



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**La sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 modifica las
características asociadas a células troncales de
cáncer y transición epitelio mesénquima en
células de adenocarcinoma gástrico humano**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Franklin Cruz Villegas



DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Erika Patricia Rendón Huerta

Ciudad Universitaria, CD. MX. 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado.

1. Datos del alumno

Cruz

Villegas

Franklin

5545701884

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

312235615

Presidente:

Dra. Floria Josefina Lizárraga Sánchez

Vocal:

Dra. Ana Cristina Torres Martínez

Secretario:

Dra. Erika Patricia Rendón Huerta

Sinodal 1:

Dr. Gonzalo Castillo Rojas

Sinodal 2:

Dr. Luis Felipe Montaña Estrada

“Al despertarme esa mañana estaba decidido. Me había convertido en biólogo de nacimiento y para siempre. Me sentía bajo ese signo, que a partir de entonces iba a llevar en mí. Desenvainé. Iba a forjarme un destino.”

François Jacob.

A mi madre y a mi abuela, a mi familia porque todo lo aprendido también lo veo con sus valores y sus ojos. Por enseñarme a ser fuerte y por cuidarme cuando soy vulnerable.

A Priscila, sin ella esta tesis no hubiera sido posible.

A la Dra. Rendón y al Dr. Montaña por permitirme aprender y desarrollarme en mi primer trabajo científico.

A mis maestros, ponía más atención de la que parecía.

A mis amigos por los consejos y el apoyo.

Índice.**Tabla de contenido**

Resumen.....	10
Introducción.....	11
Figura 1. Tipos de cáncer gástrico según la clasificación de Lauren.....	12
Antecedentes.....	13
Uniones Estrechas.....	13
Claudinas.....	14
Figura 2. Organización estructural de las claudinas.....	15
Figura 3. Cristalografía de la Cldn-15	15
Claudinas y Cáncer.....	16
Tabla 1. Claudinas como promotoras y supresoras de tumor en distintos cánceres.....	16
Células Troncales de Cáncer (CTC) y Claudinas.....	18
Marcadores de CTC.....	20
CD44.....	20
Figura 4. Estructura de CD44.....	21
CD24.....	21
Figura 5. Estructura de CD24.....	22
Población CD44 ⁺ /CD24 ⁻ en CTC.....	23
Marcadores de Autorrenovación.....	23
NANOG.....	24
Figura 6. Estructura de Nanog.....	24
SOX2.....	24
Figura 7. Estructura de Sox2 y sitios de modificación post traduccional.....	25
Marcadores de TEM.....	25
SNAIL.....	26
Figura 8. Estructura de los factores de transcripción Snai1 y Snai2	27
TWIST.....	27
Figura 9. Estructura de Twist.....	27
E-Cadherina.....	28
Figura 10. Estructura de E-cadherina	28
N-Cadherina.....	29
Figura 11. Estructura de N-cadherina.....	29
Planteamiento del problema.....	30

Justificación.....	30
Hipótesis.....	31
Objetivo.....	31
Objetivos particulares.....	31
Materiales y Métodos.....	32
Modelo.....	32
Cultivo de células AGS.....	32
Citometría de Flujo.....	32
Arreglo celular sistemático activada por fluorescencia y Citometría de flujo (FACS).....	32
Proteínas de Membrana.....	33
Proteínas nucleares.....	34
Adquisición de datos.....	34
Inmunofluorescencias.....	34
Ensayo de migración.....	35
Ensayo de Invasividad.....	35
Análisis estadístico.....	36
Resultados.....	37
Sublíneas recombinantes que sobreexpresan a Cldn-6 o -9.....	37
Figura 12. Células AGS que sobreexpresan a Cldn -6 o -9.....	37
Marcadores de CTC.....	38
Figura 13. Expresión de CD44 y CD24 en las células AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-9 y diagramas de puntos asociados a las subpoblaciones CD44 ⁺ /CD24 ⁺ , CD44 ⁺ /CD24 ⁻ , CD44 ⁻ /CD24 ⁺ y CD44 ⁻ /CD24 ⁻	39
Figura 14. La sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 en células AGS incrementa la expresión de CD44 y disminuye la de CD24.....	40
Marcadores de autorenovación.....	41
NANOG.....	41
Figura 15. La sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 en células AGS enriquece las poblaciones positivas a NANOG e incrementa su expresión.....	42
SOX2.....	43
Figura 16. La sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 en células AGS enriquece las poblaciones positivas a SOX2 e incrementa su expresión.....	44
Marcadores de TEM.....	45
SNAIL.....	45
Figura 17. La sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 en células AGS enriquece las poblaciones positivas a SNAIL e incrementa su expresión.....	46

N-Cadherina.....	47
Figura 18. La sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 en células AGS enriquece las poblaciones positivas a N-Cadherina y Cldn-9 incrementa su expresión.	48
TWIST y E-Cadherina.	49
Figura 19. Expresión basal de TWIST y E-Cadherina en las cuatro sublíneas celulares.....	49
Las células AGS expresan simultáneamente marcadores de CTC, troncalidad y TEM.	50
Tabla 2. Porcentajes de las poblaciones positivas a CD44, NANOG, SOX2, SNAIL y N-Cadherina en las células AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9.....	50
Microscopía Confocal.	50
Expresión de CD44 y NANOG.	50
Figura 20. Las células AGS expresan CD44 y NANOG de manera simultánea y la sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 aumentan la expresión de estos marcadores.	52
Expresión de CD44 y SNAIL.	53
Figura 21. Las células AGS expresan CD44 y SNAIL de manera simultánea y la sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 aumentan la expresión de estos marcadores.	53
Expresión de CD44 y TWIST.....	54
Figura 22. Las células AGS expresan CD44 y TWIST de manera simultánea y la sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 aumentan la expresión de estos marcadores.	55
Fluorescencia obtenida por Microscopía Confocal.	55
Figura 23. Fluorescencia de los marcadores de CTC, autorenovación y TEM obtenida por microscopía.	56
Ensayos funcionales.....	56
Migración celular.	57
Invasividad celular.....	57
Figura 24. La sobreexpresión de CLDN-6 aumenta la migración y CLDN-9 la invasividad celular.	58
Discusión.....	59
Conclusiones.....	62
Perspectivas.....	63
Referencias.	64

Abreviaturas.

AEC	Asas extra celulares
AH	Ácido Hialurónico
ANOVA	Análisis de varianza
APC	Aloficocianina
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CD24	Cluster de diferenciación 24
CD44	Cluster de diferenciación 44
Cldn	Claudina
CpE	Enterotoxina de <i>Clostridium perfringens</i>
CTC	Células troncales de cáncer
C-TERMINAL	Carboxi-terminal
DMEM	Medio esencial mínimo
EDTA	Ácido etilendiaminatetraacético
ERM	Ezrina/Radixina/Moesina
FCTC	Fluorescencia Celular Total Corregida
FGFR	Receptor del Factor de crecimiento de fibroblastos
G418	Geneticina
GFP	Proteína fluorescente verde
GPI	Glucosil fosfatidil inositol
HLH	Hélice Asa hélice
hPSC	Células troncales pluripotentes humanas
IL-6	Interleucina-6
IMF	Intensidad media de fluorescencia
JAM	moléculas de unión/adhesión
K.O.	Knock Out
kDa	Kilodalton
N-TERMINAL	Amino terminal
PBMC	Células Mononucleares de sangre periférica
PBS	Buffer de fosfato salino

SFB	Suero fetal bovino
UEs	Uniones Estrechas
URF	Unidades Relativas de Fluorescencia
VEB	Virus de Epstein-Barr
ZO	Zona Ocludens

Resumen.

El cáncer gástrico es un problema relevante de salud pública en México y a nivel mundial. En 2020 hubo más de 1, 000, 000 de nuevos casos de este cáncer y se estima que provocó la muerte de 769, 000 personas ese mismo año. A menudo los pacientes tratados recaen localmente o con metástasis a distancia. La subpoblación tumoral de células troncales de cáncer (CTC) se renuevan a sí mismas e impulsan el inicio, la progresión del cáncer, adquieren resistencia a múltiples fármacos, al estrés oxidativo, poseen capacidad metastásica y evaden al sistema inmune. Debido a lo anterior, se piensa que son responsables de la recurrencia del cáncer después del tratamiento.

Las claudinas que son proteínas de uniones estrechas (UEs) a menudo se han relacionado con distintos tipos de cáncer, en particular la sobreexpresión de las claudinas 6 y 9 se ha relacionado con mayor capacidad migratoria, invasiva y de proliferación en células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS). Cabe destacar que la expresión de dichas claudinas, se restringe a tejidos durante el desarrollo embrionario, siendo su expresión débil o ausente en tejidos adultos.

En este estudio, nuestra pregunta de investigación fue si la sobreexpresión de la Cldn6 y Cldn9 induce la formación de CTC. Para responder esta pregunta, se generó un modelo en las células AGS que sobreexpresan a estas proteínas de UEs y se evaluaron distintos aspectos en las CTC. Se determinó el enriquecimiento de la población de CTC CD44⁺/CD24⁻, los marcadores de troncalidad NANOG y SOX2 y de Transición epitelio mesénquima (TEM) SNAIL, TWIST, E-Cadherina y N-Cadherina al sobreexpresar las claudinas. Todos estos marcadores aumentaron a nivel poblacional y en su expresión en las sublíneas recombinantes AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9. Además, se observó un aumento en los procesos de migración e invasividad para las células AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9, respectivamente. De los resultados obtenidos se concluye que la sobreexpresión de Cldn6 y 9 genera fenotipos relacionados a las CTC, al encontrar marcadores de autorenovación y TEM que se expresan simultáneamente. Mas aún, en muestras de pacientes se

observó que Cldn6 está relacionada con la remisión local y Cldn9 con la metástasis en cáncer gástrico.

Introducción.

En 2020 hubo más de 1, 000, 000 de nuevos casos de cáncer gástrico a nivel mundial y se estima que provocó la muerte de 769, 000 personas ese mismo año. El cáncer gástrico representa el quinto tipo de cáncer más diagnosticado, la tercera causa principal de muerte por cáncer en México y la cuarta a nivel mundial^{1,2}. Algunas áreas geográficas de la República Mexicana tienen mayores tasas de mortalidad por cáncer gástrico como Chiapas, cuya tasa es de 6.4 por cada 100,000 habitantes en comparación con la Ciudad de México con 4.5 y el Estado de México con 2.5 por cada 100,000 habitantes³. Esto puede ser debido a las condiciones socioeconómicas y a factores ambientales como la alimentación, el consumo de alcohol y tabaco e infección por *Helicobacter pylori*, entre otros. Estos hechos, convierten al estudio de esta enfermedad en uno de suma importancia para nuestro país.

De acuerdo a la clasificación histológica de Lauren del cáncer gástrico que es la más ampliamente utilizada en clínica este se divide en dos tipos histológicos, el intestinal y el difuso (Figura 1). El tipo intestinal está asociado con gastritis atrófica crónica, metaplasia intestinal y se presenta más a menudo en el estómago distal. El tipo difuso se origina normalmente en la mucosa gástrica, presenta células de anillo de sello (células con una gran vacuola llena de mucosa); es común en personas menores de 45 años y es el tipo de cáncer gástrico con peor pronóstico debido a su capacidad de remisión.

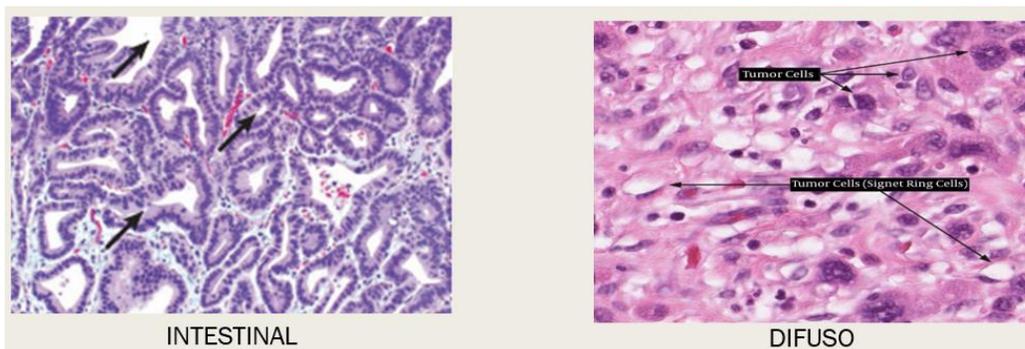


Figura 1. Tipos de cáncer gástrico según la clasificación de Lauren. A la izquierda se observan las glándulas diferenciadas características en la histología del tipo intestinal. A la derecha las células tumorales con grandes núcleos y las células de anillo de sello presentando una gran vacuola llena de mucosa.

Cerca del 3% del cáncer gástrico difuso es hereditario debido a una mutación en el gen CDH1 que codifica para la E-cadherina una proteína importante en la adherencia celular y cuya pérdida provoca poca cohesión en el epitelio gástrico^{4,5}. La prognosis pobre de este cáncer se debe en cierta medida a la falta de tratamientos dirigidos. En ambos tipos histológicos encontramos tratamientos generales, siendo la cirugía la única terapia curativa. La quimioterapia perioperatoria y adyuvante, así como la quimiorradiación y la disección de los ganglios linfáticos adyacentes pueden mejorar el resultado de la resección de este cáncer. Sin embargo, más de la mitad de los pacientes con cáncer gástrico operado recaen localmente o con metástasis a distancia o reciben el diagnóstico de cáncer gástrico cuando el tumor se disemina; por lo tanto, la media de supervivencia rara vez supera los 12 meses y la supervivencia a los 5 años es inferior al 10%⁶. Encontrar marcadores moleculares tempranos e información que conduzca al diseño de tratamientos dirigidos contra la recaída o metástasis es de especial importancia para mejorar el pronóstico de este tipo de cáncer.

Más del 90% de los casos de cáncer gástrico corresponden a adenocarcinomas (cáncer que se forma en el tejido glandular)⁷. Los epitelios están mantenidos por complejos de uniones intercelulares, entre los que se encuentran las Uniones Estrechas (UEs) las cuales están conformadas por diversas proteínas entre las que destacan las claudinas. En mamíferos existen 27 miembros de claudinas provenientes de un gen ancestral y son componentes integrales de la membrana celular que ayudan a regular el flujo paracelular y a mantener la polaridad celular⁸. La expresión de las claudinas se modifica a la alta o a la baja en diversas neoplasias dependiendo del tejido, favoreciendo un fenotipo tumoral y metastático o actuando como supresoras de tumor. La comprensión de la función de estas proteínas contribuirá a establecer los mecanismos moleculares que actúan en el desarrollo del cáncer y permitirá evaluar la posibilidad de considerarlas como biomarcadores útiles para la detección y diagnóstico de diversos tipos de cáncer⁹.

Las células troncales de cáncer (CTC) representan una subpoblación de células oncogénicas que se renuevan a sí mismas e impulsan el inicio y la progresión del cáncer. Las CTC a menudo adquieren resistencia a múltiples fármacos, al estrés oxidativo, poseen capacidad metastásica y evaden al sistema inmune, por lo que se piensa que son responsables de la recurrencia del cáncer después del tratamiento^{5,10}. Recientemente, los factores de transcripción asociados a troncalidad y autorrenovación, NANOG y SOX2, se han relacionado con las CTC en cáncer gástrico ya que son fundamentales en la oncogénesis, en la transición epitelio-mesenquima (TEM), la progresión tumoral y la metástasis, manteniendo un fenotipo indiferenciado¹¹. En los tumores primarios, las células cancerosas a menudo deben someterse a una TEM durante el proceso de metástasis, lo cual es necesario para entrar en circulación a sitios secundarios.

Para establecer un nuevo tumor los genes responsables de mantener un estado celular mesenquimatoso deben desactivarse pasando a un estado epitelial, esta capacidad de las células que pasan por un proceso de TEM tiene paralelos con las CTC en las cuales una de sus características es recrear la heterogeneidad tumoral. Se ha observado experimentalmente en células de cáncer de mama circulantes, que expresan marcadores de CTC como CD44, marcadores de autorenovación como SOX2 y marcadores de TEM como SNAIL y TWIST¹⁰. Esto nos habla de poblaciones celulares capaces de llevar a cabo TEM y dar origen a un nuevo tumor en otros tejidos debido a su fenotipo indiferenciado de CTC.

Antecedentes.

Uniones Estrechas.

Las uniones estrechas (UEs) se localizan en la parte más apical de las células epiteliales y endoteliales permitiendo que los tejidos interactúen directamente con el ambiente exterior y con compartimentos internos contiguos al exterior; estos están revestidos por superficies mucosas, donde las células epiteliales actúan como

aislamiento del órgano interno. Estas estructuras no solo proporcionan una capa protectora, también actúan como una barrera selectiva restringiendo el libre intercambio a través del espacio paracelular^{12,13}. Las proteínas de las UEs son diversas e incluyen ocludinas, claudinas, tricelulinas, cingulinas y moléculas de unión/adhesión (JAM por sus siglas en inglés), se caracterizan porque interactúan entre sí y con el citoesqueleto para formar una arquitectura compleja. Entre estas proteínas de UEs, las claudinas son clave ya que interaccionan dinámicamente para formar poros o barreras y ayudan al flujo paracelular de las células epiteliales¹².

Claudinas.

Las claudinas (Cldn) tienen las siguientes funciones: (1) Función de valla, responsable de mantener la polaridad de los epitelios diferenciando los dominios celulares apical y basolateral; (2) Moléculas de señalización, involucradas en el crecimiento, supervivencia, proliferación y diferenciación celular y (3) Función de compuerta, separando en compartimentos los fluidos con solutos para evitar que se mezclen¹⁴. Se han identificado 27 genes de claudinas en mamíferos¹⁵. Las claudinas clásicas (como se les llama por homología) incluyen a las claudinas 1-10, 14, 15, 17, y 19, y claudinas no clásicas son las 11-13, 16, 18 y 20-27, que son menos homólogas¹².

La estructura de las claudinas se compone de cuatro dominios transmembranales involucrados en la formación de poros (~50 a.a.), las regiones intracelulares N terminal (7 a.a.) y C terminal (25-55 a.a.) que interactúan con otras proteínas a través de un dominio PDZ¹⁶ y las asas extracelulares (AEC) donde la AEC1 consta de ~50 a.a. con dos cisteínas conservadas implicadas en la función de barrera (Figura 2). Además, las cargas negativas y positivas en la AEC1 contribuyen a la formación de poros. La AEC2 de ~25 a.a. es responsable de las interacciones homo y heterotípicas y está involucrada en la unión de la enterotoxina (CpE) de *Clostridium perfringens* a las células infectadas por este patógeno¹². Estructuralmente, en 2014 se describió la estructura cristalográfica de la claudina-15 (que forma parte de las claudinas clásicas) y se mostró que contiene hojas β -

plegadas para los dos segmentos extracelulares que están anclados a una región transmembrana de cuatro α -hélices unidas por motivos consenso¹⁷ (Figura 3).

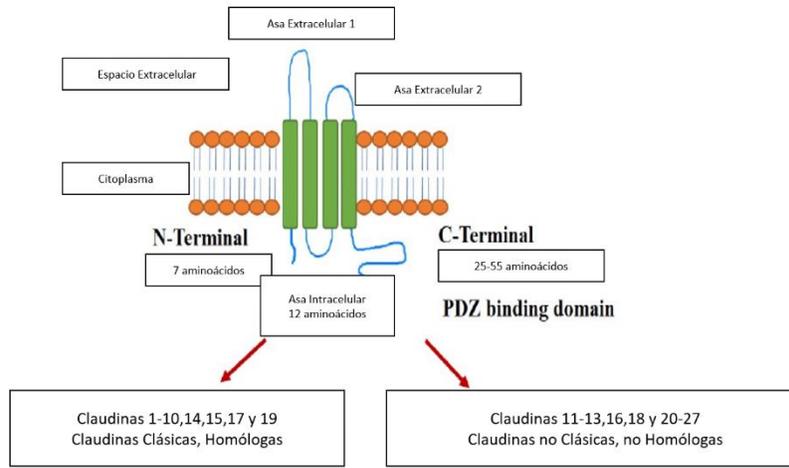


Figura 2. Organización estructural de las claudinas y su clasificación basada en homología. Dominios transmembranales (verde), membrana lipídica (naranja) y asas extracelulares y regiones terminales N y C (azul) (Gowrikumar, Singh and Dhawan, 2020).

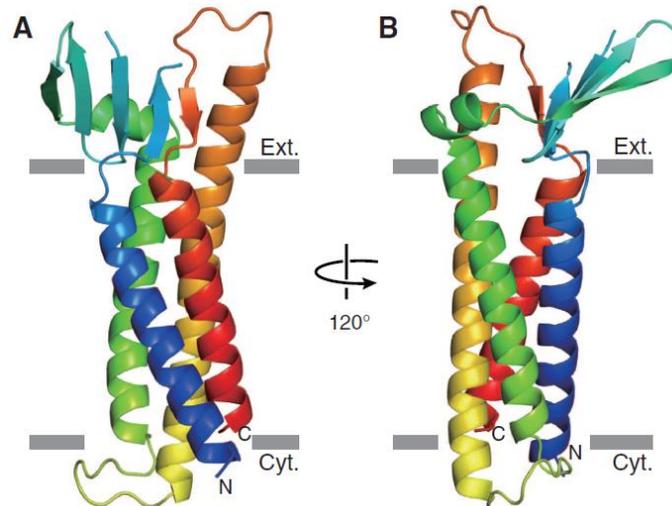


Figura 3. Cristalografía de la Cldn-15. **A y B)** Cristalografía de la Cldn-15 representada en la membrana celular desde distintos ángulos hojas β -plegadas para las regiones extracelulares ancladas a una región transmembranal de cuatro α -hélices (Modificada de Suzuki et al., 2014).

Claudinas y Cáncer.

La expresión de las claudinas varía entre los tejidos¹⁸ y se modifica a la alta o a la baja en diversas neoplasias, favoreciendo un fenotipo tumoral y metastático o actuando como supresoras de tumor^{12,19,20}. Se sabe que las claudinas Cldn-1, -3, -4 y -7²¹ están desreguladas con frecuencia en los cánceres. En la Tabla 1 se muestran diversas claudinas que pueden tener funciones de promotoras y/o supresoras de tumor en distintos cánceres, lo que ejemplifica el relevante papel de las claudinas en el cáncer.

Claudins Subtype	Cancer Type	Proto-Oncogene
Claudin-6	Gastric cancer	Tumour promotor
Claudin-1	Colon cancer	Tumour promotor
Claudin-3	Ovarian cancer	Tumour promotor
Claudin-4	Ovarian cancer	Tumour promotor
Claudin-6	Breast cancer, Gastric cancer	Tumour promotor
Claudin-7	Colon cancer	Tumour promotor
Claudin-2	Lung cancer	Tumour promotor
Claudin-1	Gastric cancer	Tumour suppressor
Claudin-1	Lung cancer	Tumour suppressor
Claudin-3	Ovarian cancer	Tumour suppressor
Claudin-4	Ovarian cancer	Tumour suppressor
Claudin-7	Lung cancer	Tumour suppressor
Claudin-11	Gastric cancer	Tumour suppressor
Claudin-2	Osteosarcoma	Tumour suppressor

Tabla 1. Claudinas como promotoras y supresoras de tumor en distintos cánceres (modificada de Gowrikumar, Singh and Dhawan, 2020).

A continuación se describirá brevemente la relevancia de las claudinas en el cáncer.

En un estudio reciente de Chang *et al*, se muestra evidencia de hiperplasia intestinal y adenomas en ratones K.O. para claudina-7²². De acuerdo con esto, la Cldn-7 fue regulada a la baja en muestras de pacientes con cáncer de colon en comparación con tejido normal. Por el contrario, claudina-7 y su asociación con la molécula de adhesión de células epiteliales (EPCAM) induce la proliferación, la regulación positiva de proteínas antiapoptóticas y la resistencia a fármacos en células humanas embrionarias de riñón HEK293²³.

Por otro lado, los ratones K.O. para claudina-18 desarrollan espontáneamente adenocarcinomas de pulmón. Por su parte, se determinó que la disminución de la claudina-3 indujo tumores mediante el incremento de la actividad de β -catenina a través de la señalización de IL-6/STAT3 en el cáncer de colon²⁴. De manera contraria, la claudina-4 acelera la migración celular y la invasión en líneas celulares tumorales de ovario²⁵.

Por otro lado, Se demostró que claudina-6 es un supresor de tumor a través de estudios de manipulación genética en células de carcinoma de cuello uterino²⁶. Sin embargo, en la línea celular de adenocarcinoma gástrico humano (AGS), se demostró que se incrementaba su potencial invasivo, de migración y su tasa de proliferación al sobreexpresar a Cldn-6 y -9²⁷. Dichos hallazgos muestran la diversidad de efectos que puede tener la claudina-6 en distintos tejidos en el desarrollo del cáncer.

Una serie de artículos de Dhawan *et al.* han demostrado un papel importante de claudina-1 como promotor tumoral en el cáncer de colon²⁶, el aumento de esta proteína se asoció causalmente con la metástasis. De manera similar, la claudina-2 está regulada a la alza en el cáncer de colon y participa en la progresión del cáncer.

En contraste al cáncer de colon, la claudina-1 es frecuentemente regulada a la baja en el cáncer de mama ²⁹. Los estudios demuestran la interacción de SNAIL (factor de transcripción asociado a la autorenovación) con la región E-box del promotor de claudina-1 causando la inhibición de claudina-1. Se sabe que SNAIL actúa como factor de transcripción causando la represión de E-Cadherina (una proteína importante en la adherencia celular y cuya pérdida provoca poca cohesión en el epitelio) y tiene un papel potencial en la promoción de la tumorigénesis³⁰. Considerando la evidencia antes mencionada en conjunto, se concluye que la desregulación de las claudinas en los epitelios puede generar cambios en la señalización celular que promueven la oncogénesis de manera tejido dependiente.

Células Troncales de Cáncer (CTC) y Claudinas.

Las células troncales son cruciales para el desarrollo y la homeostasis de muchos tejidos³¹ y han sido utilizadas en terapias de reemplazo celular en el caso de daño o degeneración³². La pluripotencia de las células troncales se define como el potencial de autorrenovación y diferenciación en las tres capas germinales¹². Son capaces de diferenciarse en una amplia variedad de células bajo la influencia de diversas moléculas de señalización, factores de crecimiento y factores de transcripción³³. Por otro lado, las células troncales también son un factor importante para muchos cánceres generando tumores más agresivos y teniendo el potencial de reformar todo el tumor^{12,34}.

Las células troncales de cáncer representan un grupo de células en tumores heterogéneos, que poseen propiedades de iniciación tumoral y autorrenovación, dando lugar a una progenie tumorigénica. Las CTC se enriquecen regularmente después de la quimioterapia y conducen a la recurrencia del cáncer¹². Aunque existe polémica respecto a este modelo.

Como se menciona anteriormente, antes del proceso de metástasis, regularmente las células deben pasar por la TEM, lo que implica que las poblaciones celulares puedan dar origen a un nuevo tumor en otros tejidos (metástasis) debido a su fenotipo indiferenciado. Cabe mencionar que se conocen otros procesos por los cuales las células de cáncer pueden migrar sin embargo, no serán evaluados en este trabajo. La detección de las CTC se basa en diversos marcadores que se relacionan con sus características antes mencionadas, estos marcadores serán discutidos más adelante.

Durante la detección de una proteína altamente particular para las células troncales pluripotentes humanas (hPSC por sus siglas en inglés), Uri Ben-David *et al.*³⁶ encontraron que la claudina-6 es muy específica para estas. La expresión de claudina-6 calculada por microarreglos fue 90 veces mayor en hPSC que en células diferenciadas. Robusteciendo lo anterior, Sugimoto *et al.*³⁷ observaron el potencial de claudina-6 para desencadenar la morfogénesis epitelial en células madre de ratón ya que reguló a otras moléculas de UEs como claudina-7, ocludina, Zonula

occludens (ZO-1 α), y al complejo ezrina/radixina/moesina (ERM) que regulan la organización y función de estructuras corticales en las células epiteliales polarizadas uniendo a los filamentos de F-actina hacia las proteínas de la membrana plasmática³⁸. Esto fue respaldado por otros estudios, que también mostraron que la expresión de claudina-6 es un marcador temprano en las células troncales embrionarias de ratón^{39,40}.

Durante la diferenciación de células troncales embrionarias a células similares a hepatocitos hubo una disminución en los marcadores de células troncales y de autorrenovación Oct3/4 y NANOG como era esperado. Junto con los marcadores de células troncales, la claudina-1 disminuyó eventualmente, mientras que la claudina-4 aumentó y fue mayor en la etapa final de la diferenciación⁴¹. Esto muestra la participación de algunas claudinas en etapas embrionarias y el establecimiento de otras en células diferenciadas, lo que puede relacionarse con el desarrollo del cáncer y la pobre prognosis al sobreexpresar claudinas embrionarias, como claudina-6, en distintos tipos de cáncer y de especial importancia para este trabajo, en el cáncer gástrico²⁷.

La vía Wnt proporciona las señales clave para lograr el fenotipo de CTC, así como para el desarrollo de células troncales normales. Artículos recientes han destacado el vínculo entre las claudinas, la vía Wnt/ β -catenina y el papel de las CTC en el desarrollo tumoral. Un ejemplo es la pérdida de claudina-3, que induce la activación Wnt/ β -catenina, vía relacionada con troncalidad contribuyendo así al desarrollo del cáncer de colon²⁴. Darido *et al.* proporcionó evidencia de que Sox-9 (marcador de troncalidad) regula la expresión de claudina-7⁴². Además, se sabe que la claudina-3 juega un papel oncogénico en el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC por sus siglas en inglés) promoviendo la troncalidad y la quimiorresistencia. El silenciamiento de claudina-3 en estas células fue capaz de combatir la formación de esferoides y la formación de tumores, así como un aumento de sensibilidad al cisplatino en este cáncer⁴³. Estas evidencias nos hablan de la importancia de las claudinas en el inicio y progreso del cáncer y sobre cómo pueden inducir el fenotipo de CTC.

Marcadores de CTC.

CD44.

CD44 es una molécula de adhesión a la superficie celular involucrada en interacciones célula-célula, adhesión celular y migración⁴⁴. El principal ligando de CD44 es el ácido hialurónico (AH), un polisacárido presente en la matriz extracelular de los mamíferos^{45,46}. Se compone de un dominio amino terminal extracelular distal (ECD por sus siglas en inglés), una región de tallo, un dominio transmembrana (TM) y un dominio carboxilo terminal citoplásmico intracelular (ICD por sus siglas en inglés).

El gen CD44 codifica para 20 exones, de los cuales los exones 6 al 15 corresponden a exones variables (v1-v10). El ECD corresponde estructuralmente a una proteína globular estabilizada por puentes disulfuro entre tres pares de residuos de cisteína⁴⁵ (Figura 4). Las cadenas de carbohidratos, generalmente glicoaminoglicanos (GAG), se unen a este dominio, lo que confiere a CD44 una carga eléctrica negativa y rigidez^{47,48}. La región del tallo es donde se insertan los exones variables en las isoformas de CD44v. El dominio TM tiene un papel importante en la localización de CD44 en la superficie celular⁴⁹, ya que un residuo de cisteína conservado en esta región (cisteína 286) promueve su homodimerización y unión al AH^{50,51}. El ICD interactúa con los filamentos de actina a través de las proteínas ERM⁴⁷, que se unen a CD44 a través de su dominio FERM amino-terminal y al citoesqueleto de actina a través de su dominio carboxilo terminal⁵². La asociación entre CD44 y el citoesqueleto permite la modulación de la forma y la motilidad celular⁵³. La asociación entre el ICD de CD44 y las proteínas ERM induce cambios en la arquitectura del citoesqueleto y permite la transducción de algunas vías de señalización, ya que CD44 también interactúa como correceptor para una gran cantidad de receptores⁵⁴ (Modificado de Medrano-González *et al.* 2021). Está demostrado que CD44 y sus isoformas son marcadores fiables de CTC que se

pueden utilizar tanto solos como en combinación con otros marcadores de superficie para identificar CTC³¹.

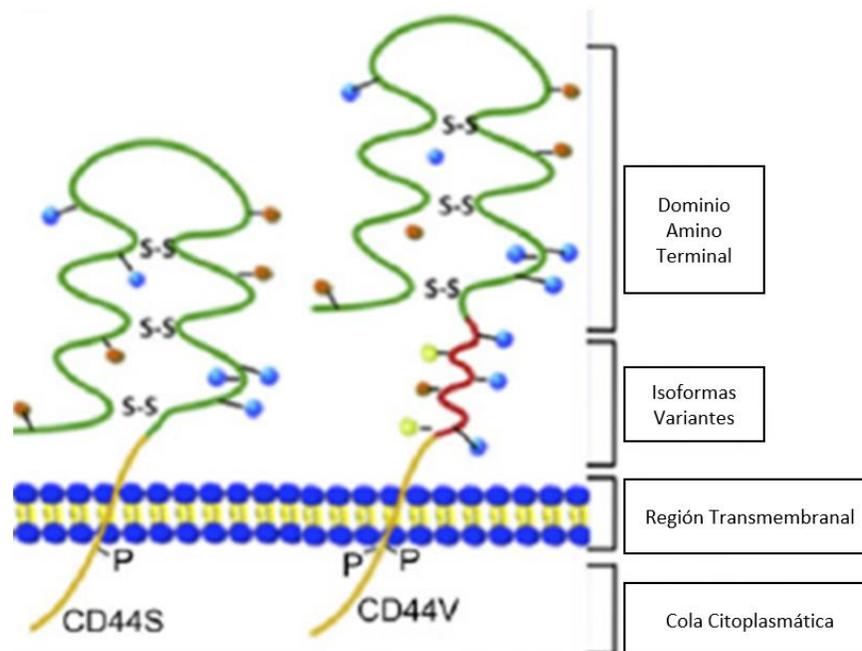


Figura 4. Estructura de CD44. Está compuesta por un dominio extracelular (ECD) estabilizada por puentes disulfuro, una región del tallo donde se unen los exones variables en CD44v, un dominio transmembranal (TM) importante para la localización de la molécula y un dominio intracelular (ICD) que interactúa con los filamentos de activa a través de tres proteínas: ERM (Modificada de Yan et al. 2015).

CD24.

CD24 es una proteína de superficie celular altamente glicosilada compuesta de una proteína central pequeña. Presenta patrones altamente variables de N- y O-glicosilación dependientes del contexto celular; así, su peso molecular puede variar de 25 a 75 kDa. Está unida a la membrana a través de un anclaje de glucosilfosfatidil-inositol (GPI)⁵⁵ que es unida durante su procesamiento en el retículo endoplásmico⁵⁶. Durante las modificaciones postraduccionales, se remueven dos terceras partes de los aminoácidos originales, resultando en un péptido maduro de 32 residuos⁵⁷.

Los diferentes patrones de glicosilación exhiben un potencial único de unión a receptores de superficie celular. Por ejemplo, los ácidos siálicos α 2,6 y α 2,3 pueden unirse a Siglec-G de otra célula en procesos de sepsis; de manera interesante, L1CAM sólo puede unirse a la forma α 2,3, mientras que los carbohidratos LewisX se unen a contactina y TAG-1 durante la neurogenesis. Por otro lado, los carbohidratos sulfatados de NK-1 (HNK-1) se unen a P-selectina durante la adhesión celular (Figura 5), presentando así diferentes posibilidades de unión dependiente de modificaciones post-traduccionales y el contexto celular⁵⁸.

Gli1 que es un componente de la vía de señalización Sonic Hedgehog funciona como factor de transcripción para el gen de CD24⁵⁷. Se ha reportado como marcador de CTC de páncreas, intestino, mama, gástrico y sistema nervioso^{59,60}. Se ha visto una fuerte expresión de CD24 en meduloblastomas, neurocitomas y neuroblastomas indiferenciados⁶¹. En cáncer de páncreas, células CD44⁺/CD24⁺ fueron capaces de generar tumores en ratones inmunodeficientes, mostraron capacidad de autorrenovación, daban lugar a una progenie diferenciada y generaban una morfología similar al cáncer primario del paciente. En cáncer gástrico, CD24 está involucrado en procesos de proliferación, migración y quimio sensibilidad⁶², así como a un incremento en la invasividad y un peor pronóstico⁶³ (Modificado de Medrano-González, 2018).

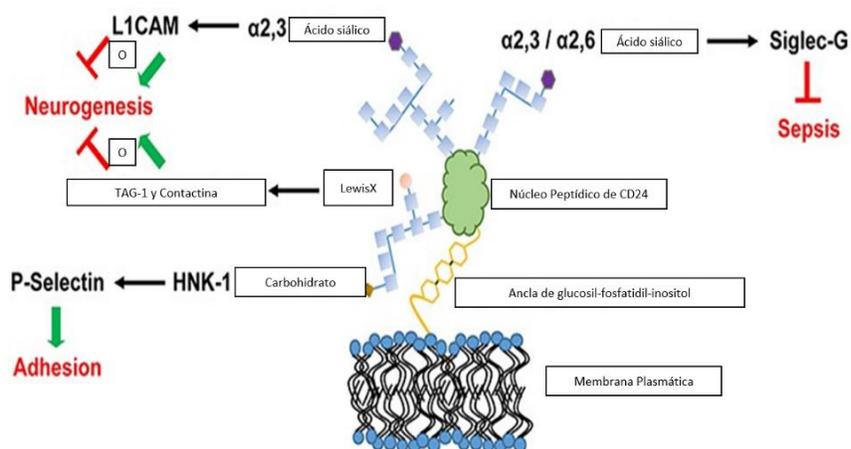


Figura 5. Estructura de CD24. CD24 es una proteína pequeña a la cual están unidas diferentes cadenas de carbohidratos. Está unida a la membrana por un anclaje de glucosil-fosfatidil-inositol. Las glicosilaciones están representadas como cadenas de monómeros de carbohidratos (cuadros azules) (Modificada de Ayre et al. 2016).

Población CD44⁺/CD24⁻ en CTC.

Las células troncales de cáncer de mama se identificaron por primera vez según los niveles de expresión de antígenos de superficie celular, con fenotipo CD44⁺/CD24⁻ que conducen a una alta capacidad de invasión, migración y proliferación⁶⁴ Se demostró que las células de cáncer de mama con fenotipo CD44⁺/CD24⁻, que componen solo una pequeña parte del tejido tumoral, podrían generar un tumor en un modelo de xenoinjerto mientras que las demás células cancerosas que constituyen la mayor parte del tumor no eran capaces de esto.^{64,65}

Por otro lado, en la línea celular de cáncer gástrico positivo al virus de Epstein-Barr (VEB) SNU-719, se aislaron CTC y se encontró que CD44⁺/CD24⁻(low) podría ser la combinación potencial de marcadores de superficie para CTC en CG VEB⁶⁶. Además, la presencia de células CD44⁺/CD24⁻(low) en tejidos cancerosos predijo una peor supervivencia libre de enfermedad, en comparación con pacientes con más células cancerosas que no presentaban estas características⁶⁶. En comparación con SNU-719 las células CD44⁺/CD24⁻(low) mostraron mayor actividad inmunosupresora al inhibir la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC por sus siglas en inglés) y la activación de células T⁶⁶.

Marcadores de Autorrenovación.

Las vías de señalización que normalmente están activas durante la embriogénesis y la homeostasis se vuelven aberrantes durante la formación de tumores regulada por CTC. Wnt, Hedgehog y Notch son las principales vías de señalización responsables de la troncalidad y la capacidad de diferenciación de las CTC³¹.

Para que las CTC tengan capacidad de autorenovación al máximo requieren expresar factores de transcripción como SOX2, NANOG, OCT4, KLF4 y c-MYC; estos se han propuesto como dianas potenciales para la terapia del cáncer^{65,67,68}.

Recientemente, NANOG y SOX2 se han relacionado con las CTC en cáncer gástrico ya que son fundamentales en la oncogénesis, la TEM y la metástasis, manteniendo un fenotipo indiferenciado y una progresión sostenida del cáncer¹¹.

NANOG.

La proteína NANOG consiste de 280 residuos de aa. Estructuralmente, contiene un dominio N-terminal rico en residuos de serina, un homeodominio y un dominio C-terminal que contiene repeticiones de triptófano altamente conservado⁶⁸ (Figura 6). Participa en el mantenimiento de la pluripotencia durante el desarrollo embrionario del epiblasto y evita la diferenciación al endodermo primitivo⁶⁹.

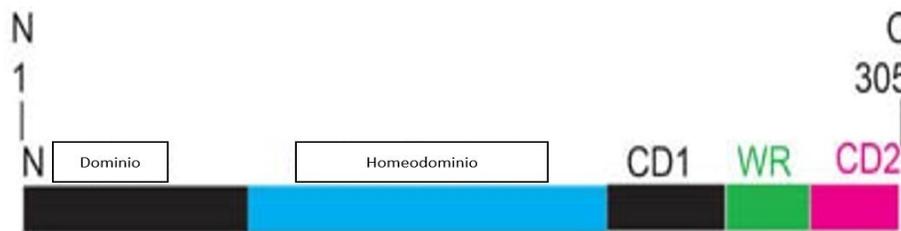


Figura 6. Estructura de Nanog. Está compuesto por un extremo N-terminal rico en residuos de serina, un homeodominio central y un dominio C-terminal en el cual se encuentra una región de unión CD1, repeticiones de 10 pentapéptidos (WR) que funciona como activador y una región de 58 aminoácidos (CD2) que funciona como trans-activador (Modificada de Pan et al. 2007).

SOX2.

SOX2 es un miembro de la familia de factores de transcripción Sox. Consiste en una proteína de 317 residuos compuesto por 3 dominios principales un dominio HMG (High mobility group por sus siglas en inglés) en el extremo N-terminal que se une a secuencias específicas de DNA, un dominio central de dimerización y un dominio C-terminal que reconoce y se une a promotores de genes blanco activando o reprimiendo su expresión⁷⁰⁻⁷² (Figura 7).

La expresión de SOX2 es inicialmente detectada en la etapa de mórula para posteriormente localizarse en la masa interna celular del blastocisto, por lo que SOX2 tiene un papel importante en la formación temprana de las células troncales

pluripotentes embrionarias⁷³, además juega un rol importante en el mantenimiento de las células troncales adultas⁷⁴.

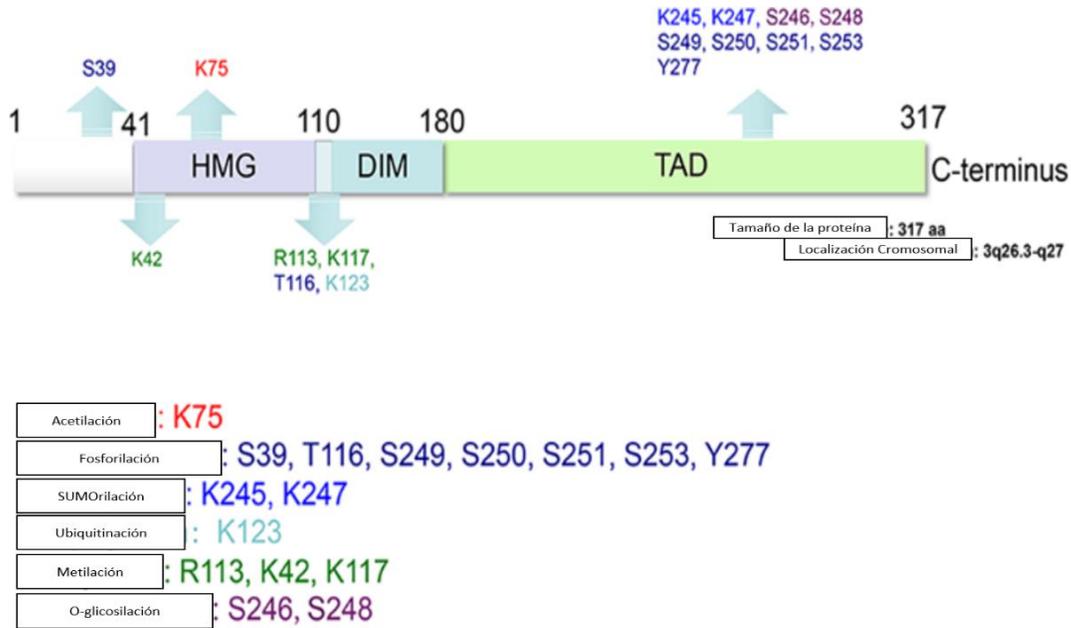


Figura 7. Estructura de Sox2 y sitios de modificación post traduccional. Sox2 contiene tres dominios funcionales: un grupo de alta movilidad (HMG), un dominio de dimerización (DIM) y un dominio de transactivación (TAD). Algunos residuos pueden ser modificados por acetilación, fosforilación, sumoilación, ubiquitinación, metilación u O-glicosilación (Grimm et al.2020).

Marcadores de TEM.

La transición epitelio mesenquima es un proceso que cambia las características de las células epiteliales y las convierte en fenotipos similares a células mesenquimales durante el desarrollo. Además del desarrollo embrionario, la activación de la TEM es crucial para procesos que implican la formación de células troncales, la cicatrización de heridas y la progresión del carcinoma, ya que las células que pasan por TEM ganan capacidad de migración e invasividad^{75,76}.

Durante la progresión de la TEM, las células epiteliales pierden sus moléculas de adhesión como UEs, desmosomas y hemidesmosomas que conducen a una pérdida de polaridad apical-basolateral^{75,77}.

Además, se ha demostrado que los marcadores de células epiteliales como la E-cadherina se regulan a la baja mientras que los marcadores mesenquimales como la N-cadherina y la vimentina se regulan a la alza durante la TEM^{31,75}.

Los reguladores de la TEM pueden ser factores de transcripción o impulsores del proceso.

SNAIL.

Snail es una familia de factores de transcripción tipo “dedos de zinc” en el que se encuentran agrupados Snai1 (SNAIL), Snai2 (slug) y Snai3 (smuc), las cuales tienen una región C-terminal que contiene de cuatro a seis dedos de zinc tipo C2H2. El extremo N-terminal contiene un dominio SNAG esencial para la represión transcripcional⁷⁸. SNAIL está compuesto por 264 residuos de a.a. y generalmente actúa como un represor transcripcional^{30,79,80} (Figura 8), un dominio de transactivación SNAG relacionado con la TEM (círculo rosa) seguido por el dominio de interacción CtBP. En el centro, se encuentra el dominio específico de las proteínas Snai1, Slug (naranja), la caja de destrucción DB (verde) y la señal de exportación nuclear NES (amarillo). Durante el desarrollo embrionario, regula el movimiento y la adhesión celular pero no en el establecimiento de linajes relacionados con el mesodermo ya que las células de ratones mutantes a esta proteína son capaces de formar el mesodermo, pero no de migrar. Además, ha sido descrita su participación en procesos de TEM⁸¹. Se ha demostrado que SNAIL, otro factor de transcripción maestro de la TEM, mejora la capacidad de iniciación de tumores de las células en modelos humanos de cáncer de mama³¹.

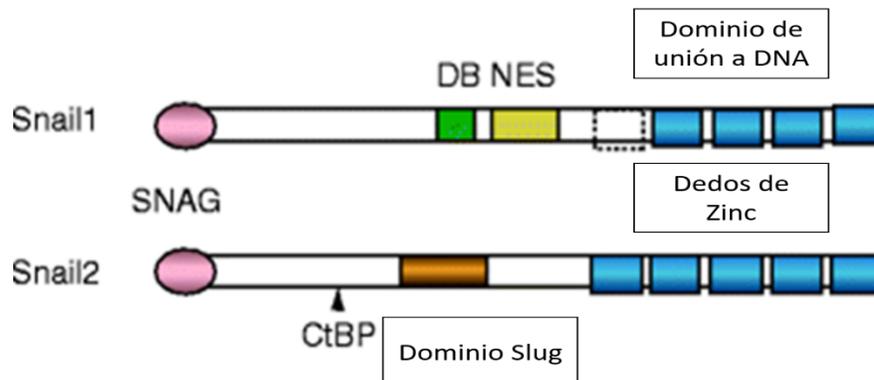


Figura 8. Estructura de los factores de transcripción Snai1 y Snai2. En el extremo N-terminal, se encuentra un dominio de transactivación SNAG (círculo rosa) seguido por el dominio de interacción CtBP. En el centro, se encuentra el dominio específico de las proteínas Snai1, Slug (naranja), la caja de destrucción DB (verde) y la señal de exportación nuclear NES (amarillo). En el extremo c-terminal se encuentran los dominios de unión a DNA (azul) (Amparo et al. 2011).

TWIST.

El gen de Twist contiene dos exones y un intrón. El primer intrón contiene un marco abierto de lectura con 202 residuos de a.a. mientras que el segundo exón no se traduce⁸². La proteína TWIST es un factor de transcripción expresado durante el desarrollo temprano⁸³. Se expresa en tejidos derivados del mesodermo durante el desarrollo embrionario y en células troncales del mesénquima en individuos adultos⁸². En su estructura se distinguen los siguientes dominios: (1) la región básica, necesaria para su unión a DNA, (2) el dominio HLH (*hélice-loop-hélice*) necesario para la dimerización de la proteína y (3) un motivo WR que le permite interactuar con otros factores de transcripción y actuar como un dominio de activación o represión^{84,85} (Figura 9). TWIST es un factor de transcripción maestro en la TEM³¹. TWIST, factor de transcripción maestro de TEM, que regula las propiedades de CTC, puede reprimir a E-Cadherina indirectamente.

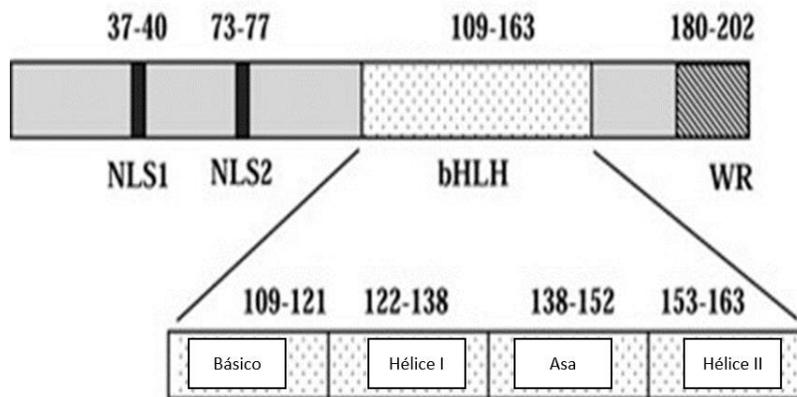


Figura 9. Estructura de Twist. Constituido por secuencias de señalización nuclear NLS1 y NLS2, un dominio bHLH, hélice-asa, hélice, y un motivo de arginina y triptófano (WR). Los números muestran el número de residuos de aminoácidos contenidos en cada dominio (Modificada de Qin et al. 2012).

E-Cadherina.

El gen de E-cadherina (CDH1) contiene 16 exones cuyo tamaño varían de 115 a 2,245 pb. Codifica para una proteína de 120 kDa. Contiene un dominio extracelular, un solo segmento transmembranal y un dominio citoplásmico corto a través del cual interactúa con las cateninas alfa, beta y gamma y p120 que le permiten su asociación con el citoesqueleto de actina (Figura 10)⁸⁵ y un dominio extracelular compuesto por 5 dominios en tándem, C1-C5, donde se unen las moléculas de Ca^{+2} , región indispensable para su estabilidad (Liu et al. 2014).

Cumple un papel importante en el desarrollo de los tejidos, organogénesis y el mantenimiento de los epitelios. Su asociación con diferentes cateninas es esencial para el establecimiento de las uniones adherentes en procesos de TEM y mesénquima-epitelio, necesarios para mantener la plasticidad del tejido durante el desarrollo embrionario^{86,87}. Cerca del 3% del cáncer gástrico difuso es hereditario debido a una mutación en el gen CDH1^{4,5}.

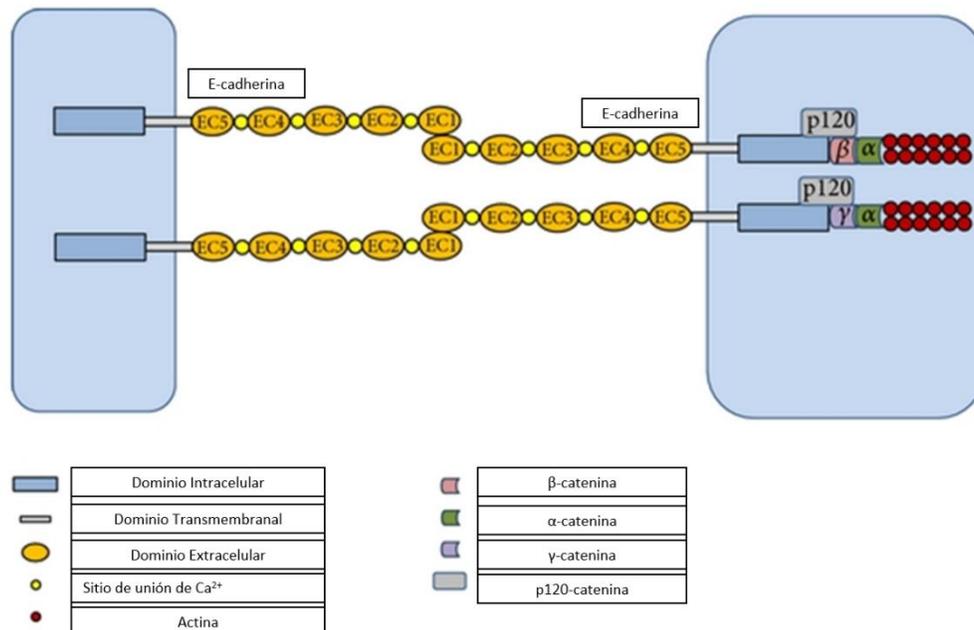


Figura 10. Estructura de E-cadherina. Está compuesta por 3 dominios principales: un dominio intracelular, un solo segmento transmembranal y un dominio extracelular compuesto por 5 dominios en tándem, (Modificada de Liu et al. 2014).

N-Cadherina.

N-Cadherina es un miembro de la familia de moléculas de adhesión dependientes de calcio. Consiste de 5 dominios extracelulares (residuos 1 a 542 de la proteína madura) unidos a un dominio intracelular funcional. La unión entre monómeros de N-cadherina de células opuestas ocurre por la inserción recíproca de un residuo de triptófano en el primer dominio extracelular⁸⁸. La expresión más temprana de N-Cadherina ocurre durante la neurulación, en la separación del tubo neural del ectodermo embrionario⁸⁹.

La función de N-Cadherina depende del contexto celular. Además de mediar las interacciones célula-célula, está involucrada en vías de señalización al interactuar con β -catenina y la catenina p120, así como de estabilizar al receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) en la membrana⁹⁰. Además, regula la motilidad celular al interactuar con los filamentos de actina a través de su unión a cateninas⁹¹ (Figura 11).

Su expresión aberrante ha sido un marcador de TEM y comúnmente se encuentra presente en tumores con un fenotipo agresivo⁹². N-Cadherina promueve procesos de invasión y motilidad celular aún en condiciones donde se induce la expresión de marcadores epiteliales⁹³.

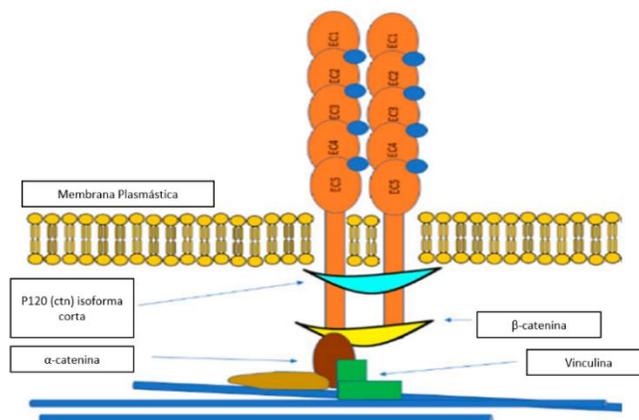


Figura 11. Estructura de N-cadherina. Posee un dominio intracelular, un dominio transmembranal y un dominio extracelular al que se le añaden moléculas de Ca^{2+} para su estabilidad. Aunque las cateninas α y β son cruciales para la unión de las cadherinas a la actina, se requiere de adaptadores adicionales como vinculina (Modificada de Loh et al. 2019).

Planteamiento del problema.

En la línea celular de adenocarcinoma gástrico humano AGS, se demostró un incremento en su potencial invasivo, de migración y su tasa de proliferación al sobreexpresar a Cldn-6 y -9²⁵. Por otro lado, se ha observado en cáncer de mama que la desregulación de Cldn-3, -4 y -7 enriquece las características asociadas a CSC y de TEM⁹⁴ y en células de cáncer de mama circulantes se expresan marcadores de CTC como CD44, marcadores de autorenovación como SOX2 y marcadores de TEM como SNAIL y TWIST¹⁰. Con base en las funciones que tienen claudina-6 y -9 en células AGS se podría especular que la sobreexpresión de estas claudinas podría favorecer un fenotipo de CTC y por ende, una población celular con características que le permitan entrar en TEM y colonizar sitios secundarios.

Justificación.

El cáncer gástrico es un problema de importancia médica en nuestro país y a nivel mundial^{2,3}. A pesar de que ya se han identificado algunos marcadores de células troncales de cáncer gástrico como CD44 y CD24⁹⁵, poco se sabe sobre el efecto que tiene la expresión de ciertas claudinas en la adquisición de un fenotipo desdiferenciado o troncal y en las características de esta subpoblación.

Considerando la relación que existe entre las claudinas y las CTC, el hecho de que claudina -6 y 9 se encontraron sobreexpresadas en tumores de cáncer gástrico del tipo difuso²⁷ y destacando la alta homología entre ellas, localizándose a 200 pb de distancia genómica entre sus genes y estando ambas relacionadas con la troncalidad, migración e invasión^{27,96}, este estudio pretende obtener evidencia de si la sobreexpresión de Cldn -6 o -9 modifica la expresión de marcadores de CTC (CD44 y CD24), de autorrenovación (SOX2 y NANOG) y de TEM (TWIST, SNAIL, E-Cadherina y N-Cadherina) robusteciendo la idea de que estas proteínas generan CTC con capacidad metastásica.

Esto ampliaría el conocimiento sobre la relevancia de estas claudinas en el desarrollo de una subpoblación celular que tiene un papel fundamental en la remisión del cáncer gástrico y su metástasis, estableciendo las bases para el desarrollo de terapias enfocadas a estas subpoblaciones.

Hipótesis.

La sobreexpresión de Cldn-6 o -9 modificará la expresión de marcadores de CTC, autorenovación y TEM, el porcentaje de su expresión poblacional y la capacidad de migración e invasividad en la línea celular AGS.

Objetivo principal.

Determinar el efecto de las Cldn-6 o -9 en las características asociadas a CTC tales como la expresión de marcadores de CSC, de autorenovación y de TEM, su porcentaje poblacional y la capacidad de migración e invasividad en la línea celular AGS.

Objetivos particulares.

1.-Evaluar la expresión y localización de las siguientes moléculas en células AGS que sobreexpresan a Cldn-6 o -9:

- 1) Marcadores de CTC: CD44 y CD24.
- 2) Factores de transcripción asociados a autorenovación: SOX2 y NANOG
- 3) Marcadores de TEM: TWIST, SNAIL, E-Cadherina y N-Cadherina.

2.-Determinar el porcentaje poblacional en células AGS que sobreexpresan a Cldn-6 o -9 de los siguientes marcadores:

- 1) Marcadores de CSC: CD44 y CD24
- 2) Factores de transcripción asociados a autorenovación: SOX2 y NANOG
- 3) Marcadores de TEM: TWIST, SNAIL, E-Cadherina y N-Cadherina.

3.- Investigar la capacidad de migración e invasión de células AGS que sobreexpresan a Cldn-6 o -9.

Materiales y Métodos.

1. Modelo.

Se utilizaron las sublíneas celulares estables derivadas de adenocarcinoma gástrico humano AGS que sobreexpresan Cldn-6 y Cldn-9. Estas se generaron empleando los vectores pmaxGFP que contenía los genes de Cldn-6 y Cldn-9 (sistema Amaxa).

2. Cultivo de células AGS.

Para esta investigación se utilizaron las cuatro líneas celulares siguientes. La línea celular AGS (AGS-WT) se mantuvo en cultivo con medio esencial mínimo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Biowest), 2 mM de L-glutamina (Biowest), 100 U/mL de penicilina-estreptomina (Biowest), y 2 mM de piruvato de sodio (Corning). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C y 5% CO₂. El mantenimiento se realizó cambiando el medio de cultivo cada 2 días y lavando con PBS 1x antes de colocar medio nuevo. Las las sublíneas celulares estables que sobreexpresaban Cldn-6 o -9 (AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9) y su control (células que contienen al vector vacío AGS-GFP), se seleccionaron y mantuvieron con 500 µg/ml de Geneticina (G-418, Goldbio) en medio de cultivo.

3. Citometría de Flujo.

Arreglo celular sistemático activada por fluorescencia y Citometría de flujo (FACS).

Una vez que las células AGS-WT, AGS-GFP, AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 alcanzaron el 80% de confluencia se disgregaron del cultivo utilizando verseno (EDTA 0.05 mM en PBS) durante 5 min y se contaron utilizando un hemocitómetro. La suspensión celular (4×10^5 células) se centrifugó dos veces durante 5 min a 1,500 rpm en

amortiguador de FACS (PBS con azida de sodio al 0.09% y SFB al 1%). Posteriormente, las células se fijaron y se permeabilizaron con el amortiguador de fijación I y el amortiguador de permeabilización III (BD BioSciences Phosflow), respectivamente, para marcar proteínas nucleares. Para el marcaje de proteínas de membrana, las células se fijaron y permeabilizaron con el Kit Cytotfix/Cytoperm (BD BioSciences). En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos primarios y secundarios fueron utilizados a diluciones determinadas previamente por titulación.

Proteínas de Membrana.

Las cuatro líneas celulares se fijaron y permeabilizaron como se describió anteriormente para evaluar a las proteínas de membrana. Se incubaron durante 30 minutos con los anticuerpos anti-Cldn-6 (Santa Cruz cabra/humano 1:100), anti Cldn-9 (Santa Cruz cabra/humano 1:100) y se marcaron con los isotipos de conejo: IgG-APC (R&D Systems, 1:800) e IgG-PE (Novus Biologicals, 1:4000). De manera independiente, también se realizó un marcaje con los anticuerpos Anti-CD24 Alexa Fluor 405 (Novus Biologicals, 1:200, rata/humano), anti-CD44 APC (Biolegend, 1:100, ratón/humano), y con los controles de isotipo IgG2bk Alexa Fluor 405 (Novus Biologicals, 1:200), IgG1,k APC (Biolegend 1:100), respectivamente, en este caso se realizó un doble marcaje que permitió generar cuadrantes para analizar las subpoblaciones CD44⁺/CD24⁺, CD44⁺/CD24⁻, CD44⁻/CD24⁺ y CD44⁻/CD24⁻ en las cuatro sublíneas (Figura 13). De la misma forma se fijaron y permeabilizaron las cuatro sublíneas y se marcaron con los anticuerpos anti-E-Cadherina (Santa Cruz Biotechnology, 1:200, ratón) y anti-N-Cadherina (Santa Cruz Biotechnology, 1:200, ratón) durante 30 minutos y finalmente se les agregó el anticuerpo secundario AlexaFluor-680 (Abcam, 1:3000, cabra-anti-ratón) durante 1 h y se lavaron 2 veces con amortiguador FACS. Se utilizaron células AGS-WT teñidas con el anticuerpo secundario como control de isotipo, así como una muestra de células sin marcajes para determinar la población estudiada. Todos los experimentos se realizaron a 4°C en la oscuridad.

Proteínas nucleares.

Para teñir las proteínas nucleares, las cuatro sublíneas celulares se fijaron y permeabilizaron como se menciona anteriormente. Se incubaron durante 50 min con los anticuerpos primarios: anti-Sox2 (R&D Systems, 1:100, ratón), anti-Twist (Santa Cruz Biotechnology, 1:200, ratón), anti-Nanog (Novus, 1:200, conejo), anti-Snail (Santa Cruz Biotechnology, 1:200, conejo). Posteriormente, se lavaron dos veces con el amortiguador FACS y se agregaron los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 680 (abcam 1:4000, burro-anti-conejo) o Alexa Fluor 680 (abcam, 1:3000, cabra-anti-ratón) durante 1 h y se lavaron 2 veces con buffer FACS. Se utilizaron células AGS-WT teñidas con cada anticuerpo secundario como control de isotipo. Todos los experimentos se realizaron a 4°C en la oscuridad.

Adquisición de datos.

Para todos los experimentos se realizó un análisis de citometría de flujo usando el citómetro de enfoque acústico Attune™-NxT. Después de la tinción, se identificó a la población de interés mediante las propiedades de dispersión frontal y lateral “Forward y Scatter”, seguido del control con los parámetros FSC-A x FSC-H (célula única, “single cell”). Los experimentos de citofluorometría incluyeron el control de isotipo de anticuerpos adecuado (descrito previamente). Para cada muestra, se adquirió un mínimo de 20.000 células de la región R2. Los datos se analizaron en términos de valores de intensidad media de fluorescencia IMF (Unidades relativas de fluorescencia, URF) y en términos de porcentaje de células positivas respecto a los controles de isotipo utilizando el software FlowJO v.10.0.7r2. Los datos presentados (media \pm desviación estándar) son los resultados agrupados de tres experimentos independientes.

4. Inmunofluorescencias.

Las células se sembraron en portaobjetos y cuando alcanzaron el 80% de confluencia se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 min a temperatura ambiente. Después de permeabilizar con Tween al 0.05% en PBS durante 30 min y bloquear con BSA al 2% en PBS durante 30 min, las células se incubaron con los

anticuerpos primarios: anti-Snail (Santa Cruz Biotechnology, 1:50, conejo), anti-Nanog (Novus, 1:1000, conejo), anti-Twist (Santa Cruz Biotechnology, 1:1000, conejo), anti-CD44 (Cell Signaling, 1:1600, ratón) o anti-CD44 (Thermo Fisher, 1:400, conejo) diluido en BSA al 1% en PBS durante la noche. Después de ser lavadas con PBS, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios AlexaFluor-680 (Abcam, 1:500, cabra-anti-ratón) o Cy3 (Abcam, 1:200, burro-anti-conejo) diluidos en BSA al 1% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron con DAPI (Roche). Los portaobjetos se montaron con el medio de montaje de fluorescencia Dako en portaobjetos de vidrio y se analizaron con el microscopio confocal Leica System modelo TCSSP5. Las imágenes se analizaron con el software ImageJ y se calculó el nivel de Fluorescencia celular total corregida (FCTC) seleccionando 30 células de las imágenes obtenidas usando la ecuación:

FCTC = Densidad integrada - (Área de la célula seleccionada x Fluorescencia media de las lecturas de fondo).

5. Ensayo de migración.

La migración celular se midió con un ensayo de cicatrización o cierre de herida. Las células se cultivaron hasta un 80% de confluencia y se hizo un campo de herida usando una punta de pipeta de 200 μ l. Después de 24 horas, se tomaron fotos de las células y se midió el área en μ m² entre las heridas usando el software ImageJ. Los datos presentados (media \pm desviación estándar) son los resultados agrupados de tres experimentos independientes.

6. Ensayo de Invasividad.

Para los ensayos de invasividad se sembraron 5×10^4 células de las 4 sublíneas en los pozos de las cámaras de invasividad con matrigel (BD, Biocoat) en medio DMEM sin SFB y del otro lado del pozo se colocó medio DMEM suplementado con 10% de SFB como quimio-atrayente. Después de 24 h de incubación, los insertos del fondo de los pozos previamente limpiados de las células que no migraron fueron teñidos con una solución de azul de toluidina al 1% y Borax al 1% durante 1 minuto y lavados con agua destilada. Una vez secos, se cortaron y montaron en portaobjetos con

aceite de inmersión y se analizaron al microscopio óptico para contabilizar el número de células invasivas de las 4 sublíneas utilizando el software ImageJ.

7. Análisis estadístico.

Todos los datos de los distintos experimentos se analizaron utilizando GraphPad Prism 8. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía para evaluar si existían diferencias significativas entre los grupos experimentales: AGS-WT, AGS-GFP, AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9. Posteriormente, se realizó la prueba de comparación múltiple de Dunnet para evaluar el cambio entre las sublíneas recombinantes respecto al control de transfección AGS-GFP y la sublínea AGS-WT. Se consideró un cambio significativo a aquellos valores que obtenían una $p < 0.5$. Los datos presentados (media \pm desviación estándar) son los resultados agrupados de tres experimentos independientes.

Resultados.

Establecimiento o de las sublíneas de AGS que sobreexpresan a Cldn-6 o -9.

La transfección de las células AGS con el vector pmaxGFP y los genes de Cldn -6 o -9 hace que esas proteínas se sobreexpresen de manera significativa generando sublíneas recombinantes estables que sobreexpresan a Cldn-6 y Cldn-9 respecto al control AGS-GFP con una $p < 0.01$ y 0.05 , respectivamente (Figura 12).

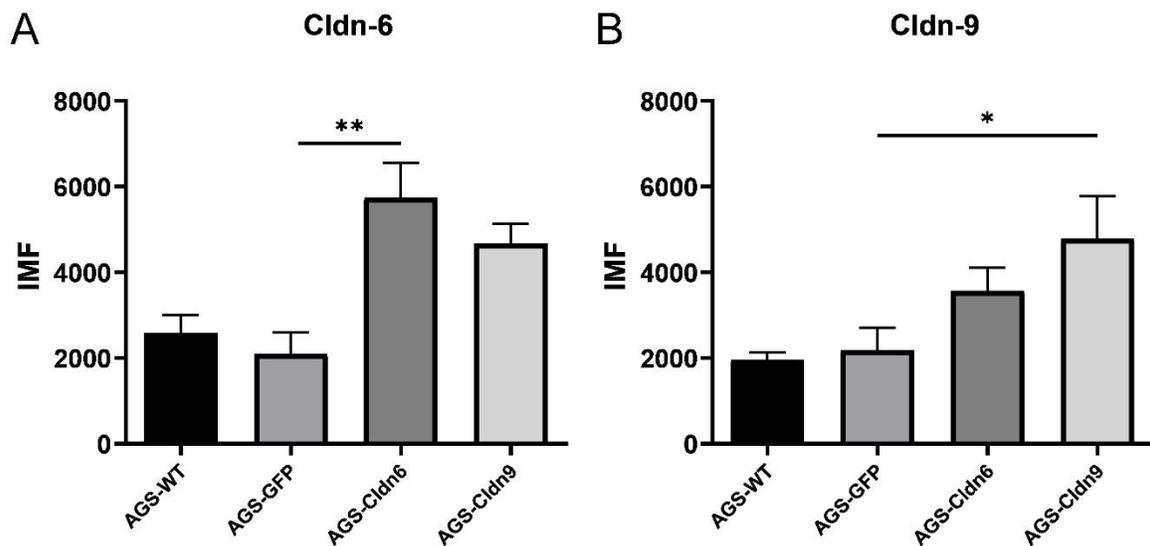


Figura 12. Células AGS que sobreexpresan a Cldn -6 o -9. (A) IMF de Cldn-6 en las cuatro sublíneas con una $p < 0.01$ para AGS-Cldn6 respecto al control AGS-GFP. (B) IMF de Cldn-9 en las cuatro sublíneas con una $p < 0.05$ para AGS-Cldn9 respecto al control. Datos agrupados de tres experimentos independientes obtenidos por citometría.

Detección de marcadores por citometría de flujo.

Para evaluar si las células AGS que sobreexpresan Cldn-6 y Cldn-9 poseen cambios en la expresión de proteínas asociadas a CTC, se midió la expresión de: 1) CD44 y CD24 como marcadores de CTC; 2) NANOG y SOX2 como factores de transcripción y marcadores de autorenovación y 3) TWIST, SNAIL, E-Cadherina y N-Cadherina como factores de transcripción y proteínas de membrana que son marcadores de la TEM. Todas ellas fueron estimadas a través de ensayos de citometría de flujo en células AGS-WT, AGS-GFP, AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 considerando dos aspectos

principales: a nivel poblacional (el porcentaje positivo a la marca respecto al control de isotipo) y de expresión celular, al comparar la IMF de estos marcadores en las sublíneas con respecto al control de transfección AGS-GFP.

Marcadores de CTC.

Los resultados obtenidos muestran la expresión de los marcadores de CTC, CD44 y CD24, en la membrana de las células AGS-WT, AGS-GFP, AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9. Se cuantificaron los datos positivos a las marcas comparando con la señal del control de isotipo de los fluorocromos (Figura 13 A y B) una pequeña población CD44⁺/CD24⁺ que no presentó cambios significativos en las células AGS-Cldn6 y AGS Cldn-9 (Figura 13 C, cuadrante superior derecho de los diagramas de puntos). Además, se observó un enriquecimiento de la población CD44⁺/CD24⁻ (Cuadrante superior izquierdo de los diagramas de puntos). Por otro lado, CD44⁻/CD24⁺ se ve disminuida en las células AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 (cuadrante inferior derecho de los diagramas de puntos). Las regiones positivas para las marcas fueron determinadas con respecto al control de isotipo de cada fluorocromo.

Se observó una tendencia al aumento en CD44⁺/CD24⁻ con un $58.40\% \pm 0.02$ en las células AGS-WT, $69.85\% \pm 0.13$ en AGS-GFP, $84.40\% \pm 0.01$ en AGS-Cldn6 y $81.45\% \pm 0.02$ en AGS-Cldn9. Este aumento no fue estadísticamente significativo al realizar el experimento por triplicado y comparando los datos contra el control de transfección AGS-GFP (Figura 14 A). La población CD24⁺/CD44⁻ está bien definida en las células AGS-WT $9.68\% \pm 0.02$, sin embargo, esta disminuyó claramente en las células AGS-GFP con un $5.27\% \pm 0.01$, AGS-Cldn6 con $2.16\% \pm 0.01$ y AGS-Cldn9 con $1.08\% \pm 0.01$ (prueba estadística de Dunnet, $p < 0.05$ para AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9) (Figura 14 B, datos significativos en rojo).

Por otro lado, las células AGS-Cldn6 mostraron cambios significativos para CD44 con una IMF de $2885_{URF} \pm 315$, $p < 0.05$ y con un incremento de 90% en la expresión de este marcador respecto al control AGS-GFP cuya IMF fue de $1511_{URF} \pm 192$. En AGS-Cldn9 para CD44 se obtiene una IMF de $3479_{URF} \pm 509$, $p < 0.01$ y un incremento en la expresión de 130% respecto al control (Figura 14 C).

En tanto a la IMF para CD24 no se observaron cambios significativos en la expresión de esta molécula en ninguna de las sublíneas aunque existe una ligera tendencia al aumento en las sublíneas recombinantes (Figura 14 D).

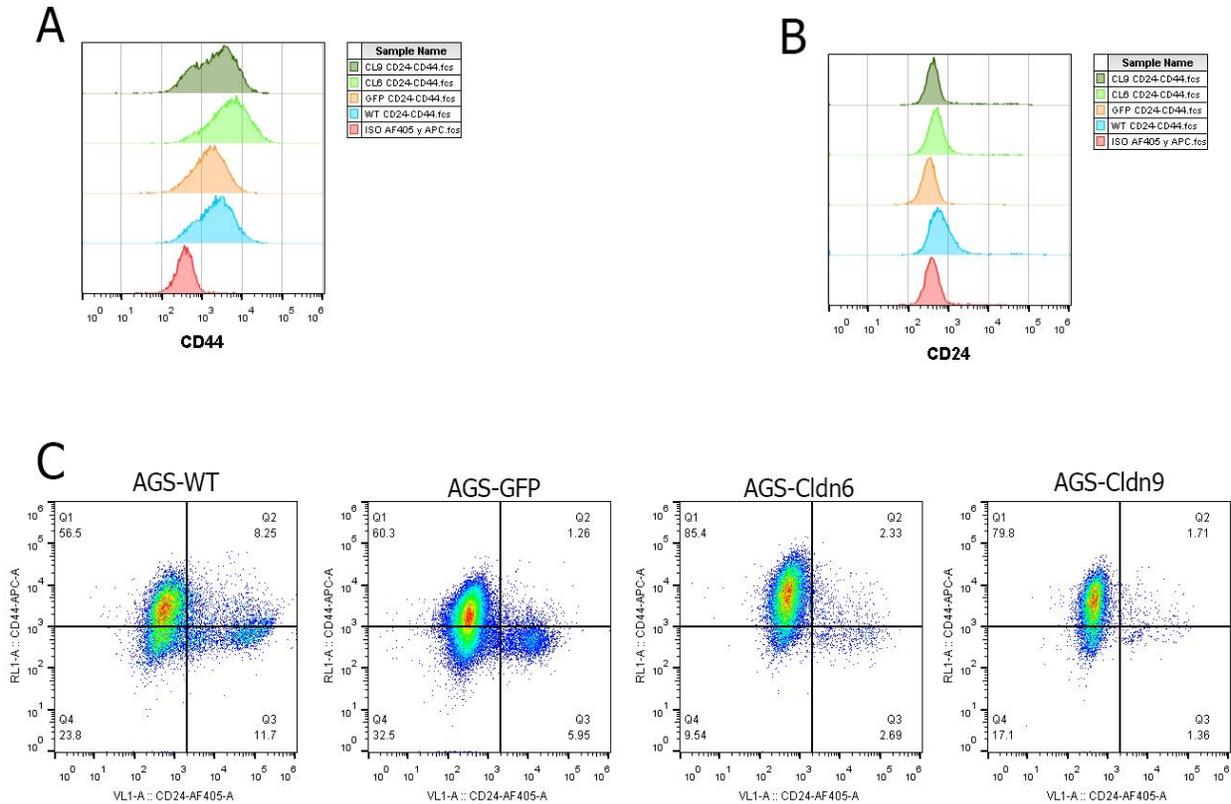


Figura 13. Expresión de CD44 y CD24 en las células AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-9 y diagramas de puntos asociados a las subpoblaciones CD44⁺/CD24⁺, CD44⁺/CD24⁻, CD44⁻/CD24⁺ y CD44⁻/CD24⁻ **A)** Histogramas representativos de la determinación de CD44 marcada con el fluorocromo APC y **B)** CD24 marcada con el fluorocromo Alexa-Fluor 405. **C)** Diagramas de puntos representativos para las células AGS-WT, AGS-GFP, AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 mostrando los marcadores de CTC, CD44 (vertical) y CD24 (horizontal). AGS-WT (azul), AGS-GFP (naranja), AGS-Cldn6 (verde), AGS-Cldn9 (verde oscuro) respecto al control de isotipo (rojo).

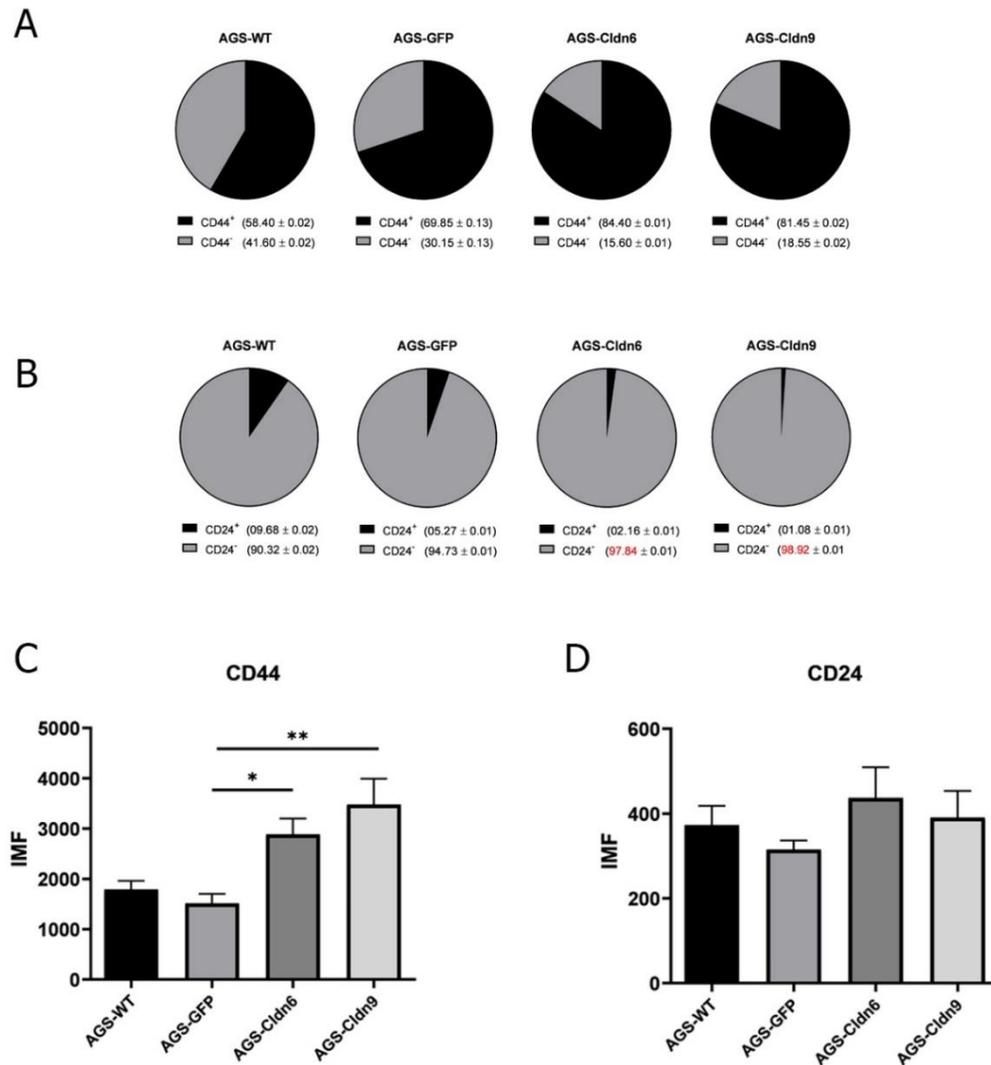


Figura 14. La sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 en células AGS incrementa la expresión de CD44 y disminuye la de CD24. **A)** Aumento en las poblaciones CD44⁺/CD24⁻ en las sublíneas recombinantes. **B)** Disminución de las poblaciones CD24⁺/CD44⁻. Se realizó la prueba estadística de Dunnet con una p<0.05 en ambos casos (datos en rojo). **C)** Incremento significativo de la expresión (IMF) de CD44 en células AGS-Cldn6 p<0.05 Y AGS-Cldn9 p<0.01. Se realizó la prueba estadística de Dunnet. **D)** La expresión (IMF) de CD24 no se modifica. Los datos presentados (media ± desviación estándar) son los resultados agrupados de tres experimentos independientes.

Marcadores de autorenovación

NANOG.

Para evaluar si la sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 modifica la expresión de NANOG, se midió la señal del marcador de autorenovación NANOG en el núcleo de las células AGS-WT, AGS-GFP, AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 en los ensayos de citometría (Figura 15. A); para esto se utilizó un anticuerpo contra NANOG y se marcó con un anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo Alexa-Fluor 680. Se observó que la sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 enriquece las poblaciones positivas a NANOG pasando de un $93.60\% \pm 0.01$ en AGS-WT a un $87.50\% \pm 0.02$ en AGS-GFP, $98.02\% \pm 0.01$ en AGS-Cldn6 y $98.35\% \pm 0.01$ en AGS-Cldn9 siendo el enriquecimiento poblacional estadísticamente significativo en las dos últimas con una $p < 0.01$ en ambos casos al comparar contra el control de transfección AGS-GFP (Figura 15 B datos significativos en rojo).

En el caso de la IMF para NANOG en AGS-Cldn6 se obtuvo un valor de $332631URF \pm 13541$, $p < 0.01$ y un incremento de expresión de **40%** respecto al control AGS-GFP con una IMF de $236341URF \pm 2720$. En AGS-Cldn9 la IMF fue de $325410URF \pm 23753$, $p < 0.01$ y un incremento de expresión de **37%** respecto al control. (Figura 15 C).

En general los cambios poblacionales y la expresión de NANOG en las células AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 son equivalentes.

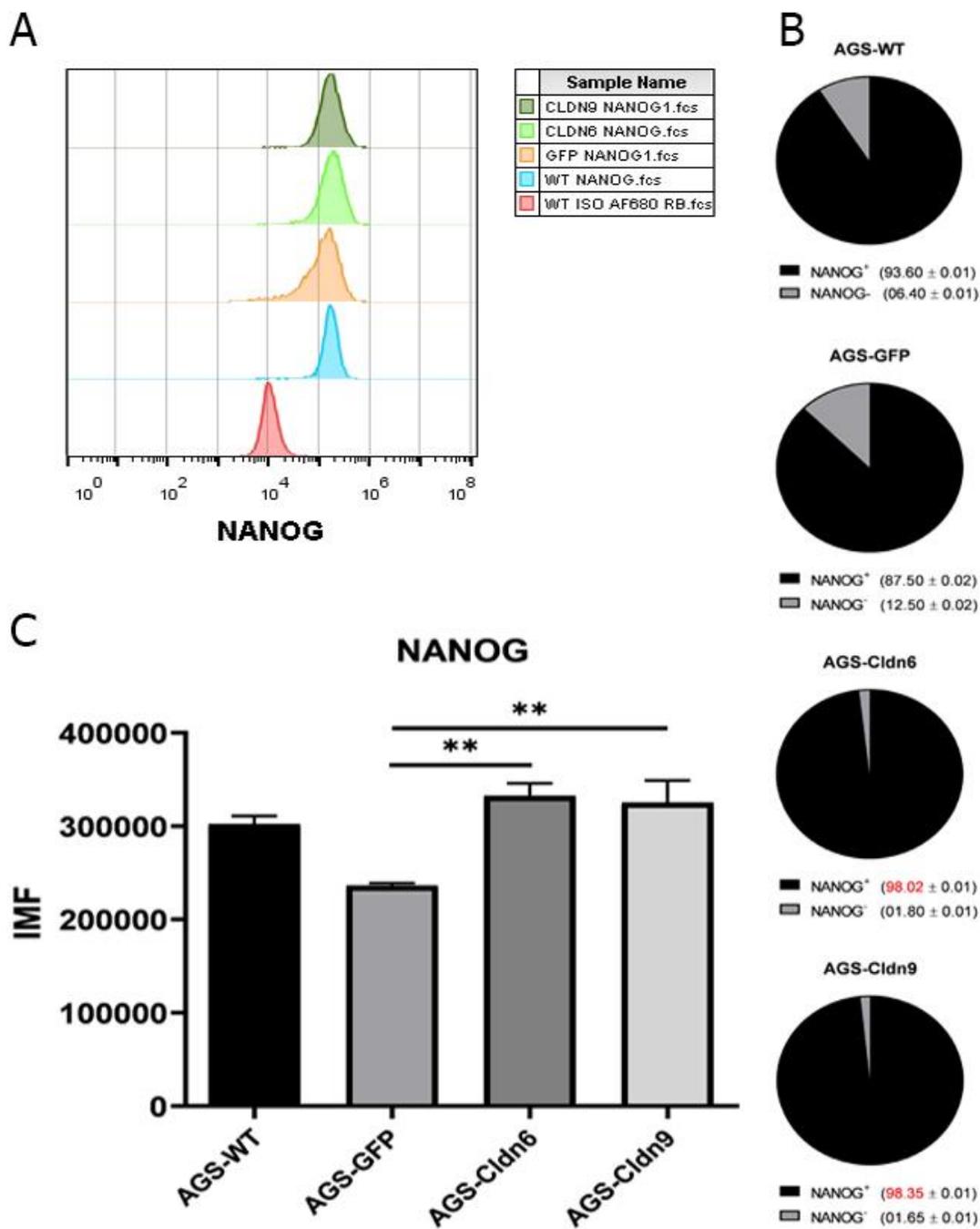


Figura 15. La sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 en células AGS enriquece las poblaciones positivas a NANOG e incrementa su expresión. **A)** Histogramas representativos de la expresión de la proteína NANOG marcada con el fluorocromo Alexa-Fluor 680 en células AGS-WT (azul), AGS-GFP (naranja), AGS-Cldn6 (verde) y AGS-Cldn9 (verde oscuro) respecto al control de isotipo (rojo). **B)** Aumento de la población NANOG⁺ en las células AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 con una $p < 0.01$ en ambos casos (datos en rojo). **C)** Aumento en la IMF de NANOG en células AGS-Cldn6: IMF $332631 \text{URF} \pm 13541$, $p < 0.01$ y un incremento de expresión de **40%** respecto al control AGS-GFP y AGS-Cldn9: IMF $325410 \text{URF} \pm 23753$, $p < 0.01$ y un incremento de expresión de **37%** respecto al control. Evaluando las diferencias con la prueba estadística de Dunnet. Los datos presentados (media ± desviación estándar) son resultados agrupados de tres experimentos independientes.

SOX2.

Los ensayos de citometría mostraron que la señal del marcador de troncalidad SOX2 fue positiva en el núcleo de las células AGS-WT, AGS-GFP, AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 (Figura 16 A); para esto se utilizó un anticuerpo contra SOX2 y se marcó con un anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo Alexa-Fluor 680.

Los resultados mostraron que la sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 enriquece las poblaciones positivas a SOX2 pasando de un $70.58\% \pm 0.10$ en AGS-WT a un $74.78\% \pm 0.18$ en AGS-GFP, $95.53\% \pm 0.03$ en AGS-Cldn6 y 97.88 ± 0.02 en AGS-Cldn9. Cabe resaltar que el enriquecimiento poblacional es estadísticamente significativo en AGS-Cldn6 con una $p < 0.05$ y en AGS-Cldn9 con una $p < 0.01$ al comparar contra el control de transfección AGS-GFP (Figura 16 B datos significativos en rojo). Además, la IMF para SOX2 incrementó significativamente para AGS-Cldn6 a $46731URF \pm 10205$, $p < 0.001$ y se observó un incremento de expresión de 80% respecto al control AGS-GFP con una IMF de $24788URF \pm 5727$. Para AGS-Cldn9 la IMF fue de $37740URF \pm 6761$ con una $p < 0.05$ y un incremento de expresión de 50% respecto al control (Figura 16 C).

Estos resultados en conjunto muestran diferencias entre los cambios generados por la sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 en las células AGS siendo mayor la expresión de SOX2 en las células AGS-Cldn6 que en las AGS-Cldn9; sin embargo, ambos datos son estadísticamente significativos. Por otro lado, poblacionalmente los porcentajes de células SOX2⁺ son equivalentes en las sublíneas recombinantes.

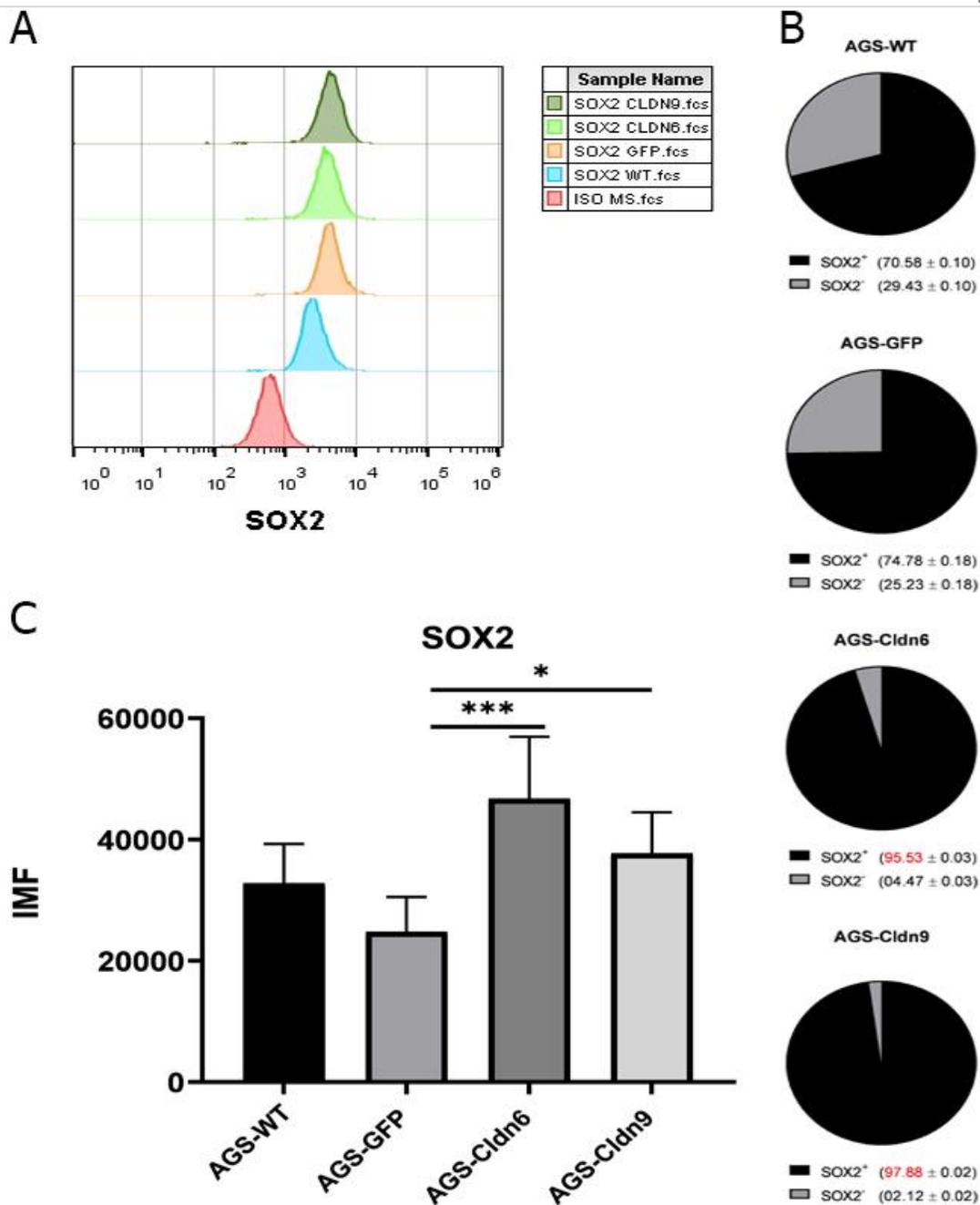


Figura 16. La sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 en células AGS enriquece las poblaciones positivas a SOX2 e incrementa su expresión. **A)** Histogramas representativos de la expresión de SOX2 marcada con el fluorocromo Alexa-Fluor 680 en células AGS-WT (azul), AGS-GFP (naranja), AGS-Cldn6 (verde), AGS-Cldn-9 (verde oscuro) respecto al control de isotipo (rojo). **B)** Poblaciones SOX2⁺ y SOX2⁻ en las sublíneas celulares. Se observa un aumento significativo de la población SOX2⁺ en las células AGS-Cldn6 $p < 0.05$ y AGS-Cldn9 $p < 0.01$ (datos en rojo). **C)** Incremento significativo en la expresión (IMF) de SOX2 en células AGS-Cldn6 $46731 \text{URF} \pm 10205$, $p < 0.001$ y una expresión **80%** mayor respecto al control AGS-GFP y en AGS-Cldn9 una IMF de $37740 \text{URF} \pm 6761$, $p < 0.05$ y un incremento de expresión de **50%** respecto al control. Evaluando las diferencias con la prueba estadística de Dunnet. Los datos presentados (media \pm desviación estándar) son resultados agrupados de tres experimentos independientes.

Marcadores de TEM.

SNAIL

Uno de los marcadores de TEM que se evaluó por citometría de flujo fue SNAIL. Los resultados mostraron una expresión positiva de SNAIL en el núcleo de las células AGS-WT, AGS-GFP, AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 utilizando la misma estrategia de marcaje que se menciona anteriormente (Figura 17 A). Se observó que la sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 enriquece las poblaciones positivas a SNAIL, pasando de un $64.75\% \pm 0.14$ en AGS-WT a un $59.20\% \pm 0.01$ en AGS-GFP, $93.40\% \pm 0.04$ en AGS-Cldn6 y 96.00 ± 0.01 en AGS-Cldn9 siendo el enriquecimiento poblacional estadísticamente significativo en las dos últimas con una $p < 0.05$ (Figura 17 B datos significativos en rojo).

Además, AGS-Cldn6 tuvo una IMF para SNAIL de $25728URF \pm 6000$, $p < 0.05$ y una expresión **26%** mayor respecto al control AGS-GFP con una IMF de $20397URF \pm 5783$. AGS-Cldn9 presentó una IMF de $26235URF \pm 5800$, $p < 0.05$ y una expresión **28%** mayor al control (Figura 17 C)

Estos resultados no muestran diferencias entre los cambios generados por la sobreexpresión de Cldn-6 o Cldn-9 en las células AGS dado que el comportamiento observado en la expresión de SNAIL parece ser equivalente para ambas sublíneas recombinantes. Aun cuando se observó un ligero enriquecimiento de la población SNAIL+ (Figura 17 B), en las células AGS-Cldn9 respecto a las células AGS-Cldn6, esta diferencia no es significativa.

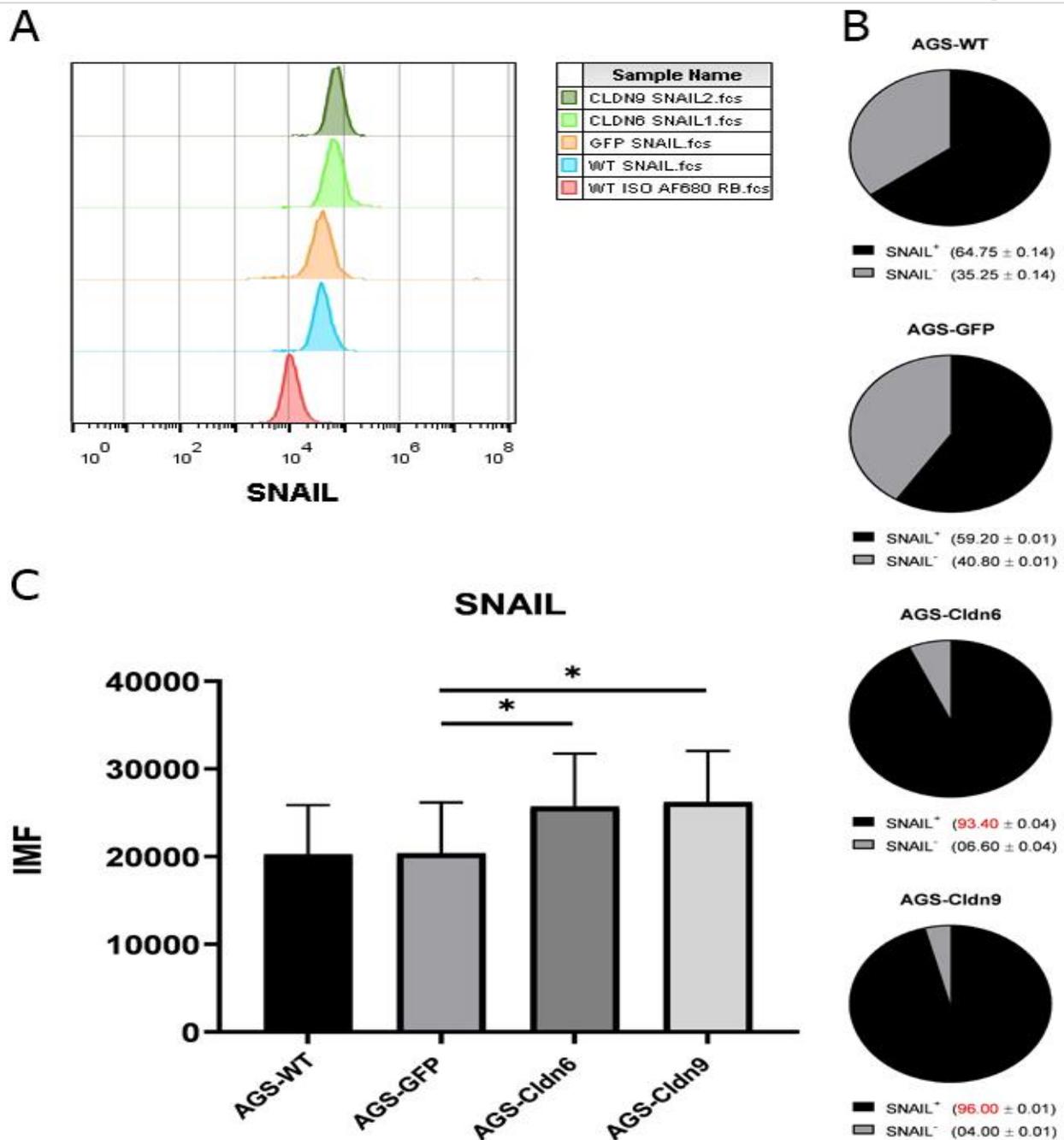


Figura 17. La sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 en células AGS enriquece las poblaciones positivas a SNAIL e incrementa su expresión. **A)** Histogramas representativos de la determinación de la expresión de SNAIL marcada con el fluorocromo Alexa-Fluor 680 en células AGS. AGS-WT (azul), AGS-GFP (naranja), AGS-Cldn6 (verde), AGS-Cldn-9 (verde oscuro) respecto al control de isotipo (rojo). **B)** Poblaciones SNAIL⁺ y SNAIL⁻ en las sublíneas celulares. Se observa un aumento significativo de la población SNAIL⁺ en las células AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 con una $p < 0.05$ en ambos casos (datos en rojo). **C)** Incremento significativo de la expresión (IMF) de SNAIL en células AGS-Cldn6 con $25728 \text{ URF} \pm 6000$ y con una expresión **26%** mayor respecto al control AGS-GFP y AGS-Cldn9 con una IMF de $26235 \text{ URF} \pm 5800$ y expresando **28%** más SNAIL respecto al control. Presentando una $p < 0.05$ en ambas sublíneas recombinantes. Evaluando las diferencias con la prueba estadística de Dunnet. Los datos presentados (media \pm desviación estándar) son resultados agrupados de tres experimentos independientes.

N-Cadherina

Los ensayos de citometría mostraron que la señal del marcador de TEM N-Cadherina fue positiva en la membrana de las células AGS-WT, AGS-GFP, AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 utilizando el marcaje con fluorocromos descrito anteriormente (Figura 18 A).

La sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 enriqueció las poblaciones positivas a N-Cadherina pasando de un $29.90\% \pm 0.01$ en AGS-WT a un $67.60\% \pm 0.02$ en AGS-GFP, $83.35\% \pm 0.03$ en AGS-Cldn6 y 94.75 ± 0.01 en AGS-Cldn9, siendo el enriquecimiento poblacional estadísticamente significativo en AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 con una $p < 0.001$ en ambos casos al comparar contra el control de transfección AGS-GFP y mayor en el caso de AGS-Cldn9 (Figura 18 B, datos significativos en rojo).

Además, la sublínea AGS-Cldn9 mostró un aumento significativo en la IMF $2673URF \pm 598$, $p < 0.001$ y una expresión **97%** mayor que el control AGS-GFP con una IMF para N-Cadherina de $1353URF \pm 309$. En cambio, aunque se registró un ligero aumento en la IMF de N-Cadherina en las células AGS-Cldn6, este no fue estadísticamente significativo (Figura 18 C).

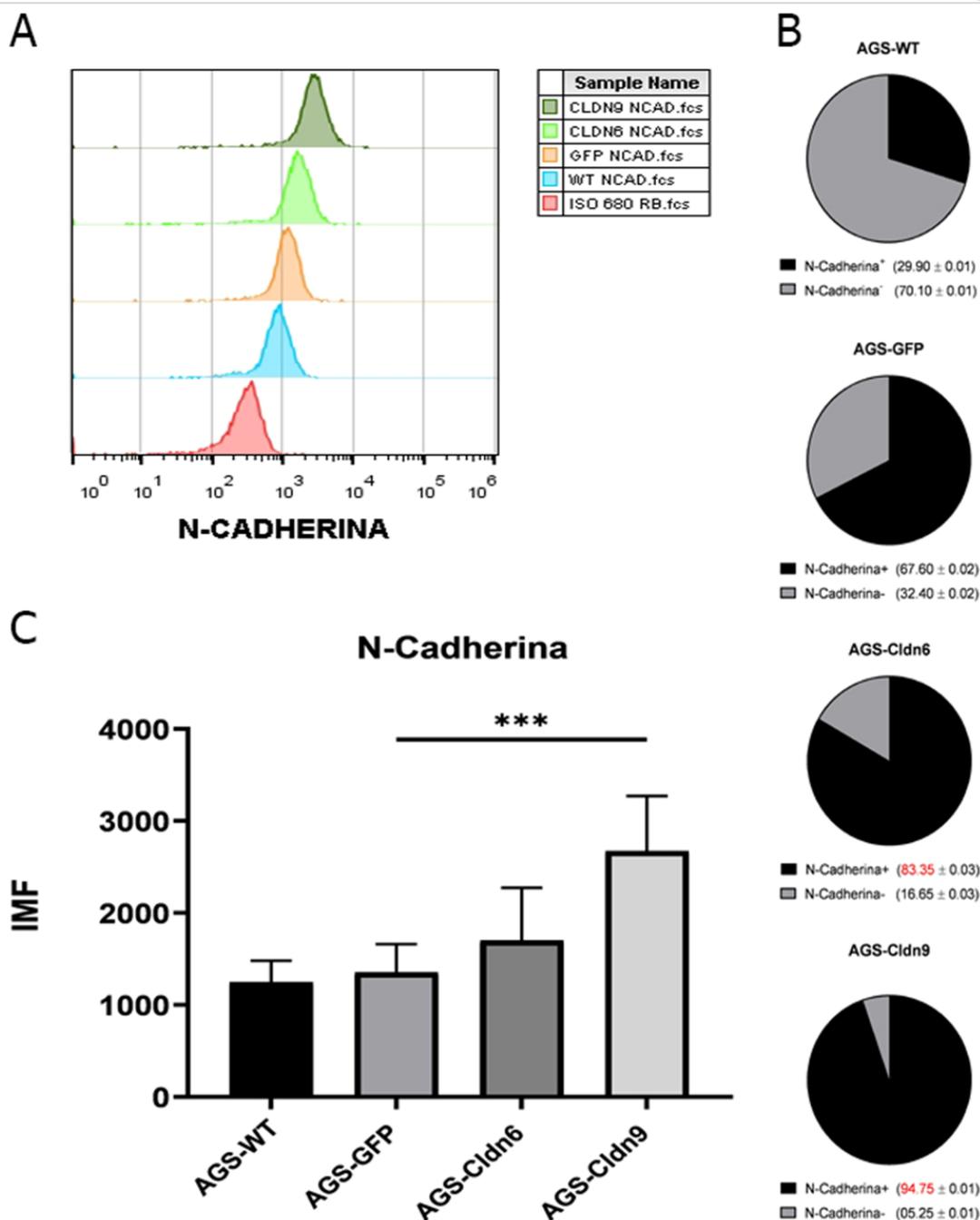


Figura 18. La sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 en células AGS enriquece las poblaciones positivas a N-Cadherina y Cldn-9 incrementa su expresión. **A)** Histogramas representativos de la expresión de N-Cadherina marcada con el fluorocromo Alexa-Fluor 680 en células AGS. AGS-WT (azul), AGS-GFP (naranja), AGS-Cldn6 (verde) y AGS-Cldn9 (verde oscuro) respecto al control de isotipo (rojo). **B)** Poblaciones N-Cadherina⁺ y N-Cadherina⁻ en donde se observa un aumento significativo de la población N-Cadherina⁺ en las células AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 con una $p < 0.001$ en ambos casos (datos en rojo). **C)** La sobreexpresión de Cldn-9 incrementa significativamente la expresión (IMF) de N-Cadherina en células AGS-Cldn9 $2673URF \pm 598$, $p < 0.001$ y una expresión **97%** mayor que el control AGS-GFP. En AGS-Cldn6 no hay cambios significativos en la IMF. Estos análisis se realizaron haciendo comparaciones respecto a la IMF de AGS-GFP con la prueba estadística de Dunnet. Los datos presentados (media \pm desviación estándar) son resultados agrupados de tres experimentos independientes.

TWIST y E-Cadherina.

La señal de los marcadores de TEM, TWIST y E-Cadherina no se distinguió del control de isotipo del anticuerpo con el que fueron detectadas estas proteínas en el núcleo y en la membrana de las células AGS-WT, AGS-GFP, AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 respectivamente (Figura 19 A y B). Aunque los experimentos se repitieron en tres ocasiones y se probaron diferentes concentraciones de los anticuerpos primarios y del secundario acoplado al fluorocromo AF-680, no fue posible encontrar señales positivas para todas las sublíneas celulares.

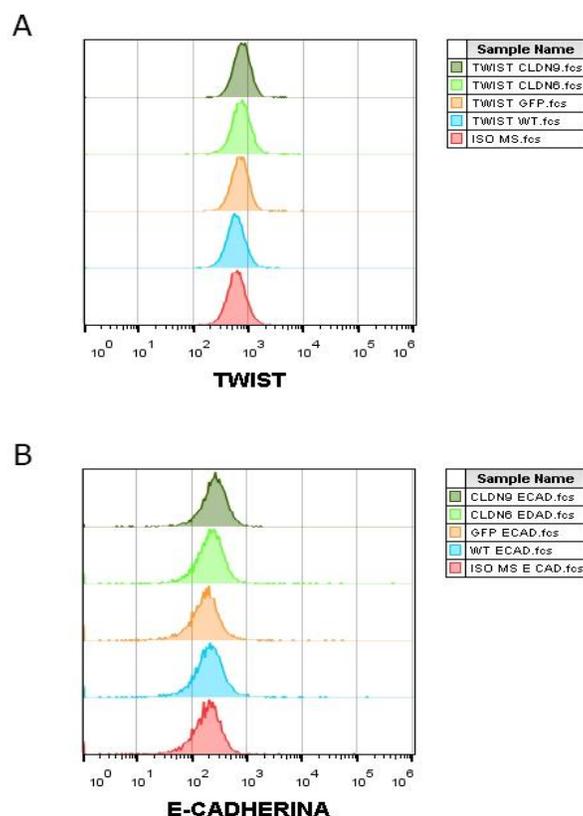


Figura 19. Expresión basal de TWIST y E-Cadherina en las cuatro sublíneas celulares. A) Histogramas representativos que no muestran diferencias entre TWIST y B) E-Cadherina con respecto al control de isotipo de Alexa-Fluor 680 en células AGS-WT (azul), AGS-GFP (naranja), AGS-Cldn6 (verde), AGS-Cldn9 (verde oscuro) y el control de isotipo (rojo).

Las células AGS expresan simultáneamente marcadores de CTC, troncalidad y TEM.

De acuerdo a los marcadores evaluados se puede afirmar que las células AGS expresan marcadores de CTC, troncalidad y TEM de manera simultánea. Esto se apoya en la observación de que los porcentajes poblacionales que se enriquecen en las sublíneas recombinantes son siempre altos. Por ejemplo, en las células AGS-Cldn6, CD44 tiene una población positiva del 84.40%, NANOG⁺ del 98.2%, SOX2⁺ del 95.53%, SNAIL⁺ del 93.40% y N-Cadherina⁺ del 83.35% por lo tanto estos deben estar presentes al mismo tiempo en estas células (Tabla 2.).

MARCADOR	AGS-Cldn6	AGS-Cldn9
CD44+	84.40%±0.01	81.45%±0.02
NANOG+	98.02%±0.01	98.35%±0.01
SOX2+	95.53%±0.03	97.88%±0.02
SNAIL+	93.40%±0.04	96.00%±0.01
N-Cadherina+	83.35%±0.03	94.75%±0.01

Tabla 2. Porcentajes de las poblaciones positivas a CD44, NANOG, SOX2, SNAIL y N-Cadherina en las células AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9. Se observan porcentajes siempre superiores al 80% sugiriendo que la mayoría de las células recombinantes comparten marcadores de CTC, autorenovación y TEM.

Microscopía Confocal.

Para robustecer la evidencia de que las células AGS presentan marcadores de CTC, autorenovación y TEM simultáneamente, se realizaron ensayos de microscopía confocal de manera pareada con el marcador CD44, el cual se demostró anteriormente por citometría de flujo que se sobreexpresa en las células AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9, y un marcador de autorenovación o TEM.

Expresión de CD44 y NANOG.

Se marcaron las células AGS-WT, AGS-GFP, AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 con DAPI para ubicar su núcleo (Figura 20, columna DAPI en azul. Ejemplos señalados con flechas blancas). Las proteínas Cldn-6 y Cldn-9 acopladas a GFP se localizaron principalmente en la membrana

celular para las sublíneas recombinantes y en el núcleo para el caso del control de tranfección AGS-GFP (Figura 20, columna GFP en verde, ver flechas blancas). La expresión de CD44 que se marcó con el fluorocromo Alexa-Fluor 680 y NANOG marcado con el fluorocromo CY3 se observó en el citoplasma y en mayor medida en el núcleo (Figura 20, columna CD44 en rojo y NANOG en amarillo, ver flechas blancas).

De acuerdo con lo esperado se presenta una expresión basal de CD44 y NANOG en las células AGS-WT y AGS-GFP que se ve aumentada en AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 lo que se mira en las columnas CD44 y NANOG, en las filas AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 de la Figura 20. Se muestra cuantitativamente la mayor expresión de CD44 y NANOG en las sublíneas recombinantes en la Figura 11 A y B, respectivamente, donde se estimó la fluorescencia de las células a partir de las imágenes obtenidas por microscopía confocal (ver materiales y métodos).

Además, en la columna MERGE de la Figura 20, se observa evidencia de que CD44 y NANOG se expresan de manera simultánea en las células AGS. Siendo estos resultados, consecuentes con los datos obtenidos por citometría y fortaleciendo la idea de que las CTC también presentan proteínas que inducen la autorrenovación como es el caso de NANOG.

Cabe subrayar que los resultados de citometría para el marcador de CTC (CD44) están enfocados a la proteína que se localiza en la membrana y en el caso de las imágenes obtenidas por microscopía confocal como se menciona anteriormente, la señal de CD44 se localizó principalmente en el núcleo de las células AGS (ver Figuras 20, 21 y 22 en columna CD44 para todas las sublíneas). Esto podría deberse al tiempo de permeabilización con Tritón a la cual estuvieron sujetas las células (el cual fue de 30min, ver materiales y métodos) para marcar factores de transcripción como es el caso de NANOG, SNAIL y TWIST. Sin embargo, en ambos experimentos la expresión de CD44 aumenta en las células AGS-Cldn-6 y -9 aun que esta sea detectada en diferentes regiones celulares (Ver Figura 23 A).

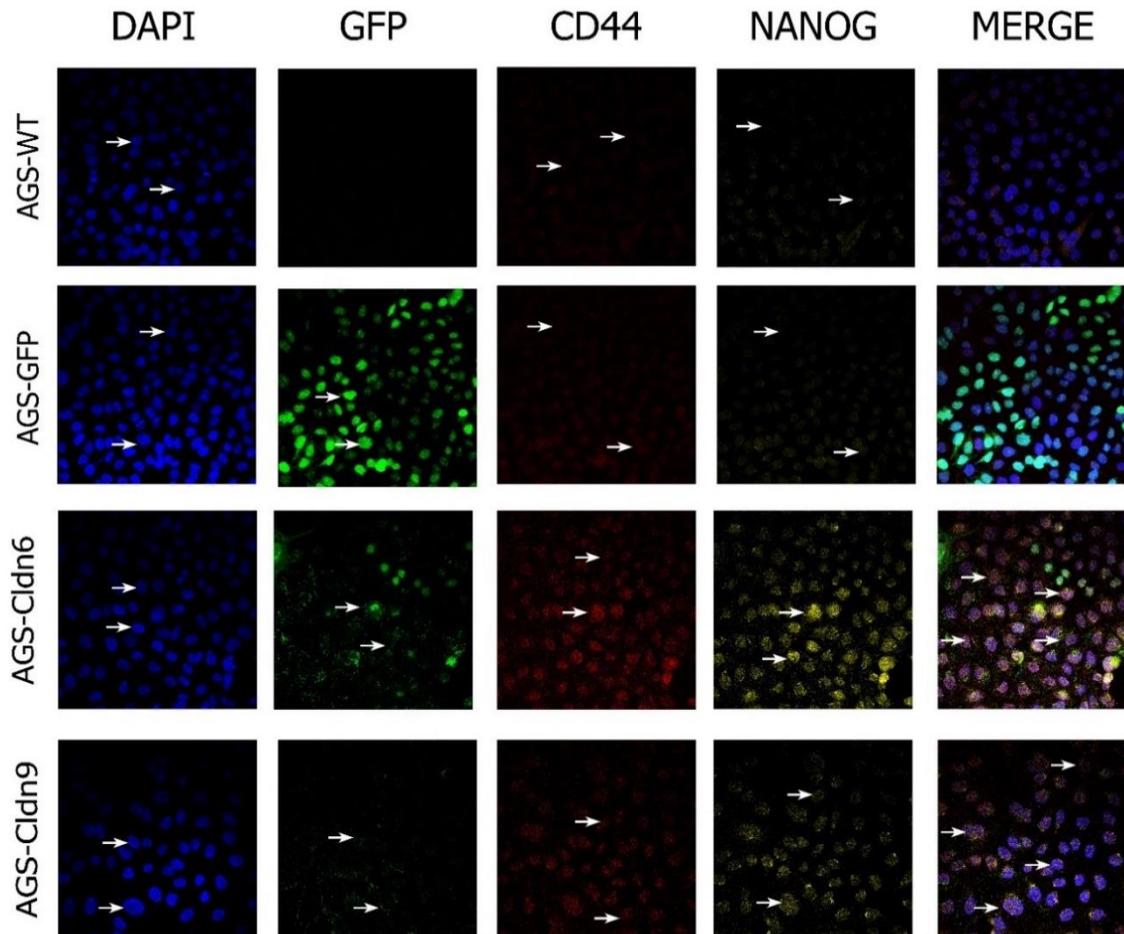


Figura 20. Las células AGS expresan CD44 y NANOG de manera simultánea y la sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 aumentan la expresión de estos marcadores. Inmunofluorescencias de las células AGS-WT, AGS-GFP, AGS-Cldn9 y AGS-Cldn6. Columna **DAPI**: Marcaje nuclear de las cuatro sublíneas en color azul. **GFP**: Células AGS-GFP, sublíneas AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9. **CD44**: Expresión de CD44 marcada con el fluorocromo Alexa-Fluor 680 en rojo. **NANOG**: Expresión de NANOG marcada con el fluorocromo CY3 en amarillo. **MERGE**: Imágenes que muestran la expresión simultánea de CD44 y NANOG en las células AGS WT, GFP, Cldn6 y Cldn9. (Ejemplos señalados por flechas blancas).

Expresión de CD44 y SNAIL.

CD44 y SNAIL fueron marcadas con los mismos fluorocromos mencionados anteriormente en las cuatro sublíneas y al igual que para la expresión de NANOG, las células AGS-WT y AGS-GFP expresan de manera basal y simultánea los marcadores CD44 y SNAIL. Estos marcadores aumentan su expresión en las células AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 (Ver Figura 21 A y C para análisis cuantitativo) y se observan principalmente en el núcleo. Lo que se muestra de manera individual en las columnas CD44 y SNAIL, en las filas AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 de la Figura 21 y en conjunto en la columna MERGE de la misma figura (ver ejemplos señalados con flechas blancas). Esta evidencia es congruente con los resultados de citometría y apoya lo antes mencionado sobre que las CTC también expresan marcadores de TEM como SNAIL.

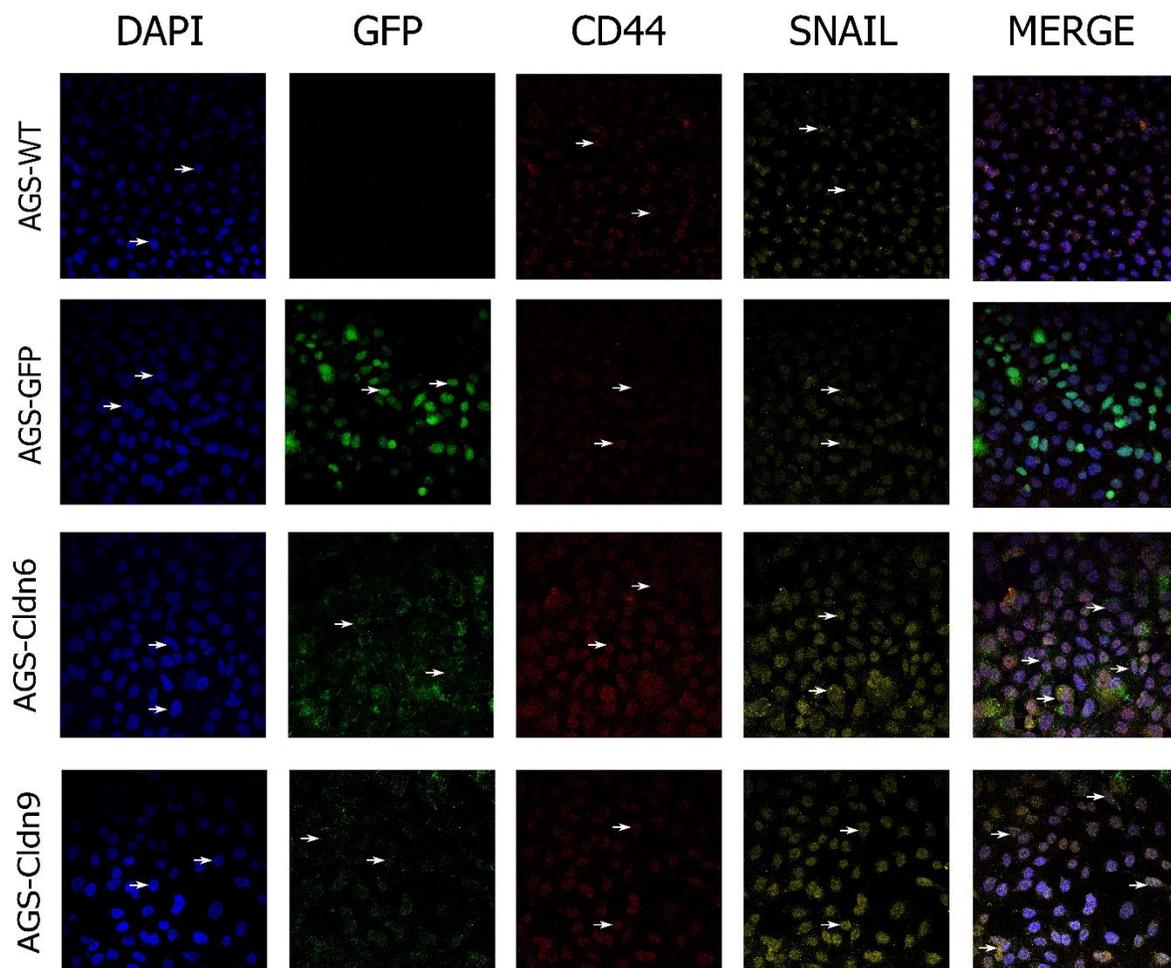


Figura 21. Las células AGS expresan CD44 y SNAIL de manera simultánea y la sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 aumentan la expresión de estos marcadores. Inmunofluorescencias de las células AGS-WT, AGS-GFP, AGS-Cldn9 y AGS-Cldn6. Columna **DAPI**: Marcaje nuclear de las cuatro sublíneas en color azul. **GFP**: Células AGS-GFP, sublíneas AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9. **CD44**: Expresión de CD44 marcada

con el fluorocromo Alexa-Fluor 680 en rojo. **SNAIL**: Expresión de SNAIL marcada con el fluorocromo CY3 en amarillo. **MERGE**: Imágenes que muestran la expresión simultánea de CD44 y SNAIL en las células AGS WT, GFP, Cldn6 y Cldn9. (Ejemplos señalados por flechas blancas).

Expresión de CD44 y TWIST.

Para evaluar el marcador de CTC (CD44) y el de TEM (TWIST), se utilizó la misma estrategia de marcaje con los fluorocromos Alexa-Fluor 680 y CY3 respectivamente en las cuatro sublíneas. Al igual que en los resultados anteriores, se observó el aumento esperado en la expresión de CD44 en las sublíneas recombinantes y su ubicación principalmente nuclear. Además, por primera vez se obtiene evidencia de la expresión de TWIST en el núcleo de las células AGS (Ver Figura 22, columna CD44 y TWIST) que como se menciona anteriormente no fue posible detectar en los ensayos de citometría (ver Figura 19). Se observó la expresión basal de TWIST en las células AGS-WT y AGS-GFP aunado al aumento de su expresión en las sublíneas recombinantes AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9, este cambio es significativo con una $p < 0.001$ en ambos casos y mayor en AGS-Cldn6 (ver Figura 23 D). Por otro lado, la evidencia robustece la hipótesis de que las células AGS que sobreexpresan Cldn-6 y Cldn-9 además de sobreexpresar CD44, también expresan con mayor intensidad el marcador de TEM TWIST de manera simultánea (Ver Figura 22, columna MERGE).

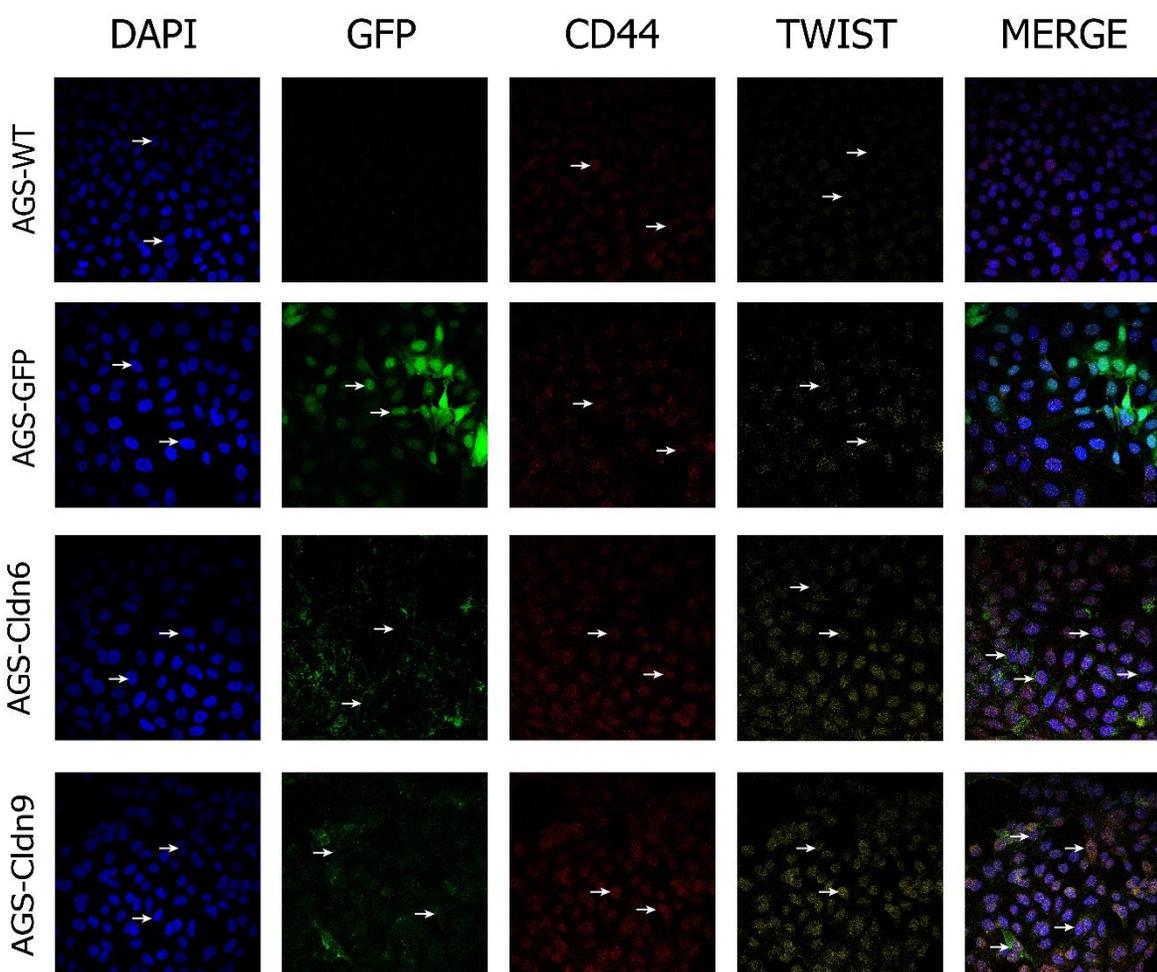


Figura 22. Las células AGS expresan CD44 y TWIST de manera simultánea y la sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 aumentan la expresión de estos marcadores. Inmunofluorescencias de las células AGS-WT, AGS-GFP, AGS-Cldn9 y AGS Cldn6. Columna **DAPI**: Marcaje nuclear de las cuatro sublíneas en color azul. **GFP**: Células AGS-GFP, sublíneas AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9. **CD44**: Expresión de CD44 marcada con el fluorocromo Alexa-Fluor 680 en rojo. **TWIST**: Expresión de TWIST marcada con el fluorocromo CY3 en amarillo. **MERGE**: Imágenes que muestran la expresión simultánea de CD44 y TWIST en las células AGS WT, GFP, Cldn-6 y Cldn-9. (Ejemplos señalados por flechas blancas).

Fluorescencia obtenida por Microscopía Confocal.

Como se menciona anteriormente, se estimó la fluorescencia de las células a partir de las imágenes obtenidas por microscopía confocal (ver materiales y métodos). Cabe destacar que al comparar los resultados obtenidos por microscopía confocal para el marcador de CTC, CD44, el marcador de autorenovación, NANOG y los marcadores de TEM, SNAIL y TWIST con los datos de citometría se observó la tendencia general del aumento en la expresión de éstos en

las células recombinantes AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 (Ver Figura 23). Teniendo así evidencia del mismo comportamiento para estas marcadores por dos técnicas experimentales diferentes.

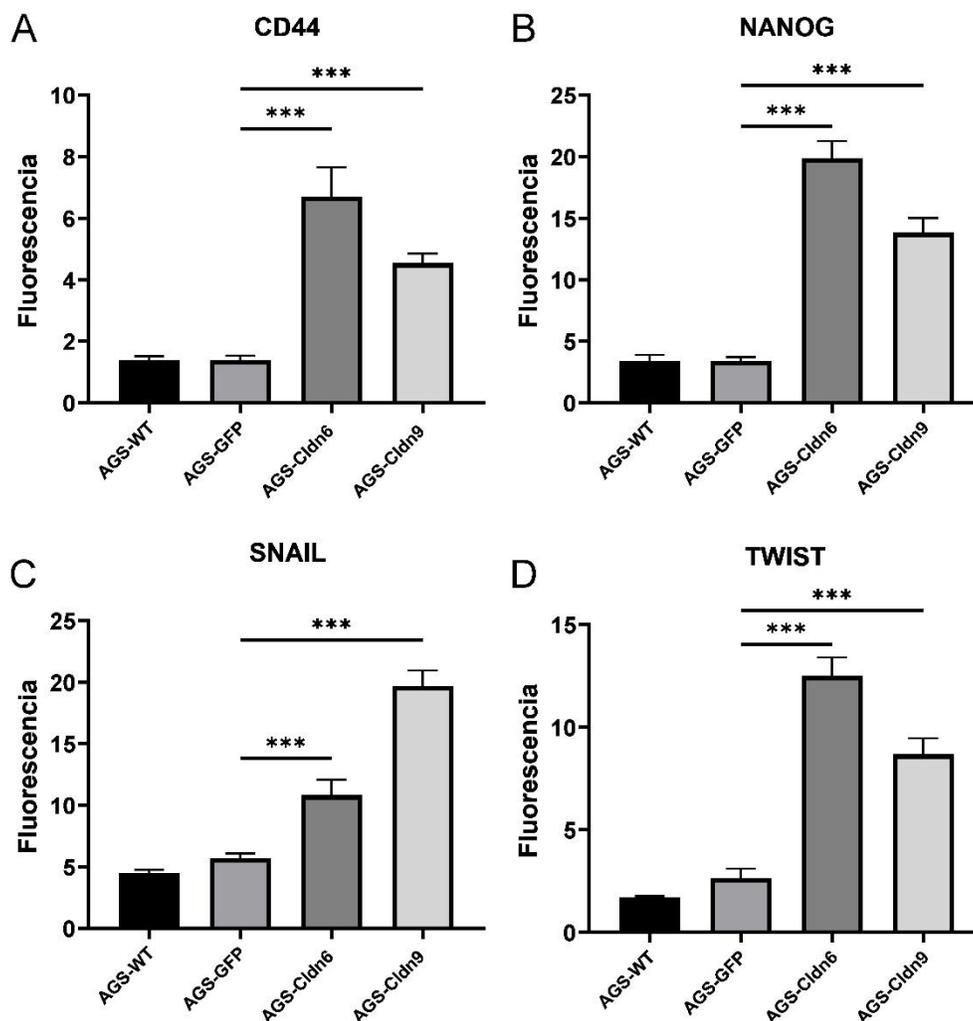


Figura 23. Fluorescencia de los marcadores de CTC, autorenovación y TEM obtenida por microscopía. La sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 aumenta la expresión de CD44 (A), NANOG (B), SNAIL (C) y TWIST (D), robusteciendo los resultados de citometría y arrojando evidencia de la expresión de TWIST. Datos obtenidos del análisis de las imágenes de microscopía confocal.

Ensayos funcionales

En conjunto, los ensayos de citometría y microscopía confocal mostraron que la sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 en células AGS aumenta la expresión y el porcentaje poblacional de CD44 como marcador de CTC, de los marcadores de autorenovación NANOG y SOX2 y de los marcadores de TEM, SNAIL y N-Cadherina. Además, se obtuvo evidencia de que estos

marcadores se expresan de manera simultánea en las células AGS y que esta expresión también incrementó en las células AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9.

Para evaluar si las variaciones en la expresión de estos marcadores se traducen en cambios en la capacidad de migración e invasividad, se realizaron ensayos funcionales de las células AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9.

Migración celular.

La capacidad de migración celular se evaluó a través de ensayos de herida en las células AGS-WT, AGS-GFP, AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 las cuales se monitorearon al microscopio a las 24 h de haber realizado la herida (Figura 24 A). Los resultados mostraron que el área despejada después de 24 h de haber realizado la herida fue significativamente menor en las células AGS-Cldn6 en comparación con las células control AGS-GFP mostrando una mayor capacidad migratoria cuantificada como una menor área libre con una $p < 0.05$. Aunque existe una tendencia a una mayor migración en el caso de las células AGS-Cldn9 esta no fue significativa (Figura 24. B).

Invasividad celular.

Los ensayos de invasividad realizados con las células AGS-WT, AGS-GFP, AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9, mostraron diferencias significativas en la invasividad de las células AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 en comparación con las células control donde las células AGS-Cldn9 mostraron mayor invasividad con una $p < 0.001$ (Figura 24 C). En el caso de las células AGS-Cldn6 tuvieron una disminución en la capacidad de invasividad respecto a las células control AGS-GFP con una $p < 0.01$ (Figura 10 D). Estos resultados a diferencia de los ensayos de migración mostraron que las células AGS-Cldn9 tuvieron un incremento en el número de células invasivas de aproximadamente el doble con una $p < 0.001$ respecto a las células AGS-GFP (Figura 24 D).

Tomando los datos funcionales en conjunto cabe destacar que las células AGS-Cldn6 parecen tener una mayor capacidad migrativa y las AGS-Cldn9 una mayor facultad invasiva y considerando los datos de los marcadores de CTC, autorenovación y TEM se podría relacionar

a la sobreexpresión de Cldn-6 con un fenotipo mayormente de recaída en el cáncer gástrico y a la sobreexpresión de Cldn-9 a un fenotipo cuya capacidad metastásica es mayor, donde puede ser determinante la sobreexpresión del marcador de TEM N-Cadherina. Sin embargo, aunque relacionadas con estos aspectos del cáncer las células AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 serían capaces según todas las evidencias aquí presentadas, de llevar a cabo la formación de un tumor *de novo* en el tejido gástrico o en algún tejido adyacente con mayor eficiencia que células que no sobreexpresen a estas proteínas.

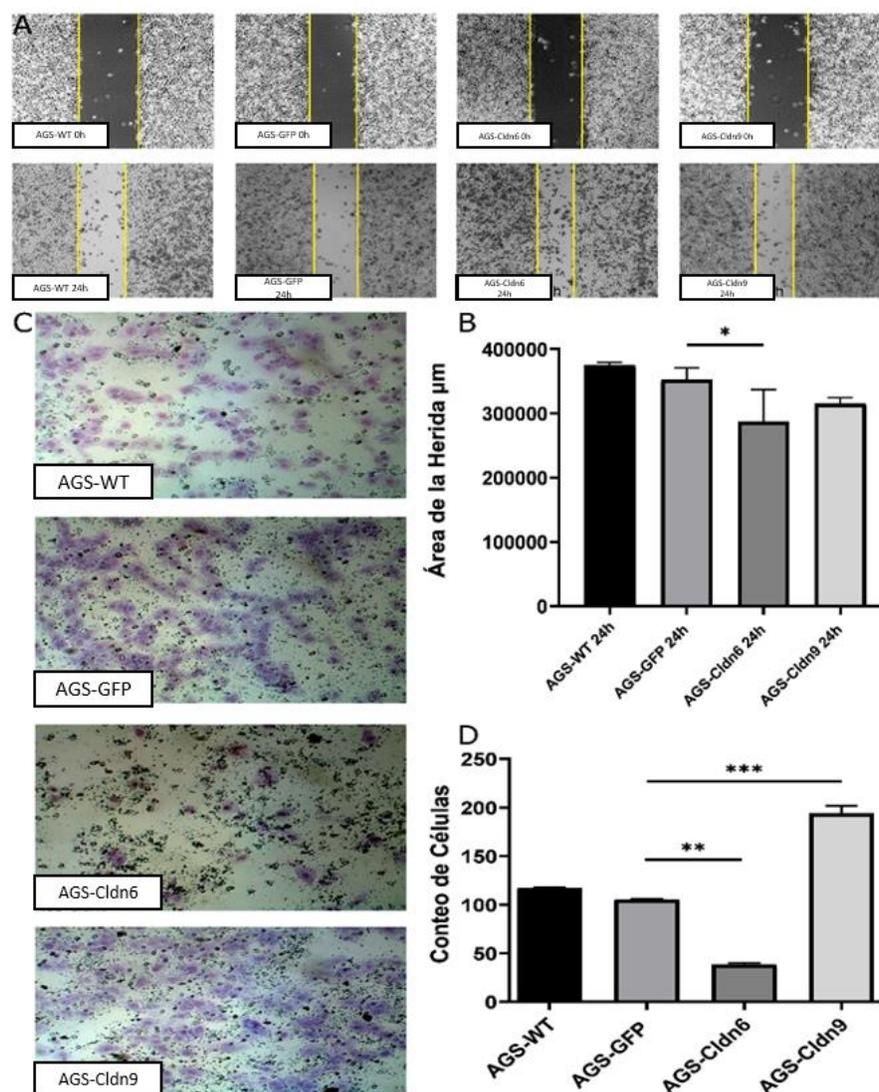


Figura 24. La sobreexpresión de CLDN-6 aumenta la migración y CLDN-9 la invasividad celular. A) Imágenes representativas de los ensayos de herida realizados con las células AGS-WT, AGS-GFP, AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 a las 0h en la parte superior y a las 24h en la parte inferior. Las heridas fueron delimitadas con líneas amarillas para resaltar la migración producida después de 24h. Se observa una mayor migración en las células AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9. B) Análisis cuantitativo de la migración celular.

Las células AGS-Cldn6 mostraron un mayor cierre de la herida después de 24h con una $p < 0.05$ C) Imágenes representativas de los ensayos de invasividad a las 24h de ser sembradas. Se observa una menor invasividad en las células AGS-Cldn6 y una mayor en las AGS-Cldn9 respecto al control de transfección AGS-GFP. D) El número de células invasivas en las células AGS-Cldn6 es menor con una $p < 0.01$ y el número de células invasivas en las AGS-Cldn9 es aproximadamente el doble que las AGS-GFP con una $p < 0.001$. Los datos se analizaron con la prueba estadística de Dunnett y los datos que se presentan son resultados agrupados de tres experimentos independientes

Discusión.

El cáncer gástrico es un problema relevante de salud pública en México y a nivel mundial^{1,2}. La media de supervivencia rara vez supera los 12 meses y la supervivencia a los 5 años es inferior al 10%. La remoción del tumor es el principal tratamiento de esta enfermedad. Siendo la quimioterapia, quimiorradiación y disección de los ganglios linfáticos adyacentes terapias adyuvantes⁶. El cáncer gástrico del tipo difuso es el más común en personas menores de 45 años y el que tiene la peor prognosis⁴. Más de la mitad de los pacientes con cáncer gástrico presentan remisión del tumor primario o con metástasis a distancia⁶.

Es ampliamente aceptado que las CTC son las responsables de la remisión del cáncer después del tratamiento^{5,10}. Para aislarlas tradicionalmente se han utilizado marcadores de superficie como CD44 y CD24 mediante ensayos de citometría. La definición de estas células se basa en sus características funcionales y a menudo son inyectadas en ratones inmunodeficientes para corroborar su habilidad para formar tumores. Estos ensayos *in vivo* son considerados fisiológicamente relevantes ya que además de la habilidad de formar tumores, demuestran la capacidad de autorrenovación dando lugar a una progenie celular heterogénea⁹⁷.

En este trabajo se encontró que la sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 en células AGS favorece un fenotipo CD44⁺/CD24⁻ que expresa un **90%** más CD44 en AGS-Cldn6 y un **130%** más en AGS-Cldn9 y significativamente menos CD24 en ambas sublíneas. Este fenotipo es equivalente al CD44⁺/CD24⁻ (low) encontrado en células de cáncer gástrico positivas a VEB SNU-719 que fueron capaces de generar tumores a partir de esferoides en un modelo murino⁶⁶. Tomando en cuenta ambas evidencias de manera independiente, este fenotipo se puede considerar el de las CTC. Se debe resaltar, que en este trabajo el fenotipo CD44⁺/CD24⁻ es inducido por la

sobreexpresión de las Cldn-6 y Cldn-9, las cuales se expresan en etapas tempranas del desarrollo en tejido sano^{36,37,98}, mostrando evidencia de la importancia de estas proteínas en el inicio y progreso del cáncer gástrico.

Como se ha referido en este trabajo, existe una relación fundamental entre las CTC y la TEM, y las moléculas involucradas en las características de las CTC van más allá de los marcadores de superficie. Durante los procesos celulares normales, la pluripotencia de las células troncales se define como el potencial de autorrenovación y diferenciación en las tres capas gérminales¹² y la TEM cambia las características de las células epiteliales y las convierte en células mesenquimales durante el desarrollo, cicatrización y generación de células troncales^{75,76}. Esto conduce a que ambos procesos van de la mano, en el cáncer estas procesos relevantes en el desarrollo embrionario se vuelven a activar en el inicio de la enfermedad y la metástasis.

Tomando en cuenta lo anterior, cabe destacar que en este estudio el factor de transcripción que mantiene la autorenovación, NANOG, se expresó un **40%** más en AGS-Cldn6 y **37%** más en AGS-Cldn9 y el factor de transcripción SOX2 se expresó **80%** y **50%** más en las sublíneas recombinantes. Además, los factores de transcripción de TEM SNAIL se expresó un **26%** más en AGS-Cldn6 y un **28%** más en AGS-Cldn9 y TWIST aumentó su expresión evidenciada en los ensayos de microscopía. Estos datos en conjunto dan evidencia de que la sobreexpresión de la Cldn-6 y Cldn-9 en células AGS induce la formación de las CTC y a nivel poblacional las sublíneas recombinantes se enriquecieron en estos marcadores con pequeñas diferencias entre sí. Estos hallazgos correlacionan con otros estudios donde se utilizaron estas proteínas para identificar CTC en cáncer gástrico, de mama y de cuello y cabeza^{11,12,99}.

En el proceso de TEM, TWIST puede reprimir la expresión de E-Cadherina³¹ y N-Cadherina promueve los procesos de invasión y motilidad celular incluso en condiciones donde se induce la expresión de marcadores epiteliales⁹³. Además, SNAIL mejora las capacidades de iniciación tumoral y es un regulador maestro de la TEM³¹. En este estudio se observó que la expresión de TWIST fue mayor en las sublíneas AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 sugiriendo que la mayor expresión de TWIST y SNAIL en las células recombinantes puede inhibir la expresión de E-Cadherina y favorecer la expresión de N-Cadherina, pero principalmente en AGS-Cldn9 donde su expresión

es **97%** mayor respecto al control. Sin embargo, se requieren de más experimentos para corroborar dichos resultados.

Los datos poblacionales y derivados de la microscopía confirman que las células AGS en general expresan marcadores tanto de CTC, autorenovación y TEM de manera simultánea pero lo más relevante para este trabajo es que la sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 exacerbaban la expresión de estas proteínas y producen mayor cantidad de células que las contienen. En general, los datos obtenidos por estos ensayos son bastante equivalentes, sin embargo, los ensayos funcionales arrojaron luz acerca de las diferencias en los efectos de estas claudinas en el cáncer gástrico. Las células AGS-Cldn6 tienen mayor capacidad migrativa y las células AGS-Cldn9 tienen mayor capacidad invasiva, aunque esto no quiere decir que alguna no pueda llevar a cabo ambas tareas considerando la expresión de las proteínas evaluadas, ciertamente según los datos existe una predilección dada por la sobreexpresión de una claudina sobre otra.

Esta observación podría ser importante para estudios futuros donde se esperaría que si tomamos a la Cldn-6 como marcador de CTC las células que expresaran esta proteína provocarían con mayor probabilidad una recaída local y las que expresen Cldn-9 estarán más orientadas a un proceso de metástasis, guiando el tipo de tratamiento adecuado para cada paciente con estos marcadores. Aún hacen falta ensayos para apoyar estas hipótesis, como ensayos *in vivo* midiendo la expresión de estas proteínas para confirmar el concepto de las CTC y comprobando si son capaces de generar un tumor *de novo*. También, sería deseable explorar las vías de señalización involucradas con estas moléculas que unan a cada una con estas con las claudinas 6 y 9. Por ejemplo, la vía de Wnt/ β -catenina a menudo involucra a CD44, NANOG y SOX2 con otras proteínas de membrana^{24,65,67}.

Como se ha mencionado, las claudinas pueden tener un papel ambivalente en diferentes tipos de cáncer, actuando como supresoras o promotoras de tumor^{12,19,20}. Esto se puede explicar con el hecho de que existe una regulación de las claudinas que se expresan en los tejidos dependiendo de las distintas etapas de desarrollo en la que se encuentren.

Por ejemplo, la Cldn-6 es considerada una proteína supresora de tumor en carcinoma de cuello uterino^{26,100} pero actúa como promotora de tumor en cáncer gástrico^{27,96}. Esto hace pensar en que la necesidad de células con alta capacidad de autorenovación y motilidad en el cuello uterino puede ser mayor por lo que las células mantienen estas características, llevando a la patología cuando esto no ocurre. De manera contraria, en el cáncer gástrico, las células con una capacidad de autorenovación y motilidad exacerbada conducen al desarrollo del cáncer. Aún hacen falta más estudios que corroboren estas hipótesis.

Por último, existen algunos esfuerzos para tratar diversos cánceres utilizando como dianas a las claudinas. Por ejemplo, el diseño de anticuerpos monoclonales o fármacos acoplados a CpE cuyo mecanismo de entrada a las células es a través de las claudinas¹². Reconocer la importancia de estas proteínas en el cáncer podría impulsar el desarrollo de estas terapias dirigidas.

Conclusiones.

Las CTC poseen características que las implican en el inicio y progreso del cáncer. Estas características son criterios de demarcación para diferenciarlas de otras poblaciones celulares dentro de la heterogeneidad de los tumores. En este trabajo se encontró que la sobreexpresión de Cldn-6 y Cldn-9 en células AGS:

- 1) Enriquece la población de CTC CD44⁺/CD24⁻.
- 2) Aumenta la expresión de CD44 y disminuye la de CD24.
- 3) Incrementa los factores de transcripción asociados a la autorenovación NANOG y SOX2.
- 4) Incrementa los factores de transcripción SNAIL y TWIST y la proteína de membrana N-Cadherina y en el caso de SNAIL y N-Cadherina se enriquecieron poblacionalmente.
- 5) Sobreexpresan simultáneamente marcadores de CTC, autorenovación y TEM.
- 6) La sublínea AGS-Cldn6 tiene una mayor capacidad migratoria y la sublínea AGS-Cldn9 y posee una mayor capacidad invasiva.

Tomando en cuenta todas estas evidencias se puede afirmar que las células AGS que sobreexpresan Cldn6 y Cldn9 poseen características que las definirían como CTC mostrando

un papel relevante de estas proteínas relacionando a la Cldn-6 con una posible remisión del cáncer gástrico y a Cldn-9 con la metástasis.

Perspectivas.

1.- Evaluar la resistencia a fármacos y la evasión del sistema inmune en las células AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9.

2.- Realizar ensayos *in vivo* en un modelo murino con las células AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9 para evaluar su capacidad de formación de tumores y su capacidad metastásica.

Referencias.

1. Sampieri, C. L. & Mora, M. Gastric cancer research in Mexico: A public health priority. *World Journal of Gastroenterology* (2014) doi:10.3748/wjg.v20.i16.4491.
2. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* (2018) doi:10.3322/caac.21492.
3. CansecoEpidemiología de cáncer gástrico en el tercer nivel de atención en salud en Chiapas-Ávila, L. M. *et al.* Epidemiología de cáncer gástrico en el tercer nivel de atención en salud en Chiapas. *Revista de Gastroenterología de México* (2019) doi:10.1016/j.rgmex.2018.06.006.
4. Sitarz, R. *et al.* Gastric cancer: Epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Management and Research* (2018) doi:10.2147/CMAR.S149619.
5. Bandhavkar, S. Cancer stem cells: A metastasizing menace! *Cancer Medicine* (2016) doi:10.1002/cam4.629.
6. Oritura, M. *et al.* Treatment of gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology* **20**, (2014).
7. Marimuthu, A. *et al.* Gene Expression Profiling of Gastric Cancer. *Journal of Proteomics and Bioinformatics* (2011) doi:10.4172/jpb.1000170.
8. Osanai, M., Takasawa, A., Murata, M. & Sawada, N. Claudins in cancer: bench to bedside. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* (2017) doi:10.1007/s00424-016-1877-7.
9. Tabariès, S. & Siegel, P. M. The role of claudins in cancer metastasis. *Oncogene* (2017) doi:10.1038/onc.2016.289.
10. Lytle, N. K., Barber, A. G. & Reya, T. Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. *Nature Reviews Cancer* (2018) doi:10.1038/s41568-018-0056-x.
11. Basati, G., Mohammadpour, H. & Emami Razavi, A. Association of High Expression Levels of SOX2, NANOG, and OCT4 in Gastric Cancer Tumor Tissues with Progression and Poor Prognosis. *Journal of Gastrointestinal Cancer* (2019) doi:10.1007/s12029-018-00200-x.
12. Gowrikumar, S., Singh, A. B. & Dhawan, P. Role of claudin proteins in regulating cancer stem cells and chemoresistance-potential implication in disease prognosis and therapy. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 21 (2020).
13. Schneeberger, E. E. & Lynch, R. D. The tight junction: A multifunctional complex. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* vol. 286 (2004).
14. Krause, G., Protze, J. & Piontek, J. Assembly and function of claudins: Structure-function relationships based on homology models and crystal structures. *Seminars in Cell and Developmental Biology* vol. 42 (2015).
15. Mineta, K. *et al.* Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Letters* **585**, (2011).
16. Günzel, D. & Fromm, M. Claudins and other tight junction proteins. *Comprehensive Physiology* **2**, (2012).
17. Suzuki, H. *et al.* Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science* **344**, (2014).
18. Soini, Y. Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. *Histopathology* **46**, (2005).
19. Kage, H., Flodby, P., Zhou, B. & Borok, Z. Dichotomous roles of claudins as tumor promoters or suppressors: lessons from knockout mice. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 76 (2019).
20. Shang, X., Lin, X., Alvarez, E., Manorek, G. & Howell, S. B. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 control tumor growth and metastases. *Neoplasia (United States)* **14**, (2012).
21. Morin, P. J. Claudin proteins in human cancer: Promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Research* vol. 65 (2005).

22. Xu, C., Wang, K., Ding, Y. H., Li, W. J. & Ding, L. Claudin-7 gene knockout causes destruction of intestinal structure and animal death in mice. *World Journal of Gastroenterology* **25**, (2019).
23. Nübel, T. *et al.* Claudin-7 regulates EpCAM-Mediated functions in tumor progression. *Molecular Cancer Research* **7**, (2009).
24. Ahmad, R. *et al.* Loss of claudin-3 expression induces IL6/gp130/Stat3 signaling to promote colon cancer malignancy by hyperactivating Wnt/ β -catenin signaling. *Oncogene* **36**, (2017).
25. Hicks, D. A. *et al.* Claudin-4 activity in ovarian tumor cell apoptosis resistance and migration. *BMC Cancer* **16**, (2016).
26. Zhang, X. *et al.* Expression of apoptosis signal-regulating kinase 1 is associated with tight junction protein claudin-6 in cervical carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **8**, (2015).
27. Zavala-Zendejas, V. E. *et al.* Claudin-6, 7, or 9 overexpression in the human gastric adenocarcinoma cell line AGS increases its invasiveness, migration, and proliferation rate. *Cancer Investigation* (2011) doi:10.3109/07357907.2010.512594.
28. Dhawan, P. *et al.* Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *Journal of Clinical Investigation* **115**, (2005).
29. Blanchard, A. A. *et al.* Identification of claudin 1 transcript variants in human invasive breast cancer. *PLoS ONE* **11**, (2016).
30. Martínez-Estrada, O. M. *et al.* The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochemical Journal* **394**, (2006).
31. Kuşoğlu, A. & Biray Avcı, Ç. Cancer stem cells: A brief review of the current status. *Gene* vol. 681 (2019).
32. Biteau, B., Hochmuth, C. E. & Jasper, H. Maintaining tissue homeostasis: Dynamic control of somatic stem cell activity. *Cell Stem Cell* vol. 9 (2011).
33. Romito, A. & Cobellis, G. Pluripotent stem cells: Current understanding and future directions. *Stem Cells International* vol. 2016 (2016).
34. Duinsbergen, D., Salvatori, D., Eriksson, M. & Mikkers, H. Tumors Originating from Induced Pluripotent Stem Cells and Methods for Their Prevention. in *Annals of the New York Academy of Sciences* vol. 1176 (2009).
35. Phi, L. T. H. *et al.* Cancer stem cells (CSCs) in drug resistance and their therapeutic implications in cancer treatment. *Stem Cells International* vol. 2018 (2018).
36. Ben-David, U., Nudel, N. & Benvenisty, N. Immunologic and chemical targeting of the tight-junction protein Claudin-6 eliminates tumorigenic human pluripotent stem cells. *Nature Communications* **4**, (2013).
37. Sugimoto, K. *et al.* The Tight-Junction Protein Claudin-6 Induces Epithelial Differentiation from Mouse F9 and Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE* **8**, (2013).
38. Morales, F. C., Takahashi, Y., Kreimann, E. L. & Georgescu, M. M. Ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding phosphoprotein 50 organizes ERM proteins at the apical membrane of polarized epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, (2004).
39. Turksen, K. & Troy, T. C. Claudin-6: A novel tight junction molecule is developmentally regulated in mouse embryonic epithelium. *Developmental Dynamics* (2001) doi:10.1002/dvdy.1174.
40. Wang, L. *et al.* Claudin 6: A novel surface marker for characterizing mouse pluripotent stem cells. *Cell Research* vol. 22 (2012).

41. Erdélyi-Belle, B. *et al.* Expression of Tight Junction Components in Hepatocyte-Like Cells Differentiated from Human Embryonic Stem Cells. *Pathology and Oncology Research* **21**, (2015).
42. Darido, C. *et al.* Defective claudin-7 regulation by Tcf-4 and Sox-9 disrupts the polarity and increases the tumorigenicity of colorectal cancer cells. *Cancer Research* **68**, (2008).
43. Ma, L., Yin, W., Ma, H., Elshoura, I. & Wang, L. Targeting claudin-3 suppresses stem cell-like phenotype in nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. *Lung Cancer Management* **8**, (2019).
44. Naor, D., Sionov, R. V. & Ish-Shalom, D. CD44: Structure, function, and association with the malignant process. *Advances in Cancer Research* vol. 71 (1997).
45. Goodison, S., Urquidi, V. & Tarin, D. CD44 cell adhesion molecules. *Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology* vol. 52 (1999).
46. Sil, P. *et al.* Dynamic actin-mediated nano-scale clustering of CD44 regulates its meso-scale organization at the plasma membrane. *Molecular Biology of the Cell* **31**, (2020).
47. Gál, I. *et al.* Role of the extracellular and cytoplasmic domains of CD44 in the rolling interaction of lymphoid cells with hyaluronan under physiologic flow. *Journal of Biological Chemistry* **278**, (2003).
48. Yan, Y., Zuo, X. & Wei, D. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Translational Medicine* **4**, (2015).
49. Buscher, K. *et al.* The transmembrane domains of L-selectin and CD44 regulate receptor cell surface positioning and leukocyte adhesion under flow. *Journal of Biological Chemistry* **285**, (2010).
50. Liu, D. & Sy, M. S. A cysteine residue located in the transmembrane domain of CD44 is important in binding of CD44 to hyaluronic acid. *Journal of Experimental Medicine* **183**, (1996).
51. Liu, D. & Sy, M. S. Phorbol myristate acetate stimulates the dimerization of CD44 involving a cysteine in the transmembrane domain. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **159**, (1997).
52. Tsukita, S. *et al.* ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *Journal of Cell Biology* **126**, (1994).
53. Senbanjo, L. T. & Chellaiah, M. A. CD44: A multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* vol. 5 (2017).
54. Medrano-González, P. A., Rivera-Ramírez, O., Montaña, L. F. & Rendón-Huerta, E. P. Proteolytic Processing of CD44 and Its Implications in Cancer. *Stem Cells International* vol. 2021 (2021).
55. Kristiansen, G., Sammar, M. & Altevogt, P. Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *Journal of Molecular Histology* vol. 35 (2004).
56. Sagiv, E. & Arber, N. The novel oncogene *CD24* and its arising role in the carcinogenesis of the GI tract: from research to therapy. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* **2**, 125–133 (2008).
57. Gilliam, D. T., Menon, V., Bretz, N. P. & Pruszek, J. The CD24 surface antigen in neural development and disease. *Neurobiology of Disease* **99**, 133–144 (2017).
58. Ayre, D. C. & Christian, S. L. CD24: A rheostat that modulates cell surface receptor signaling of diverse receptors. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* vol. 4 (2016).
59. Klonisch, T. *et al.* Cancer stem cell markers in common cancers – therapeutic implications. *Trends in Molecular Medicine* **14**, 450–460 (2008).

60. Kim, Y. S., Kaidina, A. M., Chiang, J.-H., Yarygin, K. N. & Lupatov, A. Yu. Cancer stem cell molecular markers verified in vivo. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry* **11**, 43–54 (2017).
61. Kristiansen, G., Sammar, M. & Altevogt, P. Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *Journal of molecular histology* **35**, 255–62 (2004).
62. Jiao, X.-L., Zhao, C., Niu, M. & Chen, D. Downregulation of CD24 inhibits invasive growth, facilitates apoptosis and enhances chemosensitivity in gastric cancer AGS cells. *European review for medical and pharmacological sciences* **17**, 1709–15 (2013).
63. Wang, Y.-C. *et al.* CD24 mediates gastric carcinogenesis and promotes gastric cancer progression via STAT3 activation. *Apoptosis* **19**, 643–656 (2014).
64. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, (2003).
65. Battle, E. & Clevers, H. Cancer stem cells revisited. *Nature Medicine* vol. 23 (2017).
66. Hui, D. *et al.* CD44⁺CD24⁻/low sphere-forming cells of EBV-associated gastric carcinomas show immunosuppressive effects and induce Tregs partially through production of PGE2. *Experimental Cell Research* **390**, (2020).
67. Chi, H. C., Tsai, C. Y., Tsai, M. M., Yeh, C. T. & Lin, K. H. Roles of long noncoding rnas in recurrence and metastasis of radiotherapy-resistant cancer stem cells. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 18 (2017).
68. Pan, G. & Thomson, J. A. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Research* vol. 17 (2007).
69. Chambers, I. *et al.* Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**, (2003).
70. Novak, D. *et al.* SOX2 in development and cancer biology. *Seminars in Cancer Biology* vol. 67 (2020).
71. Zhang, S., Xiong, X. & Sun, Y. Functional characterization of SOX2 as an anticancer target. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 5 (2020).
72. Grimm, D. *et al.* The role of SOX family members in solid tumours and metastasis. *Seminars in Cancer Biology* vol. 67 (2020).
73. Zhang, S. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World Journal of Stem Cells* **6**, (2014).
74. Vilas, J. M. *et al.* Adult Sox2⁺ stem cell exhaustion in mice results in cellular senescence and premature aging. *Aging Cell* **17**, (2018).
75. Shibue, T. & Weinberg, R. A. EMT, CSCs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications. *Nature Reviews Clinical Oncology* vol. 14 (2017).
76. Nieto, M. A., Huang, R. Y. Y. J., Jackson, R. A. A. & Thiery, J. P. P. EMT: 2016. *Cell* vol. 166 (2016).
77. Grigore, A., Jolly, M., Jia, D., Farach-Carson, M. & Levine, H. Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *Journal of Clinical Medicine* **5**, (2016).
78. Wu, Y. & Zhou, B. P. Snail: More than EMT. *Cell Adhesion & Migration* **4**, 199 (2010).
79. Kaufhold, S. & Bonavida, B. Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR* **33**, 62 (2014).
80. Cano, A. & Nieto, M. A. Snail Transcription Factors. in *Encyclopedia of Cancer* 3456–3459 (Springer Berlin Heidelberg, 2011). doi:10.1007/978-3-642-16483-5_5389.

81. Barrallo-Gimeno, A. & Nieto, M. A. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* **132**, 3151–3161 (2005).
82. Qin, Q., Xu, Y., He, T., Qin, C. & Xu, J. Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms. *Cell Research* **22**, 90–106 (2011).
83. BARNES, R. M. & FIRULLI, A. B. A twist of insight - the role of Twist-family bHLH factors in development. *The International journal of developmental biology* **53**, 909 (2009).
84. Castanon, I. & Baylies, M. K. A Twist in fate: evolutionary comparison of Twist structure and function. *Gene* **287**, 11–22 (2002).
85. Qin, Q., Xu, Y., He, T., Qin, C. & Xu, J. Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms. *Cell Research* vol. 22 (2012).
86. Pećina-Šlaus, N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell International* **3**, 17 (2003).
87. Graziano, F. The E-Cadherin Gene, Structure and Function. *Spotlight on Familial and Hereditary Gastric Cancer* 27–33 (2013) doi:10.1007/978-94-007-6570-2_4.
88. Harrison, O. J. *et al.* The Extracellular Architecture of Adherens Junctions Revealed by Crystal Structures of Type I Cadherins. *Structure* **19**, 244–256 (2011).
89. K, H., S, T., H, F. & M, T. Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. *Developmental biology* **120**, 215–227 (1987).
90. Loh, C. Y. *et al.* The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells* vol. 8 (2019).
91. Radice, G. L. N-cadherin-mediated adhesion and signaling from development to disease: Lessons from mice. *Progress in molecular biology and translational science* **116**, 263 (2013).
92. Mrozik, K. M., Blaschuk, O. W., Cheong, C. M., Zannettino, A. C. W. & Vandyke, K. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer* **18**, (2018).
93. Nieman, M. T., Prudoff, R. S., Johnson, K. R. & Wheelock, M. J. N-Cadherin Promotes Motility in Human Breast Cancer Cells Regardless of Their E-Cadherin Expression. *Journal of Cell Biology* **147**, 631–644 (1999).
94. Hennessy, B. T. *et al.* Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Research* (2009) doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3441.
95. Qiao, X. T. & Gumucio, D. L. Current molecular markers for gastric progenitor cells and gastric cancer stem cells. *Journal of Gastroenterology* (2011) doi:10.1007/s00535-011-0413-y.
96. Rendón-Huerta, E. *et al.* Distribution and expression pattern of claudins 6, 7, and 9 in diffuse- and intestinal-type gastric adenocarcinomas. *Journal of Gastrointestinal Cancer* (2010) doi:10.1007/s12029-009-9110-y.
97. Abbaszadegan, M. R. *et al.* Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: A review. *Journal of Cellular Physiology* vol. 232 (2017).
98. Abuazza, G. *et al.* Claudins 6, 9, and 13 are developmentally expressed renal tight junction proteins. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **291**, (2006).
99. Huang, C. *et al.* ERK1/2-Nanog signaling pathway enhances CD44(+) cancer stem-like cell phenotypes and epithelial-to-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinomas. *Cell Death and Disease* **11**, (2020).

100. Zhang, X., Ruan, Y., Li, Y., Lin, D. & Quan, C. Tight junction protein claudin-6 inhibits growth and induces the apoptosis of cervical carcinoma cells in vitro and in vivo. *Medical Oncology* **32**, (2015).