



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células
de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con
claudinas”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Torres Granados Priscila Judith



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

México 2015



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.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

Hoja de datos del Jurado

1. Datos del alumno:
Torres
Granados
Priscila Judith
57851777
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
304245590
2. Datos del Propietario
Doctor
Luis Felipe
Montaño
Estrada
3. Datos del Propietario
Maestro en Ciencias
Alfonso José
Vilchis
Peluyera
4. Datos del Propietario/Tutora
Doctora
Erika Patricia
Rendón
Huerta
5. Datos del suplente
Doctora
María Cristina
Catañeda
Patlán
6. Datos del suplente
Doctora
Adriana Elizabeth
González
Villalba

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunobiología del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM, con el financiamiento del proyecto IN210813 por parte del PAPIIT y 177678 por parte del CONACyT.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 2 |
| 2.1 Uniones intercelulares | 3 |
| 2.1.1 Desmosomas | 4 |
| 2.1.2 Uniones Gap | 4 |
| 2.1.3 Uniones adherentes | 4 |
| 2.1.4 Uniones estrechas | 4 |
| 2.2 JAM (<i>Junctional Adhesion Molecule</i>)..... | 7 |
| 2.3 Tricelulina | 7 |
| 2.4 Ocludina | 8 |
| 2.5 Claudinas | 9 |
| 2.5.1 Interacciones entre claudinas..... | 13 |
| 2.6 Claudinas y cáncer..... | 14 |
| 2.7 Proteínas de choque térmico (<i>Hsp's</i>)..... | 18 |
| 2.7.1 Participación de las <i>Hsp's</i> en cáncer. | 25 |
| 2.8 Enfoques terapéuticos anticáncer basados en <i>Hsp's</i> extracelulares e intracelulares..... | 27 |
| 3. JUSTIFICACIÓN..... | 30 |
| 4. HIPÓTESIS | 31 |
| 5. OBJETIVOS | 31 |
| 6. METODOLOGÍA..... | 32 |
| 6.1 Línea celular | 32 |
| 6.2 Cultivo y manejo de líneas celulares | 32 |
| 6.3 Obtención de proteínas..... | 34 |
| 6.4 Ensayos de Western Blot..... | 35 |
| 6.5 Co-Inmunoprecipitación..... | 36 |
| 7.RESULTADOS | 37 |
| 7.1 Sobre-expresión de las diferentes claudinas en células AGS | 37 |
| 7.2 Expresión de <i>Hsp's</i> en células AGS control y células AGS que sobre-expresen claudinas-6, -7 y -9. | 38 |

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

| | |
|---|----|
| 7.3 Secreción de Hsp's en sobrenadantes de células AGS control y células AGS que sobre-expresen claudinas..... | 40 |
| 7.4 Interacción entre Hsp's, MMP's y Cldn's en células AGS control y células AGS transfectadas con claudinas..... | 41 |
| 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 44 |
| 9. CONCLUSIONES | 49 |
| 10. PERSPECTIVAS | 50 |
| 11. ANEXO..... | 51 |
| 12. BIBLIOGRAFÍA..... | 58 |

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

1. RESUMEN

El cáncer de estómago o adenocarcinoma gástrico causa cerca de un millón de muertes en el mundo anualmente. En las formas metastásicas de cualquier tipo de cáncer las células tumorales pueden infiltrar los vasos linfáticos de los tejidos, diseminarse a los ganglios linfáticos y penetrar en la circulación sanguínea, después de lo cual queda abierto virtualmente el camino a cualquier órgano del cuerpo.

Durante el desarrollo del cáncer, se llevan a cabo múltiples cambios en las células normales que alteran la expresión de ciertas proteínas, enzimas y rutas esenciales que alteran la homeostasis general y dan origen a un fenotipo tumoral. Las células adquieren ventajas que le permitan desarrollar el tumor, así como aumentar su capacidad de invadir y metastatizar, para lo cual requieren de la degradación de la matriz extracelular (MEC), proceso que se lleva a cabo por medio de enzimas llamadas metaloproteasas (MMPs). Las MMPs tienen la capacidad de alterar los contactos célula-célula o célula-MEC, con ayuda de proteínas que las asisten en su activación.

En el cáncer, existe una estrecha relación entre las metaloproteasas y las proteínas de choque térmico (Hsp's). Éstas últimas juegan un papel importante en la migración de las células cancerígenas ya que participan en la pérdida de adhesión célula-célula, la activación de las MMPs y la migración e invasividad de las células malignas en el cuerpo.

Se ha reportado que en el adenocarcinoma gástrico la sobreexpresión de proteínas de las uniones estrechas como las claudinas-6 y -9, correlaciona con el aumento en la proliferación, migración, invasividad celular y la expresión de MMP-2 y MMP-9. Debido a que las Hsp's están involucradas con la activación de MMP-2 y MMP-9, en este proyecto se evaluó si la sobreexpresión de las claudinas-6, -7 y -9 correlaciona con cambios en la expresión de las proteínas de choque térmico, (principalmente Hsp27, Hsp40, Hsp70 y Hsp90 $\alpha\beta$) y si estas claudinas colocalizan con las Hsp's.

Los resultados obtenidos mostraron un aumento en la expresión de la Hsp40 y Hsp90 en las células AGS transfectadas con claudina-9. De la misma manera se observó una probable co-localización de la Hsp90 con la claudina-6 Y -9. Los resultados en conjunto sugieren que la sobreexpresión de claudina-9 podría estar promoviendo la activación de MMP-2 y el aumento en la expresión de Hsp90 que, junto con el aumento en la permeabilidad celular, promovería la secreción de MMPs y Hsp's a través de vías paracelulares dañadas. Las Hsp's podrían participar manteniendo un ambiente proinflamatorio (con la inducción y secreción de citocinas y la expresión de marcadores de

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

superficie) propicio para la proliferación e invasión de las células cancerosas y favorable para la degradación de la matriz extracelular por las MMPs.

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer gástrico es la cuarta enfermedad más diagnosticada y la segunda causa de muerte relacionada con cáncer en el mundo¹ y se sabe que presenta tasas de mortalidad excepcionalmente altas².

De acuerdo a la “Clasificación de Lauren” en este tipo cáncer existen dos subtipos histomorfológicos: intestinal y difuso, los cuales difieren entre sí en su morfología en general, rasgos histológicos y en su composición molecular, además de su epidemiología, patogénesis, perfil genético y avance clínico³. El tipo intestinal tiende a formar masas con glándulas columnares o tubulares que se infiltran a través de un estroma desmoplásico (tejido formado alrededor de los tumores primarios que ayuda a la progresión e invasividad de las células cancerosas hacia otros tejidos mediante la metástasis). Por el contrario, el tipo difuso puede no presentarse como un tumor discreto pero sí como racimos de células poco cohesivas distribuidas a través del tejido del estómago, las cuales pierden la característica de poder expresar una de las principales moléculas de adhesión celular (E-cadherina)⁴.

Los patrones de metástasis tienden a diferir entre las dos clases de cáncer antes mencionadas, en donde el cáncer de tipo intestinal favorece las rutas hematogena (circulación sanguínea) y linfática (vasos linfáticos); mientras que el tipo difuso se propaga por la vía transcelómica (peritoneal) y diseminación linfógena con ocasional propagación por sangre⁴.

La invasividad, progresión y metástasis por cualquiera de las rutas metastásicas de este y otros tipos de cáncer se ha relacionado directamente con el desensamble de los contactos célula-célula (principalmente de las uniones estrechas) que se dan en los tejidos cuando se presenta un proceso canceroso, promoviendo con ello la invasión hacia otros tejidos.

Prueba de lo anteriormente citado son los estudios que han demostrado que el epitelio gástrico exhibe una serie de cambios en la expresión de las claudinas (proteínas transmembranales de las uniones estrechas) durante la progresión hacia carcinoma metastásico. La alta o baja regulación de claudinas está involucrada en el proceso de progresión de cáncer; la sobre-expresión de claudinas en el tracto intestinal se ha visto relacionado con la proliferación celular y la adquisición de fenotipos displásicos;

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

generalmente se presenta la reducción de la expresión de estas proteínas con la progresión del cáncer y la adquisición de nuevas características más agresivas⁵.

2.1 Uniones intercelulares

Las células epiteliales y endoteliales de los tejidos forman barreras para separar y mantener a los órganos en subcompartimentos funcionales. Este aislamiento y compartimentalización del ambiente externo es crucial para la función de los órganos en los organismos multicelulares. Las células controlan estas barreras selectivas mediante la regulación del movimiento del agua, iones y proteínas a través de las monocapas, generando así la polaridad y función de la estructura celular. El movimiento de iones y moléculas entre las células se conoce como “permeabilidad celular” y es regulado por sitios de contacto célula-célula⁶.

Los contactos célula-célula están lejos de ser estructuras estáticas que mantienen las barreras simplemente por la unión de las células, de hecho estos contactos se someten a constante remodelación para permitir la extrusión de células apoptóticas, así como la incorporación de nuevas células epiteliales diferenciadas derivadas de células progenitoras sin la pérdida de función de barrera⁶. Éstos contactos célula-célula en los epitelios consisten de cuatro principales estructuras de adhesión y comunicación celular: desmosomas, uniones Gap, uniones adherentes (UA) y uniones estrechas (UE) (Fig. 1)

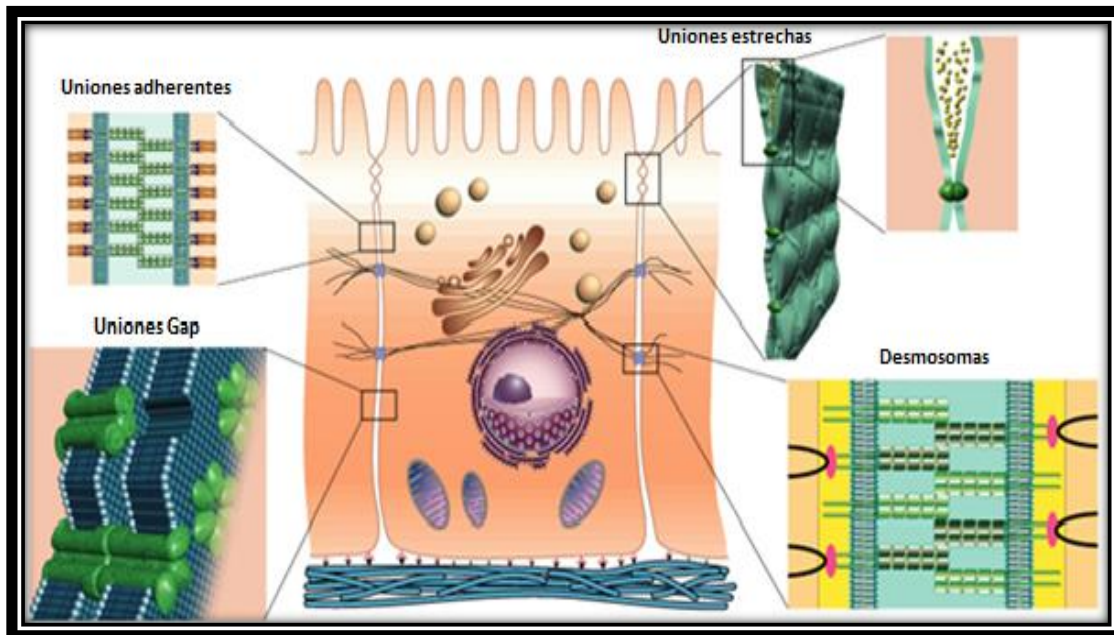


Fig. 1. Complejo multimolecular de uniones intercelulares (Wiley et. al. 1999)

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

2.1.1 Desmosomas

Son puntos adherentes que forman una red continua de células que se extiende a todo el tejido a través de la unión de sus proteínas integrales de membrana (desmocolina y desmogleina) mediante desmoplaquinas (placofilina y placoglobina) a filamentos intermedios⁷. Los desmosomas son cruciales para la integridad del tejido debido a su alta capacidad de adherencia con lo cual proporcionan cierta rigidez a la célula, además de que pueden ser reguladas por la proteína cinasa C cuando se requiere la remodelación dinámica de la adhesión célula-célula^{7,8}.

2.1.2 Uniones Gap

Las uniones Gap (UG) son los canales únicos que permiten la difusión de pequeños metabolitos, mensajeros secundarios, iones y otras moléculas entre las células vecinas. La comunicación a través de estas uniones es esencial para la transducción eléctrica, señalización y nutrición⁹.

Están formadas por hemicanales llamados conexones que se encuentran insertos en la membrana de dos células contiguas los cuales, a su vez, están formados por proteínas integrales de membrana llamadas conexinas. La apertura o cierre de estos canales es un proceso dinámico altamente regulado a diferentes niveles¹⁰.

2.1.3 Uniones adherentes

Las uniones adherentes (UA) son microdominios que proporcionan fuerza de adhesión y mecánica a las uniones célula-célula del epitelio. Realizan múltiples funciones, incluyendo la iniciación y estabilización de la adhesión célula-célula, regulación del citoesqueleto de actina, señalización intracelular y regulación de la transcripción. El centro de las uniones adherentes incluye interacciones entre glicoproteínas transmembranales de la superfamilia de las cadherinas, como la E-cadherina, y de la familia de las cateninas incluyendo p120-catenina, β -catenina y α -catenina; juntas, estas proteínas controlan la formación, mantenimiento y función de las uniones adherentes¹¹.

2.1.4 Uniones estrechas

Las uniones estrechas (UE) son las uniones intercelulares más apicales de las células endoteliales y epiteliales y crean la principal barrera de regulación del movimiento paracelular del agua y solutos a través del epitelio. Esta barrera es variable y regulada fisiológicamente, por lo que su desensamble y/o desorganización pueden contribuir a enfermedades en los humanos¹².

Dentro de una célula, las uniones estrechas actúan como una barrera que bloquea el movimiento de proteínas entre las superficies apical y basolateral, con lo cual contribuyen

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

al mantenimiento de la polaridad de la célula¹³⁻¹⁵. Entre células adyacentes, las UE llevan a cabo una función de “compuerta” la cual regula el movimiento paracelular de iones y moléculas pequeñas entre ambas superficies. La función de compuerta de las UE actúa como una barrera dinámica entre el ambiente exterior e interior que puede ser alterada en respuesta a señales ambientales, fisiológicas o farmacológicas¹⁶.

La regulación de la difusión de iones, solutos y agua a través del espacio paracelular por las uniones estrechas (función de compuerta) junto con la función de barrera, mantienen y regulan la compartimentalización celular (Fig. 2), por lo tanto, estas uniones establecen compartimentos separados en los organismos multicelulares y son cruciales para el intercambio de sustancias entre el ambiente celular externo e interno mediante la expresión de proteínas de transporte tejido-específicas¹⁷.

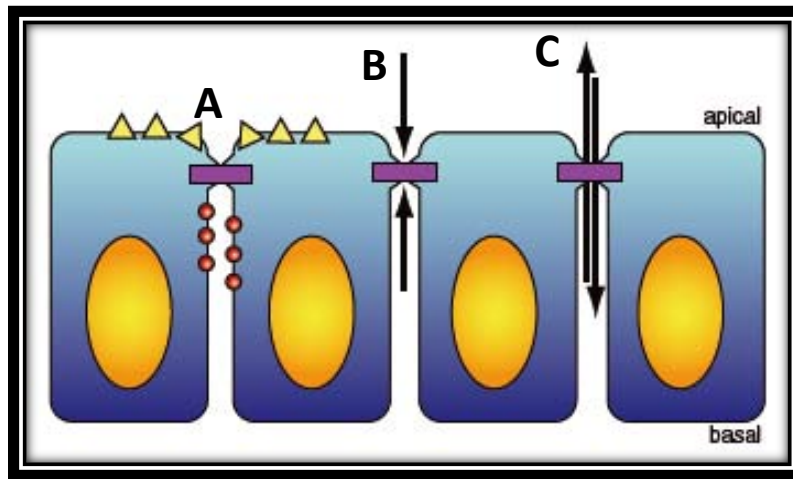


Fig. 2. Función de barrera y compuerta de las uniones estrechas. (A) Las UE (representadas por rectángulos morados) actúan como barrera para prevenir la mezcla de componentes de la membrana apical y basolateral. (B) En su función de “compuerta” las UE pueden formar un sello entre las células epiteliales que bloquea el movimiento de iones a través del espacio paracelular. (C) Alternativamente, algunas UE son “permisivas” o “de fuga” y permiten el movimiento de agua y iones a través del espacio paracelular (Gupta IR Y Ryan AK, 2010¹⁸)

Las uniones estrechas pertenecen a un complejo multimolecular que comprende más de 40 proteínas tanto citosólicas como transmembranales y que puede ser dividido en cuatro principales grupos: 1) proteínas de placa o andamiaje (*scaffolding proteins*) que sirven como enlace entre las proteínas integrales de membrana y el citoesqueleto de actina y como adaptadores para el reclutamiento de moléculas citosólicas implicadas en la señalización celular; 2) proteínas nucleares y citosólicas que incluyen proteínas reguladoras, supresores tumorales, y factores transcripcionales y post-transcripcionales que interactúan directa o indirectamente con las proteínas de placa de las UE para

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

coordinar funciones como la regulación de la permeabilidad paracelular de solutos, proliferación y polaridad celular; 3) proteínas que regulan el tráfico vesicular y 4) proteínas transmembranales que median el contacto directo entre células y forman barreras que regulan la permeabilidad, tales como las proteínas JAM (*junction adhesion molecule*), tricelulina, ocludina y claudinas^{5,19} que se describen a continuación (Fig. 3).

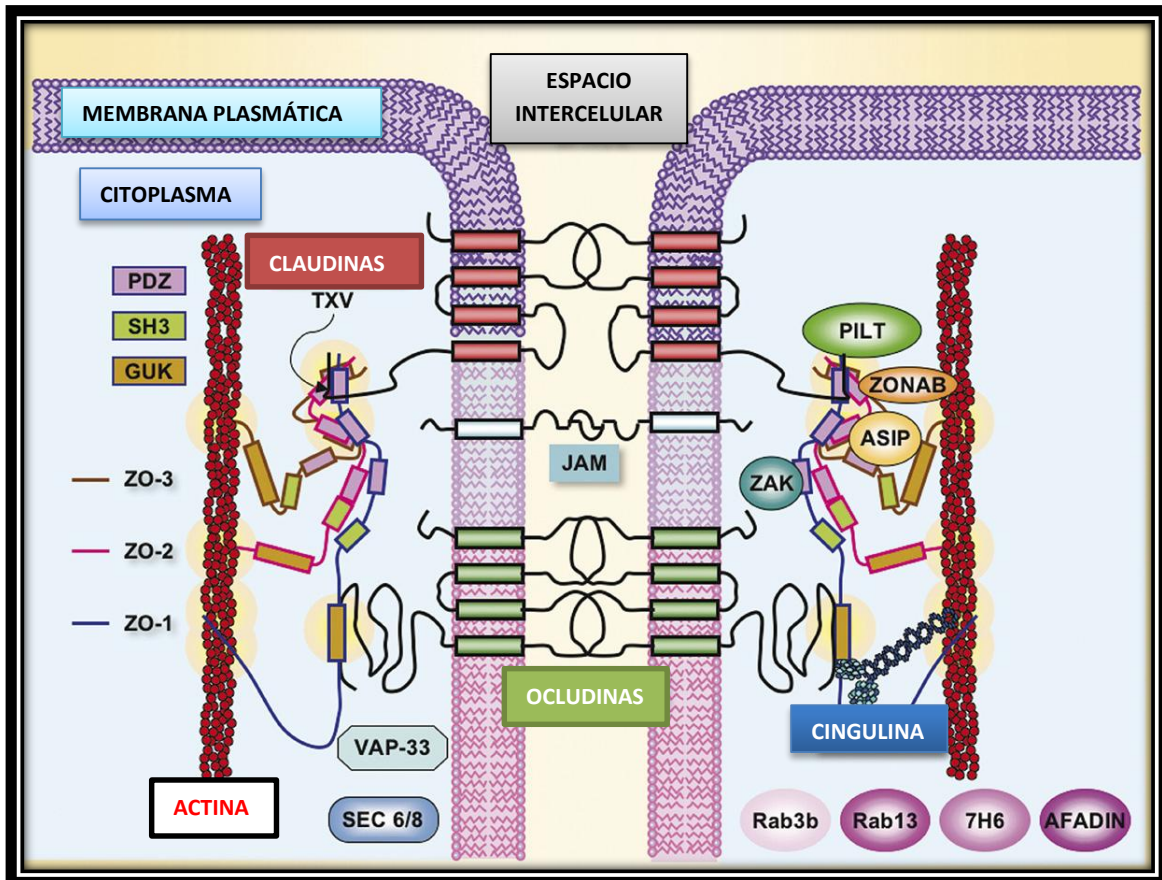


Fig. 3. Estructura molecular de las uniones estrechas. Las UE están conformadas por proteínas que pueden permanecer en la membrana plasmática (como claudinas, ocludinas y JAM), participar en la fijación de las UE al citoesqueleto (tales como: ZO-1, ZO-2, ZO-3, ZONAB o cingulina), participar en tráfico vesicular (por ejemplo: VAP-33, SEC 6/8, Rab 3b, Rab13), aquellas involucradas en la señalización (como: ASIP, ZAK, sAfadina), otras que residen temporalmente en las UE (PILT, JACOB) y aquellas que son importantes para la formación de las UE (por ejemplo: 7H6). Estas proteínas poseen dominios que les permiten adherirse a otras especies de proteínas tales como: PDZ, SH3, el homólogo de GUK, etc. (Cerejido et. al, 2007)

2.2 JAM (*Junctional Adhesion Molecule*)

Las JAM's son proteínas glicosiladas que han sido localizadas junto con las ocludinas y claudinas en las UE. A diferencia de ellas, las JAM's tienen un sólo dominio transmembranal, una porción extracelular que está plegado a dos dominios similares a las

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

Ig tipo V y una cola citoplasmática carboxilo-terminal corta con un sitio de unión a PDZ¹⁹⁻²⁰.

Estas proteínas son miembros de una superfamilia de inmunoglobulinas y son expresadas en células epiteliales y otros tipos celulares tales como los leucocitos, endotelio y plaquetas. Se han identificado cuatro miembros en esta familia: JAM-A, JAM-B, JAM-C y JAM4/JAM-L (JAM4 se refiere a la proteína en ratón, mientras que la JAM-L se refiere al homólogo de JAM-4 en humano) (Mandelland Parkos, 2005). En los epitelios, JAM-A y JAM-C se localizan en las UE, mientras que JAM-B se ubica a lo largo de la membrana lateral²⁰.

Las proteínas JAM están involucradas en la trans migración celular y en el ensamble de las uniones celulares, así como en los mecanismos de adhesión de células epiteliales y endoteliales.

2.3 Tricelulina

La tricelulina es una proteína formada por 4 dominios transmembranales y tiene una secuencia similar a la ocludina en el dominio citoplasmático C-terminal de aproximadamente 130 aminoácidos uniéndose, al igual que la ocludina, a ZO-1 por medio de ésta región²¹.

Es la única proteína conocida que se encuentra muy concentrada en las UE orientada verticalmente en las hebras de las mismas en los contactos tricelulares. Estas uniones estrechas tricelulares se encuentran perpendicularmente al plano del epitelio e involucran hebras adicionales de partículas intramembranales. Al punto de contacto de tres células, las hebras superiores de las uniones estrechas bicelulares giran en dirección basal, mientras las hebras de las uniones estrechas orientadas verticalmente forman el “elemento central” de las uniones tricelulares. El centro de la unión estrecha tricelular es un tubo estrecho que está implicado en el control del flujo paracelular de macromoléculas²².

El silenciamiento de esta proteína en células epiteliales resulta en una organización anormal de las UE tricelulares, lo que ocasiona daños en la función de barrera epitelial. Se ha visto también, que la disminución de ocludina en cultivos de células epiteliales causa la localización de la tricelulina hacia los contactos bicelulares de las UE, indicando la importancia de la ocludina para la concentración de tricelulina en las uniones estrechas tricelulares²³.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

2.4 Ocludina

Fue la primera proteína en ser identificada como proteína integral de membrana localizada en las UE, contando con un peso molecular de aproximadamente 60 kDa. Tiene 4 dominios transmembranales y tres regiones intracitoplasmáticas: 1) dominio carboxilo terminal largo; 2) dominio amino terminal corto y 3) una asa intracelular corta. El dominio carboxilo terminal es rico en residuos de serina, treonina y tirosina, los cuales sirven de blancos de un gran número de proteínas y tirosinas cinasas. Una de las asas extracelulares consta de un alto contenido (~61%) de residuos de tirosina y glicina, mientras que la segunda asa es rica (~18%) en residuos de tirosina^{20,24}. Esta proteína puede ser fosforilada en residuos de serina/treonina y la forma fosforilada parece ser preferencialmente expresada en las UE, mientras que la forma no fosforilada es detectada a lo largo de la membrana basolateral²⁵.

La ocludina interactúa directamente con las ZO-1, ZO-2 y ZO-3 en las uniones estrechas y estas interacciones son requeridas para la localización de la proteína dentro de las UE. Se ha demostrado que la mitad del dominio C-terminal que consiste en ~250 aminoácidos, es responsable de la interacción con ZO-1 y ZO-2. Además, la ocludina interactúa con el citoesqueleto de actina y con las proteínas JAM indirectamente mediante su interacción con las proteínas ZO (González-Mariscal et al. 2000, Mandell & Parkos 2005).

Diversos estudios han demostrado la participación de la ocludina en funciones de barrera de las uniones estrechas, por ejemplo, la sobre-expresión de ocludina en cultivo de células MDKC (células epiteliales derivadas de riñón canino) incrementa el número de UE, lo que resulta en la elevación de su resistencia transepitelial (McCarthy, K. et al, Cell Sci. 1996). Además, se ha visto que la introducción del dominio C-terminal truncado en células MDKC o en embriones de *Xenopus* resultan en un incremento de fugas en el transporte paracelular que se da en las UE, lo que indica la importancia que tiene esta proteína para un correcto y selectivo movimiento de iones a través de las UE (Balda, M. et al. J. Cell Biol. 1996)²⁶.

Una función más que se le ha atribuido a la ocludina es su capacidad de unirse a moléculas relacionadas con la transducción de señales como TGF- β y participar en el proceso de apoptosis mediante las vías de las MAPK y Akt²⁷, sin embargo, a pesar de las múltiples funciones que lleva a cabo, también se ha demostrado que las UE estrechas pueden formarse sin esta proteína, tal es el caso de las células endoteliales, tejidos no neuronales y en algunas células de Sertoli²⁸.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

2.5 Claudinas

En mamíferos, las claudinas pertenecen a una familia multigénica constituida por 24 isorformas (y tres más recientemente descritas que aún están a discusión en cuanto a su clasificación) con un peso que varía entre 24-34kDa. En humano se han identificado 23 de las 24 isoformas a excepción de la Claudina 13, la cual se encuentra presente sólo en roedores^{29,30} (Tabla 1).

Son proteínas integrales de membrana con cuatro dominios transmembranales, un extremo amino terminal, que a excepción de Claudina-5, -16 y -25 es muy corto (2- 6 aminoácidos), una secuencia carboxilo terminal larga (la cual varía según las isoformas), dos asas extracelulares (AE1 que es larga (52 residuos) y AE2 que es corta (16-33 residuos)) y una asa intracelular de ~15 aminoácidos³¹ (Fig. 4).

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

| Protein name | Synonymous names | Gene name | Human chromosome |
|--------------|---|---------------|------------------|
| Claudin 1 | SEMP1 (senescence-associated epithelial membrane protein 1) | <i>CLDN1</i> | 3q28-29 |
| Claudin 2 | | <i>CLDN2</i> | Xq22.3-23 |
| Claudin 3 | RVP1 (rat ventral prostate 1 protein) | <i>CLDN3</i> | 7q11.23 |
| | CPETR2 (<i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin receptor 2) | | |
| Claudin 4 | CPE-R, CPER (<i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin receptor) | <i>CLDN4</i> | 7q11.23 |
| | CPETR1 (<i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin receptor 1) | | |
| | WBSCR 8 (Williams-Beuren syndrome chromosomal region 8 protein) | | |
| Claudin 5 | TMVCF (transmembrane protein deleted in velo-cardio-facial syndrome) | <i>CLDN5</i> | 22q11.2 |
| | MBEC (mouse brain endothelial cell 1) | | |
| Claudin 6 | | <i>CLDN6</i> | 16p13.3 |
| Claudin 7 | CEPTRL2 (<i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin receptor-like 2) | <i>CLDN7</i> | 17p13.1 |
| Claudin 8 | | <i>CLDN8</i> | 21q22.1 |
| Claudin 9 | | <i>CLDN9</i> | 16p13.3 |
| Claudin 10 | CPETRL3 (<i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin receptor-like 3) | <i>CLDN10</i> | 13q32.1 |
| | OSP-L (oligodendrocyte-specific protein-like) | | |
| Claudin 11 | OSP (oligodendrocyte-specific protein) | <i>CLDN11</i> | 3q26.2 |
| Claudin 12 | | <i>CLDN12</i> | 7q21.13 |
| Claudin 13* | | <i>Cldn13</i> | |
| Claudin 14 | | <i>CLDN14</i> | 21q22.13 |
| Claudin 15 | | <i>CLDN15</i> | 7q22.1 |

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

Continuación...

| Protein name | Synonymous names | Gene name | Human chromosome |
|--------------|----------------------|---------------|------------------|
| Claudin 16 | PCLN1 (Paracellin-1) | <i>CLDN16</i> | 3q28 |
| Claudin 17 | | <i>CLDN17</i> | 21q22.1 |
| Claudin 18 | | <i>CLDN18</i> | 3q22.3 |
| Claudin 19 | | <i>CLDN19</i> | 1p34.2 |
| Claudin 20 | | <i>CLDN20</i> | 6q25.3 |
| Claudin 21 | | <i>CLDN21</i> | 4q35.1 |
| Claudin 22 | | <i>CLDN22</i> | 4q35.1 |
| Claudin 23 | | <i>CLDN23</i> | 8p23.1 |

*Cldn 13 sólo en roedores

Tabla 1. Familia de las claudinas (Elkouby-Naor L. & Ben-Yosef T. 2010)

La AE1 de ~52 residuos de aminoácidos es responsable de la permeabilidad selectiva de las UE. Contiene una secuencia altamente conservada [Gly-Leu-Trp-x-x-Cys-(8-10aa)-Cys], la cual determina el flujo de iones y pequeñas moléculas a través de la vía paracelular. Contiene dos cisteínas altamente conservadas que ayudan a estabilizar la estructura secundaria de esta asa mediante un puente disulfuro; además, estos aminoácidos cargados juegan un papel crítico en la determinación de la selectividad de iones en las UE^{32,33}. Se ha demostrado que al mutar una o ambas cisteínas disminuye la capacidad de Cldn-5 para formar uniones estrechas con una alta resistencia³⁴. Ésta asa contiene el receptor de entrada para el virus de la hepatitis C.

La AE2 consta de 16-33 residuos de aminoácidos y se ha propuesto un modelo de hélice-giro-hélice para ella³⁵. Participa en la oligomerización de las claudinas requerida para la formación de las hebras de las UE dentro de la célula, así como también en la interacción cabeza-cabeza de las claudinas entre células adyacentes. En algunos miembros de la familia (cldn-3 y 4) cuenta con un sitio de unión a la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (CPE)³⁶. Ambas asas extracelulares son necesarias para la regulación de las interacciones claudina-claudina.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

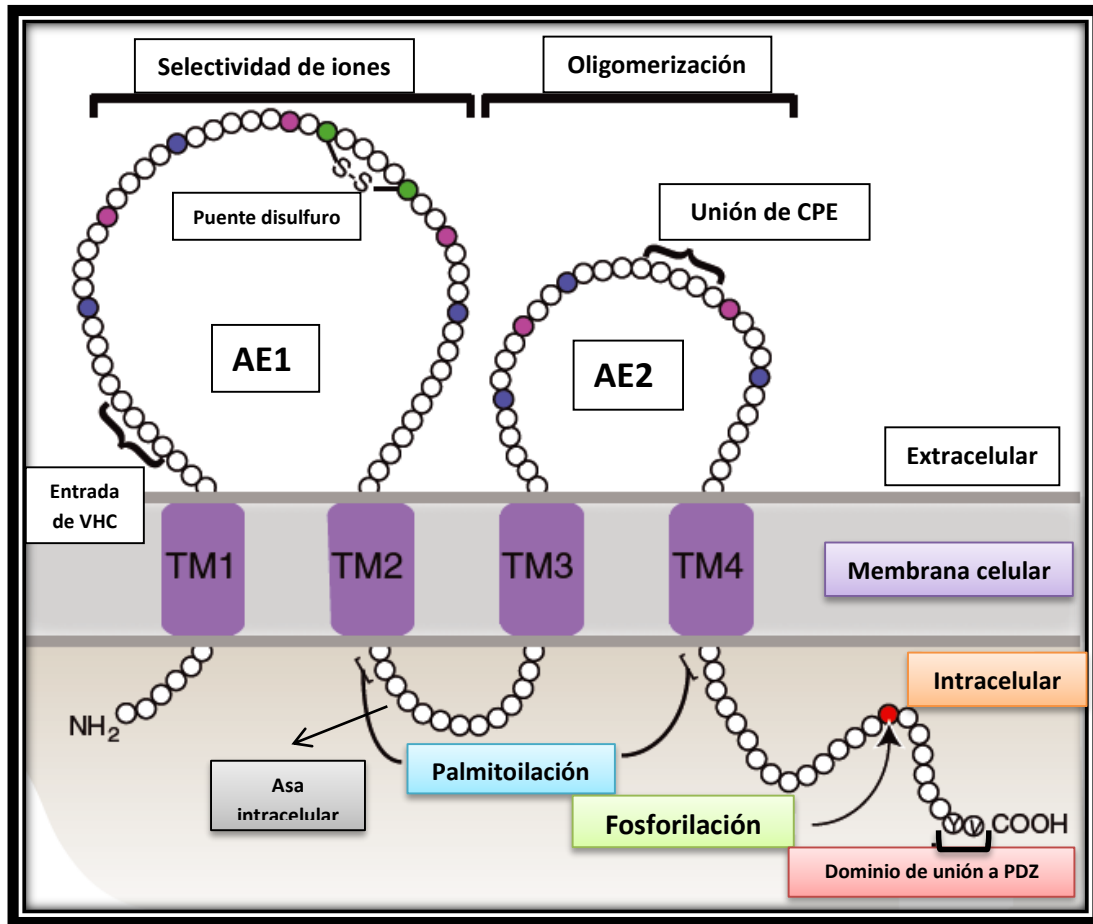


Fig. 4. Estructura de las claudinas. Se muestran los cuatro dominios transmembranales (TM1-TM4), dos asas extracelulares (AE1 y AE2), los extremos C- terminal y N-terminal citoplásmicos y una asa intracelular. En la AE1 se puede observar la región de entrada para el Virus de Hepatitis C (VHC), los residuos de aminoácidos básicos (azul) y ácidos (rosa) que regulan la selectividad de iones de las UE y los puentes disulfuro formados por dos cisteínas conservadas (verde). En la AE2 se observa el sitio de unión para la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (CPE)* y los residuos de aminoácidos básicos y ácidos. El extremo C-terminal presenta sitios de fosforilación (círculo rojo) y un dominio de unión a PDZ. Los sitios de palmitoilación se muestran en el asa intracelular y el extremo C-terminal inmediatamente seguidos de los dominios transmembranales 2 y 4. (Gupta IR Y Ryan AK, 2010¹⁸)

*Presente sólo en algunos miembros de la familia

La cola citoplasmática de las claudinas muestra una variación considerable entre los miembros de la familia. Es el sitio donde se dan las modificaciones post-traduccionales que tienen que ver con qué tan estrechas sean las uniones y con la localización de las claudinas, además de que contienen residuos que regulan su estabilidad. Los últimos dos aminoácidos del extremo carboxilo terminal interactúan con el dominio PDZ que sirve

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

como anclaje a proteínas citoplásmicas entre las que se encuentran las ZO-1, -1 y -3, MUPP1 y PALS-1³⁷.

Las claudinas son el componente clave de la estructura y función de las uniones estrechas y su función más sobresaliente y obvia es la de formar las hebras de las UE, de hecho, se sabe que las asas extracelulares de estas proteínas son las que ocupan el espacio presente entre las células adyacentes, dando origen a las diferentes uniones que se dan entre miembros de la familia. Un ejemplo de la importancia de las hebras de las UE en los contactos entre células, es aquél en el que, al sobre-expresarse las claudinas en fibroblastos de ratón carentes de UE endógenas, las claudinas exógenas se concentran en los contactos célula-célula entre células adyacentes y forman hebras de UE³⁸.

2.5.1 Interacciones entre claudinas

Las interacciones cabeza-cabeza que se dan en las claudinas a través de las asas extracelulares entre membranas celulares opuestas se conocen como homotípicas y heterotípicas dependiendo de si se dan entre el mismo tipo de Claudina o si es entre diferentes productos génicos. En general, la mayoría de las claudinas parecen intraccionar homotípicamente, lo cual se basa en su colocalización en los sitios de contacto célula-célula cuando son expresadas por fibroblastos (Fig. 5)³⁹.

Las interacciones heterotípicas son menos frecuentes y de hecho se ha encontrado que muchas combinaciones de claudinas son incompatibles heterotípicamente, mientras que son heteroméricamente (interacción lateral en la membrana) compatibles cuando son expresadas por la misma célula, por ejemplo: cldn-3 y -4 o cldn-16 y -19.

Además de la interacción cabeza-cabeza, las claudinas también pueden interactuar de lado a lado (lateralmente) en el plano de la membrana, a lo cual se le llama interacción homomérica y heteromérica. Al contrario de las interacciones heterotípicas, las homoméricas son más frecuentes, formándose incluso entre claudinas que sean incompatibles heterotípicamente, tal es el caso de cldn-3 y -4 y cldn-16 y -19. De hecho, se sabe que tal vez las interacciones heteroméricas sean requeridas para que los pares de claudinas puedan formar hebras de uniones estrechas funcionales⁴⁰.

Las diferentes interacciones entre claudinas dan lugar a la formación de poros paracelulares de diferentes diámetros que pueden ir desde 4 hasta los 50 Å. Además, las cargas presentes en los dominios extracelulares de estas proteínas permiten discriminar entre aniones y cationes.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

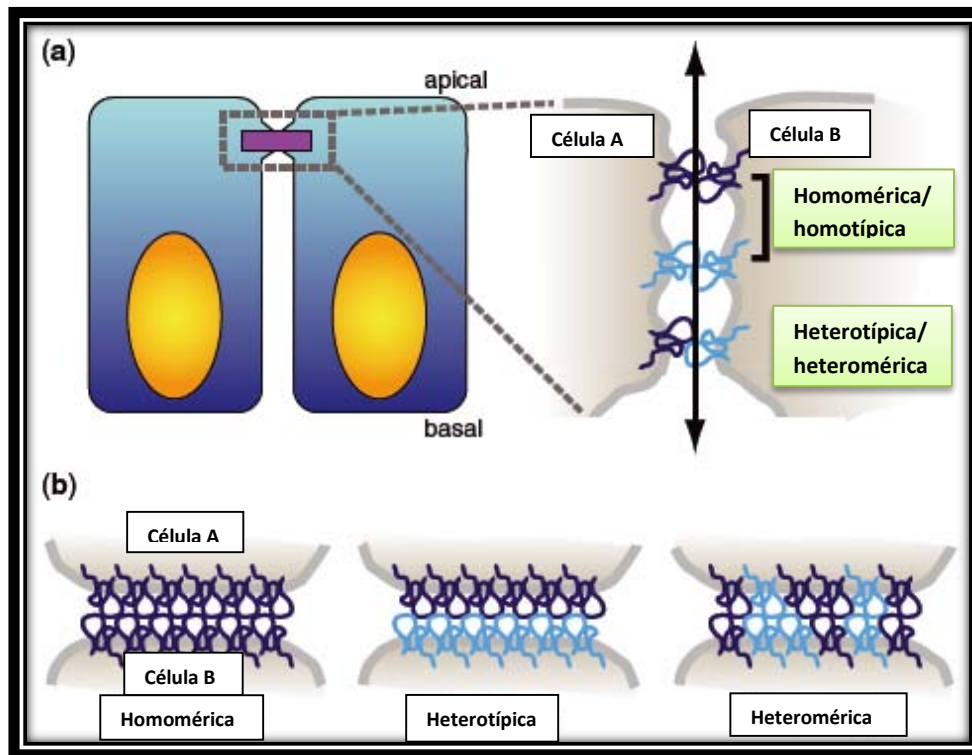


Fig. 5. Interacciones entre UE. a) Muestra la vista lateral ampliada de las UE y el transporte paracelular indicado por la flecha. Se muestran las interacciones homoméricas-homotípicas (misma isoforma) en las primeras dos hebras y las interacciones heterotípicas-heteroméricas entre dos diferentes miembros de la familia de las claudinas. b) Interacciones entre las hebras de las uniones estrechas: homoméricas, heterotípicas y heteroméricas. (Gupta IR Y Ryan AK, 2010¹⁸).

2.6 Claudinas y cáncer

Desde hace más de 30 años se ha tenido evidencia acerca de la alteración de las uniones estrechas en epitelios cancerosos. Observaciones realizadas en tumores demostraron que, estos procesos cancerosos atenúan o eliminan las UE, incrementan la permeabilidad paracelular de moléculas traza, disminuyen la TER (resistencia eléctrica transepitelial) y provocan discontinuidades y reducciones en el número de hebras de UE, lo cual ha sido detectado por microscopía por criofractura. Tomando en cuenta los resultados anteriores en conjunto, éstos muestran un decremento en la función de barrera epitelial de las células cancerosas, por lo tanto, la pérdida de las uniones estrechas constituye un paso esencial en el desarrollo del cáncer⁴¹⁻⁴³. En general, las células de cáncer pierden sus

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

funciones específicas y polaridad con una disminución en el desarrollo de uniones estrechas, lo cual muestra que las células de cáncer pierden irreversiblemente y progresivamente UE por medio de cambios genéticos y epigenéticos.

Se ha visto que durante la progresión y desarrollo del cáncer, las células epiteliales cambian de fenotipo (se desdiferencian en términos de atipia estructural) mediante la transición epitelio-mesénquima (TEM). Las células epiteliales normales presentan dos particulares características fenotípicas: 1) la formación de capas integradas por células que están unidas mediante UE, y 2) una polarización apical-basolateral (Cerejido et. al. 2004). Por el contrario, las células mesenquimales no forman capas organizadas de células, no están polarizadas y los contactos entre células vecinas no están asociados con la lámina basal por lo tanto, la TEM y la pérdida de UE contribuyen en el desarrollo del cáncer.

La pérdida de la compartimentalización en los epitelios que conduce a la ruptura de la barrera epitelial ha sido asociada con cambios en la expresión de las claudinas (principales componentes de las UE) en muchos tipos de cáncer. Se ha demostrado que tanto la regulación a la alta como la regulación a la baja de las claudinas están involucradas en la progresión del cáncer en gran variedad de cánceres. De hecho, durante la última década se ha establecido que las claudinas son anormalmente expresadas en gran variedad de tumores malignos tales como cáncer de mama, cáncer gástrico, carcinoma de células renales, mesotelioma, cáncer del tracto biliar y hepatocelular⁴⁴⁻⁴⁶(Tabla 2).

Se ha mostrado que mientras una isoforma en particular se encuentra silenciada en ciertos tipos de cáncer esa misma proteína se encuentra sobre-expresada en otros carcinomas, sugiriendo que la función de las claudinas puede ser tejido-específica y puede depender de un circuito particular de la célula⁴⁷.

La mayoría de las claudinas tienden a disminuir en las diferentes variedades de cánceres, sin embargo, la expresión de algunas de estas proteínas como la cldn-3, -4 y -7 incrementan en tumores originados del estómago, ovario, útero, mama, páncreas, vejiga, colon próstata y tiroides⁴⁸. Además, por ejemplo, se ha observado que en esferoides de cáncer de mama la re-expresión de cldn-1 induce apoptosis, mientras que estos cambios no han sido detectados en cultivos celulares de dos dimensiones⁴⁹.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

| | | |
|------------|---------------|------|
| Claudin 1 | Breast | Down |
| | Cervical | Down |
| | Colorectal | Up |
| | Epidermis | Up |
| | Esophagus | Up |
| | | Down |
| | Gastric | Up |
| | Hepatocyte | Down |
| | Prostate | Up |
| Claudin 2 | Cervical | Down |
| | Colorectal | Up |
| Claudin 3 | Breast | Up |
| | Colorectal | Up |
| | Esophagus | Up |
| | Gastric | Up |
| | Ovary | Up |
| | Pancreas | Up |
| | Prostate | Up |
| | Uterus | Up |
| Claudin 4 | Biliary tract | Up |
| | Bladder | Up |
| | | Down |
| | Cervical | Down |
| | Colorectal | Up |
| | | Down |
| | Epidermis | Up |
| | | Down |
| | Esophagus | Up |
| | Mesothelioma | Down |
| | Gastric | Up |
| | | Down |
| | Ovary | Up |
| Pancreas | Up | |
| Prostate | Up | |
| Uterus | Up | |
| Claudin 5 | Pancreas | Up |
| | Prostate | Down |
| Claudin 7 | Breast | Down |
| | Cervical | Down |
| | Colorectal | Up |
| | esophagus | Up |
| | | Down |
| | Gastric | Up |
| | Head and neck | Down |
| Ovary | Up | |
| Uterus | Down | |
| Claudin 10 | Liver | Up |
| Claudin 16 | Breast | Down |
| Claudin 18 | Pancreas | Up |
| Claudin 23 | Gastric | Down |
| | Gastric | Down |

Tabla 2.
Cambios en la expresión de algunos miembros de la familia de las claudinas en distintos carcinomas (Modificado de Tsukita S et al. 2008)

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

La expresión de las claudinas también varía de acuerdo al estado de carcinogénesis. Por ejemplo, en carcinomas bien diferenciados de páncreas se detectan altos niveles de cldn-4 mientras que en tumores no diferenciados y altamente invasivos cldn-4 es expresada débilmente. Por otro lado, la expresión de ciertas claudinas en los carcinomas tiene un valor predictivo en la evolución de la enfermedad; un ejemplo de ello es la cldn-10, ya que su expresión en carcinomas hepatocelulares predice la recurrencia de la enfermedad después de una hepatectomía curativa⁴⁹.

En cuanto al cáncer gástrico se sabe que el epitelio exhibe una serie de cambios en la expresión de diferentes claudinas durante la progresión hacia adenocarcinoma metastásico. Durante la metaplasia intestinal, uno de los pasos tentativos hacia la carcinogénesis gástrica, los patrones de expresión de claudinas difieren de los epitelios gástricos normales. Se ha visto una pérdida de la cldn-18 (de expresión normal) junto con un incremento en la expresión de cldn-1, -3, -4 y -7. Estos cambios se han correlacionado con la expresión de marcadores de proliferación como el Cdx2⁴⁹.

Así mismo, se ha visto que la expresión de cldn-1, -3, -4, -5 y -9 se redujo en cáncer gástrico de tipo difuso comparado con el cáncer gástrico de tipo intestinal; sin embargo, excepciones en el decremento de la expresión de claudinas en este tipo de cáncer gástrico son la cldn-6 y cldn-7. Johnson *et al* observaron que en el 70% de displasias y 30% de metaplasias de estómago se expresó la cldn-7, además encontraron que la mayoría (82%) de los adenocarcinomas intestinales expresaron esta proteína. Por otro lado, Rendón-Huerta *et al*⁵⁰ reportaron que la expresión de la cldn-6 es alta en ambos adenocarcinomas gástricos (difuso e intestinal). Diversos estudios han revelado que la expresión de cldn-7 es un evento temprano de tumorigénesis gástrica que es mantenido a través de la progresión del tumor⁵¹.

Las claudinas también influyen en las diferentes vías de la metástasis en ambos subtipos de carcinoma. El cáncer gástrico de tipo intestinal favorece la metástasis hematogéna, una ruta poco común en carcinomas de tipo difuso. Éste proceso es facilitado por las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP's) en particular de las MMP-2 Y MMP-9, las cuales, junto con la cldn-4, -6 y -9, aumentan su expresión en el cáncer de tipo intestinal, mostrando un aumento en la invasividad celular de dicho cáncer, sin embargo, aunque no existe evidencia de la activación de MMP's mediante la sobre-expresión de claudinas, se ha reportado que esa sobre-expresión aumenta a su vez la expresión de MMP's, lo cual contribuye a la adquisición de un fenotipo mayormente invasivo⁵⁰.

Las MMP's son endopeptidasas dependientes de zinc que se secretan inicialmente en un estado enzimáticamente inactivo, el cual se mantiene gracias a la formación de un enlace

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

entre un residuo de Cisteína (Cys 73) y un ión Zn^{2+} en el dominio catalítico. Para su activación requieren de la ruptura del enlace Zn^{2+} -Cys⁷³, mecanismo llamado “cysteine switch”. Estas enzimas llamadas también “gelatinasas” (debido al sustrato que digieren colágena desnaturalizada y gelatina) juegan un papel fundamental en la invasión tumoral, debido a su capacidad de degradar el colágeno tipo IV que forma parte de las membranas basales de los epitelios. Se sugiere que estas gelatinasas podrían desempeñar un papel decisivo en la capacidad de las células tumorales de origen epitelial para atravesar dichas membranas basales e invadir el estroma de los tejidos circundantes para que se lleve a cabo la metástasis^{52,53}. Por lo tanto es evidente que durante el desarrollo del cáncer la acción de degradación de las MMPs sobre la MEC (matriz extracelular) es un proceso importante capaz de alterar las uniones célula-MEC y célula-célula.

En distintos carcinomas se ha demostrado que las MMPs, además de ser activadas por la sobre-expresión de ciertas claudinas, también se activan mediante las proteínas de choque térmico (Hsp's), las cuales juegan numerosos papeles en la célula tanto en un estado normal como bajo algún tipo de estrés o alteración a nivel celular. En los procesos cancerosos, las Hsp's se encuentran asociadas a la progresión de la enfermedad llevando a cabo funciones vitales como: proliferación ilimitada, evasión de apoptosis, invasión de tejidos, migración celular y metástasis⁵³.

Por lo anteriormente expuesto, y que se sabe que en procesos cancerosos las MMPs pueden ser activadas por la sobre-expresión de ciertas claudinas y mediante Hsp's, es muy probable que de igual forma exista una relación directa o indirecta entre cldn's y Hsp's de modo que su interacción pueda favorecer la progresión tumoral mediante la activación de MMPs pero de una forma conjunta, siendo éste un tema de estudio amplio, innovador e interesante.

2.7 Proteínas de choque térmico (Hsp's)

Las proteínas del shock o choque térmico constituyen una familia que se encuentra en forma constitutiva en todas las células procariotas y eucariotas. Fueron descubiertas inicialmente como un grupo de proteínas estimuladas principalmente por choques de calor y otros procesos de estrés en una gran cantidad de especies. De hecho, se encuentran entre las proteínas mejor conservadas filogenéticamente, con respecto a su función y estructura, cumpliendo un papel similar en todos los organismos: bacterias, levaduras, plantas y células animales.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

Recientemente se sabe que las proteínas de choque térmico funcionan como proteínas chaperonas que modifican estructuras e interacciones de otras proteínas, además de cumplir roles como la estabilización de las proteínas intracelulares, asistencia en la translocación y secreción de proteínas, reparación o degradación de proteínas dañadas o anormales y el plegamiento proteico a partir de secuencias lineales de aminoácidos (Fig. 6)⁵⁴⁻⁵⁸. Por tales motivos y por su marcada participación en diferentes roles celulares, estas proteínas representan un determinante esencial en el control de la calidad de las proteínas en la célula, funcionando como una red de las diferentes familias de Hsp's en los diversos compartimentos celulares.

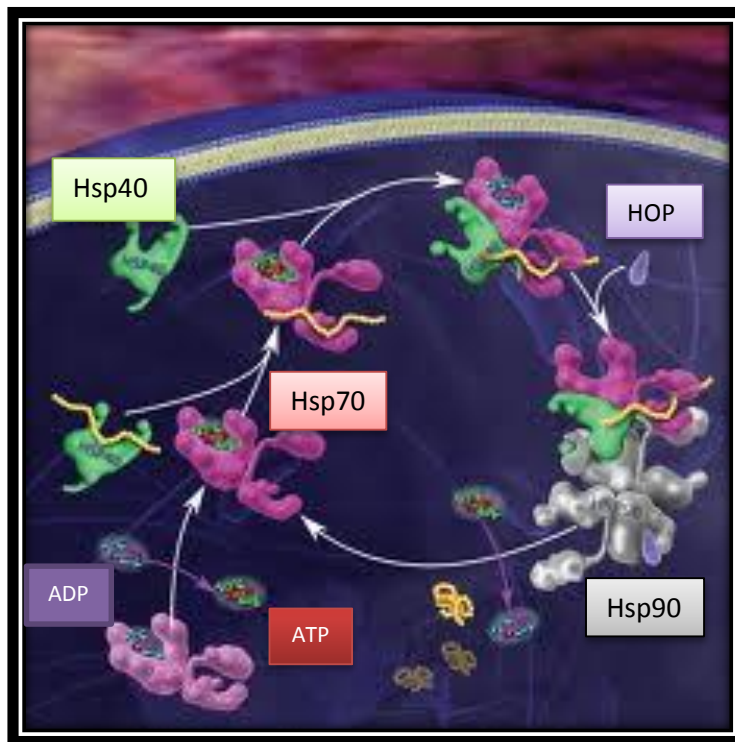


Fig. 6. Plegamiento proteico asistido por Hsp40, Hsp70 y Hsp90. Hsp40 funciona como proteína intermediaria que forma un complejo con Hsp70 para transferirle la proteína a plegar, además de estimular la actividad de ATPasa de Hsp70 para poder formar el complejo. Este complejo se une por Hsp70 al complejo Hsp90 y sus co-chaperonas utilizando a HOP (heat shock organizing protein) como proteína de andamiaje. Por último, con ayuda de ATP la proteína es plegada y los complejos disociados (Sims J. et al. 2011)

Estas proteínas, normalmente responsables de la adaptación celular a un amplio espectro de estrés, son también altamente expresadas durante la progresión maligna del cáncer, teniendo roles promotores importantes en las características clave del mismo, tales como: proliferación ilimitada, evasión de apoptosis, invasión de tejidos, migración celular y metástasis. Las Hsp's son continuamente expresadas en células normales y se sobre-expresan en las células malignas, incluyendo varios tipos de cáncer, siendo las más

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

conocidas en cuanto a la etiología de esta enfermedad (principalmente cáncer de mama) las Hsp 27, Hsp70 y Hsp90⁵⁸.

Las Hsp's se categorizan dentro de diferentes familias cuyos miembros se agrupan con base en sus pesos moleculares, los cuales varían entre 10.000 y 150.000, y se les puede encontrar en los compartimentos celulares principales. No obstante su amplia diversidad en cuanto a rango de masa molecular y localización intracelular, su actividad como chaperonas las unifica (Tabla 3)^{59,60}.

Cada familia de Hsp's está compuesta por miembros expresados constitutivamente o regulados por inducción y están dirigidos a diferentes compartimentos subcelulares. Mientras la Hsp90 es expresada constitutiva y abundantemente en las células normales, las Hsp27 y 70 son altamente inducidas por diferentes tipos de estrés como el calor, estrés oxidativo o medicamentos contra el cáncer. En condiciones normales Hsp27 y Hsp70 son expresadas a muy bajos niveles. Una vez inducidas, estas proteínas que influyen la agregación, transporte, plegamientos de proteínas, etc., también modulan la ejecución de la vía de señalización apoptótica. Las Hsp's pueden actuar en múltiples puntos de esta vía para asegurar que el daño ocasionado por el estrés no desencadene inapropiadamente la muerte celular. Además, se ha demostrado que la Hsp27 interactúa e inhibe los componentes que inducen la apoptosis vía estrés o receptor. (Fig. 7)^{61,62}.

| Familia | Nombre | Localización | Función |
|--------------|-------------------------------|---------------------|---|
| Pequeñas Hsp | p20 | citoplasma | vasorelajación |
| | Hsp22 o α B-crystallin | citoplasma y núcleo | estabilización del citoesqueleto |
| | Hsp 25 (ratón) | citoplasma/núcleo | chaperona, |
| | Hsp 27 (humana) | citoplasma/núcleo | dinámica de la actina |
| Hsp 40 | Hsp 40 | citoplasma | chaperona |
| | Hsp 47 | ret. endoplásmico | control en síntesis de colágeno |
| Hsp 60 | Hsp 58 | mitocondrias | chaperonas |
| | Hsp 60 | | |
| Hsp 70 | Hsc 70 (73) | citoplasma | chaperonas |
| | Hsp 70 (72) | citoplasma/núcleo | |
| | Hsp 75 | mitocondria | |
| | Grp 78* | ret. endoplásmico | |
| Hsp 90 | Hsp 90 α (86) | citoplasma | unión a receptores de hormonas esteroides |
| | Hsp 90 β (84) | citoplasma | |
| | Grp 94* | ret. endoplásmico | |
| Hsp 110 | Hsp 105 | citoplasma | chaperonas, |
| | Hsp 110 | nucléolo/citoplasma | citoprotectoras |

Los números entre paréntesis corresponden a otras denominaciones de las mismas proteínas.
*GRp: proteínas relacionadas con glucosa, inducidas por anoxia y privación de glucosa.

Tabla 3. Familias de Hsp's (Coronato et. al. 1999)

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

Intracelularmente, la contribución de las Hsp's en la tumorigénesis se atribuye a sus actividades pleiotrópicas como chaperonas moleculares que proveen a la célula cancerígena la oportunidad de alterar las actividades de las proteínas, en particular, componentes de la maquinaria del ciclo celular, cinasas y otras proteínas que influyen el crecimiento celular tumoral. De hecho, se ha demostrado que el papel tumorigénico de la Hsp70 y Hsp27 se encuentra asociado a sus propiedades antiapoptóticas⁶³.

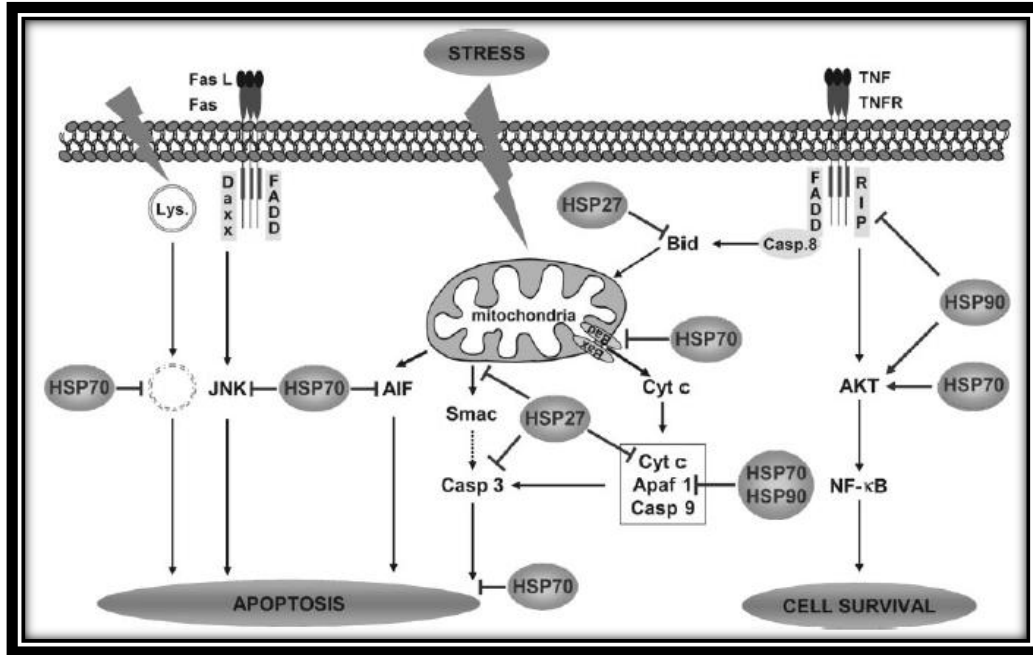


Fig. 7. Modulación de la vía apoptótica mediante las Hsp's. A nivel mitocondrial, Hsp27 y Hsp70 inhiben la liberación mitocondrial de proteínas pro-apoptóticas a través de la inhibición de Bid y Bax. A un nivel post-mitocondrial, la inhibición de la formación del apoptosoma y, por lo tanto, la activación de las caspasas y apoptosis se lleva a cabo a través de la inhibición del citocromo c por Hsp27 y de Apaf 1 por Hsp70 y Hsp90. Hsp70 puede también interactuar e inhibir la vía apoptótica de Daxx a través de su unión a JNK 1, resultando en la inhibición de ésta vía. Hsp90 puede interactuar con la cinasa RIP1 o con Akt, resultando en ambos casos en la activación de NF-κB mediada por la inhibición de la apoptosis. (Schmitt et. al. 2007)

Por lo anterior, se puede decir que las principales funciones de las Hsp's intracelularmente son:

- Hsp27 (proteína de supervivencia) que inhibe la apoptosis mediante la oligomerización y la fosforilación^{64,65}
- Hsp70 (proteína con alta capacidad antiapoptótica), regulador negativo decisivo de la vía apoptótica mitocondrial, la cual puede inhibir la apoptosis a diferentes niveles: premitocondrial, mitocondrial y postmitocondrial⁶⁶.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

- Hsp90 (proteína con funciones citoprotectoras) la cual responde a diferentes asociaciones moleculares según sea el estímulo de muerte celular al que se haya sometido la célula⁶⁷.

Las Hsp's pueden también localizarse extracelularmente y mediar funciones inmunológicas con las cuales pueden provocar una respuesta inmune modulada, ya sea mediante el sistema inmune adaptativo o por medio del sistema inmune innato. De hecho, la proteína Hsp70 se encuentra expresada externamente unida a la membrana plasmática⁶⁸.

Las principales funciones inmunológicas de estas proteínas son:

- Acarreadoras de péptidos (presentación de péptidos al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH))

Principalmente las proteínas de un peso molecular de 70 y 90 kDa han sido identificadas como reguladores clave del sistema inmune del hospedero. Se ha visto que las Hsp's son importantes en el proceso de presentación de los péptidos antigénicos al CMH-I (tipo I) para iniciar la respuesta antigénica específica de las células T o linfocitos T citotóxicos CD8+, para la cual es utilizada la respuesta inmune adaptativa. De hecho, los complejos Hsp-péptidos absorbidos por las APC (Células Presentadoras de Antígenos) se ha visto que son específicos, saturables, y dependientes de concentración, por lo cual se han hecho hipótesis acerca de la existencia de receptores específicos de Hsp's⁶⁹⁻⁷¹ (Fig. 8).

En cuanto a la inmunidad innata, el grupo heterodimérico TLR2/TLR4 en combinación con el receptor de lipopolisacáridos (LPS) CD14 han sido identificados como receptores relevantes mediando la absorción de Hsp70 (inducible), Hsc 70 (proteína de choque térmico de la familia de las Hsp70 constitutivamente expresada) y Gp96 (Hsp90 β 1, parálogo de la Hsp90 que se encuentra en el retículo endoplásmico).

- Inductoras de la secreción de citocinas

Aún en la ausencia de péptidos inmunogénicos, los miembros del grupo de Hsp70 y Hsp90 proveen señales de peligro para el sistema inmune del hospedero. Las células tumorales han sido identificadas como una fuente natural para la localización extracelular de la Hsp70¹⁹. La interacción de Hsp70 libre de péptidos con CD14 y TLR2/4 en las APCs inicia la liberación de citocinas proinflamatorias, incluyendo TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-6 and GM-CSF. Este proceso se desencadena por la translocación de NF- κ B en el núcleo, además de que estas citocinas resultan en una estimulación no específica del sistema inmune innato^{72,73}(Fig. 9).

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

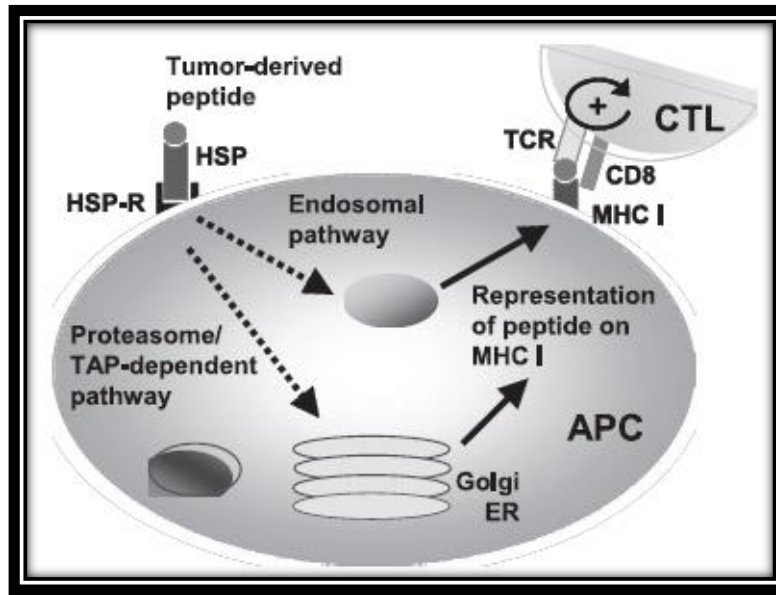


Fig.8 Función acarreadora de péptidos de las Hsp's. Las Hsp's como chaperonas de péptidos derivados de células tumorales son internalizados vía endocitosis mediante los receptores de Hsp. Después de la absorción y procesamiento de los péptidos, estos son presentados en el CMH-I del APC, lo cual induce la respuesta de las células T CD8+ en contra del cáncer. (Schmitt *et. al*, 2007)

Hsp70 también compite con el ligando CD40 para unirse a las APCs. De hecho, se ha determinado la implicación de Hsp70 en la estimulación de la migración de células dendríticas (DCs) para el drenaje hacia los nódulos linfáticos y en la maduración *per se* de las DCs. En células dendríticas, después del contacto con Hsp70, el CMH-tipo II y moléculas coestimuladoras (incluyendo CD86, CD83 y CD40) están altamente regulados⁷⁴. Sin embargo, el papel de las Hsp's como proteínas semejantes a las citocinas se ha reportado que puede ser, al menos en parte, una consecuencia de contaminación de las preparaciones de Hsp's con LPS o lipoproteína bacteriana⁷⁵.

- Inmunoestimulación de células NK

Las células NK son células efectoras importantes del sistema inmune innato. Sus funciones efectoras están reguladas por un gran número de células inhibitorias de muerte o asesinas y por receptores activados; estos receptores pertenecen ya sea al receptor parecido a las inmunoglobulinas de células asesinas (KIR), al transcritor parecido a inmunoglobulina (ILT), al receptor de lectina tipo-C o al receptor de citotoxicidad natural (NCR). Dependiendo de la localización intracelular de del inmunoreceptor inhibitorio basado en tirosina o en motivos activadores, estos receptores median la activación de células NK o la tolerancia hacia antígenos propios^{76,77}.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

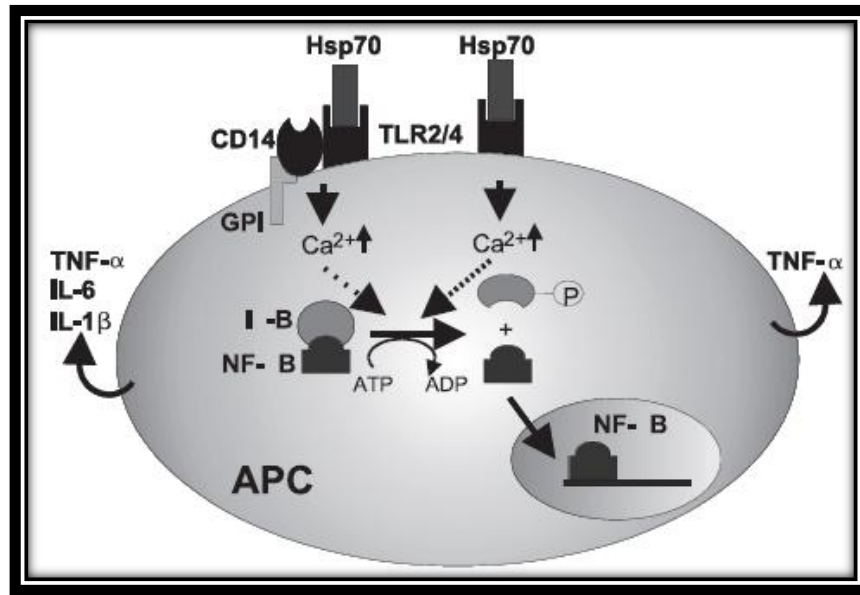


Fig. 9 Efectos de inducción de citocinas por Hsp70. En ausencia antigénica, las Hsp's se unen a receptores de señalización (como TLR2/4 más CD14) que desencadenan la activación de NF-κB. Las APCs secretan citocinas proinflamatorias (IL-1β, IL-6, TNF-α) las cuales conducen a una estimulación no-específica del sistema inmune innato. GPI=glicosilfosfatidilinositol. (Schmitt *et. al*, 2007)

En estudios realizados con células NK y Hsp's se observó que la Hsp70 desencadenó una alta expresión membranal de CD94, una glicoproteína de membrana que forma heterodímeros con miembros de la familia de receptores NKG2. La cantidad de Hsp70 unida a la membrana en las células tumorales se correlaciona positivamente con la intensidad de lisis mediada por las células NK, por lo que se ha visto que un estrés químico como la adición de fármacos citostáticos aumenta la expresión en la superficie celular de Hsp70 en células tumorales y, por lo tanto, representan las mejores dianas para las células NK (Rabinovich *et. al.* (2000); Feng *et. al.* (2001)). La incubación de células NK purificadas con proteína Hsp70 recombinante o con péptido TKD aumenta su actividad citolítica contra las células tumorales que portan en la membrana a Hsp70 y mejora la activación de receptores celulares NK, incluyendo al CD94^{78,79}.

Se ha determinado que Hsp70 y Hsp90 tienen la capacidad de estimular el sistema inmune innato cuando están presentes en la superficie de la célula. Estudios realizados en biopsias de tumores humanos revelaron la presencia de Hsp70 en la membrana plasmática de células de colon, pulmón, páncreas, mama y las metástasis derivadas de los mismos⁸⁰⁻⁸².

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

2.7.1 Participación de las Hsp's en cáncer.

Se ha reportado que las Hsp's se encuentran sobre-expresadas en una gran variedad de tumores humanos, mientras que su expresión ha sido asociada con la diferenciación de células tumorales, así como con su resistencia a la apoptosis y un mal pronóstico de cáncer. Más aún, existe evidencia relativamente reciente de que ciertas Hsp's (Hsp27, 60 y 90) son sobre-expresadas en cáncer gástrico contribuyendo al desarrollo y mal pronóstico de este tipo de cáncer⁸³.

La participación de las Hsp's conlleva funciones que algunas de ellas pueden compartir y otras en las que difieren, siendo las siguientes las principales:

Hsp27

Esta proteína se encuentra sobre-expresada en una gran variedad de cánceres y se ha sugerido que su papel más importante en el desarrollo de los tumores es el bloqueo de la apoptosis mediante proteínas “cliente” que están involucradas en la vía de la apoptosis entre las que se incluyen: Akt, p53 y NF-κB. Adicionalmente, Hsp27 puede suprimir el programa de senescencia, ya que se ha visto que la eliminación de Hsp27 en células transformadas causa la activación de la vía de p53, inducción de p21 y la expresión de los signos típicos de senescencia celular⁸⁴⁻⁸⁵.

Hsp27 juega un papel importante en la migración celular y metástasis a través de su interacción con el citoesqueleto de actina y la potenciación de la expresión de MMP-2 y MMP-9 que son esenciales para la metástasis funcionando como degradadoras de la MEC⁸⁶. Además se encuentra involucrada también en el control de la proliferación celular y en la resistencia a terapias anti-cáncer.

Hsp40

En cáncer, la regulación a la baja de las isoformas I y II entre las que se incluyen DNAJA3, DNAJB4 y DNAJB6 de Hsp40 están correlacionadas con un fenotipo altamente agresivo e invasivo (Mitra A, et al. 2012) y la sobre-expresión de DNAJB8 aumenta la tumorigénesis en células de cáncer colorectal (Morita R. et al, 2014). Debido al limitado conocimiento en esta proteína se han realizado principalmente dos enfoques orientados que se encuentran en etapas tempranas de desarrollo. El primero es un enfoque inmunológico con una

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

vacuna de la isoforma DNAJB8 y la otra es una molécula pequeña que blanquea a Hsp40 (Cassel J et al. 2012- Nishizawa S. et al. 2012).

Hsp70

Los estudios realizados con esta proteína y su participación en el cáncer señalan que juega un papel causal de iniciación de la enfermedad. Específicamente la sobre-expresión de Hsp70-1 se ha encontrado que confiere tumorigenicidad en las células de fibrosarcoma en ratón así como también la capacidad de resistencia de estas células a la muerte por células T citotóxicas y macrófagos *in vitro*⁸⁷.

Más recientemente, se encontró que Hsp70-1 es requerida para la transformación mediada por el receptor de Her2/neu (Human epidermal growth factor receptor 2) y la sobre-expresión de Hsp70-2 se encontró en líneas celulares de cáncer de mama. Estos resultados indican que Hsp70 puede tener una función de oncogen⁸⁸.

Hsp70 también tiene un papel importante en la presentación antigénica de p53 para la respuesta humoral en pacientes con cáncer de mama. Controla el crecimiento y la propagación del tumor mediante la formación de un complejo junto con p53 a lo que le sigue una respuesta inmune en los pacientes con esta enfermedad. Junto con Hsp90, Hsp70 median la activación de MMP-2 con lo que dan lugar a la migración celular e invasión fuera de las células de cáncer de mama^{89,90}.

Hsp70 sobre-expresada protege a las células de estímulos como la apoptosis y necrosis, por lo que le confiere a las células tumorales una ventaja de supervivencia⁹¹. También se encuentra involucrada en un incremento en la proliferación celular (cáncer de mama, cuello uterino y pulmón), metástasis de los nódulos linfáticos (cáncer de mama y colon), incremento del tamaño del tumor (cuello uterino) y presencia de p53 mutado (cáncer de mama y endometrio)⁹².

Hsp90

El cáncer es una enfermedad de inestabilidad genética y tal inestabilidad permite que una célula eventualmente adquiera seis capacidades que caracterizan a las enfermedades malignas (Hanahan & Weinberg), tales son: angiogénesis sostenida, invasión, insensibilidad a la señalización anti-crecimiento, potencial replicativo ilimitado, autosuficiencia en señalización de crecimiento y la capacidad de evadir la apoptosis,

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

siendo Hsp90 una proteína que desempeña un papel fundamental en la adquisición y mantenimiento de cada una de estas capacidades⁹³.

Aunque Hsp90 es una chaperona intracelular, recientemente se ha encontrado expresada en la superficie celular de las células malignas altamente metastásicas como las células de melanoma y fibrosarcoma. En células de melanoma la expresión de Hsp90 de superficie celular se correlaciona positivamente con el potencial metastásico y la migración celular es experimentalmente inhibida por anticuerpos contra Hsp90. Esto sugiere que la Hsp90 de superficie celular está involucrada en la invasión y metástasis y es un blanco potencial para el desarrollo de nuevos inhibidores de invasión y metástasis^{94,95}. En cuanto a su función de superficie celular en la invasión de células, Eustace et al. demostraron la participación de la Hsp90 en el proceso de activación de la MMP-2, la cual permite la diseminación tumoral⁹⁵.

Hsp90 y sus co-factores modulan la apoptosis de las células tumorales. Este proceso lo lleva a cabo mediante su interacción con AKT, receptor de TNF y NFκB. Esta proteína está involucrada en interacciones dinámicas de baja afinidad con los factores de transcripción y cinasas manteniéndolos en un estado latente pero que se activa fácilmente. Mutaciones oncogénicas en dichas proteínas provocan que estén en una conformación inestable y exigen una mayor demanda de la chaperona^{96,97}.

2.8 Enfoques terapéuticos anticáncer basados en Hsp's extracelulares e intracelulares

Extracelularmente

La mayoría de los enfoques inmunoterapéuticos contra el cáncer basados en Hsp's explotan su función acarreadora de péptidos inmunogénicos^{98,99}. Estudios utilizando como vacuna a los complejos formados por Hsp70-Gp96 purificados de pacientes con tumores como medios para tratar y prevenir el cáncer indican, que la inmunogenicidad de estos complejos es específica del tumor.

Además de su actividad de chaperonas, los complejos péptido-Hsp son internalizados en las células presentadoras de antígenos mediante endocitosis mediada por receptores. Dentro de los compartimentos celulares los péptidos “chaperoneados” son liberados, procesados y presentados con las moléculas del CMH clase I. Al mismo tiempo, la entrada de estos péptidos inicia la maduración de las células presentadoras de antígenos, lo cual es de vital importancia por el hecho de que estas células son esenciales para inducir una

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

reacción inmune frente a antígenos tumorales y, ya que se encuentran defectuosas en los pacientes con cáncer, promover su maduración mediante péptidos podría ser un método prometedor para vencer la inmunosupresión inducida por el tumor.

Debido a que la Hsp70 es frecuentemente presentada en la membrana plasmática de las células tumorales y no en tejidos normales, ésta ha sido utilizada como blanco de tumores. En ensayos realizados por E. Schmitt y col. se exploró el efecto del péptido TDK derivado de Hsp70 en la estimulación de células NK en reposo contra tumores positivos a Hsp70 en la membrana. En un modelo de ratón con un xenoinjerto de tumor, la incubación de linfocitos de sangre periférica con el péptido TDK más una dosis baja de Interleucina 2 (IL-2) promovieron la capacidad citolítica y migratoria de las células NK hacia las células tumorales *in vitro* positivas a Hsp70 en la membrana¹⁰⁰. Gracias a estos resultados, se inició un ensayo clínico de fase I en pacientes con terapia refractaria (aquéllos cuya respuesta al cáncer se ha interrumpido al primer o segundo tratamiento), metástasis colorectal y carcinoma de pulmón para estudiar la tolerancia y viabilidad de las células NK activadas por TDK. Después de una estimulación *in vivo* del producto de una leucaféresis (separación de leucocitos a partir de una muestra de sangre) con IL-2/TDK, el péptido fue removido y las células autólogas activadas se introdujeron nuevamente a la circulación vía intravenosa. El procedimiento se repitió por seis ciclos mostrándose que la reinfusión de células NK activadas por TDK resultó una técnica tolerable, factible y segura. De hecho, diez de los doce pacientes mostraron respuestas inmunológicas significativas incluyendo una alta en la regulación de la actividad citolítica en contra de los tumores positivos a Hsp70 en membrana y un incremento en la densidad de receptores activadores de células NK en la superficie de la célula, incluyendo al receptor de lectina tipo-C, el cual sirve como marcador sustituto para la reactividad de Hsp70. Además, dos de cinco pacientes tratados con más de cuatro ciclos mostraron respuestas clínicas, lo cual no se esperaba ya que todos los pacientes presentaban enfermedad tumoral progresiva durante su última quimioterapia estándar¹⁰¹. Finalmente, la ventaja de este enfoque es el gran perfil de seguridad y la disponibilidad ilimitada del péptido Hsp70 y TDK sintético, el cual estimula a las células NK.

En conclusión, los pacientes fueron inyectados con preparaciones de Hsp's con el fin de inducir una respuesta inmune antitumoral específica capaz de rechazar al tumor, por lo tanto las Hsp's (principalmente Hsp70 y Gp96 (Hsp90β1)) tienen un rol positivo en la terapia contra el cáncer.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

Intracelularmente

La alta expresión constitutiva de Hsp's es una propiedad esencial para la supervivencia de la mayoría de las células tumorales, por lo tanto, la neutralización de estas proteínas ha sido una estrategia atractiva como terapia anticáncer. Hasta ahora, sólo los inhibidores de Hsp90 han estado disponibles para probarlos clínicamente, tal es el caso de la geldanamicina y su análogo 17-AAG, drogas que se han sometido a ensayos clínicos de fase I y II para la actividad anti-cáncer. El uso de Hsp90 como “blanco” farmacológico con inhibidores químicos específicos permite la degradación de proteínas cliente y la inhibición del crecimiento del tumor a través del arresto de la fase G1 y la activación de la apoptosis^{102,103}. El hecho de que la geldanamicina y la 17-AAG promuevan la muerte selectiva de células cancerosas, sugiere que estas células pueden exhibir un fenotipo estresado con una alta dependencia de la acción citoprotectora de la Hsp90. En los tumores, la Hsp90 está presente enteramente en complejos de multichaperonas con una alta actividad de ATPasa, mientras que en tejidos normales está presente en un estado sin complejos¹⁰⁴. Las drogas inhibitorias de Hsp90 usan como “blanco” indirecto a diversas proteínas requeridas para el crecimiento de las células malignas, lo cual ha demostrado ser muy prometedor en los ensayos terapéuticos^{105,106}. Sin embargo, esta clase nueva de fármacos induce en alta proporción a Hsp70, proteína protectora que reduce fuertemente el efecto de muerte celular provocado por los inhibidores de Hsp90.

La combinación de inhibidores de Hsp70 y Hsp90 podría ser muy útil en la terapia contra el cáncer, de hecho, se han realizado estudios de los cuales se ha reportado que las construcciones antisentido de Hsp70 tienen propiedades quimiosensitivas que incluso pueden matar líneas celulares en ausencia de estímulos adicionales^{107,108}. Estudios en células de leucemia humana (Bcr-Abl) muestran que la Hsp70 es un blanco terapéutico prometedor para revertir la resistencia a drogas por las células cancerosas, probablemente por su capacidad de inhibir la apoptosis río arriba y río abajo de la mitocondria. Sin embargo, a la fecha no existen moléculas que puedan inhibir selectivamente a la Hsp70 citosólica.

Se ha demostrado recientemente que la creación de blancos de Hsp70 derivados del factor de inducción de apoptosis (AIF por sus siglas en inglés) pueden sensibilizar a las células cancerígenas para la inducción de apoptosis neutralizando la función de Hsp70. Todos esos péptidos derivados de AIF contienen la región 150-228 de aminoácidos, la cual se sabe que es necesaria para la unión de la Hsp70. Experimentos realizados utilizando diferentes líneas celulares de cáncer (leucemia, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer cervical) demuestran que algunos de estos inhibidores de Hsp70 derivados de AIF

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

incrementan fuertemente la sensibilidad de las células a la quimioterapia *in vitro*. Este resultado está meramente relacionado con la capacidad de neutralizar a la Hsp70 endógena ya que ésta actividad pro-apoptótica se perdió en las células negativas a Hsp70¹⁰⁹⁻¹¹⁰.

En cuanto a Hsp27, se ha demostrado que, en cáncer de próstata, la utilización de oligonucleótidos antisentido de Hsp27-fosforotioato (variante del ADN en la que uno de los O₂ se encuentra reemplazado por un S) mejora la apoptosis y el retraso de la progresión del tumor. Esta terapia toma como células diana a aquellas con una alta expresión de Hsp27 por ser independientes de la concentración de andrógenos, ya que en terapias contra este tipo de cáncer en las cuales se incluía la eliminación de andrógenos, se inducía una apoptosis no completa, por lo que se establecía progresión de células tumorales supervivientes independientes de andrógenos. Ya que esta progresión es el obstáculo principal para mejorar la supervivencia y la calidad de vida, se han realizado estudios focalizados en terapias no hormonales en los que se establecen como dianas estas células independientes de andrógenos, es decir, células con alta expresión de Hsp27¹¹¹.

Las estrategias antisentido también han demostrado que el mieloma múltiple y distintos tipos de linfomas pueden ser sensibilizados a los fármacos terapéuticos como la dexametasona y el inhibidor de proteosoma “Velcade”. En líneas celulares resistentes a dexametasona, la Hsp27 se sobreexpresa. Su baja regulación por siRNA sensibiliza a la célula a la dexametasona promoviendo la apoptosis mediante la activación de caspasas¹¹¹.

3. JUSTIFICACIÓN

Todos los estudios anteriormente citados muestran la gran importancia e interés de desarrollar nuevas y novedosas drogas terapéuticas dirigidas a las Hsp's para aumentar la supervivencia y calidad de vida de los pacientes con cáncer y, preferentemente, eliminar del todo este padecimiento. Para lograr estos objetivos es de vital importancia conocer detalladamente a cada una de estas proteínas (principalmente las que se sabe están más relacionadas con esta enfermedad), su función, sus implicaciones en los procesos cancerosos y su relación con proteínas que contribuyen a la invasividad de tejidos, mediante la inhibición de la apoptosis y la supervivencia y propagación de las células cancerosas. De hecho, gracias a numerosos estudios realizados en pacientes con

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

diferentes tipos de cáncer, se sabe que las proteínas de choque térmico que están mayormente implicadas en el desarrollo y progresión de esta enfermedad son: Hsp90, Hsp70, Hsp40 y Hsp27 por lo tanto, el presente trabajo está enfocado a determinar los niveles de expresión de estas proteínas en células de cáncer gástrico que sobreexpresan a claudinas-6, -7 o -9 promoviendo la activación de MMPs, la migración e invasividad celular, ya que se ha demostrado una relación directa entre Hsp's y activación de MMP's por un lado y Cldn's-MMP's por el otro sin embargo, no se tienen estudios en los que se demuestre una co-relación entre Hsp's y sobre-expresión de claudinas que pueda estar participando en dichos procesos celulares en los que se propaguen las células malignas hacia otros tejidos, por lo que esta investigación podría ser considerada novedosa en ese aspecto.

4. HIPÓTESIS

- Dado que la sobre-expresión de las claudinas-6, -7 o -9 correlaciona con un aumento en los niveles de proliferación, migración e invasividad de células de adenocarcinoma gástrico humano, entonces se espera que los niveles de expresión de las Hsp-90, -70, -40 o -27 sea mayor comparada con la que se observaría en células control.
- Asimismo, si la sobreexpresión de dichas claudinas promueve la activación de las MMP-2 o MMP-9 y se ha reportado que éstas pueden ser activadas por las Hsp's, entonces se espera detectar co-localización de las Hsp's con las MMPs o de las claudinas con las Hsp's.

5. OBJETIVOS

General:

- Analizar la expresión de las proteínas de choque térmico o Hsp's (Hsp 27, Hsp 40, Hsp 70 y Hsp90) en células de origen gástrico AGS control y en células AGS que sobre-expresen claudina-6, -7 o -9 por transfección.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

Particulares:

- Medir la expresión de Hsp27, Hsp40, Hsp70 y Hsp90 en células AGS control y en células AGS que sobre-expresen claudinas -6, -7 o -9.
- Medir la secreción de Hsp27, Hsp40, Hsp70 y Hsp90 en sobrenadantes de células AGS control y en células AGS que sobre-expresen claudinas -6, -7 o -9
- Evaluar la posible interacción entre Hsp's, MMP's y claudinas en células AGS control y en células AGS que sobre-expresen claudinas -6, -7 o -9 mediante ensayos de co-inmunoprecipitación.

6. METODOLOGÍA

6.1 Línea celular

Para la realización de este proyecto se utilizó una línea celular epitelial AGS derivada de adenocarcinoma gástrico humano, la cual fue cultivada y propagada en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM de GIBCO) suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS), 2 mM de L-glutamina (GIBCO), 1mg/mL de insulina de (SIGMA), 2 mM de piruvato de sodio (GIBCO) y 10,000 U/mL/10,000 µg/mL de penicilina/estreptomicina (GIBCO). También se utilizaron células AGS que fueron previamente transfectadas con el vector pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO para sobreexpresar a claudinas-6, -7 o -9 de forma estable. Al medio de estas células se le acondicionó 60 µl de geneticina para mantener la expresión constitutiva de las claudinas. El proceso de cultivo y propagación se realizó a 37 ° C, 5% de CO₂ y 95% de O₂.

6.2 Cultivo y manejo de líneas celulares

- *Descongelamiento de células*

Las células AGS mantenidas en crioviales a -70°C se descongelaron paulatinamente colocándolas en hielo. Una vez descongeladas, se colocaron en tubos cónicos de 15mL adicionando 3 mL de medio (D-MEM) suplementado. Esta mezcla se centrifugó a 150 rpm durante 5 minutos para obtener el botón celular que sería utilizado para fines de cultivo y propagación. Por último, se eliminó el sobrenadante de los tubos cónicos (dejando sólo el botón celular) y se le agregó 1mL de medio suplementado para poder resuspender el botón celular. Una vez obtenida la suspensión celular, ésta se agregó en una caja de Petri

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

(p-100) junto con 7mL de D-MEM y se guardaron en la incubadora con la temperatura, CO₂ y O₂ correspondientes.

- *Propagación de células*

Para poder llevar a cabo la propagación de las líneas celulares, se permitió que las células llegaran a un mínimo de 90% de confluencia. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se realizaron tres lavados con 5 mL de PBS 1X estéril. Una vez retirado el PBS, se prosiguió a aplicar 400µl de tripsina (enzima que elimina las uniones célula-célula o célula-matriz extracelular) incubando por aproximadamente 3-5min para promover el desprendimiento de las células contenidas en la caja. Después del desprendimiento celular, se inactivó la Tripsina agregando 2mL de medio de cultivo, se resuspendió y se pasó a tubos cónicos para centrifugar a 150 rpm durante 5 min. Por último, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular adicionándole 2 mL de medio de cultivo, agregando esta suspensión celular a cajas Petri con 7mL de medio suplementado D-MEM. En el caso de las células tranfectadas con claudinas -6, -7 y -9 se les agregaron 60 µl de geneticina.

- *Congelamiento celular (para preservación de células)*

Este proceso se llevó a cabo a partir de cajas confluentes, las cuales se lavaron con PBS 1X estéril, se tripsinizaron, centrifugaron y contaron las células con ayuda de la cámara de Neubauer para obtener cantidades exactas de células a congelar. El botón de células obtenidas por centrifugación, se resuspendió con nuevo medio al cual se le adicionó glicerol al 10%, homogenizándolos perfectamente. Posteriormente, se colocaron 1X10⁶ células por criovial y se congelaron a -70°C.

- *Medio condicionado*

Este proceso se llevó a cabo con células confluentes al 90-100% a las cuales se les retiró el medio de cultivo con el que se encontraban creciendo (D-MEM suplementado), se les realizaron 3 lavados con PBS 1X estéril y posteriormente se les aplicó medio de cultivo D-MEM libre de Suero Fetal Bovino (SFB) para someterlas a un “estrés” durante 24 hrs y con ello, promover la secreción de moléculas al medio. Se recuperó este medio condicionado después de haber dejado en incubación las células por 24 hrs., se depositó en tubos cónicos y se almacenó a -70°C.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

6.3 Obtención de proteínas

- *Lisados totales (extracción total de proteína)*

Se descongelaron células contenidas en cajas Petri, se les agregó 1mL de amortiguador de lisis 1 con inhibidores de fosfatasa y proteasas (ver anexo) a cada caja y se rasparon de la caja para desprenderlas. La suspensión celular obtenida del raspado fue depositada en tubos de polipropileno de 1.5ml mantenidos en hielo. Posteriormente, se prosiguió a sonicar cada lisado para romper las membranas durante 1 minuto a 25 % de amplitud en un sonicador *SONICS Vibra Cell*.

Por último, los lisados se centrifugaron los lisados a 39,000rpm durante 30 minutos a 4 °C utilizando un rotor 70 Ti, se recuperaron los sobrenadantes en tubos tipo eppendorf, se les agregó solución de Laemmli 4X y se guardaron a -20° C.

- *Determinación de proteína*

La concentración de proteínas se determinó por medio del método de Bradford (Bio-Rad), el cual se basa en el cambio de color del colorante de Coomassie (Brilliant blue G-250) después de ser añadido a una solución de proteínas. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos, y una vez que se han unido, la unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción (absorbancia) del colorante desde 465 a 595 nm.

Para poder realizar la cuantificación de proteínas se realizó una curva patrón de albúmina, utilizando un stock de albúmina de 1mg/mL, llevando a cabo las siguientes diluciones:

| Volumen de Albumina a 1 mg/ml (µL) | Volumen de ddH ₂ O (µL) | Concentración final (µg/mL) |
|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 1000 | 0 |
| 10 | 990 | 10 |
| 20 | 980 | 20 |
| 30 | 970 | 30 |
| 40 | 960 | 40 |
| 50 | 950 | 50 |
| 60 | 940 | 60 |
| 70 | 930 | 70 |
| 80 | 920 | 80 |
| 90 | 910 | 90 |
| 100 | 900 | 100 |

Las muestras problema se tomaron de los lisados totales antes realizados y se diluyeron 1:50 con ddH₂O. En una placa de 96 pozos e colocaron por triplicado 80µl de las muestras problema y de las diluciones de la curva patrón. Posteriormente se agregó 20µl de

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

reactivo de BIO-RAD. Se mezclaron las diluciones por aproximadamente 15 min y se leyeron las absorbancias a 595nm en el equipo Vicor 1420 Multilabel Counter de Wallac a 595nm en el equipo *Vicor 1420 Multilabel Counter de Wallac*. Por último, una vez obtenidas las absorbancias y con base en éstas, se calcularon las concentraciones específicas totales de proteínas y las cantidades a cargar en μ l de muestra en los geles de poliacrilamida.

6.4 Ensayos de Western Blot

Es una técnica analítica utilizada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada, por lo que fue utilizado para la detección de proteínas derivadas de los lisados totales.

Para comenzar esta técnica se realizaron geles de poliacrilamida del 10% y 12.5% de acuerdo a los diferentes pesos moleculares de las proteínas de estudio. Se agregó β -mercaptoetanol a una concentración final del 5% y se dejaron en ebullición durante 5 min. Se prosiguió a cargar 35 μ g de proteína (obtenida de los lisados totales) en cada carril y se llevó a cabo la electroforesis aplicando una corriente de 50 mA por gel durante aproximadamente 30min-1h a temperatura ambiente. Posteriormente se llevó a cabo la electrotransferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa. Ésta se realizó a 120 mA y 250 V durante 1h. Para verificar la eficiencia de este proceso, se tiñeron las membranas con rojo de Ponceau. Se bloqueó posteriormente con 5% de leche descremada (BIO-RAD) en *Tris-Buffered saline* (TBS) durante 1h en agitación suave para bloquear los sitios inespecíficos y evitar que los anticuerpos se unieran a ellos. A continuación, se retiró la leche bloqueadora, se hizo un lavado con TBS1x para eliminar los excesos de la misma y se aplicaron los anticuerpos primarios correspondientes (Hsp27, Hsp40, Hsp70 y Hsp90 $\alpha\beta$) dejándolos en agitación suave durante toda la noche a 4°C. Al siguiente día se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con TTBS 1x (*Tween 20-Tris Buffer saline*) y se prosiguió a añadir a las membranas los anticuerpos secundarios correspondientes: goat anti-mouse y rabbit anti goat (tabla 2) manteniéndolos en agitación durante una hora y media a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 10 min con TTBS 1X y un lavado de 10 min con TBS 1X quedando en las condiciones óptimas para la detección de las proteínas por medio del revelado. La unión de los anticuerpos fue detectada por quimioluminiscencia con el *kit Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate de Thermo Scientific /Pierce Protein Research Products*. Para ello se eliminó el exceso de TBS 1X de las membranas y se colocaron durante 5

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

minutos en la mezcla de los reactivos. Las membranas se expusieron a placas radiográficas KODAK.

| Anticuerpo primario | Anticuerpo secundario |
|-----------------------------|-----------------------|
| Goat polyclonal anti Hsp27 | Rabbit anti goat |
| Mouse monoclonal anti Hsp40 | Goat anti mouse |
| Mouse monoclonal anti Hsp70 | Goat anti mouse |
| Mouse monoclonal anti Hsp90 | Goat anti mouse |

Tabla 4. Anticuerpos específicos para las proteínas de choque térmico

6.5 Co-Inmunoprecipitación

Para conocer la posible interacción entre proteínas de choque térmico con metaloproteasas y claudinas se realizó la técnica de co-inmunoprecipitación. Para ello, se utilizaron anticuerpos específicos dirigidos contra las claudinas o las MMPs de interés para así revelar, a través de un ensayo de western blot, la señal obtenida para las Hsp's de interés.

Se requirieron células cultivadas hasta al 90-100% de confluencia las cuales, para iniciar la técnica, se lavaron con PBS frío dos veces. Se preparó el Amortiguador 1 (NaCl 150mM) con los inhibidores necesarios (ver anexo) y se agregó 1mL del mismo a cada caja incubando durante 30 min a 4°C. Posteriormente, se realizó el raspado de las células de cada caja y se colectaron los lisados en tubos tipo eppendorf, se resuspendieron y centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min a 4°C para posteriormente recuperar los sobrenadantes en tubos nuevos. Se realizó la cuantificación de proteína de los lisados totales y posteriormente se preclareó, es decir, se incubó 1mg/mL de proteína obtenida de los lisados con 10µl de suero pre-inmune y 10 µl de proteína G sefarosa durante al menos 1 h a 4°C con agitación suave. Posterior a la incubación, se centrifugó a 9000 rpm por 3 min. , se recuperó sobrenadante y se colocó en tubos nuevos. Se agregó la cantidad apropiada de anticuerpo primario para cada Claudina y metaloproteasa (proteínas a inmunoprecipitar) y se incubó durante toda la noche a 4°C en agitación suave. Posteriormente se agregaron 25µl de proteína G sefarosa a cada muestra y se incubó durante 2 h máximo a 4°C. Se centrifugó el inmunoprecipitado a 9000 rpm durante 2 min a 4°C, se recuperaron las perlas y se realizaron dos lavados con Amortiguador 2 (NaCl 600mM (ver anexo)) y un lavado con Amortiguador 1, ambos sólo con inhibidores de fosfatasas y proteasas. Finalmente se agregaron 25 µl de la solución de Laemmli 4X y se

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

realizó western blot revelando contra las Hsp's con las que podrían interaccionar las claudinas y las MMP's

| Proteína | Suero preinmune |
|----------|-----------------|
| Cldn 6 | Anti goat |
| Cldn 7 | Anti rabbit |
| Cldn9 | Anti goat |
| MMP-2 | Anti mouse |
| MMP-9 | Anti mouse |

Tabla 5. Sueros pre-inmunes utilizados para cada proteína inmunoprecipitada.

7. RESULTADOS

7.1 Sobre-expresión de las diferentes claudinas en células AGS

En primera instancia se realizaron ensayos de western blot para confirmar que las claudinas de estudio se encuentran sobre-expresadas en las células AGS. En la figura 10 se muestran los niveles de proteína de las claudinas -6, -7 y -9 utilizando anticuerpos específicos para dichas claudinas y en la figura 11 utilizando un anticuerpo contra la GFP acoplada a cada una de las claudinas.

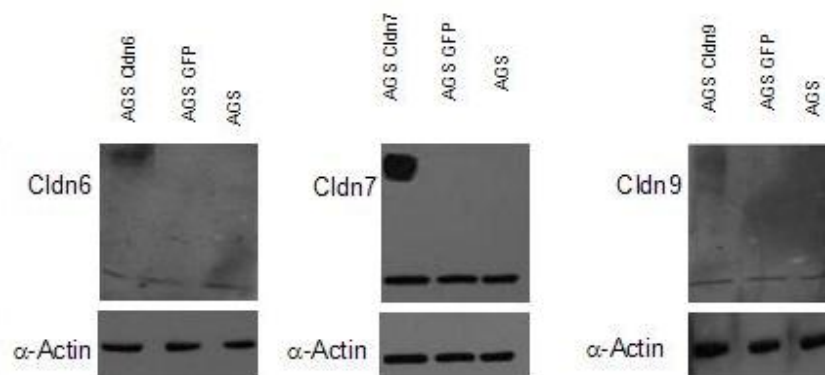


Fig. 10. Western blot de extractos totales de células AGS en el que se muestra la sobre-expresión de las claudinas-6, -7 y -9. La proteína sobre-expresada tiene un peso aproximado de 50 kDa debido a que se encuentra fusionada a la GFP. En las células AGS control y con el vector vacío sólo se observa la proteína endógena de aprox. 25 kDa. Se muestra α -Actina como control de carga.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

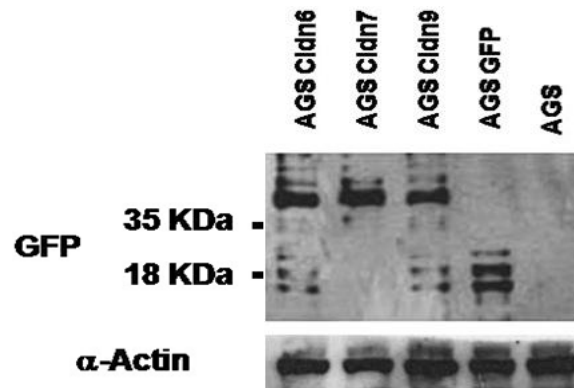


Fig. 11. Western blot realizado a partir de lisados totales de células AGS que muestra la sobre-expresión de las claudinas de estudio la cual es evidenciada con un anticuerpo específico para la proteína verde fluorescente (GFP). Las proteínas sobre-expresadas tienen un peso de aprox. 50kDa que corresponde a cada Claudina fusionada a la GFP. En el caso de las muestras de AGS con el vector vacío se observa solo la banda correspondiente a la GFP de aproximadamente 20-25kDa. Se muestra α -Actina como control de carga.

7.2 Expresión de Hsp's en células AGS control y células AGS que sobre-expresen claudinas-6, -7 y -9.

Para evaluar si las proteínas de choque térmico (Hsp27, Hsp40, Hsp70 y Hsp90) se expresan en células AGS control y AGS transfectadas con las diferentes claudinas (cldn -6, -7 y -9), se hicieron extracciones totales de proteína para posteriormente realizar ensayos de Western blot y corroborar la presencia/ausencia de las proteínas de interés.

En la figura 12 se muestran los resultados obtenidos de los ensayos de Western blot en los que se puede observar que la expresión de Hsp27 aumenta en las células transfectadas con claudina-6. Las células transfectadas con claudinas-7 y -9 muestran niveles de expresión similares a las de las células AGS control. Con respecto a la expresión de Hsp70, similar a Hsp27, se observó un ligero aumento en células transfectadas con claudina-6 con niveles de expresión similares entre las células AGS control y las transfectadas con cldn-7 y -9.

En cuanto a la expresión de Hsp40, no se pudo detectar señal en las células AGS control. Contrario a lo que sucede con éstas, la expresión fue evidente en las células AGS que sobre-expresan claudinas-6, -7 y -9. Cabe mencionar que la Hsp40 mostró un aumento considerable en las células AGS transfectadas con Claudina-9. La expresión de Hsp40 fue similar en las células transfectadas para claudina-6 y -7.

La Hsp90, al igual que Hsp40, se detectó sólo en las células transfectadas. Su expresión fue menor comparada con la de la Hsp40, similar entre las células transfectadas con claudina-6 y -7 y aumentada para las células que sobre-expresan claudina-9.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

Se llevó a cabo una densitometría de cada una de las proteínas para demostrar su expresión cuantitativamente en la cual se demuestra el aumento de la expresión de Hsp40 y Hsp90 principalmente en relación con las células transfectadas con Claudina 9. En cuanto a Hsp27 y Hsp70, se puede observar un ligero aumento en cldn-6, sin embargo no es significativo (Fig. 13).

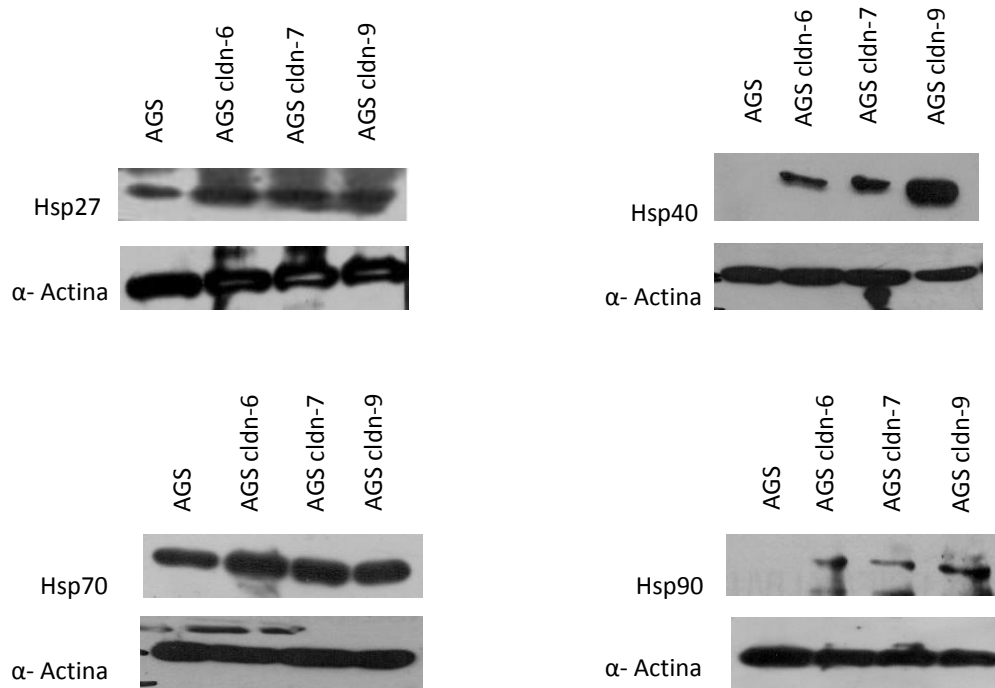


Fig. 12. Expresión de las diferentes Hsp's en células AGS control y transfectadas con cldn-6, -7 y -9. Como control de carga se muestra a α -Actina.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

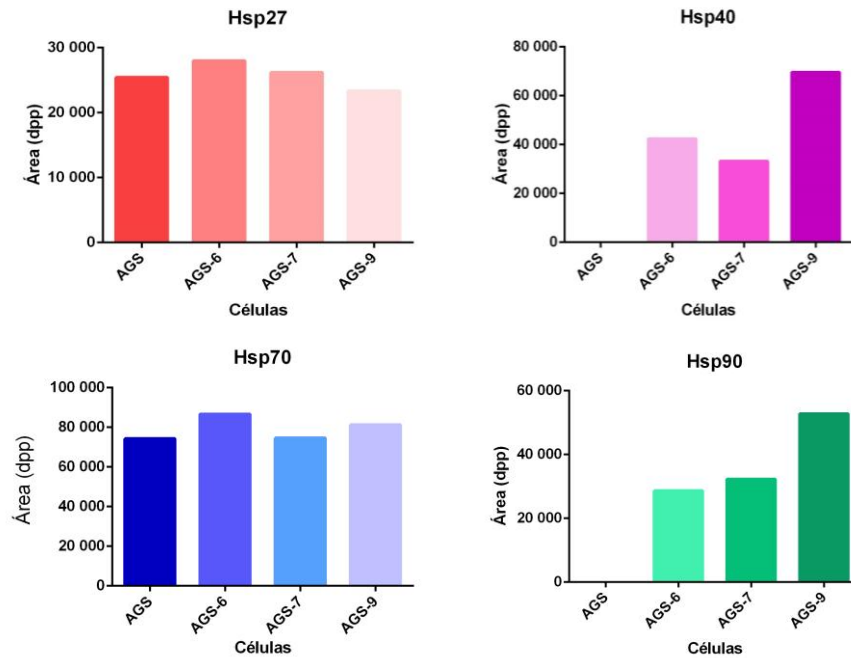


Figura 13. Estudio cuantitativo realizado por densitometría de la expresión las proteínas de choque térmico observadas por western blot.

Con los resultados anteriores se puede sugerir que la sobre-expresión de cldn-9 parece jugar un papel importante en la expresión de dos proteínas de choque térmico: Hsp40 y Hsp90, siendo la Hsp40 en la que se muestra una mayor regulación positiva.

7.3 Secreción de Hsp's en sobrenadantes de células AGS control y células AGS que sobre-expresen claudinas

Para determinar si la secreción de las Hsp's es diferente en las células AGS control y en las transfectadas, se realizaron ensayos de Western blot a partir de sobrenadantes de las células cultivadas durante 24 h sin SFB.

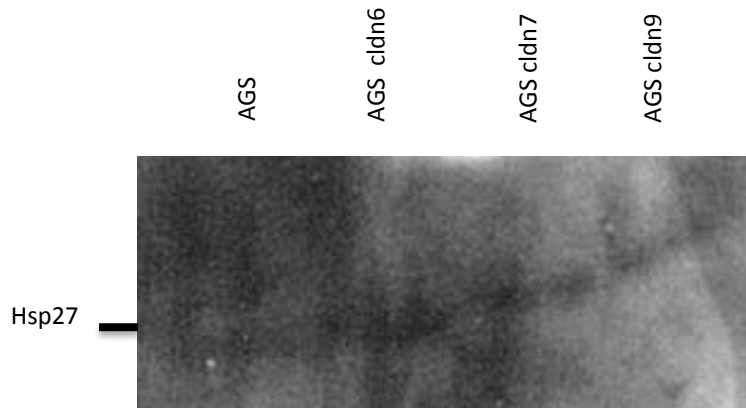


Fig. 13. Secreción de Hsp27 en el medio condicionado de células AGS control y AGS transfectadas con claudinas.

Los resultados a partir del análisis de los medios condicionados fueron escasos, ya que esta técnica sólo permitió la detección de la Hsp27. Como se muestra en la figura 13 se reveló una banda muy tenue en el peso molecular correspondiente a esta proteína la cual no muestra un aumento significativo en ninguno de los tipos de células utilizados (control y transfectadas). El hecho de no detectar a las otras Hsp's no significa que estas no sean secretadas al medio, por lo que será necesario realizar modificaciones a la técnica para medir exitosamente dicha secreción e implementar otra técnica como la de inmunoprecipitación, la cual podría detectar con mayor facilidad las cantidades mínimas de proteína que se secreta en los medios condicionados.

7.4 Interacción entre Hsp's, MMP's y Cldn's en células AGS control y células AGS transfectadas con claudinas.

Para analizar la posibilidad de que las Hsp's interactúen o colocalicen tanto con metaloproteasas como con claudinas, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación en los que se precipitó a cada una de las claudinas (-6, -7 y -9) y metaloproteasas (MMP-2 Y MMP-9) tanto en células AGS control como en células AGS transfectadas. Cada inmunoprecipitado se analizó mediante ensayos de western blot utilizando anticuerpos específicos contra cada una de las proteínas de choque térmico (Hsp27, 40, 70 y 90).

Co-IPs de claudinas y MMPs reveladas con anticuerpo anti-Hsp70

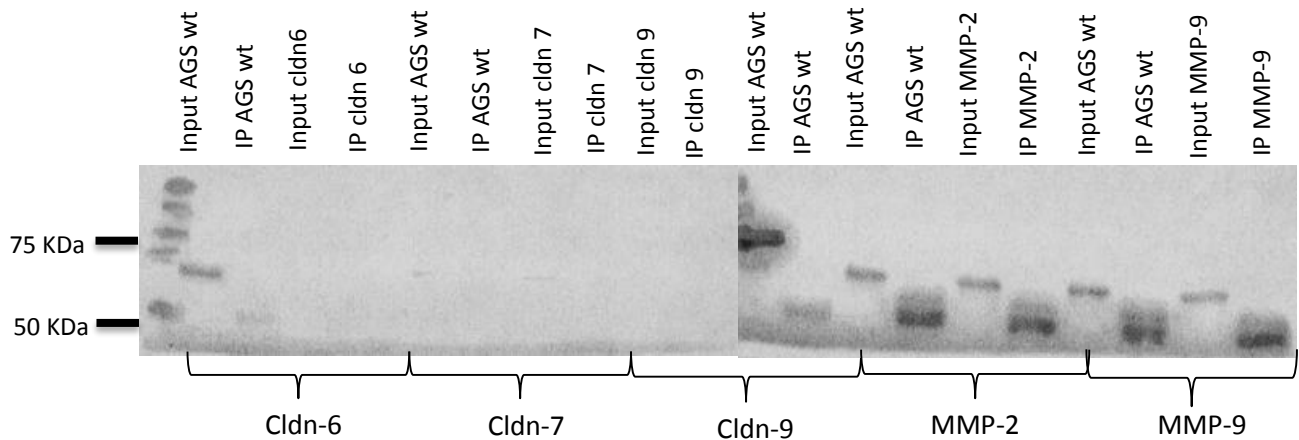


Fig.14. Co-Inmunoprecipitados de claudinas -6, -7 y -9 y metaloproteasas -2 Y -9 para Hsp70. Se muestran las células AGS sin tranfectar (wt) como control y el “Input” como control para cada inmunoprecipitado.

Co-IPs de claudinas y MMPs reveladas con anticuerpo anti-Hsp27

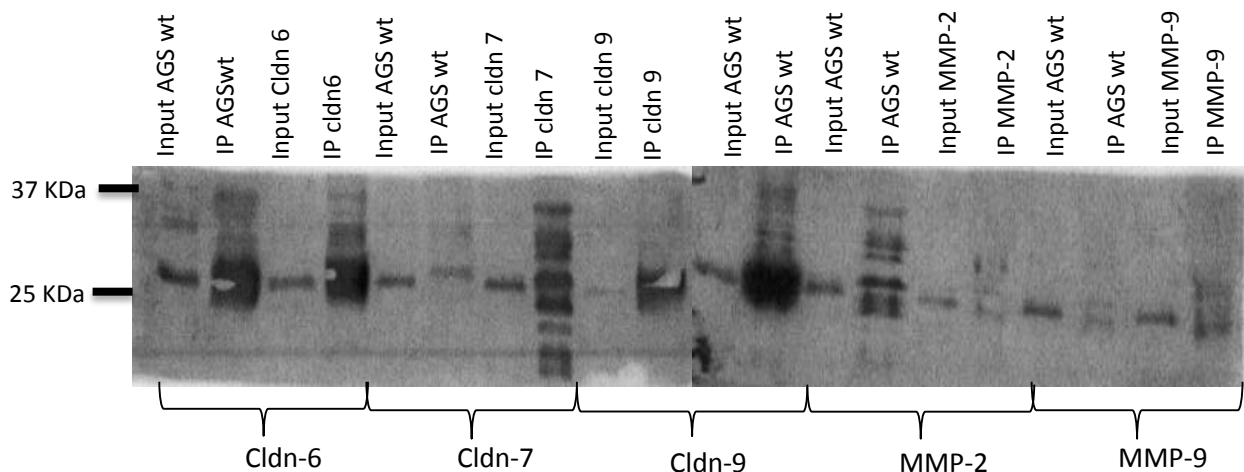


Fig.15. Co-Inmunoprecipitados de claudinas -6, -7 y -9 y metaloproteasas -2 Y -9 para Hsp27. Se muestran las células AGS sin tranfectar (wt) como control y el “Input” como control para cada inmunoprecipitado.

Co-IPs de claudinas y MMPs reveladas con anticuerpo anti-Hsp90

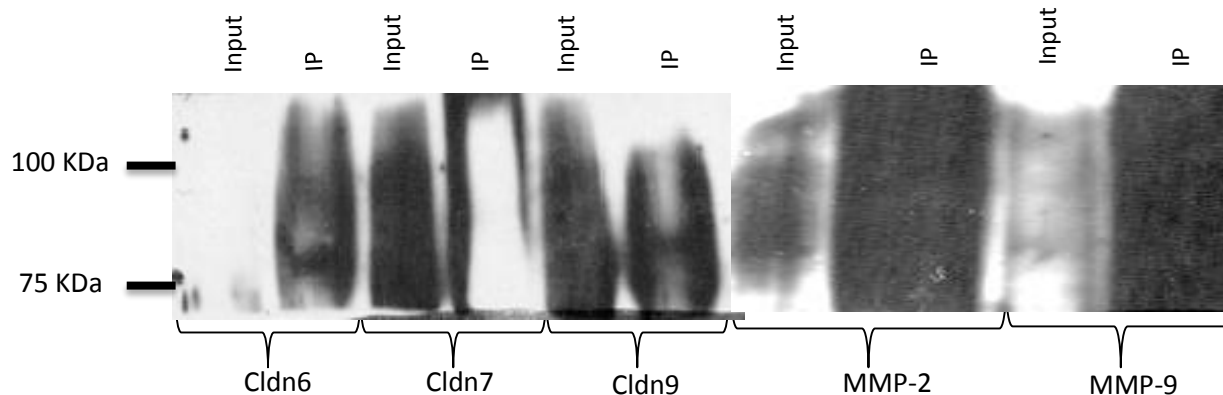


Fig.16. Co-Inmunoprecipitados de claudinas -6, -7 y -9 y metaloproteasas -2 Y -9 para Hsp90. Se muestra el “Input” como control para cada inmunoprecipitado.

Co-IPs de claudinas y MMPs reveladas con anticuerpo anti-Hsp40

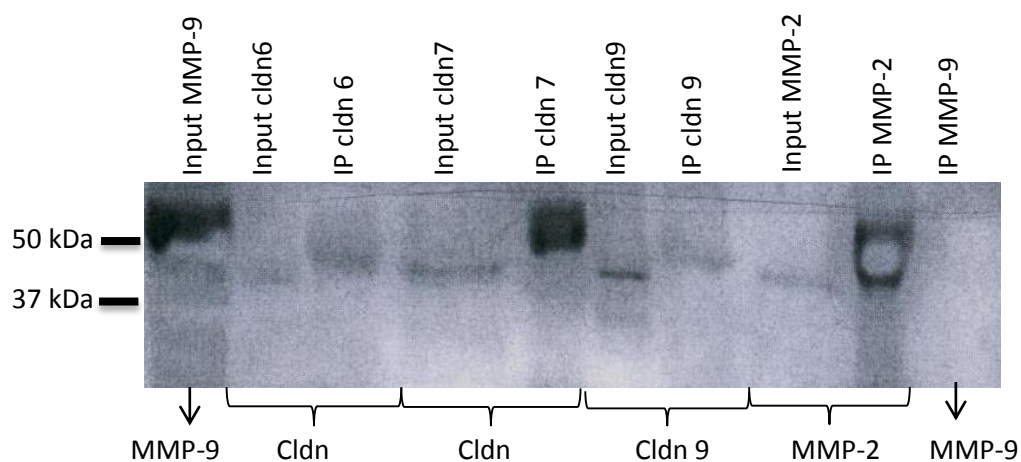


Fig.17. Co-Inmunoprecipitados de claudinas -6, -7 y -9 y metaloproteasas -2 Y -9 para Hsp40. Se muestra el “Input” como control para cada inmunoprecipitado.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

En la figura 14 se muestran los resultados de la posible interacción entre las claudinas o las MMPs en estudio, con la Hsp70. Como puede observarse, para el caso de las células AGS control y transfectadas con claudinas-6 y -7, no se obtuvo ninguna señal positiva. Para el caso de las células transfectadas con claudina-9 y aquellas en las que se inmunoprecipitó a MMP-2 y -9, se observó una banda cercana a los 70 KDa únicamente en las muestras del “input” utilizadas como control. En las muestras de los inmunoprecipitados solo se detectó una banda cercana a los 50 KDa que pudiera tratarse de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas.

En cuanto a la posible interacción con la Hsp27 (Fig.15), se observa una señal correspondiente a peso molecular en todas las muestras analizadas excepto para el inmunoprecipitado de la MMP-2. Comparando todos los carriles de los inmunoprecipitados con sus “input” controles, se observa que la banda correspondiente a 27 KDa es más fuerte en estas muestras, lo que pudiera indicar una interacción entre la Hsp27 con las claudinas-6 y -7 y con la MMP-9.

En las Fig. 16 y 17 se muestran los resultados de las inmunoprecipitaciones de las claudinas y las MMP's para determinar colocalización con la Hsp90 y Hsp40. Aunque es evidente que se requieren otros experimentos para corroborar estos resultados, se sugiere una posible interacción en aquellos en los que se inmunoprecipitó a las claudina-6 y -9 y se reveló contra Hsp90, ya que se observa una señal correspondiente a un peso molecular cercano a 90 KDa. Utilizando el anticuerpo contra Hsp40 se podría sugerir una interacción entre esta proteína y la Claudina-6.

Tomando en conjunto los resultados obtenidos en este trabajo se sugiere que la sobreexpresión de las claudinas-6, -7 o -9 promueven la expresión de proteínas como las Hsp's. Parece que este efecto es más evidente para la claudina-6 y la claudina-9 en las cuales se promovió la expresión de las Hsp40 y Hsp90. De la misma manera, al realizar los ensayos de inmunoprecipitación, se observó que estas mismas claudinas podrían estar colocalizando con la Hsp-90 y muy probablemente con la Hsp27 y Hsp40.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las claudinas son los componentes más importantes de las UE ya que son responsables del mantenimiento de la polaridad y permeabilidad de los epitelios, además de estar involucradas de una manera importante en la arquitectura y regulación de la homeostasis de los tejidos, en los que actúan como barreras de la vía paracelular. Existen diversos

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

reportes en los que se muestran variaciones en la expresión de claudinas tejido-específicas en tumores malignos, por lo que el estudio del patrón de distribución de éstas proteínas ha sido de gran interés, ya que tanto su aumento como su disminución podrían tener un impacto importante en la progresión del tumor^{113,114}.

Diversos estudios han demostrado que la sobre-expresión de las claudinas en células de distintos carcinomas promueve procesos relacionados con la progresión de estos padecimientos, como lo son la proliferación, migración e invasividad celular. Dentro de estos procesos se ven involucradas diversas proteínas como MMPs, supresores de tumores (a través de ZO-1 Y ZO-2), la activación de complejos de factores de transcripción como β -catenina/TCF-LEF, entre otros. Estos procesos conllevan a la supervivencia celular, inhibición de apoptosis, inducción de la expresión de oncogenes, degradación de la matriz extracelular y una gran variedad de procesos que aseguran el desarrollo de la enfermedad y la diseminación de la misma^{115,116}.

Existen reportes en los cuales se ha demostrado que la sobre-expresión de las claudinas promueve la activación de MMP-2 y -9, lo que podría explicar el papel que juegan las claudinas en la migración e invasividad celular¹¹⁷. Dentro de estos procesos, proteínas como las proteínas de choque térmico o Hsp's participan de manera importante, ya que éstas se expresan constitutivamente en células normales pero, en distintos tipos de carcinomas, se han visto sobre-expresadas. A la fecha no se sabe si existe alguna relación entre la sobreexpresión de claudinas, la activación de metaloproteasas y la activación y/o aumento en la expresión de Hsp's, por lo que este proyecto se desarrolló con la finalidad de analizar la expresión y posible activación de las Hsp's en células que sobre-expresan claudinas-6, -7 o -9 y relacionarlo con los efectos ejercidos por dichas claudinas.

Las proteínas de choque térmico que se evaluaron en este estudio fueron: Hsp27, Hsp40, Hsp70 y Hsp90, ya que en diversos estudios se ha demostrado que están principalmente implicadas en procesos cancerosos⁵⁸. En primera instancia se analizó la expresión, a nivel de proteína de las Hsp's. Los resultados obtenidos mostraron un aumento en los niveles de expresión de la Hsp27 en las células transfectadas con claudina-6, de Hsp40 y Hsp90 en células tranfectadas con claudina-9. El efecto más sobresaliente es el del aumento en la expresión de Hsp40 por la sobreexpresión de claudina-9, de la cual se sabe que su sobre-expresión incrementa la proliferación e invasividad de células de cáncer y, ahunado a esto, se ha demostrado que Hsp40 y Hsp90 se sobre-expresan en distintos carcinomas junto con distintas proteínas co-chaperonas y participando también en la migración e invasividad celular lo cual, de acuerdo a los resultados obtenidos, podría estar sucediendo en la línea celular del cáncer gástrico, particularmente en este estudio⁸⁹.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

Aún cuando no fue posible medir la secreción de todas las Hsp's evaluadas, se observó que (por lo menos para el caso de la Hsp27) éstas son secretadas al medio. Será indispensable determinar, por otras técnicas, si esta secreción es mayor cuando las células sobreexpresan claudinas, ya que para el caso de aquellas que sobre-expresan a claudina-9 en donde se vió aumentada la expresión de Hsp40 y Hsp90, se espera que haya una correlación entre los niveles de expresión de estas Hsp's y sus niveles de secreción.

Se sabe que la sobre-expresión de ciertas claudinas en este tipo de enfermedades está relacionada con la pérdida o atenuación de las UE, aumento en la permeabilidad celular, disminución de la TER, etc., lo que da lugar a una disminución de la función de barrera epitelial. Estos cambios celulares pueden facilitar el paso de las Hsp's a través de los epitelios contribuyendo a la migración e invasión de otros tejidos, y a la inhibición de apoptosis para la supervivencia celular, funciones que se sabe llevan a cabo las proteínas de choque térmico cuando son sobre-expresadas en procesos cancerosos¹¹⁸.

El cáncer por sí solo, es un proceso que le ocasiona estrés a la célula, sin embargo estudios recientes han demostrado que células de cáncer de mama sometidas a estrés presentan una alta expresión de Hsp90 (y sus co-chaperonas, Hsp70 y Hsp40), un aumento en su secreción y que su capacidad de migración e invasión se ve aumentada¹¹⁸⁻¹¹⁹. En este trabajo se midió la presencia de Hsp's en medios de células que fueron crecidas durante 24 h sin SFB como una vía para evaluar la secreción de las Hsp's. Sorprendentemente, solo la Hsp27 y no las demás, fue detectada en los medios condicionados, a una baja intensidad y sin cambios visibles en su expresión entre cada una de las células utilizadas (AGS control y AGS transfectadas). Estos resultados coinciden con el hecho de que Hsp27 es altamente inducible bajo condiciones de estrés, además de que se sabe que su sobre-expresión y secreción en distintos carcinomas podría servir de diagnóstico temprano y una posterior terapia contra el carcinoma en cuestión^{59,120}. En cuanto al resto de las proteínas se ha reportado, principalmente con células de cáncer de mama, que la Hsp90 así como las Hsp40 y Hsp70 (que funcionan como co-chaperonas de la primera) son secretadas conjuntamente en medio condicionado ya que forman complejos proteínicos que asisten en la activación de ciertas “proteínas cliente” entre ellas la MMP-2, contribuyendo a la invasión y metástasis⁸⁹, sin embargo, en nuestro estudio no fue posible detectarlas por lo que se requiere hacer más estudios con los que se pueda corroborar su secreción, para comprobar el comportamiento de estas proteínas en medios condicionados y si son excretadas en estos proceso cancerosos. Dado lo anterior, resulta entonces de vital importancia, estudiar las proteínas de choque térmico en medios condicionados por el hecho de que su participación, principalmente Hsp90, es necesaria para la activación de

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

ciertas proteasas requeridas para la invasión (como las MMP's) que son secretadas de forma inactiva al medio extracelular.

Numerosos estudios han mostrado que la remodelación de los tejidos depende en gran escala de la reestructuración de la matriz extracelular (MEC) la cual, en procesos de tumorigénesis, se ve afectada promoviendo la migración e invasión de las células cancerosas para colonizar órganos distantes. Referente a este proceso, se han identificado diferentes proteasas extracelulares que son de gran importancia en el mismo, entre ellas las metaloproteasas (MMPs), las cuales son endopeptidasas dependientes de zinc capaces de degradar gelatina y el colágeno de las membranas basales^{52,121}. Con lo anterior, se vuelve más evidente que uno de los primeros procesos de invasión es el desprendimiento de la célula tumoral para atravesar el tejido e invadir los órganos contiguos degradando la matriz extracelular mediante éstas MMPs.

Recientemente se ha reportado que las MMPs, además de degradar proteínas de matriz extracelular, también pueden hacerlo con proteínas que no pertenecen a la matriz, tales como las de adhesión célula-célula. Aunado a esto, se ha reportado que la sobre-expresión de algunas claudinas, como *cldn-3* y *cldn-4*, está asociada con el incremento en la actividad de la MMP-2, o también que la baja expresión de *cldn-10* se relaciona con una reducción en la actividad de las MMPs en células de hepatocarcinoma. Estos reportes, indican que existe una estrecha relación entre la actividad de las MMPs, la sobre-expresión de *cldn's* y la metástasis en células cancerosas¹²²⁻¹²³. Por otra parte, existen diversos estudios en los que se muestra que la sobre-expresión de las proteínas de choque térmico en diferentes carcinomas se encuentra involucrada en procesos de migración, invasión y metástasis hacia otros tejidos a través de la activación de las MMPs.

Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que en células AGS la sobre-expresión de claudina-9 induce un aumento en la expresión de MMP-2 y la sobre-expresión de claudinas-6 y -7 de MMP-9, sugiriendo que el aumento en la capacidad invasiva de éstas células podría deberse al aumento en la expresión de estas metaloproteasas.

De acuerdo con lo anterior, evaluamos la posible interacción entre las claudinas y MMPs con las Hsp's. Los resultados que obtuvimos mostraron una co-localización entre Hsp90 con *cldn-6* y *cldn9*, así como también de Hsp27 con *cldn-7* y MMP-9. Estos datos concuerdan con estudios previos en los que se mostró que Hsp27 juega un papel importante en la invasión y metástasis hacia otros tejidos, siendo una proteína con un papel crítico para la expresión de metaloproteasas-2 y -9¹²⁴. Con lo anterior se podría proponer que la sobre-expresión de *cldn-7* potencia la expresión de Hsp27 y que la

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

cercanía entre ésta y MMP-9 podría inducir el inicio del proceso de invasión, en el que la MMP-9 llevara a cabo su papel de degradación de la matriz mientras que Hsp27 llevara a cabo su papel en la migración celular y metástasis mediante su interacción con el citoesqueleto de actina y la potenciación de la expresión de MMP-9⁸⁶.

En cuanto a Hsp40 y Hsp90, de igual forma se mostró un incremento en la expresión de éstas en relación con cldn-6 para Hsp40 y de las cldn-6 y -9 para Hsp90, las cuales al igual que con Hsp27 podrían estar promoviendo el aumento en la actividad de la proteína de choque térmico por su sobre-expresión. En este caso, se puede sugerir que el aumento en la expresión de Hsp40 y Hsp90 podría estar dado por una vía indirecta mediante un intermediario, como las MMPs. En estudios previos de nuestro laboratorio se mostró una interacción entre claudina-6 con MMP-9 y Claudina-9 con MMP-2, por lo que una posible interacción a través de la formación de complejos entre MMPs y claudinas incrementaría la expresión de las Hsp's indirectamente. Otra posibilidad es que, además de que las claudinas y metaloproteasas pudieran aumentar la expresión de Hsp90 y Hsp40, se indujera la formación de co-chaperonas que interactúen con esta proteína e incluso ayuden en la activación de MMP-2 principalmente¹¹⁷, por lo que un complejo formado entre las proteínas mencionadas podría estar jugando un papel importante en la sobre-expresión de las Hsp's mencionadas. Posteriormente, sería sugerible realizar ensayos de inmunofluorescencia o de FRET para corroborar la interacción directa entre las proteínas que mostraron una posible co-localización.

Los resultados anteriores nos pueden sugerir que el aumento en la capacidad invasiva de las células AGS podría estar relacionado con el aumento en la expresión de las Hsp's mediante las MMP's directa o indirectamente reguladas por la sobre-expresión de las claudinas reportadas.

Interesantemente, aunque Hsp40 fue la proteína que elevó más significativamente sus niveles de expresión en células que sobre-expresan claudina-9 y mostró una posible co-localización con Claudina-6, se deberían llevar a cabo más estudios para corroborarlo. Esto se podría explicar de manera similar a lo que ocurre con Hsp90, ya que se ha demostrado que claudina-9 co-localiza con MMP-2 y MMP-9 principalmente aumentando los niveles de expresión, así como Claudina-6 promueve el aumento en la expresión y posible activación de MMP-2, por lo que ese gran aumento en la expresión captado mediante la técnica de Western blot, podría estar dado de una forma indirecta en la que la claudina-6 y/o -9 interactúen o formen complejos con la MMP-2 y éstas a su vez, influyen un aumento en la activación de la Hsp, la cual se sabe que tiene altos índices de invasividad,

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

hecho que concuerda con los estudios que señalan que las MMPs son los principales degradadores de matriz para que se dé la invasión hacia los tejidos circundantes.

Hsp70 mostró un aumento en su expresión con respecto a células AGS transfectadas con cldn-6, sin embargo no mostró co-localización con ninguna otra proteína. Estudios previos con esta proteína han mostrado que es importante para la activación de MMP-2 en células de cáncer de mama, ya que su inhibición demostró un decremento en la migración y, por lo tanto, de la invasividad celular¹¹⁸. Además, como se mostró en nuestro laboratorio, la claudina-6 está relacionada con un incremento en la actividad de MMP-2 por lo que sería importante realizar estudios más profundos acerca de la actividad y expresión de estas proteínas y así saber si la MMP-2 podría ser un intermediario en esta reacción.

Tomando todos los datos en conjunto podemos proponer que la sobreexpresión de claudina-9 podría estar promoviendo el aumento en la expresión y posible activación de MMP-2 y de Hsp90 que, junto con el aumento en la permeabilidad celular, promovería la secreción de MMPs y Hsp's a través de vías paracelulares dañadas. Las Hsp's podrían participar manteniendo un ambiente proinflamatorio (con la inducción y secreción de citocinas y la expresión de marcadores de superficie) propicio para la proliferación e invasión de las células cancerosas y favorable para la degradación de la matriz extracelular por las MMPs.

Finalmente, cabe resaltar, que los estudios mostrados en el presente trabajo son innovadores por el hecho de que no existen hasta la fecha evidencias de que la expresión de Hsp's y claudinas confieran alguna ventaja a las células cancerosas para su supervivencia, migración e invasividad. Los estudios a la fecha evalúan a cada una de las proteínas por separado, por lo que los presentes hallazgos ayudarían a establecer el marco molecular en el cual cada una de las proteínas está regulada.

9. CONCLUSIONES

- La sobre-expresión de claudina 9 aumenta los niveles de expresión de Hsp40 y Hsp90.
- La sobre-expresión de claudina-6 aumenta la expresión de Hsp27.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

- Hsp27 co-localiza con cldn-7, cldn-9 y MMP-9 mostrando un aumento en su expresión con cada una de ellas.
- Hsp40 co-localiza con cldn-6.
- Hsp90 co-localiza con claudinas-6 y -9.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren una relación estrecha entre la expresión de claudinas y la expresión de las Hsp's como probables protagonistas de la activación de MMPs y, en consecuencia, de la invasividad celular. Estos estudios podrían dar pauta a la realización de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a este grupo de proteínas como método diagnóstico de cáncer gástrico y, posteriormente, otros tipos de cáncer.

10. PERSPECTIVAS

Aún faltan estudios por realizar para determinar, de manera más precisa, los mecanismos que están involucrados en los procesos de invasividad, migración y metástasis dados por el complejo de proteínas antes mencionadas y cómo es su funcionamiento y regulación dentro de las células contribuyendo a la adquisición de un cambio a nivel celular que pueda desencadenar algún tipo de cáncer. Esto podría realizarse mediante distintas técnicas entre las que se incluyen inmunofluorescencias o FRET para determinar la localización de las proteínas en la célula y si éstas interactúan entre sí; ensayos de inmunoprecipitación y western blot de los medios condicionados para detectar con mayor facilidad a las proteínas, ya que la cantidad secretada mediante un medio condicionado es muy poca en comparación con un extracto celular; ensayos de zimografía para observar actividad de metaloproteasas en presencia de las Hsp's y claudinas sobre-expresadas; uso de RNAs de interferencia para conocer los efectos que se producen al silenciar una proteína en específico, etc. Todos estos estudios serán de gran ayuda en la comprensión de los mecanismos requeridos en una transformación celular en los cuales se involucra a las claudinas como elementos importantes en estos procesos.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

11. ANEXO

MEDIO DE CULTIVO

D-MEM solo (ésteril)

- Disolver un sobre del medio en aproximadamente 800 ml de agua tratando de no dejar nada de medio en el sobre
- Adicionar 2 g de NaHCO_3 y disolver
- Ajustar a pH = 7.4 (puede quedar 0.1 o 0.2 abajo)
- Levar a 1 L de volumen con agua
- Esterilizar por filtración separando en botellas de 500 ml etiquetadas

D-MEM suplementado

Por cada 100 ml de medio D-MEM solo adicionar:

- 0.1 ml de Insulina de SIGMA de 10 mg/mL (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o 0.1 U/ml)
- 0.2 ml de Piruvato de Sodio de GIBCO 100mM (2mM)
- ml de L-Glutamina de GIBCO 200 mM (2mM)
- ml de Penicilina/Estreptomicina de GIBCO 10,000U/ml/10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (100U/ml/100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
- 5.0 ml de Suero Fetal Bovino de GIBCO (5%)

DMEM para congelamiento de células.

D-MEM + GLICEROL 10% Para 10 ml de medio total:

- 1.25 ml de Glicerol al 80%
- 8.75 ml de D-MEM suplementado.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

D-MEM para medio condicionado

Por cada 100 ml de medio D-MEM solo (estéril) adicionar:

- 0.1 ml de Insulina de SIGMA de 10 mg/mL (10 µg/ml o 0.1 U/ml)
- 0.2 ml de Piruvato de Sodio de GIBCO 100mM (2mM)
- ml de L-Glutamina de GIBCO 200 mM (2mM)
- ml de Penicilina/Estreptomicina de GIBCO 10,000U/ml/10,000 µg/ml (100U/ml/100 µg/ml)

NOTA: se debe dejar libre de Suero Fetal Bovino (SFB), ya que ésta es la base del condicionamiento hacia las células

PBS 1X pH = 7.5, para lavado de los cultivos celulares.

Para 1L

-Pesar 9.6 g de PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) de GIBCO

-Disolver en 900 ml de agua

-Ajustar el pH

-Aforar con ddH₂O, esterilizar por filtración y guardar en refrigeración.

AMORTIGUADOR DE LISIS (para extracción de proteínas) pH = 7.5.

Para preparar 100 ml:

- 0.8766 g de NaCl (150 mM)
- 0.6057 g de Tris base (PM = 121.14 g/mol, C₄H₁₁NO₃) de SIGMA (50 mM)
- 0.038 g de EGTA (PM = 380.4 g/mol, C₁₄H₂₄N₂O₁₀) de SIGMA (1 mM)
- 0.029 g de EDTA (PM = 292.2 g/mol, C₁₀H₁₆N₂O₈) de SIGMA (1 mM)
- ml de IGEPAL (1%)
- ml de Solución de Desoxicolato de Sodio al 10% (0.1%)
 - g de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) (0.1%)

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

-Disolver los compuestos y ajustar el pH

-Aforar a 100 ml con agua

-Almacenar en Refrigeración

*Antes de emplear adicionar los siguientes inhibidores, por cada ml de Buffer a emplear:

- 4 μ l de Leupeptina 5 mg/mL (20 μ g/ml)
- 10 μ l de Coctail de Inhibidores de Fosfatasas I de SIGMA (dil 1:100)
- 10 μ l de Coctail de Inhibidores de Fosfatasas II de SIGMA (dil 1:100)
- 1 mg de Inhibidor de Tripsina de SIGMA (1mg/ml)

Buffer de Laemli 4X

Para 50 ml:

- 20 ml de SDS al 10% (4%)
- 12.5 ml de Tris 0.5 M pH = 6.8 (0.125M)
- 10 ml de Glicerol (20%)
- 0.02 g de Azul de Bromofenol (0.04%)

-Disolver y aforar a 50 ml

-Alicuotar en tubos de 15 ml

-Almacenar en congelación

-Usar la mitad del volumen de este buffer en el volumen de la muestra.

*Antes de emplear la muestra para corrimiento electroforético adicionar β -Mercaptoetanol para tener una concentración del 5%.

ACRILAMIDA 30.8%

Para 100 ml:

- 30 g de Acrilamida (BIO-RAD) (30%)

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

- 0.8 g de Bis N, N'- metilen bis acrilamida (BIO-RAD) (0.8%)

-Disolver poco a poco la acrilamida en 50 ml de ddH₂O y posteriormente disolver la bis - acrilamida.

-Llevar a 100 ml con ddH₂O y guardar en refrigeración.

TRIS 1.5M pH=8.8

Para 100 ml: 1

- 8.171g de Tris

-Disolver poco a poco en 50 ml de ddH₂O, ajustar el pH y posteriormente aforar a 100ml.

TRIS 0.5M pH= 6.8

Para 100ml:

- 6.057g de Tris

-Disolver poco a poco en 50 ml de ddH₂O, ajustar el pH y posteriormente aforar a 100ml.

Gel Separador al 12.5%

- 8.33 ml de Acrilamida 30.8%
- 5 ml de Tris 1.5 M pH = 8.8
- 6.4 ml de ddH₂O
- 100 µl de SDS al 20%
- 100 µl de Persulfato de Amonio al 10%
- 10 µl de TEMED

Gel Separador al 10%

- 3.35 ml de Acrilamida 30.8%

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

- 2.5 ml de Tris 1.5 M pH = 8.8
- 4 ml de ddH₂O
- 50 µl de SDS al 20%
- 50 µl de Persulfato de Amonio al 10%
- 5 µl de TEMED

Gel Concentrador

2.5 ml de Acrilamida 30.8%

3.75 ml de Tris 0.5 M pH = 6.8

8.55 ml de ddH₂O

75 µl de SDS al 20%

15 µl de TEMED

150 µl de Persulfato de Amonio al 10%

Amortiguador para Electroforesis, pH = 8.3

Para 4L:

- 12.13 g de Tris (25 mM)
- 57.65 g de Glicina (192 mM)
- 4 g de SDS (0.1%)

-Aforar con ddH₂O

Amortiguador de Transferencia, pH = 8.3

Para 1 L:

- 3.03 g de Tris (25 mM)
- 14.4 g de Glicina (192 mM)
- 200 ml de Metanol (20%)

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

NOTA: No ajustar pH con ácidos o bases, el pH de 8.3 se obtiene si se pesan correctamente los ingredientes.

-Aforar con ddH₂O y guardar en refrigeración.

Para lavados de membranas se utilizó TBS 1X, pH = 7.6

Para 1L:

- 2.423 g de Tris (20 mM)
- 8 g de NaCl (136 mM)

-Aforar con ddH₂O y guardar en refrigeración.

Para lavados e incubaciones con anticuerpos de membranas se utilizó TTBS 1X, pH = 7.6

Para 1L:

- 2.423 g de Tris (20 mM)
- 8 g de NaCl (136 mM)
- 1 ml de Tween 20 (0.1%)

-Aforar con ddH₂O y guardar en refrigeración.

INMUNOPRECIPITACIÓN

Amortiguador 1 (Para 500 ml de NaCl 150mM)

- 3.0285 de Tris (50mM)
- 4.35g de NaCl (150mM)

-Ajustar Ph a 7.5

*Antes de emplear adicionar los siguientes inhibidores. Por cada ml de amortiguador a emplear:

- Inhibidor de tripsina (1mg/ml)
- Cocktel de fosfatasas y proteasas dil 1:100 (10µl/ml)

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

- Leupeptina 20 µg/ml (4 µl de la sol. 5mg/ml)
- Aprotinina 10 µg/ml (10 µl de la sol. 1mg/ml)
- Tritón X-100 al 0.5% (en lavados de perlas recuperadas del inmunoprecipitado no se agrega este detergente)

Amortiguador 2 (Para 500ml de NaCl 600mM)

- 3.0285g de Tris (50mM)
- 17.4g de Na Cl (600mM)

-Ajustar pH a 8.3

Para 500ml de Tris 20Mm

- 1.211g de Tris (20Mm)

-Ajustar pH a 7.5 y de preferencia esterilizar.

Lavado de perlas de proteína G Sefarosa

- Se lavan 3 veces con Tris 20mM pH 7.5, en un volumen 1:1
- Se centrifugan a 9000 rpm
- Se guardan a 4°C hasta utilizarse.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893–917
2. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:1893–907
3. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965;64:31–49
4. Marrelli D, Roviello F, de Manzoni G, Morgagni P, Di Leo A, Saragoni L, De Stefano A, Folli S, Cordiano C, Pinto E, Italian Research Group for Gastric Cancer. Different patterns of recurrence in gastric cancer depending on Lauren’s histological type: longitudinal study. *World J Surg* 2002;26:1160–5
5. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004; 286:C1213–1228.
6. E. Fuchs, T. Tumber, and G. Guasch, “Socializing with the neighbors: stem cells and their niche,” *Cell*, vol. 116, no. 6, pp. 769–778, 2004.
7. D. Garrod, M. Chidgey, Desmosome structure, composition and function, *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (2008) 572–587.
8. K.J. Green, J.C. Jones, Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components, *Faseb. J.* 10 (1996) 871–881.
9. D.A. Goodenough, J.A. Goliger, D.L. Paul, Connexins, connexons, and intercellular communication, *Annu. Rev. Biochem.* 65 (1996) 475–502.
10. L. van Zeijl, B. Ponsioen, B.N. Giepmans, A. Ariaens, F.R. Postma, P. Varnai, T. Balla, N. Divecha, K. Jalink, W.H. Moolenaar, Regulation of connexin43 gap junctional communication by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, *J. Cell. Biol.* 177 (2007) 881–891.
11. Hartsock A. and Nelson W. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimic Biophys Acta* 1778(2008): 660-669.
12. Mitic LL, Van Itallie CM, and Anderson JM. Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions. I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G250_G254, 2000.
13. Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P et al. Tight junction proteins. *Progr Biophys Mol Biol* 2003; 81: 1–44.
14. Turksen K, Troy TC. Barriers built on claudins. *J Cell Sci* 2004; 117: 2435–2447.
15. Van Itallie CM, Anderson JM. The role of claudins in determining paracellular charge selectivity. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 38–41.
16. Shen L, Turner JR. Role of epithelial cells in initiation and propagation of intestinal inflammation. Eliminating the static: tight junction dynamics exposed. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G577–G582.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

17. Förster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol* (2008) 130:55-70
18. Gupta IR, Ryan AK. Claudins: unlocking the code to tight junction function during embryogenesis and in disease. *Clin Genet* 2010, 77:314-325
19. Shin K, Fogg V and Margolis B. Tight junctions and cell polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2006. 22:207-35
20. Schneeberger E, Lynch R. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J. Physiol Cell Physiol.* 2004. 286: C1213-C1228.
21. Riazuddin S, Ahmed Z, Fanning A, et al. Tricellulin is a tight junction protein necessary for the hearing. *Am J Hum Genet.* 2006. 79:1040-1051
22. Ikenouchi J, Furuse K, Sasaki et al. Loss of occluding affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell.* 2008. 19: 4687-4693
23. Ikenouchi J, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S. Loss of occluding affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell.* 2008. 19: 4687-4693
24. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, and Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol.* 1993. 123: 1777–1788.
25. Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, and Tsukita Y. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol.* 1997. 137: 1393–1401.
26. Tsukita S, Furuse M. Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Cell Biol.* 1999. 9: 268-273.
27. Murata M, Kojima T, Yamamoto T, et al. Down-regulation of survival signaling through MAPK and Akt in occluding deficient mouse hepatocytes in vitro. *Exp Cell Res.* 2005. 310: 140-151.
28. Mitic L, Van Itallie C, and Anderson J. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000. 279: 250-254
29. Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, Tamura A, Igarashi M, Endo T, Takeuchi K, Tsukita S. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett.* 2011. 585: 606–612.
30. Wu J, Helftenbein G, Koslowski M, Sahin U, Tureci O. Identification of new claudin family members by a novel PSI-BLAST based approach with enhanced specificity. *Proteins.* 2006. 65: 808–815.
31. Günzel D and Yu A. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev.* 2013. 93:525-569.
32. Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 2006; 68: 403–429.
33. Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ et al. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283: C142–C147
34. Wen H, Watry DD, Marcondes MC, and Fox HS. Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: Role of the first extracellular domain of claudin-5. *Mol Cell Biol* 24: 8408–8417, 2004.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

35. 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* 2008. 22: 146–15.
36. Van Itallie CM, Betts L, Smedley JG, 3rd et al. Structure of the claudin-binding domain of Clostridium perfringens enterotoxin. *J Biol Chem* 2008; 283: 268–274.
37. Guillemot L, Paschoud S, Pulimeno P et al. The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 601–613.
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. Coyne CB, Gambling TM, Boucher RC, Carson JL, and Johnson LG. Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003. 285: 1166–1178.
40. Overgaard C, Daugherty B, Mitchell L & Koval M. Claudins: Control of barrier function and regulation in response to oxidant stress. *Antioxidants & Redox signaling*. 2011. 15: 1179-1188.
41. Alroy J. Ultrastructure of canine urinary bladder carcinoma. *Vet Pathol* 1979. 16:693–701.
42. Martinez-Palomo A. Ultrastructural modifications of intercellular junctions in some epithelial tumors. *Lab Invest* 1970. 22:605–14.
43. 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* 1999. 20:1425–31.
44. Ouban A, Ahmed AA. Claudins in human cancer: a review. *Histol Histopathol* 2010;25:83–90
45. Turksen K. Claudins and cancer stem cells. *Stem Cell Rev* 2011;7:797–8
46. Morin PJ. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res* 2005;65:9603–6
47. Gonzalez-Mariscal L, Lechuga S, Garay E. Role of tight junctions in cell proliferation and cáncer. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 2007. 42: 1-57
48. Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer* 2006;6:186
49. Resnick MB, Gavilanez M, Newton E, Konkin T, Bhattacharya B, Britt DE, et al. Claudin expression in gastric adenocarcinomas: a tissue microarray study with prognostic correlation. *Hum Pathol* 2005; 36:886–92.
50. Rendo’n-Huerta E, Teresa F, Teresa GM, Xochitl GS, Georgina AF, Veronica ZZ, Montañó LF. *Distribution and expression pattern of claudins 6, 7, and 9 in diffuse- and intestinal-type gastric adenocarcinomas*. *J Gastrointest Cancer* 2010;41:52–9
51. A.H. Johnson, H.F. Frierson, A. Zaika, S.M. Powell, J. Roche, S. Crowe, C.A. Moskaluk, W. El-Rifa, *Expression of tight-junction protein claudin-7 is an early event in gastric tumorigenesis*, *Am. J. Pathol.* 2005 167: 577–584.
52. Nigase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteases and TIMPs. *Cardiovascular Research*. 2006. 69:562-573

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

53. Kessenbrock K, Plaks V, Werb, Z. Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010. 141:52-65
54. Hightower LE. *Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity*. *Cell*. 1991;66:191–7.
55. Gething MJ, Sambrook J. *Protein folding in the cell*. *Nature*. 1992;355:33–45.
56. Netzer WJ, Hartl FU. *Protein folding in the cytosol: chaperon independent and independent mechanisms*. *Trends Biochem Sci*. 1998;23:68–73.
57. Freeman BC, Yamamoto KR. *Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones*. *Science*. 2002;296:2232–5.
58. Halacli Oskay S., Halacli B., Altundag K. 2013. *The significance of the heat shock proteins in breast cancer therapy*. *Med Oncol*. 30(2):575
59. Coronato S., Di Girolamo W, et. al. 1999. *Biología de las proteínas de choque térmico*. *MEDICINA (Buenos Aires)* 1999; 59: 477-486
60. G. Vallespi M, García I. 2008. *Las proteínas de estrés térmico en inflamación y cáncer*. *Biotecnología aplicada*. 25:199-207
61. Jaattela, M. (1995) *Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells*. *Int. J. Cancer* **60**, 689–693.
62. Garrido, C., Fromentin, A., Bonnotte, B., Favre, N., Moutet, M., Arrigo, A. P., Mehlen, P., Solary, E. (1998) *Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones*. *Cancer Res*. **58**, 5495–5499.
63. Gurbuxani, S., Bruey, J. M., Fromentin, A., Larmonier, N., Parcellier, A., Jaattela, M., Martin, F., Solary, E., Garrido, C. (2001) *Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells*. *Oncogene* **20**, 7478–7485.
64. Bruey, J. M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S. A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S., Arrigo, A. P., Kroemer, G., Solary, E., et al. (2000) *Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c*. *Nat. Cell Biol*. **2**, 645–652.
65. Garrido, C. (2002) *Size matters: of the small HSP27 and its large oligomers*. *Cell Death Differ*. **9**, 483–485.
66. Shi, Y., Thomas, J. O. (1992) *The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate*. *Mol. Cell. Biol*. **12**, 2186–2192.
67. Sreedhar, A. S., Kalmar, E., Csermely, P., Shen, Y. F. (2004) *Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance*. *FEBS Lett*. **562**, 11–15.
68. Schmitt E., Gehrmann M, et. al. 2007. *Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy*. *Journal of Leukocyte Biology*. 81:15-27
69. Arnold-Schild, D., Hanau, D., Spehner, D., Schmid, C., Rammensee, H. G., de la Salle, H., Schild, H. (1999) *Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells*. *J. Immunol*. 162, 3757–3760.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

70. Habich, C., Baumgart, K., Kolb, H., Burkart, V. (2002) The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins. *J. Immunol.* **168**, 569–576.
71. Vabulas, R. M., Ahmad-Nejad, P., da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, C. J., Hacker, H., Wagner, H. (2001) Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 31332–31339.
72. Matzinger, P. (2002) The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**, 301–305.
73. Asea, A., Kraeft, S. K., Kurt-Jones, E. A., Stevenson, M. A., Chen, L. B., Finberg, R. W., Koo, G. C., Calderwood, S. K. (2000) HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat. Med.* **6**, 435–442.
74. Lehner, T., Wang, Y., Whittall, T., McGowan, E., Kelly, C. G., Singh, M. (2004) Functional domains of HSP70 stimulate generation of cytokines and chemokines, maturation of dendritic cells and adjuvanticity. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 629–632.
75. Kuppner, M. C., Gastpar, R., Gelwer, S., Nossner, E., Ochmann, O., Scharner, A., Issels, R. D. (2001) The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1602–1609.
76. Triantafilou, K., Triantafilou, M., Ladha, S., Mackie, A., Dedrick, R. L., Fernandez, N., Cherry, R. (2001) Fluorescence recovery after photobleaching reveals that LPS rapidly transfers from CD14 to hsp70 and hsp90 on the cell membrane. *J. Cell Sci.* **114**, 2535–2545.
77. Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M. C., Biassoni, R., Moretta, L. (2001) Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 197–223.
78. Long, E. O. (1999) Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 875–904.
79. Gross, C., Hansch, D., Gastpar, R., Multhoff, G. (2003) Interaction of heat shock protein 70 peptide with NK cells involves the NK receptor CD94. *Biol. Chem.* **384**, 267–279.
80. Gross, C., Schmidt-Wolf, I. G., Nagaraj, S., Gastpar, R., Ellwart, J., Kunz-Schughart, L. A., Multhoff, G. (2003) Heat shock protein 70-reactivity is associated with increased cell surface density of CD94/CD56 on primary natural killer cells. *Cell Stress Chaperones* **8**, 348–360.
81. Shin, B. K., Wang, H., Yim, A. M., Le Naour, F., Brichory, F., Jang, J. H., Zhao, R., Puravs, E., Tra, J., Michael, C. W., et al. (2003) Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. *J. Biol. Chem.* **278**, 7607–7616.
82. Ciocca DR, Calderwood SK: Heat shock proteins in cancers: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 2005, **10**:86-103.

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

83. Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurtner, D. and Buchner, J. (2005) *Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. Nat Struct Mol Biol*, **12**, 842-846
84. Steffi Oesterreich, Chye-Ning Weng, Ming Qiu, Susan G. Hilsenbeck, C. Kent Osborne, and Suzanne A. W. Fuqua (1993) The Small Heat Shock Protein hsp27 Is Correlated with Growth and Drug Resistance in Human Breast Cancer Cell Lines *Cancer Res*, **53**, 4443-4448.
85. Basha E, O'Neill H, Vierling E. (2012) Small heat shock proteins and α -crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends Biochem Sci.*, **37**(3), 106-117.
86. Jäättelä, M. Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. *Int. J. Cancer*. 1995. **60**, 689–693.
87. Rohde, M. *et al.* Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Dev*. 2005. **19**, 570–582.
88. Davidoff AM, Iglehart JD, Marks JR. Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70 complexes in breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992. **89**:3439–42.
89. Sims JD, McCready J, Jay DG. Extracellular heat shock protein (Hsp)70 and Hsp90 α assist in matrix metalloproteinase-2 activation and breast cancer cell migration and invasion. *PLoS ONE*. 2011. **6**:e18848.
90. Sherman M, Multhoff G. (2007) Heat shock proteins in cancer. *Ann N Y Acad Sci.*, **1113**, 192-201
91. Renu Wadhwa, Kazunari Taira, and Sunil C. Kaul (2002) An Hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/PBP74/Grp75: what, when, and where? *Cell Stress Chaperones.*, **7**(3), 309-316.
92. Hanahan D & Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000. **100**: 57-70.
93. Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, Yimlamai D, Unger C, Zehetmeier C, Lain B, Torella C, et al. Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 α in cancer cell invasiveness. *Nat Cell Biol* 2004 **6**: 507-514.
94. Sidera K, Samiotaki M, Yfanti E, Panayotou G and Patsavoudi E: Involvement of cell surface HSP90 in cell migration reveals a novel role in the developing nervous system. *J Biol Chem* 279: 45379-45388, 2004.
95. Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohaszka, Z. and Nardai, G. (1998) The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther*, **79**, 129-168.
96. Whitesell, L. and Lindquist, S.L. (2005) HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer*, **5**, 761-772
97. Multhoff, G., Botzler, C., Wiesnet, M., Muller, E., Meier, T., Wilmanns, W., Issels, R. D. (1995) A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int. J. Cancer* **61**, 272–279.
98. Pilla, L., Squarcina, P., Coppa, J., Mazzaferro, V., Huber, V., Pende, D., Maccalli, C., Sovena, G., Mariani, L., Castelli, C., et al. (2005) Natural killer and NK-like T-cell

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

- activation in colorectal carcinoma patients treated with autologous tumor-derived heat shock protein 96. *Cancer Res.* **65**, 3942–3949.
99. Suto, R., Srivastava, P. K. (1995) A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* **269**, 1585–1588.
100. Janetzki, S., Palla, D., Rosenhauer, V., Lochs, H., Lewis, J. J., Srivastava, P. K. (2000) Immunization of cancer patients with autologous cancer-derived heat shock protein gp96 preparations: a pilot study. *Int. J. Cancer* **88**, 232–238.
101. Stangl, S., Wortmann, A., Guertler, U., Multhoff, G. Control of metastasized pancreatic carcinomas in SCID/beige mice with human IL-2/TKD-activated NK cells. *J. Immunol.* In press.
102. Krause, S. W., Gastpar, R., Andreesen, R., Gross, C., Ullrich, H., Thonigs, G., Pfister, K., Multhoff, G. (2004) Treatment of colon and lung cancer patients with ex vivo heat shock protein 70-peptide-activated, autologous natural killer cells: a clinical phase I trial. *Clin. Cancer Res.* **10**, 3699–3707.
103. Neckers, L., Ivy, S. P. (2003) Heat shock protein 90. *Curr. Opin. Oncol.* **15**, 419–424.
104. Calderwood, S. K., Khaleque, M. A., Sawyer, D. B., Ciocca, D. R. (2006) Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 164–172.
105. Kamal, A., Thao, L., Sensintaffar, J., Zhang, L., Boehm, M. F., Fritz, L. C., Burrows, F. J. (2003) A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* **425**, 407–410.
106. Workman, P. (2004) Altered states: selectively drugging the Hsp90 cancer chaperone. *Trends Mol. Med.* **10**, 47–51.
107. Banerji, U., Walton, M., Raynaud, F., Grimshaw, R., Kelland, L., Valenti, M., Judson, I., Workman, P. (2005) Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships for the heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitor 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin in human ovarian cancer xenograft models. *Clin. Cancer Res.* **11**, 7023–7032.
108. Gurbuxani, S., Schmitt, E., Cande, C., Parcellier, A., Hammann, A., Daugas, E., Kouranti, I., Spahr, C., Pance, A., Kroemer, G., et al. (2003) Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene* **22**, 6669–6678.
109. Zhao, Z. G., Shen, W. L. (2005) Heat shock protein 70 antisense oligonucleotide inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cell line SGC-7901. *World J. Gastroenterol.* **11**, 73–78.
110. Schmitt, E., Parcellier, A., Gurbuxani, S., Cande, C., Hammann, A., Morales, M. C., Hunt, C. R., Dix, D. J., Kroemer, R. T., Giordanetto, F., et al. (2003) Chemosensitization by a non-apoptogenic heat shock protein 70-binding apoptosis-inducing factor mutant. *Cancer Res.* **63**, 8233–8240.
111. Rocchi, P., So, A., Kojima, S., Signaevsky, M., Beraldi, E., Fazli, L., Hurtado-Coll, A., Yamanaka, K., Gleave, M. (2004) Heat shock protein 27 increases after androgen ablation and plays a cytoprotective role in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* **64**, 6595–6602.
112. Tamura A, Yamazaki Y, Hayashi D, Suzuki K, Sentani K, Yasui W, Tsukita S. Claudin-based paracellular proton barrier in the stomach. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1258:108–14.
113. Turksen K, Troy T. Junctions gone bad: Claudins and loss of the barrier in cancer *Biochimica and Biophysica Acta*. 2011. 1816:73-79
114. Dhawan, P., Singh, A. B., Deane, N. G., No, Y., Shiou, S. R., Schmidt, C., Neff, J., Washington, M. K. and Beauchamp, R. D. (2005) Claudin-1 regulates cellular transformation and

“Evaluación de las proteínas de choque térmico en células de adenocarcinoma gástrico humano transfectadas con claudinas”

- metastatic behavior in colon cancer. *J. Clin. Invest.* 115, 1765– 1776. Arabzadeh, A., Troy, T. C. and Turksen, K. (2006) Role of the cldn6 cytoplasmic tail domain in membrane targeting and epidermal differentiation in vivo. *Mol. Cell Biol.* 26, 5876–87.
115. McCready J, Sims JD, Chan D, Jay DG (2010) Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. *BMC Cancer* 10: 294.
116. Lee, L. Wu, C. Wang, C. et al. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in gastric cancer and their relation to claudin-4 expression. *Histol Histopathology.* 23 (5): 515-21.
117. Sims J. McReady J. Jay D. Extracellular heat shock protein (Hsp)70 and Hsp90 α assist in matrix metalloproteinase-2 activation and breast cancer cell migration and invasion. *Plos one.* 2011. 6:18848
118. Murphy M. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis.* 2013. 00: 1-8
119. Parcellier A., Schmith E., Brunet M. et al. Small heat shock proteins HSP27 and α B-crystallin: cytoprotective and oncogenic functions. *Antioxidants and REDOX signaling.* 2005. 7: 3-4.
120. Murphy, G. and Gavrilovic, J. (1999) Proteolysis and cell migration : creating a path? *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 614±621
121. Ip YC, Cheung ST, Lee YT, Ho JC, Fan ST. Inhibition of hepatocellular carcinoma invasion by suppression of Claudin-10 in HLE cells. *Mol Cancer Ther.* 2007;6:858-2867.
122. Ip YC, Cheung ST, Lee YT, Ho JC, Fan ST. Inhibition of hepatocellular carcinoma invasion by suppression of Claudin-10 in HLE cells. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6:858-2867.
123. Xu L., S. Chen & R.C. Bergan. 2006. MAPKAPK2 and HSP27 are downstream effectors of p38MAPkinase-mediated matrix metalloproteinase type 2 activation and cell invasion in human prostate cancer. *Oncogene* 25: 2987–2998.