

# Alteración de la integridad de las uniones estrechas en el desarrollo del cáncer. El papel de las claudinas

Verónica E Zavala-Zendejas,\* Erika P Rendón-Huerta\*

## RESUMEN

Las uniones estrechas (UE) restringen la difusión de solutos por el espacio paracelular confiriendo la propiedad de barrera a los epitelios y endotelios. La pérdida de la función normal de las UE es un paso importante en la progresión del cáncer, ya que se compromete la compartimentalización creada por los epitelios, modificando el microambiente de dichos tejidos. La función de las UE se encuentra comprometida por cambios en la expresión y/o localización de las claudinas, las proteínas transmembranales que constituyen los principales elementos estructurales de dichas uniones. Sin embargo, las alteraciones en la expresión de las claudinas en el cáncer parecen influir en otros procesos importantes para la progresión tumoral y no sólo en la modificación de la homeostasis en los tejidos. El presente trabajo da una idea general del papel que juegan estas proteínas en algunas de las etapas de dicha progresión, los mecanismos involucrados en la regulación de su expresión y localización y su posible uso para el diagnóstico y terapia en diferentes tipos de cáncer.

**Palabras clave:** Uniones estrechas, claudinas, progresión tumoral, cáncer.

## ABSTRACT

*Tight junctions (TJ) are important elements of the cell junctional complexes that restrict solute diffusion along the paracellular space conferring barrier properties to epithelia and endothelia. Loss of normal TJ function is an important step for cancer progression, since epithelial compartmentalization is compromised and tissue microenvironment is modified. Changes in the expression and/or localization of the transmembrane proteins that are the backbone of TJ, the claudins, alter the function of these junctions. The abnormal expression of claudins in several human cancers seem to have an important role in several steps of cancer progression and not only in the tissue homeostasis disruption. The current work gives a general idea of the role of these proteins in some steps of tumor progression, the mechanisms responsible for the regulation of their expression and localization and their use as promising targets for cancer diagnosis and therapy.*

**Key words:** Tight junctions, claudins, tumor progression, cancer.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las enfermedades crónico-degenerativas que más afecta a los seres humanos. Debido a las diferencias que dan origen a cada tipo de cáncer y a la variación de los pasos que dan lugar a las alteraciones celulares durante la transformación progresi-

va de los tumores, es que el diagnóstico y el tratamiento de estos padecimientos es hasta la fecha un reto para los investigadores en esta área.

Aproximadamente el 90% de los tumores son de origen epitelial, y son precisamente los epitelios los responsables de la compartimentalización de los fluidos y del mantenimiento de la polaridad en los orga-

\* Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.

### Abreviaturas:

Cldn: claudina, ECM: matriz extracelular, ECP: enterotoxina de *Clostridium perfringens*, EMT: transición epitelio-mesénquima, GF: Factores de crecimiento, GFR: Receptores de factores de crecimiento, TJ: Tight junctions, UA: Uniones adherentes, UC: Uniones comunicantes UE: Uniones estrechas, ZO: Zonula occludens

### Correspondencia:

Dra. Erika P. Rendón-Huerta. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad Núm. 3000, Copilco Universidad, 04510, México, D.F. Fax. 56 16 24 19, E-mail: erendon@bq.unam.mx

Recibido: 07-06-2007

Aceptado: 21-12-2007

nismos. Durante la transformación celular, las estructuras responsables de mantener la función de barrera en los epitelios se alteran, perdiendo su capacidad de restringir el paso de algunas moléculas a través de la vía paracelular, proceso que juega un papel muy importante durante la progresión tumoral.

El presente trabajo se enfoca a describir el papel que tienen las claudinas (cldn), una familia de proteínas que constituye a las uniones estrechas (UE) y cuya función es importante en el mantenimiento de las funciones de barrera y de polaridad celular de los epitelios. Así mismo, se hace mención del papel que juegan estas proteínas durante la progresión tumoral, desde el punto de vista de sus niveles de expresión y de los cambios en la localización subcelular de las mismas, así como de sus posibles usos como herramientas en el diagnóstico y tratamiento de diferentes tipos de cáncer.

## Epitelios y uniones estrechas

La función principal de los epitelios es separar diferentes compartimentos en un mismo organismo y regular el paso de diferentes sustancias entre ellos mediante mecanismos de transporte transcelular asimétricos, que se dan gracias a la presencia de bombas y canales membranales y por otro lado, mediante el transporte paracelular por medio del cual se regula la difusión de iones y pequeñas moléculas no cargadas a través de los espacios intercelulares.<sup>1</sup> Mientras que el transporte transcelular es dependiente de energía y se encuentra representado por una serie de transportadores y canales específicos para cada tipo celular localizados en las membranas apicales y basolaterales de las células, el transporte paracelular es pasivo y es el resultado de la difusión, electrodifusión u ósmosis de moléculas a través de gradientes creados por los mecanismos transcelulares. De esta manera, estos dos tipos de transporte permiten que los epitelios funcionen como barreras permeables, capaces de crear gradientes eléctricos y de concentración de moléculas entre los fluidos lumbales y serosos.<sup>1,2</sup>

La ruta paracelular no muestra discriminación en cuanto a la dirección del transporte, sin embargo, muestra pequeñas diferencias en cuanto a la selectividad iónica y cambia enormemente en términos de la resistencia eléctrica entre epitelios.<sup>3</sup>

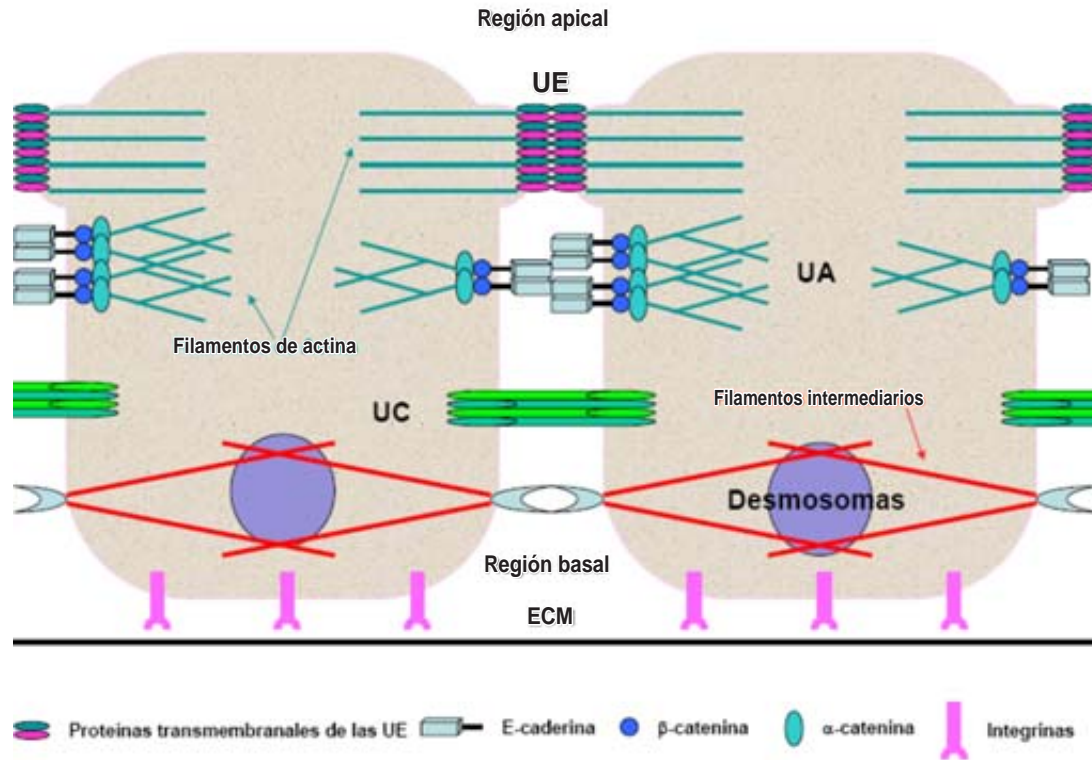
El complejo de unión celular de los epitelios polarizados es una estructura altamente desarrollada formada por varias subunidades bien definidas, incluyendo a las uniones comunicantes (UC), los desmosomas,

las uniones adherentes (UA) y las uniones estrechas (Figura 1).<sup>4</sup>

Las UC median la comunicación entre las células permitiendo el paso de iones y pequeñas moléculas de hasta 1,000 Da de citoplasma a citoplasma de células vecinas, dando lugar al acoplamiento metabólico y eléctrico entre ellas.<sup>5</sup> Las UA y los desmosomas son los responsables de proporcionar la adhesión mecánica a las células. Los desmosomas son sitios de anclaje para filamentos intermedios y puntos de contacto que fijan a células adyacentes por medio de sus membranas laterales y a las células con la matriz extracelular por medio de sus membranas basales. Las UA forman un "cinturón de adhesión continuo" que sirve para mantener juntas a las células vecinas a través de una familia de moléculas de adhesión dependientes de  $Ca^{2+}$ , las caderinas, que se unen a filamentos de actina y miosina. Las UE son el componente más apical del complejo de uniones intercelulares y funciona como una barrera que separa a los dominios apicales y basolaterales y tiene un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis y la polaridad en los tejidos.<sup>6</sup>

Las UE rodean la región apical de la superficie lateral de células epiteliales adyacentes, creando un sellado paracelular continuo entre los compartimentos apical y basolateral. Forman la principal barrera de difusión de moléculas hidrosolubles entre células adyacentes y mantienen la polaridad celular, impidiendo la difusión de proteínas y lípidos entre los dominios apicales y basolaterales de la membrana plasmática, lo que genera diferentes microambientes en la membrana apical y basal de las células.<sup>7-9</sup> Cuando se visualizan por medio de microscopía electrónica de secciones ultrafinas, las UE aparecen como una serie de sitios de fusión de la membrana plasmática de células adyacentes, mientras que por criofractura, aparecen como una red de fibras de partículas de membrana que rodean la región apical de la superficie lateral de cada célula.<sup>3,7,10</sup>

Las UE se encuentran formadas por más de 40 diferentes moléculas, entre las que se encuentran: 1) proteínas citosólicas; que pueden servir como proteínas estructurales o de anclaje, como las zonula ocludens-1 (ZO-1), ZO-2, ZO-3; 2) proteínas de regulación del tráfico vesicular, involucradas en la señalización y la polaridad celular e incluso en la regulación de la expresión génica; y 3) proteínas transmembranales, como las claudinas, ocludina y las JAM. Estas proteínas interactúan con proteínas pertenecientes a su misma familia presentes en la membrana de la célula adyacente formando canales



**Figura 1. Estructura del complejo de unión celular.** Las uniones célula-célula están formadas por desmosomas, que le dan fuerza adhesiva a las membranas basolaterales de las células y proveen de sitios de anclaje para filamentos intermedios; las uniones comunicantes (UC), que forman canales entre células adyacentes permitiendo la comunicación entre ellas; las uniones adherentes (UA), que le dan fuerza mecánica a las células al estar unidas al citoesqueleto de actina; y las uniones estrechas (UE), que crean sellos en la región más apical de la membrana lateral de las células. Figura modificada de (4).

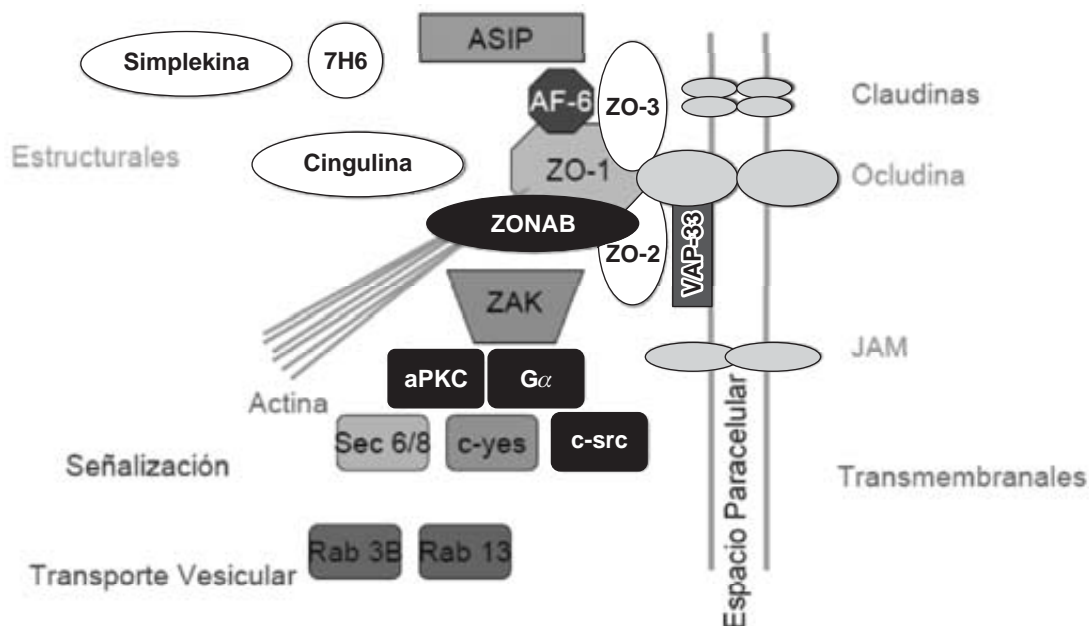
paracelulares capaces de discriminar el paso de moléculas de acuerdo a su tamaño y carga<sup>10-13</sup> (Figura 2).

## Claudinas

Las proteínas pertenecientes a la familia de las claudinas son los principales componentes de las UE. A la fecha se han identificado 24 miembros en mamíferos cuyo peso molecular varía de 17 a 27 kDa. El patrón de expresión de las claudinas es específico de cada tejido, lo que contribuye, junto con el perfil de interacciones homotípicas o heterotípicas entre dichas proteínas, a las funciones especializadas en los tejidos epiteliales y endoteliales.<sup>14,15</sup>

Se predice que las claudinas cruzan cuatro veces la membrana plasmática, dejando expuestas dos asas en la región extracelular, la primera importante para la selectividad de cargas en el flujo paracelular y como correceptor viral (como en el caso de la claudina 1 y el virus de hepatitis C),<sup>16</sup> y la segunda

como receptor de toxinas bacterianas (como la enterotoxina de *Clostridium perfringens* para las claudinas 3, 4).<sup>9</sup> Sus regiones amino (N-terminal) y carboxilo terminal (C-terminal) se encuentran expuestos al citosol, siendo el C-terminal importante para determinar la localización de estas proteínas. La región C-terminal se encuentra ampliamente conservada en los integrantes de esta familia, y contiene sitios de unión a PDZ, con los cuales pueden interactuar con otras proteínas de las UE que contienen dominios PDZ, como las ZO, PATJ y MUPP1, involucradas en procesos de señalización.<sup>11</sup> La región C-terminal de las claudinas puede ser fosforilada en residuos de serina y/o treonina, regulando su interacción con otras proteínas, su localización y su vida media. Los cambios en la fosforilación de las claudinas se han asociado con cambios en la permeabilidad paracelular y resistencia transepitelial de las células (medidas empleadas para evaluar la función de las UE).<sup>6,11,12</sup>



**Figura 2. Composición de las UE.** Representación esquemática de las proteínas que conforman a las UE y la manera en la que éstas interactúan. En el dibujo se indican las proteínas transmembranales , proteínas estructurales de las UE , que se encargan de anclar a las proteínas transmembranales a los filamentos de actina; proteínas de señalización , que regulan el ensamblaje de estos complejos; y proteínas involucradas en el tráfico vesicular . Figura modificada de (10, 13).

### Expresión de claudinas y cáncer

Los cambios en la expresión de diferentes claudinas, ya sea su aumento o disminución, se han asociado con varios tipos de tumores, desde cáncer de mama hasta cáncer de colon (*Cuadro I*). Sin embargo, debido a que en la mayoría de los estudios realizados se reportan cambios en la expresión de estas proteínas a nivel de ARNm, es difícil saber si la localización subcelular de las mismas se ve modificada y/o si dichos cambios alteran el número de contactos celulares presentes con respecto a los tejidos normales.<sup>17-21</sup>

### ¿Cuáles son los mecanismos que regulan la expresión y la localización de las claudinas?

Durante el desarrollo del cáncer ocurren cambios en los niveles de expresión de determinadas claudinas y en su localización subcelular, por lo que los mecanismos de regulación transcripcional y modificación posttraduccional de estas proteínas deben de resultar alterados.

La actividad de las UE se regula por varias vías de señalización (*Cuadro II*). Debido a que las claudinas interactúan con una serie de proteínas de anclaje y de señalización citosólicas, la alteración de alguna de

estas proteínas puede afectar a la localización, función y expresión de las claudinas, tanto a nivel genético como proteico.<sup>22-38</sup>

La polimerización de las claudinas en las membranas laterales y su localización en la región más apical de los complejos de unión intercelular en vertebrados se encuentra regulada por las proteínas ZO-1 y ZO-2. El reclutamiento a la membrana plasmática y la dimerización de dichas ZO es indispensable para iniciar la polimerización de las claudinas e incluirlas en las UE.<sup>39,40</sup> Sin embargo, en algunos tipos celulares se ha encontrado que las claudinas se distribuyen también en otras regiones de la membrana lateral sin formar cadenas de UE,<sup>41</sup> por lo que debe haber otros mecanismos que regulen su localización.

Dentro de las modificaciones postraduccionales que pueden sufrir las claudinas se encuentran la fosforilación y la palmitoilación. Ambas afectan la localización de estas proteínas en la membrana plasmática, dando lugar a cambios en la permeabilidad paracelular. Las fosforilaciones de las claudinas pueden darse gracias a la acción directa o indirecta de varias cinasas, entre las que destacan la proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa C (PKC), la proteína Ras y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) dentro de las cuales se encuentran las cina-

**Cuadro I.** Expresión de claudinas en diferentes tipos de tumores.

Claudina	Neoplasia	Expresión	Localización	Referencia
Cldn-1	Colon	↑	Citoplasma	(14)
	Mama	↓	ND	(18)
	Esófago de Barrett	↓	ND	(14)
Cldn-3	Cérvix	↑	ND	(19)
	Ovario	↑	Membrana plasmática y citoplasma	(14)
	Próstata	↑	¿? Difuso	(14)
Cldn-4	Mama	↑	ND	(14)
	Ovario	↑	Membrana plasmática y citoplasma	(14)
	Páncreas	↑	Membrana plasmática	(14)
Cldn-6	Estómago	↓	ND	(18)
	Mama	↑	ND	(14)
	Próstata	↑	ND	(18)
Cldn-7	Glándula mamaria	↓	ND	(14)
	Cabeza y cuello	↓	ND	(14)
	Mama	↓	Membrana plasmática	(14)
Cldn-10	Esófago (fenotipo invasivo)	↓	Membrana plasmática	(20)
	Estómago	↑	ND	(21)
	Cérvix	↑	ND	(19)
Cldn-16	Hígado	↑	ND	(18)
	Tiroides	↑	ND	(18)
Cldn-23	Ovario	↑	ND	(18)
Cldn-23	Estómago	↓	ND	(3)
	Mama	↓	ND	(3)
	Páncreas	↓	ND	(3)

ND: No Determinado

**Cuadro II.** Efectos en la expresión de claudinas y función de las UE por distintos efectores.

Efector	Claudinas	Células/Tejido	Función	Mecanismo	Referencia
EGF	Cldn-2 ↓	MDCK II	TER ↑	MAPK/ERK1/2	(29)
	Cldn-1, -3, -4 ↑				
HGF	Cldn-2 ↓	MDCK II	TER ↑	MAPK/ERK1/2	(30)
	Cldn-2 ↑	MDCK I	TER ↓		
	Cldn-7 ↓	MCF-7, T47D	ND	Metilación del promotor	(31)
GATA-4 CDX2, HNF1 $\alpha$	Cldn-2 ↑	Caco-2 HIEC	Mantiene expresión	Transcripción	(32)
CDX2, HNF1 $\alpha$	Cldn-2 ↑	Caco-2	ND	Transcripción	(33)
HNF-4 $\alpha$	Cldn-6, -7 ↑	F9	Induce UE	—	(34)
Snail	Cldn-2, -4, -7 ↓	MDCK II	TER ↓	—	(35)
	Cldn-1 ↓	MDCK	ND	Traducción	(36, 37)
IL-1 $\beta$	Cldn-3, -4, -7 ↓	Eph4, CSG1	EMT	Transcripción	(38)
	Cldn-2 ↑	Hígado, hepatocitos	ND	MAPK, PI3K	(39)
IL-17	Cldn-1, -2 ↑	T84	TER ↑	MEK	(39)
Hipoxia	Cldn-3 ↑	HUVEC	ND	Transcripción	(40)
INF, TNF, IL-1 $\beta$	Cldn-1 ↑	Caco-2	TER ↓	—	(41)
INF, TNF	Cldn-1 ↑, Cldn-2 ↓	MDCK	Flujo moléculas ↑ y TER ↓	MEK 1, p38	(42)
AMPc	Internalización Cldn-1, -4	T84	TER ↓	—	(43)
	Fosforilación y Cldn-5 ↑	Células cerebrales endoteliales porcinas	TER ↑	PKA	(44)
TGF- $\beta$ 1	Cldn-1, -2 ↓	MDCK II	ND	ERK 1/2, PI3K, Snail	(45)

TER: Resistencia transepitelial

ND: No Determinado

sas ERK 1/2, que generalmente están activadas en varios tipos de cáncer.<sup>7,42</sup>

La función de barrera en las células endoteliales de pulmón requiere de la fosforilación de claudina 1 en el residuo de treonina 203. Esta fosforilación es mediada por la vía de las MAPK. Por otro lado, se ha observado que en células derivadas de cáncer de mama que expresan claudina 1 se altera la propiedad de invasión al bloquear la vía de MAPK a nivel de ERK 1/2 con inhibidores específicos.<sup>14</sup> Se ha reportado la fosforilación de claudina 1 por MAPK y PKC, así como la de claudina 5 por la proteína cinasa dependiente de AMPc. De la misma manera, se ha visto que la cinasa WNK4 fosforila a las claudinas 3 y 4 y disminuye la función de la UE.

Algunas citocinas y factores de crecimiento pueden alterar selectivamente a las UE impidiendo o fortaleciendo la función de barrera de los epitelios. El interferón gamma (INF- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) inducen la internalización de claudina 1, 4 y ocludina, así como la disminución de la expresión de ZO-1 y la redistribución de ZO-2, aumentando la permeabilidad paracelular de manera independiente a la cascada de señalización apoptótica inducida por citocinas en un modelo epitelial de intestino. Otras vías de señalización que regulan la función de las UE pueden regular también el destino y la función de las diferentes claudinas. AMPc por ejemplo, induce un aumento en los niveles de claudina 5, así como su fosforilación vía PKA y la disminución de claudina 1 en células endoteliales porcinas. El AMPc altera la organización de las UE aumentando la función de barrera de las mismas.<sup>8,14</sup> El factor de crecimiento epidérmico (EGF) también es capaz de regular de manera diferencial la localización de las claudinas 1, 2, 4 y 7 en células epiteliales MDCK, aumentando la cantidad de claudinas 4 y 7 en las UE y relocalizando en el citosol a las claudinas 1 y 2, sin modificar a otras proteínas de las UE como ocludina, ZO-1 y ZO-3.<sup>43</sup>

Los cambios observados a nivel transcripcional incluyen modificaciones epigenéticas, como alteraciones en el grado de metilación de ciertos genes. Tal es el caso del gen de la claudina-7 en líneas de cáncer de mama, en las cuales el promotor de dicho gen se hipermetila. Dicha hipermetilación se ve acompañada de la pérdida de contactos celulares después del tratamiento con el factor de crecimiento hepático (HGF).<sup>14</sup> El caso contrario se ha observado para el gen de claudina-4 en líneas celulares y carcinomas primarios de páncreas. En éstos, el gen de claudina-4 se encuentra hipometilado en comparación con tejidos y células

pancreáticas normales, lo que da lugar a la sobreexpresión del mismo.<sup>44</sup>

Algunos factores de transcripción han sido también identificados como reguladores de la expresión de varias claudinas, tal es el caso del factor nuclear de hepatocito 4 alfa (HNF-4 $\alpha$ ) el cual regula positivamente la expresión de claudinas 6 y 7. La región proximal del promotor de claudina 2 tiene sitios de unión a los factores de transcripción LEF-TCF y Cdx1, dichos sitios pueden ser activados por la vía clásica de WNT. SNAIL es otro factor de transcripción que inhibe la expresión de claudinas 1, 3, 4 y 7, así como de la ocludina, pero no de otros componentes de las UE, como ZO-1.<sup>45</sup> Este factor de transcripción es necesario en la fase temprana de la embriogénesis y en la regulación de la transición epitelio-mesénquima (EMT).<sup>14</sup>

### ¿Y qué tiene que ver esto con el cáncer?

Durante el desarrollo tumoral suceden cambios genéticos que le confieren ventajas de crecimiento a las células, dando lugar a la conversión de células normales a células cancerosas, en las que se pierde la diferenciación y la polaridad celular. Este tipo de ventajas incluyen la autorregulación o autosuficiencia de factores de crecimiento, insensibilidad a señales que inhiben el crecimiento celular, evasión de apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión de tejidos y metástasis.<sup>46</sup>

El proceso de adquisición del fenotipo invasivo de los tumores de origen epitelial se lleva a cabo mediante un proceso llamado EMT. Este proceso incluye dos etapas, en la primera se observa una disminución en la adhesión intercelular, lo que le permite a las células disociarse unas de otras; y en la segunda se produce un incremento en la motilidad celular, permitiendo su migración a tejidos conectivos. La adquisición de estas características se encuentra asociada a la pérdida total de la polaridad celular, pérdida de la diferenciación y alteración de la función de las UE.<sup>28</sup>

Las UE juegan un papel fundamental en procesos como la morfogénesis, polaridad, proliferación y diferenciación celular, los cuales requieren de la coordinación de señales que llegan o emanan de la membrana plasmática. La placa citosólica que compone a las UE, así como la ocludina, están involucradas en la coordinación de señales de regulación de la proliferación celular, modulando cascadas de señalización, como en las que participan Raf-1, RhoA y el receptor tipo I de TGF- $\beta$ , y reclutando factores de transcripción como ZONAB, el cual es secuestrado por ZO-1 y

ZO-2 regulando así a proteínas asociadas con la proliferación celular, como ciclina D1 y a reguladores del ciclo celular.<sup>12,47</sup> A este respecto, aunque a la fecha no se ha encontrado evidencia suficiente para indicar que las claudinas son capaces de propagar la señalización vía proteínas citoplásmicas adaptadoras, se cree que son capaces de regular de manera indirecta la proliferación ya que su C-terminal se une a proteínas ZO y esto podría alterar la interacción de estas últimas con el factor de transcripción ZONAB.<sup>14</sup>

### ¿De qué otra manera pueden influir los cambios en la expresión de claudinas en la progresión tumoral?

**Claudinas y señales de crecimiento:** Las células normales requieren de señales de crecimiento para entrar a un estado proliferativo. Estas señales se transmiten por la unión de moléculas de señalización, como los factores de crecimiento (GF) a receptores transmembranales. Varias células tumorales son capaces de generar sus propias señales de crecimiento, reduciendo así la dependencia de la estimulación del microambiente en el tejido normal, pero otro tipo de fenómenos pueden ser los responsables de mantener esta señal de proliferación activa.

Como resultado de la polaridad celular y de la función de barrera en los epitelios, los receptores para factores de crecimiento (GFR) se encuentran normalmente localizados en la superficie basolateral de la célula, en contacto con el flujo sanguíneo y fluidos intersticiales, mientras que los GF están compartimentalizados a muy altas concentraciones en fluidos lumenales de los tejidos epiteliales. De esta manera, los epitelios separan al ligante del receptor, regulando el paso de los GF por la vía transcelular e impidiendo la difusión de estas moléculas por la vía paracelular. Esto le permite al epitelio controlar los estímulos que pueden recibir las células que conforman a un tejido y por lo tanto, regular la proliferación celular del mismo. Si se debilitan las UE de manera crónica, los GF pueden tener acceso ininterrumpido a sus respectivos receptores por medio de la vía paracelular, manteniendo la señal de proliferación activa y permitiendo así el crecimiento continuo de las células<sup>1</sup> (Figura 3).

El debilitamiento de las UE se ha observado en varios tipos de neoplasias (de ovario, mama, hígado y colon) y en otros estadios precancerosos del tracto gastrointestinal (esófago de Barrett, enfermedad de Crohn, displasia gástrica, entre otros). Estos cambios en la función de barrera de los epitelios pre- o neoplásicos, se han atribuido principalmente a cam-

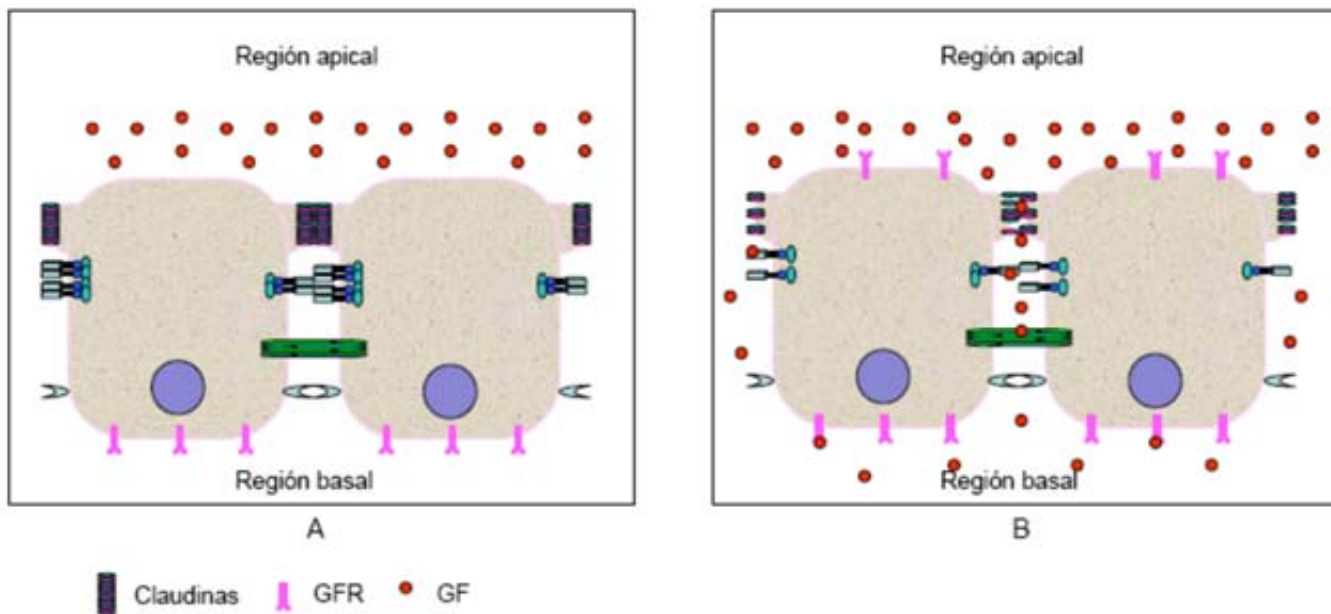
bios en el patrón y niveles de expresión de las claudinas, así como en localización subcelular de las mismas.

Aunado a esto, se ha observado que los GFR pueden empezar a localizarse en la superficie apical de la célula en el tejido epitelial transformado y tomar contacto con los fluidos lumenales y por lo tanto, con altas concentraciones de su ligante.<sup>1</sup> Estos cambios en la localización de los GFR pueden deberse no únicamente al aumento en la expresión del receptor en las células transformadas, sino también, a los cambios en las UE traducidos en diferencias en la expresión o localización de las claudinas (lo cual influiría en la función de otras proteínas involucradas en polaridad celular localizadas en las UE)<sup>48</sup> o por algún otro mecanismo desconocido hasta la fecha.

**Claudinas y evasión de apoptosis:** La vida de la mayoría de las células se mantiene principalmente por las señales de sobrevivencia generadas por las interacciones célula-matriz extracelular (ECM) y célula-célula. La pérdida de estas uniones en una célula normal da lugar a la muerte celular programada o apoptosis. Durante la apoptosis se activan una serie de proteasas, denominadas caspasas, que son importantes en los mecanismos que conllevan a la muerte celular mediante la destrucción de estructuras, organelos y genoma celular. La sobreexpresión de claudina 1 en células de cáncer colorrectal, así como de claudinas 3 y 4 en células de cáncer de ovario aumenta la sobrevivencia celular reduciendo la velocidad de la apoptosis, mientras que la reexpresión de claudina 1 en células de cáncer de mama da lugar a un aumento de la apoptosis en cultivos tridimensionales. Los mecanismos mediante los cuales las claudinas actúan para que dicho fenómeno suceda aún se desconocen.<sup>48</sup>

**Claudinas, invasividad de tejidos y metástasis:** Se sabe que durante la EMT la arquitectura de las UE desaparece, sin embargo, los mecanismos implicados en este proceso se encuentran aún en estudio.

Durante el proceso de invasión y metástasis ocurren cambios en el acoplamiento de las células con su microambiente y la activación de proteasas extracelulares. Por ejemplo, se encuentra ampliamente estudiado el papel que juegan algunas proteínas involucradas en la adhesión célula-célula, como la E-caderina, la cual está inhibida o desaparece en la mayoría de los cánceres epiteliales, impidiendo la transmisión de señales que inhiben el crecimiento. Poco se sabe sobre el papel que tienen las proteínas de las UE en estos procesos, aunque se han reportado cambios en la expresión y localización de algunas



**Figura 3. Modelo sobre el efecto del debilitamiento de las UE en el cáncer.** A. En un epitelio normal, en el que las UE se encuentran intactas, el paso de los factores de crecimiento (GF) por la vía paracelular se encuentra restringido, regulando así la cantidad de GF que puede estar en contacto con su respectivo receptor (GFR) y por lo tanto, modulando los estímulos proliferativos que reciben las células. B. Al debilitarse la estructura de las UE, ya sea por cambios en el patrón, cantidad o localización de las claudinas, los GF pueden atravesar las capas celulares por la vía paracelular y entrar en contacto con su receptor; y permitir la difusión de los GFR a la membrana apical, donde tendrían una fuente ilimitada de su ligando.

claudinas con fenotipos más invasivos de diferentes tipos de cáncer.

Las claudinas 1, 2, 3, 4 y 5 reclutan y promueven la activación de metaloproteinasas (MMP), lo que sugiere también el papel de estas proteínas en la invasividad y metástasis.<sup>49</sup> El aumento en la expresión de estas claudinas en algunos tipos de cáncer (como cáncer de colon, ovario, páncreas y adenocarcinoma gástrico) se ha asociado a un aumento en la capacidad invasiva de dichos carcinomas, como resultado del aumento en la actividad de la MMP-2. En cáncer de mama, la disminución en la expresión de las claudinas se ha relacionado con mayor invasividad y peor pronosis.

La internalización de las claudinas, pero no de otras proteínas asociadas a las UE, como ocludina o ZO-1 se ha visto asociada durante el movimiento de las células en el proceso de embriogénesis y de remodelaje tisular,<sup>50</sup> lo mismo que en fases avanzadas de algunos tipos de cáncer. Debido a que las interacciones célula-célula y célula-ECM son necesarias para la sobrevivencia celular y estas interacciones se pierden durante la invasión de una célula a los tejidos, se podría sugerir que la internalización de las claudinas

sería una manera de evadir que la célula perciba cambios en estas interacciones, como sucede con la disminución de la expresión de E-caderina. Esto le permitiría a las células evadir procesos apoptóticos, e inhibir la interacción de estas claudinas con otras de las células que la rodean, que inicialmente impediría el movimiento de la misma.

En el cáncer de páncreas tubular y coloidal se ha observado un aumento significativo en los niveles de ARNm y de proteína para claudina 4 en las fases invasivas.<sup>14</sup> En células derivadas de tumor primario y metástasis de cáncer de colon, el aumento en la expresión de claudina 1 y su deslocalización de la membrana plasmática al citoplasma y núcleo se asocia con el poder de invasividad de estas células.<sup>49</sup>

### ¿Cómo podemos usar a nuestro favor los cambios en la expresión de estas proteínas en la progresión tumoral?

#### Diagnóstico y pronosis

Debido a la alta especificidad en los patrones de expresión de las claudinas en los tejidos normales y



cancerosos, se ha sugerido que éstas pueden representar marcadores moleculares e indicadores pronósticos útiles en varios tipos de cáncer. Para ello, primero es necesario caracterizar los perfiles de expresión de estas proteínas en ambos tipos de tejidos, lo cual ha resultado difícil debido a la falta de anticuerpos dirigidos a cada una de las claudinas. Debido a esto, se han realizado estudios para conocer dichos patrones a nivel de ARNm,<sup>17</sup> sin embargo, la información que éstos muestran pueden no ser de gran utilidad, ya que no se comprueba la presencia de la proteína ni la localización de la misma y por lo tanto, el efecto de ésta en el tejido. Aun con estas desventajas, se ha tratado de relacionar el nivel de expresión de algunas claudinas con el pronóstico de algunas neoplasias. Un ejemplo de ello es la baja expresión de claudina 1 en cáncer de colon, la cual se asocia con un pronóstico poco favorable en la etapa II de este tipo de cáncer. La expresión de claudina 10 ya se considera como un factor pronóstico para la recurrencia de carcinoma hepatocelular después de hepatectomía curativa.<sup>18</sup>

### Terapia

Se ha reportado que las claudinas 3 y 4 son receptores para la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (ECP), que es un polipéptido de 35 kDa que después de unirse a sus receptores interactúa con la membrana celular, creando pequeños poros en la misma, dando lugar a la pérdida de la regulación osmolar y finalmente a la muerte celular.<sup>51,52</sup> Ambas claudinas se han encontrado elevadas a nivel de proteína en una gran cantidad de carcinomas. Esto ha sido de gran interés para algunos grupos, ya que se proponen como posibles blancos terapéuticos para varios tipos de tumores, como es el caso de xenoinjertos de células de cáncer de páncreas, las cuales expresan cantidades elevadas de claudina 4 observando una disminución del tumor acompañado por necrosis al tratarlas con la ECP. Las mismas observaciones se han realizado para células de cáncer de mama, que presentan niveles elevados de claudina 3 y 4, en las que se observa una lisis celular aumentada en respuesta a la administración local de la ECP en el tumor.<sup>53</sup> Sin embargo, existen algunos inconvenientes para el uso de la ECP en el tratamiento de tumores ya que varios tejidos normales, como pulmón, riñón e intestino, también expresan estas claudinas.

El uso de esta enterotoxina podría ser de gran utilidad para dar una terapia localizada al momento de la remoción del tumor y su estructura podría ser la base

para el desarrollo de nuevos medicamentos. Por ello, y dado que se ha sugerido que la ECP puede destruir a las UE, este péptido puede ser útil en combinación con quimioterapia convencional para incrementar la cantidad del fármaco en el interior de los tumores.<sup>18</sup>

La terapia por anticuerpos dirigidos contra claudina 4 es otra de las opciones que se pretende probar en lesiones primarias y metastásicas en cáncer de páncreas, ya que cerca del 100% de estos tumores expresan a esta proteína en la membrana. Sin embargo, estos tipos de terapias tienen sus limitantes ya que, como se mencionó anteriormente, diversos tejidos normales expresan también a estas claudinas, por lo que podrían presentarse varios efectos secundarios.

### DISCUSIÓN

Las claudinas juegan un papel central en la homeostasis y formación de barrera mediada por las UE. Por ello, la expresión y localización correcta de las claudinas en diferentes tejidos endoteliales y epiteliales puede ser la principal defensa contra carcinomas circulantes e invasivos durante el proceso de intravasación y extravasación.

Aparte de la disminución en los niveles proteicos de algunos componentes de las UE, la fosforilación y/o desfosforilación de las claudinas son eventos muy importantes que pueden afectar la función de barrera de las UE durante el desarrollo del cáncer. La pérdida de la expresión de algunas claudinas y otras proteínas de las UE en el cáncer se ha interpretado como un mecanismo de pérdida de adhesión y por lo tanto un paso importante en el desarrollo del mismo para dar lugar a la metástasis y la sobrevivencia de las células. Sin embargo, el aumento en la expresión de otras claudinas, como la 3 y 4 (generalmente sobreexpresadas en varios tipos de cáncer) sugiere que estas proteínas tienen un efecto positivo en la progresión tumoral, dando lugar a un aumento en la invasividad, motilidad y sobrevivencia celular, todas estas características importantes en el proceso de metástasis. Los mecanismos que dan lugar a esta serie de eventos, así como las características que cada una de las claudinas confieren a los tejidos y los mecanismos involucrados en la regulación de la localización y expresión de las mismas siguen sin comprenderse, por lo que se requieren más estudios para aclarar el papel fisiológico de estas proteínas en condiciones normales y patológicas. El gran potencial que tienen las claudinas como marcadores de pronóstico, diagnóstico y terapia son también motivo para profundizar en el estudio de las mismas.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Lorenza González Mariscal (CINVESTAV-IPN) y la Dra. Norma A. Hernández Rodríguez (INCAN) por sus valiosos comentarios y sugerencias durante la elaboración de este manuscrito.

## REFERENCIAS

1. Mullin JM. Epithelial barriers, compartmentation, and cancer. *Sci STKE*. 2004; 216: e2.
2. Mullin JM, Agostino N, Rendon-Huerta E, Thornton JJ. Keynote review: epithelial and endothelial barriers in human disease. *Drug Discov Today*. 2005; 10: 395-408.
3. Turksen K, Troy TC. Barriers built on claudins. *J Cell Science*. 2004; 117: 2435-47.
4. Glick AB, Yuspa SH. Tissue homeostasis and the control of the neoplastic phenotype in epithelial cancers. *Semin Cancer Biol*. 2005; 15: 75-83.
5. Qu Y, Dahl G. Function of the voltage gate of gap junction channels: selective exclusion of molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 697-702.
6. Denker BM, Nigam SK. Molecular structure and assembly of the tight junction. *Am J Physiol*. 1998; 274: F1-F9.
7. Furuse M, Tsukita S. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol*. 2006; 16: 181-8.
8. Nusrat A, Turner JR, Madara JL. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000; 279: G851-G857.
9. Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol*. 2006; 68: 403-29.
10. Mitic LL, Van Itallie CM, Anderson JM. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000; 279: G250-G254.
11. Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol*. 2003; 81: 1-44.
12. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004; 286: C1213-C1228.
13. Fanning AS, Mitic LL, Anderson JM. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10: 1337-45.
14. Swisshelm K, Macek R, Kubbies M. Role of claudins in tumorigenesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005; 57: 919-28.
15. Furuse M, Sasaki H, Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol*. 1999; 147: 891-903.
16. Evans MJ, von Hahn T, Tschirne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*. 2007; 446: 801-5.
17. Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer*. 2006; 6: 186.
18. Morin PJ. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res*. 2005; 65: 9603-6.
19. Lee JW, Lee SJ, Seo J, Song SY, Ahn G, Park CS, et al. Increased expressions of claudin-1 and claudin-7 during the progression of cervical neoplasia. *Gynecol Oncol*. 2005; 97: 53-9.
20. Usami Y, Chiba H, Nakayama F, Ueda J, Matsuda Y, Sawada N, et al. Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hum Pathol*. 2006; 37: 569-77.
21. Johnson AH, Frierson HF, Zaika A, Powell SM, Roche J, Crowe S, et al. Expression of tight-junction protein claudin-7 is an early event in gastric tumorigenesis. *Am J Pathol*. 2005; 167: 577-84.
22. Singh AB, Harris RC. Epidermal growth factor receptor activation differentially regulates claudin expression and enhances transepithelial resistance in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem*. 2004; 279: 3543-52.
23. Lipschutz JH, Li S, Arisco A, Balkovetz DF. Extracellular signal-regulated kinases 1/2 control claudin-2 expression in Madin-Darby canine kidney strain I and II cells. *J Biol Chem*. 2005; 280: 3780-8.
24. Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, et al. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene*. 2003; 22: 2021-33.
25. Escaffit F, Boudreau F, Beaulieu JF. Differential expression of claudin-2 along the human intestine: Implication of GATA-4 in the maintenance of claudin-2 in differentiating cells. *J Cell Physiol*. 2005; 203: 15-26.
26. Sakaguchi T, Gu X, Golden HM, Suh E, Rhoads DB, Reinecker HC. Cloning of the human claudin-2 5'-flanking region revealed a TATA-less promoter with conserved binding sites in mouse and human for caudal-related homeodomain proteins and hepatocyte nuclear factor-1alpha. *J Biol Chem*. 2002; 277: 21361-70.
27. Chiba H, Gotoh T, Kojima T, Satohisa S, Kikuchi K, Osanai M, et al. Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4alpha triggers formation of functional tight junctions and establishment of polarized epithelial morphology in F9 embryonal carcinoma cells. *Exp Cell Res*. 2003; 286: 288-97.
28. Carrozzino F, Soulie P, Huber D, Mensi N, Orci L, Cano A, et al. Inducible expression of Snail selectively increases paracellular ion permeability and differentially modulates tight junction proteins. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005; 289: C1002-C1014.
29. Ohkubo T, Ozawa M. The transcription factor Snail down-regulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. *J Cell Sci*. 2004; 117: 1675-85.
30. Martínez-Estrada OM, Culleres A, Soriano FX, Peinado H, Bolos V, Martínez FO, et al. The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochem J*. 2006; 394: 449-57.
31. Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci*. 2003; 116: 1959-67.
32. Yamamoto T, Kojima T, Murata M, Takano K, Go M, Chiba H, et al. IL-1beta regulates expression of Cx32, occludin, and claudin-2 of rat hepatocytes via distinct signal transduction pathways. *Exp Cell Res*. 2004; 299: 427-41.
33. Scheurer SB, Rybak JN, Rosli C, Neri D, Elia G. Modulation of gene expression by hypoxia in human umbilical cord vein endothelial cells: A transcriptomic and proteomic study. *Proteomics*. 2004; 4: 1737-60.

34. Han X, Fink MP, Delude RL. Proinflammatory cytokines cause NO<sup>\*</sup>-dependent and -independent changes in expression and localization of tight junction proteins in intestinal epithelial cells. *Shock*. 2003; 19: 229-37.
35. Patrick DM, Leone AK, Shellenberger JJ, Dudowicz KA, King JM. Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma modulate epithelial barrier function in Madin-Darby canine kidney cells through mitogen activated protein kinase signaling. *BMC Physiol*. 2006; 6: 2.
36. Bruewer M, Hopkins AM, Hobert ME, Nusrat A, Madara JL. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol*. 2003; 171: 6164-72.
37. Ishizaki T, Chiba H, Kojima T, Fujibe M, Soma T, Miyajima H, et al. Cyclic AMP induces phosphorylation of claudin-5 immunoprecipitates and expression of claudin-5 gene in blood-brain-barrier endothelial cells via protein kinase A-dependent and -independent pathways. *Exp Cell Res*. 2003; 290: 275-88.
38. Medici D, Hay ED, Goodenough DA. Cooperation between snail and LEF-1 transcription factors is essential for TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell*. 2006; 17: 1871-9.
39. Fanning AS, Little BP, Rahner C, Utepbergenov D, Walther Z, Anderson JM. The unique-5 and -6 motifs of ZO-1 regulate tight junction strand localization and scaffolding properties. *Mol Biol Cell*. 2007; 18: 721-31.
40. Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, et al. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell*. 2006; 126: 741-54.
41. Nunes FD, Lopez LN, Lin HW, Davies C, Azevedo RB, Gow A, et al. Distinct subdomain organization and molecular composition of a tight junction with adherens junction features. *J Cell Sci*. 2006; 119: 4819-27.
42. Chen Y, Lu Q, Schneeberger EE, Goodenough DA. Restoration of tight junction structure and barrier function by down-regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in ras-transformed Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell*. 2000; 11: 849-62.
43. Flores-Benitez D, Ruiz-Cabrera A, Flores-Maldonado C, Shoshani L, Cerejido M, Contreras RG. Control of tight junctional sealing: role of epidermal growth factor. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 292: F828-F836.
44. Sato N, Fukushima N, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, van Heek NT, Cameron JL, et al. Gene expression profiling identifies genes associated with invasive intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Am J Pathol*. 2004; 164: 903-14.
45. Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci*. 2003; 116: 1959-67.
46. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.
47. Matter K, Aijaz S, Tsapara A, Balda MS. Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol*. 2005; 17: 453-8.
48. Oliveira SS, Morgado-Diaz JA. Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64: 17-28.
49. Dhawan P, Singh AB, Deane NG, No Y, Shiou SR, Schmidt C, et al. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest*. 2005; 115: 1765-76.
50. Matsuda M, Kubo A, Furuse M, Tsukita S. A peculiar internalization of claudins, tight junction-specific adhesion molecules, during the intercellular movement of epithelial cells. *J Cell Sci*. 2004; 117: 1247-57.
51. McClane BA, Chakrabarti G. New insights into the cytotoxic mechanisms of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Anaerobe*. 2004; 10: 107-14.
52. Smedley JG III, Fisher DJ, Sayeed S, Chakrabarti G, McClane BA. The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2004; 152: 183-204.
53. Ebihara C, Kondoh M, Hasuike N, Harada M, Mizuguchi H, Horiguchi Y, et al. Preparation of a claudin-targeting molecule using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J Pharm Experim Therap*. 2006; 316: 255-60.