



Revisión

# Participación de las uniones estrechas del epitelio intestinal en la patogenia de la Enfermedad de Crohn

*Br. Rodrigo Dorelo, Br. Diego Fleitas, Br. Dionisio Díaz*

*Orientador: Prof. Agdo. Dra. Silvia Chifflet*

*Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina*



## Índice de contenidos

Resumen .....	2
Fundamentación de la propuesta .....	3
Introducción .....	4
Objetivo general de trabajo .....	9
Metodología.....	9
Estructura de las uniones estrechas .....	10
Ocludina .....	11
Claudinas .....	11
JAM´s.....	12
Proteínas ZO .....	13
Desregulación de las TJ en la Enfermedad de Crohn .....	13
Microbiota y su papel en la regulación de las TJ .....	14
Respuesta inflamatoria en la enfermedad de Crohn .....	16
Enfermedad de Crohn y riesgo de desarrollar cáncer .....	17
Tratamiento de la enfermedad de Crohn: las uniones estrechas como blanco terapéutico .....	18
Glucocorticoides y regulación de las TJ.....	19
Azatioprina y 6-mercaptopurina.....	20
Metrotexato, ¿resultados contradictorios?.....	20
Ácidos 5 aminosalicílicos y la respuesta inflamatoria.....	21
Adalimumab y la prevención de la disfunción de la barrera intestinal.....	21
Probióticos: una herramienta terapéutica.....	22
Conclusiones y perspectivas .....	23
Agradecimientos.....	24
Referencias bibliográficas .....	25
Figuras .....	35

## Resumen

La Enfermedad de Crohn (EC), un tipo de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) se ha considerado como una enfermedad que afecta a la barrera intestinal. Esta barrera está constituida por una capa intacta de células epiteliales que forman una monocapa continua y polarizada, estrechamente conectada por varios tipos de uniones, entre las que se destacan las uniones estrechas (“tight junctions” (TJ)). Las TJ forman una estructura continua entre el límite apical y los dominios de la membrana basolateral en las células epiteliales y endoteliales creando una barrera paracelular selectiva que las protege del medio ambiente externo.

Cada vez resulta más evidente que la disfunción de la barrera epitelial juega un papel central en la fisiopatología de la EC. Los pacientes con EC presentan una pérdida de la función de barrera de las TJ y un aumento de la producción de citoquinas pro-inflamatorias así como una desregulación del sistema inmune. Por este motivo, un importante objetivo terapéutico es mantener la remisión de la enfermedad mediante la conservación de la organización correcta de estos complejos de unión.

En esta revisión se describe brevemente la composición molecular, estructura, interacciones y función de las TJ, además de mostrar las últimas evidencias acerca de la relación entre la disfunción de las mismas y la EC. También se detalla el rol de la microbiota en la regulación de las TJ así como el papel de la desregulación de estas uniones en el desarrollo del cáncer asociado a la EC. Finalmente, se describen los últimos hallazgos de la literatura actual al respecto de las TJ como objetivo terapéutico de los fármacos utilizados en el tratamiento de la EC y su posible utilidad como blanco de nuevos medicamentos.

**Palabras clave:** enfermedad de Crohn, uniones estrechas, enfermedad inflamatoria intestinal, claudina, ocludina, microbiota, epitelio intestinal.

## Fundamentación de la propuesta

El tracto intestinal constituye la principal superficie de intercambio entre el medio interno y el medio externo del cuerpo humano. Podemos estimar que en un individuo adulto la mucosa de este sistema alcanza una superficie total de 300 a 400 m<sup>2</sup>, esta mucosa es necesaria para que este órgano brinde al organismo dos beneficios vitales: la nutrición y la defensa(1). Para que se cumplan esas funciones de forma correcta, es decir, que se permita un eficiente transporte de nutrientes a través del epitelio mientras se excluye rigurosamente el paso de moléculas y organismos dañinos, es necesario que la “barrera intestinal” esté bien regulada. Uno de los factores determinantes de esta regulación es la correcta permeabilidad del epitelio: un transporte transcelular y paracelular controlado. Esto se logra con una correcta polaridad de la célula y mediante un desarrollo de uniones celulares complejas que involucran a uniones comunicantes, desmosomas, uniones adherentes y a uniones estrechas (“TJ”) (2). Nuestro trabajo se centrará en estas últimas, las TJ, que por mucho tiempo se tomaron como estáticas y pasivas pero actualmente se sabe que son dinámicas y activas. Las TJ tienen un papel crítico en la permeabilidad del epitelio. En esta monografía, describimos y discutimos evidencia que muestra cómo la desregulación de estas uniones constituye un evento desencadenante de estados patológicos o bien, un evento que perpetúa los mismos. Nos referimos en particular a la Enfermedad de Crohn (EC), que se enmarca dentro del capítulo de Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), y que traduce un conflicto inmunológico por la pérdida de la “tolerancia inmunológica” frente al ecosistema microbiano habitual. Esto resulta en consecuencias estructurales y funcionales en la barrera intestinal, responsables de la patogenicidad de la enfermedad (3).

Consideramos importante estudiar las bases moleculares de la EC porque según estadísticas recientes, la misma no es una enfermedad infrecuente. El progreso en el tratamiento de la EC depende de la comprensión de procesos fisiológicos y patológicos básicos. Para ello, resulta relevante la investigación en

biología celular, cuyos resultados más importantes en el tema que desarrollamos en esta monografía vamos a proyectar hacia la clínica y terapéutica.

## **Introducción**

La EC es una enfermedad inflamatoria del intestino que tiene un curso recurrente y una etiología todavía no del todo conocida. Esta enfermedad puede afectar a cualquier zona del tracto digestivo, aunque de forma predominante aparece sobre el segmento intestinal que circunda la válvula ileocecal. Suele afectar a varios segmentos del tracto gastrointestinal, entre los que se hallan zonas normales. Su carácter transmural y su tendencia a la fibrosis explica el desarrollo frecuente de fístulas y estenosis. En el curso natural de la enfermedad alternan brotes de actividad inflamatoria con periodos de remisión y existe una elevada tendencia a la recurrencia tras la resección quirúrgica de los tramos afectados(4).

La prevalencia (número de personas afectadas en 100.000 habitantes) y la incidencia (número de casos nuevos en 100.000 habitantes por año) de la EC varían según los diferentes países. La prevalencia más alta es en los países desarrollados del norte de Europa y EEUU. En Uruguay los últimos estudios en 2007/2008 registran una tasa de incidencia ajustada de 0,74 por 100.000 habitantes/año(5). La incidencia de EC a nivel mundial se sitúa entre 1-10 casos cada 100.000 habitantes y afecta principalmente a individuos jóvenes entre la segunda y tercera década de la vida, pero puede ocurrir en todas las edades. La distribución por sexo no presenta diferencias relevantes(6).

En relación con la etiopatogenia de la EC, la susceptibilidad genética tiene un papel patogénico primordial, ya que el factor de riesgo más importante para padecer EC es tener un familiar con la enfermedad. Además se considera probable el rol de factores desencadenantes ambientales de naturaleza aún no determinada como el tabaco, infecciones, componentes de la dieta, entre otros.

La alteración histológica inicial y más frecuente en el intestino es la lesión de las criptas, que resultan infiltradas por neutrófilos, con la subsiguiente formación de abscesos en esta localización. Aunque esta lesión es muy parecida a la observada en la colitis ulcerosa (CU), en la EC la distribución de las lesiones es más focal. Otro punto que las diferencia es que en la EC la reducción de células caliciformes es menos marcada.

La lesión de la cripta es seguida por la aparición de ulceración microscópica de la mucosa intestinal que recubre los folículos linfoides y por infiltración de la lámina propia por células inflamatorias. Algunos agregados de células histiocitarias se organizan en granulomas no caseificantes que contienen células gigantes multinucleadas. Los granulomas pueden aparecer en cualquier capa de la pared intestinal. Estas lesiones pueden hallarse también en nódulos linfáticos, mesenterio, peritoneo e hígado, como resultado de la extensión de la enfermedad a partir del intestino. Microscópicamente, la existencia de granulomas en la EC permite distinguirla de la colitis ulcerosa(7).

La patogenia de la EC es consecuencia de una respuesta inmune exagerada a componentes de la luz intestinal en individuos genéticamente predispuestos. Uno de los principales factores que contribuyen a la homeostasis intestinal y que se altera en la EC es la permeabilidad regulada de la barrera epitelial, tema que describiremos con detalle en esta monografía.

En individuos sanos, la barrera intestinal está constituida por una capa intacta de células epiteliales que forman una monocapa continua y polarizada estrechamente conectadas por varios tipos de uniones celulares. Las TJ juegan un rol primordial, ya que son las principales responsables de mantener esta barrera, y además regulan la permeabilidad a iones, nutrientes y agua. Las TJ están compuestas por varias proteínas incluyendo proteínas transmembranas como ocludina, tricelulina, claudina y las moléculas de adhesión a la unión (JAM). La porción intracelular de estas proteínas transmembranarias interactúan con proteínas citoplasmáticas de membrana periféricas como zonula occludens (ZO) y cingulina. Las TJ a través de sus proteínas citoplasmáticas interactúan con F-

actina y miosina II que de este modo ancoran el complejo de las uniones con el citoesqueleto(8). La familia de las claudinas consiste en más de 24 miembros y son consideradas la columna vertebral de la estructura de las TJ, éstas son determinantes para la permeabilidad paracelular basado en la carga y tamaño de las moléculas. Fue demostrado que en la EC existe una sobreexpresión de la claudina 2, en tanto que la expresión de las claudinas 5 y 8 está disminuida(9).

El papel de las ocludinas en la permeabilidad intestinal no está todavía muy claro. Algunos estudios realizados en ratones con deficiencia de ocludinas no encontraron anomalías en la estructura, ni en la función de la barrera de las TJ en el epitelio intestinal(10). Con respecto a la expresión de las moléculas de adhesión a la unión (JAM) se mostró que ésta se encuentra disminuida en pacientes con EII(11). Además de estos cambios, otros autores encontraron que pacientes con EC inactiva presentan una alteración en la distribución de las proteínas de las TJ aunque sin modificación en la distribución de la proteína de citoesqueleto F-actina(12).

Los cambios encontrados en la EC ya mencionados causan una disfunción de la barrera epitelial, la que incrementa la permeabilidad paracelular. La disfunción de las TJ puede deberse a varios mecanismos resultantes del complejo balance entre factores genéticos y disparadores ambientales. Las citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) cumplen un rol importante en incrementar la permeabilidad de las TJ, pero también actúan induciendo la apoptosis y aumentando la translocación bacteriana. Las citoquinas pueden afectar las TJ por dos caminos, el primero regulando la expresión de proteínas y en segundo lugar afectando la redistribución de estas proteínas(13).

La barrera intestinal está expuesta a los componentes de la dieta y a muchas bacterias comensales. Diversos estudios han mostrado que las bacterias intestinales tienen como blanco varias vías intracelulares, cambiando la expresión y distribución de las proteínas de las TJ y así regulando la barrera intestinal. Se ha

demostrado que algunos probióticos reducen la permeabilidad intestinal en humanos con EC(14).

La predisposición genética todavía está lejos de ser totalmente comprendida pero parece jugar un rol importante en el desarrollo de la EC. Hasta el momento se identificaron 99 locis susceptibles para la EC, incluyendo 28 que son compartidos entre la EC y la colitis ulcerosa(15). Las mutaciones en el gen de dominio de reclutamiento activador de la caspasa (CARD15) son un factor de riesgo para el desarrollo de la EC. Las mutaciones en este gen están asociadas con una alteración de las TJ y, como consecuencia, un aumento de la permeabilidad intestinal(16).

Si bien todavía no hay cura para la EC, las TJ se han estudiado como posibles blancos terapéuticos para tratar la enfermedad. Es así que los antagonistas de las citoquinas inflamatorias como el infliximab, un anticuerpo monoclonal quimérico, y el adalimumab, un anticuerpo monoclonal humano, que actúan contra el TNF- $\alpha$ ; han demostrado inducir y mantener la remisión en paciente con EC moderada/severa(17)(18). Asimismo, el péptido similar al glucagón 2 (GLP-2) ha mostrado en ratas disminuir la permeabilidad intestinal, tanto paracelular como la transcelular, lo que mejora la integridad de las uniones estrechas(19). En pacientes con EC un estudio usando el análogo de GLP-2 fue efectivo en promover la curación de la mucosa intestinal y la remisión clínica de la enfermedad(20).

Existen estudios del efecto de diversos compuestos en la función de barrera del epitelio intestinal, tales como el zinc, el que parece disminuir la permeabilidad de la mucosa en pacientes con EC(21), y otros como la berberina (del grupo de la isoquinolona alcaloide) y el flavonoide quercetina que parecen regular la expresión de claudina de las uniones estrechas y tener efectos antiinflamatorios sobre la barrera intestinal(22)(23). Los probióticos también actúan regulando el nivel de

citoquinas inflamatorias y la expresión de las proteínas que conforman las uniones estrechas(24).

El entendimiento más a fondo de cómo están reguladas las uniones estrechas está ayudando a desarrollar regímenes terapéuticos específicos para tratar el daño en estas uniones. Se debe tener presente además que los pacientes con EC tienen un riesgo elevado de padecer cáncer colorrectal(25), según la literatura actual el riesgo aumentado de cáncer en la EII está relacionado con la severidad de la inflamación sugiriendo que la injuria crónica puede acelerar o contribuir a la transformación neoplásica. Hay estudios que sugieren, además, que estos pacientes tienen un riesgo aumentado de desarrollar cáncer extraintestinal(26). Se ha visto que cambios en algunas de las proteínas que conforman la TJ tienen un rol primordial en la transformación maligna y en el desarrollo de metástasis(27) así, se cree que una mejor caracterización de estos mecanismos en el futuro podrá transformarse en una importante alternativa terapéutica para evitar el desarrollo de cáncer en paciente con EC.

## **Objetivo general del trabajo**

El objetivo general de este trabajo fue realizar una revisión y análisis del conocimiento actual sobre la relación entre la desregulación de las uniones estrechas del epitelio intestinal y la Enfermedad de Crohn.

Además, proponer diversas perspectivas para futuros enfoques de investigaciones en el tema que desarrollamos en el presente trabajo.

## **Metodología**

Se realizó una revisión sistemática de literatura científica sobre los diferentes temas a tratar en el presente trabajo: importancia de la barrera intestinal en la homeostasis del organismo, morfología y función de las uniones estrechas en el epitelio intestinal, desregulación de las uniones mencionadas y su relación con la enfermedad de Crohn, tratamiento de la enfermedad, y además se realizó una búsqueda bibliográfica sobre la enfermedad de Crohn como factor de riesgo para cáncer colorrectal.

Para tal fin se realizó una búsqueda de artículos publicados entre el año 2000 y la fecha actual, disponibles en inglés o español. Las bases de datos consultadas fueron PubMed, Google Académico y Cochrane Library. Los términos MeSH utilizados fueron: enfermedad de Crohn, uniones estrechas, epitelio intestinal. Se realizó una búsqueda restringida combinando los términos mencionados con operadores booleanos. Consideramos criterio inclusivo la disponibilidad del artículo en PubMed debido a que los estándares de calidad que exige esta base de datos para incluir una revista en su índice son mayores que para la mayoría de las otras.

Además, el equipo de trabajo seleccionó tres artículos científicos (utilizando como uno de los criterios inclusivos un índice de impacto alto de la revista en la que fue publicado) para su posterior presentación, análisis y discusión en seminarios, lo que consideramos contribuyó al desarrollo de la presente monografía.

## **Estructura de las uniones estrechas**

Las TJ están formadas por microdominios de la membrana plasmática, compuestos de múltiples puntos fusionados (“kissing points”) entre las caras exteriores de las membranas plasmáticas de células adyacentes, de tal manera que rodean el polo apical de cada célula en forma de una franja continua(28). Esta estructura separa el lado apical del basolateral de las células epiteliales, generando compartimentos con diferentes composiciones, por lo que los epitelios y las mismas TJ actúan como barrera a la difusión de fluidos entre dos compartimentos, pero con permeabilidad selectiva a los iones, factores de crecimiento, agentes patógenos y otros solutos(29).

Cuando las TJ son procesadas por criofractura y observadas por microscopio electrónico (Figura 1), parecen estar compuestas por una red de cordones selladores que rodean por completo la zona apical de cada célula epitelial(30). Cada cordón sellador de las TJ está compuesto por una larga hilera de proteínas de transmembrana adhesivas que se sitúan en cada una de las membranas plasmáticas adyacentes. Los dominios extracelulares de estas proteínas interactúan entre sí directamente, con lo que se produce la oclusión del espacio intercelular. Las principales proteínas de transmembrana de la TJ son las ocludinas y las claudinas, que resultan esenciales para la formación y función de la unión estrecha. Estas dos proteínas se asocian con las proteínas periféricas de membrana denominada ZO, las cuales anclan los complejos transmembrana al citoesqueleto de actina (Figura 2)(31). Además de estas proteínas, las TJ contienen otras proteínas, entre las que se encuentran las que regulan la polaridad de la célula epitelial y las que dirigen el transporte de componentes membranosos hacia su dominio de destino(32). Las TJ tienen una organización supramolecular conformada por más de 40 proteínas que se organizan en tres niveles: 1) el primer nivel de las TJ está formado por proteínas transmembranarias, tales como las claudinas, ocludina, tricelulina y las moléculas de adhesión (“Junctional Adhesion Molecule”, JAMs); 2) el segundo nivel de TJ está constituido por proteínas citosólicas; que pueden servir como proteínas estructurales o de anclaje, como

las zonula occludens-1 (ZO-1), ZO-2, ZO-3, cingulina, proteína-1 con múltiples dominios PDZ (MUPP1), así como proteínas de regulación del tráfico vesicular; y 3) el tercer nivel de las TJ conformado por un haz de microfilamentos contráctiles de actina, que se inserta en la placa citosólica, constituyendo un anillo en el perímetro de la célula(33).

A continuación describiremos la estructura y función de aquellas proteínas de la TJ que se han encontrado que participan en la patogenia de la EC. Desarrollaremos primero las proteínas transmembrana, ocludina, claudinas y JAMs, continuando con las proteínas citosólicas, ZO responsables de unir las TJ al citoesqueleto de actina.

### ***Ocludina***

Fue la primera molécula de las TJ identificada como proteína integral de membrana. Es producto de un gen único. Hasta el momento se han descrito 5 isoformas, producto de “splicing” alternativo: I, II, III, IV y TM4. Estas isoformas pueden presentar diferentes estados de fosforilación u otras modificaciones post-transduccionales (34). Es una proteína de 65 kDa, con cuatro dominios transmembrana, dos dominios extracelulares (EC1 y EC2), y dos dominios citoplasmáticos (N-terminal y C-terminal). El dominio C-terminal se une directamente a la proteína ZO-1 y es susceptible de fosforilación en sus residuos de serina, treonina y tirosina por diversas kinasas (src kinasas y CK2), siendo la proteína fosforilada la que se localiza en las TJ (35)(29). Participa también en la transducción de señales, ya que interacciona con diversas moléculas señalizadoras como el receptor tipo 1 de TGF, proteínas fosfatasa 2A, PI3 kinasa, etc(36).

### ***Claudinas***

Son los principales componentes de las TJ. Se han identificado 24 miembros en mamíferos cuyo peso molecular varía de 17 a 27 kDa. El patrón de expresión de las claudinas es específico de cada tejido, lo que contribuye junto con el perfil de interacciones homo o heterotípicas entre dichas proteínas, a las

funciones especializadas en los tejidos epiteliales y endoteliales(37)(38).

Están compuestas por dos dominios extracelulares, cuatro dominios transmembrana y dos dominios citoplasmáticos N y C-terminal(9). El dominio C-terminal se asocia a proteínas con dominios PDZ a través de aminoácidos altamente conservados y localizados en la región C-terminal de ZO-1, por lo tanto mutaciones en estos aminoácidos impiden la asociación con claudinas, y ZO-1 no se asocia a las TJ(39)(40). Esta región C-terminal puede ser fosforilada en residuos de serina y/o treonina, regulando su interacción con otras proteínas, su localización y su vida media. Los cambios en los niveles de fosforilación se han asociado con cambios en la permeabilidad paracelular y resistencia transepitelial de las células epiteliales(41).

### ***JAM's***

Éstas proteínas restringen la libre difusión de proteínas hacia el espacio intermembrana. Se trata de glicoproteínas transmembrana pertenecientes a la familia IgG y tienen una masa molecular de 43 kDa. Contienen tres dominios estructurales distintos: una región extracelular con dos dominios extracelulares tipo-Ig, una única región transmembrana y un corto tallo intracelular formando el dominio C-terminal con un sitio de unión para dominios PDZ(42). Esta familia está compuesta por moléculas estrechamente relacionadas JAM-A, JAM-B y JAM-C, y las más lejanamente relacionadas CAR (“Coxsackie and adenovirus receptor”), ESAM (“endotelial cell-selective adhesión molecule”) y JAM-4. En procesos inflamatorios, se ha determinado que durante el paso de leucocitos desde la sangre al estroma, los dominios tipo inmunoglobulinas de las proteínas JAM interaccionan con antígenos y así evitan el transporte paracelular de proteínas(43).

### **Proteínas ZO**

Forma parte de la zona ocludens, cumplen un rol importante en la formación y mantención de los dominios de membrana de varios tipos celulares. Estas moléculas contienen tres dominios PDZ, un dominio SH3, y un dominio tipo guanilato quinasa (GUK). Los dominios PDZ pueden unirse al C-terminal de varias proteínas, específicamente proteínas integrales de membrana (claudinas y ocludinas). Compuesta por tres variantes, ZO-1, ZO-2 y ZO-3(2).

ZO-1 y ZO-2 se unen directamente a los microfilamentos de actina por su región C-terminal, sugiriendo que estas moléculas funcionan entrecruzando los filamentos de TJ y los microfilamentos de actina. A pesar que las proteínas ZO-1 se asocian específicamente con las TJ en el tejido epitelial, se han observado en el núcleo de células en proliferación(44), sugiriendo que la expresión de ZO-1 podría estar relacionada a estados de proliferación en células epiteliales(45). En células en reposo proliferativo la ZO-1 inhibe la transición de la fase G1/S mediante el secuestro citoplasmático del complejo CDK4-ZONAB. Así, la sobre expresión o disminución de ZO-1 y ZONAB también afectarían la densidad celular en cultivos celulares(46).

### **Desregulación de las TJ en la Enfermedad de Crohn**

Como se mencionara, la EC se asocia con una permeabilidad intestinal defectuosa, lo que sugiere una disfunción de las TJ(13). Los defectos de barrera se atribuyen a una mayor actividad de las citoquinas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interferón gamma (INF- $\gamma$ ), interleuquinas como IL-1 $\beta$  e IL-13, que están altamente expresadas en el intestino con inflamación crónica. El TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  cumplen un rol importante al incrementar la permeabilidad de las TJ, pero también actúan induciendo la apoptosis y aumentando la translocación bacteriana(47).

La barrera intestinal está expuesta a muchos componentes de la dieta y a muchas bacterias comensales, diversos estudios han mostrado que las bacterias intestinales tienen como blanco varias vías intracelulares, cambiando la expresión

y distribución de las proteínas de las TJ y así regulando la barrera intestinal (Figura 3). Se ha demostrado que algunos probióticos reducen la permeabilidad intestinal en humanos con EC. Los trastornos de barrera también son causados por alteraciones en la composición de la microbiota intestinal, dando como resultado un desequilibrio de comensales y patógenos potenciales(48).

A través de criofractura se encontró que la arquitectura de las TJ se ve muy alterada en la EC activa (Figura 4), mostrando un número reducido de hebras de unión que fue acompañado de una disminución de la profundidad del entramado principal de la TJ. Como hallazgo importante, se demostró un incremento de más de 10 veces en el número de discontinuidades de las hebras de unión en la EC activa. Debido al tamaño de las interrupciones (0,25 nm), estas roturas de las hebras pueden proporcionar una ruta para el paso de grandes macromoléculas inmunogénicas, en particular en las regiones de TJ compuesta de sólo dos o tres hebras(9).

El aumento de la claudina 2 formadora de poros con la disminución de claudinas 3, 5 y 8 de sellado (Figura 5), representa la base molecular de los filamentos discontinuos en la EC activa, lo que puede conducir a TJ con fugas. Por otra parte, no se han encontrado alteraciones en la estructura de la ocludina(9).

### **Microbiota y su papel en la regulación de las TJ**

El tracto gastrointestinal constituye la principal superficie de intercambio y comunicación entre el medio externo y el medio interno. En el individuo adulto la mucosa gastrointestinal está dotada de estructuras y funciones específicas para el reconocimiento de las sustancias que transitan por el tubo digestivo(49). Se considera que la microflora intestinal es un órgano más, perfectamente integrado en la fisiología del individuo. Los dos elementos funcionales (tubo digestivo y microflora) son interdependientes y su equilibrio condiciona la homeostasis del individuo dentro de su entorno ambiental(50). Más del 99% de la microflora está compuesta por bacterias que mantienen una relación de simbiosis con el ser humano y pueden dividirse en cuatro familias principales: Firmicutes,

Bacteroidetes, Proteobacterias y Actinobacterias(51). Las bacterias comensales y probióticos han demostrado promover la integridad de la barrera intestinal. Las repercusiones de las alteraciones en el equilibrio de la microbiota son muy extensas, siendo partícipe de diversas patologías no sólo del tracto gastrointestinal, sino de todo el organismo. Este balance puede ser alterado desde el período prenatal y durante todas las etapas de la vida(52).

Las diferentes especies de bacterias pueden utilizar múltiples vías para modular la integridad de las TJ, a través de proteínas de señalización celular incluyendo la familia Rho GTPasas, PKC y MAPK. Por ejemplo, la E. coli utiliza una ruta de señalización dependiente de PKCz para reducir la interrupción de la barrera epitelial causada por la E. coli enteropatogénica(53). PKCz es el único isotipo PKC situado en el complejo TJ y la activación de PKCz conduce a la fosforilación de ZO-2, dando como resultado su retirada de la unión y del citoesqueleto. E. coli reduce la fosforilación de PKC y así redistribuye PKCz en el citosol, reduciendo la colocalización de ZO-2-PKCz lo que permite una adecuada formación de TJ y asociación de ZO-2 con el citoesqueleto.

Algunos probióticos y comensales han demostrado prevenir, e incluso revertir, los efectos adversos de los agentes patógenos en función de la barrera intestinal. Las interacciones entre los componentes de la dieta y la microbiota también son cruciales en la regulación de la integridad de la barrera(52).

La microbiota en el intestino grueso fermenta sustancias que no pueden ser digeridas en el intestino delgado (como almidones resistentes a digestión, celulosa, pectinas, y algunos oligosacáridos), lo que permite la recuperación de energía metabólica y sustratos absorbibles para el anfitrión. También pueden afectar de forma indirecta la función de barrera intestinal a través de los productos de la fermentación de hidratos de carbono no digeridos en el intestino. Un ejemplo de esto es la producción de butirato por las bacterias del colon, lo que mejora la barrera intestinal facilitando el montaje de las TJ(54).

Por otro lado, ciertos carbohidratos de la dieta son capaces de cambiar la comunidad comensal hacia una estructura más ventajosa mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de bacterias en el sistema gastrointestinal, que a su vez puede afectar la integridad de las TJ. Por lo tanto, es importante tener en cuenta las interacciones entre los diferentes componentes de la barrera intestinal en el desarrollo de estrategias para mejorar la integridad de la misma(55).

### **Respuesta inflamatoria en la enfermedad de Crohn**

Como hemos mencionado, estudios sobre la EI demostraron que existe una pérdida en la función de barrera de las TJ, un incremento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias y una desregulación inmune(8). El patrón inflamatorio y los mediadores de inmunorregulación presentes en la respuesta inflamatoria de la EC le imprimen cierta particularidad.

Diversos estudios evidenciaron alteraciones en respuestas de la inmunidad innata en la EC. El reconocimiento y procesamiento de antígenos por parte de las células presentadoras de antígeno está alterado, de forma que no pueden realizar un reconocimiento correcto de la flora comensal lo que induce una activación de la inmunidad adquirida en lugar de inducir tolerancia. Esta respuesta inmune adquirida está dominada por un fenotipo TH1- TH17(56).

Existe un aumento del ARN mensajero de la IL-2 (una citoquina inmunorreguladora) en la enfermedad activa, esto es debido a que la respuesta inflamatoria predominante es de las células inmunes T. También, se encontró un aumento de expresión de la citoquina IFN- $\gamma$ , estrictamente relacionado a la IL-12. Respecto a las citoquinas pro-inflamatorias, la IL-1 es encontrada en altas concentraciones en pacientes con esta enfermedad. Esto se debe a un desequilibrio entre la citoquina y su antagonista(56).

La citoquina que tiene más implicancias en la pérdida de la barrera epitelial es el factor de necrosis tumoral, TNF- $\alpha$ . Estudios in vitro, muestran que dosis

relativamente altas de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  pueden inducir disfunción de la barrera en cultivos celulares en monocapa. En modelos animales y humanos antagonizar a estas citoquinas ha mostrado restaurar la función. El mecanismo por el cual estas citoquinas actúan, es un efecto directo sobre las TJ: hay una pérdida de proteínas ZO-1, ocludina y de claudina-1 (figura 6)(57).

### **Enfermedad de Crohn y riesgo de desarrollar cáncer**

Existe un riesgo significativamente alto de desarrollo de cáncer en intestino delgado en pacientes que padecen EC(58). Otro estudio, encuentra un 5 % de riesgo de desarrollo de cáncer de colon en países de occidente, identificando grupos con riesgo incrementado como en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal(59). En estudios poblacionales se ha encontrado un mayor riesgo de desarrollar carcinoma de intestino delgado en pacientes con EC, y un mayor riesgo de desarrollar linfoma entre los hombres con la enfermedad(60). Esta evidencia ha promovido la creación de criterios que promueven el tamizaje de cáncer colorrectal en pacientes con determinadas características de la enfermedad, como pueden ser los años de evolución o la extensión(61).

Algunos autores consideran que existe abundante evidencia para apoyar la teoría de que el cáncer se desarrolla a través de una secuencia dada por la inflamación, displasia y por último carcinoma(62). Varios eventos moleculares implicados en el proceso de la inflamación crónica activa contribuyen a la progresión de varias etapas del desarrollo de carcinoma. La identificación morfológica de la displasia es un marcador de aumento del riesgo de malignidad.

El 90 % de los cánceres malignos que se desarrollan en el organismo derivan del epitelio(27). Esto ha despertado interés en investigar los mecanismos que subyacen al cáncer en el tejido epitelial. Algunos autores demostraron que cambios en las proteínas que componen las uniones estrechas tienen un importante papel en la transformación maligna, sobre todo las claudinas. El cambio en la función de barrera en los epitelios cancerosos se explica por una disposición desorganizada de las hebras de TJ, con aumento de la permeabilidad

paracelular. También encontraron niveles elevados de claudina 1, 2, 3, 4 y 12 en cáncer de colon, y en contrapartida una expresión disminuida de claudina 8.

El rol de las TJ y de los cambios en la función de barrera en el mecanismo de metástasis cancerígena ha sido ampliamente estudiado. El aumento de las proteínas promueve la diseminación celular, y como contrapartida la disminución causa desmantelamiento de la estructura de la unión con pérdida de la polaridad, pérdida de inhibición por contacto, crecimiento incontrolado, y el consecuente desprendimiento e invasión de células cancerosas(63). Aunque todavía se está investigando el papel exacto de las proteínas que conforman las TJ en la tumorigénesis, es evidente que representan dianas prometedoras para la detección del cáncer, el diagnóstico y la terapia(64)(65).

### **Tratamiento de la enfermedad de Crohn: las uniones estrechas como blanco terapéutico**

La EC es un trastorno inflamatorio crónico que no posee tratamiento curativo médico ni quirúrgico. Exige enfoques terapéuticos para inducir y mantener el control de los síntomas, mejorar la calidad de vida, minimizar la progresión lesional y las complicaciones. Los objetivos más recientes de la terapia incluyen la inducción y mantenimiento de la curación de la mucosa que están empezando a traducirse en el cambio de la "historia natural" de la enfermedad(66). De esta manera se pueden evitar las principales complicaciones que la inflamación constante del epitelio intestinal puede generar, tales como la fibrostenosis, las fístulas, la displasia o cáncer y la pérdida de la función intestinal. La particularidad de cada paciente requiere un tratamiento individualizado que depende de múltiples factores entre los que destacan la localización, la gravedad, el patrón evolutivo, la respuesta previa al tratamiento y la presencia de complicaciones.

Existen variados estudios que plantean posibles mecanismos de actuación de los diferentes medicamentos que actualmente se proponen para el tratamiento de la EC. Los corticoides sistémicos son tratamiento de primera línea en enfermedad activa. En formas leves se prefiere la acción local de budesonide,

mientras que en brotes moderados es preferible la prednisona. En casos seleccionados se utiliza también la beclometasona(67). El uso de los aminosalicilatos como la sulfasalazina y la mesalazina en la EC es controvertido, sus indicaciones potenciales se limitarían al tratamiento del brote leve de EC de localización cólica(68). Otras alternativas terapéuticas son los inmunomoduladores tiopurínicos (azatioprina y mercaptopurina), y el metrotexato. La actividad inflamatoria de la EC también es objetivo terapéutico de dos anticuerpos monoclonales anti-TNF IgG1: infliximab y adalimumab (69). La evidencia experimental apoya su uso en la inducción de remisión y mantenimiento. Otros tratamientos son las dietas elementales y poliméricas(70), el uso de probióticos y en casos especiales (complicación séptica) el uso de antibióticos(71).

A continuación se hará breve reseña de la evidencia encontrada sobre el efecto de estos medicamentos en la permeabilidad paracelular y en la estructura de las TJ.

### ***Glucocorticoides y regulación de las TJ***

Existe evidencia que el cultivo con dexametasona en células epiteliales de ratón induce la formación de TJ, lo que sugiere un rol importante en la función y mantenimiento de la unión célula – célula(72). Recientes estudios analizaron el efecto de la dexametasona sobre las TJ utilizando como modelo las células intestinales en cultivo Caco-2(73). Este estudio mostró una reducción del flujo paracelular de cationes, así como la disminución de la proteína de formación de poros claudina-2, y el aumento de la proteína de sellado claudina-4, sin evidenciar otros cambios estructurales (figura 7). También se pudo comprobar que el uso de dexametasona, disminuye el efecto en la resistencia transepitelial que provoca la respuesta inflamatoria a través de citoquinas como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Fisher et al. encontraron que el uso de dexametasona en células poco diferenciadas así como la aplicación de un antagonista del receptor de glucocorticoides como de la vía de quinasas MKP-1 disminuye el impacto del medicamento (73). Esto permite concluir que el efecto de los glucocorticoides depende receptor y de la vía mencionada.

El objetivo del tratamiento con glucocorticoides es, principalmente, atenuar la respuesta inflamatoria. El estudio citado en el párrafo anterior, plantea que es posible que exista un efecto directo sobre la barrera epitelial y como consecuencia en el transporte paracelular que influiría en la respuesta al tratamiento con estos fármacos en la EC.

### **Inmunomoduladores tiopurínicos: *Azatioprina* y *6-Mercaptopurina***

La 6-mercaptopurina (usado predominantemente como un agente quimioterapéutico) y su profármaco azatioprina (un agente modificador de la respuesta inmune) son análogos de las purinas que interfieren competitivamente con el metabolismo de los ácidos nucleicos(74).

Si bien no existen estudios que hayan abordado específicamente el mecanismo por el cual estas drogas regulan la permeabilidad epitelial, hay evidencia que la azatioprina reduce el número de leucocitos en la mucosa de los pacientes con EII hasta la normalidad(75). Asimismo, también se encontró que la 6-mercaptopurina disminuye la activación de macrófagos y la expresión de citoquinas inflamatorias inducidas por TNF- $\alpha$  en células epiteliales intestinales, mecanismos importantes en la patogenia de las EII(76). Así se podría plantear que como consecuencia de esta respuesta inmune atenuada, habría una mejoría en la regulación de la permeabilidad de las TJ.

### **Metrotexato, ¿resultados contradictorios?**

Si bien, como se mencionara, para el tratamiento de determinadas presentaciones clínicas de la EC resulta de utilidad el metrotexato, diversos estudios han demostrado que el tratamiento con metrotexato aumenta la permeabilidad de la barrera epitelial intestinal. En ratas tratadas con este medicamento, se alteró la distribución celular y la expresión de claudina, ocludina y ZO-1 (figura 8). In vitro, el tratamiento con metrotexato condujo a un aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  y la IL-8, sin producir apoptosis ni necrosis. En este estudio se analizaron las vías intracelulares involucradas, y se encontró que estas alteraciones fueron prevenidas por

inhibidores de MEK 1 y 2, de JNK, y los de NF- $\kappa$ B(77). Otro estudio encontró disturbios en las TJ caracterizado por una disminución de ZO-1 lo que contribuye con el aumento de la permeabilidad paracelular(78).

En virtud de la patogenia de la EC, los hallazgos descritos en el párrafo anterior para el metrotexato resultan contradictorios. Los mecanismos de acción de la droga que promueven la remisión de la EC aún no se entienden completamente, tampoco está claro cuándo y cómo utilizarla(79). Estudios más actuales, plantean reconsiderar la posición del metrotexato en el algoritmo terapéutico de la enfermedad debido al bajo porcentaje de pacientes que responden de forma total o parcial luego de 1 año de tratamiento con esta droga(80). Algunos autores sostienen que la droga es bien tolerada pero que su potencial en la modificación de la enfermedad es desconocida(81).

#### ***Ácidos 5 aminosalicílicos y la respuesta inflamatoria***

Como se mencionara, el efecto resultante de la acción de las citoquinas inflamatorias en el epitelio intestinal es una disminución de la resistencia eléctrica epitelial y un aumento de la permeabilidad transepitelial. Di Paolo et al. encontraron que dicho impacto de las citoquinas es atenuado con el tratamiento con ácidos 5 aminosalicílicos (5-ASA), y que este efecto está mediado por la vía de los antígenos leucocitarios humanos tipo DR (más conocido por sus siglas en inglés "HLA-DR"). El tratamiento con IFN- $\gamma$  y 5-ASA en cultivos de células de colon bien diferenciadas provocó una disminución del aumento de la permeabilidad(82). Asimismo, se encontró que la sulfasalazina (un tipo de 5-ASA) previene cambios en la morfología de las TJ por antagonizar el efecto de la citoquina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$ , mediante la inhibición de la vía NF $\kappa$ B(57).

#### ***Adalimumab y la prevención de la disfunción de la barrera intestinal***

El adalimumab es un anticuerpo monoclonal humano anti -TNF- $\alpha$ . Se utiliza como terapia biológica para las enfermedades inflamatorias intestinales y con ella, se ha encontrado una restitución de la barrera intestinal. Este tratamiento previene la disminución de la resistencia transepitelial inducida por TNF- $\alpha$ , impide la

internalización de la ocludina, y contrarresta la disminución de la expresión en proteínas que componen a las TJ como claudina-1, claudina-2, claudina-4, y ocludina. Se encontró que el adalimumab interrumpe la activación de vías de señalización p38 MAPK y NF-κB, implicadas en la disfunción de la barrera epitelial por la citoquina mencionada. En conjunto, estos datos demuestran que el adalimumab impide la desregulación funcional y estructural de la barrera inducida por el TNF-α(83).

### ***Probióticos: una herramienta terapéutica***

El intestino humano es habitado por  $10^{14}$  microorganismos. Diversos estudios han focalizado su atención en la relación existente entre éstos y el epitelio intestinal y han encontrado que estos microorganismos interactúan con el epitelio pudiendo afectar la función de barrera.

Como se mencionara, las TJ no son una barrera estática sino que son estructuras muy dinámicas que interactúan de forma constante con los estímulos externos como los patógenos, bacterias comensales y los alimentos. Los probióticos han demostrado promover la integridad de la barrera intestinal. El *Lactobacillus GG* puede reducir la permeabilidad intestinal en pacientes con enfermedad de Crohn(14). Estudios mostraron que el *Lactobacillus plantarum* puede regular las TJ humanas in vivo y que la administración de este microorganismo en voluntarios humanos saludables provocó un aumento significativo de ZO-1 y ocludina en la superficie apical de la célula a nivel de la TJ(84).

Asimismo, los probióticos también pueden disminuir la disfunción en la barrera intestinal causada por citoquinas. El tratamiento previo del epitelio intestinal con *S. thermophilus* y *L. acidophilus* o con la bacteria comensal *Bacteroides thetaiotaomicron* demostró prevenir la disminución de la resistencia eléctrica transepitelial causada por TNF-α e IFN-γ(85). Por otra parte, estudios recientes mostraron que la administración del probiótico VSL#3 impide la reducción y redistribución de ZO-1, ocludina y claudina 1, 3, 4 y 5(86).

## Conclusiones y perspectivas

En la presente monografía hemos realizado una descripción de los componentes de las TJ así como también puntualizar su función y rol en la patogenia de la EC. Consideramos que comprender su regulación proporciona una visión más clara de los mecanismos que subyacen a la enfermedad. En la actualidad el correcto conocimiento del rol de las TJ en la permeabilidad epitelial ha permitido ampliar los horizontes diagnósticos y terapéuticos de la EC.

La patogenia de la EC es de naturaleza multifactorial donde la disfunción de la barrera epitelial juega un papel crítico. Asimismo, las alteraciones encontradas en las TJ en pacientes con esta enfermedad pueden explicar el aumento de la permeabilidad del epitelio intestinal y la pérdida de la homeostasis del mismo. Entre las principales alteraciones en las TJ destacamos los cambios en la distribución y expresión de las proteínas que componen la unión, siendo un desencadenante clave la respuesta inmune descontrolada del epitelio caracterizada por un predominio de las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

Existe una gran diversidad de alternativas terapéuticas que tienen como objetivo estabilizar las TJ y de este modo restablecer la función de la barrera intestinal, incluso el uso de probióticos modificaría la microflora intestinal la cual tiene un papel importante en la regulación de las TJ. Muchas de las alternativas tienen la finalidad de atenuar o modular la respuesta inmune. Actualmente, existen tratamientos prometedores con anticuerpos monoclonales que ponen en revisión los antiguamente utilizados como el metrotexato.

Diversos autores plantean que los pacientes con EC tienen un riesgo aumentado de padecer cáncer, principalmente colorrectal. Recientes estudios plantean una relación con las alteraciones en las TJ mencionadas, lo que sitúa a las uniones como objeto de estudio prometedor de nuevos esquemas diagnósticos y terapéuticos para el cáncer asociado a la EC.

Para futuros trabajos consideramos importante potenciar la investigación orientada a conocer aún más la biología celular de los procesos fisiológicos y patológicos subyacentes de la EC. Asimismo, planteamos optimizar las aplicaciones de los conocimientos emergentes de estas investigaciones en el campo clínico que permitirán un mejor manejo práctico de las personas afectadas por la enfermedad.

### **Agradecimientos**

Agradecemos a nuestra orientadora Dra. Silvia Chifflet por sus valiosos comentarios y sugerencias en la elaboración de esta monografía, así como su tiempo y dedicación en enseñarnos más que solo medicina.

Además agradecemos a la Dra. Beatriz Iade por sus comentarios y consejos acerca de esta monografía.

## Referencias bibliográficas

1. Guarner F. Redalyc. Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. 2007;22:14–9.
2. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;286:C1213–C1228.
3. Camilleri M, Madsen K, Spiller R, Greenwood-Van Meerveld B, Van Meerveld BG, Verne GN. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol Motil*. 2012;24:503–12.
4. Borstnar CR. Farreras-Rozman. *Medicina Interna + acceso online* [Internet]. Elsevier Health Sciences Spain; 2012. Available from: <http://books.google.com.uy/books?id=WJ-uVVG-crsC>
5. Buenavida G, Casañias A, Vásquez C, De Souza M, Martínez L, Gardil I, et al. Incidence of inflammatory bowel disease in five geographical areas of Uruguay in the biennial 2007-2008. *Acta Gastroenterol Latinoam* [Internet]. 2011;41:281–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22292223>
6. Ciril Rozman Borstnar. Farreras-Rozman. *Medicina Interna*. 17th ed. Elsevier, editor. 2012.
7. Hoda SA, Hoda RS. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Advances in Anatomic Pathology*. 2005. p. 103.
8. Edelblum KL, Turner JR. The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2009 Dec [cited 2014 Sep 2];9(6):715–20. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2788114&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
9. Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* [Internet]. 2007 Jan [cited 2014 Jul 14];56(1):61–72. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1856677&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

10. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell*. 2000;11:4131–42.
11. Vetrano S, Danese S. The role of JAM-A in inflammatory bowel disease: Unrevealing the ties that bind. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1165:308–13.
12. Oshitani N, Watanabe K, Nakamura S, Fujiwara Y, Higuchi K, Arakawa T. Dislocation of tight junction proteins without F-actin disruption in inactive Crohn's disease. *Int J Mol Med*. 2005;15:407–10.
13. Hering N a, Fromm M, Schulzke J-D. Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. *J Physiol* [Internet]. 2012 Mar 1 [cited 2014 Jul 22];590(Pt 5):1035–44. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3381811&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
14. Gupta P, Andrew H, Kirschner BS, Guandalini S. Is lactobacillus GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000;31:453–7.
15. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet*. 2011;43:246–52.
16. Buhner S, Buning C, Genschel J, Kling K, Herrmann D, Dignass A, et al. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut*. 2006;55:342–7.
17. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *The New England journal of medicine*. 1997 p. 1029–35.
18. Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, Hanauer SB, Panaccione R, et al. Adalimumab for Maintenance of Clinical Response and Remission in Patients With Crohn's Disease: The CHARM Trial. *Gastroenterology*. 2007;132:52–65.
19. Benjamin MA, McKay DM, Yang PC, Cameron H, Perdue MH. Glucagon-like peptide-2 enhances intestinal epithelial barrier function of both transcellular and paracellular pathways in the mouse. *Gut*. 2000;47:112–9.
20. Buchman AL, Katz S, Fang JC, Bernstein CN, Abou-Assi SG. Teduglutide, a novel mucosally active analog of glucagon-like peptide-2 (GLP-2) for the

treatment of moderate to severe Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16:962–73.

21. El-Tawil AM. Zinc supplementation tightens leaky gut in Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2012.
22. Amasheh M, Fromm A, Krug SM, Amasheh S, Andres S, Zeitz M, et al. TNFalpha-induced and berberine-antagonized tight junction barrier impairment via tyrosine kinase, Akt and NFkappaB signaling. *J Cell Sci*. 2010;123:4145–55.
23. Amasheh M, Schlichter S, Amasheh S, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, et al. Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells. *J Nutr*. 2008;138:1067–73.
24. Roselli M, Finamore A, Britti MS, Mengheri E. Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Br J Nutr*. 2006;95:1177–84.
25. Von Roon AC, Reese G, Teare J, Constantinides V, Darzi AW, Tekkis PP. The risk of cancer in patients with Crohn's disease. *Dis Colon Rectum*. 2007;50:839–55.
26. Kappelman MD, Farkas DK, Long MD, Erichsen R, Sandler RS, Sørensen HT, et al. Risk of cancer in patients with inflammatory bowel diseases: a nationwide population-based cohort study with 30 years of follow-up evaluation. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2014;12:265–73.e1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23602821>
27. Ding L, Lu Z, Lu Q, Chen Y-H. The claudin family of proteins in human malignancy: a clinical perspective. *Cancer Manag Res* [Internet]. 2013;5:367–75. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3825674&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
28. GONZALEZMARISCAL L. Tight junction proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2003. p. 1–44.
29. Balda MS, Matter K. Tight junctions. *J Cell Sci* [Internet]. 1998;111 ( Pt 5:541–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9454728>
30. Madara JL. Regulation of the movement of solutes across tight junctions. *Annu Rev Physiol*. 1998;60:143–59.

31. Tsukita S, Furuse M. Occludin and claudins in tight-junction strands: Leading or supporting players? *Trends in Cell Biology*. 1999. p. 268–73.
32. Yu QH, Yang Q. Diversity of tight junctions (TJs) between gastrointestinal epithelial cells and their function in maintaining the mucosal barrier. *Cell Biol Int*. 2009;33:78–82.
33. Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci*. 2008;121:2115–22.
34. Itoh M, Bissell MJ. The organization of tight junctions in epithelia: Implications for mammary gland biology and breast tumorigenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2003. p. 449–62.
35. 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*. 1999;147:1351–63.
36. Salim SY, Söderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis [Internet]*. 2011 Jan [cited 2014 Sep 2];17(1):362–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20725949>
37. Swisshelm K, Macek R, Kubbies M. Role of claudins in tumorigenesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005. p. 919–28.
38. Furuse M, Sasaki H, Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol*. 1999;147:891–903.
39. Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol [Internet]*. 2003;81:1–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12475568>
40. Ruffer C, Gerke V. The C-terminal cytoplasmic tail of claudins 1 and 5 but not its PDZ-binding motif is required for apical localization at epithelial and endothelial tight junctions. *Eur J Cell Biol [Internet]*. 2004 May [cited 2014 Sep 9];83(4):135–44. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0171933504703507>
41. Shin K, Fogg VC, Margolis B. Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22:207–35.
42. Mandell KJ, Parkos CA. The JAM family of proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005. p. 857–67.

43. Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, Vestweber D. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci.* 2004;117:19–29.
44. Gottardi CJ, Arpin M, Fanning AS, Louvard D. The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:10779–84.
45. Hoover KB, Liao SY, Bryant PJ. Loss of the tight junction MAGUK ZO-1 in breast cancer: relationship to glandular differentiation and loss of heterozygosity. *Am J Pathol.* 1998;153:1767–73.
46. Balda MS, Garrett MD, Matter K. The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol.* 2003;160:423–32.
47. John LJ, Fromm M, Schulzke J-D. Epithelial barriers in intestinal inflammation. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15:1255–70.
48. Sepehri S, Kotlowski R, Bernstein CN, Krause DO. Microbial diversity of inflamed and noninflamed gut biopsy tissues in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13:675–83.
49. Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F, Braesco V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium “The Intelligent Intestine,” held in Paris, June 14, 2002. *Am J Clin Nutr.* 2003;78:675–83.
50. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science.* 2005;307:1915–20.
51. Ojetti V, Gigante G, Ainora ME, Fiore F, Barbaro F, Gasbarrini A. Microflora imbalance and gastrointestinal diseases. *Dig Liver Dis Suppl.* 2009;3:35–9.
52. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews.* 2010. p. 859–904.
53. Zyrek AA, Cichon C, Helms S, Enders C, Sonnenborn U, Schmidt MA. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC?? redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell Microbiol.* 2007;9:804–16.
54. Peng L, Li Z-R, Green RS, Holzman IR, Lin J. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr.* 2009;139:1619–25.

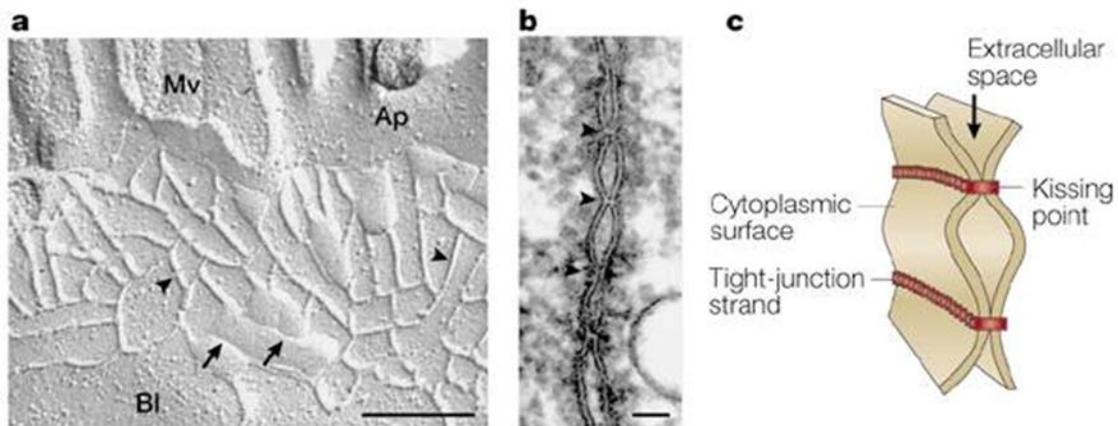
55. Gibson GR. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clinical Nutrition, Supplement*. 2004. p. 25–31.
56. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* [Internet]. 1998 Jul;115(1):182–205. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9649475>
57. Wang F, Vallen Graham W, Wang Y, Witkowski ED, Schwarz BT, Turner JR. Interferon- $\gamma$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Synergize to Induce Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Up-Regulating Myosin Light Chain Kinase Expression. *Am J Pathol*. 2005;166:409–19.
58. Mellemkjaer L, Johansen C, Gridley G, Linet MS, Kjaer SK, Olsen JH. Crohn's disease and cancer risk (Denmark). *Cancer Causes Control*. 2000;11:145–50.
59. Borrero PMH, Tamara D, Hechavarría M. Artículos originales. 2003;7(3):4–9.
60. Bernstein CN, Blanchard JF, Kliwer E, Wajda A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*. 2001;91:854–62.
61. Itzkowitz SH, Present DH. Consensus conference: Colorectal cancer screening and surveillance in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2005. p. 314–21.
62. Bressenot A, Cahn V, Danese S, Peyrin-Biroulet L. Microscopic features of colorectal neoplasia in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2014;20:3164–72. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3964388&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
63. Martin TA, Jiang WG. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1788:872–91.
64. Morin PJ. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res*. 2005;65:9603–6.
65. Tokunaga Y, Tobioka H, Isomura H, Kokai Y, Sawada N. Expression of occludin in human rectal carcinoid tumours as a possible marker for glandular differentiation. *Histopathology*. 2004;44:247–50.
66. Lichtenstein GR, Hanauer SB, Sandborn WJ. Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2009 Feb [cited 2014 Jul 16];104(2):465–83; quiz 464, 484. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19174807>

67. Lichtenstein GR, Abreu MT, Cohen R, Tremaine W. American gastroenterological association institute technical review on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2006. p. 940–87.
68. Ransford RAJ, Langman MJS. Sulphasalazine and mesalazine: serious adverse reactions re-evaluated on the basis of suspected adverse reaction reports to the Committee on Safety of Medicines. *Gut*. 2002;51:536–9.
69. Peyrin-Biroulet L, Deltenre P, de Suray N, Branche J, Sandborn WJ, Colombel J-F. Efficacy and safety of tumor necrosis factor antagonists in Crohn's disease: meta-analysis of placebo-controlled trials. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008;6:644–53.
70. Kirkwood B, Gjaffer M h., Brown S, Verma S. Polymeric Versus Elemental Diet as Primary Treatment in Active Crohn's Disease: a Randomized, Double-Blind Trial. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2000;95:735–9. Available from: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1572-0241.2000.01527.x>
71. Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: Antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology*. 2004. p. 1620–33.
72. Zettl KS, Sjaastad MD, Riskin PM, Parry G, Machen TE, Firestone GL. Glucocorticoid-induced formation of tight junctions in mouse mammary epithelial cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:9069–73.
73. Fischer A, Gluth M, Weege F, Pape U-F, Wiedenmann B, Baumgart DC, et al. Glucocorticoids regulate barrier function and claudin expression in intestinal epithelial cells via MKP-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2014 Feb [cited 2014 Sep 2];306(3):G218–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24309183>
74. Prefontaine E, Macdonald JK, Sutherland LR. Azathioprine or 6-mercaptopurine for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;CD000545.
75. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Bengmark S, Lochs H, Dörffel Y. Azathioprine and mesalazine-induced effects on the mucosal flora in patients with IBD colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:51–6.
76. Marinkovic G, Hamers AA, de Vries CJ, de Waard V. 6-Mercaptopurine Reduces Macrophage Activation and Gut Epithelium Proliferation Through Inhibition of GTPase Rac1. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(9):1487–95.

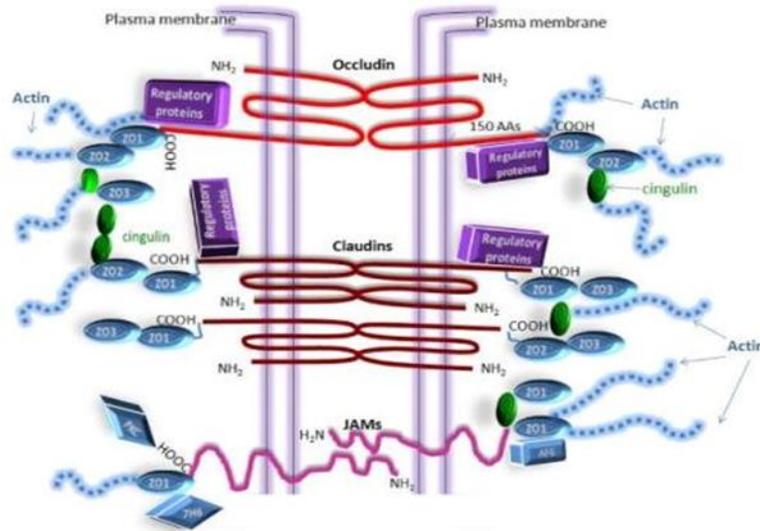
77. Beutheu Youmba S, Belmonte L, Galas L, Boukhattala N, Bôle-Feysot C, Déchelotte P, et al. Methotrexate modulates tight junctions through NF- $\kappa$ B, MEK, and JNK pathways. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2012 Apr [cited 2014 Sep 2];54(4):463–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22197938>
78. Hamada K, Shitara Y, Sekine S, Horie T. Zonula Occludens-1 alterations and enhanced intestinal permeability in methotrexate-treated rats. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;66:1031–8.
79. Rampton DS. Methotrexate in Crohn ' s disease. 2001;790–1.
80. Gordon-Walker TT, Stahl MW, Groome M, Todd J, Reynolds N, Mowat C. PWE-259 The efficacy of methotrexate in Crohn's disease: a clinical perspective. *Gut* [Internet]. 2012 May 28 [cited 2014 Sep 9];61(Suppl 2):A403–A403. Available from: [http://gut.bmj.com/cgi/content/long/61/Suppl\\_2/A403-b](http://gut.bmj.com/cgi/content/long/61/Suppl_2/A403-b)
81. Antunes O, Filippi J, Hébuterne X, Peyrin-Biroulet L. Treatment algorithms in Crohn's - Up, down or something else? *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014;28:473–83.
82. Di Paolo MC, Merrett MN, Crotty B, Jewell DP. 5-Aminosalicylic acid inhibits the impaired epithelial barrier function induced by gamma interferon. *Gut*. 1996;38:115–9.
83. Fischer A, Gluth M, Pape U-F, Wiedenmann B, Theuring F, Baumgart DC. Adalimumab prevents barrier dysfunction and antagonizes distinct effects of TNF- $\alpha$  on tight junction proteins and signaling pathways in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2014 Sep 2];304(11):G970–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23538493>
84. Karczewski J, Troost FJ, Konings I, Dekker J, Kleerebezem M, Brummer R-JM, et al. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2010 Jun [cited 2014 Aug 20];298(6):G851–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20224007>
85. Resta-Lenert S, Barrett KE. Probiotics and commensals reverse TNF-alpha- and IFN-gamma-induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2006;130:731–46.

86. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet.* 2011;43:246–52.
87. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:285–93.
88. Redzic Z. Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. *Fluids Barriers CNS.* 2011;8:3.
89. Pastorelli L, Salvo C De, Mercado JR, Vecchi M, Pizarro TT. Central role of the gut epithelial barrier in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation: Lessons learned from animal models and human genetics. *Frontiers in Immunology.* 2013.

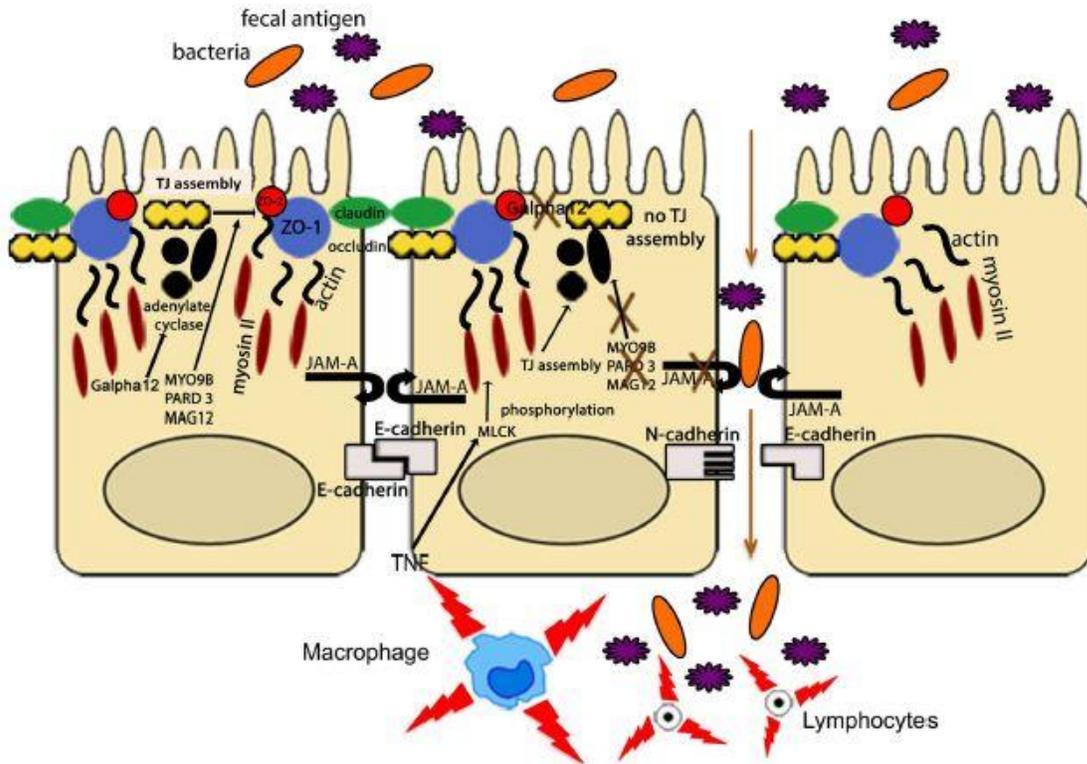
## Figuras



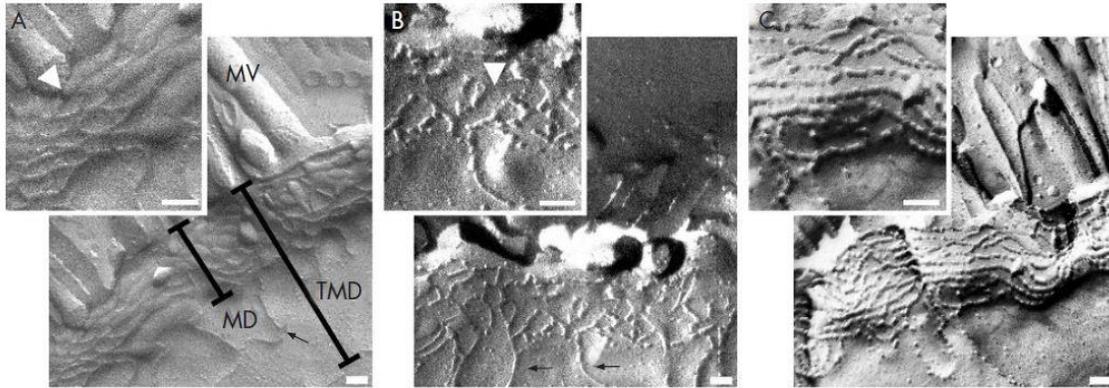
**Figura 1. Estructura de TJ de células epiteliales del intestino delgado.** (a) Imágenes de criofractura, (b) microscopía electrónica de transmisión, y (c) representación esquemática de su estructura tridimensional. En (a), el plano de micrografía es paralelo al plano de la membrana, y la TJ aparece como una banda de hebras de sellado anastomosados que rodean cada célula (puntas de flecha). Las hebras de sellado se observan como crestas formadas por partículas intramembrana, situadas en la cara citoplasmática de la fractura (cara P), o sus depresiones complementarias en la cara externa de la fractura (cara E), (flechas). Mv, microvellosidades; Ap, membrana apical; Bl, membrana basolateral). Barra de escala, 200 nm. En (b) se muestra un corte transversal de la unión, se observa como existen puntos de contacto íntimo (“besos”) entre las hemimembranas externas de las dos membranas plasmáticas que interactúan, correspondiendo cada conexión a una hebra de sellado (puntas de flecha). Barra de escala, 50 nm(87).



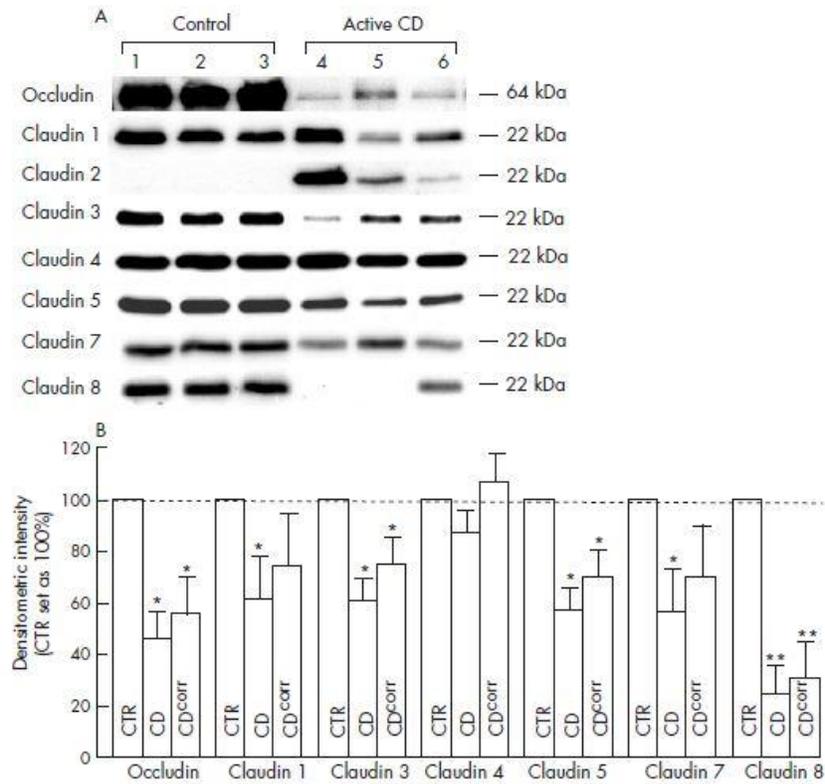
**Figura 2. Representación esquemática de las TJ entre dos células adyacentes.** Se indican las proteínas de transmembrana, como las claudinas, ocludina, y las moléculas de adhesión (Junctional Adhesion Molecule, JAMs) (nivel 1); las proteínas citosólicas, como las zonula ocludens-1 (ZO-1), ZO-2, ZO-3, cingulina, proteína-1 con múltiples dominios PDZ (MUPP1) (nivel 2), y el citoesqueleto de actina (nivel 3) (88).



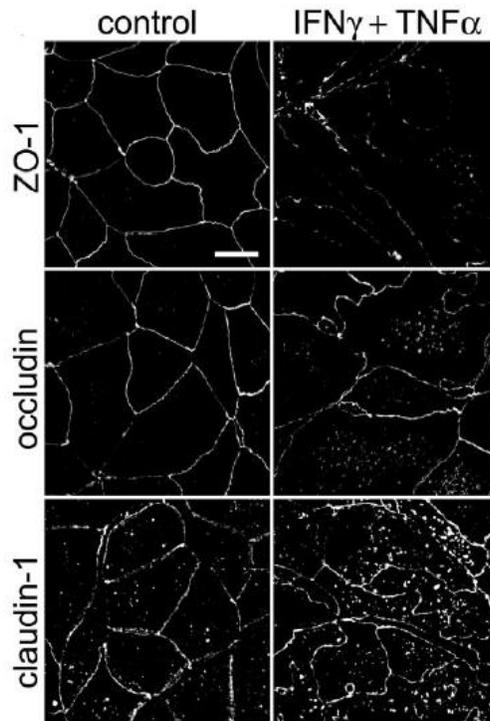
**Figura 3. Vías intracelulares implicadas en la translocación de bacterias.** La barrera epitelial juega un papel central en la homeostasis del intestino. Las células epiteliales intestinales forman un revestimiento semipermeable, con la función de barrera modulada por la presencia de TJs, AJs y desmosomas. La expresión y ensamblaje de estos complejos de proteínas están finamente regulados por varias vías intercelulares. Los polimorfismos en MYO9B, Pard3 y MAG12 y el deterioro en el eje de la guanilato ciclasa dan como resultado TJ defectuosas; la fosforilación de la miosina II a través de la activación de MLCK por el TNF conduce al desensamblaje de las TJ. La falta de proteínas de unión, como JAM-A, o alteraciones en la expresión (por ejemplo, N-cadherina dominante negativo, y sobreexpresión de claudina-2) conduce a un aumento de la permeabilidad del epitelio, lo que facilita la translocación de bacterias lumenales(89).



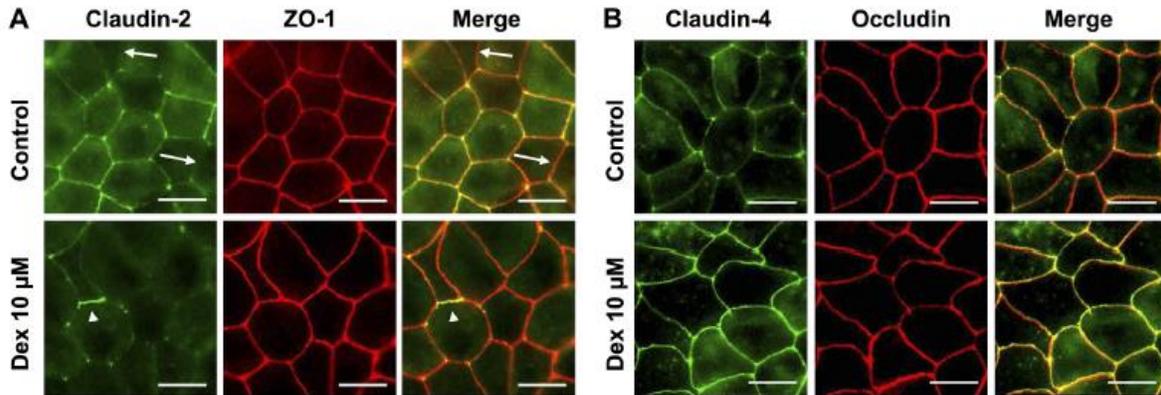
**Figura 4: Análisis por criofractura de las TJ en la EC.** (A) Control, (B y C) EC leve y con inflamación moderada. El control presenta uniones continuas (recuadro), con casi ninguna rotura de cadena. Por el contrario, las muestras con EC mostraron un número reducido de hebras y un aumento de roturas (punta de flecha en B), o una red compleja pero discontinuada (C). Las puntas de flecha en A y en B señalan hebras aberrantes. MD: profundidad de la malla principal de TJ; TMD: profundidad total de la malla de TJ incluyendo hebras aberrantes. MV: microvellosidades. Barra de escala, 100 nm (9).



**Figura 5. Expresión de las proteínas de TJ en la EC.** (A) Western blot para proteínas de TJ de tres individuos controles y tres pacientes con EC activa. La claudina 2 no pudo ser detectada en los controles, y la claudina 8 no pudo detectarse en los pacientes 4 y 5 con EC activa. (B) Evaluación estadística mediante densitometría de las bandas obtenidas en (A). Los valores representan las medias de la expresión de proteína analizada en comparación con los valores de control del mismo blot, los que se establecen como 100%. CTR: controles; CD: pacientes con EC activa, CDcorr: los pacientes con enfermedad de Crohn activa. Los valores fueron corregidos para la cantidad de proteína y para el cambio en el área de superficie de la mucosa. \* p, 0,05, \*\* p, 0,001 versus control (9).



**Figura 6. Disrupción de TJ inducida por citoquinas inflamatorias TNF- $\alpha$  y IFN- $\gamma$ .** Se cultivaron células CACO 2 con IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  y se analizaron los cambios en las proteínas ZO-1, ocludina y claudina-1 por microscopía de inmunofluorescencia. En los paneles de la derecha se puede observar que los tratamientos provocaron una clara alteración en la distribución de las proteínas mencionadas. La tinción de las TJ decreció en intensidad y tiene un patrón irregular luego del cultivo con las citoquinas (57).



**Figura 7. Cambios en la inmunofluorescencia de proteínas de las TJ en células Caco-2 tratadas con dexametasona.** Las células fueron cultivadas durante 35 con el vehículo (Control) o con dexametasona 10  $\mu\text{M}$  (Dex 10  $\mu\text{M}$ ). (A) Las flechas señalan ausencia de claudina-2 en células control. Las puntas de flecha, señalan la unión con preservación de Claudina-2 en células tratadas. Se evidencia una clara disminución global de la tinción para la proteína mencionada, con una conservación de la ZO-1. (B) Se encontró un aumento de tinción de la claudina-4 en células tratadas con dexametasona y una conservación global de la ocludina. (74).

**Figura 8. Efecto del metrotexato en la expresión de proteínas de TJ.** En el panel A se presenta un Western blot que evidencia la disminución de expresión de la proteína ZO-1 y de la ocludina en células tratadas con metrotexato. Las gráficas en B-D corresponden al análisis densitométrico de las bandas obtenidas en el Western blot, normalizadas respecto a los valores densitométricos de la  $\beta$ -actina del mismo carril, utilizados como controles internos. Se destaca que la expresión de claudina-1 permaneció incambiada luego del tratamiento con la droga. \*  $p < 0.05$  (75).

