



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Expresión diferencial de claudina 6, 7, 9 y 10 en las
etapas de progresión del adenocarcinoma gástrico**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Monserrat Carrera Martinez



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Erika Patricia Rendón Huerta
2014**



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno.

Apellido paterno: Carrera
Apellido materno: Martínez
Nombre(s): Monserrat
Teléfono: 41191406
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
Número de cuenta: 408042552

2. Datos del Tutor.

Grado: Dra.
Nombre(s): Erika Patricia
Apellido paterno: Rendón
Apellido materno: Huerta

3. Datos del sinodal 1

Grado: Dra.
Nombre(s): Rocío
Apellido paterno: Salceda
Apellido materno: Sacanelles

4. Datos del sinodal 2

Grado: Dra.
Nombre(s): Irma
Apellido paterno: Romero
Apellido materno: Alvarez

5. Datos del sinodal 3

Grado: Dr.
Nombre(s): Luis Felipe
Apellido paterno: Montaña
Apellido materno: Estrada

6. Datos del sinodal 4

Grado: Dra.
Nombre(s): Rosario
Apellido paterno: Ortíz
Apellido materno: Hernández

7. Datos de la tesis.

Título: Expresión diferencial de claudina 6, 7, 9 y 10 en las etapas de progresión del adenocarcinoma gástrico
No. de páginas: 57 p
Año: 2014



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
Director General
Dirección General de Administración Escolar
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Expresión diferencial de claudina 6,7,9, y 10 en las etapas de progresión del adenocarcinoma gástrico

realizado por **Carrera Martínez Monserrat** con número de cuenta **4-0804255-2** quien ha decidido titularse mediante la opción de **tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dra. Rocío Salceda Sacanelles	
Propietario	Dra. Irma Romero Alvarez	
Propietario Tutora	Dra. Erika Patricia Rendón Huerta	
Suplente	Dr. Luis Felipe Montaña Estrada	
Suplente	Dra. Rosario Ortiz Hernández	

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU ”
Ciudad Universitaria, D. F., a 17 de febrero de 2014
EL JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

MAG/mdm

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, principalmente a mis padres y mi hermana, son un ejemplo de trabajo arduo y siempre me brindan su apoyo incondicional, gracias por sus consejos, por no dejar que me venciera el miedo. A mis sobrinos por todo el amor y momentos hermosos que me regalan.

A mis abuelos, que cimentaron desde cero a mi familia y debo a ellos todo lo que tengo. A mis tíos, que han sido tan amables conmigo, siempre apoyando e impulsando mi desarrollo, han sido mis cómplices.

A mis tutores, que son como mis padres adoptivos y siempre he contado con su apoyo y su mentoría, son excelentes personas, y con los cuales formamos una familia en el laboratorio. Por cada consejo, cada risa, cada plática que me escucharon con buenas o malas noticias.

A mis amigas y amigos, que son mis hermanos, todos los momentos en la vida que hemos compartido, las clases, las fiestas, los viajes los quiero.

A mis compañeros del laboratorio de los cuales he aprendido mucho y espero haya podido aportar algo para enriquecer nuestra formación académica.

Aunque parezca sencillo, no ha sido fácil lograr esta meta, sin embargo, valió la pena cada momento y cada aprendizaje cada oportunidad aprovechada.

¡Vamos por lo que sigue!

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
UNIONES CELULARES.....	2
UNIONES ESTRECHAS.....	3
Componentes moleculares de las uniones estrechas.....	5
Proteínas citosólicas.....	6
Proteínas de andamiaje.....	6
Proteínas de señalización.....	6
Proteínas integrales de membrana.....	8
-PIM de un cruce transmembranal (JAM, CAR).....	8
-PIM con cuatro cruces transmembranales (Tricelulina, ocludina, claudina).....	8
CLAUDINAS.....	9
Estructura.....	9
REGULACIÓN.....	11
Regulación Génica.....	11
Modificaciones postraduccionales (palmitoilación y fosforilación).....	11
TRÁFICO Y OLIGOMERIZACIÓN.....	12
INTERACCIONES ENTRE CLAUDINAS.....	14
UNIONES ESTRECHAS Y CÁNCER.....	15
Alteración de las uniones estrechas	15
Cambios en la expresión de la familia de las claudinas.....	16
Claudinas como marcador diagnóstico y blanco terapéutico.....	17
CÁNCER GÁSTRICO.....	17
Factores de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico.....	18
Factores del huésped.....	18
Etiopatogénesis.....	19

<i>Helicobacter pylori</i> Y CÁNCER GÁSTRICO.....	21
II. ANTECEDENTES.....	23
III.HIPÓTESIS.....	24
IV.JUSTIFICACIÓN.....	24
V. OBJETIVOS (GENERAL Y ESPECÍFICOS).....	24
VI.MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
Colecta de tejido.....	25
Fijación.....	26
Inclusión.....	26
Corte y montaje.....	26
Desparafinado e hidratación.....	27
Recuperación antigénica.....	27
Permeabilización.....	27
Bloqueo de peroxidasa endógena.....	27
Bloqueo de proteínas no específicas.....	27
INMUNODETECCIÓN.....	28
Anticuerpos primarios.....	28
Amplificación de la señal con kit Dako.....	29
Revelado con diaminobenzidina.....	29
Contratinción.....	30
Deshidratación.....	30
Montaje.....	30
Visualización de la muestra.....	30
Análisis estadísticos.....	30
VII. RESULTADOS.....	31
Características de la población analizada.....	31

Análisis de la Expresión de claudina 6, 7, 9 y 10 por ensayos de Inmunohistoquímica.....	32
Análisis de la expresión de claudina 6, 7, 9 y 10 en Gastritis No Atrófica (GNA), Metaplasia y Adenocarcinoma Gástrico (ACG).....	34
Análisis de la expresión de claudina 6, 7, 9 y 10 con respecto al subtipo de Metaplasia y Adenocarcinoma.....	35
Análisis de la expresión de claudina 6, 7, 9 y 10 con respecto a la región de la glándula y a la localización subcelular.....	36
Región de la glándula.....	36
Localización subcelular.....	40
VIII. DISCUSIÓN.....	40
IX. CONCLUSIONES.....	43
REFERENCIAS.....	44
ANEXO.....	57

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Complejos de unión intercelular.....	2
Figura 2. Ultraestructura de las uniones estrechas.....	3
Figura 3. Función de compuerta y de barrera de las uniones estrechas.....	4
Figura 4. Componentes moleculares de las uniones estrechas.....	5
Figura 5. Complejidad de las interacciones proteína-proteína en las uniones estrechas..	7
Figura 6. Estructura de las claudinas mostrando cuatro dominios transmembranales, dos asas extracelulares y los extremos C-terminal y N-terminal citoplásmicos.....	9
Figura 7. Vías de oligomerización de las claudinas.....	13
Figura 8. Interacciones entre las claudinas.....	14
Figura 9. Etiopatogénesis del adenocarcinoma gástrico y representación esquemática de las vías de infección por <i>Helicobacter pylori</i>	20
Figura 10. Interacciones moleculares necesarias para realizar una detección inmunohistoquímica.....	29
Figura 11. Tinción inmunohistoquímica representativa de claudina 6, 7, 9 y 10 en tres etapas de progresión del adenocarcinoma gástrico.....	33
Figura 12. Expresión de claudina 6, 7, 9 y 10 comparando entre subtipos de metaplasia y adenocarcinoma.....	36
Figura 13. Histología del epitelio gástrico.....	37
Figura 14. Imagen representativa de las glándulas en la que se indican las distintas regiones evaluadas.....	39
Figura 15. Localización subcelular de las claudinas en tres etapas de progresión del adenocarcinoma gástrico.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Expresión de claudinas en tumores primarios.....	16
Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para la inmunodetección de claudina 6, 7, 9 y 10.....	28
Tabla 3. Características generales de la población analizada.....	31
Tabla 4. Expresión diferencial de claudina 6, 7, 9 y 10.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

ACG (Adenocarcinoma gástrico)
ACGD (Adenocarcinoma gástrico de tipo difuso)
ACGI (Adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal)
AF6 (variante de splicing pequeña de afadina-1)
AP-1 (proteína-1 activadora)
aPKC (proteínas cinasas C atípicas)
ASIP (del inglés Agouti signalling peptide)
Bves (del inglés blood vessel/epicardial substance)
CagA (cytotoxin-associated gene A)
cagPAI (cag Pathogenicity Island)
CAR (del inglés *Coxsackievirus/ adenovirus* receptor)
Sf9 (líneas celulares de *Spodoptera frugiperda*)
CPE (enterotoxina de *Clostridium perfringens*)
c-Yes (tirosina cinasa no receptora)
Cys (Cisteína)
DAB (3,3'-diaminobenzidina)
ESAM (moléculas selectivas de adhesión celular endotelial)
Gly (glicina)
GNA (Gastritis no atrófica)
HRP (Peroxidasa de rábano)
huASH1 (del inglés human absent, small, or homeotic-like 1)
IgG (Inmunoglobulina G)
IHC (Inmunohistoquímica)
IL (Interleucina)
IL-1 β (interleucina 1 beta)
IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social)
JAM (del inglés **J**unction **A**dhesion **M**olecule),
LE1 (Asa extracelular 1)
LE2 (Asa extracelular 2)
Leu (Leucina)
LPS (Lipopolisacárido)
LSAB (Biotina- estreptavidina marcada)
MAGI (Guanilato cinasa asociada a membrana)
MAGUK (Superfamilia de guanilato cinasas asociadas a membrana)
MARK2 (Cinasa reguladora de afinidad a microtúbulos)
MARVELD3 (Proteínas relacionadas con el tráfico de vesículas y unión a membrana)
MDCK (riñón canino Madin-Darby)
MLCK (miosina cinasa de cadena ligera)
MMP-2 (Metaloproteasas de matriz)
mRNA (Ácido ribonucleico mensajero)
MUPP1 (Proteína 1 con múltiples dominios PDZ)
NFAT (Factor nuclear de células T activadas)
NF- κ β (Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas)
NH₂ terminal (amino terminal)
NIH 3T3 (Línea celular de fibroblastos de embrión de ratón)
PAR y Par (proteína de partición defectuosa)
PATJ (proteína asociada a uniones estrechas con múltiples dominios PDZ)

PBS (Solución amortiguadora de fosfatos)
PDZ (es un acrónimo que combina las primeras letras de tres proteínas - proteína de densidad postsináptica (PSD95), una supresora de tumores en *Drosophila* (DlgA), y la proteína zonula occludens-1 (ZO-1))
PI3K (fosfoinositol 3-cinasa)
PILT (proteína que se incorpora tarde en las uniones estrechas)
PKC ζ (proteína cinasa C atípica isoforma zeta)
PP2A (proteína fosfatasa 2A)
PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa)
Rab-3b y rab-13 (isoformas de la superfamilia de GTPasas monoméricas de la familia Ras)
Rab (miembro de la superfamilia Ras de proteínas G monoméricas)
RANTES (reguladores expresados y secretados de activación de células T normales)
RE (Retículo endoplásmico)
región -COOH terminal (Región carboxilo terminal)
SEC 6/8 (Complejo de exocitosis de levaduras)
SS (Secretaría de Salud)
T4SS (Sistema de secreción de tipo IV)
TEM (transición epitelio – mesénquima)
TGF- β (Factor de crecimiento tumoral- beta)
TGN (La red del trans Golgi)
TM (transmembranal)
TME (transición mesénquima - epitelio)
TRAF6 (Factor 6 asociado a TNFR)
Trp (Triptófano)
UE (uniones estrechas)
VAP-33 (Proteína de 33 kDa asociada a VAMP)
VHC (virus de hepatitis C)
WNK (sin K=lisina; serina/treonina)
ZAK (del inglés Sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase)
ZO (Zonula Occludens)
ZONAB (Proteína de unión a ácidos nucleicos asociada a ZO)

RESUMEN

El tracto gastrointestinal, está cubierto por distintos tipos de epitelios que funcionan como una barrera en donde los espacios paracelulares deben estar estrictamente sellados. Estos sellos están constituidos por complejos de proteínas entre los que se encuentran las uniones estrechas (UE).

Las UE se encuentran rodeando a la célula como un cinturón en la región más apical de las células epiteliales. Son complejos protéicos compuestos por proteínas citosólicas y proteínas integrales de membrana. Entre las proteínas integrales de membrana más importantes se encuentra la familia de las claudinas, que son componentes clave para su estructura y función.

En padecimientos como el cáncer se ha observado una alteración en la expresión de múltiples miembros de la familia de las claudinas; tanto el aumento como la disminución de su expresión inducen la pérdida de adhesión celular.

En el presente trabajo se analizaron los patrones de expresión de las claudinas 6, 7, 9 y 10 en distintas etapas de progresión del adenocarcinoma gástrico, el cual representa un grave problema de salud pública, ocupa el sexto lugar de incidencia y el tercer lugar en mortalidad a nivel mundial.

Encontramos que la expresión de claudina 7 está aumentada en metaplasia colónica claudina 10 está aumentada en metaplasia intestinal. Con respecto a los subtipos de adenocarcinoma gástrico, en el de tipo difuso, aumenta significativamente la claudina 7.

La localización de las claudinas analizadas se observó en el citoplasma. Al analizar la expresión con respecto a las distintas regiones de las glándulas gástricas se detectó una disminución de claudina 6 en fosas, y de claudina 9 en fondo de la glándula y un aumento de claudina 7 en epitelio superficial en relación con la progresión tumoral

En conclusión, los patrones de expresión de las claudinas observadas en este estudio, apoyan el uso de su detección en el diagnóstico en las distintas etapas de progresión del cáncer gástrico.

INTRODUCCIÓN

En los organismos multicelulares se requiere el establecimiento de distintos ambientes internos para el mantenimiento de la vida. Para cumplir este propósito, todas las superficies, la piel, el tracto gastrointestinal, el tracto respiratorio, etc., están cubiertos por distintos tipos de epitelios o endotelios que funcionan como una barrera en donde los espacios paracelulares deben ser estrictamente sellados ⁽¹⁾. Estos sellos están constituidos por complejos de proteínas entre los que se encuentran las uniones estrechas (UE), uniones adherentes, desmosomas, uniones en hendidura, y hemidesmosomas (Figura 1).

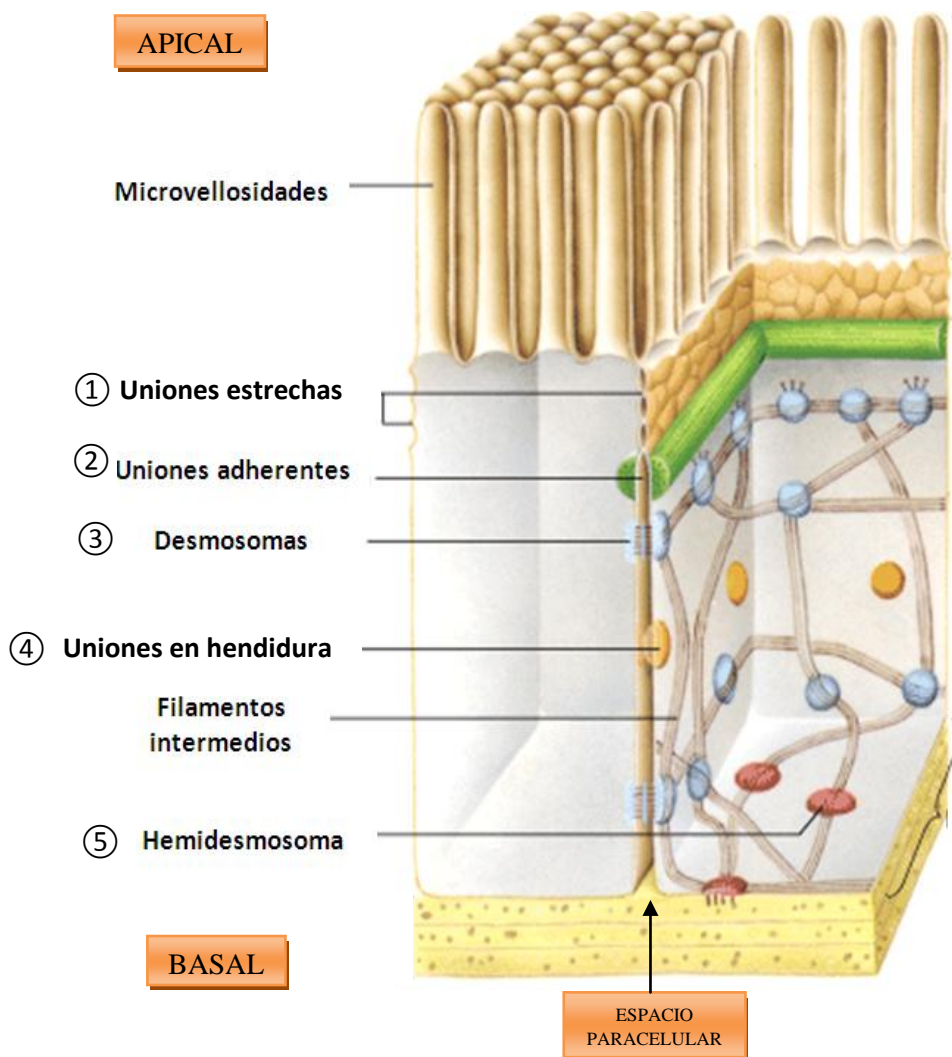


Figura 1. Complejos de unión intercelular. ① Las uniones estrechas sellan espacios entre células epiteliales ② Las uniones adherentes conectan los filamentos de actina agrupados en una célula con los de la siguiente. ③ Los desmosomas conectan filamentos intermedios de una célula con los de la siguiente ④ Las uniones en hendidura permiten el tránsito de pequeñas moléculas solubles en agua de una célula a otra ⑤ Los hemidesmosomas anclan filamentos intermedios de una célula a la matriz extracelular. (Modificada de: Lodish 4^o edición, capítulo 21 ¹³³).

El presente trabajo se enfoca en una familia de proteínas transmembranales del complejo de UE por lo que éstas se describirán a detalle.

UNIONES ESTRECHAS

Las UE se visualizan como un conjunto de hebras continuas y anastomosadas en una zona en la que las membranas plasmáticas de células adyacentes toman contacto por medio de uniones focales (en inglés llamadas *kissing points*) (Figura 2a), rodeando a la célula como un cinturón en la región más apical de las células epiteliales ⁽²⁾ (Figura 2b).

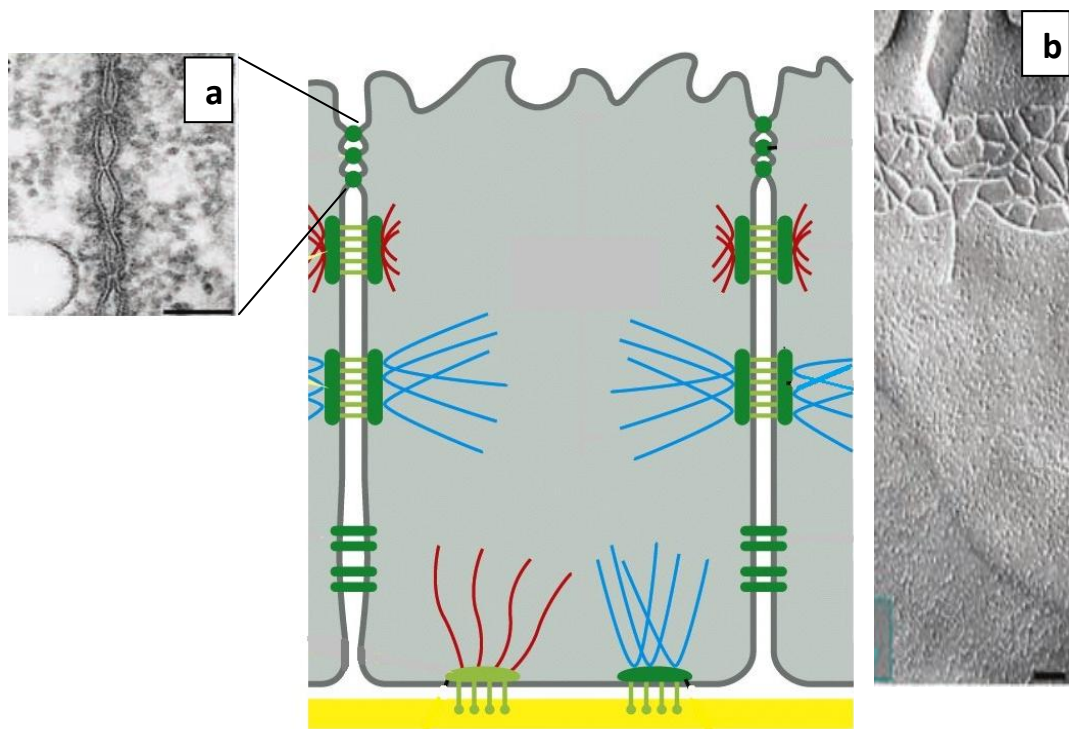


Figura 2. Ultraestructura de las uniones estrechas. a) Micrografía electrónica de transmisión en la que se observan las uniones focales (*kissing points*). b) Imagen de microscopía electrónica de barrido con la técnica de criofractura, se observa el cinturón de hebras anastomosadas en la región apical de las células. Barra 100nm (Modificado de Yamasaki, et al 2008 ¹⁰⁴; Alberts, et. al, 2007 ¹³⁴).

Las células epiteliales tienen dos dominios distintos: la membrana apical y la basolateral, cuya composición de proteínas y lípidos es diferente. Las uniones estrechas mantienen la polaridad celular separando al dominio celular apical del basolateral evitando la mezcla de moléculas entre estos dominios, esto es lo que se conoce como la función de barrera. La estricta regulación de la difusión de iones, solutos y agua a través

del espacio paracelular por las uniones estrechas, referida como la función de compuerta, junto con la función de barrera, mantienen y regulan la compartimentalización celular (Figura 3).

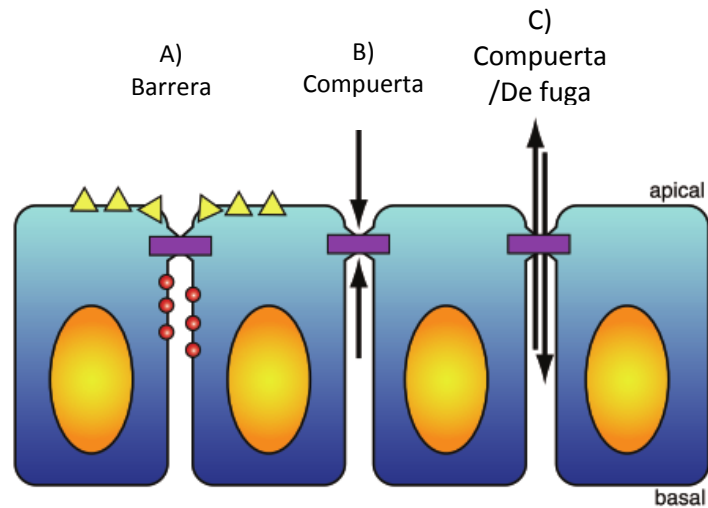


Figura 3. Función de compuerta y de barrera de las uniones estrechas. (A) Las UE (representadas por rectángulos color violeta), actúan como una "barrera" para evitar la mezcla de los componentes de la membrana apical y basolateral. (B) En su función de "compuerta", las UE pueden formar un sello hermético entre las células epiteliales que bloquea el movimiento de iones a través del espacio paracelular. (C) Alternativamente, algunas uniones estrechas son permisivas o "de fuga" y permiten el movimiento de los iones y agua a través del espacio paracelular (Modificado de Gupta y Ryan, 2010¹²⁸).

Recientemente, se han descrito dos funciones adicionales de las UE: 1) Participan en la regulación de la transducción de señales⁽³⁾. A este respecto, se ha reportado que la ocludina (proteína transmembranal de UE) es capaz de unirse a diversas moléculas relacionadas con la transducción de señales como TGF- β ⁽⁴⁾, y participar en la apoptosis de la célula⁽⁵⁾. Algunas moléculas importantes se unen a las uniones estrechas como las de la vía de señalización Hippo, involucrada en proliferación celular y apoptosis⁽⁶⁾. Además, Merlin (neurofibromatosis tipo II), el cual es un supresor de tumores, se ha observado tanto en el núcleo como en las uniones estrechas⁽⁷⁾ y 2) Participan en el funcionamiento del sistema inmune. Esta relación se ha investigado en la inmunidad innata (de mucosas). Se considera que las uniones estrechas son componentes estáticos de la inmunidad innata y una barrera física contra alérgenos, contaminantes y bacterias. Otra relación con el sistema inmune es la expresión de algunas proteínas de uniones estrechas en las células dendríticas que se encuentran entre las células epiteliales para enviar sus dendritas hacia afuera a través de espacios paracelulares en el epitelio del colon, probablemente para censar moléculas nocivas extrínsecas⁽⁸⁾.

La disfunción de las uniones está íntimamente relacionada con diversas condiciones patológicas. Cuando la función de compuerta no se lleva a cabo, las células pierden su polaridad celular, y éste proceso está profundamente involucrado en la biología celular del cáncer ⁽⁹⁾.

COMPONENTES MOLECULARES DE LAS UNIONES ESTRECHAS

Las uniones estrechas son complejos proteicos compuestos por proteínas citosólicas (algunas con función de andamiaje y otras de señalización) y proteínas integrales de membrana (entre las que se encuentra la familia de las claudinas, ocludina, tricelulina y las moléculas de adhesión a las uniones [JAM]) ^(10, 11, 12) (Figura 4).

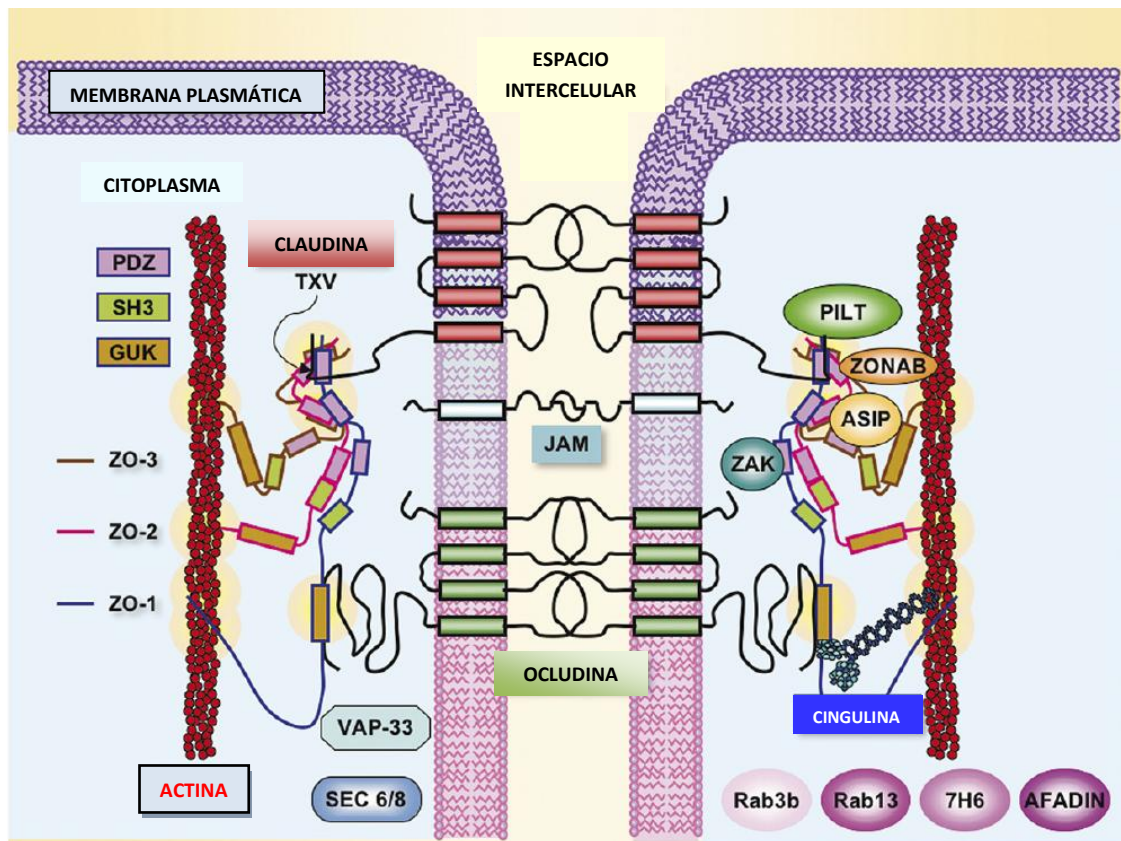


Figura 4. Componentes moleculares de las uniones estrechas. Las UE están conformadas por proteínas que pueden permanecer en la membrana celular (como claudinas, ocludinas y JAM), participan en la fijación de las UE al citoesqueleto (tales como ZO-1, -2, y -3, ZONAB, cingulina), participan en tráfico vesicular (por ejemplo, VAP-33, SEC 6/8, unión Rab3b, Rab13), hay proteínas implicadas en la señalización (ASIP, ZAK, sAfadin), algunas que residen temporalmente en las UE (por ejemplo, PILT, JACOB), y son importantes para la formación de las UE (por ejemplo, 7H6) (Modificada de Cerejido, et al., 2007 ¹⁸).

PROTEÍNAS CITOSÓLICAS

Proteínas de andamiaje

Interactúan con proteínas integrales de membrana y del citoesqueleto para acoplar diversas funciones celulares. Pertenecen a la familia de las MAGUK (proteínas guanilato cinasas asociadas a membrana) y son esenciales para la formación de las uniones estrechas ⁽¹³⁾.

En este grupo se encuentran las proteínas que contienen dominios PDZ como la familia de las ZO (zonula ocludens) -1, -2 y -3, MAGI (Membrane-associated guanylate kinase) -1, -2, -3, ASIP (Agouti signalling peptide), MUPP1 (Multi-PDZ domain protein 1), PATJ (tight junction-associated multi-PDZ protein), cingulina y AF6/afadina.

Un ejemplo de la función de andamiaje es la interacción de las proteínas de la familia de las ZO (proteína de andamiaje) con F-actina (proteína de citoesqueleto) y a su vez con las proteínas de la familia de las claudinas (proteínas integrales de membrana) ⁽¹⁴⁾.

Proteínas de señalización

Estas proteínas forman parte de diversas vías de señalización y están relacionadas con las uniones estrechas.

El grupo principal está comprendido por cinasas y fosfatasa. Las principales fosfatasa involucradas son PP2A (proteína fosfatasa 2A), PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa). Dentro de las cinasas se encuentran: aPKC (proteínas cinasas C atípicas), c-Yes (tirosina cinasa no receptora), WNK (*with no K=lysine; serine/threonine*).

Las aPKC, específicamente la PKC ζ y la PP2A regulan los niveles de fosforilación en las proteínas de uniones estrechas para establecer la polaridad celular.

Otro grupo son los factores de transcripción: ZONAB (*ZO-1-associated nucleic acid binding protein*) está implicado en el crecimiento celular ⁽³⁾. huASH1 se localiza tanto

en núcleo, como en membrana, por lo que podría tener un papel en la señalización mediada por adhesión ⁽¹⁵⁾.

Las UE tienen proteínas involucradas en la polarización de las células epiteliales, como Rab-3b y rab-13 (isoformas de la superfamilia de GTPasas monoméricas de la familia Ras) y el complejo aPKC-Par3-PAR6 que se localiza en la región citoplásmica de las UE ⁽¹⁶⁾ (Figura 5). También tienen componentes involucrados en la migración celular como angiomotina.

Algunas proteínas residen temporalmente en las UE como PILT (*protein incorporated later into TJs*) y JACOB, así como el antígeno 7H6, que es importante en la formación de las UE ⁽¹⁷⁾.

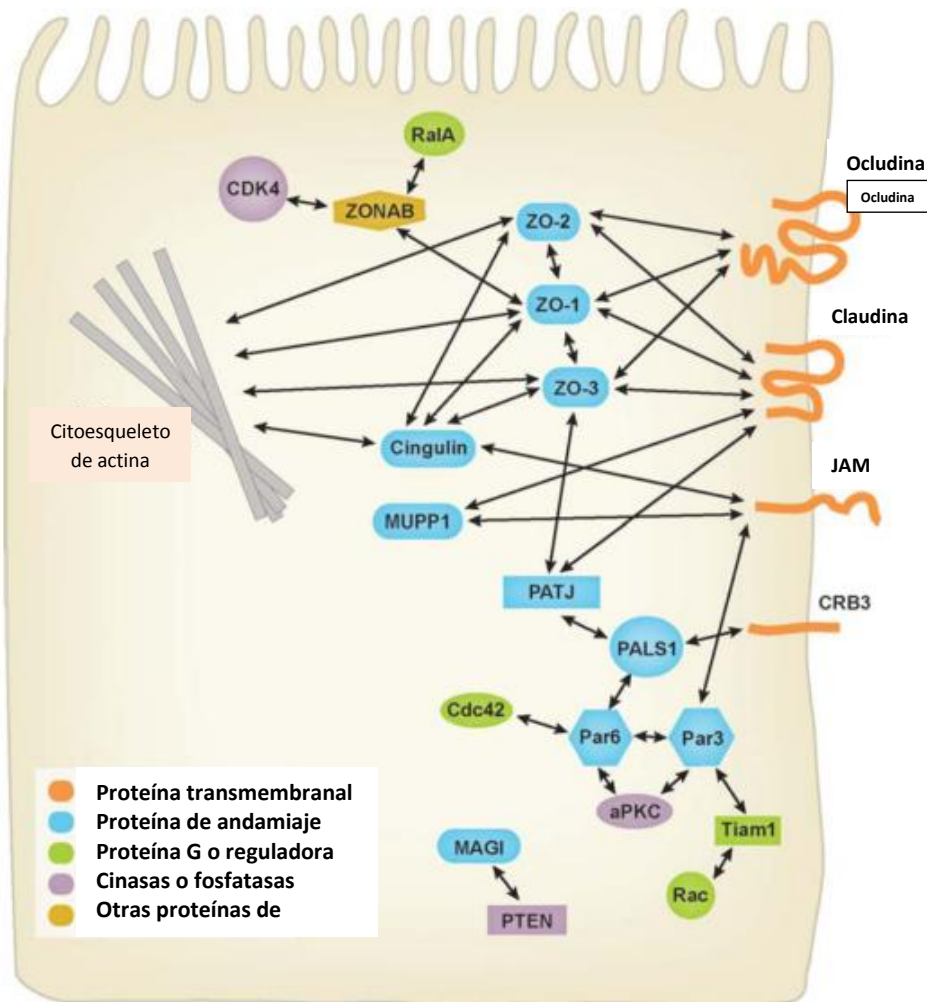


Figura 5. Complejidad de las interacciones proteína-proteína en las UE (Modificada de Shin, et al., 2006 ¹²⁹).

Debido a que las uniones estrechas son complejos multiproteicos, cualquier cambio en alguno de sus componentes, o en las proteínas relacionadas, puede afectar sus funciones ⁽¹⁸⁾.

PROTEÍNAS INTEGRALES DE MEMBRANA

Dentro de las proteínas de membrana que forman parte de las UE se encuentran JAM y CAR, las cuales poseen solo un dominio transmembranal, y por otro lado ocludina, tricelulina y las claudinas, con cuatro dominios transmembranales. Todas ellas poseen dominios intracelulares y dominios paracelulares con los cuales pueden interactuar con proteínas de las células adyacentes.

Dentro de la familia de moléculas de adhesión se encuentran JAM (del inglés *Junction Adhesion Molecule*) sus isoformas JAM-A, -B, -C, -D y JAM4, CAR (del inglés *Coxsackievirus/ adenovirus receptor*), ESAM (moléculas selectivas de adhesión celular endotelial) ⁽¹⁹⁾, y Bves (*blood vessel/epicardial substance*) ⁽²⁰⁾.

La ocludina se localiza en la región apical de la membrana basolateral. Tiene una región c-terminal larga en la región citoplásmica que contiene diversos sitios de fosforilación y un dominio en espiral (*coiled-coil*) que probablemente interactúa con ZO-1 y ZO-3, PKC- ζ , c-Yes, conexina 26 y PI3K, entre otras ⁽²¹⁾.

La tricelulina es un miembro de la sub familia MARVELD3, se encuentra en los contactos tricelulares de las células epiteliales. Su secuencia C-terminal (de ~130 aminoácidos) es 32% idéntica a la de ocludina, y su dominio citoplasmático N-terminal es más largo que el de ocludina. Participa en la barrera epitelial y la organización no sólo de uniones estrechas tricelulares sino también uniones estrechas bicelulares ⁽²²⁾.

La familia de las claudinas, son componentes clave para la estructura y función de las uniones estrechas ^(10, 23, 24), por lo tanto, el presente trabajo se enfocó en el análisis de su expresión, y a continuación se describirán a detalle.

CLAUDINAS

ESTRUCTURA

La familia de las claudinas es una familia multigénica conformada por un grupo de 24 isoformas en mamíferos con un peso de 20 a 27 kDa. En humanos se han identificado 23 de las 24 isoformas (la excepción es claudina 13) ⁽⁴⁰⁾.

Tienen una secuencia-NH₂ terminal corta (7 residuos de aminoácidos) expuesta hacia el citosol, una asa extracelular larga (AE1 de 52 residuos), una asa extracelular más corta (AE2 de 16-33 residuos), y una región -COOH terminal en la región citosólica (Figura 6) que varía considerablemente en su longitud entre las diferentes isoformas (21 a 63 residuos) ⁽¹⁰⁾.

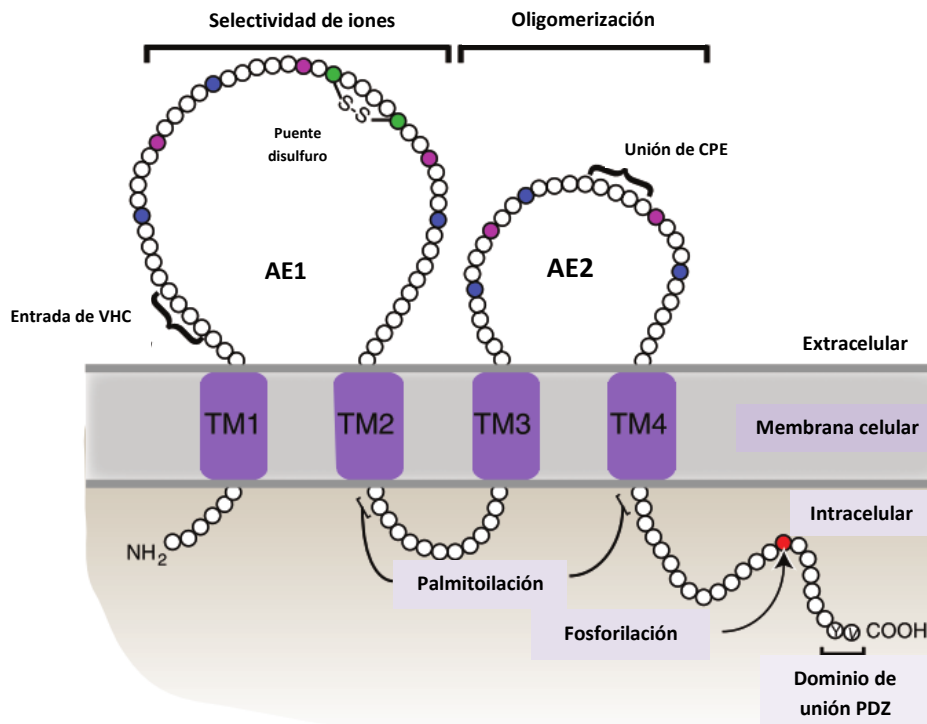


Figura 6. Estructura de las claudinas mostrando cuatro dominios transmembranales (TM1-4), dos aspas extracelulares (AE1 y AE2) y los extremos C-terminal y N-terminal citoplásmicos. Se muestran los residuos de aminoácidos básicos (azul) y ácidos (rosa) que regulan la selectividad de iones, las cisteínas (verde) que forman un puente disulfuro, los sitios de palmitoilación, un dominio PDZ y los sitios de fosforilación (círculo rojo) en el C-terminal (Modificado de Gupta y Ryan, 2010 ¹²⁸).

La primer asa extracelular (AE1) es responsable de la permeabilidad selectiva de las UE. Contiene un motivo altamente conservado [Gly-Leu-Trp-x-x-Cys-(8-10 aminoácidos)-Cys]; las cisteínas en este motivo forman un puente disulfuro el cual estabiliza su estructura secundaria. Debido a la presencia de éstos aminoácidos cargados, las claudinas forman canales selectivos ⁽²⁵⁾, que determinan la selectividad de cargas del transporte paracelular. Esta asa es utilizada como receptor para la entrada del virus de la hepatitis C (VHC) ⁽²⁶⁾.

La segunda asa extracelular (AE2) es más pequeña y se ha modelado como una estructura de hélice-giro-hélice ⁽²⁷⁾ que forma dímeros entre claudinas de membranas celulares adyacentes, además de que en claudina 1, 3, 4, 6 y 9 es un receptor para la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (CPE). Ambas asas son críticas para la regulación de las interacciones claudina-claudina ⁽²⁸⁾ (Figura 6).

Además de la importancia que tienen las claudinas en selectividad de iones y moléculas que cruzan la vía paracelular, se ha descrito que participan en otros procesos importantes como: en la entrada del VHC (virus de hepatitis C) a las células epiteliales a través de la interacción de éste con un dominio del asa extracelular 1 de claudina 1, 6 y 9; en la activación de pro-MMP-2; y en la regulación de la proliferación, migración e invasividad celular ^(13, 29).

El extremo carboxilo terminal muestra la mayor heterogeneidad molecular (21 a 63 aminoácidos) entre diferentes isoformas de claudinas. Contiene un dominio de unión PDZ que permite que interactúen con las proteínas asociadas a uniones estrechas como MAGUK, ZO-1, -2 y -3, MUPPI ⁽³⁰⁾ y PATJ ⁽³¹⁾. La localización y función de las claudinas también está regulada por la fosforilación de este extremo citoplásmico, que tiene blancos para serina/treonina y tirosina cinasas.

REGULACIÓN

Las funciones de las claudinas pueden ser reguladas principalmente a nivel génico y de modificaciones postraduccionales.

REGULACIÓN GÉNICA

Factores de transcripción como Snail⁽³²⁾ y GATA-4⁽³³⁾ se unen a las regiones promotoras de algunos genes de claudinas y afectan su expresión. También hay evidencia que apoya el concepto de que las claudinas son reguladas a la baja tanto transcripcionalmente y post-transcripcionalmente por diversos factores de crecimiento y citocinas^(34, 35).

Varias claudinas están expresadas de forma anormal en cáncer⁽³⁶⁾, por ejemplo, claudina 1 está regulada a la baja en cáncer de colon y de mama^(37,38). En contraste, se ha encontrado la sobreexpresión de claudina 3 y 4 en múltiples tipos de cáncer⁽³⁶⁾. En el cáncer, la sobreexpresión de claudinas puede tener un papel en la motilidad, invasión y la supervivencia^(39, 40).

MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS CLAUDINAS

Palmitoilación

Los motivos de palmitoilación en residuos de cisteína se encuentran conservados en toda la familia de claudinas (cerca del cruce transmembranal 2 y 4 como se aprecia en la figura 6). Su función es mejorar la incorporación de claudinas en las uniones estrechas⁽⁴¹⁾. Las claudinas palmitoiladas se incorporan más eficientemente en membranas resistentes a los detergentes, en comparación con los mutantes no palmitoiladas, lo que sugiere que las balsas lipídicas desempeñan un papel en el montaje de la unión estrecha y el ensamblaje de las claudinas⁽⁴²⁾.

Fosforilación

Los miembros de la familia de las claudinas son fosforilados en el carboxilo terminal, lo cual tiene efectos dramáticos y divergentes en la actividad de las claudinas y en su localización dentro de las UE.

La fosforilación se ha relacionado tanto con un aumento como con la disminución en la permeabilidad de las UE. Por ejemplo, la fosforilación mediada por la proteína cinasa A disminuye la incorporación de claudina 3 en las uniones estrechas ⁽⁴³⁾, sin embargo, es necesaria para la correcta incorporación y función de claudina 16 ⁽⁴⁴⁾. La fosforilación de claudina 1 y 4 por la proteína cinasa C- θ es necesaria para la formación de UE en células epiteliales intestinales ⁽⁴⁵⁾.

En contraste, la actividad de la fosfatasa PP2A disminuye la función de barrera de claudina 1. De igual forma, la fosforilación a través de MLCK (cinasa de la cadena ligera de la miosina) y Rho cinasa se asocia con la desorganización de las UE y aumento de la permeabilidad paracelular asociada con inflamación ^(46, 47, 48).

TRÁFICO Y OLIGOMERIZACIÓN

Se sabe poco acerca de cómo interactúan las claudinas antes de ensamblarse en las cadenas de las uniones estrechas. Sin embargo, su correcto plegamiento y oligomerización son un prerrequisito para su posterior transporte hacia la membrana ^(49, 50).

Cada miembro de la familia de las claudinas forma oligómeros de diferentes tamaños, el cual varía de acuerdo al tejido y tipo celular. Por ejemplo, claudina 4 expresada en células Sf9 forma hexámeros estables ⁽⁵¹⁾, mientras que en células NIH 3T3 se observaron ya sea como monómeros (en la casos de claudina 1 y 4) o trímeros/tetrámeros (para claudina 5). Sin embargo, claudina 3 expresada por células 3T3 forman tetrámeros estables ⁽⁵²⁾. Por otra parte, en células MDCK, las claudinas 1, 2 y 7 formaron dímeros y claudina 4 permaneció como un monómero ⁽⁵³⁾.

La figura 7 esquematiza tres modelos potenciales de oligomerización de claudinas: temprana, tardía y oligomerización inducida al ensamblarse en las uniones estrechas.

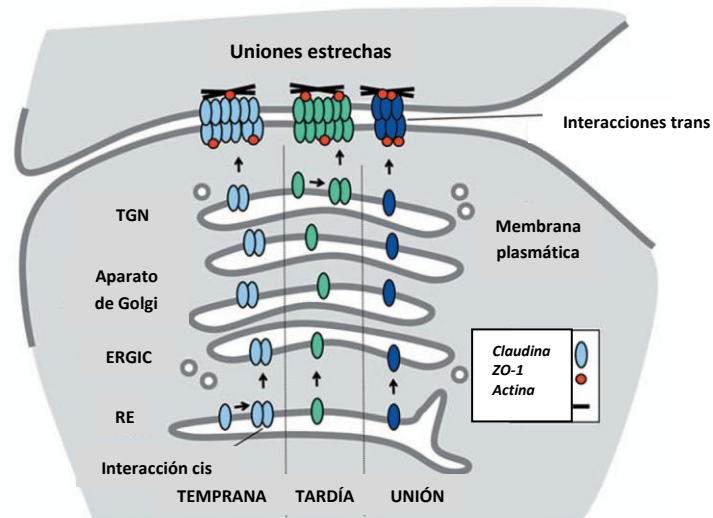


Figura 7. Vías de oligomerización de las claudinas. La vía temprana representa la oligomerización (mediante interacciones *cis*) que ocurre en el retículo endoplásmico (RE), la vía tardía muestra la oligomerización en la red *trans* Golgi (TGN). La oligomerización también podría ocurrir en el compartimento intermedio RE-Golgi (ERGIC) o el aparato de Golgi en sí. Alternativamente, la oligomerización podría ocurrir en la membrana plasmática (Modificada de Koval, 2013 ⁵⁵).

La vía de oligomerización temprana corresponde a la vía de control clásica del retículo endoplásmico (RE) para la oligomerización de proteínas transmembranales multiméricas, donde la interacción ocurre desde el RE y se mantiene a través de la ruta secretora, hasta llegar a la membrana plasmática ⁽⁵⁰⁾.

La hipótesis de la vía tardía se propuso debido a que se encontró evidencia de que algunas claudinas interactúan al pasar la red *trans* Golgi (TGN), en subcompartimentos extremadamente tardíos en la ruta secretora ^(56, 57).

Alternativamente, la oligomerización inducida al ensamblarse en las uniones estrechas podría ocurrir al momento en que las claudinas se asocian con proteínas de andamiaje y proteínas del citoesqueleto, incluso la oligomerización podría ocurrir en la membrana, al momento en que ocurren las interacciones entre claudinas de células adyacentes.

Dada la diversidad estructural de los diferentes miembros de la familia de las claudinas, es poco probable que todas las claudinas se oligomericen a través de la misma vía.

INTERACCIONES ENTRE CLAUDINAS

La mayoría de los tejidos expresan múltiples claudinas, las cuales pueden interactuar de forma homotípica y heterotípica para formar las cadenas de uniones estrechas ^(1, 58). Las interacciones homotípicas (con la misma isoforma) y heterotípicas (entre distintas isoformas) ocurren entre claudinas de membranas celulares opuestas (interacción cabeza-cabeza) a través de las asas extracelulares (Figura 8).

Se ha encontrado que diversas combinaciones de pares de claudinas son heterotípicamente incompatibles cuando se encuentran en la misma célula (por ejemplo claudina 3 con claudina 4 o claudina 16 con claudina 19). Las claudinas también interactúan lateralmente en el plano de la membrana, esta interacción puede ser homomérica o heteromérica ⁽⁵⁹⁾. En contraste con las interacciones heterotípicas, las heteroméricas son más frecuentes. De hecho es probable que se requieran estas interacciones para que los pares de claudinas puedan formar UE funcionales.

Estudios de co-expresión sugieren que diferentes isoformas de claudinas se pueden incorporar dentro de la misma cadena de UE ⁽⁶⁰⁾.

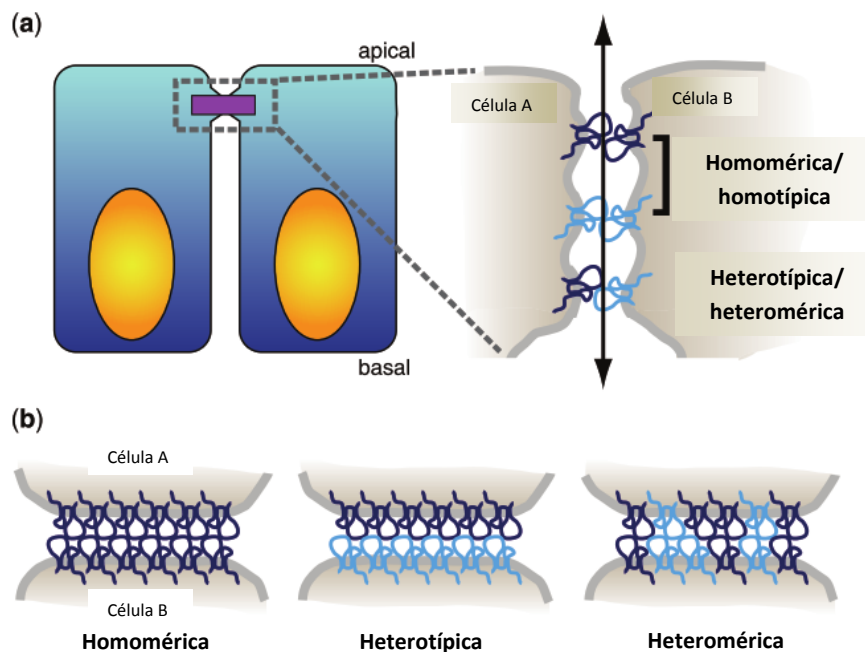


Figura 8. Interacciones entre las claudinas. (a) Vista lateral ampliada de UE formadas entre la célula A y la célula B. El transporte paracelular está indicado por la flecha. Se ilustran las interacciones homo/heteroméricas y homo/heterotípicas entre claudinas (b) Interacciones homoméricas, heterotípicas y heteroméricas de las hebras de UE (Modificado de Gupta y Ryan, 2010 ¹²⁸).

UNIONES ESTRECHAS Y CÁNCER

El alto grado de organización celular observado en tejidos normales bien diferenciados a menudo se pierde en padecimientos como el cáncer. Las células tumorales presentan una función anormal de las uniones estrechas así como una disminución en la diferenciación y polarización celular ^(61, 62). La pérdida de la integridad de las uniones estrechas es de particular importancia para permitir la difusión de nutrientes y otros factores necesarios para el crecimiento y supervivencia de las células tumorales ⁽⁶³⁾. Además, la disminución en la diferenciación y la polaridad es importante para inducir el fenotipo metastásico, donde las células individuales pueden dejar el sitio primario y entrar a los vasos sanguíneos para llegar a sitios distantes ⁽⁶⁴⁾.

La relación entre las uniones estrechas y el cáncer se puede dividir en dos aspectos principales; uno es la alteración de las uniones estrechas y el otro son los cambios en la expresión de la familia de las claudinas.

Alteración de las uniones estrechas

En adenocarcinomas humanos, las UE se pierden cuando las células cancerígenas comienzan a desdiferenciarse ⁽⁶⁵⁾.

Una vez que la transformación maligna ocurre, las células epiteliales se desdiferencian en términos de atipia estructural, estos cambios son llamados transición epitelio-mesénquima (TEM), el cual es un proceso reversible, y su contraparte se llama transición mesénquima-epitelio (TME) ^(66, 67). La TEM es acompañada por la pérdida de ocludina, claudinas y E-cadherina cuyos genes contienen un dominio E-box en su región promotora ⁽³²⁾. Algunos factores de transcripción como Slug, SIP1 y Snail, inducidos por TGF- β e hipoxia en células de adenocarcinoma, se unen a este dominio E-box en el promotor de E-cadherina y otros genes de las proteínas de uniones estrechas induciendo cambios reversibles ⁽⁶⁸⁾.

Cambios en la expresión de la familia de las claudinas

Tanto el aumento como la disminución de la expresión de las claudinas en cáncer se han interpretado como un mecanismo que induce la pérdida de adhesión celular, la cual es un paso importante para la progresión del cáncer a metástasis. Las funciones de las claudinas son tejido-específicas y dependientes del microambiente celular. En el cáncer hay una alteración significativa de la expresión de múltiples miembros de la familia de las claudinas ⁽⁷⁰⁾, algunos ejemplos de estos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Expresión de claudinas en tumores primarios

Claudina	Tipo de Neoplasia	Expresión*	Método de detección	Localización
CLDN1	Glioblastoma multiforme	↓	IHC	Citoplasma
	Cáncer de colon	↑	RT-PCR, IHC	Citoplasma
	Perineuroma	=	IHC	Citoplasma
	Metaplasia de Barrett	↓	Western blot	S/D
	Sarcoma sinovial	↑	IHC	Membrana plasmática
CLDN3	Cáncer de ovario	↑	SAGE, IHC	Membrana plasmática y citoplasma
	Cáncer de próstata	=	mRNA in situ	Citoplasma
	Glioblastoma multiforme	↓	IHC	Citoplasma
	Cáncer de mama	↑	IHC, Western blot	
CLDN 4	Cáncer de ovario	↑	SAGE IHC	Membrana plasmática y citoplasma
	Cáncer pancreático	↑	IHC	Membrana plasmática
	Cáncer de mama	↑	IHC, Western blot	S/D
CLDN6	Cáncer de mama	↓	sqRT-PCR	S/D
CLDN7	Cáncer de cabeza y cuello	↓	Western blot	S/D
	Cáncer de mama	↓	RT-PCR, IHC	Membrana plasmática

IHC, inmunohistoquímica

RT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa

SAGE, análisis en serie de expresión génica.

sqRT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa semicuantitativa.

*Nivel de expresión relativo al tejido de origen no neoplásico.

S/D Sin datos

(Modificada de Swisshelma, K., et. al. 2005 ¹²²).

Claudinas como marcador diagnóstico y blanco terapéutico

Debido a la alta especificidad de los patrones de expresión en cáncer, se ha sugerido que las claudinas pueden representar un marcador molecular útil para diferentes cánceres. Por ejemplo, un paquete de cuatro marcadores, incluyendo claudina 3 es suficiente para identificar con precisión los 158 cánceres de ovario, incluyendo ocho cánceres serosos en etapa temprana ⁽⁷¹⁾.

Las claudinas podrían ofrecer blancos prometedores para terapia basada en anticuerpos debido a que son proteínas transmembranales y tienen dos asas extracelulares relativamente largas ⁽⁷²⁾. Por ello, se han producido anticuerpos que reconozcan específicamente estas asas extracelulares y que muestren unión específica a las claudinas en la superficie celular ⁽⁷³⁾.

Los patrones de expresión inusual de claudinas son de gran utilidad para la detección, diagnóstico y tratamiento de cánceres resistentes a los medicamentos. Sin embargo aún se requieren más estudios para completar el perfil de expresión de claudinas en distintos tipos de cáncer.

En el presente trabajo se analizaron los patrones de expresión de cuatro isoformas de la familia de las claudinas en distintas etapas de progresión del adenocarcinoma gástrico, el cual representa un grave problema de salud pública.

CÁNCER GÁSTRICO

El cáncer gástrico ocupa el sexto lugar de incidencia a nivel mundial con 631,293 nuevos casos globales en 2012 (8.5% de todo los cánceres) y el tercer lugar en mortalidad con 468,931 muertes reportadas en 2012 (10.1% de todas las muertes por cáncer) ⁽⁷⁴⁾. *H. pylori* es el agente causal de aproximadamente el 63% de este tipo de cáncer ⁽⁷⁵⁾. Es poco común encontrar lesiones displásicas debido a que tiende a ser asintomático, y los pacientes son diagnosticados cuando los tumores ya están en grado avanzado ⁽⁷⁶⁾. Por eso, la identificación de cambios tempranos en la tumorigenesis del cáncer gástrico es un reto.

FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE CÁNCER GÁSTRICO

Existen diversos factores que contribuyen al desarrollo de cáncer gástrico, las principales son las infecciones crónicas, variantes genéticas del hospedero, el consumo de tabaco, la dieta y la obesidad ⁽⁷⁷⁾.

INFECCIONES CRÓNICAS

La colonización gástrica por *H. pylori*, una espiroqueta Gram negativa, representa una de las más comunes en todo el mundo, ocurre con mayor frecuencia en la infancia, cuando la bacteria coloniza el estómago de su hospedero, y se adhiere a la mucosa del epitelio ⁽⁷⁸⁾. Se estima que al menos la mitad de la población mundial está infectada, sin embargo, la prevalencia de la infección es muy variable y depende en gran medida de la situación socioeconómica de la población; alrededor del 74% de la población adulta de mediana edad en los países en desarrollo, y el 58% en los países desarrollados ⁽⁷⁹⁾. *H. pylori* está clasificada como un carcinógeno del Grupo I por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer desde 1994.

FACTORES DEL HÚESPED

En la última década, se ha generado evidencia que muestra la importancia de las variantes genéticas humanas en el cáncer gástrico ^(80, 81). Los factores del huésped que han recibido más atención son los relacionados con la secreción de la citocina proinflamatoria IL-1 β (interleucina 1 beta), un fuerte inhibidor de la secreción de ácido gástrico. Algunos polimorfismos en el gen de IL1B se han asociado con un aumento de la producción de IL-1 β y riesgo elevado de desarrollar cáncer gástrico.

También las mucinas (proteínas que protegen el epitelio gástrico de lesiones externas) son polimórficas y se ha observado que moléculas más grandes brindan mayor protección contra el desarrollo de cáncer que las moléculas más pequeñas, las cuales son significativamente más comunes en los pacientes con adenocarcinoma gástrico ⁽⁸²⁾.

Otros factores ambientales externos que influyen en el desarrollo del cáncer gástrico están relacionados con la dieta. El exceso de ingesta de sal, nitritos y nitrosaminas que aumenta el riesgo de desarrollar cáncer gástrico ^(83, 84 85).

ETIOPATOGENESIS

El modelo apropiado para examinar la causa del cáncer gástrico es el paradigma epidemiológico clásico en el cual el desenlace es determinado por la virulencia del organismo involucrado, modulado por fuerzas relacionadas con el hospedero y otros factores externos. La interacción de tales fuerzas comienza décadas antes de que se diagnostica el cáncer en la clínica, por lo general, es en la infancia cuando se adquiere la infección bacteriana. La evolución del proceso es una enfermedad infecciosa activa crónica. La figura 9 muestra una representación esquemática de un posible modelo epidemiológico de la infección de *H. pylori*.

Cuando *H. pylori* coloniza el estómago, la respuesta inmune inicial de la mucosa gástrica varía considerablemente de acuerdo con la virulencia de la cepa. Cepas de baja virulencia inducen un proceso inflamatorio leve, que es asintomático y no avanza a la atrofia gástrica o adenocarcinoma. Por el contrario, las cepas de alta virulencia, sobre todo las que contienen la isla de patogenicidad Cag, se han asociado a enfermedades gástricas severas como gastritis severa crónica no atrófica, úlceras gástricas y duodenales, gastritis atrófica multifocal y cáncer gástrico. Aproximadamente el 90% del cáncer gástrico es adenocarcinoma ⁽⁸⁶⁾, el resto lo ocupan el linfoma, tumores del estroma gastrointestinal (GIST), tumores carcinoides gastrointestinales (originados en las células productoras de hormonas), etc.

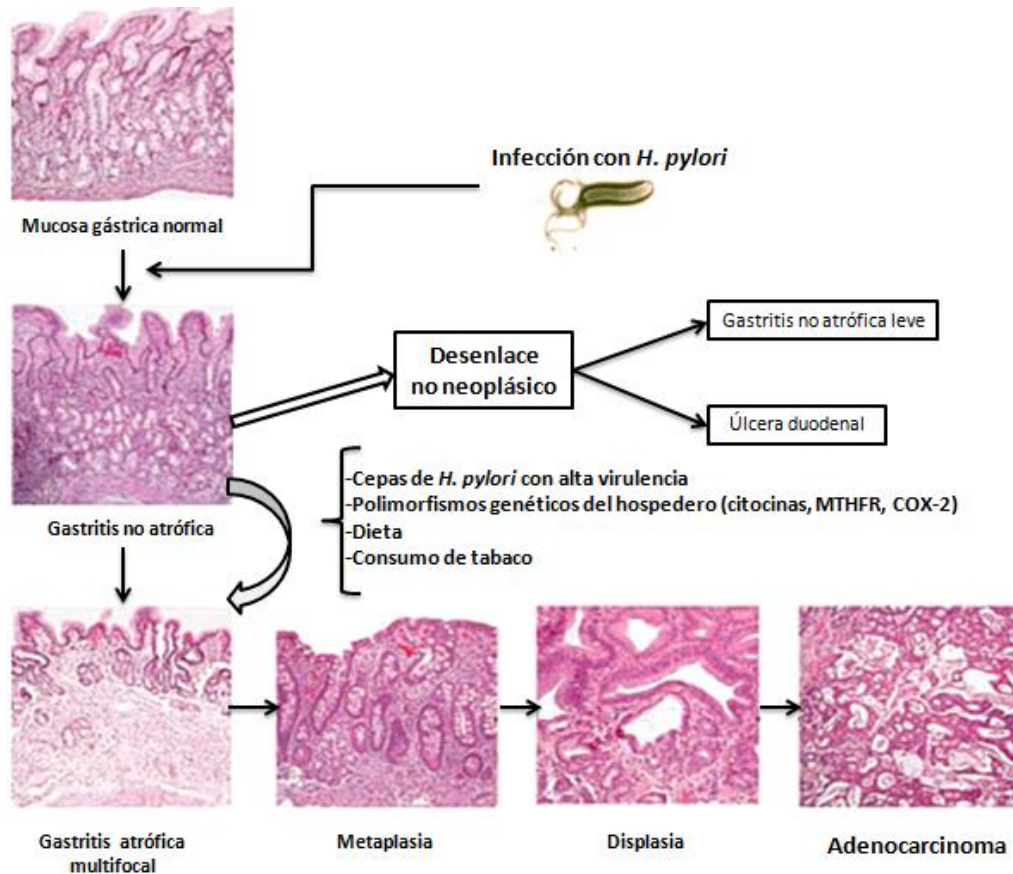


Figura 9. Etiopatogénesis del adenocarcinoma gástrico y representación esquemática de las vías de infección por *Helicobacter pylori*. Desde la primera infancia, la infección bacteriana se manifiesta primero como gastritis no atrófica. La interacción de múltiples factores (genotípica, bacteriana, y del medio ambiente) induce el desenlace. Con frecuencia, la infección conduce a lesiones no neoplásicas, incluyendo úlcera duodenal. En un pequeño grupo de sujetos, se desarrolla atrofia y puede representar el primer paso en la secuencia de la carcinogénesis gástrica: gastritis atrófica → metaplasia, → displasia → adenocarcinoma (Modificada de Correa, P., et al., 2006¹³⁰).

Cada uno de los pasos de la etiopatogénesis presenta características histológicas bien definidas e incluso, presenta subclasificaciones con implicaciones patológicas.

El primer paso en la secuencia es la gastritis crónica no-atrónica, está caracterizada por infiltrado inflamatorio en la mucosa gástrica con la preservación de glándulas gástricas. Esos cambios gástricos pueden variar de leves, que pueden ser asintomáticos, a marcados, acompañados de sintomatología severa.

El segundo tipo de respuesta a la infección es la gastritis atrófica multifocal, que se caracteriza por múltiples focos de pérdida de glándulas gástricas.

La pérdida de glándulas es a menudo reemplazada por la aparición de células epiteliales con fenotipo intestinal, conocida como metaplasia intestinal. Este tipo de respuesta a la

infección con el tiempo puede conducir a cambios displásicos y transformaciones neoplásicas ⁽⁸⁷⁾.

La metaplasia se puede clasificar en dos subtipos de acuerdo al tipo celular y la producción de distintas enzimas en: metaplasia colónica e intestinal. La metaplasia intestinal está caracterizada por la presencia de células absortivas y células Panneth secretoras de sialomucina. La metaplasia colónica se caracteriza por la presencia de células columnares secretoras de sialomucina y/o sulfomucina ⁽⁸⁸⁾.

El último paso en la secuencia es el desarrollo de adenocarcinoma, la clasificación histopatológica de Hervey y Lauren subdivide el adenocarcinoma en tipo difuso e intestinal (1965). En el adenocarcinoma de tipo intestinal las células del tumor se observan como estructuras tubulares irregulares, los epitelios se transforman en pluriestratificados y el tejido conectivo es reducido, a menudo, se observa metaplasia intestinal en la mucosa vecina, está asociado a un proceso de gastritis crónica, es frecuente en gente mayor. El adenocarcinoma de tipo difuso tiene su origen en células mucosas gástricas, no está asociado a gastritis crónica y es poco diferenciado ^(89, 90). La evidencia epidemiológica indica que *H. pylori* tiene un papel crítico en el desarrollo de ambos tipos, intestinal y difuso ⁽⁹¹⁾.

***Helicobacter pylori* y cáncer gástrico**

La infección con esta bacteria tan común, a menudo es crónica, prosperando por décadas en el estómago de su hospedero. Debido al largo tiempo de incubación, ocurren muchos cambios que se acumulan como resultado de esta interacción, e incluso cambios pequeños como inflamación subclínica, puede causar grandes problemas durante toda la vida.

Evidencia epidemiológica indica que la infección por *H. pylori* es un factor de riesgo para desarrollar gastritis atrófica ⁽⁹²⁾, la cual es una lesión precursora para desarrollar cáncer gástrico ⁽⁹³⁾.

La infección con *H. pylori* puede influenciar la progresión de gastritis crónica a adenocarcinoma del estómago distal por distintos mecanismos. La mucosa gástrica responde al daño inducido por *H. pylori* aumentando la actividad mitogénica de las células epiteliales y disminuyendo la apoptosis ⁽⁹⁴⁾, también se promueve la elongación

de las células epiteliales y pérdida de polaridad, provocando el desensamble de uniones célula – célula y la disminución de la secreción de ácidos ⁽⁹⁵⁾.

La patogenicidad de *H. pylori* se atribuye en gran medida a sus diversos factores de virulencia, que incluyen los flagelos, lipopolisacáridos (LPS), toxina vacuolizante VacA y la isla de patogenicidad del gen asociado a citotoxicidad (cagPAI) ⁽⁹⁵⁾.

CagA inhibe la cinasa reguladora de polaridad PAR1b/MARK2, la cual provoca la pérdida de polaridad celular y tiene un rol en la alteración de la arquitectura normal del epitelio ⁽⁹⁶⁾.

Existen diversos mecanismos por los que la infección por *H. pylori* puede inducir cambios en el epitelio del estómago del hospedero que conlleven a la génesis de cáncer. A pesar de que se requieren varios factores para inducir la carcinogénesis, uno de los mecanismos más importantes es la inducción de la inflamación crónica.

Algunas moléculas se encuentran sobreexpresadas en los estómagos de pacientes infectados con *H. pylori*, incluyendo IL-1, IL-6, IL-8 y RANTES ⁽⁹⁷⁾. Las bacterias que translocan CagA dentro de las células del hospedero, inducen altos niveles de producción de IL-8 y activan a NF- κ B, AP-1 y NFAT ⁽⁹⁸⁾. El factor de transcripción NF- κ B es un regulador maestro de la respuesta inmune e inflamatoria y regula diversos procesos celulares importantes en la carcinogénesis, incluyendo la transformación, proliferación, angiogénesis y metástasis ⁽⁹⁹⁾. Actualmente, tres productos bacterianos se consideran importantes para la activación de NF- κ B por *H. pylori*: LPS, peptidoglicanos y CagA ⁽¹⁰⁰⁾.

Se ha propuesto que el mecanismo de liberación de peptidoglicanos dentro de la célula hospedera es a través del pili con el sistema de secreción tipo IV (T4SS) o a través de vesículas de membrana externa que se unen a balsas lipídicas en las células del hospedero ^(101, 102).

Recientemente se ha demostrado que CagA es una proteína asociada a membrana que se une a fosfatidilserina en la membrana interna y actúa como una proteína de andamiaje lo cual podría explicar su capacidad para interactuar y activar a TRAF6, una proteína de UE ⁽¹⁰⁴⁾.

La infección por cepas CagA⁺ está asociada con el aumento de quimiocinas y al aumento de riesgo de ulceración péptica, atrofia gástrica y cáncer gástrico ⁽¹⁰⁵⁾.

Otros mecanismos de daño al tejido dependiente de *H. pylori* incluyen la alta producción de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la cual está sobreexpresada durante la inflamación ^(106, 107) y puede contribuir al daño oxidativo del DNA ⁽¹⁰⁹⁾. Esto puede aumentar la tasa de mutación en la mucosa gástrica infectada hiperproliferativa y disminuir la tasa de apoptosis en las células del epitelio gástrico ^(106, 108).

La recuperación de la mucosa gástrica después del daño involucra división celular en la zona proliferativa en el cuello de las glándulas gástricas para reemplazar las células perdidas y la migración de células de la superficie mucosa para restablecer la continuidad epitelial.

ANTECEDENTES

Las claudinas son el principal componente transmembranal de las uniones estrechas, tienen un papel fundamental en el sellado hermético de las membranas de las células epiteliales y funcionan como barreras de permeabilidad selectiva a la difusión de iones, nutrientes y patógenos.

Tanto la disminución como el aumento en la expresión de las claudinas es uno de los mecanismos responsables de causar la interrupción estructural y funcional de las uniones estrechas.

Debido a la alta especificidad de los patrones de expresión de las claudinas en cáncer, han sido consideradas como posibles marcadores moleculares útiles para diferenciar tumores con diferente histogénesis e incluso distintos grados de agresividad ⁽¹¹¹⁾.

Se ha propuesto a la claudina 4 como un marcador de lesiones precursoras del adenocarcinoma gástrico, metaplasia intestinal y displasia epitelial ⁽¹³⁶⁾.

Las claudinas 6, 7 y 9 se sobreexpresaron en ambos tipos de adenocarcinoma gástrico, y en relación a la supervivencia de los pacientes puede ser consideradas como indicadoras de mal pronóstico ⁽¹¹⁷⁾.

Con respecto a claudina 10 se ha descrito que el aumento en su expresión está significativamente relacionado con la progresión del carcinoma hepatocelular ⁽¹¹⁵⁾.

Hasta ahora no se ha podido llegar a una conclusión acerca de la relación entre la expresión de claudinas y el cáncer debido a que la expresión ocurre de forma tejido, célula y momento específico, por lo que se requiere la caracterización de la expresión de cada miembro de la familia de las claudinas en varios tipos de cáncer.

HIPÓTESIS

La expresión de las claudinas 6, 7, 9 y 10 es diferencial en distintas etapas del desarrollo del cáncer gástrico, por lo que pueden ser útiles como marcadores del desarrollo de esta patología.

JUSTIFICACIÓN

Nuestro grupo reportó la expresión de claudinas 6, 7 y 9 en biopsias de adenocarcinoma gástrico tipo difuso e intestinal de pacientes positivos a *Helicobacter pylori* ⁽¹¹⁷⁾. Con base en estos hallazgos, y tomando en cuenta que claudina 10 no ha sido analizada en adenocarcinoma gástrico, analizaremos a partir de qué etapa de dicha patología se detecta la expresión de claudinas 6, 7, 9 y 10.

OBJETIVO GENERAL

Analizar los patrones de expresión de las claudinas 6, 7, 9 y 10 en distintas etapas de la progresión del adenocarcinoma gástrico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estudiar, mediante el método de inmunohistoquímica, la expresión de las claudinas 6, 7, 9 y 10 en biopsias de pacientes con gastritis no atrófica, metaplasia y adenocarcinoma gástrico.
- 2) Analizar la expresión de las claudinas en los subtipos de metaplasia (intestinal y colónica) y adenocarcinoma gástrico (intestinal y difuso).
- 3) Caracterizar los patrones de distribución de cada una de las claudinas de acuerdo a la región histológica de las glándulas gástricas.

4) Determinar la localización subcelular (citósol, membrana o núcleo) de cada una de las claudinas en las tres etapas de progresión del adenocarcinoma gástrico.

MATERIAL Y MÉTODOS

COLECTA DE TEJIDO

Las 78 muestras embebidas en parafina (36 de GNA, 31 de metaplasia y 11 de ACG) se obtuvieron del Servicio de Patología del Hospital General de México (SS) y el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional (IMSS), las cuales se obtuvieron inicialmente para analizar la utilidad de pruebas serológicas como biomarcadores de lesiones precancerosas y cáncer gástrico asociadas con *H. pylori*⁽¹³⁵⁾.

Los sujetos de estudio son pacientes mayores de 30 años con síntomas gastrointestinales protocolizados para gastroscopia y biopsia gástrica en ambos hospitales. Se comprobó que fueran positivos a *H. pylori* con la prueba del aliento.

Se excluyeron del estudio los sujetos:

- a) Que habían recibido tratamiento previo para cáncer.
- b) Que habían recibido tratamiento previo en las últimas dos semanas con antibióticos, anti-inflamatorios no esteroideos compuestos de bismuto e inhibidores de la bomba de protones.
- c) Con várices esofágicas.
- d) Con enfermedades crónicas severas.
- e) Con padecimientos mentales.

El protocolo de investigación fue aprobado por las comisiones de ética de ambos hospitales y por el Instituto Nacional de Salud Pública. Cada paciente firmó una carta de consentimiento informado y se le aplicó un cuestionario previamente validado para obtener información sociodemográfica, nivel de educación y hábitos de consumo de tabaco y alcohol.

La definición de caso que se utilizó fue la siguiente:

Gastritis no atrófica: incluye pacientes con mucosa gástrica normal, o aquellos con gastritis no atrófica o superficial, glándulas gástricas en menor cantidad con trastornos en su distribución y morfología.

Metaplasia: se caracteriza por la presencia de epitelio cilíndrico en la superficie del esófago inferior, reemplazando el característico epitelio escamoso.

Adenocarcinoma gástrico: se incluyen sujetos con carcinoma invasor del estómago, todos los subtipos y localizaciones y que no han recibido tratamiento previo.

El diagnóstico final se basó en los resultados del estudio histopatológico, se tomaron seis biopsias, cuatro del antro y dos del cuerpo. Las biopsias fueron colocadas en formalina amortiguada, se incluyeron en bloques de parafina, se realizaron cortes en el micrótopo y las preparaciones se tiñeron con los métodos de tinción de hematoxilina/eosina y Giemsa. El diagnóstico final fue el resultado de la lesión más grave de los seis sitios analizados. Un patólogo con experiencia analizó todos los especímenes.

FIJACIÓN

Las biopsias se colocaron en viales con formalina amortiguada para su fijación (Sigma-Aldrich Cat: P-6148 Lote: 37H0760). Este procedimiento reduce la solubilidad de las proteínas.

INCLUSIÓN

Las biopsias fijadas, se incluyeron en parafina para mantener la forma natural y la arquitectura de la muestra durante el almacenamiento.

CORTE Y MONTAJE

Se obtuvieron cortes de 4 a 5 μm de los tejidos embebidos en parafina con un micrótopo (Leica RM2125RT). Los cortes se montaron en portaobjetos de vidrio tratados con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich Cat: P4707).

DESPARAFINADO E HIDRATACIÓN

Se utilizó el siguiente tren de solventes para eliminar la parafina de los cortes:

Xilol (2 lavados de 5 min)

Xilol/Alcohol [1:1] (1lavado de 5 min)

Alcohol 100% (2 lavados de 5 min)

Alcohol 96% (2 lavados de 5 min)

Agua corriente por 5 min

Para hidratar los tejidos se sumergieron en PBS elaborado en el laboratorio (ver anexo) durante 5 min.

RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA

La fijación con formaldehído genera puentes de metileno en las proteínas, estos puentes pueden enmascarar la presentación antigénica e interferir con la unión del anticuerpo. Para contrarrestar ese efecto, se realizó la recuperación antigénica colocando los cortes en buffer de citratos 0.01M pH 6 (Ver anexo) dentro de un Köplin y calentando a baño maría en el microondas durante 4 min ⁽¹³⁷⁾.

PERMEABILIZACIÓN

Los tejidos se colocaron en solución de PBS-Tritón X-100 0.2% durante 20 min. En este paso se promueve la formación de micro poros, lo que favorece la entrada de los anticuerpos primarios a todas las células del corte.

ELIMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PEROXIDASA ENDÓGENA

El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) suprime la actividad de peroxidasa endógena y por lo tanto reduce la tinción de fondo. Para bloquear la peroxidasa endógena, se colocaron gotas de peróxido de hidrógeno al 3% sobre cada tejido durante 15 min, dentro de una cámara húmeda, seguido de tres lavados con PBS.

BLOQUEO DE PROTEÍNAS NO ESPECÍFICAS

Aunque los anticuerpos muestran afección preferencial para los epítomos específicos, los anticuerpos se pueden unir parcial o débilmente a proteínas no específicas que contengan sitios de unión análogos a los del antígeno diana, la unión no específica provoca alta tinción de fondo que puede enmascarar la detección del antígeno diana.

Para reducir la tinción de fondo, los tejidos se incubaron en solución de PBS-albúmina 2% durante 30 min a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda, seguido de dos lavados con PBS-Tween 20 al 0.05%, el siguiente paso es la inmunodetección.

INMUNODETECCIÓN

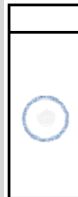
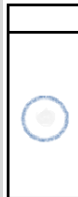
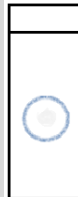
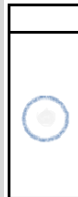
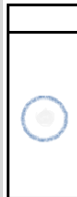
Anticuerpos Primarios

Se incubaron los siguientes anticuerpos primarios (Tabla 2) diluidos en PBS-albúmina 1% en cámara húmeda a 4°C durante 12 horas. La concentración adecuada se determinó basándonos en la recomendación de la hoja técnica y titulando cada anticuerpo.

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para la inmunodetección de claudina 6, 7, 9 y 10.

ANTICUERPO	MARCA	DILUCIÓN
Cabra anti-Claudina 6 (200 µg/ml) Policlonal	Santa Cruz Biotechnology (Cat: sc-17669 Lote: H2112)	1:250 (0.8 µg/ml)
Ratón anti-Claudina 7 (500 µg/ml) Monoclonal	Invitrogen (Cat: 37-4800 Lote: 1082955A)	1:200 (0.8 µg/ml)
Cabra anti-Claudina 9 (200 µg/ml) Policlonal	Santa Cruz Biotechnology (Cat: sc-17672 Lote:A1112)	1:250 (2.5 µg/ml)
Conejo anti-Claudina 10 (250 µg/ml) Policlonal	Invitrogen (Cat: 38-8400 Lote: 1449526A)	1:50 (5 µg/ml)

De cada paciente se obtuvieron 5 cortes, en cada uno, se inmunodetectó la expresión de una de las cuatro isoformas de las claudinas. Todos los ensayos de inmunolocalización se corrieron con una preparación como control negativo a la cual no se le adicionó anticuerpo primario.

	Control Negativo	Cabra anti- Claudina 6	Ratón anti- Claudina 7	Cabra anti- Claudina 9	Conejo anti- Claudina 10
Paciente 1					

Amplificación de la señal con Kit DAKO

Se utilizó el kit Dako LSAB+System-HRP (Cat: K0679) para detectar los sitios donde se acoplaron los anticuerpos primarios en esta investigación. Los anticuerpos primarios producidos en ratón, conejo o cabra son reconocidos por el anticuerpo secundario biotinilado al cual se une la estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP).

Se incubaron los tejidos con el mix de anticuerpos secundarios biotinilados durante 20 min, y se realizaron lavados con PBS-Tween 20 al 0.05%. En seguida se incubaron los tejidos con estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano durante 20 min en cámara húmeda y posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0.05%.

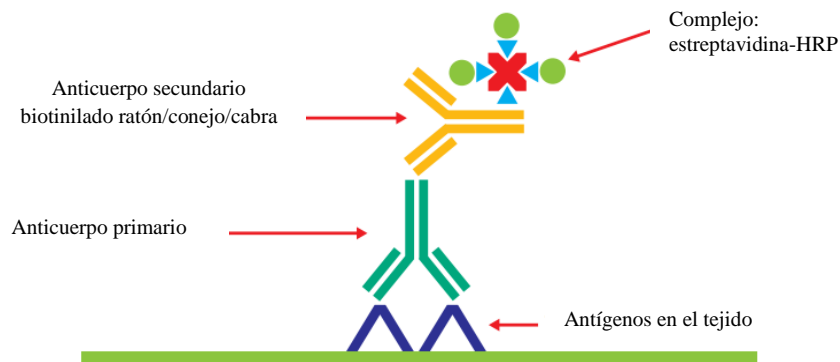


Figura 10. Interacciones moleculares necesarias para realizar una detección inmunohistoquímica (Modificada de Kumar, G., Rudbeck, L., 2009 ¹³¹).

Revelado de HRP con Diaminobenzidina

La reacción de coloración se desarrolla usando una solución sustrato-cromógeno, resultando en un precipitado coloreado en el sitio del antígeno. El sustrato es peróxido de hidrógeno y el cromógeno es 3,3'-diaminobenzidina (DAB).

Se preparó una solución con 20 µl de DAB en 1 ml de la solución amortiguadora sustrato (peróxido de hidrógeno), y se colocó sobre el corte de tejido hasta observar coloración café. Para detener la reacción se realizaron 3 lavados con agua corriente.

CONTRATINCIÓN

Después de la inmunolocalización cromogénica del antígeno diana (la cual es una marca de color café), es necesario proporcionar contraste para mostrar un entorno celular, y que la marca principal destaque, para tal fin, se adicionó Hematoxilina (Biocare Cat: CATHE H) en los cortes durante 4 min y se eliminó el excedente realizando lavados con agua corriente.

DESHIDRATACIÓN

Los tejidos se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol y finalmente xilol:

Alcohol 96% (2 lavados de 5 min)

Alcohol 100% (2 lavados de 5 min)

Xilol/Alcohol [1:1] (1 lavado de 5 min)

Xilol (2 lavados de 5 min)

MONTAJE

Los tejidos se cubrieron con 40 μ l de medio de montaje Richard-Allan (Thermo Scientific, Cat: 4111) y se colocó un cubre objetos.

OBSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Las imágenes de los cortes se obtuvieron con la cámara del microscopio Nikon Eclipse 80i y se estandarizaron los parámetros de captura con el Software NIS Elements F.

Para la elaboración de la base de datos se tomó en cuenta si la muestra expresaba o no cada una de las claudinas, en qué región de la glándula se expresaba (epitelio superficial, fosas, cuerpo y fondo) y la localización subcelular (membrana, citosol o núcleo).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tanto la relación potencial entre la expresión de la claudinas y el estado de progresión del adenocarcinoma gástrico, como la relación entre la expresión de las claudinas con respecto al tipo de metaplasia y adenocarcinoma se probó usando la prueba χ^2 en donde los datos con $P < 0.05$ se consideraron como significativos. La región histológica y localización subcelular fue analizada comparando los promedios de expresión.

Las pruebas fueron realizadas en SPSS 10.0 Microsoft Excel 2010.

RESULTADOS

Características de la población analizada.

En la Tabla 3 se muestran las características de la población analizada basados en datos clínicos de cada paciente. La edad promedio de los pacientes está entre los 50 y 60 años, entre el 63% y el 72% de los pacientes analizados son *H. pylori* Cag A⁺ y el consumo de tabaco y alcohol se presentó en aproximadamente el 50%. De acuerdo a lo ya reportado, los pacientes positivos a *H. pylori* Cag A⁺ tienen un riesgo mayor de desarrollar transformación celular⁽⁷⁸⁾.

Tabla 3. Características generales de la población analizada.

	Gastritis no atrófica		Metaplasia		Adenocarcinoma Gástrico	
	n=36	%	n=31	%	n=11	%
Media de Edad (DE)	49.3 (13.4)		60.5 (12.9)		62.3 (12.6)	
Sexo						
Femenino	24	66.7	19	61.3	7	63.6
Masculino	12	33.3	12	38.7	4	36.4
Tabaco						
No	19	52.8	18	58.1	7	63.6
Si	17	47.2	13	41.9	4	36.4
Alcohol						
No	18	50.0	17	54.8	8	72.7
Si	18	50.0	14	45.2	3	27.3
Hp (-) Cag A (-)	5	13.9	3	9.7	1	9.1
Hp (+) Cag A (-)	5	13.9	1	3.2	3	27.3
Hp (+) Cag A (+)	26	72.2	27	87.1	7	63.6

DE: desviación estándar

Análisis de la Expresión de claudina 6, 7, 9 y 10 por ensayos de Inmunohistoquímica

La expresión de las claudinas fue analizada en cada una de las muestras utilizando anticuerpos específicos contra cada proteína. La especificidad de la tinción de cada prueba fue corroborada utilizando controles negativos (sin anticuerpo primario). En la Figura 11 se observan microfotografías representativas de pacientes con gastritis no atrófica, metaplasia y adenocarcinoma en las que se obtuvo señal positiva para las claudinas 6, 7, 9 y 10.

A la fecha hay pocos estudios en los cuales se observe la expresión de estas claudinas en lesiones gástricas tempranas.

Como se observa en la figura 11, se observó señal positiva a nivel glandular para las claudinas 6, 7, 9 y 10 en las tres tipos de tejidos analizados, gastritis no atrófica, metaplasia y adenocarcinoma. Claudina 6 dio una señal muy suave en la mayoría de las muestras observándose como pequeñas vesículas dentro y fuera de las células positivas.

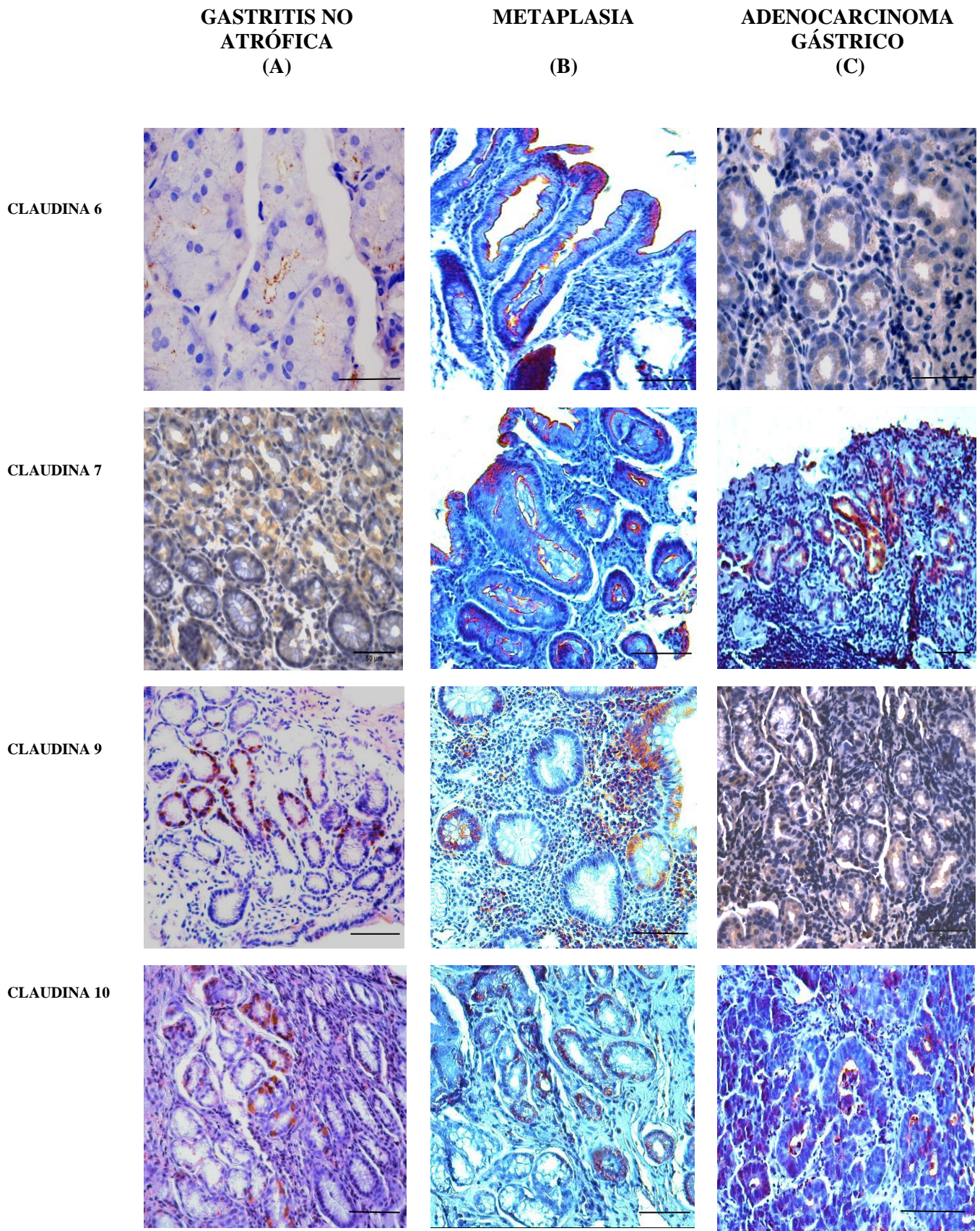


Figura 11. Tinción inmunohistoquímica representativa de claudina 6, 7, 9 y 10 en tres etapas de progresión del adenocarcinoma gástrico. Columna (A) gastritis no atrófica, (B) metaplasia, (C) adenocarcinoma gástrico. La tinción se localiza principalmente en citoplasma y en la membrana apical de las células epiteliales (40X) Barra: 50 μ m. Las proteínas se visualizaron utilizando DAB, se contra tiñeron con hematoxilina y se observaron en un microscopio óptico de campo claro.

Análisis de la expresión de claudina 6, 7, 9 y 10 en gastritis no atrófica (GNA), metaplasia y adenocarcinoma gástrico (ACG)

El análisis estadístico de la expresión de estas claudinas mostró que claudina 6 se presentó en el 88.9% del grupo de pacientes con GNA, 54.8% del grupo con metaplasia y 54.5% del grupo con ACG (Tabla 4.). Basándonos en la prueba de χ^2 podemos observar que la expresión fue significativamente diferente al comparar los grupos de pacientes con GNA vs. metaplasia ($P < 0.005$) y pacientes con metaplasia vs. ACG ($P < 0.05$).

La expresión de claudina 7 se presentó en el 69.4% del grupo con GNA, 27.2% del grupo con metaplasia y 22.6% del grupo con ACG. Al comparar mediante la prueba de χ^2 observamos que la expresión fue significativamente diferente al comparar entre GNA vs. metaplasia ($P < 0.001$) y metaplasia vs. ACG ($P < 0.05$).

Tabla 4. Expresión diferencial de claudina 6, 7, 9 y 10

	GNA n=36 %	Metaplasia n=31 %	p*	ACG n=11 %	p*
Claudina 6	88.9	54.8	0.002	54.5	0.011
Claudina 7	69.4	27.2	0.001	22.6	0.013
Claudina 9	77.8	58.1	0.083	45.5	0.040
Claudina 10	50.0	6.5	0.001	45.5	0.792

Claudina 9 se detectó en el 77.8% del grupo de pacientes con GNA, 58.1% del grupo con metaplasia y 45.5% del grupo de ACG. Sin embargo la prueba de χ^2 mostró que la expresión solo es significativamente diferente al comparar entre metaplasia vs. ACG ($P < 0.05$).

Claudina 10 se detectó en el 50.0% del grupo con GNA, 6.5% del grupo con metaplasia y 45.5% del grupo de ACG. La prueba de χ^2 únicamente mostró una diferencia

significativa en la expresión de claudina 10 al comparar entre GNA vs. metaplasia ($P < 0.001$) como se observa en la Tabla 3.

En nuestro análisis, se observó una expresión significativa de claudinas 6, 7 y 10 al comparar los grupos de GNA y metaplasia. Sin embargo, al comparar la expresión entre los grupos de metaplasia y ACG se observó una diferencia significativa para las claudinas 6, 7 y 9. Estos datos concuerdan con lo ya reportado en donde se muestra la expresión de estas claudinas en el adenocarcinoma gástrico ⁽¹¹⁷⁾.

Análisis de la expresión de claudina 6, 7, 9 y 10 con respecto al subtipo de metaplasia y adenocarcinoma

- Metaplasia (subtipo intestinal y colónica)

Los resultados obtenidos en el análisis de las claudinas 6 y 9 no mostraron diferencias importantes entre las variables histopatológicas. Sin embargo se observó una mayor expresión de claudina 7 en muestras de pacientes con metaplasia colónica (29.4%) al compararlo con la metaplasia intestinal (14.3%) ($P < 0.05$). La expresión de claudina 10 se observó en las biopsias con metaplasia tipo intestinal (14.3%) y su expresión en metaplasia colónica fue nula $p < 0.05$ (Figura 12).

- Adenocarcinoma (subtipo intestinal y difuso)

La clasificación histopatológica de Jarvi y Lauren (1965) subdivide al adenocarcinoma gástrico en dos entidades histomorfológicas separadas: intestinal y difuso. Estas difieren en su epidemiología, patogénesis, desenlace clínico y perfil genético mostrando, al mismo tiempo, diferentes grados de diferenciación, por lo tanto, la búsqueda de marcadores específicos que puedan servir como indicadores del pronóstico es un reto.

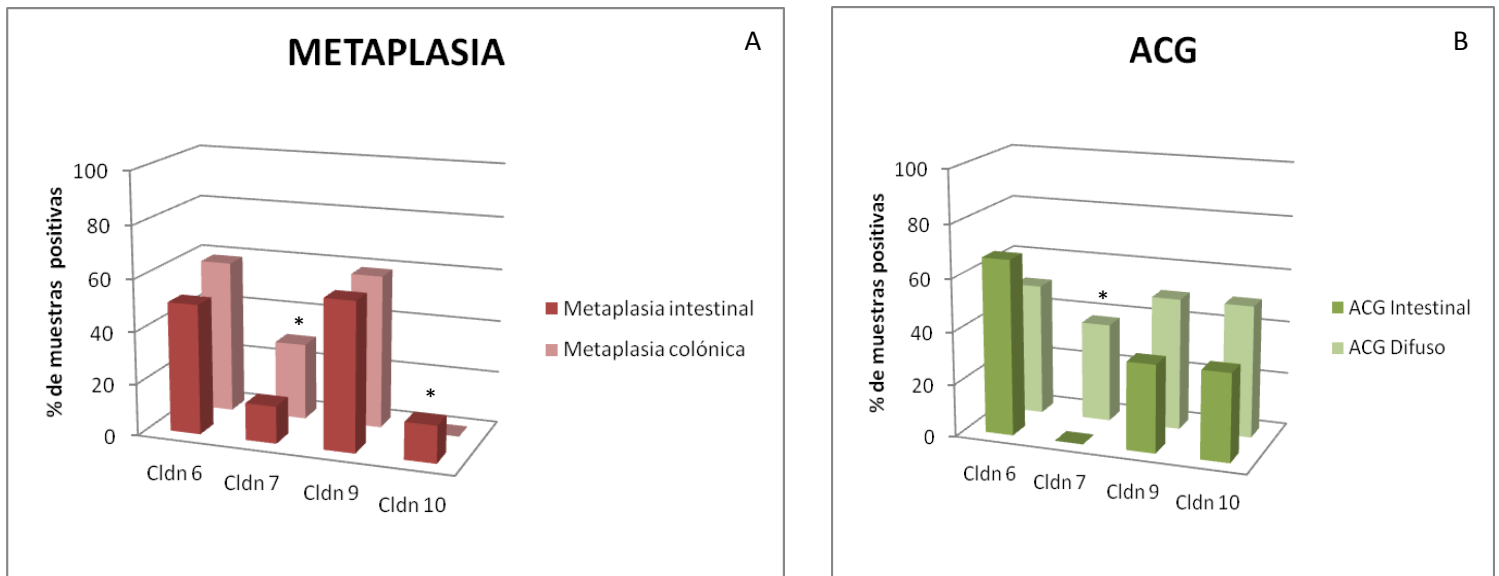


Figura 12. Expresión de claudina 6, 7, 9 y 10 entre subtipos de metaplasia (n=31) y adenocarcinoma (n=11). **A)** Expresión diferencial entre metaplasia intestinal (n=14) y colónica (n= 17) y **B)** los subtipos de adenocarcinoma intestinal (n=3) y difuso (n=8). (χ^2 p<0.05* p<0.01**)

En el presente estudio, encontramos que la tasa de expresión de claudina 7 fue de 37.5% en adenocarcinoma gástrico tipo difuso y no se expresó en biopsias de adenocarcinoma de tipo intestinal $p < 0.05$ por lo que la podemos considerar a la claudina 7 como un marcador distintivo de ACGD.

En un estudio de nuestro grupo en el que se evaluó la expresión de diversas claudinas se observó que la claudina 9 mostró una expresión significativa en ACGD y esto correlacionaba con el índice de mortalidad ⁽¹¹⁷⁾. En este estudio no se observaron diferencias significativas en la expresión de las claudinas 6, 9, y 10 sin embargo, todas mostraron una mayor expresión en ACGD en comparación con el ACGI (Figura 12).

Análisis de la expresión de claudina 6, 7, 9 y 10 con respecto a la región de la glándula y a la localización subcelular.

Región de la glándula.

En la Figura 13 se muestra un esquema de la histología característica del epitelio gástrico en el cual se muestran los diferentes tipos celulares así como su localización. Las glándulas evaluadas fueron glándulas corpofúndicas, características del cuerpo y el fondo del estómago. Son de tipo tubular simple, aunque dos o tres de estas glándulas

pueden desembocar en una misma fosea gástrica y tener los extremos distales ramificados.

En estas glándulas se distinguen varias zonas: de arriba hacia abajo el epitelio superficial, la fosa, el cuerpo, y el fondo.

El epitelio superficial está caracterizado por la presencia de células de recubrimiento de la superficie. En las fosas se encuentran células de recubrimiento de la superficie y células regenerativas. El cuerpo de las glándulas presenta células secretoras de moco, células oxínticas (parietales). El fondo contiene células cimógenas (principales) y células enteroendocrinas.

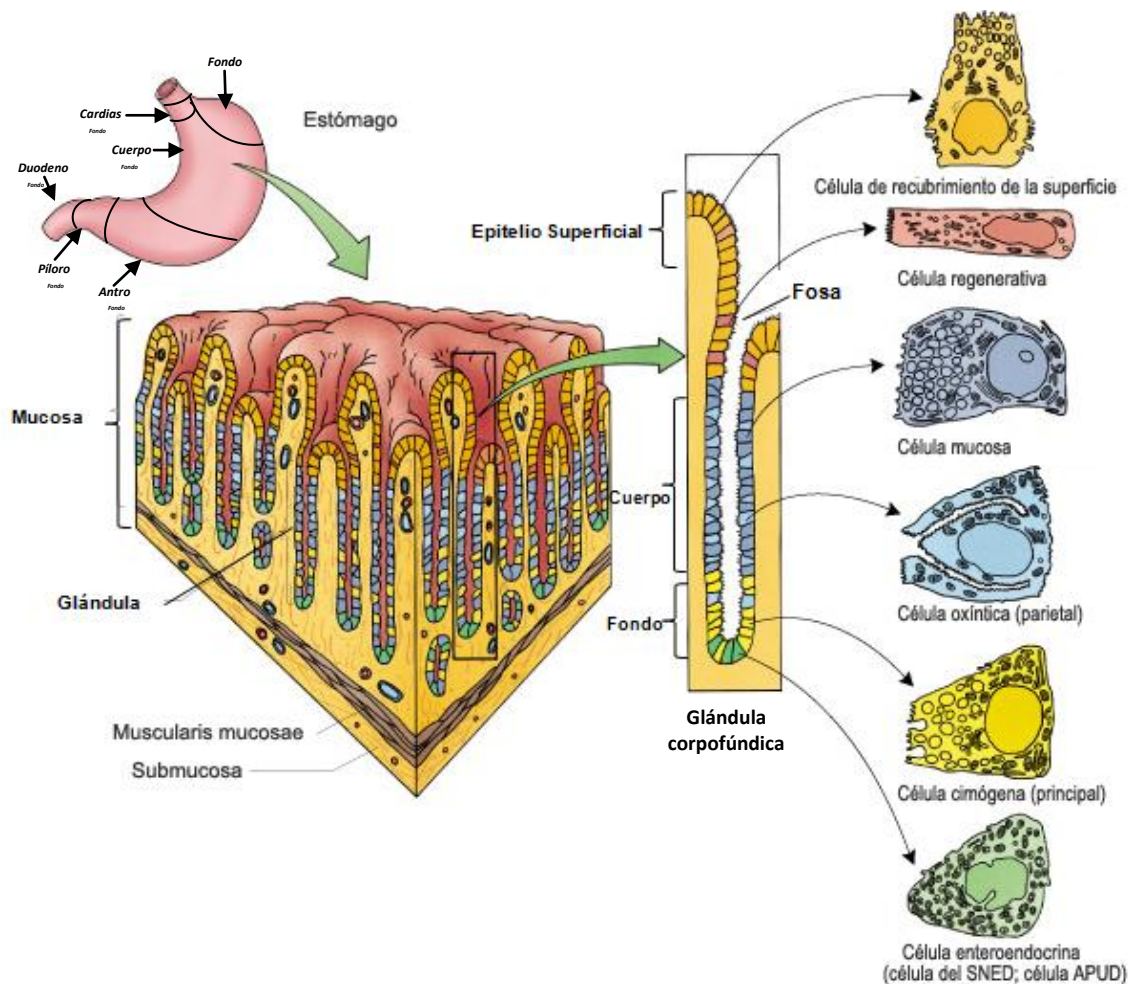


Figura 13. Histología del epitelio gástrico. Las glándulas corpofúndicas se encuentran en el cuerpo y el fondo del estómago. Se pueden distinguir las diferentes regiones de la glándula y la composición celular distintiva de cada región (Modificada de Gartner, 2003 ¹³²).

Tomando en cuenta que cada región de la glándula contiene distinta composición celular según la profundidad, analizamos el patrón de expresión de cada una de las

claudinas en cada región para saber si existía una relación con las etapas de progresión del adenocarcinoma. De esta manera pudimos determinar que, en el epitelio superficial, claudina 7 aumenta en relación con la progresión tumoral. En las fosas gástricas la claudina 6 y en el fondo la claudina 9 disminuyeron con respecto a la progresión tumoral. La claudina 10 no mostró ninguna tendencia (Figura 14).

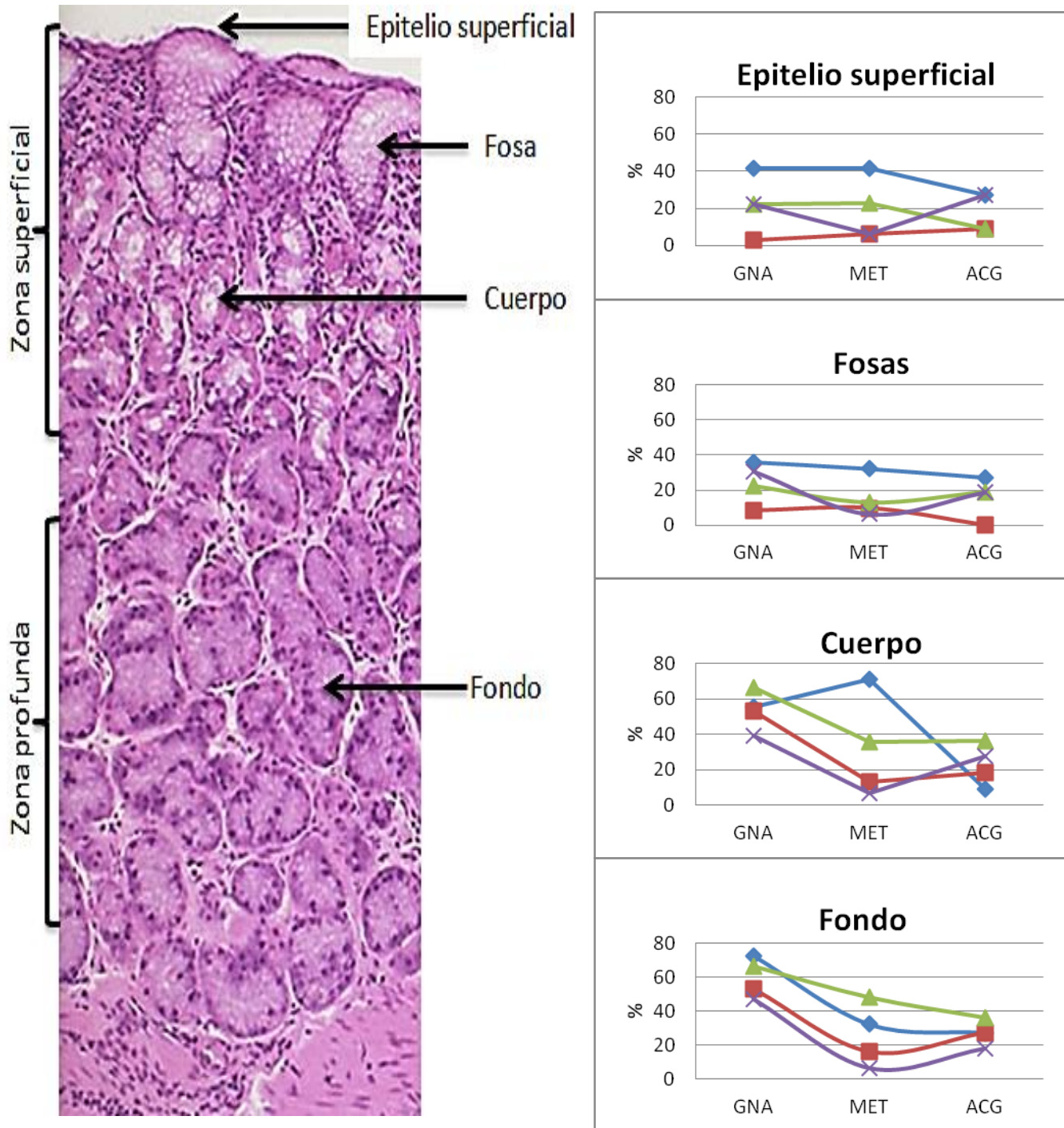


Figura 14. Imagen representativa de las glándulas en la que se indican las distintas regiones evaluadas (Izquierda). En las gráficas se observa el porcentaje de expresión de cada claudina en las diferentes regiones histológicas en los tres estadios de progresión del ACG. La tendencia más notable es la disminución de claudina 6 en las fosas y claudina 9 en el fondo.

Localización Subcelular

Se ha demostrado que bajo ciertas condiciones, las claudinas se pueden localizar en el citoplasma (incluidas en microvesículas) de tejidos normales y neoplásicos. En diversos tipos de cáncer se ha descrito que incluso cuando el nivel de expresión no cambia, la localización de las claudinas se altera ⁽¹²¹⁾. Aunque el papel exacto de las claudinas citoplasmáticas es desconocido, se le ha relacionado con el tráfico de vesículas de la ruta secretora, la fosforilación de las claudinas ⁽⁴⁰⁾, e incluso con vías de señalización celular.

En nuestro análisis, la expresión de las cuatro claudinas analizadas, se detectó principalmente en el citoplasma de las muestras con gastritis no atrófica, metaplasia y adenocarcinoma gástrico. Cabe mencionar que, a diferencia de las otras claudinas, una pequeña proporción de claudina 6 se detectó en la membrana en las 3 etapas de progresión (Figura 15).

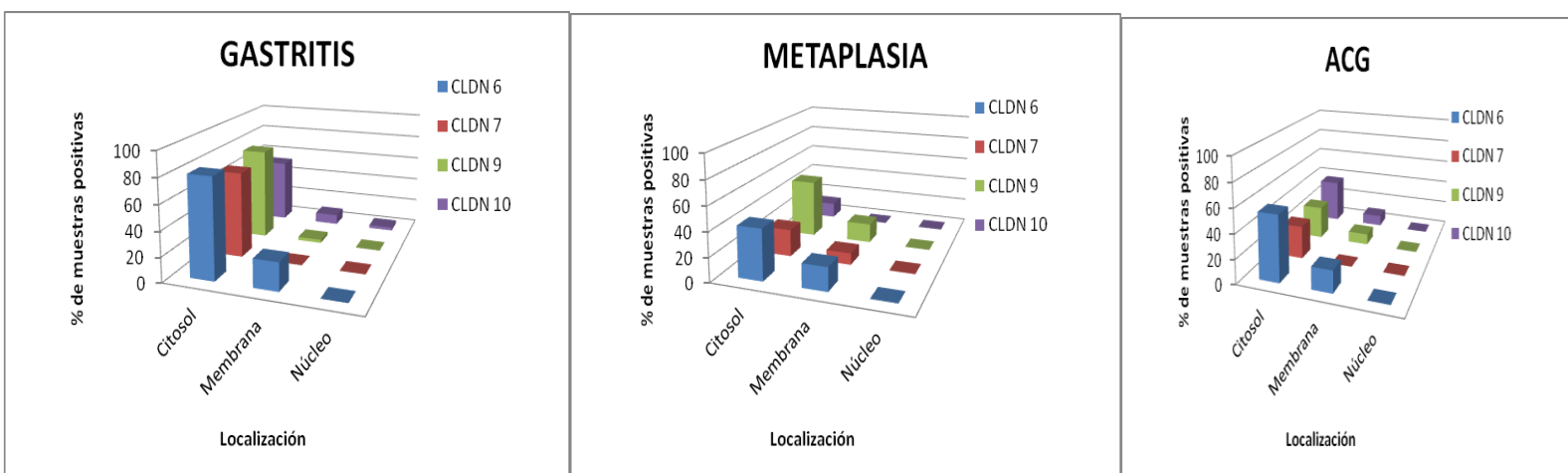


Figura 15. Localización subcelular de las claudinas en tres etapas de progresión del adenocarcinoma gástrico. Es predominante la expresión en citosol y en las tres etapas la claudina 6 también se mantiene en la membrana.

DISCUSIÓN

Las claudinas son componentes esenciales para el mantenimiento y función de las uniones estrechas en los epitelios y endotelios. Su expresión es tejido específica y en lesiones cancerígenas malignas y premalignas se han observado cambios importantes en su expresión. Tanto el aumento como la disminución de un miembro de la familia de las claudinas puede tener un impacto significativo en la función de las uniones estrechas ⁽¹¹⁹⁾.

En nuestra investigación se observó señal positiva para las claudinas 6, 7, 9 y 10 en todos los estados de progresión del adenocarcinoma gástrico analizados. Al comparar la expresión entre los grupos de metaplasia y ACG se observó una diferencia significativa para las claudinas 6, 7 y 9.

Un estudio mostró que la disminución en la expresión de claudina 6 aumenta el crecimiento tumoral y promueve la invasividad celular en cáncer de mama ⁽¹¹²⁾, lo que sugiere que esta claudina podría funcionar como un supresor tumoral. Por otro lado en células de adenocarcinoma gástrico, la sobreexpresión de claudina 6 aumenta su invasión, migración, y proliferación ⁽¹¹³⁾.

Claudina 7 también ha sido detectada en procesos de tumorigénesis, se ha propuesto que tiene un papel estructural y regulador muy importante, relacionado con procesos de diferenciación celular ⁽¹²⁴⁾. Se ha sugerido que claudina 7 pueda tener la función de supresor tumoral ya que en células de cáncer de pulmón, inhibe la migración y la invasión celular ⁽¹¹⁴⁾.

Huang et al. observaron que claudina 10 está sobreexpresada en carcinoma hepatocelular, y el aumento en su expresión está relacionado con la progresión, y con un peor pronóstico de supervivencia ⁽¹¹⁵⁾, en el caso del adenocarcinoma gástrico no tuvo una expresión homogénea que nos permita relacionarlo con el desenlace neoplásico.

En adenocarcinoma gástrico, la expresión de las claudinas 1, 2, 3 y 4, varía significativamente dependiendo de si es de tipo difuso o intestinal ⁽¹¹⁶⁾.

En nuestro estudio se observó una mayor expresión de claudina 7 en muestras de pacientes con metaplasia colónica y la expresión de claudina 10 aumentó en metaplasia tipo intestinal, debido a que los cambios en la expresión son significativos, es posible utilizar dichas claudinas como marcadores para diferenciar los dos subtipos.

En trabajos previos se observó que la claudina 7, aumenta su expresión en metaplasia intestinal y adenocarcinoma gástrico tipo difuso ⁽¹²⁷⁾ y claudina 10 tiene una baja expresión en el cáncer gástrico a diferencia del tejido normal circundante ⁽¹²⁵⁾.

Al analizar la expresión de las claudinas en las distintas regiones de la glándula, pudimos determinar que en el epitelio superficial la claudina 7 aumenta en relación con la progresión tumoral. En las fosas gástricas la claudina 6 y en el fondo la claudina 9 disminuyeron con respecto a la progresión tumoral.

La localización de las claudinas es transmembranal, sin embargo, en nuestro análisis, se observaron principalmente en el citoplasma en las tres etapas de progresión analizadas, claudina 6 se observó en membrana, en menor proporción.

Se ha demostrado que bajo ciertas condiciones, las claudinas se pueden localizar en el citoplasma de tejidos normales y neoplásicos. En diversos tipos de cáncer se ha descrito que incluso cuando el nivel de expresión no cambia, la localización de las claudinas se altera ⁽¹²¹⁾ probablemente la localización atípica influya en el proceso de transformación celular en la progresión del adenocarcinoma gástrico. Aunque el papel exacto de las claudinas citoplasmáticas es desconocido, se le ha relacionado con el tráfico de vesículas de la ruta secretora, la fosforilación de las claudinas ⁽⁴⁰⁾, e incluso con vías de señalización celular.

Con respecto al transporte vesicular, se ha reportado que las proteínas mutantes mal plegadas se acumulan en la región perinuclear de la célula ^(27, 54). Se ha demostrado que la fosforilación anormal disminuye las funciones de las UE y promueve su deslocalización ⁽¹²¹⁾.

Por otro lado, se ha acumulado evidencia de que las claudinas se involucran en la señalización intracelular ⁽¹²²⁾, también se ha observado que después del estímulo de una herida aumenta la migración y se induce la deslocalización de claudina 3 ⁽¹²³⁾.

En otro trabajo en el que se analizó la expresión de claudina 4 y 7 mediante microarreglos en carcinoma de células escamosas de esófago, se perdió la expresión típica de dichas claudinas, localizadas en la membrana de los queratinocitos del esófago normal. En su lugar, las claudinas fueron localizadas en el área de citoplasma y perinuclear. La pérdida de expresión de claudinas en la membrana y su relocalización en el núcleo y el citoplasma se ha observado anteriormente, en carcinoma de colon y de mama⁽¹²⁰⁾.

El presente estudio tiene algunas limitaciones, aunque el análisis incluyó la evaluación de cuatro claudinas, se obtuvo un número relativamente pequeño de casos, y no se realizó un análisis transcripcional.

CONCLUSIONES

En conclusión, podemos afirmar que claudina 7 está aumentada en metaplasia colónica, lo que la hace un marcador probable para identificar este subtipo. Por otro lado, la expresión de claudina 10 está aumentada en metaplasia intestinal y en metaplasia colónica está ausente, por lo que se considera el mejor marcador para diferenciar los subtipos.

Con respecto a los subtipos de adenocarcinoma gástrico, en el de tipo difuso, aumentan las claudinas 7, 9 y 10, sin embargo, en este caso la 7 es más indicativa ya que no se observó en el tipo intestinal.

La localización de las claudinas analizadas se observó en el citoplasma, detectando una disminución de claudina desarrollo 6 en fosas y de claudina 9 en fondo de la glándula.

La aportación de este estudio radica en la detección de estas claudinas en etapas tempranas al de este padecimiento.

Las claudinas, podrían ser consideradas clínicamente como marcadores moleculares factibles para la focalización de la progresión del cáncer gástrico.

REFERENCIAS

1. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: A multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol.* **286**, C1213–28 (2004).
2. Schulze C, Firth JA. Immunohistochemical localization of adherens junction components in blood-brain barrier microvessels of the rat. *J Cell Sci.* **104**, 773–782 (1993).
3. Balda MS, Matter K. Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 61–7 (2009).
4. Barrios-Rodiles M, Brown KR, Ozdamar B et al. Highthroughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian Block G: Epidemiologic evidence regarding vitamin C and cancer. *AmJ Clin Nutr.* **54**, 1310S–1314S (1991).
5. Murata M, Kojima T, Yamamoto T et al. Down-regulation of survival signaling through MAPK and Akt in occludin deficient mouse hepatocytes in vitro. *Exp Cell Res.* **310**, 140–51 (2005).
6. Zhao B, Tumaneng K, Guan KL. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat Cell Biol.* **13**, 877–83 (2011).
7. Yi C, Troutman S, Fera D, Stemmer-Rachamimov A, Avila JL, Christian N, Persson NL, Shimono A, Speicher DW, Marmorstein R, Holmgren L, Kissil JL. A tight junction-associated Merlin-angiomotin complex mediates Merlin's regulation of mitogenic signaling and tumor suppressive functions. *Cancer Cell* **19**, 527–40 (2011).
8. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.* **2**, 361–7 (2001).
9. Sawada N, Murata M, Kikuchi K, Osanai M, Tobioka H, Kojima T, Chiba H. Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc.* **36**, 147–56 (2003).
10. Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol.* **68**, 403–429 (2006).
11. Tsukita S, Furuse M. The Structure and Function of Claudins, Cell Adhesion Molecules at Tight Junctions. *Ann N Y Acad Sci.* **35**, 915:129 (2000).

12. Angelow S, Schneeberger EE, Yu AS. Claudin-8 expression in renal epithelial cells augments the paracellular barrier by replacing endogenous claudin-2. *J Membr Biol* **215**, 147–159 (2007).
13. Leotlela PD, Wade MS, Duray PH et al. Claudin-1 overexpression in melanoma is regulated by PKC and contributes to melanoma cell motility. *Oncogene* **26**, 3846-56 (2007).
14. Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol.* **147**, 1351–1363 (1999).
15. Nakamura T, Blechman J, Tada S, Rozovskaia T, Itoyama T, Bullrich F, Mazo A, Croce CM, Geiger B, Canaani E. huASH1 protein, a putative transcription factor encoded by a human homologue of the *Drosophila ash1* gene, localizes to both nuclei and cell-cell tight junctions. *Proc Natl Acad Sci USA* **13**, 7284-9 (2000).
16. Suzuki A, Ohno S. The PAR-aPKC system: Lessons in polarity. *J Cell Sci.* **119**, 979–87 (2006).
17. Hitoshi satoh, Hun Hhong, Hiroshi Isomura, Masato Saitoh, Katsuhiko Enomoto, Norimasa Sawada, and Michio Mori. Localization of 7h6 tight junction-associated antigen along the cell border of vascular endothelial cells correlates with paracellular barrier function against ions, large molecules, and cancer cells. *Exp Cell Res.* **222**, 269–274 (1996)
18. Marcelino Cerejjido, Rubén G. Contreras, David Flores-Benítez, Catalina Flores Maldonado, Isabel Larre, Agustín Ruiz, and Liora Shoshani. New Diseases Derived or Associated with the Tight Junction. *Arc of Med Res.* **38**, 465-478 (2007).
19. Wegmann F, Ebnet K, Du Pasquier L, Vestweber D, Butz S. Endothelial adhesion molecule ESAM binds directly to the multidomain adaptor MAGI-1 and recruits it to cell contacts. *Cell Res.* **15**, 121-33 (2004).
20. Osler ME, Chang MS, Bader DM. Bves modulates epithelial integrity through an interaction at the tight junction. *J Cell Sci.* **118**, 4667–78 (2005).
21. Cummins PM. Occludin: One protein, many forms. *Mol Cell Biol.* **32**, 242–50 (2012).

22. Hideki Chiba, Makoto Osanai, Masaki Murata, Takashi Kojima, Norimasa Sawada Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 588–600 (2008).
23. Angelow S, Ahlstrom R, Yu AS. Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol* **295**, F867–F876 (2008).
24. Furuse M, Tsukita S. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol.* **16**, 181-8 (2006).
25. Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C, and Anderson JM. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* **283**, C142–147 (2002).
26. Evans MJ, von Hahn T, Tschernhe DM, Syder AJ, Panis M, Wölk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **7137**, 801-5. (2007).
27. Piontek J, Winkler L, Wolburg H, Muller SL, Zuleger N, Piehl C, Wiesner B, Krause G, and Blasig IE. Formation of tight junction: Determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J.* **22**, 146–158 (2008).
28. Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y, Tsukita S. Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol.* **147**, 195–204 (1999).
29. Miyamori H, Takino T, Kobayashi Y, Tokai H, Itoh Y, Seiki M, Sato H, Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y, Tsukita S. Claudin promotes activation of pro-matrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-type matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* **276**, 28204–11 (2001).
30. Hamazaki Y, Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J Biol Chem.* **277**, 455–461 (2002).
31. Roh MH, Liu CJ, Laurinec S, Margolis B. The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight

- junctions. *J Biol Chem.* **277**, 27501–27509 (2002).
32. 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.* **116**, 1959–67 (2003).
33. 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.* **203**, 15-26 (2005).
34. Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* **81**, 1-44 (2003).
35. 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.* **279**, 3543-3552 (2004).
36. Morin PJ: Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res.* **65**, 9603-9606 (2005).
37. Kramer F, White K, Kubbies M, Swisshelm K, Weber BH. Genomic organization of claudin-1 and its assessment in hereditary and sporadic breast cancer. *Hum Genet.* **107**, 249-256 (2000).
38. Resnick MB, Konkin T, Routhier J, Sabo E, Pricolo VE: Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Mod Pathol.* **18**, 511-518 (2005).
39. Agarwal R, D'Souza T, Morin PJ. Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer Res.* **65**, 7378-7385 (2005).
40. Madhu Lal-Nag and Patrice J Morin. Protein family review: The claudins. *Genome Biology.* **10**, 235.1-235.7 (2009).
41. Van Itallie CM, Gambling TM, Carson JL, and Anderson JM. Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization. *J Cell Sci.* **118**,

- 1427– 1436 (2005).
42. Nusrat A, Parkos CA, Verkade P, Foley CS, Liang TW, Innis-Whitehouse W, Eastburn KK, Madara JL. Tight junctions are membrane microdomains. *J Cell Sci.* **113**, 1771– 1781(2000).
43. D’Souza T, Agarwal R, Morin PJ. Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMPdependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *J Biol Chem.* **280**, 26233–26240 (2005).
44. Ikari A, Matsumoto S, Harada H, Takagi K, Hayashi H, Suzuki Y, Degawa M, Miwa M. Phosphorylation of paracellin-1 at Ser217 by protein kinase A is essential for localization in tight junctions. *J Cell Sci.* **119**, 1781–1789 (2006).
45. Banan A, Zhang LJ, Shaikh M, Fields JZ, Choudhary S, Forsyth CB, Farhadi A, Keshavarzian A. theta Isoform of protein kinase C alters barrier function in intestinal epithelium through modulation of distinct claudin isotypes: a novel mechanism for regulation of permeability. *J Pharmacol Exp Ther.* **313**, 962–982 (2005).
46. Turner JR, Angle JM, Black ED, Joyal JL, Sacks DB, Madara JL. PKC-dependent regulation of transepithelial resistance: roles of MLC and MLC kinase. *Am J Physiol.* **277**, C554–562 (1999).
47. Haorah J, Heilman D, Knipe B, Chrastil J, Leibhart J, Ghorpade A, Miller DW, Persidsky Y. Ethanol-induced activation of myosin light chain kinase leads to dysfunction of tight junctions and blood-brain barrier compromise. *Alcohol Clin Exp Res.* **29**, 999–1009 (2005).
48. Mary K. Findley and Michael Koval. Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins *IUBMB Life* **61**, 431–437 (2009).
49. Ellgaard L and Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**, 181–191 (2003).
50. Sitia R and Molteni SN. Stress, protein (mis) folding, and signaling: The redox connection. *Sci STKE* **239**, 22-27 (2004).
51. Mitic LL, Unger VM, Anderson JM. Expression, solubilization, and biochemical characterization of the tight junction transmembrane protein claudin-4. *Protein Sci;* **12**, 218-27 (2003).

52. Coyne CB, Gambling TM, Boucher RC, Carson JL, Johnson LG. Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **285**, L1166-78 (2003).
53. Van Itallie CM, Mitic LL, Anderson JM. Claudin-2 forms homodimers and is a component of a high molecular weight protein complex. *J Biol Chem.* **286**, 3442-50 (2011).
54. Kausalya PJ, Amasheh S, Günzel D, Wurps H, Müller D, Fromm M, et al. Disease associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg²⁺ transport function of Claudin-16. *J Clin Invest.* **116**, 878- 91 (2006).
55. Koval M. Claudin Heterogeneity and Control of Lung Tight Junctions. *Annu Rev Physiol.* **75**, 551-67 (2013).
56. Hou J, Renigunta A, Yang J, Waldegger S. Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proc Natl Acad Sci USA.* **107**, 18010- 5 (2010).
57. Piontek J, Fritzsche S, Cording J, Richter S, Hartwig J, Walter M, et al. Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands. *Cell Mol Life Sci.* **68**, 3903-18 (2011).
58. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**, 285–93 (2001).
59. Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, and Thompson JD. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3497–3500 (2003).
60. Furuse M, Sasaki H, Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol.* **147**, 891–903 (1999).
61. Weinstein RS, Merk FB, Alroy J. The structure and function of intercellular junctions in cancer. *Adv Cancer Res.* **23**, 23–89 (1976).
62. Soler AP, Miller RD, Laughlin KV, Carp NZ, Klurfeld DM, Mullin JM. Increased tight junctional permeability is associated with the development of colon cancer. *Carcinogenesis* **20**, 1425–31 (1999).

63. Mullin JM. Potential interplay between luminal growth factors and increased tight junction permeability in epithelial carcinogenesis. *J Exp Zool.* **279**, 484–9 (1997).
64. Martin TA, Jiang WG. Tight junctions and their role in cancer metastasis. *Histol Histopathol.* **16**, 1183–95 (2001).
65. Tobioka H, Sawada N, Zhong Y, Mori M. Enhanced paracellular barrier function of rat mesothelial cells partially protects against cancer cell penetration. *Br J Cancer* **74**, 439–45 (1996).
66. Moreno-Bueno G, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene* **27**, 6958–69 (2008).
67. Floor S, van Staveren WC, Larsimont D, Dumont JE, Maenhaut C. Cancer cells in epithelial-to-mesenchymal transition and tumor-propagating-cancer stem cells: Distinct, overlapping or same populations. *Oncogene* **30**, 4609–21 (2011).
68. Kojima T, Takasawa A, Kyuno D et al. Downregulation of tight junction-associated MARVEL protein marvelD3 during epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells. *Exp Cell Res.* **317**, 2288–98 (2011).
69. Vermeer PD, Einwalter LA, Moninger TO et al. Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor. *Nature* **422**, 322–6 (2003).
70. Kominsky SL, Argani P, Korz D 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* **22**, 2021–33 (2003).
71. Lu KH, Patterson AP, Wang L, et al. Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recursive descent partition analysis. *Clin Cancer Res.* **10**, 3291–300 (2004).
72. Nacht M, Ferguson AT, Zhang W, et al. Combining serial analysis of gene expression and array technologies to identify genes differentially expressed in breast cancer. *Cancer Res.* **59**, 5464–70 (1999).
73. Offner S, Hekele A, Teichmann U, et al. Epithelial tight junction proteins as potential antibody targets for pancarcinoma therapy. *Cancer Immunol*

- Immunother. **54**, 431–45 (2005).
74. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 20/02/2014.
75. Peek RM, Jr. Orchestration of aberrant epithelial signaling by *Helicobacter pylori* CagA. *Sci STKE* **29**, 14-29 (2005).
76. Hohenberger P, Gretschel S. Gastric Cancer. *Lancet* **362**, 305–315 (2003).
77. Aggarwal BB, Gehlot P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? *Curr Opin Pharmacol.* **9**, 351-69 (2009).
78. Camargo MC, Yopez MC, Ceron C, Guerrero N, Bravo LE, Correa P, Fontham ET: Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: comparison of two areas with contrasting risk of gastric cancer. *Helicobacter* **3**, 262–270 (2004).
79. Parkin DM: The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* **118**, 3030–3044 (2006).
80. Gonzalez CA, Sala N, Capella G: Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *Int J Cancer* **100**, 249–260 (2002).
81. Hamajima N, Naito M, Kondo T, Goto Y: Genetic factors involved in the development of *Helicobacter pylori* related gastric cancer. *Cancer Sci.* **97**, 1129–1138 (2006).
82. Carvalho F, Seruca R, David L, Amorim A, Seixas M, Bennett E, Clausen Hand Sobrinho-Simoes M: MUC1 gene polymorphism and gastric cancer –an epidemiological study. *Glycoconj. J.* **14**, 107–111 (1997).
83. Joossens JV, Hill MJ, Elliott P, Stamler R, Lesaffre E, Dyer A, Nichols R, Kesteloot H: Dietary salt, nitrate and stomach cancer mortality in 24 countries. European Cancer Prevention (ECP) and the INTERSALT Cooperative Research Group. *Int J Epidemiol.* **25**, 494–504 (1996).

84. Tsugane S: Salt, salted food intake, and risk of gastric cancer: epidemiologic evidence. *Cancer Sci.* **96**, 1–6 (2005).
85. Jakszyn P, Gonzalez CA: Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: Asystematic review of the epidemiological evidence. *World JGastroenterol.* **12**, 4296–4303 (2006).
86. Coleman MP, Esteve J, Damiecki P, Arslan A, Renard H: Trends in cancer incidence and mortality. International Agency for Research on Cancer Scientific Publications **121**, 193–224 (1993).
87. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M: A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* **2**, 58–60 (1975).
88. Fennerty M. Gastric Intestinal metaplasia on routine endoscopic biopsy. *Gastroenterology* **125**, 586-590 (2003).
89. Lauren P: The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand.* **64**, 31–49 (1965).
90. Jarvi O, Lauren P: On the role of heterotopias of the intestinal epithelium in the pathogenesis of gastric cancer. *Acta Pathol Microbiol Scand.* **29**, 26–44 (1951).
91. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med.* **345**, 784–9 (2001)
92. M J Blaser and J Parsonnet. Parasitism by the "slow" bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. *J Clin Invest.* **94**, 4-8 (1994).
93. Huang J.Q., Sridhar S., Chen Y., Hunt R.H. Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology* **114**, 1169–1179 (1998).
94. Fox JG, Beck P, Dangler CA, Whary MT, Wang TC, Shi HN, Nagler-Anderson C: Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric

- immune responses and reduces helicobacter-induced gastric atrophy. *Nat Med.* **6**, 536–542 (2000).
95. Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* **7**, 629-41 (2010).
96. Hatakeyama M.. SagA of CagA in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* **11**, 30-7 (2008).
97. McGee DJ, Mobley HL. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Curr Opin Gastroenterol.* **16**, 24-31 (2000).
98. Backert S, Naumann M. What a disorder: proinflammatory signaling pathways induced by *Helicobacter pylori*. *Trends in Microbiology* **18**, 479-86 (2010).
99. Orłowski RZ, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med.* **8**, 385-9 (2002).
100. Lamb A, Yamaguchi H, Chen LF. The many roads traveled by *Helicobacter pylori* to NF- kappaB activation. *Gut Microbes* **1**, 109-113 (2010).
101. Grubman A, Kaparakis M, Viala J, Allison C, Badea L, Karrar A, Boneca IG, et al. The innate immune molecule, NOD1, regulates direct killing of *Helicobacter pylori* by antimicrobial peptides. *Cell Microbiol.* **12**, 626-39 (2010).
102. Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol.* **5**, 1166-74 (2004).
103. Yamazaki K, Gohda J, Kanayama A, Miyamoto Y, Sakurai H, Yamamoto M, Akira S, Hayashi H, Su B, Inoue J. Two mechanistically and temporally distinct NF-kappaB activation pathways in IL-1 signaling. *Sci Signal* **93**, 11-19 (2009).
104. Yamazaki, T Katsuno, A Tamura and S Tsukita Y. Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene* **27**, 6930–6938 (2008).

105. Blaster MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing CagA is associated with increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* **5**, 2111-15 (1995).
106. Mannick EE, Bravo LE, Zarama G, Realpe JL, Zhang XJ, Ruiz B, Fontham ET, Mera R, Miller MJ, Correa P. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. *Cancer Res.* **14**, 3238-43 (1996).
107. Fu S., Ramanujam K.S., Wong A., Fantry G.T., Drachenberg C.B., James S.P., Meltzer S.J., Wilson K.T. Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* gastritis. *Gastroenterology* **116**, 1319–1329 (1999).
108. Wagner, S., Beil, W., Westermann, J., Logan, R.P.H., Bock, C.T., Trautwein, C., Manns, M.P. Regulation of gastric epithelial cell growth by *Helicobacter pylori*: evidence for a major role of apoptosis. *Gastroenterology* **113**, 1099-1110 (1997).
109. Baik SC, Youn HS, Chung MH, Lee WK, Cho MJ, Ko GH, Park CK, Kasai H, Rhee KH. Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Cancer Res.* **6**, 1279-82 (1996).
110. Zhe Lin, Xiaowei Zhang, Zhijing Liu, Qihui Liu, Liping Wang, Yan Lu, Yuanyuan Liu, Min Wang, Minlan Yang, Xiangshu Jin and Chengshi Quan. The distinct expression patterns of claudin-2, -6, and -11 between human gastric neoplasms and adjacent non-neoplastic tissues. *Diagn Pathology* **133**, 2-9 (2013).
111. Gábor Sobel, Júlia Németh, András Kiss, Gabor Lotz, István Szabó, Nóra Udvarhelyi, Zsuzsa Schaff, Csilla Páska. Claudin 1 differentiates endometrioid and serous papillary endometrial adenocarcinoma. *Gynecologic Oncology* **103**, 591–598 (2006.)
112. Osanai M, Murata M, Chiba H, Kojima T, Sawada N: Epigenetic silencing of claudin-6 promotes anchorage-independent growth of breast carcinoma cells. *Cancer Sci.* **98**, 1557–1562 (2007).
113. Zavala-Zendejas, V.E.; Torres-Martinez, A.C.; Salas-Morales, B.; Fortoul, T.I.; Montano, L.F.; Rendon-Huerta, E.P. Claudin-6, 7, or 9 overexpression in the human gastric adenocarcinoma cell line AGS increases its invasiveness,

- migration, and proliferation rate. *Cancer Invest.* **29**, 1–11 (2011).
114. Lu, Z.; Ding, L.; Hong, H.; Hoggard, J.; Lu, Q.; Chen, Y.H. Claudin-7 inhibits human lung cancer cell migration and invasion through ERK/MAPK signaling pathway. *Exp. Cell Res.* **317**, 1935–1946 (2011).
115. G. W. Huang, X. Ding, S. L. Chen, L. Zeng. Expression of claudin 10 protein in hepatocellular carcinoma: impact on survival. *J Cancer Res Clin Oncol.* **137**, 1213–1218 (2011).
116. Soini Y, Tammola S, Helin H, et al. Claudins 1, 3, 4, and 5 in gastric carcinoma, loss of claudin expression associates with the diffuse subtype. *Virchows Arch.* **448**, 52-8 (2006).
117. Rendón-Huerta, E, Fortoul T, Gorráez MT, Garcia-Samper X, Alvarez-Fernández G, Zavala-Zendejas V, Montañó LF. Distribution and Expression Pattern of Claudins 6, 7, and 9 in Diffuse- and Intestinal-Type Gastric Adenocarcinomas. *J Gastrointest Canc.* **41**, 52-59 (2010).
118. Scott L Kominsky, Pedram Argani, Dorian Korz, Ella Evron, Venu Raman, Elizabeth Garrett, Alan Rein, Guido Sauter, Olli-P Kallioniemi and Saraswati Sukumar. 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* **22**, 2021–2033 (2003).
119. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A and Tsukita S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J. Cell Biol.* **156**, 1099–1111 (2002).
120. Lioni M, Brafford P, Andl C, Rustgi A, El-Deiry W, Herlyn M, and Smalley K. Dysregulation of Claudin-7 Leads to Loss of E-Cadherin Expression and the Increased Invasion of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells. *The Am J of Pathol.* **170**, 709-721 (2007).
121. S Tsukita, Y Yamazaki, T Katsuno, A Tamura and S Tsukita. Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene* **27**, 6930–6938 (2008).

122. Swisshelma K, Macekb R, Kubbies M. Role of claudins in tumorigenesis. *Adv Drug Deliver Rev* **57**, 919–928 (2005).
123. Masaya Takehara, Tomoko Nishimura, Shinji Mima, Tatsuya Hoshino, and Tohru Mizushima. Effect of Claudin Expression on Paracellular Permeability, Migration and Invasion of Colonic Cancer Cells. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 825-831 (2009).
124. Zheng JY, Yu D, Foroohar M, Ko E, Chan J, Kim N, Chiu R, Pang S. Regulation of the expression of the prostate-specific antigen by claudin-7. *J Membr Biol.* **194**, 187-97 (2003).
125. Man G, Wei L, Haiming W, Guanjun W. The distinct expression patterns of claudin-10, -14, -17 and E-cadherin between adjacent non-neoplastic tissues and gastric cancer tissues. *Diagn Pathol.* **205**, 1-8 (2013).
126. Johnson AH, Frierson HF, Zaika A, Powell SM, Roche J, Crowe S, Moskaluk CA, El-Rifai W. Expression of tight-junction protein claudin-7 is an early event in gastric tumorigenesis. *Am J Pathol.* **2**, 577-84 (2005).
127. Park JY, Park KH, Oh TY, Hong SP, Jeon TJ, Kim CH, Park SW, Chung JB, Song SY, Bang S. Up-regulated claudin 7 expression in intestinal-type gastric carcinoma. *Oncol Rep.* **2**, 377-82 (2007).
128. IR Gupta and AK Ryan. Claudins: unlocking the code to tight junction function during embryogenesis and in disease. *Clin Genet.* **77**, 314–325 (2010).
129. Shin K, Fogg V, and Margolis B. Tight Junctions and Cell Polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 207–35 (2006).
130. Correa, P., Piazuelo, M B., Camargo, M C. Etiopathogenesis of gastric cancer. *Scandinavian Journal of Surgery* **95**, 218–224 (2006).
131. Kumar, G., Rudbeck, L. eds. (2009) *Immunohistochemistry Staining Methods*. 5° ed. Dako Education Guide. California.
132. Gartner, L. (2003). *Sistema digestivo - conducto alimentario*. En: *Texto Atlas de Histología*, 2° ed. McGraw-Hill, México pag 368.
133. Harvey Lodish, Arnold Berk, S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell. (2000). *Molecular Cell Biology*, 4th edition New York: W. H. Freeman

134. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter (2007). *Molecular Biology of the Cell*. 5° ed. New York: Garland Science
135. Flores-Luna, F., Camorlinga-Ponce, M., Hernández-Suarez, G., Kasamatsu, E., Martínez, M. E., Murillo, R., Lazcano, E., Torres, J. The utility of serologic test as biomarkers for *Helicobacter pylori*-associated precancerous lesions and gastric cancer varies between Latin American countries. *Cancer Cause Control* **24**, 241-248 (2013)
136. Cunningham S, Kamangar F, Kim M.P, Hammoud S, Haque R, Iacobuzio-Donahue C.A., Maitra A, Ashfaq R, et al. Claudin-4, mitogen-activated protein kinase kinase 4, and stratifin are markers of gastric adenocarcinoma precursor lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **15**, 281–287 (2006).
137. Brown RW, Chirala R. Utility of microwave-citrate antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *Mod Pathol.* **5**, 515-20 (1995).

ANEXO

PBS 10 X

NaCl 79g

Na₂HPO₄ 15g

Na₂H₂PO₄ 6g

Aforar a 1L con dd H₂O

Ajustar pH a 7.4

PBS-Tween 0.05%

Del PBS 10X, colocar 100 ml en una probeta de 1L

Aforar a 1L con dd H₂O

Adicionara 500µL de Tween

Homogeneizar por agitación

Almacenar a 4°C, usar frío

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE CITRATOS

Preparar la Solución A y B

SOLUCIÓN A CITRATO DE SODIO 0.01M

0.2941g para 100 mL

SOLUCIÓN B ÁCIDO CÍTRICO 0.01M

0.2101g para 100mL

De las soluciones anteriores, tomar:

SOLUCIÓN A. 41.5mL de citrate de sodo 0.01M

SOLUCIÓN B. 9.5mL de ácido cítrico 0.01M

Ajustar a pH 6 con ácido cítrico