 (BRCA1/2, por sus siglas en inglés de BReast CAncer), el receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER2, por sus siglas en inglés de human EGF receptor), el del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR, por sus siglas en inglés de vascular epidermal growth receptor) y la metaloproteínasa de matriz-1 (MMP-1). Los productos de estos genes cooperan tanto en la remodelación de la red vascular en sitios donde se establece un tumor en el tejido mamario, como en la metástasis hacia el pulmón. Estas proteínas permiten la neoangiogénesis e intravasación de células cancerosas de la mama; además, en el pulmón median la extravasación de células cancerosas circulantes a los capilares del parénquima (22).

Los defectos genéticos en el cáncer de mama se traducen en alteraciones proteómicas en las vías de transducción de señales, resultando en trastornos que conllevan a un persistente estado patológico de comunicación entre las células tumorales, en donde las células que son capaces de invadir exitosamente y generar metástasis son seleccionadas debido a la progresión genética somática, lo que resulta en un circuito de comunicación alterada que conlleva a una fuerte inducción de la invasión y la supervivencia (23).

UNIONES ESTRECHAS E IMPLICACIONES MOLECULARES EN EL PROCESO DE TUMORIGÉNESIS DE LA GLANDULA MAMARIA

Diversas evidencias sugieren que las TJ son una plataforma para el inicio de la señalización intracelular coordinada que desencadenará el proceso de metástasis (24); sin embargo, no se sabe con precisión cómo es que la activación de las vías de señalización a través de algunos de los componentes intracelulares de las TJ influyen en la morfogénesis en algunos procesos cancerosos, especialmente el inicio de la TEM. Recientemente se ha descrito que algunos componentes de las TJ pueden actuar como factores de transcripción tanto en células no cancerosas como cancerosas, funcionando como reguladores multifuncionales de la expresión génica, especialmente se ha propuesto que presenta actividad promotora de la proliferación celular. El caso mejor documentado es el componente de las TJ con actividad de factor de transcripción ZONAB,

en el cual se demostró por primera vez su capacidad de modular la proliferación de la línea celular MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), del epitelio de riñón de perro. Uno de los mecanismos propuestos es la unión de ZONAB con la cinasa dependiente de la ciclina 4 (CDK4), ocasionando su secuestro en el citoplasma y, por consiguiente, la incapacidad de entrar al núcleo. La localización de CDK4 es una de las vías por las cuales ZONAB puede regular la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular. También se ha demostrado que la ciclina D1 activa tanto a la CDK4, como a la CDK6, por lo tanto promueve la transición de la fase G1/S y ZONAB por su parte también se une a CDK4, lo que sugiere que la translocación nuclear del complejo de ZONAB/CDK4 resulta en la regulación positiva de la expresión de la ciclina D1 y por tanto, una mayor estimulación de la cinasa (25).

Otro mecanismo es a través de su interacción con el coactivador ZO-1, lo cual se lleva a cabo a través de la interacción de sus dominios SH2. Se han reportado evidencias de que el complejo ZO-1/ZONAB estimula la progresión del ciclo celular en el mismo punto de transición G1/S, especialmente en células epiteliales, mediante la activación transcripcional de proteínas reguladoras del ciclo celular. Además, algunos experimentos (26) sugieren que la sobreexpresión de ZONAB induce la síntesis de varios componentes que participan en la replicación (p. ej. la proteína RFC 40 y otros factores que permiten la replicación), en la remodelación de la cromatina (p. ej. la histona H4 y grupos de proteínas de alto peso molecular, con grupos de alta movilidad; HMG-I) o el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), el cual además de ser un factor esencial de la replicación, participa en mecanismo de reparación del DNA en células eucariontes. Recientemente se ha demostrado que ZONAB se une al promotor de PCNA en una región identificada entre los sitios de unión de p53 y E2F, demostrando que ZONAB puede modular positiva o negativamente la expresión de PCNA (25).

La regulación de la expresión transcripcional inducida por ZONAB sugiere que las TJ pueden generar entrecruzamiento de señales ("cross talk") con las provenientes de la matriz extracelular y de las vías de adhesión celular para regular su proliferación. Otro ejemplo de ello es la forma en que actúa el complejo ZONAB/ZO-1 en la regulación de la expresión del oncogén HER-2, donde el mecanismo propuesto establece que la proteína ZO-1 no cuenta con dominios de unión al DNA, por lo que tiene que interaccionar con la proteína ZONAB, la cual se une directamente al DNA por medio de motivos con dedos de zinc presentes en esta proteína, induciendo la transcripción de HER-

2, el cual activa la proliferación y diferenciación celular. La sobre expresión del oncogen HER-2 tiene un papel determinante en algunos tipos de cáncer de mama, ya que su expresión está alterada en algunos tipos de tumores de origen epidérmico.

Existen dos tipos de receptores que tiene gran importancia en los mecanismos de TEM inducidos por componentes de las TJ. El primero es el receptor HER-2, que es parte de la familia de receptores con actividad de cinasa de tirosinas (RTK), junto con EGFR/ERBB1 (HER1), HER3 y HER4. El ligando de HER1 es el factor de crecimiento epidérmico (EGF), mientras que no se conoce un ligando para HER2. Para que estos receptores puedan ser activados deben formar homodímeros o heterodímeros entre algunos de los cuatro miembros de la familia, lo que induce la activación del dominio de cinasa de tirosinas del receptor complementario. Este dominio fosforilado sirve como sitio de reclutamiento para un grupo de proteínas que permiten la activación de la vía del inositol trifosfato (IP₃) o la vía de la proteína cinasa en serina/treonina (AKT). El receptor HER2 ha sido ampliamente estudiado por su importancia en el cáncer de mama y como blanco terapéutico, inclusive se han diseñado algunos inhibidores (trastuzumab, lapatinib) que actualmente están siendo utilizados en la clínica, pero con ciertas limitantes debido a su alto costo (26).

El otro tipo de receptor de gran importancia en el cáncer de mama es el de estrógenos, que en realidad son dos diferentes proteínas, el receptor de estrógenos alfa (RE α) y el beta (RE β). Ambos pertenece a una superfamilia de receptores nucleares (NR) que actúan como factores de transcripción en forma dependiente de su unión a ligando e inclusive en ausencia de éste (27). La unión con el estradiol favorece la fosforilación del receptor, alterando su conformación e induciendo su entrada al núcleo y la dimerización para activar la transcripción de genes blanco, lo que a su vez genera aumento de la proliferación en las células normales y cancerosas. Recientemente se ha demostrado que los estrógenos pueden actuar por mecanismos no genómicos, por lo que sus efectos pueden observarse en tiempos cortos, desde segundos hasta minutos. Se ha demostrado la existencia de receptores que existen dentro de las balsas caveolares en la membrana plasmática de las células del endotelio ductal de la mama. El receptor de estrógenos de membrana físicamente se asocia con otras proteínas de andamiaje, como caveolina 1 y una amplia variedad de moléculas proximales de señalización, incluyendo las proteínas G monoméricas, Src, Ras y B-Raf. Esto resulta en la activación de cascadas de señalización que activan a la fosfolipasa C (PLC), la

proteína cinasa C (PKC), la cinasa ERK, la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) y la enzima óxido nítrico sintasa (NOS); toda esta amplia gama de efectos muestra las posibles vías por cuales los estrógenos pueden favorecer al proceso canceroso a través de mecanismos totalmente diferentes a los canónicos, inducidos por las hormonas esteroides (28).

Es importante destacar que el RE puede generar un entrecruzamiento de señales con HER-2 en dos direcciones, una de ellas es vía ERK1/2 que es activada por las proteínas cinasas de activación mitogénica (MAPK), que a su vez son activadas por la señalización de HER-2 que es fosforilado por RE (Fig. 3).

El receptor HER-2 se puede activar por diversos mecanismos incluyendo la mutación, la sobreexpresión y la producción autocrina o paracrina del factor de crecimiento epidermal (EGF) o alguno de los miembros de la familia de ligandos. La activación autocrina se puede generar a través del RE y la interacción con su respectivo ligando (E₂), el cual genera que las metaloproteinasas de la membrana plasmática liberen un pro-EGF (proceso conocido como liberación del ectodominio). La activación del receptor HER-2 estimula numerosas vías de señalización a través del reclutamiento de diversas proteínas y la fosforilación de residuos específicos como se explicó antes. La vía de fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K)-AKT es estimulada a través del reclutamiento de la subunidad adaptadora p85 de PI3K al receptor. En consecuencia la proteína mTOR actúa como un sensor central de nutrientes y energía, además de ser también modulado por PI3K-AKT. Por otra parte, la activación de la vía de las MAPK depende del reclutamiento del receptor del factor de crecimiento y su unión con la proteína 2 (GRB2) o la interacción de SHC (proteína adaptadora que contiene dominios de homología con SRC) con el receptor. La cinasa SRC es activada por el receptor HER-2, Receptores acoplados a proteínas G (GPCR's) y por RE. Para la activación final río abajo de la cascada de señalización de efectores nucleares de HER-2 en células del tumor como el caso de p27, un inhibidor de las cinasas dependientes de ciclinas (CDK). Otro de los principales efectores nucleares activados por HER-2 es el transductor de señales y activador de la transcripción (STAT), un activador transcripcional de diferentes genes, que al ser fosforilado tiene la capacidad de llegar al núcleo de la célula e interactuar directamente con el DNA, en las regiones promotoras de genes blanco para activar funciones de sobrevivencia celular (29) (Fig. 3).

Por otra parte, los componentes de las TJ interactúan con diferentes moléculas de transducción de señales como las proteínas G, las proteínas

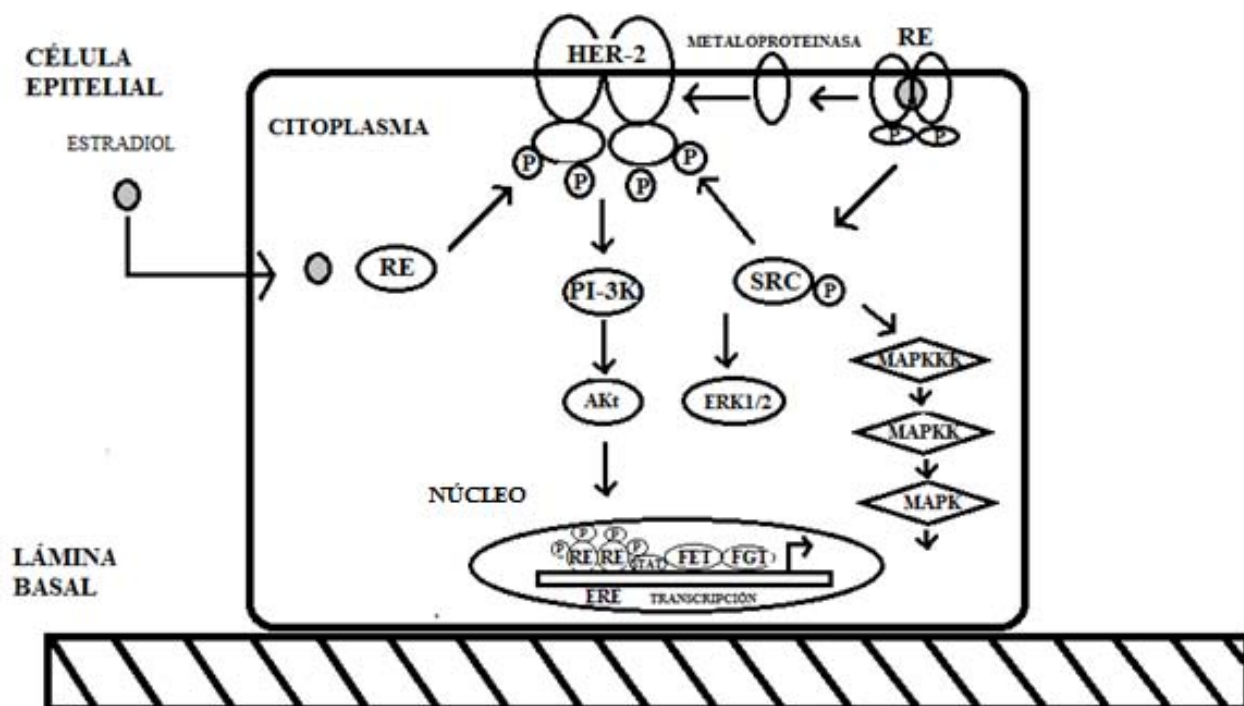


Figura 3. Entrecruzamiento de señales entre el RE y HER-2 que genera la activación de diferentes vías de señalización río abajo (PI-3K, ERK1/2 y MAPK) y que tienen como blanco final la activación de efectores transcripcionales para inducir la expresión de genes específicos.

cinastas, y en general con moléculas que regulan el crecimiento celular y la supervivencia. ZO-1 junto con sus proteínas homólogas ZO-2/-3, son miembros de las cinastas homólogas al guanilato asociado a la membrana MAGUKs, y en algunos sistemas, la pérdida de la función por mutación de las proteínas MAGUK conlleva a un fenotipo de crecimiento excesivo, lo que sugiere que estas proteínas participan en la señalización de las uniones célula a célula para regular la inhibición de crecimiento por contacto. Recientemente, se ha demostrado en cultivos confluentes que ZONAB interactúa directamente con un miembro de la familia Ras, RalA, lo cual conlleva a la activación transcripcional de promotores de genes blanco que normalmente eran reprimidos por ZONAB en células no confluentes (30).

Otro hecho interesante es el efecto de ciertas hormonas esteroides sobre las TJ y los procesos de señalización que se activan por efecto de ésta, tal es el caso del E₂, que puede inducir una amplia gama de efectos dependiendo del tipo celular y del tejido que se trate. E₂ puede actuar a través de dos posibles mecanismos, el primero es por la vía genómica tradicional, en donde el E₂ actúa como un ligando que se une al receptor respectivo generado dímeros, los cuales funcionan como

un factor de transcripción que regula la expresión de genes específicos. El efecto de esta vía usualmente toma horas o días para ser efectiva. El segundo mecanismo, es la vía no genómica y ocurre rápidamente a través de una serie de procesos de señalización: 1) activación del RE por la unión con E₂, 2) fosforilación de proteínas G asociadas al RE, 3) fosforilación de algunas cinastas asociadas a la membrana plasmática (Src, Ras, Rho, etc.) 4) fosforilación en residuo de tirosina por una tirosina cinasa en ZO-1 lo que culmina con la disociación del citoesqueleto y la redistribución del complejo de proteínas que componen las TJ, como una vía más asociada al proceso canceroso en una de las etapas previas a la metástasis (Fig. 4) (31).

CONCLUSIÓN

En resumen, las diferentes etapas y estadios de progresión del carcinoma mamario humano son ampliamente conocidos; sin embargo, poco se conoce sobre la cascada de eventos que implican la pérdida de la adhesión celular que anteceden a la transición epitelio mesénquima y que conlleva a la metástasis, en donde el papel de las uniones intercelulares, en especial las uniones estrechas son

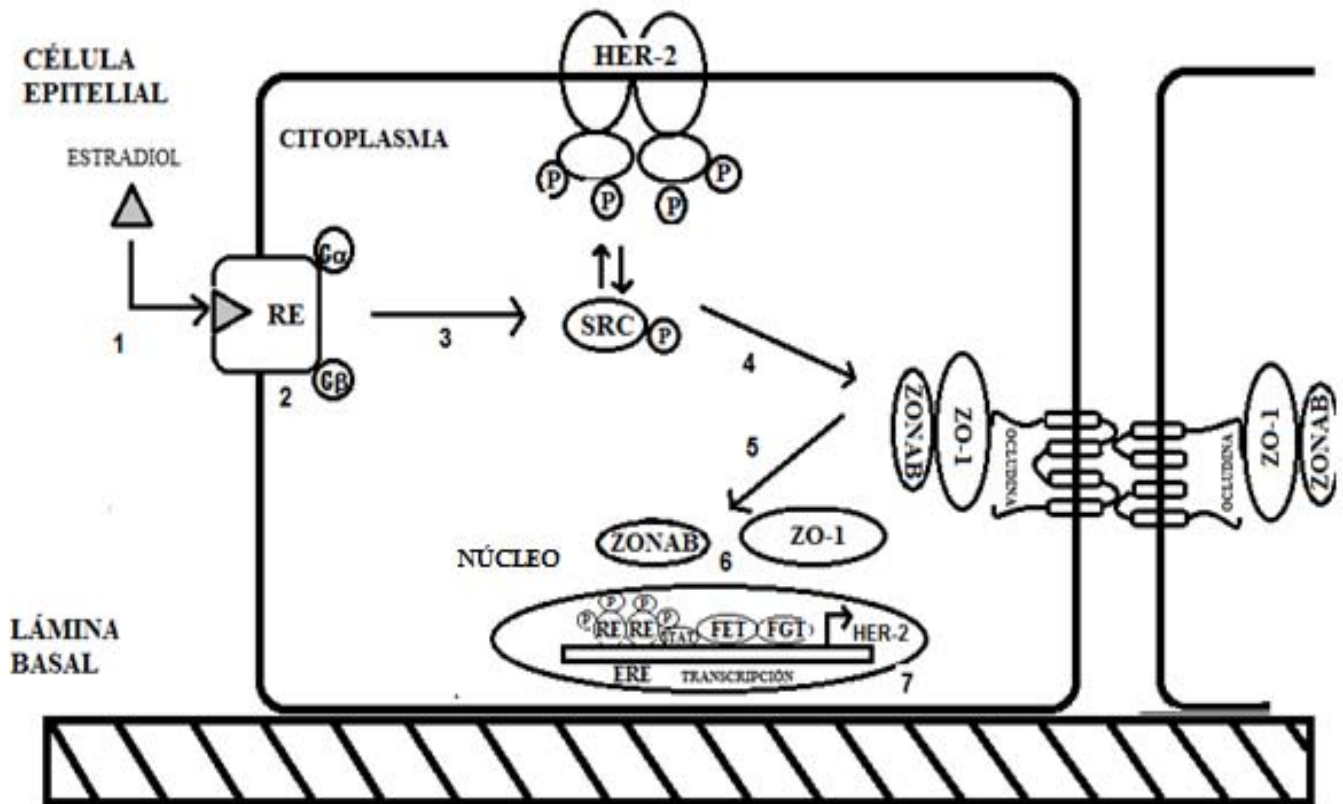



Figura 4. Representación del posible mecanismo por el cual E2 regula el desensamblaje del complejo ocluyente, induciendo la translocación al núcleo de ZO-1 y ZONAB para estimular la expresión de HER-2 en las células de cáncer de mama.

determinantes como posibles blancos terapéuticos. Estos hallazgos en conjunto nos llevarán a plantear y entender los mecanismos mediante los cuales las proteínas componentes de las uniones estrechas, en colaboración con algunas hormonas esteroides, sus respectivos receptores y algunos oncogenes promueven la metástasis de las células de cáncer de mama. Por lo que ahondar en el tema permitirá entender el proceso metastático y con el fin de plantear nuevos blancos terapéuticos para con-

trarrestar esta enfermedad en etapas tempranas, cuando las células cancerosas pierden las interacciones célula a célula.

Agradecimientos. Este trabajo fue parcialmente apoyado por el CONACYT, a través de la beca de estudios de doctorado para Javier Esteban Jiménez Salazar (212870) y al Programa de Posgrado en Biología Experimental, el cual pertenece al PNP. 

REFERENCIAS

1. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Estadística a propósito del día mundial contra el Cáncer 2010. México, DF: INEGI. www.inegi.gob.mx. http://www.who.int/mediacentre/events/annual/world_cancer_day/es/index.html
2. Lu WL, Jansen L, Post WJ, Bonnema J, Van de Velde JC, De Bock GH (2009) Impact on survival of early detection of isolated breast recurrences after the primary treatment for breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 114:403-412.
3. Solej M, Ferronato M, Nano M (2005) Locally advanced breast cancer in the elderly: curettage mastectomy. *Tumori* 4:321-324.
4. Mareel M, Leroy A (2003) Clinical, cellular,

- and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev* 83:337-376.
5. Takai Y, Miyoshi J, Ikeda W, Ogita H (2008) Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:603-615.
 6. Liu Y, Dean DC (2010) Tumor initiation via loss of cell contact inhibition versus Ras mutation: do all roads lead to EMT? *Cell Cycle* 9:897-900.
 7. Johnson PF (2005) Molecular stop signs: regulation of cell-cycle arrest by C/EBP transcription factors. *J Cell Sci* 118:2545-2555.
 8. Mareel M. and Leroy A (2003) Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev* 83:337-376.
 9. Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG (2008) The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci* 121:2115-2122.
 10. González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE (2003) Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 1:1-44.
 11. Itoh M, Bissell MJ (2003) The Organization of Tight Junctions in Epithelia: Implications for Mammary Gland Biology and Breast Tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4:449-462.
 12. Balda MS, Matter K (2008) Tight junctions at a glance. *J Cell Sci* 22: 3677-3682.
 13. Balda MS, Anderson JM (1993) Two classes of tight junctions are revealed by ZO-1 isoforms. *Am J Physiol* 264:C918-924.
 14. Mauro L, Bartucci M, Morelli C, Ando S, Surmacz E (2001) IGF-I receptor-induced cell-cell adhesion of MCF-7 breast cancer cells requires the expression of junction protein ZO-1. *J Biol Chem* 276:39892-39897.
 15. Tracey A, Martin, Tapas Das, Robert E. Mansel, Wen G. Jiang (2007) Enhanced Tight Junction Function in Human Breast Cancer Cells by Antioxidant, Selenium and Polyunsaturated Lipid. *J Cell Biochem* 101:155-166.
 16. Christofori G (2006) New signals from the invasive front. *Nature* 441:444-450.
 17. Feroni C, Brogini M, Generali D, Damia G (2012) Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: Role, molecular mechanisms and clinical impact. *Cancer Treat Rev* 38:689-697.
 18. Thiery JP, Sleeman JP (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:131-142.
 19. Lou Y, Preobrazhenska O, auf dem Keller U, Sutcliffe M, Barclay L, McDonald PC, Roskelley C, Overall CM, Dedhar S (2008) Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is not sufficient for spontaneous murine breast cancer metastasis. *Dev Dyn* 237:2755-2768.
 20. MacDonald IC, Groom AC, Chambers AF (2002) Cancer spread and micrometastasis development: quantitative approaches for in vivo models. *Bioessays* 10:885-893.
 21. Mego M, Mani SA, Cristofanilli M (2010) Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer--clinical applications. *Nat Rev Clin Oncol* 7:693-701.
 22. Chiang AC, Massagué J (2008) Molecular basis of metastasis. *Engl J Med* Dec 26:2814-2823.
 23. Pierobon M, Geho D, Belluco C, Liotta LA (2007) Invasion and Metastasis. *The Cancer Handbook* 2:2-10.
 24. Martin TA, Mason MD, Jiang WG (2011) Tight junctions in cancer metastasis. *Front Biosci* 16:898-936
 25. Sourisseau T, Georgiadis A, Tsapara A, Ali RR, Pestell R, Matter K, Balda MS (2006) Regulation of PCNA and cyclin D1 expression and epithelial morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA. *Mol Cell Biol* 6:2387-2398.
 26. Lima WR, Parreira KS, Devuyst O, Caplanusi A, N'kuli F, Marien B, Van Der Smissen P, Alves PM, Verroust P, Christensen EI, Terzi F, Matter K, Balda MS, Pierreux CE, Courtoy PJ. (2010) ZONAB promotes proliferation and represses differentiation of proximal tubule epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 3:478-488.
 27. Hynes NE, Lane HA (2005) ERBB Receptors and cancer: The complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev* 5:341-354.
 28. Noriega-Reyes Y, McCarron L (2008) Correguladores del Receptor de Estrógenos y su Implicación en el Cáncer Mamario. *Cancerología* 3:29-40.
 29. Razandi M, Oh P, Pedram A, Schnitzer J, Levin ER (2002) ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol Endocrinol* 1:100-115.
 30. Ellis MJ, Ma C (2007) Letrozole in the neoadjuvant setting: the P024 trial. *Breast Cancer Res Treat* 1:33-43.
 31. González-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D (2008) Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 3:729-756.
 32. Radhakrishna K, Shyamali B, Vijay U, Karnaky J, Gupta Akshay (2002) Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem J* 368:471-481.