



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Efecto de iRNAs específicos para Claudinas en células  
epiteliales**

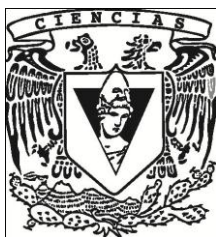
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**Jane Eyre Azucena Nieto Landaverde**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dra. Erika Patricia Rendón Huerta  
México D.F. 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.

1. Datos del alumno

Nieto  
Landaverde  
Jane Eyre Azucena  
5539230663  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
305193889

2. Datos del tutor

Dra.  
Erika Patricia  
Rendón  
Huerta

3. Datos del sinodal 1

Dr.  
Luis Felipe  
Montaño  
Estrada

4. Datos del sinodal 2

Dr.  
Víctor Manuel  
Valdés  
López

5. Datos del sinodal 3

Dra.  
Claudia  
Charles  
Niño

6. Datos del sinodal 4

M. en C.  
Suri Karina  
Martínez  
Yee

7. Datos del trabajo escrito

Efecto de iRNAs específicos para Claudinas en células epiteliales  
48 p.  
2015

Este trabajo fue realizado con el apoyo del PAPIIT  
IN210813 y del CONACYT No. 177678

## Agradecimientos

A mi familia por siempre apoyarme y ser pacientes por lo largo que se tornó este proyecto. Ceci, Sara, Jorge, papá y mamá, los amo.

A la Dra. Erika Rendón y el Dr. Luis Felipe Montaña por ser un gran ejemplo en mi vida, por siempre apoyarme y ser más que unos jefes, por darme las mejores herramientas para ser un científico. Sus enseñanzas van más allá de lo profesional. Los quiero mucho.

A mis amigos Elena Bustos, Aura Flores, Silvia Morales, Leticia Bonilla, Erendira Rojas, Valeria Buendía, Laura Pastrana, Luis Alberto Salazar por ser parte de mi vida y haber contribuido de diversas formas a finalizar este proyecto, por siempre apoyarme e incentivarme; y estar ahí en situaciones de fracaso y de logro y sobre todo por siempre inspirarme a luchar por conseguir lo que quiero, dado que ustedes son un buen ejemplo de ello.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Ana Torres, Monserrat Carrera, Berenice Salas, Antonio Paz, Christian Chavarría, Yamile Fattel, Jazmin Espinosa, Cecilia Moreno, Rosalba Pacheco, Prisila Torres y José Francisco Gallardo, por ser una gran familia y equipo de trabajo, compartir momentos muy gratos de arduo trabajo y chacoteo y compartir lo que más queremos que es la ciencia, pero además la música. Samantha Rivera, Paola Andrade, les tengo un agradecimiento especial por haberme enseñado lo primordial cuando llegué al laboratorio.

Vale la pena agradecer también a los grandes maestros que tuve durante la carrera, por haber dejado una gran huella en mi, no solo profesional si no personal. Gracias Laura Calvillo Canadell y Oswaldo Núñez, por ser más unas grandes personas y enseñar con pasión lo que amamos más en esta vida: la Biología.

## Contenido

INTRODUCCIÓN.....	7
Historia del RNA de interferencia .....	8
Biogénesis y mecanismo de acción de los miRNA, siRNAs y shRNAs.....	9
Regulación de la expresión de claudinas por iRNAs .....	13
Papel de las uniones estrechas en los epitelios .....	14
Estructura y función de las Claudinas.....	18
Las Claudinas en eventos cancerígenos .....	19
Características de las isoformas de claudinas -1, -2 y -7 y su participación en distintos tipos de Cáncer.....	21
Uso de iRNAs de interferencia para el estudio de la función de Claudinas y su participación en procesos cancerígenos.....	22
OBJETIVO.....	23
OBJETIVOS PARTICULARES .....	23
HIPÓTESIS .....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Cultivo celular.....	24
Selección de secuencias para la expresión de shRNAs de claudinas. ....	24
Alineamiento y ligación de secuencias de claudinas-1, -2, -6, -7, -9 y -10 de humano y cerdo al vector de clonación pSIREN-RetroQ para la expresión de shRNA. ....	25
Clonación de shRNAs para Claudinas -1, -2, -6, -7, -9 y -10 en la cepa DH5 $\alpha$ de <i>Escherichiacoli</i> . ....	27
Transfección de shRNA para Claudinas -1 y -2 en células LLC-PK <sub>1</sub> y -1, -2 y -7 en células AGS. ....	28
Medición de resistencia eléctrica transepitelial (TEER). ....	29
Extracción de proteína e Inmunorélicas tipo Western.....	30
Ensayo de migración (BD).....	33
Análisis estadísticos. ....	34
RESULTADOS .....	34
Obtención de shRNAs para claudinas-1, -2, -6, -7, -9 y -10.....	34
Efecto del silenciamiento de las claudinas -1 y -2 sobre la función de barrera en células LLC-PK <sub>1</sub> . ....	36
Efecto del silenciamiento de las claudinas -1, -2 y -7 sobre la capacidad invasiva de células AGS. ....	38

DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES .....	45
BIBLIOGRAFÍA.....	45

## INTRODUCCIÓN

Además de los tres tipos de RNA que se conocen comúnmente, el RNA ribosomal, el RNA de transferencia y el RNA mensajero, existen otros tipos de RNA que regulan la expresión genética a nivel postranscripcional, estos se denominan RNAs de interferencia (iRNA) y son un grupo de moléculas de RNA de ~20 – 30 nucleótidos (nt) de longitud que están conservadas evolutivamente y ampliamente distribuidas en eucariontes.(Wilson and Doudna 2013).

Los iRNAs regulan la expresión de genes codificantes para proteína, en mamíferos, participan en la regulación de genes involucrados en el desarrollo embrionario y también participan como supresores o promotores de tumores en procesos cancerígenos. En humanos los miRNAs representan el 5% del genoma y están encargados de regular el 30% de los genes que lo conforman (Wilson and Doudna 2013). y 60% de los genes codificantes de proteínas (Bartel DP 2009). Además, protegen el genoma, impidiendo la expresión de material genético extraño como transposones y material genético viral, los cuales pueden originar RNA aberrante o RNA de doble cadena (dsRNA). La manera en que los iRNAs llevan a cabo esto es por medio de su unión a un mRNA homólogo inhibiendo que este se traduzca a proteína; o reconociendo y uniéndose a moléculas de RNA viral o transposones impidiendo su expresión.

Existen varios tipos de iRNAs y de acuerdo a su origen y función se agrupan en *small interference RNA (siRNAs)* y *microRNAs (miRNAs)*. Dentro del grupo de los siRNAs, existe un subtipo de iRNAs llamados *small hairpin RNAs (shRNAs)*. Los microRNAs son iRNAs endógenos y se originan de un RNA de cadena sencilla, mientras que los siRNAs y shRNAs, son exógenos a la célula y se originan a partir de un RNA de doble cadena.



## Historia del RNA de interferencia

El estudio de estas moléculas comienza con el descubrimiento de miRNAs involucrados en el desarrollo de *Caenorhabditis elegans*. Victor Ambros y sus colaboradores, Rosalind Lee y Rhonda Feinbaum describen el gen *lin-4*, implicado en la regulación del desarrollo larval de *C. elegans*, observando que este gen no codifica para una proteína si no que genera un par de RNAs pequeños. Uno de ellos de ~22 nt y otro de ~61 nt de longitud. Estos investigadores, determinaron que el RNA de 61 nt forma una estructura tallo-asa y que es precursor de la molécula de RNA 22 nt. Posteriormente, tanto en el laboratorio de Ambros como en el de Gary Ruvkun (otro investigador del tema) observan que estos RNAs además, son complementarios a múltiples sitios del extremo 3' UTR del gen *lin-14*, el cual también está implicado en el desarrollo de *C.elegans*.

El grupo de investigación de Ruvkun buscó la importancia de este hecho, descubriendo que el gen *lin-14* estaba regulado por el *lin-4*, al observar una notable disminución del mRNA del gen *lin-14*, así como del producto proteico, para que las divisiones celulares de la primera etapa del desarrollo larval cesen y se de paso a la segunda etapa del desarrollo de *C.elegans*. Además de ello, describen la manera en que *lin-4* regula la expresión de *lin-14*: *lin-4* se une a la región 3' UTR del RNA mensajero del gen *lin-14* para reprimir la traducción de tal mensajero.(Bartel, 2004).

Posterior al descubrimiento y descripción del miRNA *lin-4*, se identificó un segundo miRNA llamado *let-7*, el cual promueve la transición de estadio larval tardío a estadio adulto de *C. elegans* (Reinhart et al., 2000; Slack et al., 2000). Este miRNA no sólo es expresado en *C. elegans*, es un miRNA homólogo en todos los animales con simetría bilateral y también tiene un papel importante en el desarrollo. Para 2001, decenas de miRNAs fueron descubiertos empleando

técnicas de clonación (Lagos-Quintana et al. 2001, Lau et al. 2001, Lee & Ambros 2001). Actualmente, se tienen bases de datos con información sobre la actividad de una gran cantidad de miRNAs en animales y diversas especies de plantas, con el fin de investigar los procesos fisiológicos específicos.

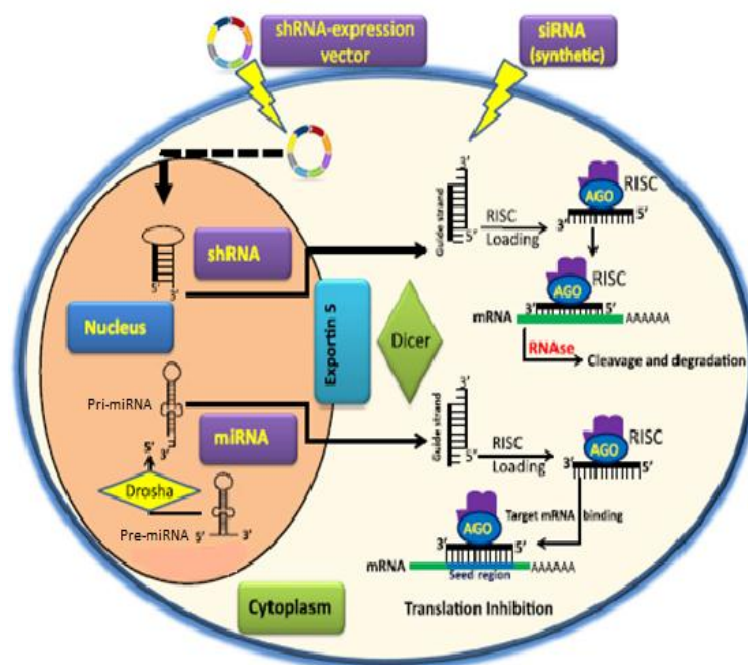
### Biogénesis y mecanismo de acción de los miRNA, siRNAs y shRNAs

Los miRNAs, siRNAs y shRNAs tienen un origen y mecanismo de acción específico. Los miRNAs provienen directamente del genoma del organismo y son sintetizados a partir de un precursor de RNA de cadena sencilla, que forma estructuras tallo-asa. Tanto los siRNAs y los shRNAs tienen su origen a partir de precursores de RNA de doble cadena. Los siRNAs pueden ser endógenos o exógenos a la célula, provenientes de material genético viral u originados por técnicas de Biología Molecular. Los shRNAs son iRNAs sintéticos y exógenos a la célula que se acoplan a un vector de clonación para lograr su expresión constitutiva en las células. (Fig. 1)

La síntesis de un miRNA comienza con la transcripción de un pre-miRNA, el cual tiene una longitud de hasta 1,000 nt, presentando varias estructuras tallo-asa a lo largo de su estructura, además de prolongaciones (*overhangs*) en sus extremos 5' y 3'. Posteriormente, este pre-miRNA es cortado por DROSHA, una enzima que pertenece a la familia de las RNAsas tipo III. En este corte también interviene una proteína llamada Región Crítica del Gen 8 del Síndrome de DiGeorge (DGCR8), la cual contiene dos dominios de unión a RNA de doble cadena (dsRBDs). DGCR8 se une al tallo del pre-miRNA y así DROSHA puede posicionarse y llevar a cabo el corte de ~11 pb a partir de donde se unió la enzima, resultando un miRNA precursor (pre-miRNA) de ~65 - 70 nt que es transportado hacia el citoplasma por medio de una proteína acoplada a la membrana nuclear, llamada Exportina 5.

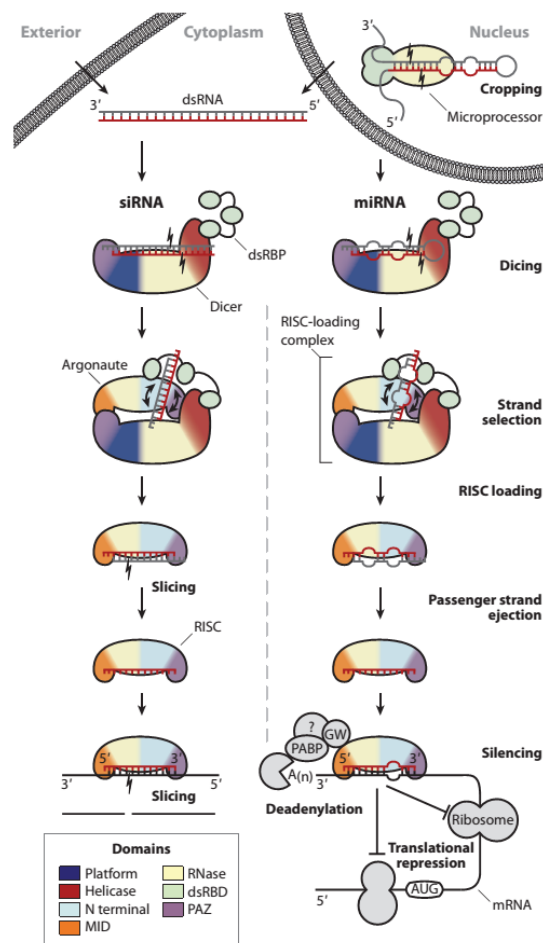
Los shRNAs, se encuentran acoplados a un vector de clonación y son introducidos a la célula mediante técnicas de transfección. Una vez que llega al núcleo se integra al material genético y es procesado para obtener un RNA de doble cadena (dsRNA por sus siglas en inglés) que al igual que el pre-miRNA es transportado al citoplasma, siendo en este punto donde convergen ambas vías de procesamiento de estos iRNAs.

Tanto el pre-miRNA como el dsRNA son escindidos por DICER, una enzima endorribonucleasa que presenta un dominio con actividad de helicasa y un par de dominios con actividad de RNasa tipo III. Con este corte se obtienen fragmentos de 21– 25 nt que se unirán al mRNA blanco, inhibiendo su traducción con ayuda de una proteína llamada Argonauta. DICER y Argonauta forman parte de un complejo proteico llamado: complejo de silenciamiento de RNA o RISC (por sus siglas en inglés) que como su nombre lo indica efectúa el proceso de silenciamiento del mRNA blanco (Fig. 1).



**Fig. 1. Biosíntesis y mecanismo de acción de miRNAs, siRNAs y shRNAs.** Los shRNAs se acoplan a un vector de clonación que se integra al genoma de la célula para expresar un dsRNA. Los miRNAs son moléculas endógenas y, al igual que los shRNA, tienen precursores de doble cadena de RNA llamados pri-miRNA, los cuales son cortados por DROSHA para generar un pre-miRNA. Este pre-miRNA y el dsRNA migran al citoplasma a través de una proteína Exportina 5, donde son cortados por Dicer, adquiriendo un tamaño de 20-30 nt. Posteriormente se unen al Complejo de Silenciamiento de RNA (RISC), conformado por la proteína Argonauta (AGO) la cual reconoce los siRNAs y estos reconocen su mRNA homólogo inhibiendo su expresión, ya sea directamente por AGO o siendo liberado y degradado por la maquinaria celular. (Singh, Narang, and Mahato 2011)

Los dsRNAs originados del corte efectuado por DICER presentan una prolongación (*overhang*) ubicada en cada extremo 3', y un grupo fosfato ubicado hacia los extremos 5' que sirven como sitios de reconocimiento para el dominio PAZ de las proteínas Argonautas. El nombre de este dominio deriva de su presencia en las proteínas, PIWI, Argonauta y Zwiille, representantes de diferentes subfamilias de las proteínas Argonautas (Figura 2).



**Fig.2. Procesamiento de un siRNA y/o shRNA y un miRNA.** Estos iRNAs son reconocidos por DICER y unidos a ella por medio de una proteína de reconocimiento de RNA de doble cadena (dsRBD). DICER corta el iRNA y lo transfiere a una proteína Argonauta, la cual forma parte de RISC y es en este complejo proteico donde se lleva a cabo la unión al mRNA correspondiente, proceso llamado "slicing" para finalmente reprimir su traducción. (Wilson and Doudna 2013)

La actividad de silenciamiento es llevada a cabo solamente por una de las cadenas del dsRNA, la cual se denomina cadena guía, mientras que la que no lleva a cabo actividad interferente se llama cadena pasajera, misma que es escindida del complejo de silenciamiento y degradada por la maquinaria de la célula. En el caso de los miRNAs, la cadena que lleva a cabo el silenciamiento del mRNA blanco se denomina miRNA y la cadena opuesta miRNA\*.

La selección de la cadena guía o del miRNA, no es una elección azarosa, se sabe que depende de propiedades intrínsecas de la molécula, es decir que desde su biogénesis ya se sabe cual de las dos cadenas llevará a cabo la función interferente. También depende de la estabilidad del extremo 5', lo cual favorecerá la unión con el mRNA correspondiente. Se ha observado que la cadena elegida presenta una base uracilo en la posición 1 del iRNA. En el caso de los miRNAs es una cuestión evolutiva, pues si se eligiera el miRNA\* silenciaría un mRNA incorrecto.(Czech & Hannon, 2011)

Para el caso de un shRNA y su mRNA blanco existe una perfecta complementariedad de bases entre uno y otro, mientras que un miRNA puede no tener absoluta complementariedad con su mRNA blanco. Una vez que esta unión se origina, RISC lleva a cabo la represión traduccional del mRNA blanco. La proteína Argonauta 2 (Ago2) es la única proteína de esta familia, exclusivamente expresada en humanos, que tiene actividad catalítica, por lo que puede degradar directamente el mRNA blanco. De no expresarse Ago 2, el mRNA blanco se desadenila para ser degradado por la célula, sin embargo, hasta ahora no se cuenta con información sobre el proceso desencadenado para la degradación de este mRNA.

## Regulación de la expresión de claudinas por iRNAs

Los avances en la descripción de los procesos celulares en que están regulados por los iRNAs han llevado a ser aplicados en la investigación de las funciones de diversas proteínas. En el presente trabajo se empleó esta técnica con el fin de observar los cambios que ocurren al silenciar Claudina -1 y -2, respecto a la participación de estas en el transporte paracelular de iones en los epitelios, y si la capacidad invasiva de células cancerosas disminuye al silenciarse Claudina-1, -2 y -7, dado que es sabido que la función de las uniones estrechas, uniones celulares que participan en mantener la integridad de los epitelios, se ve alterada al existir una desregulación de la expresión de claudinas.

Se sabe que la desregulación en la expresión de claudinas provoca daños importantes en la funcionalidad de los epitelios y esto influye en procesos tumorales. Además de otros procesos de regulación genética, la regulación por medio de miRNAs también se ha estudiado en la expresión de Claudinas, por ejemplo, la desregulación a la baja de miR-874, disminuye la expresión de Claudina-1, lo que provoca un aumento en la permeabilidad del epitelio intestinal (Zhi X. et al. 2014). Wenxing Qin et al. demuestran que el incremento de miR-155 induce una desregulación a la baja de Claudina-1 en células de cáncer de ovario (Quin W. et al. 2013).

Las Claudinas son una de las más importantes proteínas que conforman las uniones estrechas, la desregulación de ellas provoca una total alteración de estas uniones lo que conlleva a un gran número de condiciones patológicas, como trastornos renales, enfermedad inflamatoria intestinal, edema pulmonar diarrea y varios tipos de cáncer. De tal manera es que el estudio de las causas de esta

desregulación es de vital importancia con el fin de proponer nuevas herramientas terapéuticas y de diagnóstico.

Las patologías relacionadas con alteraciones en la expresión de Claudinas que cada vez más se asocian de igual forma con la desregulación de miRNAs que regulan la expresión de estas proteínas. Es por ello que ha habido un auge en el estudio de iRNAs como blancos terapéuticos en diversas enfermedades y respecto a aquellas en que las Claudinas tienen una participación importante hay un campo de estudio y aplicación importante.

### **Papel de las uniones estrechas en los epitelios**

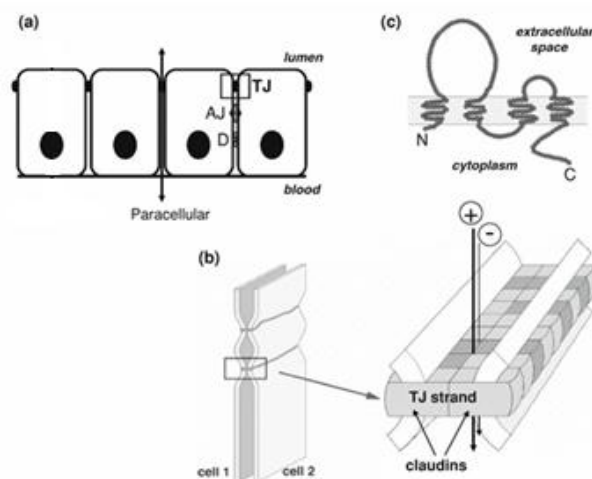
Los epitelios son un conjunto de células unidas entre sí de manera paralela formando láminas que recubren cavidades corporales y órganos conformando superficies externas en organismos multicelulares (Günzel & Yu, 2013). Estos funcionan como barreras químicas y físicas, por ejemplo: el epitelio gastrointestinal, además de regular el paso de agua, iones y solutos (barrera química), bloquea el paso a microorganismos hacia el lumen intestinal (barrera física). De esta manera es como se diferencian los distintos microambientes de las cavidades corporales y los mantienen en homeostasis.

Los endotelios también son una lámina de células unidas paralelamente pero son encontradas generalmente en la superficie interna de vasos sanguíneos y linfáticos que constituyen el sistema circulatorio. Su función es separar la pared de los vasos de la sangre o linfa circulante en el lumen.

La unión de epitelios y endotelios se da por cuatro tipos de uniones celulares: uniones estrechas (UEs), uniones adherentes, desmosomas y uniones GAP. Las uniones estrechas se encargan de sellar el espacio intercelular generando una barrera semipermeable que restringe el transporte paracelular de iones y

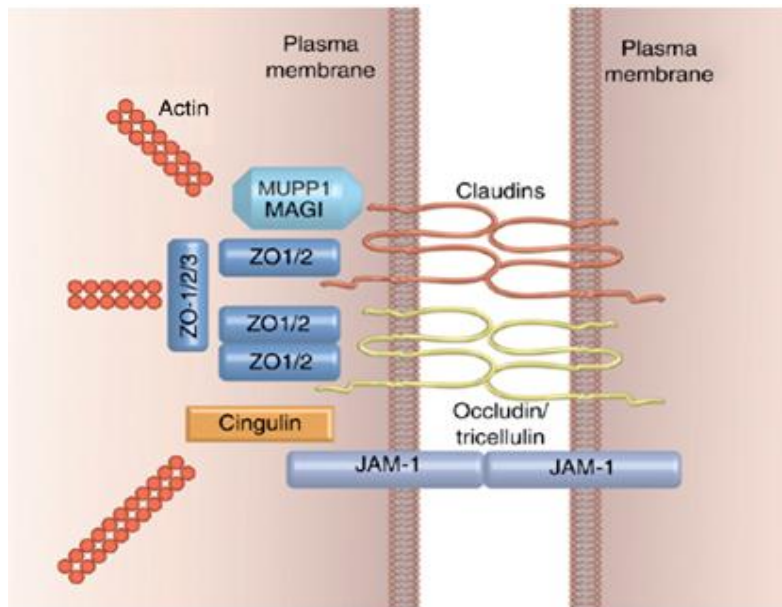
moléculas. Las uniones adherentes y los desmosomas permiten la polarización de las células y brindan soporte entre las uniones al interactuar con proteínas de citoesqueleto. Finalmente, las uniones gap forman canales entre célula y célula que permiten el paso de moléculas como metabolitos, segundos mensajeros, iones y otras moléculas menores a 1 kDa (Figura 3).

Las uniones estrechas se ubican generalmente en la parte más apical de los epitelios (Figura 3a), ayudando a la diferenciación apico-basal de estos. Con ello se modula el intercambio de solutos, iones y agua al generarse un gradiente electroquímico. Estas uniones se originan con la conexión de una red de proteínas, que además son la encargadas del transporte paracelular. Estas proteínas pertenecen a la familia de las tetraspaninas, por presentar 4 dominios transmembranales y entre estas se encuentran: Claudinas, Ocludinas, Tricelulina y proteínas de adhesión (JAM, *Junction Adhesion Molecules*) (Figura 4).



**Fig. 3\_Ubicación de las uniones estrechas (TJ) en los epitelios y endotelios. (a)** Las TJs, se ubican hacia la parte más apical del epitelio, sobre las uniones adherentes (AJ) y los desmosomas (D). El transporte de iones por la vía paracelular está regulada por las TJs. **(b)** Puntos de contacto (*kissingpoints*) entre membranas de células adyacentes en los que se muestra la localización de las claudinas. **(c)** Estructura de las claudinas en la membrana plasmática—mostrando la localización extracelular de las dos asas extracelulares, sus cuatro dominios transmembranales y sus extremos amino y carboxilo terminal citoplasmáticos. (Shigeaki, 2012))





**Fig. 4. Proteínas que conforman las uniones estrechas.** Las proteínas más comunes que conforman las uniones estrechas son las Claudinas, que podemos apreciar en la parte más apical; posteriormente las Ocludinas y finalmente las JAM (*Junctional Adhesión Molecules*) orientadas hacia la parte basal de las células. Como se ve en la figura, las Claudinas interaccionan con proteínas adaptadoras como ZO (*Zonula Occludens*) y MUPP1; a su vez, estas se unen a actina, participando de esta manera en procesos de remodelación del citoesqueleto (Niessen 2007)

Inicialmente, Tsukita y colaboradores, describen en 1993 a las ocludinas como proteínas asociadas a las uniones estrechas. Las ocludinas, son proteínas de aproximadamente 65 kDa, presentan cuatro dominios transmembranales, dos asas extracelulares y un carboxilo terminal orientado hacia el citoplasma de las células. Se sabe que la sobre-expresión de estas proteínas afecta significativamente la resistencia eléctrica transepitelial (TEER), así como la permeabilidad paracelular, concluyendo con ello que las ocludinas participan en la función de barrera de las uniones estrechas. Sin embargo, cuando células madre a las que se les ha bloqueado la expresión de ocludinas, se diferencian a células epiteliales, son capaces de formar uniones estrechas bien definidas, apoyando con ello la idea de que las ocludinas no son exclusivamente necesarias para la formación de las uniones estrechas (Shigeaki, 2012).

En 1998 Tsukita y colaboradores reportan la identificación de dos nuevas proteínas integrales de membrana de 22 kDa, que se localizan en las uniones

estrechas, las cuales se nombraron como Claudina-1 y -2. Cuando se transfectó DNA complementario (cDNA) que codifica para estas claudinas en fibroblastos, los cuales carecen de uniones estrechas, estos fueron capaces de formar estas uniones. Con esto se concluyó que las Claudinas son necesarias y suficientes para la formación de las uniones estrechas y están directamente involucradas en la formación de la barrera primaria para la difusión de solutos por la vía paracelular (Shigeaki, 2012).

Las Claudinas son expresadas en vertebrados e invertebrados tunicados. Hasta el momento, se han descrito 27 genes distintos de Claudinas en mamíferos, 26 de las cuales se expresan constitutivamente en humanos y Claudina-13 sólo es expresada en roedores. En peces, se expresan 56 isoformas de Claudinas, lo cual se atribuye a un mecanismo evolutivo desarrollado por estos organismos para adaptarse a las fluctuaciones de salinidad en su hábitat.

Las diversas isoformas de Claudinas se expresan diferencialmente en todos los tipos de epitelios contribuyendo de manera integral a la función de los mismos y en general a modular las funciones de los órganos. Se sabe que las Claudinas tienen dos funciones principales, la de formadora de poros y la de barrera y cada una se atribuye a una isoforma distinta. Claudina-1 funciona como proteína de barrera, es decir que contribuye a la fuerza de unión entre las células que conforman el epitelio; mientras que Claudina-2 es una proteína capaz de formar poros, su expresión hace más o menos lábil la unión de una célula con otra y modula el intercambio iónico.

A pesar de que cada una de las isoformas de Claudinas presenta una función específica, siempre se debe tener en cuenta que finalmente la funcionalidad de un tejido está modulada por la interacción de varias isoformas. Esta interacción puede ser de dos maneras, polimerizando de manera lineal a lo largo de la membrana plasmática de una misma célula para formar multímeros

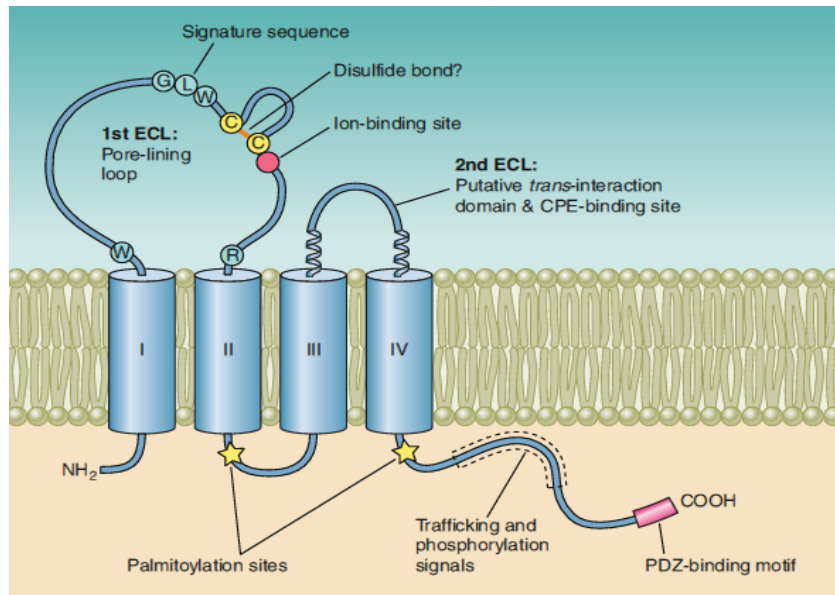
("side to side") o uniéndose una Claudina de una célula con la Claudina de la célula adyacente ("head to head") (Susanne & Alan, 2007). Estos multímeros pueden estar estructurados por la misma isoforma de Claudina, lo que se denomina interacciones homofílicas o heterofílicas cuando los multímeros están constituidos por distintas isoformas de Claudinas. Se ha demostrado por medios de transferencia de energía de resonancia fluorescente, que puede haber más de seis monómeros interactuando para formar dichos multímeros.

### Estructura y función de las Claudinas

Como se mencionó previamente, las Claudinas (Cldn) son una familia de proteínas integrales de membrana que forman parte de las uniones estrechas de epitelios y endotelios. Se consideran proteínas formadoras de poros y funcionan también como barrera selectiva al paso de iones regulando de esta manera, la permeabilidad de epitelios y endotelios. El nombre "Claudina" deriva del latín *claudere* que significa "cerca" (Shigeaki, 2012) obteniendo este nombre por su presencia en las uniones estrechas.

Las claudinas expresadas en humanos, poseen de 207 a 305 aminoácidos adquiriendo aproximadamente un peso molecular de 21-34 kDa. La estructura general de las Claudinas consiste de un extremo amino intracelular que a excepción de las Claudinas-5, -16 y -25, es muy corto; un extremo carboxilo intracelular que presenta un dominio PDZ, el cual es un motivo de unión para proteínas de andamiaje o adaptadoras, mismas que participan en procesos de señalización intracelulares. Las Cldn tienen cuatro dominios transmembranales con configuración de alfa-hélices, lo cual ayuda a su interacción con la membrana celular; dos asas extracelulares, una más pequeña que la otra, donde la más grande se denomina asa extracelular 1 (ECL, por sus siglas en inglés "*extracellular loop*" 1) y la más pequeña, asa extracelular 2 (ECL 2). El ECL1 es el que da a las claudinas la propiedad de ser formadoras de poros, presenta un puente disulfuro

que interviene en el transporte selectivo de iones. Esta asa, además presenta una secuencia de aminoácidos muy conservada (*signature secuencia*), que da identidad a las claudinas (Günzel and Yu 2013). Por otro lado, el ECL2 es el encargado de que se lleve a cabo la interacción con otras claudinas, ya sea entre isoformas iguales o entre isoformas distintas (Figura 5).



**Figura 5. Estructura general de las claudinas.** Las Claudinas tienen cuatro dominios transmembranales; dos asas extracelulares, una más pequeña que la otra, donde la más grande se denomina asa extracelular 1 (ECL, por sus siglas en inglés “extracelular loop” 1) y la más pequeña, asa extracelular 2 (ECL 2). El ECL1 es el que da a las claudinas la propiedad de ser formadoras de poros, presenta un puente disulfuro que interviene en el transporte selectivo de iones. Esta asa, además presenta una secuencia de aminoácidos muy conservada (*signature secuencia*) que da identidad a las claudinas. Por otro lado, el ECL2 es el encargado de que se lleve a cabo la interacción con otras claudinas, ya sea entre isoformas iguales (uniones homotípicas) o entre isoformas distintas (uniones heterotípicas). Además, este loop presenta sitios de reconocimiento que permiten la entrada de *Clostridium perfringens*. Las Claudinas presentan también sitios de palmitoilación involucrados en el transporte de las claudinas hacia la membrana plasmática, además de un motivo de fosforilación y finalmente un dominio PDZ en el extremo carboxilo terminal que sirve como sitio de unión para proteínas de andamiaje o adaptadoras, lo que ayuda a que las claudinas participen en procesos de señalización a nivel intracelular. (Günzel and Yu 2013).

## Las Claudinas en eventos cancerígenos

La desregulación de la expresión de claudinas, se refiere a una alteración respecto al patrón de expresión de estas proteínas. Esto puede ocurrir de diferentes maneras, ya sea que el nivel de expresión de una Claudina aumente o disminuya, incluso, estas proteínas pueden deslocalizarse de la membrana

plasmática y observarse en citoplasma. Esta desregulación se observa en diversas patologías, entre ellas el cáncer y es inducida por diferentes causas, por eventos epigenéticos o alteraciones directas hacia los genes de Claudinas.

Las claudinas son capaces de interactuar con moléculas adaptadoras mediante el dominio PDZ localizado en el extremo carboxilo de las claudinas, esta interacción induce cascadas de señalización que activan receptores nucleares involucrados en la expresión de claudinas tales como el receptor de ácido retinoico (RAR) que induce la expresión de Cldn-1, 3 y -4; el receptor de andrógenos que induce la expresión de Cldn-1 y -3 entre otros (Ichikawa, N. et al. 2011)

Otro de los procesos involucrados en la sobre-expresión de claudinas es mediante su hipermetilación, vista en diferentes tipos de Cáncer, por ejemplo en tumores de cáncer de vesícula, existe una hipermetilación de motivos CpG, que al ser tratados con inhibidor de metil-transferasa, se restaura la expresión de Cldn-4. Esto ejemplifica la diversidad de procesos que regulan la expresión de claudias y cómo estas participan en procesos cancerígenos.

En la línea celular de adenocarcinoma gástrico humano (AGS), la sobre-expresión de Cldn-6, -7 y -9 incrementa el potencial de migración e invasividad, así como la capacidad de proliferación de estas células cancerosas (Zavala-Zendejas, VE et al. 2006). Dicha capacidad de migración está inducida por la activación de metaloproteasas de matriz (MMP) que al haber una sobre-expresión de Claudinas estas enzimas son activadas. En células AGS, Cldn-4, la cual participa en procesos de metástasis de cáncer gástrico, se encuentra sobre-expresada y además está relacionada con la sobre-expresión de MMP-2 y -9 (Hwang TL. et al. 2013), y en estudios previos del laboratorio, se ha observado algo similar, la sobre- expresión de Cldn-6 y 9, está correlacionada con la sobre-expresión de MMP-2 y -9, en estudios hechos en esta misma línea celular.

La manera en que las claudinas intervienen en el proceso de invasividad es de igual manera a como lo hacen durante el desarrollo embrionario, donde hay una pérdida de la adhesión celular y la adquisición de la capacidad de migración

de las células, ello ocurre mediante la activación de Snail que se une de manera directa a los promotores de *claudina-1*, -3 y -4 y reprime la activación del gen induciendo la transición epitelio- mesénquimo que en cáncer se denomina metástasis.

Otra de las claudinas asociadas a cáncer gástrico, es Cldn-1, ésta se ve sobre-regulada en este tipo de cáncer y está asociada a un mal pronóstico en pacientes con esta enfermedad (Eftang et al. 2013). La sobre-regulación de Cldn-3 y -4 está implicada en cáncer de ovario, de páncreas, mamario, gástrico, prostático y uterino. (Kwon 2013).

Como estas, existen innumerables evidencias de la participación de Claudinas en procesos cancerígenos, lo cual da una pauta a la importancia de seguir investigando estas proteínas y, en el futuro, poder utilizarlas como blancos terapéuticos y de diagnóstico en cáncer y otras enfermedades.

#### **Características de las isoformas de claudinas -1, -2 y -7 y su participación en distintos tipos de Cáncer.**

***Claudina-1.*** Una de las claudinas más estudiadas, debido a que es expresada prácticamente en todos los tejidos del cuerpo. Es considerada como una Claudina de barrera, pues su sobre-expresión provoca un incremento de la TEER. Cldn-1 es expresada en la piel, donde pueden ser destacadas sus propiedades al contribuir de manera significativa a la protección en cuanto a la pérdida de agua de la piel. Al ser una claudina formadora de barrera, impide la pérdida de humedad de la piel y la protege de la resequedad (Günzel and Yu 2013). Existen varios padecimientos en humanos relacionados con mutaciones o pérdida de la función de Cldn -1 como lo son: colangitis esclerosante neonatal asociada a ictiosis, en dónde la producción de bilis disminuye o es ausente. En cáncer, Cldn-1 funciona como supresor de tumores o promotor, de acuerdo al tipo de cáncer (por ejemplo, en carcinoma gástrico) y está correlacionada con la diferenciación, invasividad y metástasis (Wu, YL et al, 2008).

**Claudina-2.** Esta isoforma de Claudina se encuentra en aquellos epitelios con múltiples poros mediante los cuales se lleva a cabo el intercambio de iones y moléculas a través de las uniones estrechas de los epitelios, tales como el túbulo proximal del riñón y el que se encuentra en las criptas intestinales. Se ha demostrado que en las líneas celulares epiteliales MDCK I (*Mardin-Darby canine kidney*), MDCK C-7 y LLC-PK<sub>1</sub> (*porcine kidney proximal tubule cell line*), Claudina-2 disminuye la TEER aumentando la permeabilidad a iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> (Furuse et al. 1998; Van Itallie et al. 2008; Hou et al. 2006). La sobre-regulación de Cldn-2 está implicada en el cáncer esofágico, de colon, pulmón, mama y próstata (Ding et al. 2013).

**Claudina-7.** Esta isoforma se expresa en una amplia variedad de tejidos epiteliales. Dado que se ha reportado tanto como proteína que transporta cationes como de transporte de aniones, hasta el momento su función es controversial respecto a la selectividad de iones, sin embargo, se sabe que la expresión de esta proteína incrementa la TEER en los tejidos que la expresan (Günzel and Yu 2013). La sobre-expresión de Cldn-7 está implicada en diversos tipos de cáncer como cáncer gástrico, de mama, de ovario, entre muchos otros (Ding et al. 2013).

### Uso de iRNAs de interferencia para el estudio de la función de Claudinas y su participación en procesos cancerígenos.

Desde el descubrimiento de los iRNAs, además de estudiar los procesos celulares que regulan, se han empleado para investigar la función de distintas proteínas. En este aspecto, los iRNAs han cobrado un papel muy importante, dado que ayudan a complementar este tipo de estudios que antes se realizaban usando técnicas de sobre-expresión de proteínas. El estudio de las Claudinas mediante iRNAs de interferencia, ha traído importantes avances en la investigación de estas proteínas, pues como lo hace la sobre-expresión de estas proteínas, la desregulación a la baja conlleva al desarrollo de diversas patologías. Un ejemplo es el cáncer de mama invasivo, próstata y cáncer esofágico, donde Cldn-1 y Cldn-

7, están desreguladas a la baja (Kwon 2013). Además de existir estudios donde se observan que tal regulación a la baja se encuentra inducida por miRNAs

Existen una gran cantidad de microRNAs que participan en procesos cancerígenos, funcionando como supresores o como promotores de tumores. El miR-1303 se encuentra sobre-expresado en tejidos con cáncer gástrico y en líneas celulares derivadas de este tipo de cáncer. Esta sobre-expresión promueve una disminución de la expresión de Claudina-18, asociándose esto a un aumento de la proliferación celular, así como a un aumento de la capacidad de migración e invasividad de estas células cancerígenas (Zhang, SJ et al, 2014).

Con base en lo anterior y debido a que se ha identificado que la sobreexpresión de algunas claudinas promueve el potencial invasivo de las células, resulta importante encontrar o generar miRNAs específicos contra estas claudinas, que ayuden a la identificación de blancos moleculares para su posterior utilización en los métodos de diagnóstico.

## OBJETIVO

- Generar iRNAs específicos para claudinas y evaluar sus efectos en una línea epitelial normal y una tumoral.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Generar shRNAs para las claudinas-1, -2, -6, -7, -9 y -10.
- Identificar los efectos del silenciamiento de las claudinas -1 y -2, mediante la utilización de shRNAs, sobre la función de barrera en células de epitelio de riñón de cerdo (LLC-PK<sub>1</sub>).
- Identificar los efectos del silenciamiento de las claudinas -1, -2 y -7, mediante la utilización de shRNAs, sobre la capacidad invasiva de células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS).



## HIPÓTESIS

Si disminuye la expresión de las claudinas en los epitelios, entonces se alterará la función de barrera de los mismos, provocando una desregulación del flujo paracelular de iones, así como una disminución en la capacidad invasiva de células cancerígenas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo celular.

Debido a que los ensayos de función epitelial están basados en las características morfológicas de las células, las líneas celulares utilizadas en este estudio fueron: células epiteliales de riñón de cerdo (LLC-PK<sub>1</sub>), las cuales forman monocapas con uniones estrechas bien establecidas, y células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS), las cuales forman monocapas pero se ha reportado que no forman uniones estrechas funcionales. Ambas líneas celulares se mantuvieron en cajas Petri (p-100) a 37°C de temperatura, en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>, utilizando medio líquido  $\alpha$ -MEM para las células LLC-PK<sub>1</sub> y D-MEM para las células AGS. El medio de cultivo  $\alpha$ -MEM fue suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM de glutamina y 100 U/ml de penicilina-estreptomicina. El medio de cultivo D-MEM fue suplementado con 10% de SFB, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina-estreptomicina 1 mg/ml de insulina y 2 mM de piruvato de sodio.

### Selección de secuencias para la expresión de shRNAs de claudinas.

Las secuencias de cDNA empleadas para la expresión de los shRNAs de claudinas de origen porcino y humano fueron obtenidas del banco de genes de PubMed para posteriormente obtener las secuencias de shRNA por medio del

programa: *CLONTECH shRNA Sequence Designer*. Se diseñaron las secuencias correspondientes para Claudina -1, -2, -6, -7, -9 y -10 de humano (*Homo sapiens*) y cerdo (*Sus scrofa*). Dichas secuencias se presentan en la siguiente tabla:

Secuencias	<i>Sus scrofa</i>
<b>Cldn-1a</b>	5'-gatccGCTTCGACTCCTTGCTGAATTTCAAGAGAATTCAGCAAGGAGTCAAGTTTTTTACGCGTg-----3'
<b>Cldn-1b</b>	5'-aattcACGCGTAAAAAAGTTCGACTCCTTGCTGAATTTCTTGAATTCAGCAAGGAGTCAAGCg-----3'
<b>Cldn-2a</b>	5'-gatccGCTCCAACCTGTAGGCTACATTCAAGAGATGTAGCCTACAAGTTGGAGTTTTTTACGCGTg-----3'
<b>Cldn-2b</b>	5'-aattcACGCGTAAAAAAGTTCGACTCCTTGCTGAATTTCTTGAATGTAGCCTACAAGTTGGAGCg-----3'
<b>Cldn-6a</b>	5'-gatccGCCATCATCCAGGACTTCTATTCAAGAGATAGAAGTCTGGATGATGGTTTTTTACGCGTg-----3'
<b>Cldn-6b</b>	5'-aattcACGCGTAAAAAAGCATCATCCAGGACTTCTATCTTGAATAGAAGTCTGGATGATGGCg-----3'
<b>Cldn-7a</b>	5'-gatccGTCCCCACAAACGTGAAGTATTCAGAGATACCTCACGTTTGTGGGGATTTTTTTACGCGTg-----3'
<b>Cldn-7b</b>	5'-aattcACGCGTAAAAAATCCCCACAAACGTGAAGTATCTTGAATACTTCACGTTTGTGGGGACg-----3'
<b>Cldn-9a</b>	5'-gatccGTGGACAAGAGGGACTATGTTTCAAGAGAACATAGTCCCTCTTGTCCATTTTTTTACGCGTg-----3'
<b>Cldn-9b</b>	5'-aattcACGCGTAAAAAATGGACAAGAGGGACTATGTTCTCTTGAACATAGTCCCTCTTGTCCACg-----3'
<b>Cldn-10a</b>	5'-gatccGACTTATGATTGCCGCTGTTTCAAGAGAACAGCGGCAATCATAAGTCTTTTTTTACGCGTg-----3'
<b>Cldn-10b</b>	5'-aattcACGCGTAAAAAAGACTTATGATTGCCGCTGTTCTCTTGAACAGCGGCAATCATAAGTCg-----3'
	<b><i>Homo sapiens</i></b>
<b>Cldn-1a</b>	5'-gatccGCTGGGAGTGATAGCAATCTTTCAAGAGAAGATTGCTATCACTCCCAGTTTTTTACGCGTg-3'
<b>Cldn-1b</b>	5'-aattcACGCGTAAAAAAGTGGGAGTGATAGCAATCTTCTCTTGAAGATTGCTATCACTCCCAGCg-3'
<b>Cldn-2a</b>	5'-gatccGTGACATCCAGTGCAATCTTTCAAGAGAAGATTGCACTGGATGTCACTTTTTTACGCGTg-3'
<b>Cldn-2b</b>	5'-aattcACGCGTAAAAAAGTGACATCCAGTGCAATCTTCTCTTGAAGATTGCACTGGATGTCACg-3'
<b>Cldn-6a</b>	5'-gatccGCTGGGATTGTCTTTGTCATTTCAAGAGAATGACAAAGACAATCCCAGTTTTTTACGCGTg-3'
<b>Cldn-6b</b>	5'-aattcACGCGTAAAAAAGTGGGATTGTCTTTGTCATTCTCTTGAAGTGAACAAAGACAATCCCAGCg-3'
<b>Cldn-7a</b>	5'-gatccAGTGAAGAAGGCCGTATATTCAAGAGATATACGGCCTTCTTCACTTTTTTTACGCGTg-3'
<b>Cldn-7b</b>	5'-aattcACGCGTAAAAAAGTGAAGAAGGCCGTATATCTCTTGAATATACGGCCTTCTTCACTg-3'
<b>Cldn-9a</b>	5'-gatccGCCATCATCCAGGACTTCTATTCAAGAGATAGAAGTCTGGATGATGGTTTTTTACGCGTg-3'
<b>Cldn-9b</b>	5'-aattcACGCGTAAAAAAGCATCATCCAGGACTTCTATCTTGAATAGAAGTCTGGATGATGGCg-3'
<b>Cldn-10a</b>	5'-gatccGTGCTCAATGACTGGATGTTTTCAAGAGAACATCCAGTCATTGAGCATTTTTTTTACGCGTg-3'
<b>Cldn-10b</b>	5'-aattcACGCGTAAAAAATGCTCAATGACTGGATGTTCTCTTGAACATCCAGTCATTGAGCACg-3'

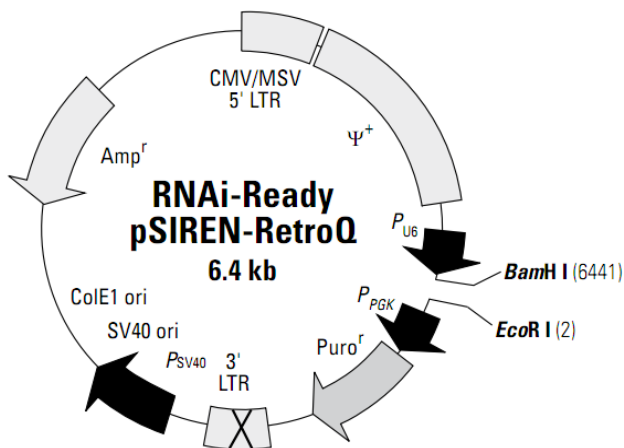
**Alineamiento y ligación de secuencias de claudinas-1, -2, -6, -7, -9 y -10 de humano y cerdo al vector de clonación pSIREN-RetroQ para la expresión de shRNA.**

El vector pSIREN-RetroQ, es un vector retroviral que cuenta con características que lo hacen idóneo para la expresión de shRNAs. Además de

presentar el promotor U6 humano, que promueve la expresión constitutiva de shRNAs, cuenta con el promotor para la enzima fosfogliceratocinasa (PGK), que se utiliza con frecuencia en la construcción de vectores, pues tal enzima es vital en el metabolismo de la levaduras y se ha usado en vectores de clonación para aumentar la cantidad de copias del plásmido de forma significativa. El vector tiene un sitio de origen de replicación para bacterias llamado *ColE1 ori* el cuál se origina de un plásmido de bacterias llamado ColE 1 que expresa el gen de la colicina, una bacteriotoxina producida por algunas cepas de *E. coli* y tóxica para otras cepas de esta misma bacteria, de tal manera que el plásmido pSIREN-RetroQ provee de inmunidad a esta toxina y cuando es clonado en bacterias no se interfiere con su replicación. Dicho vector también presenta el sitio de replicación SV40 (Simian Virus 40) y su respectivo promotor  $P_{SV40}$  el cual mantiene a la célula en una infección latente por tal virus y con ello expresa constitutivamente el gen acoplado al vector pSIREN-RetroQ.

Una vez diseñadas las secuencias de oligonucleótidos, se enviaron para su síntesis. Las secuencias *forward* y *reverse* (a y b, respectivamente, según la tabla anterior) de cada claudina se diluyeron por separado a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  para después mezclarlos en proporción 1:1, obteniendo teóricamente una concentración de 50  $\mu\text{M}$  de cada una en solución. Con el fin de eliminar estructuras secundarias que pudieran afectar la expresión del shRNA, la mezcla de oligonucleótidos se sometió a los siguientes ciclos de temperatura: 95°C durante 30 s, 72°C durante 2 min. 37°C durante 2 min. y 25°C durante 2 min.

Una vez obtenidos los oligos, se alinearon y se ligaron al vector de clonación pSIREN-RetroQ (Figura 6), por medio de la enzima ligasa T4 (Kappabiosystems).



**Fig. 6. Mapa de restricción y clonación del vector retroviral pSIREN-RetroQ.** Los sitios de restricción *BamH* I y *EcoR* I son los sitios en los que se introdujeron las secuencias específicas para la expresión de los shRNAs de cada claudina, mismas que también cuentan con estos sitios específicos de unión al vector. El vector cuenta con el gen de resistencia a la Ampicilina para la selección de bacterias; y a la Puomicina, para efectuar la selección de transfectantes estables. Para llevarse a cabo la expresión de los shRNAs el vector presenta el promotor de origen humano U6 (P<sub>U6</sub>); el promotor P<sub>PGK</sub>, que es el promotor de la enzima fosfogliceratocinasa (PGK) en levaduras y el promotor P<sub>SV40</sub>. Los sitios de origen de replicación ColE1 ori y SV40 ori para bacterias y células humanas respectivamente promueven la expresión constitutiva de la información genética acoplada en el vector.

Para realizar la ligación se mezclaron los siguientes reactivos: 2 µl vector linealizado (25 ng/ µl), 1 µl del oligo alineado diluído (0.5 µM), 0.5 µl de BSA (10 mg/ml), 9.5 µl de agua inyectable y 1 µl de T4 DNA ligasa (5 U/ µl). La mezcla se incubó durante 3 h a temperatura ambiente.

### Clonación de shRNAs para Claudinas -1, -2, -6, -7, -9 y -10 en la cepa DH5α de *Escherichiacoli*.

La cepa DH5α de *Escherichia coli* fue tratada para hacerla competente y transformarla para la expresión de los shRNA de claudinas -1, -2, -6, -7, -9 y -10 de cerdo y humano. De la mezcla de ligación (vector con el inserto) se tomaron 2 µl y se agregaron a 48 µl de una suspensión de DH5 α *E. coli* contenidos en un microtubo. Se incubó por 5 min en hielo, después de lo cual se calentó en baño maría a 42°C durante 30 segundos y posteriormente se incubó de nuevo en hielo por 2 min. Se agregaron 250 µl de medio de cultivo SOB (*Super Optimal Broth*) y se incubó a 37° durante 1 hr. a 250 rpm. De esta solución se tomaron 30 µl y se plaquearon en cajas de petri con medio LB (*Luria-Bertani medium*) y ampicilina a 100 µg/ml. Después de incubarse durante 48 h a 37°C se seleccionaron de 3-5 colonias que se sembraron en 5 ml de medio líquido LB-ampicilina (100 µg/ml) para obtener suficiente cantidad de copias de DNA. Para la obtención de los plásmidos, se utilizó el kit de extracción de plásmidos mini-prep

(Kappabiosystems). Se cuantificó la cantidad de DNA extraído y se verificó la presencia de la secuencia insertada usando la enzima de restricción Mlu-II.

### Transfección de shRNA para Claudinas -1 y -2 en células LLC-PK<sub>1</sub> y -1, -2 y -7 en células AGS.

Para evaluar el efecto de cada uno de los shRNAs, cada vector se transfectó en las líneas celulares LLC-PK<sub>1</sub> y AGS. Para eso, se sembraron  $2 \times 10^5$  células AGS y  $4 \times 10^5$  células LLC-PK<sub>1</sub> en placas de seis pozos con 3 ml de medio de cultivo D-MEM para las células AGS y  $\alpha$ -MEM para las células LLC-PK<sub>1</sub> con los suplementos específicos antes mencionados y se incubaron hasta obtener un 80% de confluencia.

La transfección se llevó a cabo utilizando Lipofectamina 2000, modificando algunas de las especificaciones del fabricante (Invitrogen) dado que se observó que las condiciones sugeridas sensibilizaban a las células y morían a los pocos días de ser transfectadas.

Para determinar las condiciones específicas de transfección de cada tipo celular, se realizaron transfecciones con diferentes concentraciones de DNA plasmídico, empleando 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5 y 1.75  $\mu\text{g}$  e incubando 6 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente las células se crecieron en medios de selección (medio con 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de puromicina para las células LLC-PK<sub>1</sub> y 0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para las células AGS) y las células obtenidas se lisaron para analizar, mediante Western blot, con qué concentración del vector se obtenía una mayor disminución en la expresión de cada claudina. Las concentraciones óptimas de DNA plasmídico para obtener transfectantes fueron de 0.5 y 1.0  $\mu\text{g}$  de DNA para las células LLC-PK<sub>1</sub> y de 1.25 y 1.5  $\mu\text{g}$  de DNA para las células AGS.

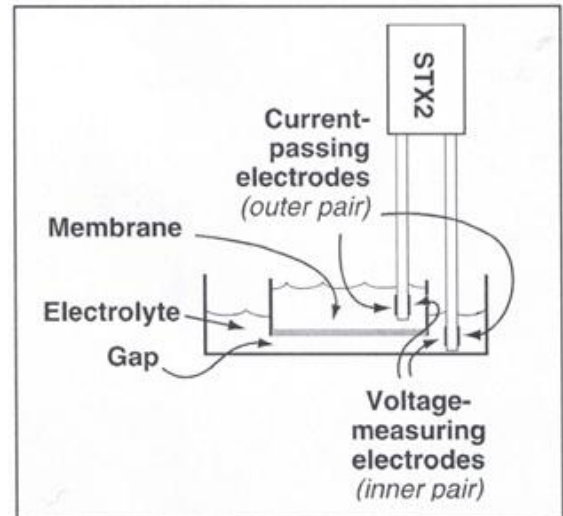
Dado que a bajas concentraciones de puromicina las células wild type (WT) podían crecer, se realizaron pruebas de transfección utilizando diferentes concentraciones de puromicina, usando de 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  - 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . La concentración de puromicina que causó la muerte de las células WT a los cinco días fue la que se usó para seleccionarlas después de ser transfectadas. Así, se determinó que la concentración de puromicina óptima para la selección de las células LLC-PK<sub>1</sub> fue de 1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y para seleccionar las células AGS de 0.3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . La selección de las células transfectadas se llevó a cabo por cuatro pasajes y las células se guardaron a -70°C para su procesamiento posterior.

### **Medición de resistencia eléctrica transepitelial (TEER).**

El parámetro fisiológico de resistencia transepitelial fue evaluado en las células LLC-PK<sub>1</sub> ya que éstas forman uniones estrechas estables. Para las mediciones de TEER se utilizaron insertos transwell (Corning) de 0.4  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro que se colocan en cajas de 6 pozos las cuales permiten la diferenciación entre un ambiente basal y uno apical, tal como se encuentra un epitelio en condiciones fisiológicas. Para ello, se sembraron  $7 \times 10^5$  células LLC-PK<sub>1</sub> transfectadas y no transfectadas y 24 horas después se cambió el medio realizando 2 lavados con PBS en los insertos que contenían a las células confluentes. Para esto, primero se succionó el medio del pozo y posteriormente el del inserto, agregando el PBS primero en el inserto y después en el pozo. Esto es con el fin de que la presión del líquido en el pozo no desprenda las células en el inserto. Posteriormente se agregaron 2.6 ml de medio de cultivo en el pozo y 1.5 ml en el inserto y se incubaron durante 5 días a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.



**Fig. 7.** Voltmetro EVOM, World Precision Instruments, Inc.



**Fig. 8.** El voltímetro cuenta con un par de electrodos, uno que se introduce en el inserto (donde se encuentran las células) y otro en el pozo de la placa, lo cual permite medir el potencial o voltaje que hay en ambos lados generado por el intercambio de iones. Al aplicar una corriente eléctrica se obtiene el valor de resistencia transepitelial dado por el epitelio, evaluando su integridad y su capacidad para regular el paso de iones.

El día de la medición (quinto día), se cambió el medio de cultivo y se incubó durante 1 h para permitir que el cultivo se estabilizara y no hubiera ninguna variación en las mediciones. Para obtener los valores de TEER se utilizó el Voltmetro EVOM (WorldPrecision Instruments, Inc.) (Fig.7), del cual se introdujo un electrodo en el inserto y el otro electrodo en la placa (como se muestra en la Fig.8) y se aplicó la corriente correspondiente para obtener los valores de Resistencia Transepitelial dada en Ohms. Se tomaron cuatro mediciones de cada pozo y se realizaron triplicados. Los valores de resistencia obtenidos se reportan como resistencia x área ( $\Omega \text{ cm}^2$ ).

### Extracción de proteína e Inmunoréplicas tipo Western.

Después de cuatro pasajes de las células transfectadas, lo cual se realizó para asegurar la expresión estable de los shRNAs, y una vez que las células

alcanzaron una confluencia del 90-100% fueron lavadas dos veces con PBS, posteriormente se agregó 1mL de amortiguador de Lisis, el cual además contiene inhibidores de proteasas (leupeptina 20  $\mu\text{g/ml}$  e inhibidor de tripsina 1mg/ml) y cocteles de inhibidores de fosfatasa II y III (SIGMA). Con ayuda de un *scraper*, se rasparon las células de la superficie de la caja Petri. La suspensión se retiró de la caja y se colocó en un tubo, se sonico a 20 unidades de amplitud y se centrifugó a 39,000 rpm durante 30 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se separaron 100  $\mu\text{l}$  para determinar la concentración de proteína. Al volumen restante se le agregó amortiguador de Laemli  $\beta$ -mercaptoetanol (al 50% y 5% concentración final respectivamente).

La cuantificación de proteína se realizó mediante el kit de determinación de proteína de BioRad, el cual se basa en el método de Bradford. Para ello se realizó una curva patrón de albúmina con las siguientes diluciones:

**Tabla 1. Diluciones empleadas para la curva patrón de albúmina**

<b>Albúmina (1mg/ml) (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>Agua bidestilada (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>Concentración final (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
0	1000	0
1	999	1
2	998	2
4	996	4
6	994	6
8	992	8
10	990	10
20	980	20
30	970	30
40	960	40
60	940	60
80	920	80

De las alícuotas de proteína se realizó una dilución 1:50. En una placa de 96 pozos se colocaron 80  $\mu\text{l}$  por triplicado de cada muestra, así como también de



las diluciones de la curva patrón, mezclándose con 20  $\mu$ l de reactivo de Bradford. La determinación de proteína se realizó en un lector de ELISA a 595 nm de longitud de onda, realizando el análisis con el programa GEN 5.

Para el análisis de la expresión de las claudinas correspondientes, se realizaron inmunoréplicas tipo Western. Se cargaron 20  $\mu$ g de proteína en geles SDS-PAGE al 15 %, a los cuales se les aplicó 50 mA de corriente por aproximadamente 1 h. Los geles se lavaron con amortiguador de transferencia y se pusieron en contacto con membranas de nitrocelulosa (Bio- Rad) durante 1 h a 120 mA para promover la transferencia de las proteínas. Para verificar la transferencia completa de las proteínas, las membranas se tiñeron con Rojo de Ponceau. Una vez corroborada la transferencia, se lavaron con agua destilada y/o *Tris-Buffered saline* (TBS). Se bloquearon las membranas en una solución al 5% de leche descremada (Bio-Rad) en TBS incubando durante 1 h con agitación suave. Posteriormente se incubaron toda la noche con los anticuerpos primarios disueltos en *Tween 20-Buffered-Saline* (TTBS) a 4°C con agitación suave. Las concentraciones de anticuerpos primarios usadas se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados**

Anticuerpo	Concentración	Marca
<b>Mouse anti- Claudina-1</b>	1 $\mu$ g/ml	Invitrogen
<b>Rabbit anti- Claudina-2</b>	2 $\mu$ g/ml	Invitrogen
<b>Mouse anti- Claudina-7</b>	1 $\mu$ g/ml	Invitrogen
<b>Mouse anti-Actina</b>	2 $\mu$ g/ml	-

Al día siguiente se hicieron tres lavados con TTBS durante 10 min con agitación suave y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa y diluidos en TTBS a las concentraciones mostradas durante 1h (Tabla 3).

**Tabla 3. Anticuerpos secundarios empleados**

Anticuerpo	Concentración	Marca
Goat anti- mouse Ig-G HRP p/Cldn-1	1:5000	Invitrogen
Goat anti- mouse Ig-G HRP p/Cldn-7	1:1000	Invitrogen
Goat anti- mouse Ig-G HRP p/Actina	1:2000	Invitrogen
Goat anti- rabbit Ig-G HRP	1:500	Invitrogen

Se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con TTBS y uno con TBS. Las membranas se incubaron con el kit de quimioluminiscencia *SuperSignal West dura extended duration substrate* (Thermo Scientific/Pierce Protein Research Products) y se expusieron a placas fotográficas (KODAK).

### Ensayo de migración (BD).

Los insertos de matrigel (*Becton Dickinson*) se rehidrataron con 500  $\mu$ l de medio de cultivo D-MEM dejando incubar por 2 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se agregaron 750  $\mu$ l de medio D-MEM suplementado con SFB al 5% en cada pozo de la placa, el cual sirve como quimioatrayente. En estos experimentos solo se utilizó las células AGS ya que las LLC-PK<sub>1</sub> no tienen capacidad invasiva. Para esto, en cada inserto se sembraron 2.5x10<sup>5</sup> células AGS y las placas se incubaron durante 36 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, tiempo en el cual las células migran a través del inserto de matrigel. Las células que no migraron y el matrigel se retiraron suavemente con un hisopo y las células que sí migraron se observaron en la membrana del inserto tiñendo con azul de toluidina al 1% y fijándolas con metanol. Se contaron las células de tres campos distintos de cada inserto y se realizaron triplicados.

## Análisis estadísticos.

Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  error estándar. Para evaluar si las diferencias entre los grupos de estudio fueron significativas se empleó el análisis de T- de Student, con el *Software Graph Pad Prism 5.01* considerando una  $P \leq 0.05$ .

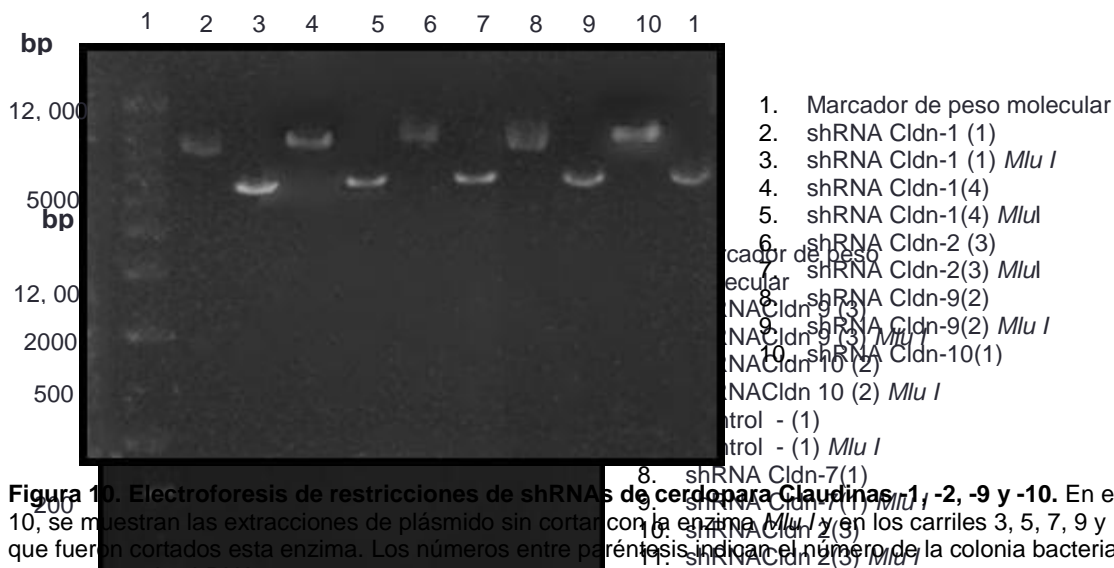
## RESULTADOS

### Obtención de shRNAs para claudinas-1, -2, -6, -7, -9 y -10.

De acuerdo a la metodología previamente descrita para la ligación del inserto con el vector correspondiente, se realizaron diferentes pruebas en las cuales se variaron las concentraciones de vector e inserto. Para cada combinación, se obtuvieron shRNAs específicos para las Claudinas-1, -2, -6, -7, -9 y -10, de origen humano y de cerdo

Con el propósito de generar una herramienta que nos permitiera observar los efectos del *knockdown* de claudinas en células epiteliales, se diseñaron shRNAs específicos para Claudina-1, -2, -6 -7, -9 y -10. Estos se obtuvieron por medio de la transformación genética de la cepa DH5 $\alpha$  de *E.coli*, seleccionándose cinco colonias de cada shRNA para las diferentes claudinas, mismas que fueron enumeradas del 1-5 y se presentan entre paréntesis. Para verificar que las colonias expresaran los shRNAs correspondientes, se realizaron ensayos de restricción con la enzima *Mlu I*, la cual corta en 5'-A▼CGCG T-3' y 3'-T GCGC▲-5',. Las restricciones, tanto para las secuencias de humano como de cerdo, se verificaron posteriormente mediante diferentes electroforesis. Cabe mencionar que de las cinco colonias aisladas no todas expresaban los shRNAs, obteniéndose al menos dos colonias que expresan los shRNAs. En las figuras 9 y 10, se presentan

dos de las diferentes electroforesis realizadas para la verificación de los shRNAs, . La figura 9 es una electroforesis correspondiente a los shRNAs para Claudinas de humano, donde el control-(1) y los shRNAs de Claudina -7(1) y -2(3), son los que se emplearon en la transfección de las células AGS; los demás shRNAs que se muestran en la imagen se utilizarán para otros proyectos del laboratorio. En la figura 10 se presenta una electroforesis de los shRNAs de Claudinas de cerdo, el shRNA de Claudina 1(1) y 2(3), se utilizaron para la transfección de las células LLC-PK<sub>1</sub>.



**Figura 10. Electroforesis de restricciones de shRNAs de cerdo para Claudinas 1, 2, 9 y 10.** En el carril 2, 4, 6, 8 y 10, se muestran las extracciones de plásmido sin cortar con la enzima *Mlu I* y en los carriles 3, 5, 7, 9 y 11 los plásmidos que fueron cortados esta enzima. Los números entre paréntesis indican el número de la colonia bacteriana al que pertenece cada shRNA.

**Figura 9. Electroforesis de restricciones de shRNAs de secuencias de humano para Claudinas -2, -7, -9 y -10.** En los carriles 2, 4, 6, 8 y 10, se muestran las extracciones de plásmido sin digerir con la enzima *Mlu I* y en los carriles 3, 5, 7, 9 y 11 los que fueron cortados con la enzima *Mlu I*. El control negativo es el vector vacío. Los números entre paréntesis indican el número de la colonia bacteriana al que pertenece cada shRNA.

La manera en que se concluyó que el plásmido cuenta con la secuencia que se le ligó, es porque esta última cuenta con sitios específicos de corte para la enzima MLU I, linearizando el DNA, así en el gel de

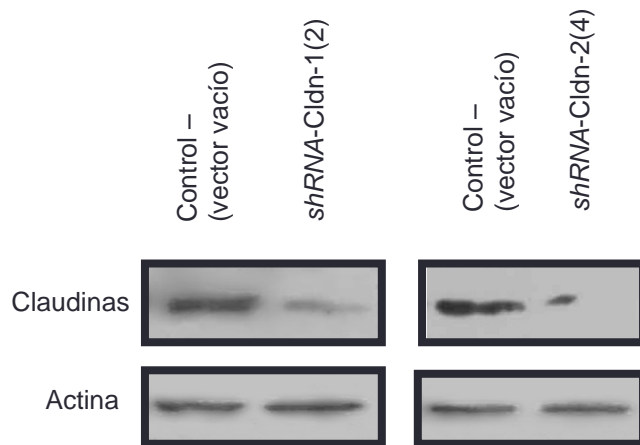
electroforesis se observará que el plásmido migra a una distancia mayor respecto al plásmido que no fue incubado con la enzima MLU I.

### Efecto del silenciamiento de las claudinas -1 y -2 sobre la función de barrera en células LLC-PK<sub>1</sub>.

Las claudinas son proteínas de uniones estrechas que regulan el paso de iones por vía paracelular, de tal manera que al ocurrir un evento que desregule la expresión de las claudinas, se alterará el transporte de iones. La medición de TEER nos permite cuantificar las variaciones en el transporte de iones por vía paracelular cuando ocurren cambios en la expresión de las claudinas, en este caso inducidos por la transfección de shRNAs específicos para Claudina-1 y -2.

Debido a que la línea celular LLC-PK<sub>1</sub> forma monocapas con uniones estrechas funcionales, se utilizó esta línea celular para evaluar la funcionalidad de la barrera epitelial a través de la medición de la resistencia transepitelial.,

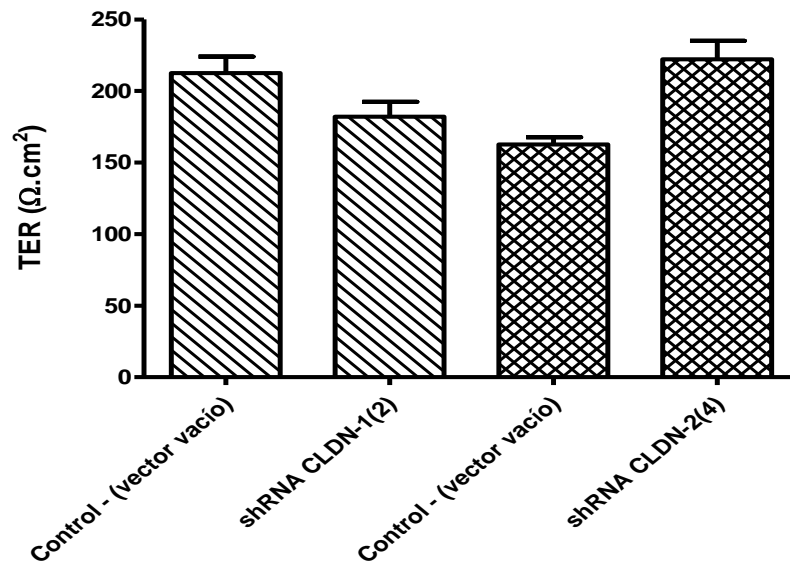
Para evaluar la eficacia de los *shRNAs* generados sobre la expresión y la función de estas claudinas, primero se determinó mediante Western blot si la expresión de estas claudinas disminuía en las células LLC-PK<sub>1</sub> transfectadas con los *shRNAs* para claudina-1 y -2, eligiéndose uno de los shRNA obtenidos. En la figura 11, se observa una disminución significativa en la expresión de dichas claudinas en las células LLC-PK<sub>1</sub> transfectadas con los *shRNAs*. Cabe mencionar que, a diferencia de otros estudios reportados en los que se muestra una disminución del 60 al 70% de proteína utilizando *shRNAs* para claudinas, en nuestro trabajo obtuvimos una disminución de más del 80% para cada una de las claudinas estudiadas.



**Figura 9. Knockdown de la expresión de Claudina-1 y -2 en células LLC-PK<sub>1</sub>.** Western-blots de extractos proteicos de células LLC-PK<sub>1</sub> que expresan una disminución de la expresión de Claudina-1 y -2.

Una vez que se observó que los shRNAs generados fueron capaces de silenciar la expresión de Claudina-1 y -2 en las células LLC-PK<sub>1</sub>, se evaluó el efecto de este silenciamiento sobre la función epitelial dada por la TER. Como se observa en la figura 11, la transfección de células LLC-PK<sub>1</sub> con el *shRNA* para Claudina-1, provocó una disminución de la TER con respecto a la transfección de estas células con el vector vacío; en contraste y de manera esperada, la transfección de células LLC-PK<sub>1</sub> con el *shRNA* para Claudina-2, causó un aumento de la TER con respecto a la transfección de estas células con el vector vacío. Esto demuestra que *knockdown* de las claudinas-1 y -2 se ve reflejado en la alteración de su función con relación al transporte de iones por vía paracelular.

Estas diferencias se deben a las distintas funciones que lleva cabo Claudina-1 y -2; Claudina-1 predominantemente funciona como una proteína de barrera dado que incrementa la TEER; mientras que claudina-2 forma poros en los epitelios, lo que disminuye la TEER, por lo que al silenciarse la expresión de estas dos proteínas se observa lo contrario a su función en condiciones fisiológicas.

**Efecto de la transfección con shRNAs sobre la función de transporte de iones en células LLC-PK1**

**Figura 12.** Efecto del knockdown de Claudina-1 y -2 sobre la TER en células LLC-PK<sub>1</sub>. Mientras que la transfección con shRNA de Claudina-1, provocó una disminución de la TER con respecto a las células transfectadas con el vector vacío, la transfección con shRNA de Claudina-2 generó un aumento en la TER.

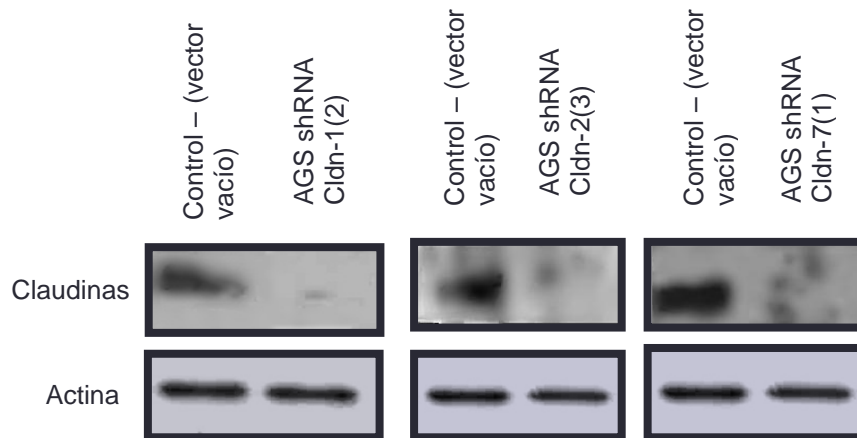
\*P < 0.05 de significancia calculada con la prueba t de Student

**Efecto del silenciamiento de las claudinas -1, -2 y -7 sobre la capacidad invasiva de células AGS.**

En las células cancerígenas existe un proceso de desregulación de la expresión y localización de las claudinas lo que, junto con otros procesos, confiere a dichas células la capacidad de migrar e invadir otros tejidos. Específicamente, se sabe que existe un aumento en la expresión de claudinas cuando las células tumorales invaden un tejido, dado que ello ayuda a la consolidación de uniones estrechas que permitan a estas células establecerse en un órgano específico. Por otro lado, se ha reportado que la sobreexpresión de claudina-6, 7 y 9 promueven eventos de proliferación, migración e invasividad (Zavala-Zendejas VE et al. 2011). Para averiguar si el silenciamiento de Claudina-

1, -2 y -7, mediante shRNAs específicos, disminuía la capacidad invasiva de células AGS, se evaluó el efecto de estos shRNAs sobre la expresión de estas claudinas a nivel de proteína y sobre la capacidad invasiva de esta línea celular.

Los ensayos de Western blot mostraron una inhibición significativa de las tres claudinas evaluadas en las células transfectadas con los shRNAs respectivos en comparación con las células que fueron transfectadas con el vector vacío (Fig. 13). Al igual que para la línea celular LLC-PK<sub>1</sub>, la transfección de células AGS con los *shRNAs* para estas claudinas mostró una disminución de más del 80%.

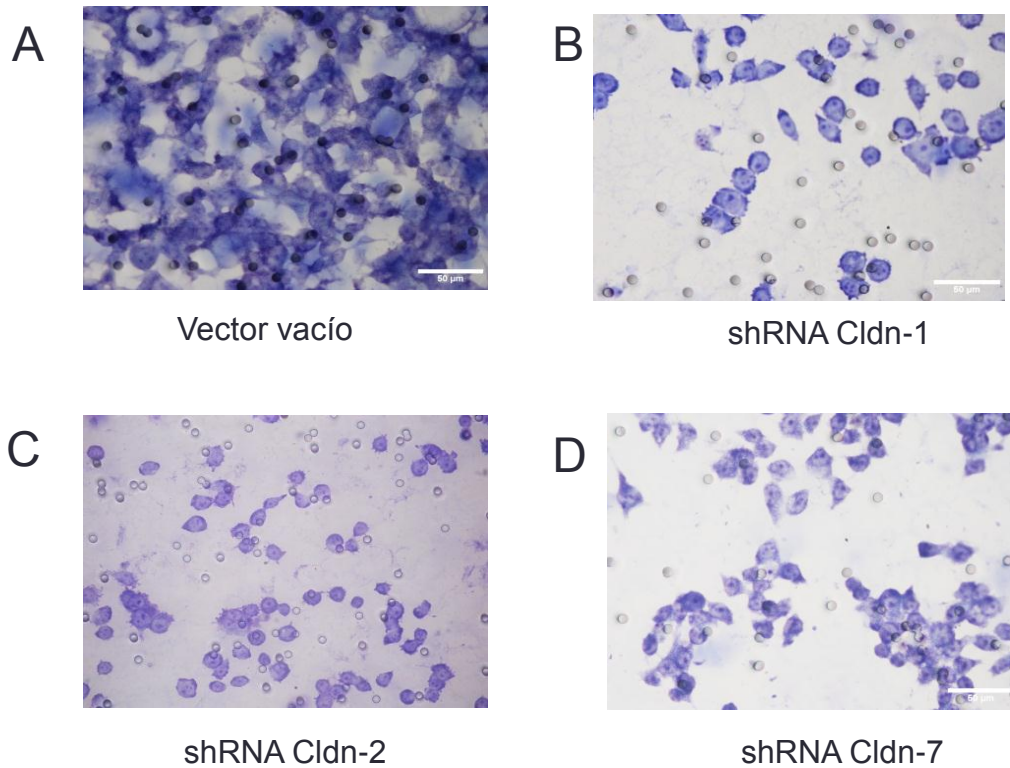


**Figura 12. Knockdown de la expresión de Claudina-1, -2 y -7 en células AGS.** Western-blot de extractos proteicos de células AGS que expresan una disminución de la expresión de Claudina-1, -2 y -7.

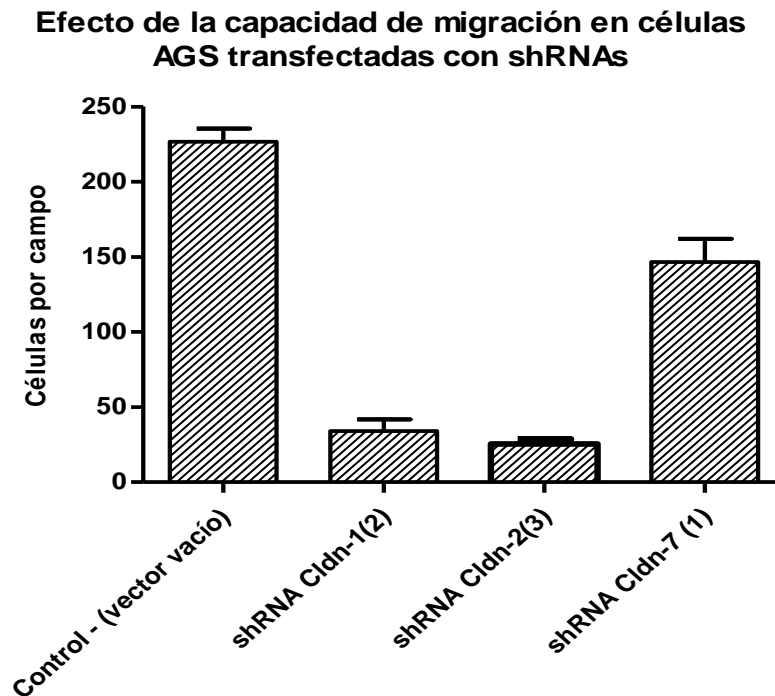
Los resultados obtenidos al evaluar la propiedad de migración de células AGS, mostraron una disminución en distinto grado con cada uno de los *shRNAs* para cada Claudina. En la figura 13 se observan fotografías que se tomaron como parte del ensayo de migración en la que se observa una clara disminución de la capacidad de migración e invasión de las células AGS al ser transfectadas con *shRNAs* para Claudina-1, -2 y -7. El análisis cuantitativo de este ensayo mostró que para las células en las que se silenció a las claudinas-1 y -2, la migración celular disminuyó un 75 % con respecto al control; sin embargo, para las células



en las que se silenció la claudina-7 solo se observó una disminución del 35% en su capacidad de migración (Figura 14).



**Figura 13. Efecto de shRNAs para Claudina-1, -2 y -7 en la capacidad de migración de células AGS.** Células AGS transfectadas con el vector vacío (A); células AGS transfectadas con shRNA para Claudina-1 (B); para Claudina-2 (C); y para Claudina-7 (D).



**Figura14.** Efecto de la expresión de shRNAs para Claudina-1, -2 y -7 en la migración de células AGS. La transfección de las células AGS con shRNAs de Claudina-1, -2 y -7 provoca una disminución diferencial en la capacidad de migración de tales células.\*P < 0.05 de significancia calculada con la prueba t de Student.

## DISCUSIÓN

Existen otros tipos de iRNAs además de los shRNAs como son los siRNAs y miRNAs, en nuestro caso utilizamos shRNAs con el fin de obtener líneas celulares (AGS y LLC-PK<sub>1</sub>) que expresen constitutivamente estas moléculas y mantengan silenciadas las claudinas -1, -2 y -7. El efecto de los siRNAs es transitorio y se utilizan para ver efectos en el silenciamiento de proteínas a corto plazo, pues su actividad perdura de 5-7 días, y además se debe probar al menos tres siRNAs para elegir aquél con mayor capacidad de silenciar la proteína de interés. En relación a los miRNAs, dado que son iRNAs endógenos, su estudio está enfocado a la descripción de los procesos celulares que regulan. Es por ello que de acuerdo a lo que se quiera estudiar es que se elige entre estos tipos de iRNAs,

El uso de shRNAs nos permitió observar cambios en la función de las células LLC-PK<sub>1</sub> en relación al transporte de iones y la capacidad invasiva de las células AGS, lo cual, nos permitió simular una desregulación en la expresión de las claudinas en procesos patológicos, la cual altera las funciones de los epitelios promoviendo el desarrollo de diversas patologías. Esta desregulación, se puede dar de dos maneras, aumentando o disminuyendola expresión de las mismas (desregulación a la alta o a la baja, respectivamente).

Por mucho tiempo, el estudio de las Claudinas se realizó a través de su sobre-expresión mediante técnicas *in-vitro*, que permitieron estudiar lo que ocurre en una desregulación a la alta de claudinas. Con el descubrimiento de los iRNAs, se desarrollaron técnicas moleculares para el silenciamiento específico de proteínas en ensayos *in vitro*, en nuestro caso, de claudinas. Estos estudios han cobrado importancia ya que pueden complementar los hallazgos que se tienen a la fecha sobre las funciones específicas de estas proteínas, pero además observar las funciones epiteliales que se ven afectados cuando ocurre una desregulación a la baja de claudinas.

Las células LLC-PK<sub>1</sub>proviene del túbulo ascendente de riñón de cerdo, esta porción del riñón tiene un papel muy importante en el filtrado de distintas moléculas, como lo son vitaminas, hormonas y péptidos (Nielsen et al. 1998). Esta línea celular es ampliamente utilizada como modelo *in-vitro*, por tratarse de una línea celular normal capaz de formar una monocapa y poder estudiar con ello la función de las claudinas en las uniones estrechas.

En las células LLC-PK<sub>1</sub> está bien documentada la expresión de Claudina-1 y -2. Claudina-1 es una proteína de barrera manteniendo así la integridad del epitelio; mientras que Claudina-2 forma poros en el epitelio que regulan el paso de iones por vía paracelular. Con respecto a los efectos funcionales del *knockdown* de estas claudinas, en células LLC-PK<sub>1</sub> se observó que el silenciamiento de Claudina-1, altera la capacidad de barrera del epitelio. Al disminuir su expresión, disminuye la selectividad en cuanto al transporte de iones, promoviendo la

disminución de la TER. En estas mismas células, se observó que el silenciamiento de Claudina-2 provoca un aumento de la TER, pues el epitelio se vuelve más fuerte y aumenta la capacidad de barrera del mismo, aumentando la TER.

Ahora que se logró la transfección estable de shRNAs para estas dos claudinas sería interesante ahondar en el efecto del *knockdown* respecto a la participación de Claudina -1 y -2 y otras, en distintos procesos celulares como: proliferación, inflamación, infecciones por bacterias, virus y hongos, etc, en células no transformadas como son las LLC-PK<sub>1</sub>, MDCK (Madin-Darvy canine kidney) u otras. Además de que resulta ser un buen recurso para el estudio de las interacciones entre claudinas (homotípicas y heterotípicas) que dan una función específica al tejido que las expresa.

Dado que una de las funciones de las claudinas en células tumorales es su participación en los procesos de migración e invasión, se evaluó la eficacia del silenciamiento de Claudinas-1, -2 y -7 en la capacidad invasiva de células AGS. Se logró generar ~~Los resultados mostraron que~~ la disminución en la expresión de estas proteínas en más del 80% comparada con las células transfectadas con el control negativo. Sin embargo, esta disminución de manera homogénea en las tres claudinas evaluadas no genera, de la misma forma, una disminución en la capacidad invasiva de las células AGS, ello se deriva de las distintas funciones de estas claudinas.

Claudina-2, dado que es formadora de poros en los epitelios, hace que estos últimos sean más permeables; en etapas tempranas del cáncer su expresión favorece el desanclaje de las células y con ello la formación de tumores. Una vez que ello ocurre, de igual manera, la expresión de Claudina-2 favorecerá el paso de factores de crecimiento involucrados en la perpetuación del tumor, así mismo que estas células tumorales, puedan migrar e invadir otros tejidos.

En pacientes con carcinoma gástrico, existe una correlación entre la sobreexpresión de Claudina-7 y la carcinogénesis de esta patología (Jun, KH. et al. 2014), lo cual está relacionado a la capacidad invasiva de las células propias

de este cáncer. En nuestro trabajo, se observa que al silenciar la expresión de cladina -1, -2 y -7 disminuye la capacidad de migración de las células AGS, dado que estas claudinas confieren a las células cancerosas la capacidad de formar uniones estrechas que permitan su establecimiento en nuevos órganos.

Contrastantemente en cáncer de endometrio, se observa una disminución significativa de la expresión de Claudina-7, correlacionada con tumores de estado tardío.(Li, X. et al. 2013), Sin embargo este contraste, se debe a la fase en que se encuentre el cáncer, es decir, en etapas tempranas de formación de un tumor, Claudina-1 y -7 disminuyen desestabilizando las uniones estrechas y las células del epitelio se desanclan del mismo. Por el contrario, en etapas más avanzadas del cáncer, en donde ocurren procesos de invasión, el aumento en la expresión de estas claudinas promueve el establecimiento de las células tumorales en el tejido invadido.

Además, en pacientes con cáncer hepático, se observa, que existe una sobreexpresión de Claudina-1, -4 y -5 y una disminución de la expresión de Claudina-7, considerándose como marcadores diagnósticos positivos para este tipo de cáncer (Bouchagier, KA. et al. 2014). Claudina-4 y -5, al igual que Claudina -1, son proteínas de barrera (Michikawa, H. et al 2008), por tanto, en cáncer hepático, el que disminuya su expresión está relacionado con que las células tumorales puedan desanclarse del tejido y poder invadir otros órganos. Claudina-5 se expresa principalmente en endotelio (Morita, K. et al. 1999) por tanto en vasos sanguíneos, al disminuir su expresión en cáncer, promueve la intravasación y extravasación de células tumorales, favoreciendo procesos invasivos.

Con todo lo anterior, se resalta la importancia de usar shRNAs para simular los procesos involucrados en la progresión de diferentes tipos de cáncer para estudiarlos y proponer nuevos blancos terapéuticos y de diagnóstico, dado que uno de los principales problemas de este padecimiento es que se detecta en fases avanzadas, cuando su cura se dificulta.

Dado que estos tres shRNAs utilizados fueron capaces de silenciar significativamente Claudina-1, -2 y -7, sería interesante continuar con el empleo de los demás shRNAs que se obtuvieron en este trabajo en células LLC-PK<sub>1</sub>, AGS y otras como MDCK (Madin-Darvy canine kidney), MCF-7 (células de cáncer de mama), entre otras; además de medir otras funciones en las que participan las claudinas, como por ejemplo, en la proliferación de células cancerosas y observar lo que ocurre en distintas etapas de la progresión de distintos tipos de cáncer.

## CONCLUSIONES

- Se lograron obtener shRNAs específicos para Claudina-1, -2, -6, -7, -9 y -10.
- Se estandarizó efectivamente la técnica de transfección de shRNAs en células LLC-PK<sub>1</sub> y AGS, por lo que se puede continuar con la obtención de células estables para la expresión de shRNAs de Claudina-6, -9 y -10.
- Se observó que ocurre una disminución de la TER cuando la Claudina-1 se silencia y un aumento de la TER cuando Claudina-2 es silenciada por medio de shRNAs específicos para cada una.
- Se observa una disminución de la capacidad invasiva de las células AGS al transfectarse con shRNA específicos para Claudina-1, -2 y -7

## BIBLIOGRAFÍA

Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136:215–233.

Bouchagier KA, Assimakopoulos SF, Karavias DD, Maroulis I, Tzelepi V, Kalofonos H, Karavias DD, Kardamakis D, Scopa CD, Tsamandas AC. 2014. Expression of Claudins-1, -4, -5, -7 and Occludin in Hepatocellular Carcinoma and their relation with classic clinicopathological features and patients survival. *In vivo*. 28(3): 315-326.

Chan SH, Wang LH. 2015. Regulation of cancer metastasis by microRNAs. *J Biomed Sci*. 2015 Jan 23;22(1):9.

- Ding, Lei, Zhe Lu, Qun Lu, and Yan-Hua Chen. The Claudin Family of Proteins in Human Malignancy: A Clinical Perspective. *Cancer Manag Res.* 2013 Nov 8; 5: 367–75.
- Eftang, Lars L, Ying Esbensen, Tone M Tannæs, Gustav P Blom, Ida R K Bukholm, and Geir Bukholm. 2013. "Up-Regulation of CLDN1 in Gastric Cancer Is Correlated with Reduced Survival." *BMC cancer* 13(1): 586.
- Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol.* 1998;141(7):1539-50.
- Günzel, Dorothee, and Alan S L Yu. 2013. 93 Physiological reviews *Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability.*
- Hwang TL, Changchien TT, Wang CC, Wu CM. Claudin-4 expression in gastric cancer cells enhances the invasion and is associated with the increased level of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression. *Oncol Lett.* 2014 Sep;8(3):1367-1371. Epub 2014 Jun 27
- Ichikawa-Tomikawa N, Sugimoto K, Satohisa S, Nishiura K, Chiba H. Possible involvement of tight junctions, extracellular matrix and nuclear receptors in epithelial differentiation. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011.
- Hou, Jianghui, Antonio S Gomes, David L Paul, and Daniel a Goodenough. 2006. "Study of Claudin Function by RNA Interference." *The Journal of biological chemistry* 281(47): 36117–23.
- Jun KH, Kim JH, Jung JH, Choi HJ, Chin HM. Expression of claudin-7 and loss of claudin-18 correlate with poor prognosis in gastric cancer. *Int J Surg.* 2014; 12(2): 156-62.
- Kwon, Mi Jeong. 2013. Emerging Roles of Claudins in Human Cancer. *International journal of molecular sciences* 14(9): 18148–80.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed rnas. *Science.* 2001; 294(5543): 853-8.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 2001; 294(5543): 858-62.
- Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 2001; 294(5543):862-4.

- Liu, X. Li Y, Qiu H, Wang Y. 2013. Downregulation of claudin-7 potentiates cellular proliferation and invasion in endothelial cancer. *OncolLett.* 2013. 6(1):101-105.
- Michikawa H, Fujita-Yoshigaki J, Sugiyama H. Enhancement of barrier function by overexpression of claudin-4 in tight junctions of submandibular gland cells. *Cell Tissue Res* 334: 255–264, 2008.
- Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* 147: 185–194.
- Nielsen, R, H Birn, S K Moestrup, M Nielsen, P Verroust, and E I Christensen. 1998. "Characterization of a Kidney Proximal Tubule Cell Line, LLC-PK1, Expressing Endocytotic Active Megalin." *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 9(10): 1767–76.
- Niessen, Carien M. 2007. "Tight Junctions/adherens Junctions: Basic Structure and Function." *The Journal of investigative dermatology* 127(11): 2525–32.
- Qin W, Ren Q, Liu T, Huang Y, Wang J. MicroRNA-155 is a novel suppressor of ovarian cancer initiating cells that targets CLDN1. *FEBS Lett* 2013 May 2;587(9):1434–9.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Bettinger, J.C., Pasquinelli, A.E., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The 21 nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901–906.
- Slack, F.J., Basson, M., Liu, Z., Ambros, V., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let 7* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol. Cell.* 5, 659–669.
- Singh, Saurabh, Ajit S Narang, and Ram I Mahato. 2011. "Subcellular Fate and off-Target Effects of siRNA, shRNA, and miRNA." *Pharmaceutical research* 28(12): 2996–3015.
- Van Itallie CM, Holmes J, Bridges A, Gookin JL, Coccaro MR, Proctor W, Colegio OR, Anderson JM. The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 3):298-305.
- Wilson, Ross C, and Jennifer a Doudna. 2013. "Molecular Mechanisms of RNA Interference." *Annual review of biophysics* 42: 217–39.
- Wu YL, Zhang S, Wang GR, Chen YP. Expression transformation of claudin-1 in the process of gastric adenocarcinoma invasion. *World J Gastroenterol.* 2008 ; 14(31):4943-8.



Zavala-Zendejas VE, Torres-Martinez AC, Salas-Morales B, Fortoul TI, Montaña LF, Rendon-Huerta EP. Claudin-6, 7, or 9 overexpression in the human gastric adenocarcinoma cell line AGS increases its invasiveness, migration, and proliferation rate. *Cancer Invest.* 2011 Jan; 29(1): 1-11.

Zhang SJ, Feng JF, Wang L, Guo W, Du YW, Ming L, Zhao GQ. miR-1303 Targets Claudin-18 Gene to Modulate Proliferation and Invasion of Gastric Cancer Cells. *Dig Dis Sci.* 2014

Zhi X, Tao J, Li Z, Jiang B, Feng J, Yang L, Xu H, Xu Z. MiR-874 promotes intestinal barrier dysfunction through targeting AQP3 following intestinal ischemic injury. *FEBS Lett.* 2014 Mar 3;588(5):757-63. doi: 10.1016/j.febslet.2014.01.022. Epub 2014 Jan 23