



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas Y de la Salud.  
Biología Oral

Efecto de la inhibición de MUC1 y c-Met en la actividad proliferativa, anti-apoptósica  
e invasiva del carcinoma oral de células escamosas

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

PRESENTA:  
CLAUDIO VIVEROS AMADOR

TUTOR O TUTORES PRINCIPALES  
Dra. María Dolores Jiménez Farfán  
Facultad de Odontología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dr. Edgar Zenteno Galindo  
Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Andrés Castell Rodríguez  
Facultad de Medicina, UNAM



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## INDICE GENERAL

	Pagina
1. Resumen.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1 Cáncer.....	2
2.2 Cáncer de cabeza y cuello.....	2
2.3 Carcinogénesis.....	4
2.3.1 Genes de regulación en la carcinogénesis.....	7
2.3.2 Receptores Tirosina Cinasa en el desarrollo del cáncer.....	8
2.3.3 Funciones de las mucinas y su participación en el cáncer.....	11
2.3.4 MUC1 en el desarrollo de carcinomas.....	12
2.4 Moléculas de adhesión, tipos y funciones.....	14
2.4.1 Claudinas y enfermedad.....	19
2.4.2 Uniones estrechas y cáncer.....	21
2.4.3 Claudinas y cáncer.....	22
2.5 Asociación de MUC1/cMet .....	23
3. Justificación.....	28
4. Objetivo general.....	29
4.1 objetivos específicos.....	29
5. Hipótesis.....	30
6. Materiales y métodos .....	30
6.1 Cultivo celular y tratamiento.....	30
6.2 Inmunocitoquímica.....	31
6.3 Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) e inmunotransferencia.....	31
6.4 Zimografía de gelatina .....	32
6.5 Ensayo de invasión celular.....	32
6.6 Estadística.....	33
7. Resultados.....	33
7.1 Inhibición farmacológica de MUC1 y c-Met en líneas celulares.....	33
7.2 Efecto de c-Met y MUC1 sobre la expresión de moléculas de adhesión.....	36
7.3 Expresión y actividad de metaloproteasas en líneas celulares de carcinomas de cabeza y cuello .....	41
7.4 Efectos sobre la migración y la invasión en células Cal27 y A253.....	42
8. Discusión.....	44
9. Conclusiones.....	48
10. Productos derivados del proyecto.....	50
11. Referencias.....	52
12. Índice de figuras.....	62

## 1. RESUMEN

En el estudio del cáncer, el papel de las metaloproteasas y moléculas de adhesión tales como las claudinas, metaloproteasas, cadherinas e integrinas ha sido abordado de manera amplia en el estudio de los carcinomas, particularmente en la evolución a metástasis. En el carcinoma oral de células escamosas (COCE) resulta importante este fenómeno ya que el 90% de las muertes relacionados a esta neoplasia se han relacionado a la metástasis vía linfática o hematológica a pulmón. Un grupo de moléculas, los receptores de tirosina cinasa y las mucinas se han relacionado con la expresión y regulación de estas moléculas en distintos modelos experimentales. **Objetivo:** Mediante inhibición farmacológica, Investigar el efecto de MUC1/c-Met, sobre el mecanismo de invasión y moléculas de adhesión en líneas celulares de carcinomas de cabeza y cuello. **Materiales y Métodos:** Se emplearon las líneas celulares Cal27 y A253 (obtenidas de carcinoma de células escamosas de lengua y adenocarcinoma de glándula submaxilar respectivamente), las cuales fueron tratadas con concentraciones de 0 a 100  $\mu$ M de SU11274 (inhibidor selectivo de c-Met) y GO-201 (inhibidor selectivo de MUC1) durante periodos de tiempo de 0-24 h. Los efectos sobre la proliferación celular se midieron mediante el ensayo de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Se evaluaron moléculas relacionadas con el proceso invasión y metástasis en las líneas celulares mediante Western blot e inmunocitoquímica, empleando anticuerpos anti-claudina 1, 3 y 9, integrina  $\alpha$ V $\beta$ 1, E-cadherina, MMP2 y MMP9, TIMP1, TIMP2. La actividad de las metaloproteasas (MMPs) se evaluó mediante zimografía, la invasión y motilidad mediante ensayo de EMC y cierre de herida respectivamente. **Resultados:** En presencia de los inhibidores, la proliferación no se vio afectada como mecanismo principal. No obstante, las moléculas de invasión, particularmente las claudinas e integrina  $\alpha$ V $\beta$ 1, se localizaron atípicamente en el citoplasma y el núcleo. Además, su expresión es modificada diferencialmente en la presencia de los inhibidores farmacológicos. La motilidad celular y la capacidad de invasión se vieron disminuidas en los ensayos de cierre de herida y EMC. Además, la actividad de la MMP9 disminuyó mientras que en el caso de la MMP2 no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y los experimentales. **Conclusiones:** Nuestros resultados sugieren que el papel de la regulación de MUC1 y c-Met no se

relaciona principalmente con la proliferación celular en las líneas celulares estudiadas. Por el contrario, demuestran, que pueden estar regulando la expresión de moléculas de adhesión y la actividad de las metaloproteasas, específicamente de la MMP9. Finalmente, nuestros resultados también nos sugieren que los mecanismos de invasión y motilidad son afectados por inhibición en la actividad de MUC1 y c-Met en dos líneas de cabeza y cuello.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Cáncer**

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. En 2012 se registraron alrededor de 14 millones de nuevos casos y se prevé que el número de nuevos casos aumente aproximadamente en un 70% en los próximos 20 años (1). El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo y en 2015, ocasionó 8,8 millones de defunciones. Las infecciones oncogénicas, entre ellas las causadas por virus de las hepatitis o por papilomavirus, ocasionan el 25% de los casos de cáncer en los países de ingresos medios y bajos (1). El tabaquismo es el principal factor de riesgo y se relaciona aproximadamente a un 22% de las muertes por cáncer (2). Este factor de riesgo incrementa la posibilidad de desarrollar cáncer de pulmón hasta 25 veces en los pacientes fumadores con respecto a los no fumadores y es sabido que solo una pequeña porción es de origen hereditario, ocasionado por alteraciones genéticas que confieren un elevado riesgo de desarrollar la enfermedad (3).

### **2.2 Cáncer de cabeza y cuello**

Anualmente el cáncer de cabeza y cuello se presenta con 540,000 nuevos casos diagnosticados y 271,000 muertes relacionadas con la enfermedad en todo el mundo (4). Comprende un grupo de neoplasias que se desarrollan en la boca, la nariz, la garganta, la laringe, los senos paranasales o las glándulas salivales. De ellos, el carcinoma oral de células escamosas (COCE) es la variedad más frecuente con aproximadamente el 90% de casos. La forma más temprana de cáncer de células escamosas se llama carcinoma in situ. Esto significa que las células cancerosas están solo en la capa de células epiteliales sin rebasar la lámina basal.

Esto es diferente al carcinoma invasivo, donde las células cancerosas se han localizado en capas más profundas del tejido conectivo de la cavidad oral u orofaringe (4). El COCE de estadio temprano a moderado generalmente se trata quirúrgicamente junto con radioterapia administrada con o sin quimioterapia postoperatoria para pacientes de alto riesgo. En pacientes con enfermedad avanzada, los enfoques multidisciplinarios no quirúrgicos se han utilizado cada vez más para mejorar el control de la enfermedad, supervivencia y calidad de vida. Sin embargo, más del 50% de los pacientes con COCE experimentan recidiva local o metástasis a distancia. En esta etapa, tienen un pronóstico más precario, y, por lo tanto, se necesitan terapias más efectivas para estos pacientes (4).

La Organización mundial de la salud reporta para México y América central una incidencia de 3.2/100,000 habitantes. El cáncer de cabeza y cuello en México se presenta con una incidencia menor al 2% con relación a todas las neoplasias (5). Se caracteriza por invasión local y una propensión para la diseminación a los ganglios linfáticos regionales. Para este paso, la invasión de las células cancerosas y la metástasis se requiere un aumento de la motilidad celular, proceso asociado con la transición epitelio/mesenquimal (TEM), que ocurre cuando las células epiteliales cambian de un epitelio polarizado a un fenotipo mesenquimal tipo fibroblasto. Este proceso resulta en la pérdida de la integridad epitelial, aumento de la migración, local invasión y metástasis (6). El cáncer de glándulas salivales constituye el 3% de las neoplasias presentes en cabeza y cuello y el 5% de éstas son malignas. La incidencia aproximada de los tumores de glándulas salivales es de 2.5 a 4 casos por cada 100,000 habitantes, con una proporción similar hombre/mujer, convirtiéndose en enfermedad propia del adulto. La edad media de presentación es de 45 años, afectando a niños en sólo el 5% de los casos, de los cuales el 35% son malignos. Estas neoplasias tienen un grado histológico variable con diferente comportamiento biológico que representa un desafío significativo en el tratamiento de tumores malignos (7).

### **2.3 Carcinogénesis**

La carcinogénesis consta de tres etapas: iniciación, promoción y progresión. La última de estas etapas, progresión, es exclusiva de la transformación maligna e implica la capacidad de invadir tejidos vecinos o a distancia. Para que se lleve a cabo el proceso metastásico, se requiere de una serie de mecanismos: angiogénesis, degradación de matrices, migración celular, evasión de la respuesta inmune del hospedero y colonización metastásica (8).

Las características distintivas del cáncer comprenden seis capacidades biológicas adquiridas durante su desarrollo. Estas incluyen el mantenimiento de la señalización proliferativa, elusión de los supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular, permitir la inmortalidad, inducción de la angiogénesis y la activación de vías de señalización relacionadas con invasión y metástasis. Detrás de estas características se encuentra la inestabilidad del genoma que genera una diversidad genética que acelera la adquisición de un fenotipo maligno, favorece la inflamación, lo que a su vez induce la activación de estas funciones relacionadas al cáncer (9).

Para los procesos mencionados, los genes supresores de tumores, o anti-oncogenes, codifican proteínas que transducen señales negativas de regulación del crecimiento celular, como las implicadas en la detención del ciclo celular y la apoptosis. A diferencia de los oncogenes, que se activan por la mutación de una sola de las dos copias génicas, los genes supresores se inactivan mediante mutaciones puntuales o delección en ambos alelos. Una vez inactivados los genes supresores tumorales, la célula escapa al estricto control del ciclo celular y está predispuesta a un crecimiento y una división descontrolados (9).

Las señales de proliferación son transmitidas en gran parte por factores de crecimiento que se unen a los receptores de la superficie celular, que típicamente contienen dominios de tirosina cinasa intracelulares. Estos últimos proceden a emitir señales a través de vías de señalización intracelulares que regulan la progresión a lo largo del ciclo celular, así como el crecimiento celular; a menudo estas señales influyen en otras propiedades biológicas de la célula, como la supervivencia celular y el metabolismo energético (10).

La división celular es controlada por sistemas que tienen efectos estimulantes o inhibitorios. El cáncer es de origen monoclonal, y para que una célula normal cambie su fenotipo y se convierta en una célula neoplásica deben ocurrir mutaciones genéticas en la misma. Dichas mutaciones genéticas ocasionan la modificación de los productos que en condiciones normales codificaría el gen y, finalmente, esto conduce a un cáncer. A su vez, los mecanismos que pueden conducir a alteraciones en los genes pueden ser de tipo genéticos o epigenéticos. Para que una célula normal cambie su fenotipo y se convierta en una célula neoplásica se requieren mutaciones en múltiples regiones del genoma y eso puede asociarse a la exposición continua a un agente carcinógeno. La susceptibilidad del huésped y la combinación de más factores de riesgo es algo que también debe considerarse en el proceso (10).

Existen dos mecanismos asociados a estas alteraciones:

a) *Mecanismos genéticos*, donde se producen alteraciones estructurales del genoma por cambios en la disposición de los propios genes o de sus bases nitrogenadas, como pueden ser las mutaciones, translocaciones o deleciones. La acumulación de alteraciones genéticas impulsa la progresión de las células normales a través de etapas hiperplásicas y displásicas hacia el cáncer invasivo y, finalmente, la enfermedad metastásica. Desde los esfuerzos iniciales para vincular los cambios histopatológicos a la mutación de genes específicos en el cáncer colorrectal (11), se han desarrollado modelos de progresión para muchos tipos de tumores, incluidos pulmón, mama, cabeza y cuello y próstata (12). El análisis de expresión génica de genes supresores de tumores y oncogenes en el contexto de la tumorigénesis temprana ha proporcionado una idea sobre el papel de estos en la progresión del cáncer (9). Si bien las alteraciones genéticas en los tumores son comunes, los cambios que se encuentran en las etapas premalignas tienen más probabilidades de representar eventos causales que inician y promueven el desarrollo del cáncer, a menudo estos cambios están asociados con la inestabilidad genética en etapas posteriores de la enfermedad. Por esta razón, se deben considerar todos los cambios que ocurren en la progresión del cáncer para comprender completamente cómo se desarrollan los tumores malignos (12).

b) *Mecanismos epigenéticos*, la cromatina está hecha de unidades repetitivas de nucleosomas, que consisten en ~146 pares de bases de ADN envueltos alrededor de un octámero de cuatro histonas nucleares (H3, H4, H2A y H2B) (13). Los mecanismos epigenéticos que modifican la estructura de la cromatina se pueden dividir en cuatro categorías principales: metilación del ADN, modificaciones covalentes de histonas, mecanismos no covalentes tales como la incorporación de variantes de histonas y remodelación de nucleosomas y ARN no codificantes, incluidos microARN (miARN). Estas modificaciones trabajan juntas para regular el funcionamiento del genoma al alterar la dinámica estructural local de la cromatina. La interacción de estas modificaciones crea un perfil epigenético que regula la forma en que el genoma de los mamíferos se manifiesta en los diferentes tipos de células, etapas de desarrollo normal, así como estados de enfermedad, incluido el cáncer (14). Las células de cáncer se vuelven *inmortales* activando de manera continua a la enzima telomerasa. Debido a que la actividad de la telomerasa puede ser limitada por modificaciones epigenéticas, existe un vínculo entre la epigenética de los telómeros y el cáncer. En este sentido, se ha establecido que los telómeros protegen los extremos cromosómicos de la fusión y de ser reconocidos como sitios de daño del ADN. Los telómeros disfuncionales, que surgen por el acortamiento crítico de los telómeros en las células somáticas normales durante las divisiones celulares progresivas, provocando respuestas de daño al ADN que desencadenan la senescencia celular. Las células que obtienen cambios oncogénicos eluden la senescencia y continúan dividiéndose hasta que múltiples telómeros severamente acortados inician la *crisis* (un período de senescencia replicativa completa, fusiones de extremo a extremo del cromosoma y apoptosis extensa). Durante la anafase, las cromátidas hermanas se separan debido al movimiento hacia los polos opuestos, lo que resulta en la formación de cromosomas derivados desiguales, lo que lleva a la inestabilidad genómica. El período de crisis produce muerte celular extensa. Sin embargo, células modificadas que escapan de la crisis y mantienen una longitud estable pero usualmente acortada de los telómeros, pueden eventualmente evolucionar hacia un fenotipo maligno mediante la estimulación de la proliferación celular continua (15). Este periodo de inmortalidad proliferativa se produce activando o regulando positivamente el gen TERT humano (hTERT) que codifica la

telomerasa, una proteína con actividad de transcriptasa inversa que forma complejos con otras proteínas y un ARN funcional (codificado por hTR, también llamado hTERC). En raras ocasiones, otro mecanismo de recombinación de ADN denominado alargamiento alternativo de los telómeros (ALT) revierte la atrición de los telómeros con el fin de eludir la senescencia. Aunque hTERT generalmente se silencia en casi todas las células somáticas, se expresa significativamente en 90% del cáncer humano. Los estudios que usan estrategias de inhibición de la telomerasa han establecido que la inhibición de hTERT puede conducir a un acortamiento progresivo de los telómeros y finalmente a la muerte de las células cancerosas. Los detalles de los mecanismos subyacentes de la activación de hTERT principalmente incluyen mutaciones en el promotor hTERT, alteraciones en el corte y empalme alternativo de hTERT pre-mRNA, amplificación de hTERT, cambios epigenéticos y/o alteración del efecto de posición de los telómeros (TPE) (16).

### **2.3.1 Genes de regulación en la carcinogénesis.**

*Genes supresores tumorales.* Rb (también denominada pRB) es la proteína del retinoblastoma, una proteína supresora de tumores que se encuentra alterada en cáncer, como el cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de próstata o el cáncer de mama, entre otros. Originalmente se detectó esta alteración en cáncer de retina, de donde deriva su nombre. Una de las funciones principales de pRb es la inhibición de la progresión del ciclo celular antes de la entrada en mitosis, de manera que la célula no entra en división hasta que está preparada para ello y se dan las condiciones adecuadas. La activación de estos genes protege a la célula de la adquisición de características malignas, activando mecanismos de control a nivel de diferentes puntos de chequeo en el ciclo celular. La proteína Rb y su sistema molecular asociado se encuentran frecuente y precozmente alterados en el cáncer oral (17). El estado hipofosforilado de pRb y de otros miembros de su familia como p107 y p130 permite que activen al factor de transcripción E2F que resulta determinante para la progresión del ciclo celular desde la fase G a la fase S. Los genes que codifican las proteínas inhibidoras de las cinasas dependientes de ciclinas (CDKIs) se comportan como importantes genes supresores tumorales, promoviendo un adecuado funcionamiento de pRb y por tanto un correcto control

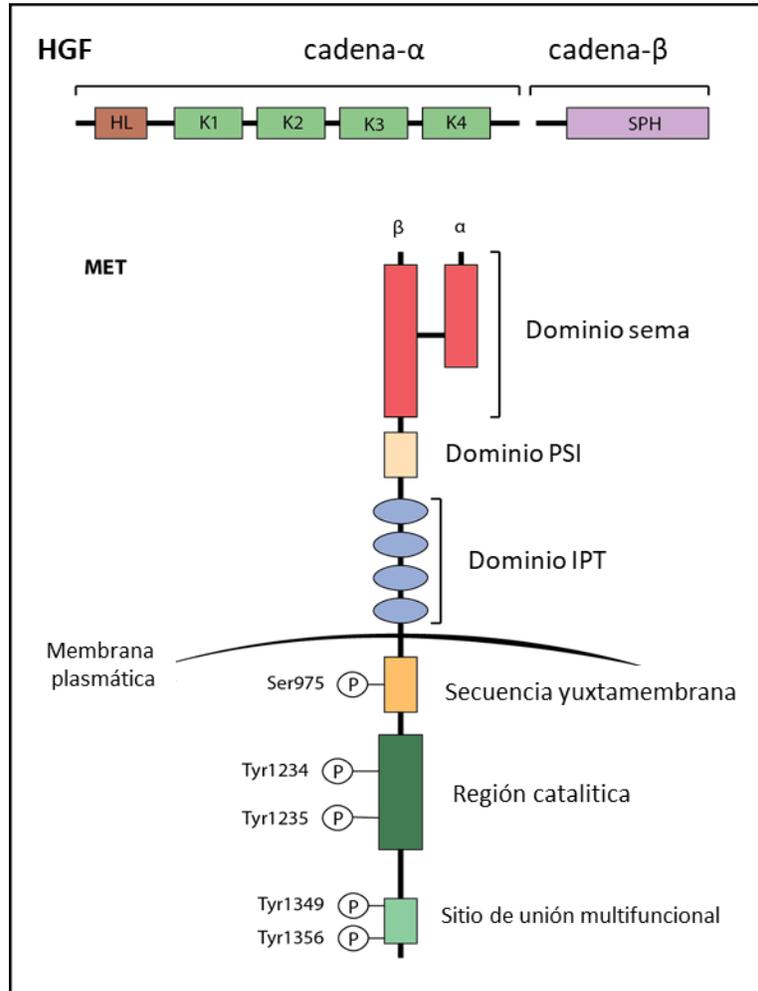
M. en C. Claudio Viveros Amador  
del ciclo celular. El gen CDKN2A que codifica la proteína p16, se localiza en el locus 9p21. Las mutaciones en p16 aumentan el riesgo de desarrollar diversos tipos de cáncer, especialmente melanomas pero también se ha encontrado mutado en el cáncer oral. En un alto porcentaje de carcinomas orales (más del 80%) se demuestra una falta de función de p16, lo que resalta la importancia de esta proteína en el mantenimiento de una homeostasis celular normal. Uno de los genes supresores tumorales más importantes en el ser humano es el TP53. La supresión de las funciones de este gen y su sistema molecular asociado se observa en tumores humanos y constituye uno de los hallazgos más antiguos en la historia del cáncer. La proteína p53 es capaz de detener el ciclo celular en respuesta a lesiones del ADN para establecer los mecanismos necesarios para su reparación, y en caso de lesiones irreparables del ADN, p53 induce apoptosis. En el caso de lesiones displásicas y cáncer oral se ha observado frecuentemente mutado (18).

### ***2.3.2 Receptores Tirosina Kinasa en el desarrollo del cáncer.***

Todas las células tienen la posibilidad de responder ante cambios producidos en el medio ambiente, mediante la activación de una red compleja de moléculas de membrana de origen proteico que, como respuesta, activan vías de señalización relacionadas al estímulo recibido. Dentro de estas moléculas se encuentran los RTKs, de los cuales hasta ahora se conocen más de 75 tipos, muchos de los cuales están relacionados a la oncogénesis. Los RTKs están formados por un dominio extracelular de unión amino terminal, una  $\alpha$ -hélice simple transmembranal y un dominio C-terminal citosólico con actividad tirosina kinasa. Este último dominio tiene la posibilidad de activar múltiples cascadas de señalización con funciones relacionadas a sobrevivencia, apoptosis, migración y crecimiento celular (19). Muchos de estos receptores funcionan como proto-oncogenes relacionados con la activación de señales de transducción “corriente abajo” asociadas con proliferación celular, migración y sobrevivencia mediante la activación de la vía MAPK, principalmente (19). Uno de los receptores con actividad tirosina kinasa estudiado en los procesos de carcinogénesis, específicamente invasión, es el receptor c-Met.

*Receptor c-Met.* Es un receptor tirosina kinasa expresado en una gran variedad de tejidos tanto de origen epitelial como endotelial, relacionado con la regulación del

crecimiento celular, diferenciación, formación de órganos, neovascularización y reparación tisular, además puede sobreexpresarse, amplificarse y/o mutarse en diversos tipos de cáncer (20-22). Se sabe que la estimulación de c-Met a través de su ligando, el factor de crecimiento de los hepatocitos (también conocido como factor de diseminación, HGF/SF) da como resultado efectos biológicos y bioquímicos relacionados a los antes mencionados. Su receptor c-Met tiene un dominio de unión extracelular N-terminal formado por una  $\alpha$ -hélice con un peso de 40 kDa y un dominio  $\beta$  citosólico C-terminal con actividad tirosina cinasa de 150 kDa (Figura 1). c-Met, se activa con la unión de HGF a través de la fosforilación de su dominio intracelular con actividad tirosina cinasa (8), lo que resulta en el incremento de la motilidad celular y proliferación de las células. Así mismo, c-Met puede activarse por la formación de heterodímeros con otros receptores tirosina cinasa o mucinas. Esta activación dependiente o independiente de ligando, también se ha visto relacionada en la progresión del tumor, invasión y metástasis (23,24); además, se ha podido establecer una correlación clínica con la expresión aumentada de Met y el pronóstico en neoplasias malignas de pulmón, mama, cabeza y cuello (25-31).



**Figura 1. Estructura del receptor Met y su ligando HGF.** HGF al unirse al receptor Met provoca la fosforilación de las tirosinas 1234 y 1235. El receptor de Met es un heterodímero. Su región extracelular de Met se compone de tres dominios: el dominio Sema (homólogo del dominio Sema de las semaforinas y las plexinas) de reconocimiento de HGF; el dominio PSI (también presente en las plexinas, semaforinas e integrinas); y cuatro dominios IPT (similar a inmunoglobulina también se encuentra en plexinas y factores transcripcionales). La región intracelular de Met consta de tres porciones: una secuencia de yuxtamembrana que tiene el papel de regular negativamente la actividad de cinasa tras la fosforilación de Ser975; una región catalítica que activa la función cinasa después de la fosforilación de Tyr1234 y Tyr1235; y un sitio de acoplamiento multifuncional carboxi-terminal que contiene dos tirosinas de acoplamiento (Tyr1349 y Tyr1356) esenciales para la señalización río abajo. Tomada y modificada de: "Molecular Targets of CNS Tumors", book edited by Miklos Garami, ISBN 978-953-307-736-9, 2011 under CC BY-NC-SA 3.

### **2.3.3 Funciones de las mucinas y su participación en el cáncer**

Las mucinas son proteínas extracelulares grandes que están fuertemente glucosiladas con oligosacáridos complejos: establecen una barrera molecular selectiva en la superficie epitelial y participan en la transducción de señales. Estas señales podrían ser en respuesta a cambios en la conformación de sus dominios extracelulares. Las señales pueden transmitirse para indicar que existe un estado normal en la superficie de la célula (por ejemplo, la célula ha alcanzado una morfología de diferenciación normal). Por lo tanto, las mucinas podrían servir como una señal de afuera hacia adentro que altera la proliferación, la diferenciación o el estado de adhesión celular de la célula epitelial. Las mucinas se utilizan como marcadores de diagnóstico en el cáncer y se están investigando como dianas terapéuticas (32). Por ejemplo, la inhibición de MUC1 afecta su dominio de oligomerización (motivo de unión CQC, Figura 2C) y la señalización proliferativa en cáncer de próstata, adenocarcinoma de pulmón y cáncer colon (33-35).

Actualmente han sido identificadas 20 mucinas en humanos, siendo la MUC1 la mucina más ampliamente expresada en la mucosa oral (36). Se sabe que MUC1 en condiciones patológicas suprime funciones inmunológicas a través de diferentes mecanismos (32). Por ejemplo, las células cubiertas con MUC1 se reconocen con menor eficiencia por parte de las células *natural killers* y células T citotóxicas, lo que permite a las células tumorales evadir la respuesta inmunológica por parte del huésped (37, 38). Asimismo, se ha reportado que MUC1 se asocia a la resistencia a anoikis, proceso apoptótico que ocurre en las células que tienen pérdida de adhesión a la matriz extracelular (ECM), lo que contribuye a la tumorigénesis y, en particular a la metástasis, al permitir la supervivencia de células cancerosas que han invadido la sangre o circulación linfática y así facilitar su propagación metastásica (39). Un grupo de moléculas iniciadoras de anoikis de la superficie celular como integrinas, cadherinas y receptores de muerte, se activan en respuesta a la pérdida de adhesión celular enviando señales de muerte mediadas por receptores de membrana y sus ligandos para la activación de la vía extrínseca de apoptosis. MUC1 en células epiteliales transformadas previene el inicio de anoikis en respuesta a la pérdida de adhesión celular, un efecto que se atribuye sustancialmente al dominio extracelular (figura 2A) de MUC1 (39). En contraste,

MUC1 puede comportarse como molécula de adhesión cuando entra en contacto con moléculas tipo lectina como ICAM-1 incrementando el grado de adhesión a la superficie endotelial para favorecer la transmigración y la formación de metástasis. Estas propiedades adhesivas y anti-adhesivas son importantes en diferentes etapas del desarrollo y progresión del cáncer (40).

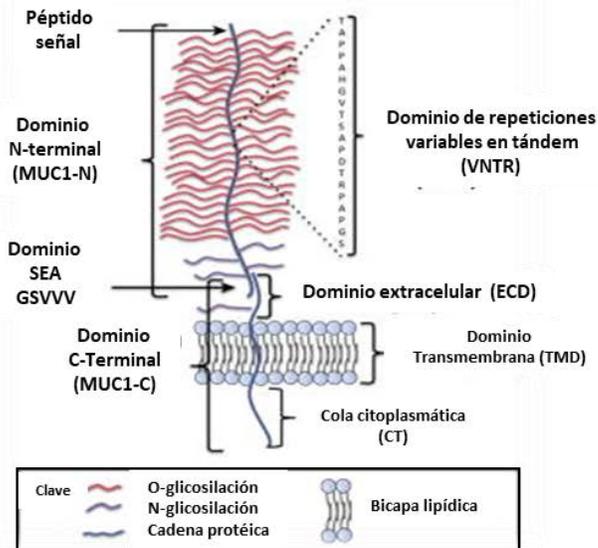
La interacción de mucinas y receptores tirosina cinasa ha sido estudiada en el desarrollo de carcinomas. De manera particular, la interacción de MUC1/c-Met se ha asociado con elevada motilidad e invasión en el adenocarcinoma de páncreas (41). Aunque esta relación se ha estudiado en varios tipos de carcinomas, el efecto regulador de las mucinas y receptores tirosina cinasa sobre las moléculas de adhesión y las metaloproteinasas aún no se conoce del todo.

#### ***2.3.4 MUC1 en el desarrollo de carcinomas***

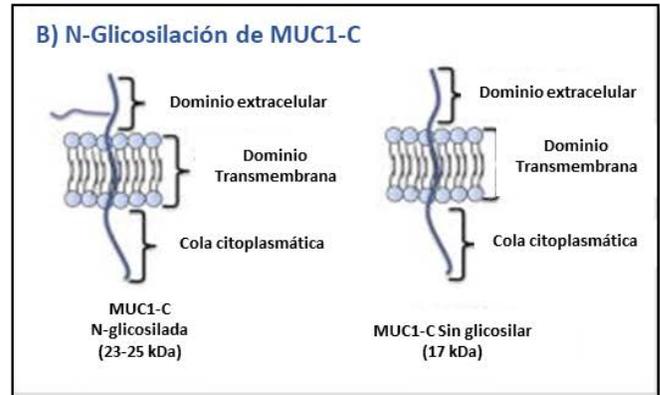
Comparativamente con otras mucinas, MUC1 es el marcador más efectivo de displasia y carcinoma. Ejemplo de ello son los carcinomas mamarios que expresan en un 90% este tipo de mucina. Se ha reportado que existe una correlación entre MUC1 y la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular y la señalización de PI3K-AKT por lo que esto representa un mecanismo por el cual MUC1 funciona como oncoproteína (42). Para esta activación, el dominio citoplasmático de MUC1 contiene sitios serina/treonina y tirosina que están fosforilados y participan en diferentes cascadas de señalización en respuesta a cambios presentes en la superficie celular incluyendo la estimulación de factores de crecimiento y citocinas (figura 2C). Los cambios en el estado de fosforilación de la región citoplasmática de MUC1 (figura 2B) modulan su afinidad por mediadores de señales de transducción, incluyendo  $\beta$ -catenina, p53 y Grb2-SOS, entre otros. Su región citoplasmática (MUC1-CT), representa un sustrato de activación para moléculas como GSK3B, c-Src, receptores de factores de crecimiento EGFRs y otros receptores tirosina cinasa como c-Met. La fosforilación mediada por EGFRs en la región citoplasmática induce su unión hacia c-Src e incrementa la afinidad por  $\beta$ -catenina, molécula implicada en el desarrollo de carcinomas. En este sentido, MUC1-CT (figura 2C) puede ser traslocada al núcleo con  $\beta$ -catenina, donde puede influenciar la actividad como un

coactivador transcripcional de genes relacionados con proliferación, evasión de la apoptosis e invasión (43).

**A) Estructura de MUC1**



**B) N-Glicosilación de MUC1-C**



**C) Sitios potenciales de fosforilación y unión de patrones con MUC1 CT**



**Figura 2. A. Estructura de MUC1.** La región N-terminal y la C-terminal de MUC1 se asocia al dominio SEA, formando un complejo heterodimérico. MUC1-N contiene el péptido señal, la región de repetición en tándem de número variable (VNTR) y el dominio SEA. El dominio C-terminal consiste en el dominio extracelular (ECD), dominio transmembrana (TMD) y CT. **(B)** En condiciones normales, MUC1 permanece en forma heterodimérica. El ECD de MUC1-C se escinde por enzimas como el factor de necrosis tumoral (TNF) - $\alpha$  enzima convertidora (TACE), también llamado desintegrina y dominio de metaloproteasa que contiene proteína ADAM17 o MMP-MT1. **(C)** Los residuos de tirosina (rojo), treonina (verde) y serina (azul) de MUC1 CT están fosforilados por receptores del factor de crecimiento y las cinasas intracelulares de señalización por lo que pueden activar cascadas de señalización o modular su estado de activación. Los monómeros MUC1-C dimerizan alrededor del motivo CQC para formar un homodímero funcional. El motivo de localización nuclear putativo RRK se une a la importina- $\beta$ , y permite la translocación al núcleo a través de Nup-62. *Figura tomada y modificada de: Trends Mol Med. 2014 Jun;20(6):332-42.*

## **2.4 Moléculas de adhesión, tipos y funciones**

Una propiedad importante de las células epiteliales y endoteliales es su ensamblaje en una barrera física, selectiva de iones y de moléculas, que separa los tejidos. Las uniones intercelulares, como uniones estrechas y adherentes, desempeñan un papel crucial en la formación y el mantenimiento de las barreras epiteliales y endoteliales. Las uniones estrechas o tight junction (TJ) se localizan en la porción más apical también llamada unión oclusiva de las células y representan la primera barrera de protección y de entrada hacia los tejidos. Las uniones adherentes se localizan por debajo y representan un sitio de anclaje para los filamentos de actina. Las uniones tipo desmosoma establecen interacciones con los filamentos intermedios del citoesqueleto. Las uniones tipo gap representan canales de intercambio formados por proteínas denominadas conexinas y su función principal es de transportar sustancias entre dos células adyacentes (figura 3) (44).

*Uniones estrechas.* Las uniones estrechas (TJ) tienen una composición proteica sorprendentemente compleja comparada con otras uniones célula-célula y está compuesta por al menos 40 proteínas diferentes. Esta complejidad es consecuencia de sus múltiples funciones relacionadas con la polaridad celular (44) la señalización (45, 46), la regulación transcripcional y el ciclo celular (47, 48), tráfico de vesículas, barrera para el transporte paracelular de sustancias (49) (figura 4) y, además, se relaciona la resistencia eléctrica transepitelial (TEER), un estado estacionario eléctrico potencial a través del epitelio (50).

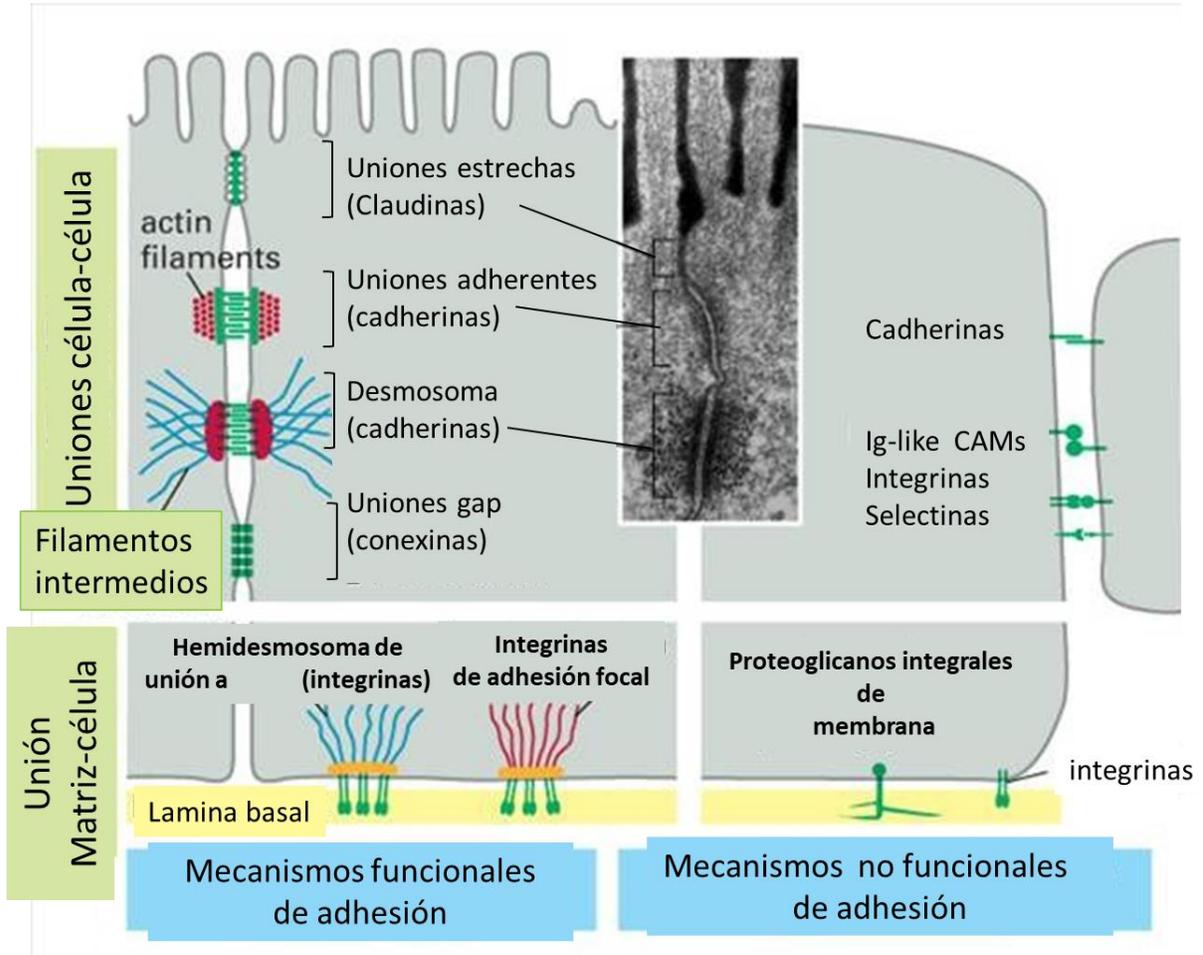
En los tejidos existe una remodelación constante de los contactos de célula a célula para renovar y reemplazar células viejas o dañadas. Además, este proceso ayuda a incorporar células recién diferenciadas sin comprometer la integridad de la barrera. En los tipos de cáncer derivados del epitelio, la integridad de la masa tumoral primaria está influenciada por las estructuras intercelulares, así como por la adhesión de célula a célula. Estos factores deben mantenerse ya que las irregularidades pueden conducir a la disociación del tumor y la metástasis posterior. Las TJ se encuentran entre aquellas que preservan la adhesividad celular en esta masa tumoral. Por lo tanto, las alteraciones en las TJ presentes pueden dar como resultado la separación de la masa tumoral (51).

*Componentes de unión estrecha.* Este complejo se encuentra formado por: proteínas transmembrana claudinas, ocludina, moléculas de adhesión de la unión (JAM) y tricelulina, así como proteínas de andamios intracelulares como la zonula occludens (ZO) y cingulina (51).

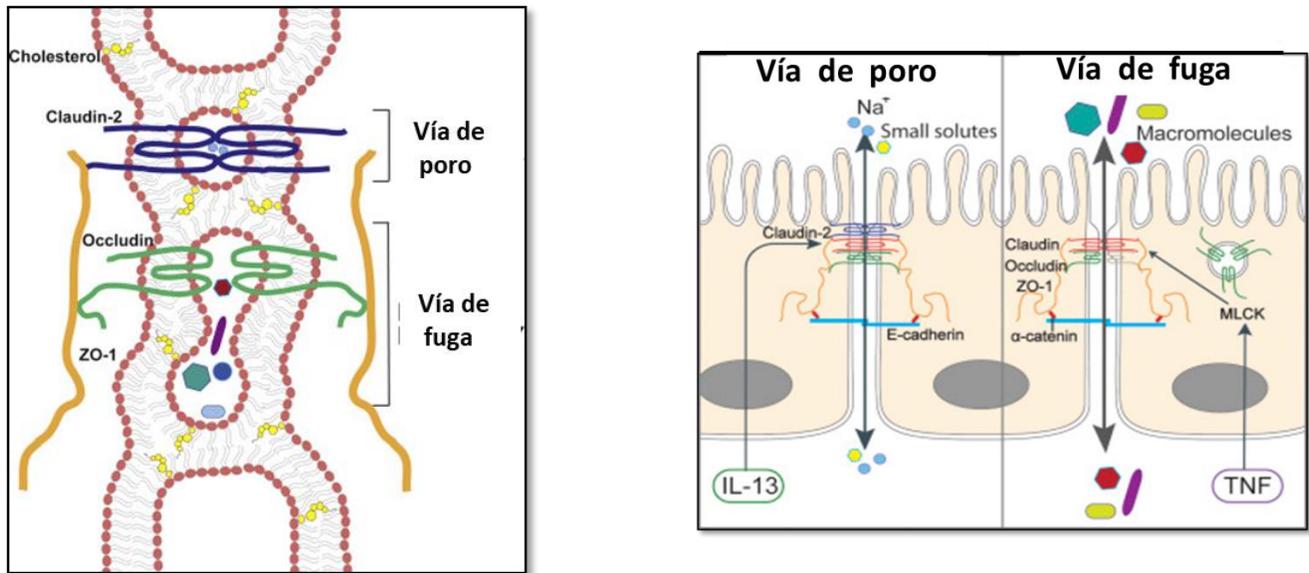
*Familia de claudinas.* Las células epiteliales cubren las superficies internas y externas de los órganos y forman compartimentos dentro de los organismos multicelulares. Las divisiones en forma de lámina permiten la formación de barrera de difusión y la permeación selectiva de sustancias e iones (permselectividad), excluyendo las moléculas innecesarias o tóxicas e incluyendo los componentes necesarios para mantener la homeostasis. La combinación de las uniones adherentes en forma de cinturón (AJ) y uniones estrechas (TJ) tienen funciones importantes en la formación de láminas de células epiteliales y también en la formación de barreras selectivas paracelulares a través de sus funciones como tabiques. Las claudinas son proteínas integrales localizadas en la membrana celular que se encuentran en las uniones estrechas de todos los epitelios y endotelios. Fueron identificadas por primera vez en 1998 en una fracción purificada de hígado de pollo por Tsukita (46). Las funciones de barrera paracelular con permselectividad son exclusivas del sistema de células epiteliales y regulan la homeostasis interna de iones y solutos en el cuerpo. Asociado a estas funciones, se han caracterizado componentes protéicos de TJs, tales como claudins, occludin, tricellulin, JAM y CAR. Recientemente, se ha sugerido que el sistema de barrera permselectiva basado en TJ específico del epitelio participa en la regulación de la proliferación celular, posiblemente regulando el microambiente alrededor de las células epiteliales. Esta noción ha atraído particular atención porque más del 90% del cáncer son de origen epitelial. La mayor evidencia de esto proviene de diferentes estudios que muestran que la sobreexpresión, knockdown o knockout de claudinas, y, las mutaciones, frecuentemente provocan cambios en la permeabilidad paracelular (46). La consecuencia de estas mutaciones puede incluir alteraciones que modifican los residuos de los dominios extracelulares de las claudinas, o puede asociarse con la introducción de cisteínas en la unión covalente (48). Las claudinas son proteínas de barrera críticas. La información actual sugiere que la barrera paracelular es modelada de manera más útil como teniendo dos componentes

fisiológicos: un sistema de poros pequeños selectivos de carga, de 4 Å de radio y una segunda vía creada por discontinuidades mayores en la barrera, carente de discriminación de carga o tamaño. La primera vía está influenciada por los patrones de expresión de la claudina y la segunda es probablemente controlada por diferentes proteínas y señales (figura 4) (52).

*Proteínas transmembrana no claudinas.* Además de los miembros de la familia claudina, hay actualmente otras tres proteínas transmembrana localizadas dentro de los filamentos de la barrera adhesiva y que en teoría podrían influir directamente sobre la barrera. Las ocludinas (Furuse y otros, 1993), tricelulina y hay una tercera proteína en la base de datos humanos homóloga a ocludina y tricellulin llamada MARVELD3 que forman parte de las proteínas transmembranales no claudina. Un papel alternativo para ellas es la coordinación de la señalización transmembrana sugerida por los descubrimientos de que se pueden unir al TGF- $\beta$  tipo III y la manipulación de ocludina en células cultivadas afecta la señalización de RAF1. Una vez activada, la proteína celular RAF1 puede fosforilarse para activar las proteínas cinasas MEK1 y MEK2, que a su vez se fosforilan para activar las proteínas cinasas específicas serina/treonina y eventos de proliferación celular (53).



**Figura 3. Localización de las uniones intercelulares.** Las uniones estrechas o tight junction (TJ) se localizan en la porción más apical también llamada unión oclusiva de las células. Las uniones adherentes se localizan por debajo y representan un sitio de anclaje para los filamentos de actina. Las uniones tipo desmosoma establecen interacciones con el los filamentos intermedios del citoesqueleto. Las uniones tipo gap representan canales de intercambio y anclaje entre dos células adyacentes, formados por proteínas denominadas conexinas. Figura tomada y modificada de: "Biología Celular y Molecular". Lodish y col. 7a. Edición. Editorial Médica Panamericana (2016).

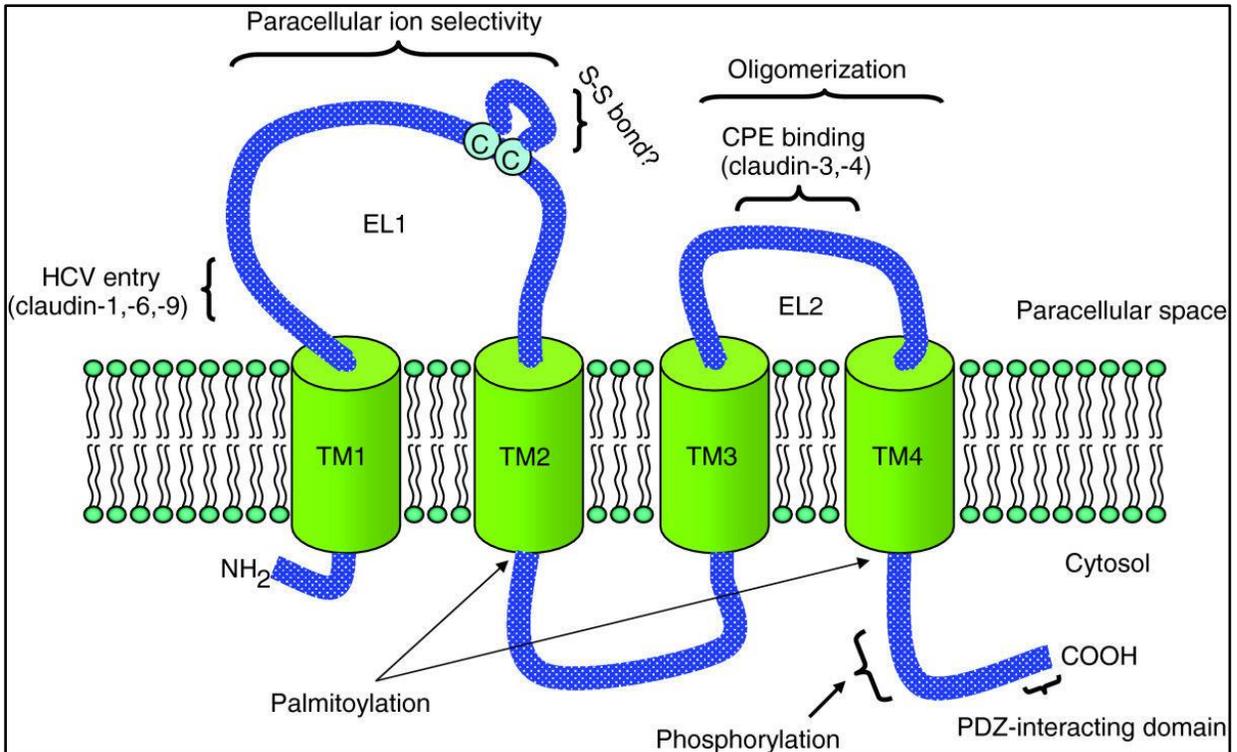


**Figura 4. Vías y mecanismos reguladores en el flujo a través de uniones estrechas.** El flujo paracelular a través de la unión estrecha epitelial puede distinguirse por dos vías distintas, poros y fugas. En el epitelio intestinal, la citocina IL-13 induce la expresión de claudina-2 que, a su vez, aumenta el transporte de agua y pequeños solutos. p.e., el flujo de iones a través de la vía de poro de alta selectividad en tamaño y carga. Por el contrario, TNF activa la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) que desencadena la remoción de occludina mediada por caveolina de la unión estrecha. Esto da lugar a un aumento del flujo macromolecular a través de la vía de fuga relativamente poco selectiva. Figura tomada de: Amulya L, Tiha L, Yitang W, Jotham R. Austin II, Jerold T. Conceptual barriers to understanding physical barriers. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2015;42:13-21

### **2.4.1 Claudinas y enfermedad**

Se ha reportado que la mutación en diferentes genes de claudinas y sus productos está fuertemente asociada a diferentes enfermedades. Alteraciones en el gen de CLDN14 conduce a la sordera recesiva no-síndromica (54), el gen CLDN16 mutado ha se ha asociado con la hipomagnesemia hereditaria (55). La ausencia de CLDN11 (también conocida como proteína de Occludin Sertoli) se ha asociado con la ausencia de hebras de TJ en la mielina, hojas de oligodendrocitos y células de Sertoli en los testículos (56).

Los genes de las claudinas codifican proteínas de 20-27 kDa con cuatro dominios transmembrana, dos bucles extracelulares donde el primero es significativamente más largo que el segundo, y un corto carboxílico intracelular (Figura 5). Los últimos aminoácidos de esta cola están altamente conservados dentro de la familia y constituyen motivos de unión a PDZ: claudinas 1-9 y 17 TYV, claudinas 10 y 15 AYV, claudina 11 AHV, claudina 12 HTT, claudina 13 LDV, claudins 14, 18 y 20 DYV, claudin 16 TRV, y claudin 19 DRV. A través de estos motivos, las claudinas están vinculadas a PDZ que contiene proteínas ZO-1, ZO-2, ZO-3 (57). Estas interacciones sugieren que las uniones estrechas, además de actuar como barreras para el flujo paracelular pueden desempeñar un papel importante en la regulación de funciones celulares, tales como proliferación y supresión tumoral (58).



**Figura 5.** Representación esquemática de la estructura de las claudinas. Las claudinas son proteínas transmembrana los dominios 1 a 4 (TM-1, TM-2, TM-3 y TM-4) y bucles extracelulares representan un objetivo prometedor para la terapia. El extremo terminal-COOH de las claudinas contiene un dominio de unión a PDZ que experimenta modificación postranscripcional y que es importante para la transducción de señales. Figura tomada y modificada de: Madhu Lal-Nag and Patrice J Morin. The claudins. *Genome Biology* 2009;10:235.

### **2.4.2 Uniones estrechas y cáncer**

La pérdida de adhesión célula-célula es uno de los pasos en la progresión a metástasis. Al menos tres familias principales de proteínas de unión han sido asociadas con este proceso: occludinas, claudinas, y uniones estrechas (TJ) (58). Algunas proteínas TJ están involucradas en la regulación de la proliferación celular y varias claudinas presentan anomalías de expresión en el cáncer humano (59). Comprender los procesos por qué células tumorales invaden y metastatizan a sitios distantes es uno de los grandes desafíos en la investigación del cáncer, ya que la diseminación metastásica es responsable para el 90% de la mortalidad relacionada con el cáncer (60). Alteración de uniones estrechas y, por lo tanto, en la expresión y localización de claudinas están relacionadas con la transformación de las células malignas. La pérdida de claudinas y otras TJ ha sido interpretada como un mecanismo de agotamiento para la adhesión celular y juega un papel significativo en la progresión de metástasis (61). La expresión de E-cadherina o su localización en la superficie celular a menudo se pierde en tumores avanzados y se asocia a una mayor incidencia de metástasis y recidiva tumoral. La pérdida de E-cadherina y la supresión o debilitamiento resultante de la adhesión célula-célula ha sido considerada como un paso crucial en el proceso de transición epitelio mesenquima (62). Por otra parte, en este proceso de transición, la propagación de tumores malignos requiere la degradación o la descomposición de la matriz extracelular y tejido conectivo que rodea las células tumorales (63). Para este paso, las metaloproteinasas de matriz (MMP) participan en la degradación de diversos componentes de la matriz extracelular. Algunos estudios han sugerido un papel principal para MMP2 y 9 en la digestión de la membrana basal, como un mecanismo importante para invasión y metástasis en algunos tipos cáncer (64). Diferentes estudios han indicado efectos moduladores de las claudinas sobre la activación de las MMPs. Agarwal et al demostraron que la expresión de claudina-3 y -4 en células epiteliales ováricas potenciaba la invasión y se asociaba con una mayor actividad de MMP-2 (65). Oku et al por su parte, demostraron que la claudina-1 potenciaba la actividad invasiva de las células del carcinoma de células escamosas orales promoviendo la escisión de la cadena laminina-5 y 2 a través de MMP-2 y la membrana de tipo MMP-1 (66). Takehara et al demostraron que la sobreexpresión

de claudin-4 estimula específicamente la actividad invasiva de las células de cáncer de colon y aumentaba la actividad de MMP-2 y -9 (67). Yoon y cols. encontraron que la claudina-1 es necesaria y suficiente para inducir la invasión celular en el carcinoma hepatocelular humano (68). Estos estudios aportan conocimiento relacionada a la regulación presente entre claudinas y metaloproteasas en diferentes tejidos.

### **2.4.3 Claudinas y cáncer**

Desde su descubrimiento, la literatura sobre el estado de las claudinas en diversos tipos de cáncer se expande constantemente y, en contraste con el pensamiento general de que la expresión de claudinas disminuiría durante la tumorigénesis al perderse las uniones estrechas durante la transformación celular, la expresión de claudinas parece cambiar de forma específica al tejido en donde se expresa (58). En este sentido se ha demostrado que la expresión y distribución de claudina-1 se asocia con el estado de disociación celular en células de cáncer de páncreas. Por el contrario, se ha encontrado que la claudina-7 está disminuida en carcinomas ductales invasivos (69), cáncer de cabeza y cuello (70) y cáncer de mama metastásico (71). Por otro lado, la Claudina-3 y -4 son frecuentemente elevados en varios tipos de cáncer incluyendo adenocarcinoma ductal pancreático, cáncer de próstata, útero, ovario y cáncer de mama (72), mientras que los carcinomas hepatocelulares y renales expresaron niveles más bajos de claudinas -4 y -5 (73). Si bien, la expresión más baja de claudin-2 también se observó en los carcinomas de mama y próstata, las expresiones de claudina-1 y claudina-7 que eran indetectables en el epitelio escamoso cervical normal aumentaron en la neoplasia cervical (74, 75). Estudios recientes han demostrado que la expresión de ciertas claudinas, especialmente claudin-1 y claudin-4 aumenta durante la metástasis y la inhibición de su expresión tiene un profundo efecto en las capacidades metastásicas de las células cancerosas, aunque de una manera específica del tejido (76-77). En la Tabla 1, hemos resumido el estado de la expresión de miembros de la familia claudina en diferentes tipos de cáncer.

Existe el mecanismo en el cual la disminución de la expresión de claudinas puede llevar a la función TJ comprometida y a la pérdida de la adhesión asociada a cáncer,

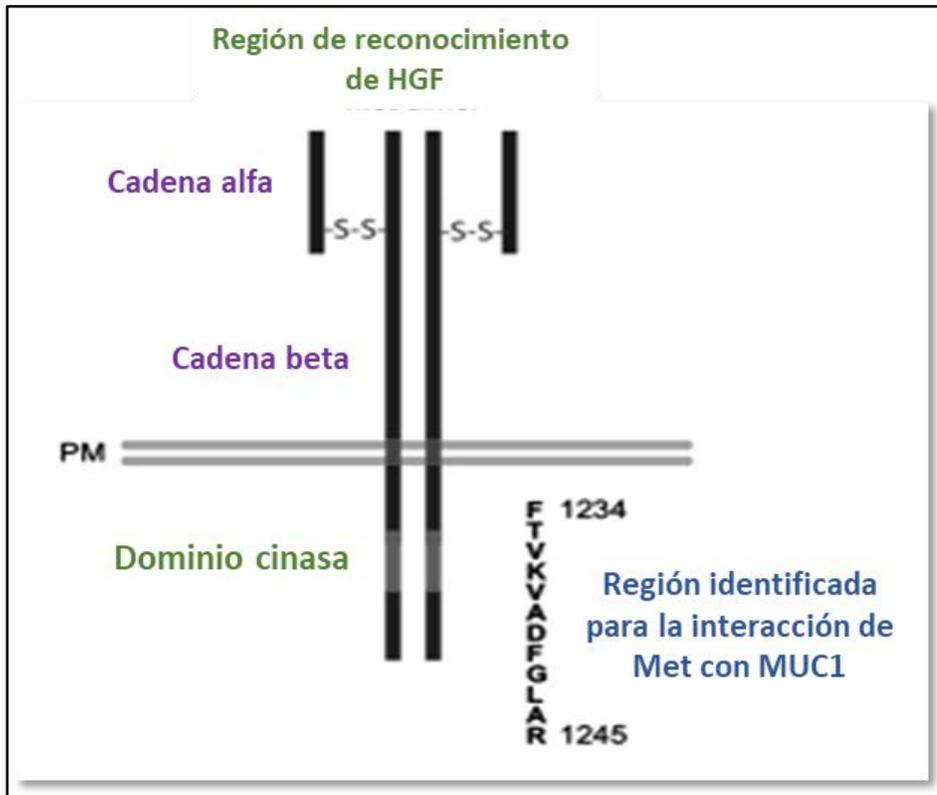
sin embargo, el proceso mediante el cual el aumento de la expresión de las claudinas contribuye a la progresión neoplásica, es menos claro. Un mecanismo probable es que la regulación incrementada o la expresión aberrante de ciertas claudinas puede contribuir a la neoplasia al alterar directamente la estructura y la función de la TJ. Además, se postula que las claudinas también pueden afectar a las vías de señalización celular relacionadas con evasión de la apoptosis y resistencia a la quimioterapia. Además, las proteínas claudina probablemente participan en las rutas de señalización a través de dominios de unión a ZO-1 en su extremo carboxilo (78). Se sabe que las proteínas de adhesión célula-célula desempeñan un papel importante en la transformación celular cuando se desplazan de su localización de membrana normal hacia el núcleo y en este punto pueden servir como moléculas oncogénicas. Las moléculas mejor estudiadas son  $\beta$ -catenina que, aunque sirven como moléculas de adhesión célula-célula cuando se expresan en su localización celular anormal, la  $\beta$ -catenina se vuelve oncogénica (62).

### **2.5 Asociación de MUC1/c-Met**

A pesar de que existe información acerca del funcionamiento de MUC1 y c-Met de manera independiente en carcinomas de cabeza y cuello, no existen reportes sobre la interacción o asociación simultánea entre MUC1 y c-Met en este tipo de lesiones. Estudios realizados en suero de pacientes diagnosticados con COCE, demuestran la formación de complejos IgG/ MUC1 y establecen la relación con el avance y etapa del tumor. La formación de este complejo es considerablemente mayor en tumores de gran tamaño, y se ha encontrado una diferencia inversamente proporcional en tumores pobremente diferenciados respecto a la presencia de MUC1 en suero (79). En los pacientes con hepatocarcinoma la expresión de MUC1 y c-Met se encuentra relacionada con el grado de diferenciación histológica, siendo mayor para ambas proteínas en carcinomas pobremente diferenciados comparativamente con los bien diferenciados, indicando una asociación entre su expresión y el grado de agresividad (80).

En este mismo sentido, reportes de estudios realizados en líneas celulares de carcinoma de células escamosas oral, señalan que las funciones de c-Met se encuentran relacionadas al crecimiento tumoral e invasión, observándose incremento en estos eventos cuando se compara con tejido sano y que, además, esto se encuentra en función a la estimulación de su ligando HGF (81).

Estudios realizados con muestras obtenidas por drenaje linfático axilar en pacientes diagnosticados con cáncer de mama han demostrado que la presencia del mensajero de c-Met, representa un valor pronóstico significativo relacionado con el tamaño y grado tumoral. Se ha observado que c-Met y MUC1, moléculas que de manera frecuente se expresan en estos mismos tumores, funcionan como dos moléculas que se encuentran frecuentemente incrementadas, siendo los tumores que desarrollan c-Met mayormente agresivos en comparación con aquellos tumores que expresan únicamente MUC1 (23). Asimismo, se ha observado en adenocarcinoma pancreático que MUC1 funciona como un regulador de la actividad de señalización de c-Met, proponiendo que MUC1 proporciona un medio ambiente propicio para la activación de c-Met aún sin la presencia de su ligando HGF. En este mismo estudio se demostró que c-Met funciona como una cinasa para MUC1, ya que c-Met fosforila la región citoplasmática de MUC1 en el motivo YHPM la cual es crucial para la localización nuclear de la cola citoplasmática de MUC1 y su actividad transcripcional (41). En pacientes con carcinoma gástrico se ha observado mediante análisis de RT-PCR en sangre, incremento en los niveles de RNA de MUC1 y c-Met, así como una relación entre la progresión clínica y un peor pronóstico en los pacientes con expresión simultánea de MUC1/Met. Algunos reportes indican que la activación de c-Met puede llevarse a cabo mediante la cola citoplasmática de MUC1 (**Figura 6**) para una fosforilación posterior en el motivo YHPM. Es sabido que esta fosforilación es importante para la localización nuclear y activación subsecuente de p53 y MMP1, moléculas que participan en procesos relacionados con invasión tisular (41).

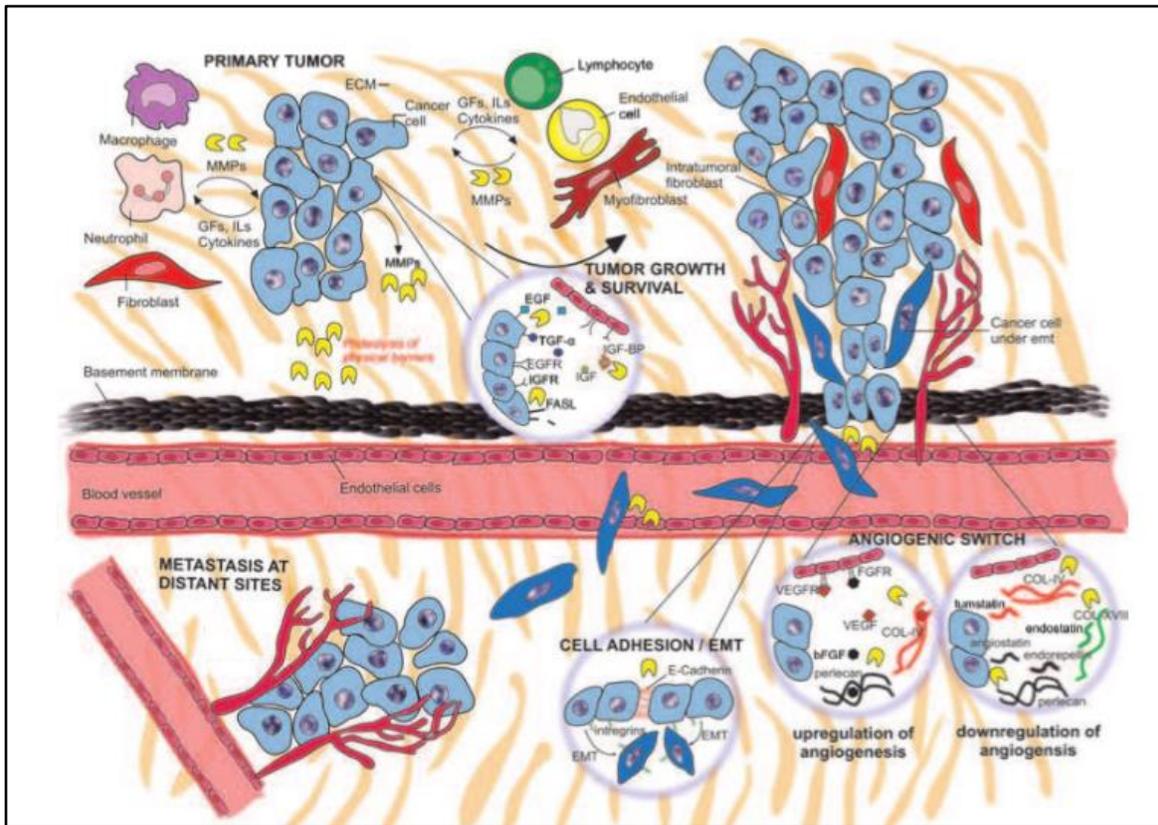


**Figura 6. Región de interacción de c-Met.** Región identificada mediante espectrometría de masas como un sitio de unión para MUC1 en el dominio intracelular o dominio cinasa de c-Met. Los sitios de fosforilación en la región F1234 a la R1245 permiten la activación vía su ligando HGF o la asociación con otros receptores con actividad tirosina cinasa. Tomada y modificada de: Singh P, Behrens M, Eggers J, Cerny R, Bailey J, et al. Phosphorylation of MUC1 by Met modulates interaction with p53 and MMP1 expression. *J Biol Chem* 2008;283:26985-26995

La movilidad de las células tumorales debe vencer la resistencia que ofrece el tejido sano circundante al tumor. Los tumores que expresan MUC1 y c-Met presentan un incremento considerable en el grado de agresividad.

Los mecanismos esenciales desplegados por las células neoplásicas en este sentido están mediados fundamentalmente por las acciones de las metaloproteinasas de matriz (MMP), un grupo de enzimas ricas en zinc que tienen la capacidad de degradar la matriz extracelular. Muchas de ellas se expresan en el cáncer oral y pueden jugar un papel importante en su progresión. Se ha reportado que la MMP-2 está asociada también a la capacidad de hacer metástasis a ganglios linfáticos (**Figura 7**) (82).

Existen diferentes tipos de herramientas para el estudio de la actividad de c-Met y MUC1, en el primer caso, el inhibidor selectivo de la actividad cinasa de Met, SU11274, ha demostrado ser una sustancia efectiva para evaluar la actividad *in vitro* así como las moléculas relacionadas a su activación en distintos tipos de neoplasias (83, 84). En el segundo caso, la inhibición de la actividad catalítica de MUC1 se ha realizado con GO201, inhibidor del motivo -CQC- de corte de la cola citoplasmática de MUC1, evitando la translocación al núcleo y su actividad proliferativa y antiapoptósica (85,86). Estos inhibidores resultan de particular importancia en el estudio de la actividad biológica *in vitro* de las neoplasias empleadas debido a su alto grado de selectividad ya que permiten estudiar bajo condiciones controladas, la expresión de moléculas relacionadas a la activación de sus vías canónicas.



**Figura 7. Papel de las MMP en la progresión del cáncer.** La progresión del cáncer involucra el crecimiento tumoral, invasión, metástasis y angiogénesis, todos los cuales pueden ser modulados por MMP. La expresión de MMP en el microambiente tumoral depende no solo de las células cancerosas, sino también de las células estromales vecinas. Las MMP ejercen su actividad proteolítica y degradan las barreras físicas, facilitando la angiogénesis, la invasión de células tumorales y la metástasis. El crecimiento tumoral y la angiogénesis también dependen de la mayor disponibilidad de moléculas de señalización, como los factores de crecimiento y las citocinas, pero las MMP hacen que estos factores sean más accesibles para las células cancerosas y el microambiente tumoral. Esto ocurre liberándolos de la MEC (IGF, bFGF y VEGF) o desprendiéndolos de la superficie de la célula (EGF, TGF- $\alpha$ , HB-EGF). Las MMP también modulan las interacciones célula-célula y célula-ECM, E-cadherina e integrinas, respectivamente, afectando tanto al fenotipo celular (EMT) como al aumento de la migración celular. Tomado de FEBS J. 2011;278(1):16-27.

Es importante señalar que tanto Met como MUC1 son moléculas que presentan relación con eventos relacionados con regulación de la proliferación celular y apoptosis. Sin embargo, señales aberrantes provocadas por mutaciones, sobreexpresión, conducen a una inapropiada activación de vías de señalización relacionadas con tumorigénesis, proliferación y apoptosis. La activación dependiente o independiente de ligando (autoactivación) recluta efectores de señales localizados en el dominio citoplasmático de Met que le permiten interactuar con receptores tirosina cinasa, con MUC1 o moléculas relacionadas con los eventos antes mencionados tal como Ras-MAPK, PI3K, Src and Stat3 (18). Por su parte se ha establecido que la fosforilación de MUC1 en los residuos de tirosina de la región citoplasmática puede estar asociada a la activación de ERK1/2. Mientras, la activación por receptores de factores de crecimiento regula su asociación con otras proteínas como  $\beta$ -catenina o E-caderina y la activación de las vías asociadas a estas moléculas (87).

### **3. Justificación**

La comprensión de la biología molecular del cáncer, específicamente de cabeza y cuello ha progresado significativamente. El desarrollo de nuevos enfoques diagnósticos y terapéuticos para COCE requiere una mejor comprensión de la patogénesis molecular y de los eventos moleculares implicados en el crecimiento, invasión y metástasis. Los cambios en el patrón de expresión y activación de mucinas y receptores tirosina cinasa se han estudiado en el proceso de carcinogénesis. Se ha demostrado que éstas pueden afectar los procesos de proliferación celular, apoptosis, interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. No obstante, en tejidos transformados aún no han sido completamente esclarecidos los procesos que regulan la fosforilación región citoplasmática de la mucina MUC1 y su interacción con otras moléculas como el receptor c-Met, ambas glicoproteínas de importancia comprobada en los procesos de transformación maligna. Hasta el momento pocos estudios han sugerido la interacción de las mucinas con receptores tirosina cinasa en el desarrollo tumoral, más

específicamente en procesos de invasión en neoplasias malignas de cabeza y cuello. En modelos experimentales de carcinoma pancreático y de mama se ha determinado que la asociación entre MUC1 y c-Met se relaciona con el grado de invasión y metástasis. Por su parte la inhibición farmacológica de c-Met así como de las mucinas, han sido considerados como un blanco terapéutico eficaz para prevenir el desarrollo de invasión y metástasis. En este mismo sentido, fenómenos regulados por genes y sus productos tales como los relacionados con moléculas de adhesión, se han asociado con estos procesos y su regulación puede encontrarse relacionada con receptores tirosina cinasa y mucinas. Por tal motivo el presente trabajo propone evaluar *in vitro* el efecto de la inhibición farmacológica de MUC1 y c-Met sobre la expresión de moléculas clave involucradas en mecanismos de proliferación, apoptosis e invasión en dos neoplasias de cabeza y cuello.

#### **4. Objetivo general**

Determinar el efecto de la inhibición farmacológica de MUC1 y c-Met sobre la proliferación celular, apoptosis e invasión en dos líneas de carcinoma de cabeza y cuello *in vitro*.

##### **4.1 Objetivos específicos**

Determinar en las líneas celulares Cal27 y A253:

- a) La dosis de inhibición para MUC1 y c-Met así como el efecto sobre la proliferación celular y apoptosis en las líneas celulares estudiadas.
- b) El índice de invasión y motilidad celular mediante ensayos funcionales de EMC y cierre de herida.
- c) El grado de expresión y localización de moléculas de invasión: e-cadherina, Claudina-1, 3 y 9, integrina- $\alpha$ V $\beta$ 1, MMP2, -MMP9, -TIMP1, -TIMP2.

## 5. Hipótesis

La inhibición farmacológica de MUC1 y c-Met tiene efecto sobre la expresión de moléculas relacionadas con procesos proliferación celular, apoptosis e invasión en dos líneas celulares de carcinomas de cabeza y cuello.

## 6. Materiales y métodos

*Químicos y anticuerpos.* Se utilizaron tripsina-EDTA como agente de disociación, medio de cultivo DMEM, medio de cultivo McCoy, SU11274 (inhibidor selectivo de c-Met) y GO-201 (inhibidor selectivo de MUC1) obtenidos de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EE. UU.); el suero bovino fetal (FBS) se adquirió en Byproducts (Guadalajara, Jalisco, MEX); Bromuro de 3- (4,5-dimetil-2-il) -2,5-difeniltetrazolio para ensayo de viabilidad celular (MTT) de Roche (Roche Diagnostics Inc., EE. UU.). Anticuerpos: IgM de conejo policlonal anti -MMP2, -MMP9, -TIMP1, -TIMP2, -Cldn1, -Cldn3, -E-cadherina, -integrina- $\alpha$ V $\beta$ 1, e IgG anti-Cldn9 monoclonal de ratón se compraron en Genetex (Concord, CA, EE.UU. USA); IgG policlonal anti-p-Met Y1234 y anti-MUC1 de Abcam (Cambridge, MA, EE.UU.), y anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -actina de ratón IgG de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, EE. UU.).

### 6.1 Cultivo celular y tratamiento

Líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello: la línea celular CAL 27 (carcinoma de células escamosas de lengua, grado de diferenciación-G3, (ATTC CRL-2095) se estableció a partir de una lesión en la mitad de la lengua (25) y la línea celular A253 a partir de un carcinoma de glándula salival submaxilar (ATCC HTB-41). Las células se cultivaron en medio DMEM y McCoy, respectivamente, y se suplementaron con suero bovino fetal al 10%, penicilina G (60 mg / l) y estreptomina (100 mg / l) a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub>. Para el ensayo de viabilidad celular (MTT). Se sembraron una cantidad de  $2 \times 10^3$  células en cajas de 96 pozos hasta llegar a una confluencia del 80%. Las células se trataron con SU11274 (inhibidor de c-Met) y GO-201 (inhibidor de MUC1) a concentraciones de 1-100  $\mu$ M durante 24 h. Después de ese tiempo, se agregaron 10  $\mu$ L de MTT a cada pocillo y se incubaron durante 4 horas a 37°C en una atmósfera húmeda. Posteriormente, se añadieron 100  $\mu$ L de solución solubilizante y, después de 24 h, se evaluó la

viabilidad celular en un espectrofotómetro de ELISA con una referencia de 550-600 nm.

## **6.2 Inmunocitoquímica**

En un sistema Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™, las células se sembraron y se trataron con inhibidores farmacológicos a una concentración de 10 µM. Las células se fijaron con formalina. Después de bloquear con 5% de albúmina de suero bovino durante 1 h, las células se incubaron con anticuerpos anti claudinas-1, -3 y -9, metaloproteinasas 2 y 9, y E-cadherina (Genetex Concord, CA, EE. UU.) (1: 100) durante la noche a 4 ° C. Luego se incubaron con el sistema de anticuerpos secundarios Multilink (Dako, Denmark A / S, Glostrup Denmark) durante 1 hora a temperatura ambiente, se montaron y se visualizaron con un microscopio Olympus DX40.

## **6.3 Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) e inmunotransferencia**

La preparación de los lisados celulares se realizó con extractos totales preparados usando CelLytic MT obtenida de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EE. UU.) De acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se aplicaron a SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. Después de la transferencia, las membranas se bloquearon con 5% de albúmina de suero bovino durante 1 h a temperatura ambiente, luego se incubaron con cada anticuerpo primario (dilución 1: 500) a 4 ° C durante la noche, seguido de incubación con un anticuerpo secundario IgG conjugado con HRP (Dilución 1: 1000) a temperatura ambiente durante 1 h. Las membranas se visualizaron utilizando el método de detección de quimioluminiscencia (ECL) (ECL Plus Western Blotting Detection System, Amersham Biosciences, Foster City, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y, finalmente, se expusieron a una película. La película fue escaneada para análisis densitométrico usando el Software de Análisis de Imágenes (Thermo Fisher Scientific Inc. Wyman, Waltham, MA EE. UU.). los valores se normalizaron a los valores densitométricos de actina en cada muestra. Se calculó el cambio en la cantidad de proteína para los conjuntos experimentales y se comparó con el control.

#### **6.4 Zimografía de gelatina**

La actividad gelatinasa de MMP2 y MMP9 se determinó mediante zimografía de gelatina. Brevemente, las células Cal27 y A253 se trataron con concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  de SU11274 y GO-201 durante 24 h. Posteriormente, el medio se recogió y se mezcló con buffer de muestra no reductor para ser corrido mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio al 10% (SDS / PAGE) en presencia de 1 mg / ml de gelatina A y B correspondiente al sustrato de la MMP2 y 9 respectivamente. El gel resultante de la corrida se lavó en Tris 10 mM (pH 8,0) que contenía Triton X-100 al 2,5%, y se incubó durante la noche en un buffer de desarrollo a 37 ° C; finalmente se tiñe el gel con azul Coomassie brillante y decoloró hasta que la actividad gelatinasa fue identificable como bandas claras.

#### **6.5 Ensayo de invasión celular**

La capacidad de invasión celular de las líneas celulares se determinó usando el ensayo de invasión EMC (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). En total, se sembraron  $3 \times 10^5$  células en la parte superior de cada uno de los insertos en medio libre de suero con y sin los inhibidores. Se colocó un volumen igual del mismo medio con 10% de SFB en la cámara inferior (debajo del filtro) para actuar como un quimioatrayente. La placa de ensayo se incubó a 37°C durante 24 h pasado ese tiempo, las células / medios se eliminaron del lado superior del inserto, y la cámara de invasión se colocó en un pozo limpio que contenía una solución de desprendimiento de células. Después de 30 minutos, las células se desprendieron de la parte inferior, inclinando la cámara de invasión e incubando con colorante CyQuant GR con buffer de lisis. Finalmente, el sobrenadante de la placa inferior y se lee con un lector de placas fluorescente.

La capacidad de migración de las células se evaluó mediante la realización de una herida con una punta de micropipeta de 200  $\mu\text{l}$  en cajas de 6 pozos. En este ensayo se observó la capacidad de cubrir la zona después de 12 y 24 h bajo las mismas condiciones de tratamiento. Pasando los tiempos indicados se toman micrografías y se evaluó la distancia entre los extremos de la herida en los diferentes grupos de tratamiento para finalmente graficar el porcentaje de migración de las células.

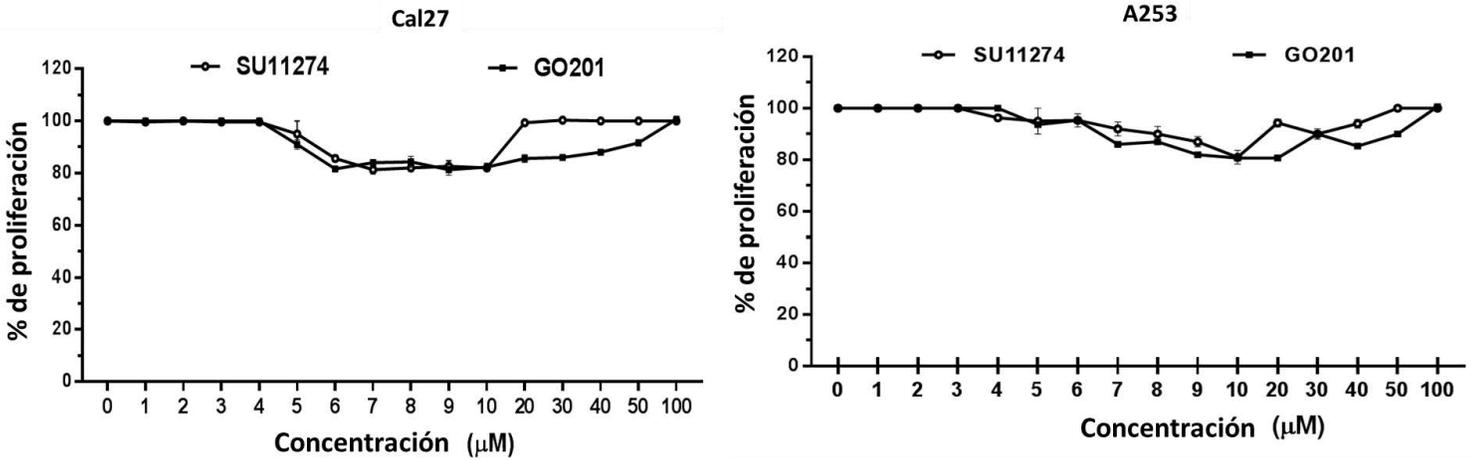
## **6.6 Estadística**

Los resultados se presentan como medias  $\pm$  SD. Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía y las correcciones se hicieron para comparaciones múltiples usando la prueba múltiple de Tukey. Las comparaciones entre dos grupos se realizaron utilizando la prueba t de Student. Se asumieron diferencias significativas con  $P < 0.05$ .

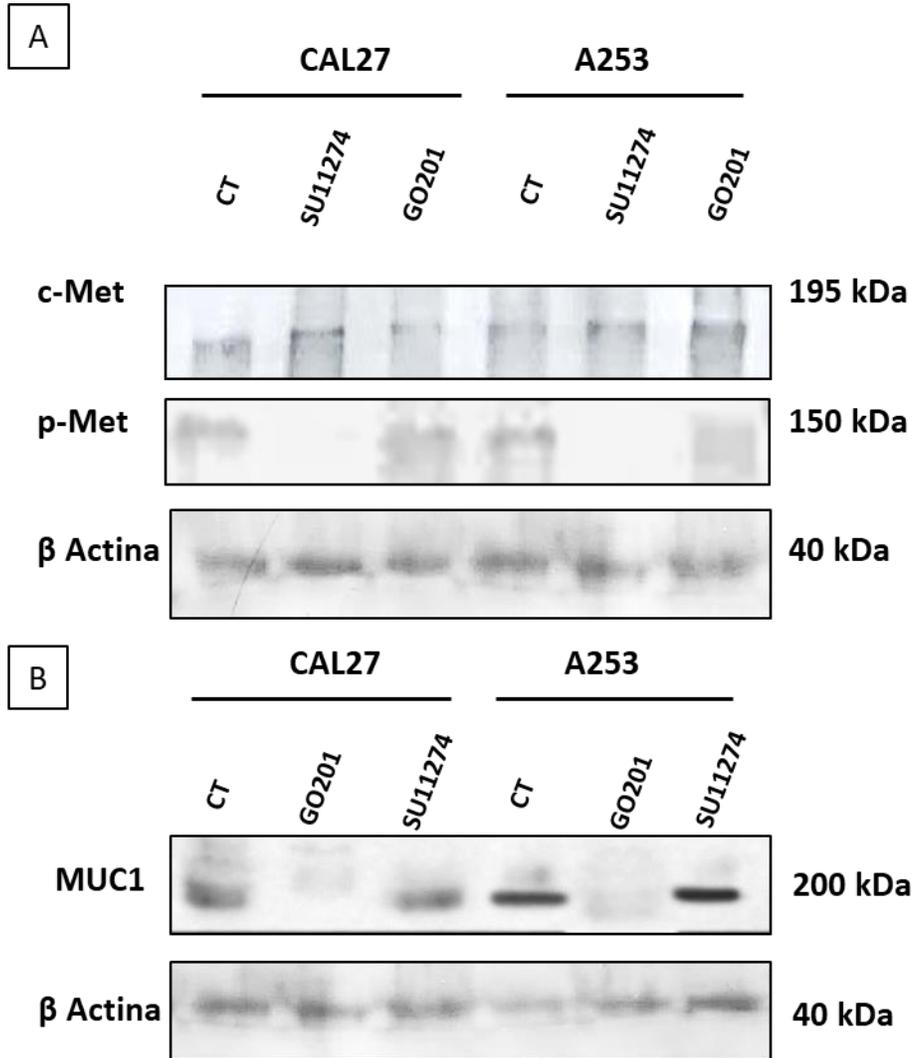
## **7. Resultados**

### **7.1 Inhibición farmacológica de MUC1 y c-Met en líneas celulares**

Las líneas celulares Cal27 y A253 se trataron con concentraciones graduales desde 0, hasta 100  $\mu$ M de los inhibidores SU11274 y GO201 durante 24 h. Posteriormente se midieron los efectos inhibitorios sobre el grado de proliferación celular. Como se muestra en la figura 8, el efecto inhibitorio de la proliferación se comienza a observar a baja concentraciones en ambas líneas teniendo como máximo efecto inhibitorio la concentración de 10  $\mu$ M. Posteriormente, las células se trataron con esta misma dosis de 10  $\mu$ M SU11274 y GO201 durante 24 horas y la inhibición de MUC1 y c-Met se observó mediante western blot. Se utilizaron anticuerpos de las regiones catalíticas de ambas moléculas, un anticuerpo anti-P-Y1234 que reconoce una de las tirosinas con mayor actividad de c-Met y el otro, que reconoce la porción citoplasmática de MUC1 (MUC1CT), región de activación y corte de su cola citoplasmática que permite su translocación al núcleo. Como se observa en la figura 9A, en las células tratadas con SU11274 se redujo el estado de fosforilación de c-Met en P-Y1234 mientras que por su parte, se observa en la figura 9B, que en las células tratadas con GO201 se redujo la expresión de MUC1CT después del tratamiento con 10  $\mu$ M del fármaco. Estos resultados muestran que la actividad catalítica de ambas moléculas se encuentra inhibida y es la razón por la cual utilizamos la concentración de 10  $\mu$ M en todos nuestros experimentos siguientes como dosis de trabajo.



**Figura 8.** Viabilidad celular a las 24 h de inhibición en Cal27 (A) y A253 (B). Las células fueron tratadas con SU11274 y GO201 y la absorbancia fue medida en presencia de 0-100 µM de los fármacos a las 24 h. El símbolo —○— Indica la viabilidad para SU11274 y el símbolo —■— para GO201. En la línea cal27 se observa disminución a partir de 6 µM mientras que en la línea A253 a partir de 7 µM. El máximo efecto inhibitorio fue observado a la concentración de 10 µM en ambas líneas celulares. Los experimentos se realizaron por triplicado.



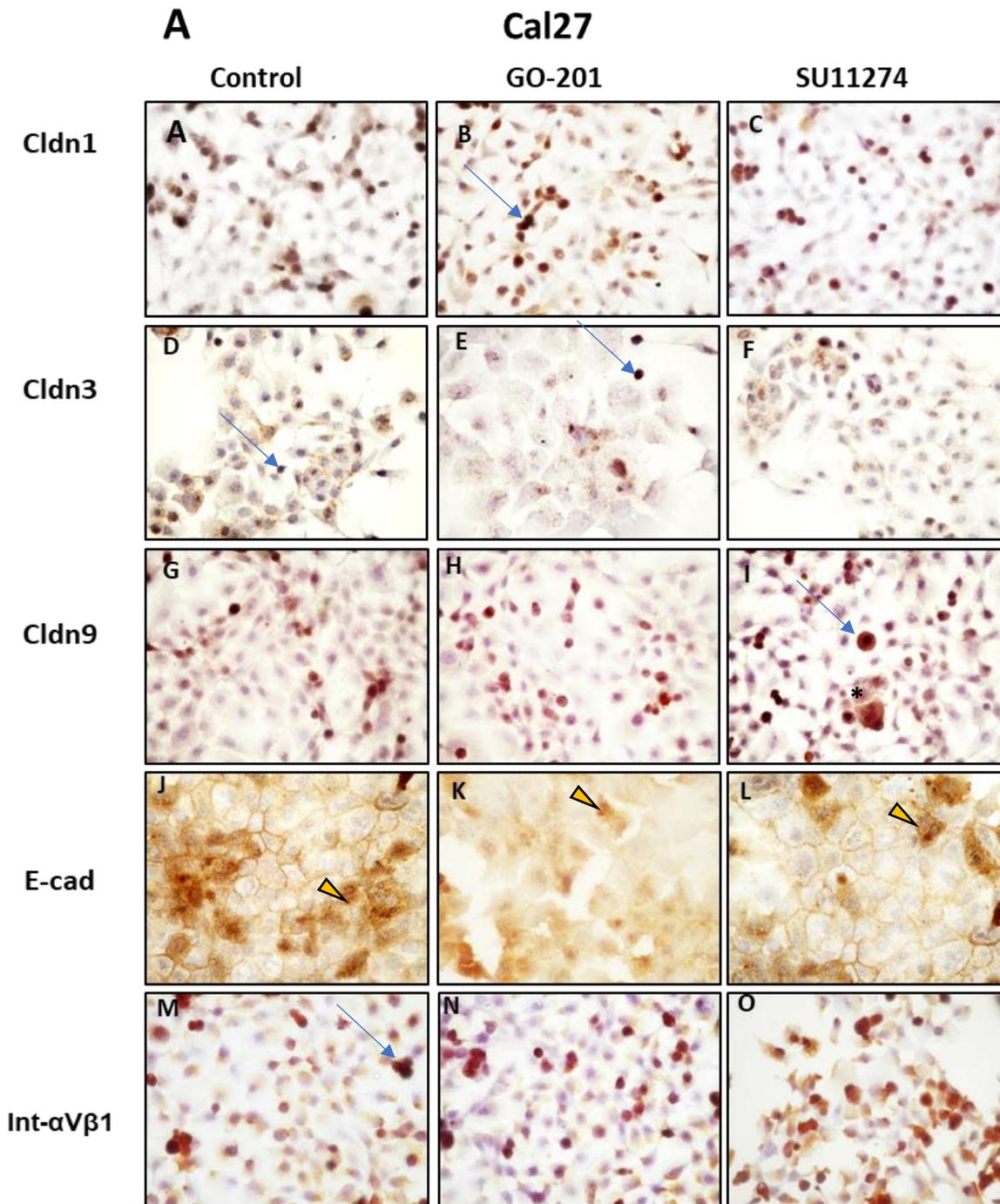
**Figura 9.** Expresión de c-Met y MUC1 después de 24 h inhibición. Las células fueron tratadas con 10  $\mu$ M SU11274 y GO201 e incubadas con anti-Met, p-Met Y1349, y anti-MUC1-CT. Como se muestra en **(A)**, después del tratamiento con SU11274, se observa disminución en el estado de fosforilación de Met. **(B)** Se observa disminución de MUC1-CT después del tratamiento con GO201.

## **7.2 Efecto de c-Met y MUC1 sobre la expresión de moléculas de adhesión**

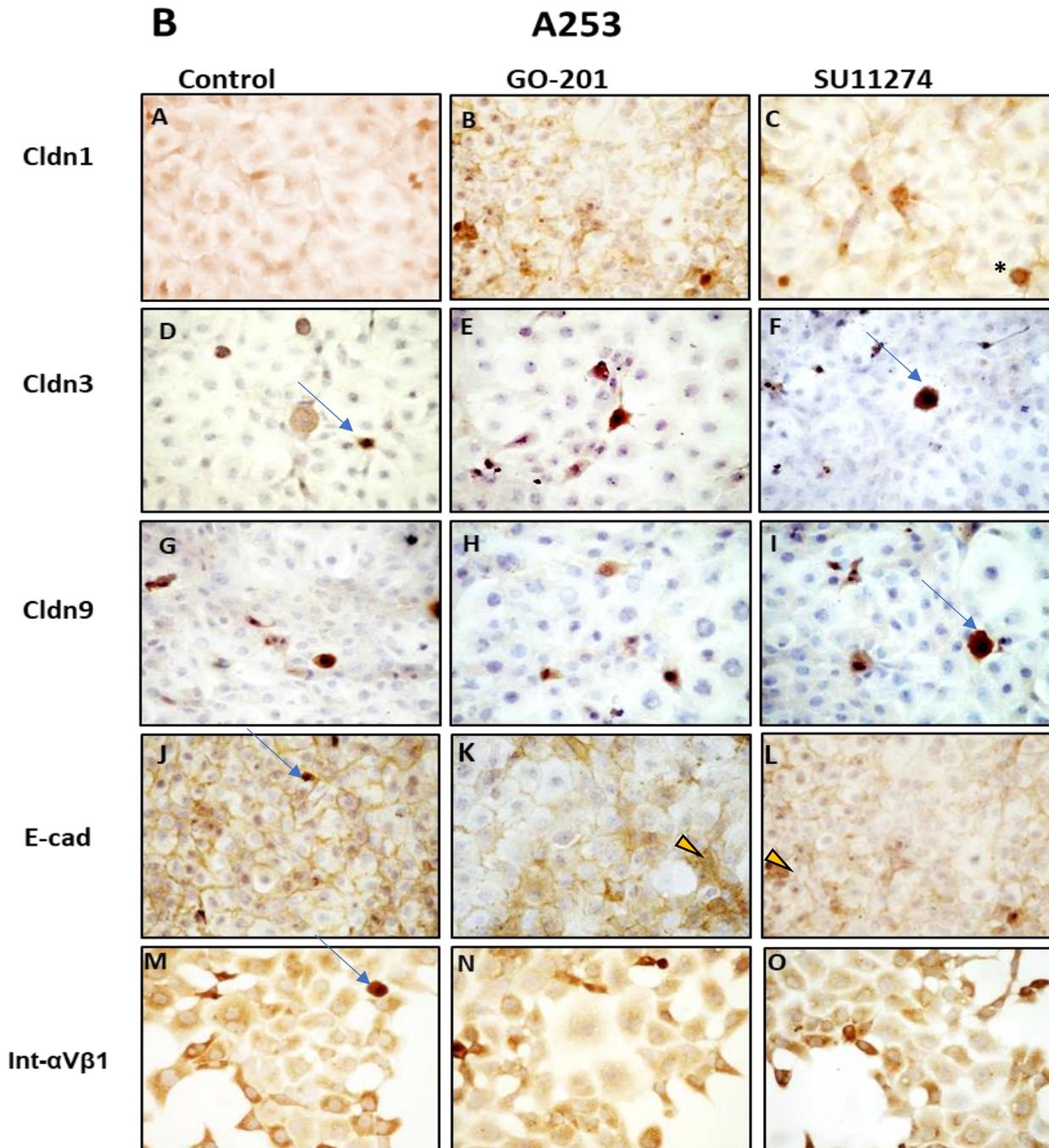
Con la finalidad de evaluar la localización y expresión de las moléculas de adhesión se realizaron los ensayos de inmunocitoquímica y western blot respectivamente. Después del tratamiento con concentraciones de 10  $\mu$ M de SU11274 y GO-201 durante 24 h, se realizó inmunocitoquímica de claudina-1, claudina-3, claudina-9, E-cadherina e integrina  $\alpha$ V $\beta$ 1.

*Localización de las moléculas de adhesión en la línea Cal27.* Como se muestra en la figura 10A, se puede observar la localización nuclear intensa en la claudina 1, 3, 9 e integrina y localización citoplasmática moderada solo en algunas células. E-cadherina se puede observar en su localización membranal y en algunos grupos de células se puede observar con expresión intensa en el citoplasma. Después del tratamiento con el inhibidor de MUC1 se observa disminución en la expresión de claudina 3. Con el resto de los marcadores, no observamos cambios en su expresión o localización después de la inhibición farmacológica.

*Localización de las moléculas de adhesión en la línea A253.* Como se puede observar en la figura 10B, el patrón de expresión de proteínas de unión claudina-1, claudina-3, claudina-9, E-cadherina e integrina en la línea A253, la expresión de claudina 3 y 9 fue leve citoplasmática. La localización nuclear fue intensa en algunas células para la claudina 1, 3, 9 e integrina, mientras que la expresión citoplasmática fue moderada en algunas células. Con lo que respecta a E-cadherina se puede observar con una localización membranal, mientras que en algunos grupos de células se puede observar en el citoplasma. La expresión de la integrina se observó intensa en el citoplasma, en algunos casos nuclear muy intensa. Después del tratamiento con el inhibidor de MUC1 y c-Met no se observaron cambios en la intensidad del marcaje o la localización de las moléculas.

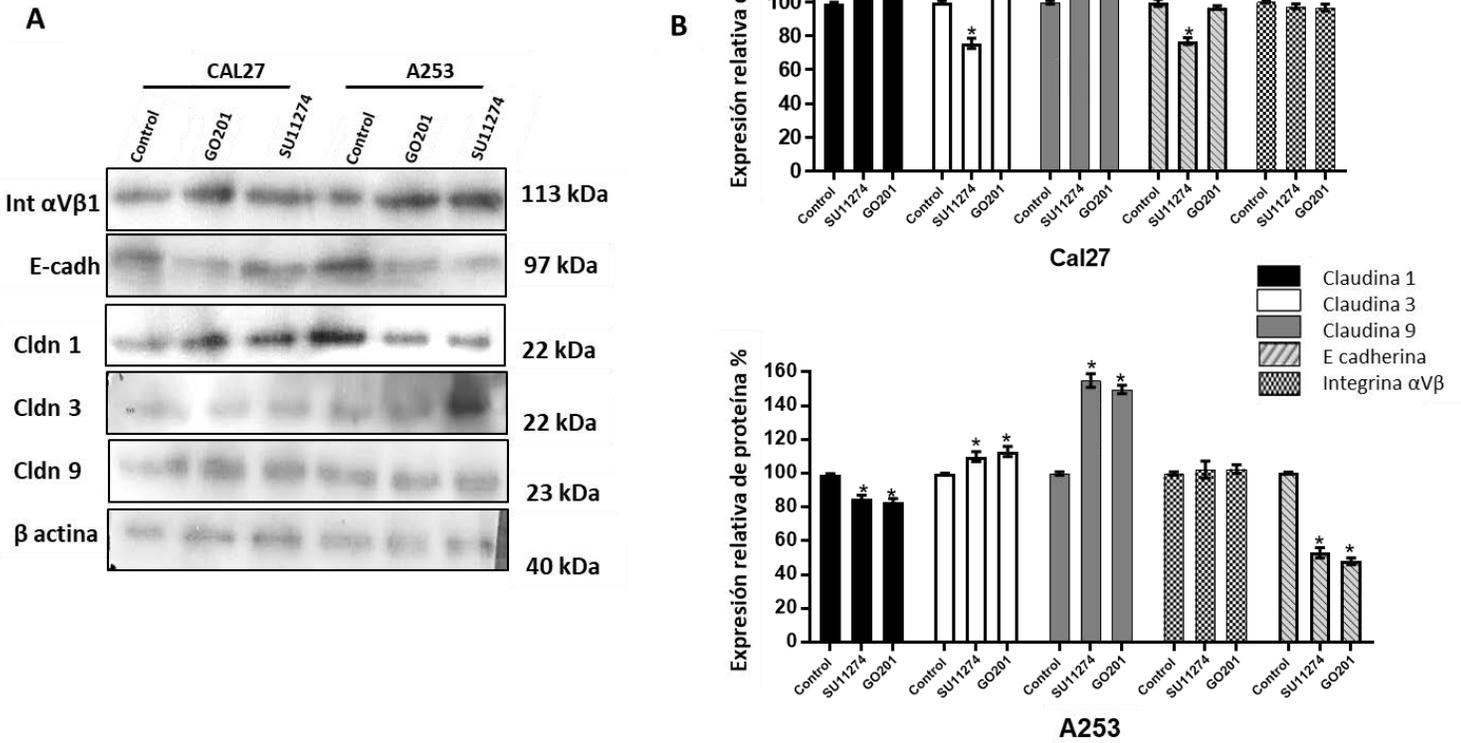


**Figura 10. A.** Patrón de expresión de proteínas de unión claudina-1, claudina-3, claudina-9, E-cadherina e integrina en la línea Cal27. Se puede observar localización nuclear intensa (flecha) en la claudina 1, 3, 9 e integrina y citoplasmática moderada solo en algunas células (asterisco). E-cadherina se puede observar en su localización membranal, en algunos grupos de células se puede observar en el citoplasma (punta de flecha). Después del tratamiento con el inhibidor de MUC1 se observa disminución en claudina 3, no obstante, en los demás marcadores no se observaron cambios en la intensidad del marcaje o la localización de las moléculas.



**Figura 10. B.** Patrón de expresión de proteínas de unión claudina-1, claudina-3, claudina-9, E-cadherina e integrina en la línea A253. Se puede observar la expresión de claudina 3 y 9 leve citoplasmática. Localización nuclear intensa (flecha) en la claudina 1, 3, 9 e integrina en algunas células y expresión citoplasmática moderada en algunas células (asterisco). E-cadherina se puede observar en su localización membranal, en algunos grupos de células se puede observar en el citoplasma (punta de flecha). La expresión de la integrina se observó intensa en el citoplasma, en algunos casos nuclear muy intensa. Después del tratamiento con el inhibidor de MUC1 y c-Met no se observaron cambios en la intensidad del marcaje o la localización de las moléculas.

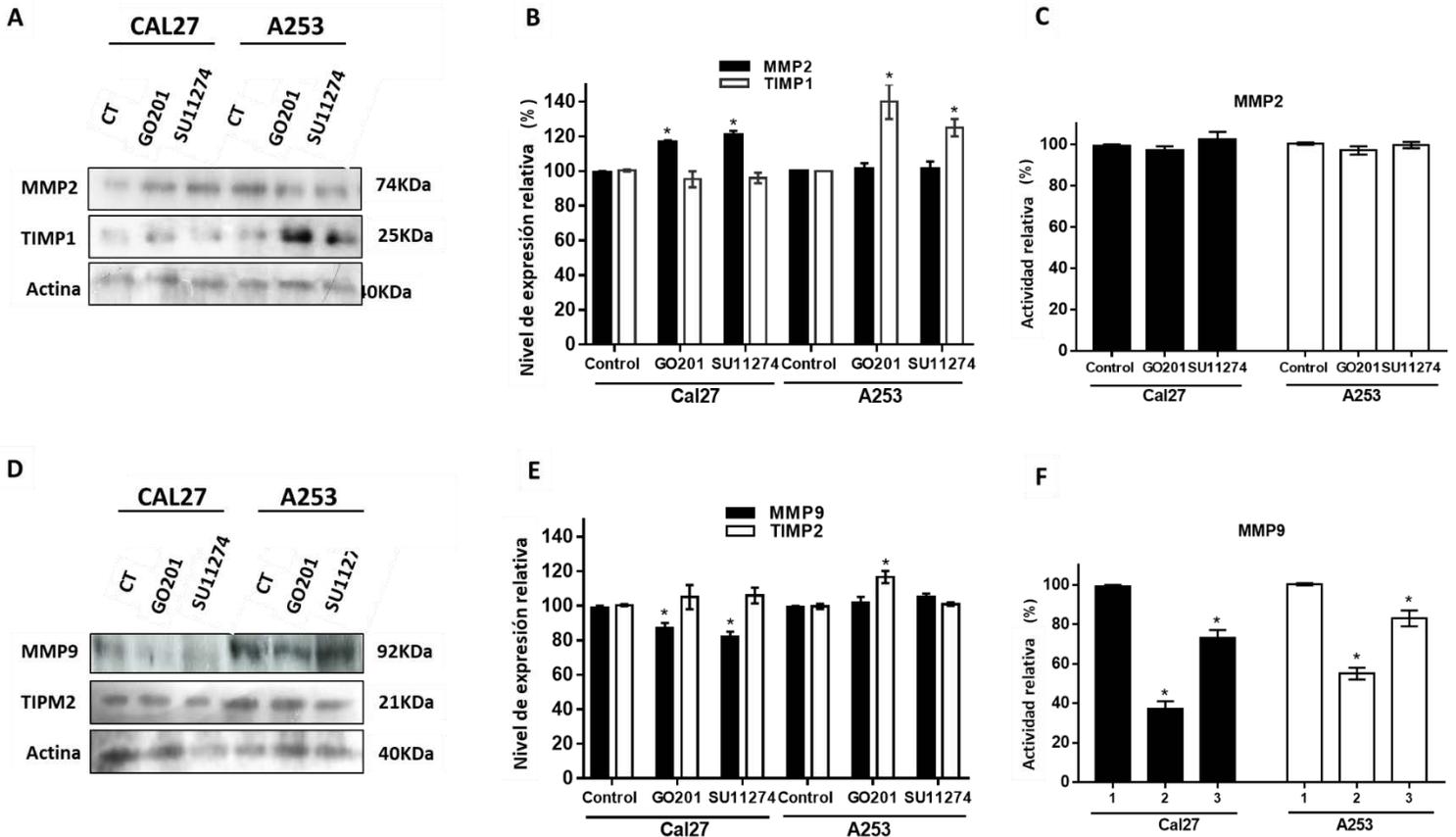
De igual manera, como se observa en la figura 11, la expresión de las moléculas de adhesión se evaluó de manera semicuantitativa por densitometría. La expresión después del tratamiento con los inhibidores fue variable para las moléculas de adhesión claudina-1, 3, 9 y E-cadherina, aumentando en el caso de Claudina 1 y 9 en la línea Cal27, y disminuyendo como fue el caso de e-cadherina en la línea A253, o permaneció sin cambios como pudo observarse en ambas líneas celulares con la integrina. Estos resultados sugieren un patrón de expresión de moléculas y localización dependiente de la línea tumoral.



**Figura 11.** Alteración de la expresión de las moléculas de adhesión por GO-201 y SU11274. (A) Se realizó inmunoblotting del extracto de proteína con anti-claudina.1, claudin-3, claudin-9, E-cadherina e integrina  $\alpha\text{V}\beta$ . (B) La expresión relativa de los niveles proteína fue representada a las 24 h de tratamiento en las gráficas de barras (10 $\mu\text{M}$ ) (\*,  $P < 0.01$ ). Los experimentos se realizaron por triplicado.

### 7.3 Expresión y actividad de metaloproteasas en líneas celulares de carcinomas de cabeza y cuello

Después del tratamiento farmacológico encontramos que la expresión de MMP-2 no se vio afectada y TIMP1 aumentó después de la aplicación de GO201 y SU11243 (Figuras 12A y 12B). La expresión de MMP-9 fue menor después tratamiento en las células Cal27 y no se produjo ningún cambio en las células A253 (Figuras 12D y 12E). Para investigar los mecanismos de MUC1 y c-Met regulando la actividad de metaloproteasas en células de cáncer oral, realizamos zimografía de gelatina. Nuestros resultados mostraron que la actividad de MMP-2 no fue afectada después del tratamiento de las células (Figura 12C). Sin embargo, la actividad de MMP-9 fue menor después del tratamiento de las líneas celulares con ambos inhibidores (Figura 12F).

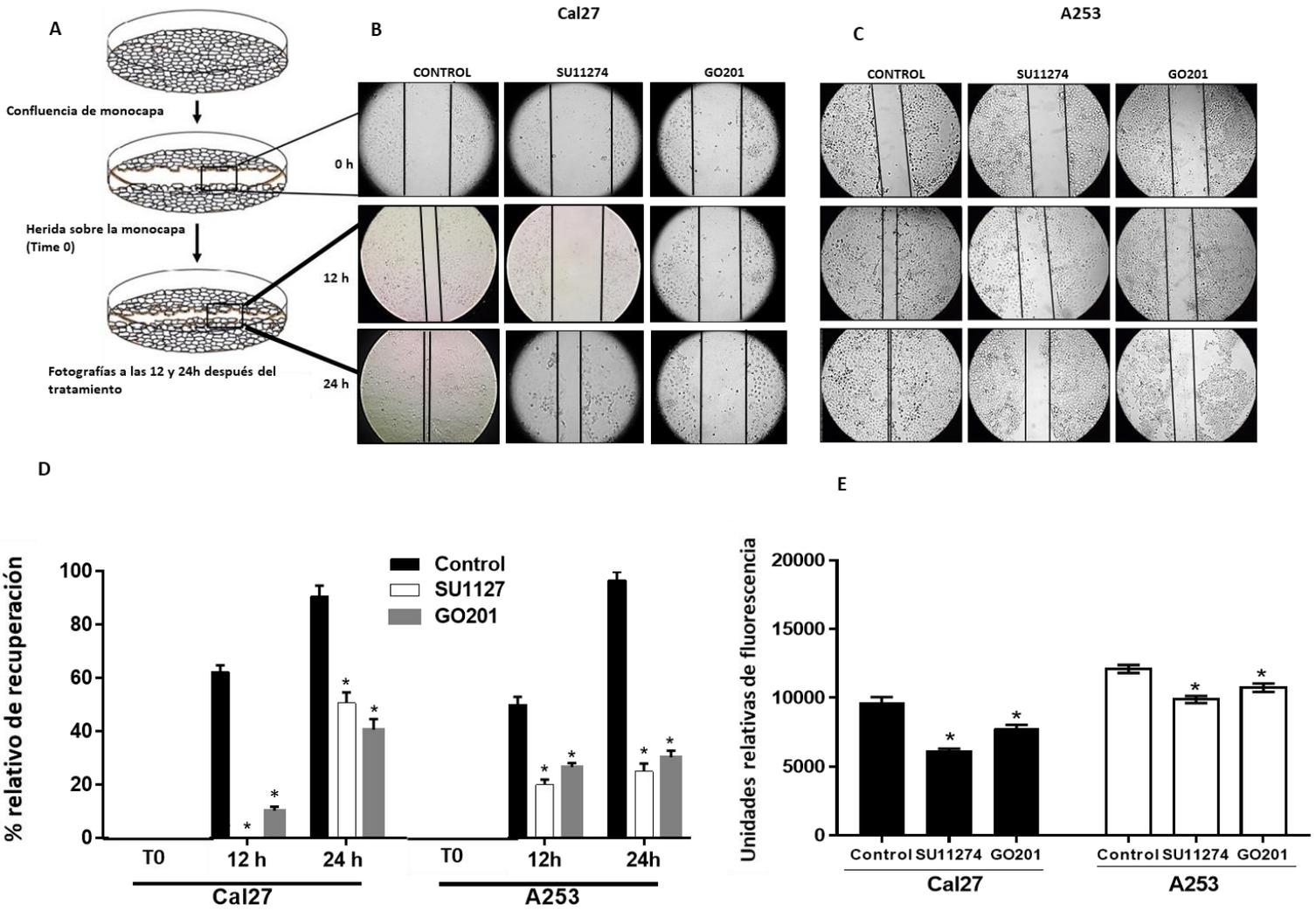


**Figura 12. Efecto de los inhibidores sobre la actividad de las metaloproteasas.** Después del tratamiento con 10  $\mu$ M de SU11274 y GO201, el lisado total fue evaluado por inmunoblotting con MMP2 y TIMP1 (A), MMP9 y TIMP2 (D). La expresión relativa de los niveles de proteínas fue representado en valores densitométricos a las 24 h de tratamiento (B, E). La actividad de MMP2 y MMP9 fue evaluada mediante zimografía y las diferencias entre grupos fue representada en las gráficas (\*,  $P < 0.01$ ). (F) Se puede observar después del tratamiento disminución para la MMP9 con ambos inhibidores mientras que no existen cambios significativos para la MMP2 (C). Los experimentos fueron realizados por triplicado.

#### **7.4 Efectos sobre la migración y la invasión en células Cal27 y A253**

Para evaluar la capacidad de migración de las células, se realizó el ensayo de cierre de herida. Después de realizar el tratamiento con 10  $\mu$ M de SU11274 y GO201 durante 24 h, se pudo observar que la tasa de migración fue menor en las células tratadas con los inhibidores farmacológicos en comparación con el grupo control. En ambas líneas celulares la capacidad de migración de los grupos controles es cercana al 100%. No obstante, a las 24 h de tratamiento observamos en Cal27 una afectación mayor en la tasa de migración con el inhibidor de MUC1 comparado con el de c-Met (Figura 13 B). Por su parte, en A253 observamos disminución de la tasa de migración similar con los dos inhibidores farmacológicos a las 24 h (Figura 13 C).

Por otra parte, se realizó el ensayo EMC para determinar la tasa de invasión en células de carcinoma de cabeza y cuello in vitro. Mediante el ensayo observamos que la tasa de invasión se ve afectada con los dos inhibidores, siendo mayor el efecto inhibidor de c-Met en comparación al de MUC1 (Figura 13E). Asimismo, pudimos observar que la línea celular Cal27, obtenida de un carcinoma de lengua, es más afectada por los tratamientos en comparación con A253 obtenida de un adenocarcinoma. Nuestros resultados sugieren que MUC1 y c-Met juegan un papel importante en los procesos de migración celular e invasión in vitro y que el grado de afectación depende de la naturaleza del tumor.



**Figura 13.** Ensayo de cierre de herida. **(A)** Procedimiento esquemático **(B, C)** fotografías tomadas de los cultivos en tiempos 0 h (inmediatamente después del rasgado) y con los intervalos indicados de tiempo mostrando el cierre de la herida después de la inhibición con GO-201 y SU11274. **(D)** la decreciente de migración de las células Cal-27 and A253 se representa en los histogramas. **(E)** GO-201 and SU11274 inhiben el grado de migración en las células Cal-27 and A253 cells. Las unidades relativas de fluorescencia (RFU) muestran diferencias significativas en ambas líneas celulares después de 24 h de tratamiento. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los histogramas muestran media  $\pm$  SD. \*,  $P < 0.05$ .

## 8. Discusión

Utilizamos las líneas celulares A253 y Cal27 en este estudio para comprender los cambios durante el tratamiento farmacológico con inhibidores de la actividad funcional de MUC1 y c-Met y su efecto sobre de uniones estrechas y mealoproteinasas. La línea celular A253 se ha utilizado en xenoinjertos como una línea de carcinoma de células escamosas bien diferenciada y con características de resistencia a la quimioterapia (88, 89, 90) y Cal27, que tiene un grado de moderadamente diferenciado. Estas líneas celulares difieren en sus características morfológicas, de inmunogenicidad, crecimiento y resistencia a los fármacos citotóxicos (91). Además, debido a su probada capacidad invasiva (90,91), se utilizaron en nuestro estudio para evaluar la invasión y migración, así como la expresión de moléculas de adhesión mediadas por MUC1 y c-Met. De acuerdo con la literatura, no se han utilizado los inhibidores SU11274 y GO201 en las líneas Cal27 y A253, ambas obtenidas de neoplasias de cabeza y cuello; no obstante, su empleo en otros tipos de líneas ha sido útil para evaluar la actividad funcional de c-Met y MUC-1(92-94).

El cáncer de cabeza y cuello ha resultado ser particularmente resistente a las terapias sistémicas. Además, se ha reportado que debido a la resistencia intrínseca o adquirida a los inhibidores de EGFR, la utilidad clínica de esta clase de fármacos como el gefitinib o trastuzumab es limitada (18). Por lo tanto, resulta muy necesario el entendimiento de los mecanismos implicados para combatir esta enfermedad. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la orientación terapéutica de la vía HGF / c-Met puede ofrecer nuevas posibilidades en el tratamiento de pacientes con estos tipos de neoplasia. Asimismo, la interacción con MUC1 resulta relevante ya que como se ha demostrado, su expresión se encuentra altamente expresada en líneas celulares de cabeza y cuello, funcionando en esos casos como un factor pronóstico de la neoplasia (108). Además de estos patrones moleculares, la presentación tardía del COCE, los patrones impredecibles de metástasis y las opciones terapéuticas limitadas para la enfermedad avanzada lo coloca en los diez primeros tipos de cáncer en todo el mundo por tasa de mortalidad. Aproximadamente del 90% de ellos relacionados a la metástasis (95).

En las líneas celulares estudiadas, observamos disminución de la tasa de proliferación en Cal27 y A253. Recientes investigaciones identificaron predominantemente a las claudinas como supresores en tumores malignos humanos y se sabe que su expresión aumentada conduce a la resistencia a medicamentos en el cáncer de colon (96). Otros estudios han determinado que la distribución de claudinas, como la claudina-1, en el núcleo y el citosol está relacionada con la regulación incrementada de los fenómenos de transformación y la proliferación celular en varios tipos de cáncer (97-99). Esto resulta particularmente importante ya que en nuestros resultados observamos localización de Claudina 1, 3 y 9 en el citoplasma y núcleo. Un mecanismo propuesto de la localización errónea de las claudinas es la  $\beta$ -catenina, un componente de TJ con un doble papel bien caracterizado en la adhesión celular (membrana) y en la transducción de señales (citoplásmica y nuclear) que conduce a la transformación de células epiteliales (100). Además, parece que esta ubicación alterada tiene efectos antiapoptóticos (96).

Los resultados de Western Blot revelaron una expresión diferencial de TJs, que se modificó mediante el uso de inhibidores farmacológicos. El patrón de expresión de claudinas es altamente tejido específico, y la mayoría de los tejidos expresan múltiples tipos de claudinas. Esta expresión diferencial de varios miembros de la familia claudina en el cáncer, se puede utilizar potencialmente para confirmar la identidad histológica de ciertos tipos y excluir a otros (101); Además, estudios recientes han identificado varios factores de crecimiento, citocinas y factores de transcripción que afectan la expresión y localización de claudinas. Se ha demostrado que los factores promotores de tumores, como el factor de crecimiento de hepatocitos y el factor de crecimiento epidérmico, disminuyen la expresión de claudina-7 y aumentan la expresión de claudina-1, -3 y -4 en el cáncer de pulmón (101). A su vez, la claudina-1 está regulada negativamente en el cáncer de mama (71), mientras que está regulada positivamente en el carcinoma de colon (77) y el melanoma (99). Asimismo, la localización nuclear de varias proteínas de unión estrecha ( $\beta$ -catenina, ZO), se correlaciona con la transformación oncogénica y la proliferación celular (87,102). De la misma manera, encontramos que la integrina  $\alpha\beta$ 1 estaba localizada al núcleo en la línea A253 pero no en la línea celular Cal27.

Existen pocos informes sobre la ubicación alterada de la integrina  $\alpha\beta 1$  hacia el núcleo asociado en procesos de cáncer. Sin embargo, se ha propuesto que esta ubicación podría promover la expresión de la proteína c-myc, ERK1/2 MAPK y Ras/Akt favoreciendo mecanismos de proliferación celular que puedan favorecer el crecimiento tumoral (103, 104).

Por otra parte, la agresividad de las células tumorales depende de su capacidad para degradar y remodelar la matriz extracelular al activar ciertas proteasas, incluido el activador del plasminógeno y las MMPs (105, 106). Entre las enzimas remodeladoras extracelulares, la actividad de gelatinasa de células tumorales por parte de MMP2 y MMP9 son especialmente relevantes (107). En nuestro desarrollo experimental, la actividad gelatinasa MMP-9 se vio afectada en líneas celulares de carcinoma después de 24 h de tratamiento. El inhibidor endógeno de MMP9, TIMP2, se une a MMP9 y lo mantiene inactivo (107). Encontramos que la expresión de TIMP2 aumenta después del tratamiento con SU11274 y GO201, lo que sugiere una regulación cruzada entre c-Met y MUC1. Las MMPs están estrechamente reguladas a niveles transcripcionales y postranscripcionales por varias citocinas y factores de crecimiento y se controlan a nivel de proteínas a través de sus activadores, inhibidores y proteínas de la superficie celular (41). Se ha demostrado que MUC1-CT físicamente ocupa el promotor de MMP. La presencia de MUC1-CT en el complejo transcripcional AP1 regula la expresión de metaloproteasas y sus inhibidores tisulares (41). Los resultados de la zimografía revelaron una disminución de la actividad de MMP-9, que podría aumentar el potencial invasivo y metastásico en el carcinoma celular a través de la degradación de la matriz extracelular. En muchos tipos de tumores, la expresión de MUC1 se correlaciona con una enfermedad metastásica agresiva, una respuesta deficiente a la terapia y una supervivencia deficiente (108). Nuestros resultados indicaron que la expresión de MUC1 en células cancerosas podría estar asociada con un fenotipo invasivo y crecimiento de cáncer como se ha informado en estudios in vivo que evalúan MUC1 y MUC4 (109). En nuestro estudio, la tasa de proliferación se vio afectada por la inhibición de GO201 y c-Met. Mediante el ensayo de invasión de EMC y el ensayo de cierre de herida, demostramos que, después de la inhibición de MUC1 y c-Met, la actividad invasiva y de motilidad de Cal27 y A253 disminuyeron notablemente, lo

que sugiere que podrían tener potencial para disminuir la progresión, más específicamente la invasión y metástasis. Se ha informado que la expresión de MUC1 se correlaciona con la adhesión e invasión de células MDA-MB-231 y la supresión de MMP2 y MMP9 (107). Por el contrario, nuestro estudio muestra baja actividad de MMP9 solo en células tratadas con GO201 pero no con SU11274. La expresión alta de MUC1 se asocia con la invasión vascular en el carcinoma escamoso oral y MUC1 representa un biomarcador útil para identificar metástasis de ganglios linfáticos ocultos en el carcinoma de células escamosas oral (109). Con base a los resultados discutidos anteriormente, podemos proponer un mecanismo de transducción probable para estos dos tipos de neoplasias. Destacando la importancia de los factores transcripcionales comunes como lo son CREB, Ap1 y Twist en la activación y regulación de moléculas de adhesión mediada por RTKs, mucinas y metaloproteasas. Será importante conocer si el papel que desempeñan estos factores, puede corresponder a lo descrito en otras neoplasias de diferentes localizaciones anatómicas.

## 9. Conclusiones

En conclusión, hemos demostrado que MUC1 y c-Met se relacionan en las células de carcinoma estudiadas, con un comportamiento relacionado a la capacidad invasiva y la motilidad, tal y como se muestra en los ensayos de cierre de herida y de matriz extracelular. La proliferación celular es otro proceso que, no obstante existió disminución significativa, al parecer no es el principal proceso afectado por inhibición farmacológica de nuestras moléculas de estudio. Asimismo, nuestros resultados sugieren que tanto MUC1 y c-Met modifican la expresión de las moléculas de adhesión de manera diferencial, es decir, la inhibición de MUC1 y c-Met en algunas claudinas aumenta y en otros casos disminuye. Además, esta expresión al parecer está asociada con el tipo de tumor y el grado de diferenciación histológica, ya que nuestras líneas fueron obtenidas de tumores con grado de diferenciación diferentes. También encontramos una ubicación atípica de las claudinas y la integrina  $\alpha V\beta 1$  hacía el núcleo. Particularmente resulta interesante la expresión anormal de este último ya que existen pocos reportes en la literatura que soporten este resultado. La expresión de claudinas también es un hallazgo del cual ya existen reportes aislados en neoplasias de cabeza y cuello.

Los resultados obtenidos sugieren que MUC1 y c-Met podrían convertirse en un blanco potencial para estudiar los fenómenos relacionados a la metástasis tumoral en otro tipo de neoplasias de cabeza y cuello. Asimismo, surge una particular importancia el estudio de los factores transcripcionales asociados, con la finalidad poder establecer una correlación desde este nivel para crear terapias más eficientes y dirigidas a blancos específicos que permitan mejores tratamientos e individualizados según el tipo de tumor. Es importante también investigar el papel de las moléculas encargadas de la traslocación tanto de MUC1 como de las claudinas hacia el núcleo, con la finalidad de poder esclarecer cómo, esta translocación podría estar asociada a un fenotipo más agresivo o resistencia a quimioterapia. En este sentido pudimos observar que la expresión y localización de moléculas de adhesión es tejido y tumor específica, lo cual refuerza lo reportado por otros autores relacionados al tema.

No obstante nuestros hallazgos nos resultan reelevantes en el estudio de los patrones moleculares en líneas celulares de neoplasias de cabeza y cuello, se necesita profundizar aún más en los mecanismos de transducción y regulación, con la finalidad de dilucidar si MUC1 y c-Met también contribuyen a la actividad de promoción de la metástasis a través de otros modelos reguladores, determinar sus vías canónicas de activación y además, poder esclarecer si este mismo patrón puede observarse en muestras obtenidas de pacientes de neoplasias de distintas localizaciones anatómicas de cabeza y cuello.

Es importante mencionar que no obstante los carcinomas son las neoplasias malignas más frecuentes en la región bucal, son pocos los estudios que se enfocan al entendimiento del comportamiento molecular, por ello consideramos que resulta particularmente relevante ahondar más en el tema con la finalidad de esclarecer, el proceso mediante el cual este tipo de neoplasias frecuentemente ocasionan metástasis regional y por lo tanto la muerte de los pacientes con la enfermedad, para poder crear mejores terapias y más específicas que mejoren su calidad de vida.

## 10. Productos derivados del proyecto

### Presentación en congresos nacionales e internacionales

#### Nacionales

- Exhibición de Carteles Científicos en la 4ta Expo Científica CTR 2015. Tema: Efecto de la inhibición de MUC1 y c-Met en la actividad proliferativa e invasiva del carcinoma oral de células escamosas in vitro. 28 y 29 de mayo 2015. Centro de Convenciones “Cinia González Diez” México D.F.
- III Congreso Internacional AMPMB, Colegio A.C. Efecto de la inhibición de MUC1 y c-Met en la actividad proliferativa e invasiva del carcinoma oral de células escamosas in vitro. Noviembre de 2014. Guadalajara Jalisco México. Modalidad: Exposición oral.

#### Internacionales

- XIV Reunión de la Academia Iberoamericana de Patología y Medicina Bucal”. Lima, Perú. 29-31 de agosto de 2016. Presentación oral.
- “IV congreso Internacional de la asociación Mexicana de Patología y Medicina Bucal Colegio” A.C. octubre de 2015. Saltillo, Coahuila México Modalidad: Exposición oral.
- “XII Reunión de la Academia Iberoamericana de Patología y Medicina Bucal”. Santiago de Chile. 13, 14 y 15 de noviembre de 2014. Modalidad E-Poster.
- III Congreso Internacional AMPMB, Colegio A.C. Efecto de la inhibición de MUC1 y c-Met en la actividad proliferativa e invasiva del carcinoma oral de células escamosas in vitro. Noviembre de 2014. Guadalajara Jalisco México. Modalidad: Exposición oral.
- IV Congreso de la Rama de Transducción de Señales Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C. 10-13 de noviembre de 2013. San Luis Potosí, S.L.P. Modalidad: Poster.
- “X Reunión Internacional de la Academia Iberoamericana de Patología y Medicina Bucal” y el “Congreso Internacional de Patología y Cirugía

M. en C. Claudio Viveros Amador  
Bucomaxilofacial”. Cartagena de Indias, Colombia. 10-13 de octubre de 2012.  
Modalidad: Poster.

#### Artículos científicos

- Hernández Guerrero JC, Jiménez Farfán MD, Ledesma Montes C, **Viveros Amador C**, Duran Padilla. Oral Squamous Cell Carcinoma: it's Prevalence in México. Int J Oral Health Dent Manag 2018;2:1-4.
- **Claudio Viveros-Amador**, Andrés Castell-Rodríguez, Edgar Zenteno, Juan Carlos Hernández-Guerrero, María Dolores Jiménez-Farfán. MUC1 and C-Met Affect Proliferation, Intercellular Junctions and Invasion in Two Head and Neck Carcinoma Cell Lines. J Clin Exp Pathol 2017;7:6
- Paredes Farrera F, Ledesma-Montes C, Jiménez-Farfán D, Contreras-Castellanos C, Fernández-Espinosa J, Hernández-Flores F, Macario-Hernández A, **Viveros-Amador C**, Hernández-Guerrero JC. Ameloblastic Carcinoma: Clinico-Pathological and Immunohistochemical Claudin Study. J Dent Health Oral Disord Ther 2017;7: 00234.

#### Premios y distinciones

- Primer lugar en el concurso de investigación del “III Congreso Internacional AMPMB”, Colegio A.C. Efecto de la inhibición de MUC1 y c-Met en la actividad proliferativa e invasiva del carcinoma oral de células escamosas in vitro. Noviembre de 2014. Guadalajara Jalisco México. Modalidad: Exposición oral.
- Primer lugar en el concurso de investigación de la “XII Reunión de la Academia Iberoamericana de Patología y Medicina Bucal”. Efecto de la inhibición de MUC1 y c-Met en la actividad proliferativa e invasiva del carcinoma oral de células escamosas in vitro. Santiago de Chile. 13, 14 y 15 de noviembre de 2014. Modalidad E-Poster.

## 11. Referencias

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136:E359-86.
2. GBD 2015 Risk Factors Collaborators (644). Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2016;388:1659-1724.
3. American Cancer Society Report. Cancer Facts and Figures 2017. American Cancer Society, Atlanta 2018;810:2-64.
4. Lam D, Schmidt B. Molecular Biology of Head and Neck Cancer: Therapeutic Implications. In *Current Therapy in Oral and Maxillofacial Surgery*. Elsevier Inc. 2012. p. 92-101. Available from, DOI:10.1016/B978-1-4160-2527-6.00010-4
5. Parkin D, Bray F, Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55:2-74.
6. Thiery J. Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:442-454.
7. Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon (France), IARC Press, 2005.
8. Civetta JD, Civetta D. Carcinogenesis. *Rev Salud Pública de México* 2011;53:405-414.
9. Hanahan A, Weinberg R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011;144:646–674.
10. Molina J, Adjei A. The Ras/Raf/MAPK pathway. *J Thorac Oncol* 2006;1:7-9.

11. Vogelstein B, Fearon E, Hamilton S, Kern S, Preisinger A, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits A, Bos J. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *Engl J Med* 1988;319:525-32.
12. Cathie G, Timon P, Wan L. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. *Mol Cancer* 2004;3: 9.
13. Luger K, Mäder A, Richmond R, Sargent F, Richmond T. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997;18:389:251-60.
14. Bernstein BE, Meissner A, Lander E. The mammalian epigenome. *Cell* 2007;128:669-81.
15. Jafri M, Ansari S, Alqahtani M, Jerry W. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med* 2016;8:69.
16. Shay J. Are short telomeres predictive of advanced cancer?. *Cancer Discov* 2013;3:1096-8.
17. González-Morales M, Gil-Montoya J, Ruiz-Ávila I. Bases moleculares de la cancerización de cavidad oral. *Adv Odontoestomatol* 2008;24;1.
18. Raybaud H, Odin G, Fafet A, Santini J, Monteil R. Genic alterations in oral and head and neck squamous cell carcinomas: analysis of international literature. *Pathol Biol* 2003;51:176-84.
19. Patrick C, Maulik P, Christensen J, Salgia R. c-Met: Structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer and Metastasis Reviews* 2003;22: 309–325.
20. Masuya D, Huang C, Liu D, Nakashima T, Kameyama K, et al. The tumour–stromal interaction between intratumoral c-Met and stromal hepatocyte growth factor associated with tumour growth and prognosis in non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 2004;90:1555-1562.
21. Peruzzi B, and Bottaro, D.P. Targeting the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:3657-3660.
22. Peschard P and M Park. From Tpr-Met to Met, tumorigenesis and tubes. *Oncogene* 2007;26:1276–1285.

23. Uen Y, Lin S, Wu C, Hsieh J, Lu C, et al. Clinical significance of MUC1 and c-Met RT-PCR detection of circulating tumor cells in patients with gastric carcinoma. *Clin Chim Acta* 2006 367:55-61.
24. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Woude G. Met, Metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:915-925.
25. Tsao M, Liu N, Chen J, Pappas J, Ho J, et al. Differential expression of Met/hepatocyte growth factor receptor in subtypes of non-small cell lung cancers. *Lung Cancer* 1998;20:1-16.
26. Maulik G, Madhiwala P, Brooks S, Ma PC, Kijima T, et al. Activated c-Met signals through PI3K with dramatic effects on cytoskeletal functions in small cell lung cancer. *J Cell Mol Med* 2002;6:539-553.
27. Ghossein R, Dillon D, D'Aquila T, Rimm E, Fearon E, et al. Expression of c-met is a strong independent prognostic factor in breast carcinoma. *Cancer* 1998;82:1513-1520.
28. Camp R, Rimm E and Rimm D Met expression is associated with poor outcome in patients with axillary lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* 1999;86: 2259-2265.
29. Qian C, Guo X, Cao B, Kort E, Lee C, et al. Met protein expression level correlates with survival in patients with late-stage nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:589-596.
30. Lo Muzio L, Farina A, Rubini C, Coccia E, Capogreco M, et al. Effect of c-Met expression on survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* 2006;27:115-121.
31. Zhao D, Wang S, Feng Y, Hua C, Zhao J, et al. Intratumoral c-Met expression is associated with vascular endothelial growth factor C expression, lymphangiogenesis, and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: implications for use as a prognostic marker. *Hum Pathol* 2011;42:1514-1523.
32. Hollingsworth M, Swanson B. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature reviews* 2004;4:45-60.

33. Liu X, Ban L, Luo G, Li Z, Li Y, et al. Acquired resistance to HSP90 inhibitor 17-AAG and increased metastatic potential are associated with MUC1 expression in colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 2016;27:417-426.
34. Joshi M, Ahmad R, Yin L, Raina D, Rajabi H, et al. MUC1 oncoprotein is a druggable target in human prostate cancer cells. *Mol Can Ther* 2009;8: 3056-3065.
35. Klinge C, Radde B, Imbert-Fernandez Y, Teng Y, Ivanova M, et al. Targeting the intracellular MUC1 C-terminal domain inhibits proliferation and estrogen receptor transcriptional activity in lung adenocarcinoma cells. *Mol Can Ther* 2011;10:2062-2071.
36. Kaori D, Tatsurolramura. Muc1 in carcinoma-host interactions. *Glycoconjugates Journal* 2000;17:649-658
37. Agrawal B, Krantz M, Reddish M, Longenecker B, Cancer associated MUC1 mucin inhibits human T-cell proliferation, which is reversible by IL-2. *Nat Med* 1998;4:43-9.
38. Zhang K, Sikut R, Hansson G. A MUC1 mucin secreted from a colon carcinoma cell line inhibits target cell lysis by natural killer cells. *Cell Immunol* 1997;176:158-65.
39. Zhao Q, Piyush T, Chen C, Hollingsworth M, Hilkens J, Rhodes J, Yu L. MUC1 extracellular domain confers resistance of epithelial cancer cells to anoikis. *Cell Death Dis* 2014;2:e1438.
40. Joyce A, Azzah A, Melissa C, Adriance, Tessier J, Kotlarczyk K, Melissa C Thompson and Gendler S. MUC1 oncoprotein activates the I $\kappa$ B kinase  $\beta$  complex and constitutive NF- $\kappa$ B signaling. *Nat Cell Biology* 2007;9:1419–1427.
41. Singh P, Behrens M, Eggers J, Cerny R, Bailey J, et al. Phosphorylation of MUC1 by Met modulates interaction with p53 and MMP1 expression. *J Biol Chem* 2008;283:26985-26995.
42. Kufe D. MUC1-C oncoprotein as a target in breast cancer: activation of signaling pathways and therapeutic approaches. *Oncogene* 28;32:1073-81.

43. Dariel A, Therrien M. The greater RTK/RAS/ERK signalling pathway: how genetics has helped piece together a signaling network. *Med Sci* 2010;26;12:1067-73.
44. Van Itallie C, Anderson J. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 2006;68:403-29.
45. Balda MS, Matter K. Trends Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression. *Cell Biol* 2003;13:310-8.
46. Tsukita S, Yamazaki Y, Katsuno T, Tamura A, Tsukita S. Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene* 2008;24:6930-8
47. Yeaman C, Grindstaff KK, Nelson WJ. Mechanism of recruiting Sec6/8 (exocyst) complex to the apical junctional complex during polarization of epithelial cells. *J Cell Sci* 2004;117:559-70.
48. Furuse M, Fujita K, Hiiiragi 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;141:1539-50.
49. Günzel D, Yu A. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev* 2013;93:525-69.
50. Chen S, Einspanier R, Schoen J. Transepithelial electrical resistance (TEER): a functional parameter to monitor the quality of oviduct epithelial cells cultured on filter supports. *Histochem and Cell Biol* 2015;144:509-515.
51. Ellaine S, Malgorzata B, Carola Y. Tight Junctions and the Tumor Microenvironment. *Curr Pathobiol Rep* 2016;4:135–145.
52. Jerrold R, Turner M, Buschmann I, Romero-Calvo A, Le S. The role of molecular remodeling in differential regulation of tight junction permeability. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2014;36:204-212.
53. Deborah T, Leicht V, Balan A, Kaplun V, Singh G, Ludmila K, Dobson M, Guri T. Raf kinases: Function, regulation and role in human cancer. *Biochemica et Biophysica Acta* 2007;1773:1196-1212.
54. Wilcox E, Burton Q, Naz S et al., “Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29,” *Cell* 2001;104:165–172.

55. Kang J, Choi H, Cho H et al. "Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis associated with CLDN16 mutations". *Pediatric Nephrology* 2005;20:1490–1493.
56. Morita K, Sasaki H, Fujimoto K, Furuse M, and Tsukita S. "Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis." *J of Cell Biol* 1999;145:579–588.
57. Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S, "Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins," *J Cell Biol* 1999;147:1351–1363.
58. Singh A, Sharma A, Dhawan P. Claudin family of proteins and cancer: an overview. *J Oncol* 2010;2010:541957
59. Hart I and Saini A. Biology of tumour metastasis. *Lancet* 1992;339: 1453-1457.
60. Van Zijl, F, Krupitza G, Wolfgang M. Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res* 2011;728:23–34.
61. Tracey A, Malcolm D, Wen G. HGF and the regulation of tight junctions in human prostate cancer cells. *Oncol Reports* 2014;32:213-224.
62. Canel M, Serrels A, Frame M, Brunton V. E-cadherin–integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J Cell Sci* 2013;126:393-401.
63. Kohn E, Liotta L. Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention. *Cancer Res* 1995;55:1856-1862.
64. Hwang T, Changchien T, Wang C, Wu C. 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;8:1367-1371.
65. Agarwal R, D' Souza T, Morin P. Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer Res* 2005;65:7378–7385.
66. Oku N, Sasabe E, Ueta E, Yamamoto T, Osaki T. Tight junction protein claudin-1 enhances the invasive activity of oral squamous cell carcinoma cells by promoting cleavage of laminin-5 gamma2 chain via matrix

metalloproteinase (MMP)-2 and membrane-type MMP-1. *Cancer Res* 2006;66:5251–5257.

67. Takehara M, Nishimura T, Mima S, Hoshino T, Mizushima T. Effect of claudin expression on paracellular permeability, migration and invasion of colonic cancer cells. *Biol Pharm Bull* 2009;32:825–831.
68. Hwang TL, Lee LY, Wang CC, Liang Y, Huang SF, Wu CM. Claudin-4 expression is associated with tumor invasion, MMP-2 and MMP-9 expression in gastric cancer. *Exp Ther Med* 2010;1:789–797.
69. Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, Rein A, Sauter G, Kallioniemi OP, Sukumar S. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene* 2003;22:2021-33.
70. Usami Y, Chiba H, Nakayama F, Ueda J, Matsuda Y, Sawada N, Komori T, Ito A, Yokozaki H. Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hum Pathol* 2006;37:569-77.
71. Sauer T, Pedersen M, Ebeltoft K, Naess O. Reduced expression of Claudin-7 in fine needle aspirates from breast carcinomas correlate with grading and metastatic disease. *Cytopathol* 2005;16:193-8.
72. Michl P, Barth C, Buchholz M, Lerch M, Rolke M, Holzmann K, Menke A, Fensterer H, Giehl K, Löhr M, Leder G, Iwamura T, Adler G, Gress TM. Claudin-4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer. *Cancer Res* 2003;63:6265-71.
73. Rangel L, Agarwal R, D'Souza T, Pizer E, Alò P, Lancaster W, Gregoire L, Schwartz DR, Cho KR, Morin P. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *J Clin Cancer Res* 2003;9:2567-75.
74. Soini Y. Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. *Histopathology* 2005;46:551-60.
75. Lee J, Lee S, Seo J, Song S, Ahn G, Park C, Lee J, Kim B, Bae D. Increased expressions of claudin-1 and claudin-7 during the progression of cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 2005;97:53-9.

76. Agarwal R, D' Souza T, Morin P. Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer Res* 2005;65:7378-85.
77. Dhawan P, Singh A, Deane N, No Y, Shiou S, Schmidt C, Neff J, Washington M, Beauchamp R. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest* 2005;115:1765-76.
78. Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins *J Cell Biol* 1999;147:1351-63.
79. Rabassa M, Croce M, Pereyra A. MUC1 expression and anti-MUC1 serum immune response in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): a multivariate analysis. *BMC Cancer* 2006;6:253.
80. Bozkaya G<sup>1</sup>, Korhan P, Cokaklı M, Erdal E, Sağol O, Karademir S, Korch C, Atabey N. Cooperative interaction of MUC1 with the HGF/c-Met pathway during hepatocarcinogenesis. *Molecular Cancer* 2012;11:64
81. Lynn M, Stabile E, Eglolf M, Rothstein M, Tomas S, Christopher T, Lerner EC, Seethala RR, Susuki S, Quesnelle K, Morgan S, Ferris RL, Grandis J. HGF and c-Met participate in paracrine tumorigenic pathways in head and neck squamous cell cancer. *Clin Cancer res* 2009;15:3740-3750.
82. Gialeli C, Theocharis A, Karamanos N. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J* 2011;278:16-27.
83. Botting G, Rastogi I, Chhabra G, Nlend M, Puri N. Mechanism of Resistance and Novel Targets Mediating Resistance to EGFR and c-Met Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One* 2015;10:e0136155.
84. Tomizawa M, Shinozaki F, Motoyoshi Y, Sugiyama T, Yamamoto S, Ishige N. SU11274 suppresses proliferation and motility of pancreatic cancer cells. *Oncol Lett* 2015;10:1468-1472.
85. Joshi MD, Ahmad R, Yin L, Raina D, Rajabi H, Bublely G, Kharbanda S, Kufe D. MUC1 oncoprotein is a druggable target in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2009;8:3056-65.

86. Raina D, Ahmad R, Joshi MD, Yin L, Wu Z, Kawano T, Vasir B, Avigan D, Kharbada S, Kufe D. Direct targeting of the mucin 1 oncoprotein blocks survival and tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2009;69:5133-41.
87. Jin T, George Fantus I, Sun. Wnt and beyond Wnt: multiple mechanisms control the transcriptional property of beta-catenin. *J Cell Signal* 2008; 20:1697-704.
88. Bhattacharya A, Tóth K, Mazurchuk R, Spornyak J, Slocum H, et al. Lack of microvessels in well-differentiated regions of human head and neck squamous cell carcinoma A253 associated with functional magnetic resonance imaging detectable hypoxia, limited drug delivery, and resistance to irinotecan therapy. *Clinical Cancer Research* 2004;10:8005-8017.
89. Kibeey M, Royce L, Dym M, Baum B, Kleinman H. Glandular-like morphogenesis of the human submandibular tumor cell line A253 on basement membrane components. *Exp Cell Res* 1992;198:343-351.
90. Fujishiro Y, Tonogi M, Ochiai H, Matsuzaka K, Yamane G, et al. The receptor tyrosine kinase inhibitor vandetanib activates Akt and increases side population in a salivary gland tumor cell line (A253). *Int J Oncol* 2012;41:362-368.
91. Bago R, Pavelić J, Vlahoviček G, Bosnar M. Nm23-H1 promotes adhesion of CAL 27 cells in vitro. *Mol Carcinog* 2009;48:779-789.
92. Horm T, Schroeder J. MUC1 and metastatic cancer: expression, function and therapeutic targeting. *Cell Adh Migr* 2013;7:187-198.
93. Kenessey I, Keszthelyi M, Kramer Z, Berta J, Adam A, et al. Inhibition of c-Met with the specific small molecule tyrosine kinase inhibitor SU11274 decreases growth and metastasis formation of experimental human melanoma. *Curr Cancer Drug Targets* 2010;10:332-342.
94. Christensen J, Schreck R, Burrows J, Kuruganti P, Chan E, et al. Cherrington JM and Mendel DB: A selective small molecule inhibitor of c-Met kinase inhibits c-Met-dependent phenotypes in vitro and exhibits cytoreductive antitumor activity in vivo. *Cancer Res* 2003;63:7345-7355.

95. Navin V, Mackenzie A. Phenotypic plasticity and epithelial-to-mesenchymal transition in the behaviour and therapeutic response of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2015;44:649–655.
96. Lee J, Hsiao W, Chen H, Hsu L, Chen P, et al. Upregulated claudin-1 expression confers resistance to cell death of nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Cancer* 2010;126:1353-1366.
97. Stebbing J, Filipović A, Giamas G. Claudin-1 as a promoter of EMT in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2013;32:4871-4872.
98. Ogawa M, Kojima T, Someya M, Nomura K, Takasawa A, et al. Epidermal growth factor modulates claudins and tight junctional functions in ovarian cancer cell lines. *Histochem Cell Biol* 2012;138: 323-338.
99. Leotlela P, Wade M, Duray P, Rhode M, Brown H, et al. Claudin-1 overexpression in melanoma is regulated by PKC and contributes to melanoma cell motility. *Oncogene* 2007;26:3846-3856.
100. Reichert M, Müller T, Hunziker W. The PDZ domains of zonula occludens1 induce an epithelial to mesenchymal transition of Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for a role of beta catenin/Tcf/Lef signaling. *J Biol Chem* 2000;275:9492-9500.
101. Ding L, Lu Z, Lu Q, Chen Y. The claudin family of proteins in human malignancy: a clinical perspective. *Cancer Manag Res* 2013;5:367-375.
102. Ikari A, Watanabe R, Sato T, Taga S, Shimobaba S, et al. Nuclear distribution of claudin-2 increases cell proliferation in human lung adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2014;1843:2079-2088.
103. Benaud C, Dickson R. Regulation of the expression of c-Myc by  $\beta$ 1 integrins in epithelial cells. *Oncogene* 2001;20:759-768.
104. Tan C, Cruet S, Troussard A, Fazli L, Costello P, Sutton K, Wheeler J, Gleave M, Sanghera J, Dedhar S. Regulation of tumor angiogenesis by integrin-linked kinase (ILK). *Cancer Cell* 2004;5:79-90.
105. Deshmukh H, Case L, Wesselkamper S, Borchers M, Martin L, et al. Metalloproteinases mediate mucin 5AC expression by epidermal growth factor receptor activation. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:305-314.

106. Sternlicht M, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516.
107. Lu L, Deng H, Fan W. Correlation of MUC1 expression to adhesion of breast cancer cell line MDA-MB-231. *Ai Zheng* 2004;23:1294-1296.
108. Hamada T, Nomura M, Kamikawa Y, Yamada N, Batra S, et al. DF3 epitope expression on MUC1 mucin is associated with tumor aggressiveness, subsequent lymph node metastasis, and poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 2012;118:5251-5264.
109. Liu X, Chen G, Wang Z, Liu F. Clinical significance of detecting mucin 1 mRNA in diagnosing occult lymph node micrometastasis in esophageal cancer patients. *Ai Zheng* 2007;26:194-199.

## 12 . Índice de figuras

Figura 1. "Molecular Targets of CNS Tumors", Miklos Garami, ISBN 978-953-307-736-9, 2011 under CC BY-NC-SA 3.

Figura 2. Nath S, Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol Med*. 2014 Jun;20(6):332-42.

Figura 3. "Biología Celular y Molecular". Lodish y col. 7ma. Edición. Editorial Médica Panamericana (2016).

Figura 4. Amulya L, Tiha L, Yitang W, Jotham R. Austin II, Jerold T. Conceptual barriers to understanding physical barriers. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2015;42:13-21.

Figura 5. Madhu L and Patrice J. The claudins. *Genome Biology* 2009;10:235.

Figura 6. Singh P, Behrens M, Eggers J, Cerny R, Bailey J, et al. Phosphorylation of MUC1 by Met modulates interaction with p53 and MMP1 expression. *J Biol Chem* 2008;283:26985-26995.

Figura 7. Gialeli C, Theocharis A, Karamanos N. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. FEBS J. 2011;278:16-27.