



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de  
Medicina, UNAM**

**El papel de Ezrina durante la transición epitelio-  
mesénquima en células de adenocarcinoma gástrico  
humano que sobreexpresan claudina 6 o 9.**

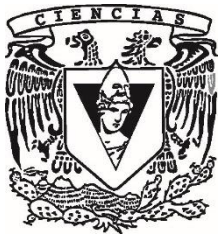
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

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

**Naresh Esteban Diego Bocanegra**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dra. Erika Patricia Rendón Huerta  
CIUDAD DE MÉXICO, 2022**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Hoja de datos del jurado

### 1. Datos del alumno

Diego

Bocanegra

Naresh Esteban

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

312012779

### 2. Datos de tutor

Dra

Erika Patricia

Rendón

Huerta

### 3. Datos del sinodal 1

Dr

Luis Felipe

Montaño

Estrada

### 4. Datos del sinodal 2

Dra

Ana Cristina

Torres

Martínez

### 5. Datos del sinodal 3

Dra

Alicia

Huerta

Chagoya

### 6. Datos del sinodal 4

M. en C

Carlos Abraham

García

García

### 7. Datos del trabajo escrito

El papel de Ezrina durante la TEM en AGS transfectadas con claudina 6 o 9.

72p.2020

“En muchas ocasiones, la ignorancia engendra confianza con más frecuencia que el conocimiento; son aquellos que saben poco, y no aquellos que saben mucho, quienes afirman que tal o cual problema nunca será solucionado por la ciencia.”

Charles Darwin



## AGRADECIMIENTOS

A mi madre por apoyarme en cada decisión de mi vida, por creer en mi capacidad desde un inicio y siempre inculcarme valores, que hacer las cosas siempre por el camino correcto trae sus recompensas, por no dejarme caer cuando tenía mis momentos de tristeza y debilidad y sobre todo porque siempre me brindó confianza y amor que fueron el combustible que impulsó mi conocimiento y éxito en mi vida académica.

Mi hermano que siempre estuvo conmigo en las malas y buenas decisiones que tomé, por ser mi compañero de vida durante mi infancia y mi mejor amigo, en las risas, travesuras y también en la tristeza. Gracias por enseñarme lo que es el amor entre hermanos.

A mi tía y mi abuela que siempre fueron un apoyo incondicional durante mi vida académica y que sin su ayuda jamás hubiera podido estar en donde estoy, gracias por creer en mi capacidad, gracias por sus regaños, su guía y su inmenso amor incondicional que me han brindado.

Al resto de mi familia gracias por su amor y sus consejos, siempre estaré agradecido de tener a la familia que tengo, que, aunque poca, siempre muy amorosa.

A mi mejor amigo, que ya no me acompaña en esta vida mortal, pero que siempre llevaré en mi corazón sus consejos, pláticas y cariño. A mis amigos de la facultad por ayudarme a descubrir mi verdadera pasión dentro de la biología y haber hecho más amenos mis estudios.

A mis compañeros del laboratorio, Priscila, Charlie, Jorge, Yuliana y Ana por brindarme sus conocimientos de la mejor manera y apoyarme con mis experimentos.

A la Dra. Erika y el Dr. Montaña por haber creído desde el principio en mi potencial, por haberme brindado el material necesario para mi tesis y sobre todo por haberme incluido en su círculo social dentro de la ciencia. Gracias por ser el primer acercamiento que tuve en la ciencia, siempre los llevaré en mis recuerdos.

Finalmente, agradecimientos a mi universidad por brindarme una educación de calidad y gratuita desde el bachillerato.



## ÍNDICE

Resumen.....	1
1.- INTRODUCCIÓN.....	2
2.- ANTECEDENTES.....	4
2.1 Uniones estrechas.....	4
2.2 Claudinas.....	4
2.3 Cáncer gástrico.....	5
2.4 Claudina 6 y 9 en cáncer gástrico.....	8
2.5 Inflamación crónica y cáncer gástrico.....	9
2.5.1 Interleucina 8.....	10
2.6 Transición epitelio mesénquima.....	11
2.6.1 Snail.....	13
2.6.2 Twist.....	14
2.6.3 E-cadherina.....	16
2.6.4 N-cadherina.....	18
2.7.- Metástasis.....	19
2.7.1.- Proteínas ERM.....	20
2.7.2.- Ezrina.....	24
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
4.- JUSTIFICACIÓN.....	26
5.- HIPÓTESIS.....	27
6.- OBJETIVO.....	27
7.- OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
8.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
8.1.- Cultivo de la línea celular AGS.....	27
7.2.- Separación celular activada por fluorescencia (FACS).....	28
7.3.- Migración e invasividad celular.....	29
7.3.1.- Ensayo de herida.....	29
7.3.2.- Ensayo de invasividad por Transwell.....	29
7.4.- Western Blot.....	30
7.5.- Inmunofluorescencias.....	31
7.6.- Análisis estadístico.....	32



<b>8.- RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
<b>8.1.- Separación celular y enriquecimiento de la expresión de cldn-6</b> .....	<b>33</b>
<b>8.2.- La sobreexpresión de Cldn-9 aumenta la migración e invasividad celular</b> .....	<b>34</b>
<b>8.3.- La sobreexpresión de Cldn-9 induce una mayor expresión de Ezrina</b> .....	<b>37</b>
<b>8.4.- Participación de Ezrina en la migración de células AGS-Cldn-9</b> .....	<b>37</b>
<b>8.5.- IL-8 induce la expresión de marcadores asociados a la TEM</b> .....	<b>39</b>
<b>8.6.- IL-8 promueve un aumento en la expresión de Ezrina en células AGS-Cldn-9</b> .....	<b>41</b>
<b>8.7.- Ezrina promueve la migración en células AGS-Cldn-9 con un fenotipo mesenquimal</b> .....	<b>43</b>
<b>9.- DISCUSIÓN</b> .....	<b>45</b>
La expresión de claudinas promueve la migración e invasividad celular.....	45
La sobreexpresión de claudinas aumenta la expresión de Ezrina.....	46
Ezrina participa en la migración celular por medio de la formación de filopodios.....	47
La IL-8 induce la expresión de marcadores asociados a la TEM.....	48
La IL-8 promueve un aumento en la expresión de Ezrina en AGS-Cldn-9.....	49
Ezrina aumenta la migración celular durante la TEM.....	50
<b>10.- CONCLUSIONES</b> .....	<b>51</b>
<b>11.- PERSPECTIVAS</b> .....	<b>51</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>52</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>53</b>



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de las uniones celulares .....	5
Figura 2. Modelos de las células troncales de cáncer .....	7
Figura 3. Vías de señalización caracterizadas para la unión de IL-8 con sus receptores CXCR1/2. ....	11
Figura 4. Regulación de la expresión y estabilidad de E-cadherina durante la TEM .....	13
Figura 5. Vías de señalización para Twist involucradas durante la invasión tumoral y la metástasis.....	16
Figura 6. Representación esquemática de las uniones célula-célula mediadas por E-cadherina.....	17
Figura 7. Estructura de las proteínas ERM.....	21
Figura 8 Activación de las proteínas ERM .....	23
Figura 9. Patrón de expresión de GFP en la clona D-10 de las células transfectadas con Cldn-6.....	33
Figura 10. Porcentaje de expresión de GFP en la clona D-10 después de diferentes pasajes celulares. ....	34
Figura 11. La sobreexpresión de Cldn-9 aumenta la migración celular. ....	36
Figura 12. La sobreexpresión de Cldn-9 aumenta la invasividad celular. ....	36
Figura 13. Expresión de Ezrina en las líneas AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-9.....	37
Figura 14. Expresión de Ezrina en células AGS por inmunofluorescencia .....	38
Figura 15. Expresión de E-cadherina en células AGS por inmunofluorescencia .....	39
Figura 16. Expresión de N-Cadherina por ensayos de Inmunofluorescencia .....	40
Figura 17. IL-8 induce la expresión de Snail y Twist.....	41
Figura 18. IL-8 promueve la expresión de Ezrina en células AGS-Cldn-9 .....	42
Figura 19. La IL-8 aumenta la migración celular mediada por Ezrina en células AGS-Cldn-9.....	44
Figura 20. La sobreexpresión de Cldn-9 aumenta la invasividad celular. ....	45





## ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGS	Células de adenocarcinoma gástrico humano
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín Trifosfato
BSA	Albúmina de Suero Bovino (Bovine Serum Albumin)
Ca <sup>2+</sup>	Ion Calcio
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CD43	Cúmulo de diferenciación 43 ( <i>Cluster of differentiation 43</i> )
CD44	Cúmulo de diferenciación 44 ( <i>Cluster of differentiation 44</i> )
CD95	Cúmulo de diferenciación 95 ( <i>Cluster of differentiation 95</i> )
CG	Cáncer Gástrico
Cldn	Claudinas
CTC	Células troncales de cáncer
C-terminal	Carboxilo terminal
DMEM	Medio esencial mínimo ( <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i> )
EGFR <i>Receptor</i>	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )
ERM	Ezrina/Radixina/Moesina
GFP	Proteína Verde Fluorescente ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
GTP	Guanosín trifosfato ( <i>Guanosine triphosphate</i> )
HIF	Factor inducible por hipoxia ( <i>Hypoxia Inducible factor</i> )
ICAM	Moléculas de adhesión intercelulares ( <i>Intercellular Adhesion Molecule</i> )
IL	Interleucinas
JAM	Molécula de adhesión de unión ( <i>Junctional adhesion molecule</i> )
K <sup>+</sup>	Ion Potasio
mA	Miliamperios



<b>MAPK Kinases)</b>	<b>Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos (<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>)</b>
<b>MEC</b>	<b>Matriz Extracelular</b>
<b>MMPs</b>	<b>Metaloproteasas</b>
<b>NFκB activated B cells)</b>	<b>Factor Nuclear Kappa B (<i>Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)</b>
<b>N-terminal</b>	<b>Amino terminal</b>
<b>PBS</b>	<b>Buffer Fosfato Salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)</b>
<b>PI3K</b>	<b>Fosfatidilinositol 3 cinasa (<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>)</b>
<b>PKA</b>	<b>Proteína Cinasa A</b>
<b>PKC</b>	<b>Proteína Cinasa C</b>
<b>ROS</b>	<b>Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)</b>
<b>RTKs</b>	<b>Receptores con actividad cinasa de tirosina (<i>Receptor tyrosine kinases</i>)</b>
<b>TEM</b>	<b>Transición Epitelio Mesénquima</b>
<b>TGFβ</b>	<b>Factor de Crecimiento Transformante beta (<i>Transforming Growth Factor beta</i>)</b>
<b>Thr</b>	<b>Treonina</b>
<b>TLRs</b>	<b>Receptores tipo Toll (<i>Toll-like receptors</i>)</b>
<b>TNF-α</b>	<b>Factor de necrosis tumoral alfa (<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>)</b>
<b>Tyr</b>	<b>Tirosina</b>
<b>UEs</b>	<b>Uniones Estrechas</b>
<b>μl</b>	<b>Microlitros</b>
<b>WT</b>	<b>Tipo Silvestre (<i>Wild Type</i>)</b>



## RESUMEN

El cáncer gástrico (CG) representa la cuarta causa de muerte por cáncer a nivel mundial y también fue la cuarta neoplasia más común en 2020. Se ha identificado que el principal factor que predispone al desarrollo del CG es una infección provocada por *Helicobacter pylori*, representando el 80% de los casos a nivel mundial. El CG resulta ser muy heterogéneo, por lo tanto, recibe una alta diversidad de clasificaciones histopatológicas, sin embargo, la más usada es la de Lauren, donde el CG es dividido en tipo intestinal y difuso, siendo este último el más agresivo.

Un cambio evidente durante el desarrollo del cáncer es la modificación en la estructura celular. Las células endoteliales y epiteliales mantienen la homeostasis de los tejidos a través de complejos de unión. Dentro de éstos se encuentran las uniones estrechas (UEs), las cuales están localizadas en la parte apical de las células y resultan esenciales estableciendo una barrera entre los diferentes compartimientos del cuerpo, funcionando como compuerta o barrera que regula el paso de iones, agua y solutos al espacio paracelular, además de que juegan un papel crucial en el mantenimiento de la polaridad celular y la traducción de señales. Dentro de las proteínas que conforman a las UEs se encuentra la familia de las claudinas, la cual está conformada por 27 proteínas transmembranales que se expresan de forma tejido específico. Las células tumorales muestran una desregulación en las UEs, así como una diferenciación y polaridad disminuidas, lo cual resulta en una pérdida en la integridad epitelial con cambios en la expresión de ciertas claudinas, lo que conlleva a un aumento en la fuga paracelular proporcionando un espacio para la movilidad de las células tumorales y un mayor suministro de nutrientes para el tumor. En el CG se ha reportado que la expresión anormal de Cldn-6 y 9 les brinda a las células una mayor capacidad de migración e invasión. Estas claudinas se expresan durante el desarrollo embrionario, siendo su expresión débil o nula en tejidos adultos.

Ezrina pertenece a la familia de las proteínas ERM y se sabe que se expresa en la mayoría de los tejidos normales y cancerosos, sin embargo, su expresión es significativamente mayor en los cánceres de origen mesenquimatoso. También se sabe que Ezrina participa en los procesos de migración celular mediante la formación de filopodios, además su distribución se correlaciona con un mal pronóstico, ya



que se reubica desde el citoplasma hacia las proyecciones móviles y de forma perinuclear en líneas celulares invasivas.

Se ha observado que la sobreexpresión de Cldn-9 en células AGS le brinda un fenotipo alargado y mesenquimatoso, a diferencia de las células AGS que sobreexpresan Cldn-6, donde el fenotipo es muy similar a las células WT. Los mecanismos que regulan el fenotipo de estas células son desconocidos por lo que este trabajo pretende determinar la posible participación de Ezrina en los fenotipos celulares observados durante la TEM, la migración celular y el mecanismo molecular que lo regula.

Palabras clave: Cáncer gástrico, claudina-6, claudina-9, filopodios, TEM, Ezrina.

## 1.- INTRODUCCIÓN

Ezrina es un miembro de la familia de proteínas ezrina/radixina/moesina (ERM) ya que comparten dominios N-terminales altamente homólogos, denominados FERM (proteína 4.1 ERM), que interactúan con las proteínas de la membrana plasmática a través de mecanismos tanto directos como indirectos. Estas proteínas pueden unirse directamente al dominio citoplasmático de ciertas proteínas con dominios transmembranales, incluidas CD43, CD44, CD95, ICAM-1,-2,-3 y con sindecano 2. Mientras que la región C-terminal proporciona el sitio principal de unión a los filamentos de actina<sup>1</sup>. También cuentan con un dominio flexible rico en hélices  $\alpha$ , pudiendo formar así una estructura en espiral que permite interacciones entre los dominios N y C terminales. Esta interacción le permite adquirir una conformación cerrada, quedando así de forma inactiva<sup>2</sup>. Para llevar a cabo su activación es necesaria una fosforilación (Thr-558 en moesina, Thr-576 en ezrina y Thr-564 en radixina) dentro del dominio C-terminal, además de una interacción con fosfolípidos como PIP2<sup>1,2</sup>.

Ezrina desempeña un papel importante en el mantenimiento de la forma y la polaridad de las células además de facilitar las vías de tráfico de membrana, la migración celular, la señalización celular, la regulación del crecimiento y la diferenciación. Ezrina se encuentra de manera inactiva en el citoplasma sin embargo, tras su activación mediada por una gran cantidad de cinasas y la interacción con diversos fosfolípidos, es dirigida hacia la membrana celular donde puede formar inmediatamente



un puente entre los filamentos de actina y varias proteínas transmembranales. Uno de los modos más frecuentes de activación que se han reportado de Ezrina es a través de la interacción con proteínas pequeñas GTPasas como Rho, que controla la remodelación del citoesqueleto de actina<sup>3</sup>.

Aunque Ezrina se expresa en la mayoría de los tejidos normales y cancerosos, su expresión es mayor en los cánceres de origen mesenquimatoso. La distribución anormal de Ezrina se ha correlacionado con un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama, donde Ezrina se expresa desde las regiones apicales observadas en líneas celulares no tumorogénicas hacia las proyecciones móviles en líneas celulares invasivas y en tumores de cáncer mama<sup>4</sup>. Un estudio mostró que utilizando un RNA de interferencia pequeño (RNAip) dirigido contra Ezrina se observa una reducción significativa en la proliferación, migración e invasividad celular en adenocarcinoma de pulmón. Al igual que en las células de cáncer de mama, la localización de la Ezrina en las células de cáncer de pulmón se encuentra alterada, observándose en la membrana apical en el epitelio bronquial normal y en el citoplasma en las células cancerosas de pulmón<sup>5</sup>. Algunos reportes sugieren que Ezrina puede funcionar como un oncogén en procesos metastásicos ya que modula múltiples procesos celulares, incluida la formación de protuberancias membranales, el mantenimiento de la morfología celular y las conexiones intercelulares, la promoción de la motilidad celular y la invasión<sup>6</sup>.

Las proteínas ERM tienen un papel fundamental durante la progresión tumoral ya que interaccionan con diferentes receptores de tipo tirosina cinasa (RTKs) como EFGR y HFGR, con proteínas de adhesión celular como CD44 y participan en otras vías de señalización como la de PI3K/Akt, cAMP/PKA y proteínas G pequeñas, las cuales están implicadas en procesos de tumorogénesis. Es por ello que las proteínas ERM pueden ser consideradas objetivos cruciales en el desarrollo de nuevas terapias para combatir la progresión del cáncer y otras enfermedades relacionadas<sup>2</sup>



## 2.- ANTECEDENTES

### 2.1 Uniones estrechas

Las células epiteliales forman láminas semipermeables que recubren la mayoría de las cavidades del cuerpo y separan el organismo del ambiente exterior<sup>7</sup>. Los tejidos epiteliales delimitan los compartimientos dentro de los tejidos y participan en el intercambio controlado de iones y moléculas, regulando así la homeostasis<sup>8</sup>. Estos procesos son gracias a las uniones celulares, las cuales cumplen las funciones de adhesión o anclaje entre células y la matriz extracelular, de oclusión y aislamiento de ambientes diferentes y de comunicación<sup>9</sup>.

Dentro de las uniones celulares se encuentran las UEs, esenciales para establecer una barrera entre los diferentes compartimientos del cuerpo cuya función fisiológica principal es la de compuerta o barrera regulando el paso de iones, agua y solutos al espacio paracelular y restringiendo la difusión de lípidos entre los dominios apical y basolateral. Estas uniones forman contactos focales entre las membranas plasmáticas de células vecinas parecidas a hemifusiones o “puntos de beso”, que en realidad son solo aproximaciones de las membranas plasmáticas unidas mediante proteínas transmembranales (Figura 1)<sup>10,11,12</sup>. Las UEs están compuestas por más de 40 proteínas que conectan con el citoesqueleto de actina y se agrupan en 3 familias: ocludinas, claudinas y las moléculas de adhesión de unión (JAM)<sup>13,14</sup>.

### 2.2 Claudinas

Las claudinas (Cldn) son una familia de proteínas con 4 pases transmembranales cuya región amino y carboxilo terminal se encuentran orientadas hacia el citoplasma, dejando 2 asas en la región extracelular. La primera asa se encarga de la selectividad de cargas en el flujo paracelular y funciona como correceptor viral, mientras que la segunda funciona como correceptor de toxinas bacterianas<sup>15</sup>. Se han identificado 27 miembros en mamíferos con un peso molecular de 20 a 34 kDa y, a pesar de las grandes similitudes genéticas y estructurales entre los miembros de la familia de las claudinas, es importante recalcar que mantienen un patrón de expresión específico de cada tejido<sup>15,16</sup>.



Debido a las similitudes en sus secuencias, las claudinas se han clasificado en dos grupos, las que exhiben mayor grado de homología en su secuencia, como las Cldn 1-10, 14, 15, 17 y 19, las cuales se han denominado clásicas, y las claudinas que comparten menor homología como las Cldn 11-13, 16, 18 y 20-24, y que se denominan no clásicas<sup>17,18</sup>. La región carboxilo terminal contiene un motivo de unión a dominios PDZ, lo que permite a las claudinas interactuar de una manera directa con proteínas asociadas a las uniones estrechas como ZO-1. Sin embargo ésta misma región puede interactuar con muchas otras vías de señalización, gracias a que su región carboxilo contiene varios sitios de fosforilación, lo que le permite una gran variedad de interacciones moleculares<sup>18,19</sup>.

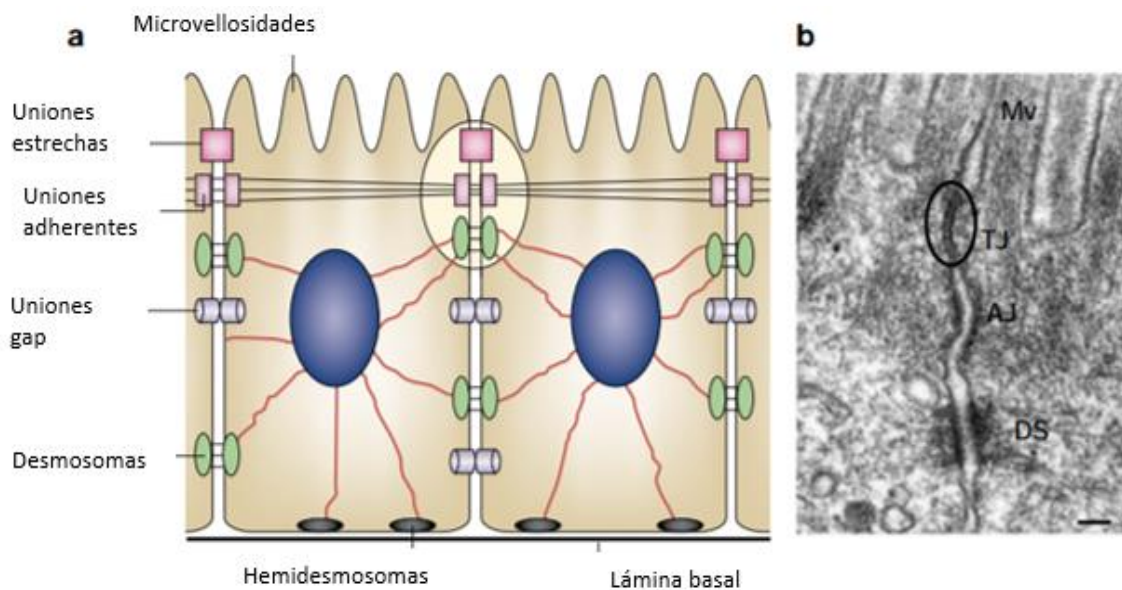


Figura 1. Distribución de las uniones celulares, por la parte apical se aprecian las uniones estrechas mientras que por la parte basal se aprecian los hemidesmosomas (Tsukita et al, 2001)

### 2.3 Cáncer gástrico

El cáncer gástrico (CG) es la quinta neoplasia más común y fue la quinta causa de muerte por cáncer a nivel mundial durante el 2020<sup>20,22</sup>. Los estadios tempranos del CG son asintomáticos, lo que lleva a una disminución de la supervivencia de los pacientes, por lo que es de suma importancia encontrar biomarcadores para la detección temprana del CG<sup>20</sup>. Se han descrito algunos factores de



riesgo como la dieta, la edad, el género, el hábito de fumar, el estatus económico, la obesidad y la alta ingesta de alimentos salados<sup>21</sup>. Sin embargo, se ha demostrado que uno de los principales factores que predisponen al desarrollo del CG es la infección provocada por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), representando el 80% de los casos en todo el mundo<sup>21,22</sup>. La infección por *H. Pylori* generalmente se contrae durante la infancia a través de la ingesta oral, lo cual puede causar una reacción inflamatoria y de no ser atendida oportunamente genera una inflamación crónica que conduce a la producción de toxinas y estrés oxidativo seguido de una rápida proliferación celular y el desarrollo de lesiones gástricas que finalmente resultan en una carcinogénesis gástrica<sup>23</sup>. Por otro lado, el daño oxidativo generado en el DNA causado por ciertas especies reactivas de oxígeno, conduce a la hipermetilación de islas CpG en las regiones promotoras de algunos genes supresores de tumores como RPRM, silenciándolos y conduciendo al inicio del cáncer<sup>24</sup>.

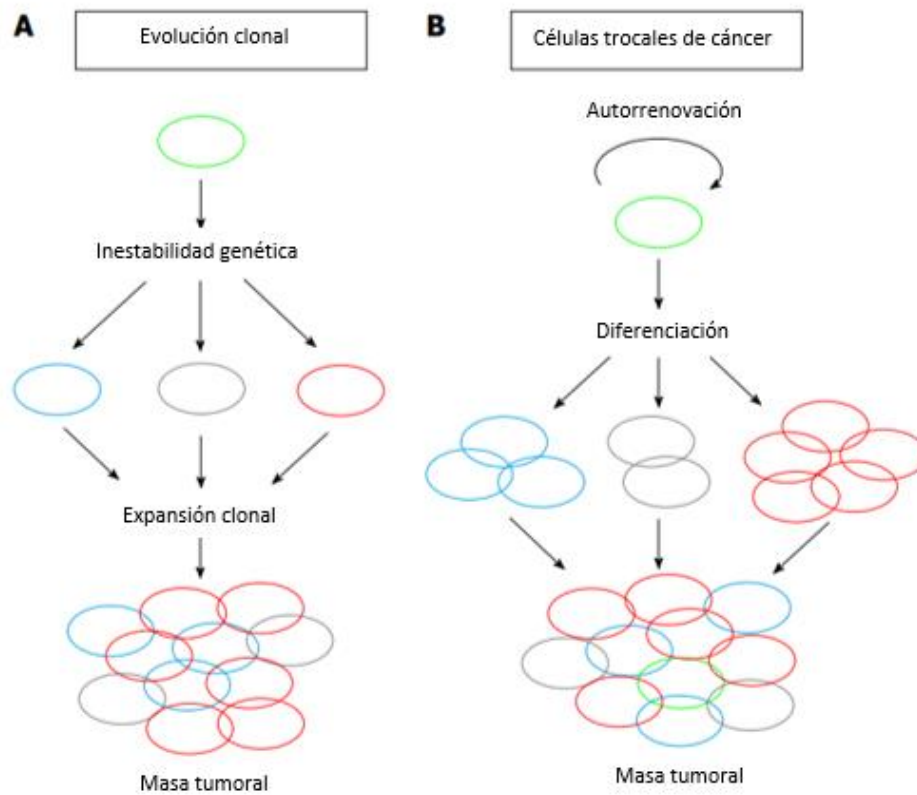
Desde un punto de vista morfológico, el CG es muy heterogéneo, lo que resulta en una alta diversidad de clasificaciones histopatológicas. La clasificación más usada es la propuesta por Lauren (1965) en la cual el CG es dividido en dos tipos: intestinal y difuso<sup>25</sup>. Los carcinomas difusos están poco diferenciados (las células presentan un aspecto muy diferente del tejido proveniente) y se encuentran compuestos por células tumorales solitarias o poco cohesivas, por el contrario, los carcinomas intestinales se encuentran bien diferenciados en su mayoría y forman estructuras glandulares que recuerdan a los adenocarcinomas colorrectales<sup>26</sup>.

A la fecha existen dos hipótesis que proponen la existencia de células troncales de cáncer (CTC) en el CG. La primera, conocida como el modelo de la evolución clonal, se menciona que la heterogeneidad celular se genera por la inestabilidad genética, posiblemente dada por mutaciones (cambios de secuencia en una sola base, fusión de genes e inestabilidad cromosómica) en el genoma, en las cuales se seleccionan células con composiciones genéticas que confieren ventajas de crecimiento y se expanden clonalmente. La segunda hipótesis, conocida como el modelo de CTC, propone que una pequeña población dentro del tumor es la que rigen la heterogeneidad celular, mediante la expansión clonal (auto renovación) generando CTC idénticas a través de divisiones asimétricas dando origen a cualquier tipo celular dentro del tumor (Figura 2)<sup>27,28</sup>. La metástasis y resistencia a fármacos se encuentran asociadas a las CTC, por lo que es de suma importancia la identificación de marcadores





relacionados a esta pequeña población para generar tratamientos más eficaces contra las células tumorales. Uno de los marcadores más conocidos es la glicoproteína transmembranal CD44, expresada en leucocitos, células endoteliales, hepatocitos, células mesenquimales y se restringe a algunas células epiteliales, la cual cumple diversos roles fisiológicos como en la adhesión a la matriz, migración celular y diferenciación<sup>29,30</sup>.



*Figura 2. Hipótesis de la existencia de las CSC. (A) En el modelo la evolución clonal la heterogeneidad se genera mediante inestabilidad genética como cambios en el número de cromosomas y mutaciones en las células tumorales. (B) En el modelo de las CTC solo una pequeña población es capaz de generar CTC idénticas y mediante divisiones asimétricas diferenciarse en cualquier fenotipo tumoral (Zhao et al, 2015)*

## 2.4 Claudina 6 y 9 en cáncer gástrico.

El gen de *cldn-6* se encuentra localizado en el cromosoma 16p13.3, contiene 5360 pares de bases y está conformado por 2 exones. Puede producir dos variantes de RNA mensajeros mediante splicing alternativo. Su expresión se da principalmente en células embrionarias de ratón del linaje epitelial durante el desarrollo temprano, tumores primitivos de células germinales como seminoma espermatocítico, coriocarcinoma y teratomas, sin embargo, su expresión es muy débil o ausente en ratones adultos<sup>30,32</sup>. *Cldn-6* regula la permeabilidad de los iones cloruro y sodio, también tiene una actividad de adhesión celular independiente de  $Ca^{2+}$ , aunque también se ha demostrado que funciona como cofactor de entrada para el virus de la hepatitis C<sup>32</sup>. Por otro lado, resulta interesante que el gen de *CLDN-6* se encuentra ubicado en la misma posición que el gen de *CLDN-9*, donde éste último se encuentra orientado en la hebra positiva. El gen de *CLDN-9* contiene 2050 pares de bases y produce un solo exón, es la *cldn* más expresada en el oído interno y cerebro, además está presente en todos los epitelios que recubren el espacio endolinfático, se requiere para preservar las células sensoriales en el órgano auditivo, ya que las uniones estrechas defectuosas de *Cldn-9* no protegen el lado basolateral de las células ciliadas de la endolinfa rica en  $K^+$ . También es uno de los cofactores de entrada para el virus de la hepatitis C<sup>33,34</sup>

La expresión anormal de las claudinas se ha reportado en diferentes cánceres epiteliales humanos, lo cual permite el paso de nutrientes y factores de crecimiento a lugares en donde normalmente no deberían estar presentes, promoviendo la proliferación de las células cancerosas<sup>35</sup>. A pesar de que se ha reportado la expresión de *Cldn-6* en múltiples cánceres humanos como los rabdoides, cáncer de mama y en cáncer gástrico, su función no se ha analizado a detalle. Un estudio mostró que la disminución en la expresión de *cldn-6* mejora el crecimiento independiente al anclaje y promueve la invasividad de células de cáncer de mama, lo que sugiere un posible papel como supresor tumoral<sup>36</sup>. Otro estudio muestra que la sobreexpresión de *Cldn-6* en una línea celular de adenocarcinoma gástrico, AGS, aumenta la migración celular<sup>35</sup> y la expresión de *Cldn-1*, lo que potencia la activación de pro metaloproteasas (MMPs)<sup>37</sup>. Por otro lado, la sobreexpresión de *Cldn-9* en células AGS también aumenta la migración celular<sup>35</sup>. La expresión de *Cldn-9* está asociada con una mayor tasa de mortalidad, para el cáncer gástrico tipo difuso (66%), comparado con el tipo intestinal (25%)<sup>38</sup>. Otro estudio mostró que en una línea celular de cáncer de pulmón, *Cldn-9* tiene una localización citosólica,



lo cual puede conducir a la metástasis en pulmón, ya que se ha demostrado que la localización de las claudinas en el citosol afecta algunos programas de señalización y transcripción de varios genes en células de cáncer<sup>39</sup>.

## 2.5 Inflamación crónica y cáncer gástrico

Se ha estimado que las enfermedades infecciosas y la inflamación crónica representa aproximadamente un 25% de los factores causantes de cáncer<sup>40</sup>. Los órganos digestivos cubren una gran parte de la superficie del cuerpo y se encuentran en contacto con el entorno exterior, por lo que además de estar habitados por muchos microorganismos, también se encuentran expuestos a alimentos o agentes químicos que son ingeridos, por lo que se encuentran infiltrados por muchas células del sistema inmune, lo que apoya la perpetuación de una inflamación crónica. Una inflamación crónica es un factor que contribuye al desarrollo de muchos tipos de cáncer, ya que es capaz de producir intermediarios potencialmente relevantes como las citocinas, quimiocinas, radicales libres (ROS, NOS), prostaglandinas, factores de crecimiento y MMPs<sup>41,42</sup>. Todos estos intermediarios son capaces de generar un microambiente que puede alterar la homeostasis celular y como en un estado inflamatorio, hay una tasa de recambio celular muy alta y el microambiente a menudo es altamente oxidativo y nitrosante, los riesgos de daño al DNA aumentan de manera significativa, promoviendo la acumulación gradual de alteraciones genéticas y epigenéticas como mutaciones puntuales, deleciones, duplicaciones, recombinaciones, la expresión de algunos microRNAs alterados y la metilación de varios protooncogenes y genes supresores de tumores<sup>43</sup>.

Resulta interesante como el sistema inmunológico es capaz de interactuar con el tumor a lo largo de su progresión ya que, por ejemplo, bajo condiciones hipóxicas los macrófagos asociados con tumores son reclutados en los sitios tumorales y a su vez, son capaces de producir citocinas y factores proangiogénicos. Esto representa un problema, ya que el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos que irriguen al tumor resulta un paso crítico en la tumorigénesis, ya que más del 90% de la mortalidad por cáncer es causada por metástasis<sup>44</sup>.



### 2.5.1 Interleucina 8

Las quimiocinas constituyen una gran familia de moléculas encargadas de la señalización polipeptídica, se encuentran relacionadas estructuralmente y son caracterizadas por su capacidad para promover la quimiotaxis de los linfocitos. La unión de las quimiocinas a sus receptores conduce a un cambio conformacional, el cual activa vías de señalización como a PI3-K, Ras y STAT3, lo que promueve la migración celular<sup>45,46</sup>. A su vez las quimiocinas y sus receptores se agrupan en 4 familias basadas en el patrón de residuos de cisteínas: CXC, CC, CX3C y C, donde la letra C representa las cisteínas y la X cualquier otro aminoácido (aa). Se han identificado aproximadamente 20 receptores y 50 quimiocinas en humanos<sup>46</sup>.

La interleucina-8 (IL-8) se identificó como un factor quimiotáctico específico de neutrófilos y posteriormente se clasificó como un miembro de la familia CXC. La IL-8 es producida por una gran variedad de células, como monocitos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos, células epiteliales y endoteliales, después de ser estimulados con IL-1, IL-17, factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) o por medio de receptores tipo toll (TLRs)<sup>47</sup>. Los efectos biológicos de la IL-8 están regulados por su unión con 2 receptores acoplados a proteínas G, CXCR1 y CXCR2. Se ha demostrado que CXCR1 y CXCR2 activan a dos miembros de las GTPasas de la familia de Rho en células endoteliales, mientras que CXCR1 induce la actividad de la GTPasa Rho, CXCR2 produce un retraso en la actividad de Rac, lo que conlleva a una polimerización del citoesqueleto de actina y una retracción del mismo, lo cual le brinda su capacidad de quimiotaxis (Figura 3)<sup>48</sup>. La IL-8 liberada por células tumorales, es capaz de funcionar de manera autocrina, lo que induce a las células de carcinoma un fenotipo mesenquimático, es decir la inducción de la transición epitelio mesénquima (TEM)<sup>49</sup>.



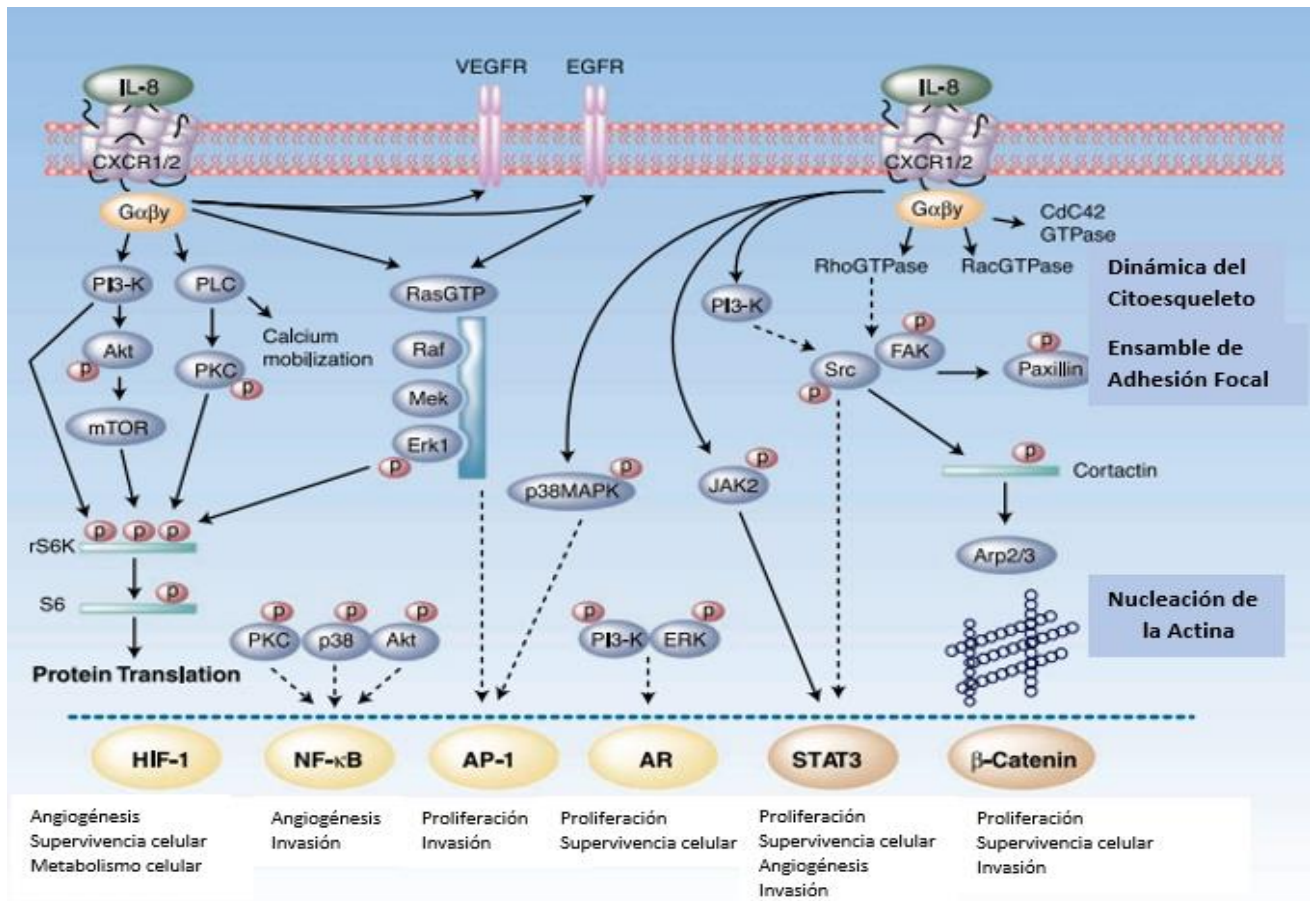


Figura 3. Vías de señalización caracterizadas para la unión de IL-8 con sus receptores CXCR1/2. Se aprecia que la mayoría de las señales desembocan en expresión de genes que ayudan a la proliferación, supervivencia y metabolismo celular, así como invasión y angiogénesis (Vaugh et al, 2008)

## 2.6 Transición epitelio mesénquima

La TEM es un proceso central que se requiere para un desarrollo embrionario normal, como en la gastrulación y en la morfogénesis tisular, pero también lo es en la reparación de heridas en adultos<sup>50,51</sup>. Sin embargo, se ha demostrado que ciertos tipos de cánceres requieren de la activación de la TEM para la progresión tumoral<sup>52</sup>. La TEM se puede dividir bajo un contexto biológico en 3 subtipos: el tipo 1 ocurre durante la embriogénesis; el tipo 2 es cuando hay una regeneración de tejidos; y el tipo 3 ocurre durante la diseminación metastásica del cáncer<sup>53</sup>. Bajo todos los contextos tisulares,



los eventos clave de la TEM son los mismos, como la pérdida de la expresión de E-cadherina, pérdida de la polaridad apical-basal, una reorganización del citoesqueleto y cambios en la forma de la célula, una regulación a la baja de la expresión de genes epiteliales y la consecuente activación de genes que ayudan a definir el fenotipo mesenquimático; aumento de protuberancias celulares, motilidad, y en muchos casos, la capacidad de degradar proteínas de la matriz extracelular (MEC)<sup>54,55</sup>. La TEM se encuentra orquestada por al menos 4 fundamentales redes regulatorias: (1) control transcripcional, (2) regulación de RNAs pequeños no codificantes, (3) *splicing* diferencial, y (4) control traduccional y postraduccional<sup>56</sup>. Durante la TEM existe un cambio de E-cadherina a N-cadherina, la cual es expresada en células mesenquimales, por lo que es uno de los principales marcadores de la TEM: sin embargo también se han caracterizado varias redes que regulan el proceso. Estas involucran varios factores transcripcionales asociados a la TEM tales como, las familias con motivos dedos de zinc SNAIL y TWIST, además de la familia ZEB, los cuales pueden ser activados bajo diferentes tipos de estrés, como hipoxia, inflamación y estrés oncogénico o metabólico, a través de diferentes vías de señalización que son críticas para el desarrollo embriológico y el desarrollo tumoral, incluida la señalización de TGF- $\beta$ , WNT, HIF, RAS/MAPK, NOTCH, NF-Kb<sup>56,57,58,59</sup>.

Se ha reportado la pérdida de la expresión de E-cadherina en varios tipos de cánceres, incluidos los carcinomas colorrectales avanzados, adenocarcinomas esofágicos, cánceres gástricos, entre otros<sup>60</sup>. Esto lleva a las células a tener un menor contacto célula-célula y reduce su polaridad, aumentando su potencial invasivo y metastásico. Los mecanismos por los cuales se ha demostrado que la expresión de E-cadherina se deja de expresar incluyen mutaciones genéticas, hipermetilación del promotor, remodelación de la cromatina, modificaciones postraduccionales y represión transcripcional. Las proteínas que se encuentran mayormente implicadas en la represión transcripcional son, Snai1 (Snail), Snai2 (Slug) y Twist, ya que se ha demostrado que se pueden unir a las secuencias E-box en el promotor de E-cadherina (CDH-1), reprimiendo así su expresión (Figura 4)<sup>60,61,62</sup>.



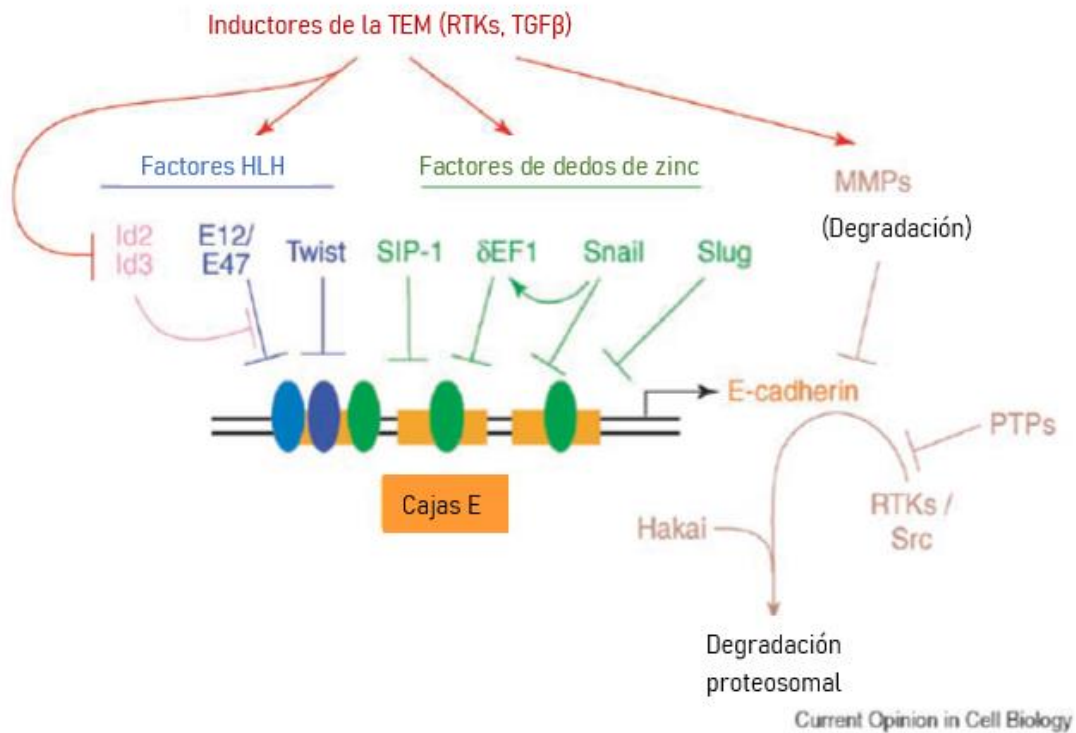


Figura 4. Regulación de la expresión y estabilidad de E-cadherina durante la TEM inducida por diversos factores. Se aprecian las familias de proteínas con motivos dedos de zinc Snail, Twist, entre otros, los cuales son capaces de unirse en las secuencias E-box del promotor de E-cadherina y reprimir su expresión. (Huber et al, 2005).

### 2.6.1 Snail

La familia Snail en mamíferos codifica para 3 factores transcripcionales altamente relacionados entre sí: Snail1 (Snail), Snail2 (Slug) y Snail3 (Smuc). Los 3 miembros contienen una región C-terminal altamente conservada que alberga un dominio de unión al DNA de 4 a 6 dedos de zinc, los cuales son específicos para las secuencias E-box C/A (5'-CACCTG-3') y un dominio SNAG en la región N-terminal, el cual se piensa que facilita la función predominantemente represiva de las proteínas de la familia Snail<sup>63,64</sup>. En embriones de *Drosophila melanogaster*, Snail se expresa inicialmente en el mesodermo prospectivo, donde actúa como represor para inhibir la expresión de genes neuroectodérmicos. Además de su función en el mesodermo, en mamíferos se ha relacionado con el desarrollo de la cresta neural<sup>65</sup>.



Si bien el comportamiento migratorio e invasivo inducido por Snail en células durante el desarrollo embrionario es vital para el mismo, también puede volverse problemático cuando es activado de forma aberrante en etapas posteriores, especialmente en casos patológicos como el cáncer<sup>65</sup>. Se ha demostrado que la expresión de Snail correlaciona con el grado tumoral y la metástasis, y que la sobreexpresión de Snail es indicativo de una mal prognosis en cáncer de mama, además también se demostró que en cáncer gástrico de tipo difuso existe una expresión muy reducida de E-cadherina y que los niveles de expresión de Snail1 comparten una relación a la inversa con E-cadherina, mientras que en el tipo intestinal no se detecta la expresión de Snail<sup>67,68,69</sup>. La expresión del gen de E-cadherina (*CDH-1*) se encuentra modulada por varios represores transcripcionales, uno de los principales es Snail, el cual es capaz de unirse a su promotor en la secuencia E-box (5'-CANNTG-3'), reprimiendo así su expresión y consecuentemente induciendo la TEM, sin embargo se ha demostrado que también es capaz de prevenir la expresión de genes epiteliales específicos como PTEN, Muc1, Claudinas y Ocludinas<sup>70</sup>. Esto se debe a que existe una amplia gama de vías de señalización que se encuentran involucradas en la expresión de Snail1 y Snail2 incluidas la del TGF- $\beta$ , Notch y la vía de Wnt, especies reactivas de oxígeno y estrés por hipoxia<sup>71,72</sup>.

## 2.6.2 Twist

Twist pertenece a la familia de factores de transcripción hélice-bucle-hélice básica (bHLH) junto con la familia de Snail. En vertebrados existen dos genes que codifican a dos proteínas Twist con una similitud de 90%, llamadas Twist-1 (*TWIST*) y Twist-2 (*DERMO-1*). En ratones, Twist se expresa en el mesodermo, las somitas, el mesénquima craneal, la yema de los dientes y los tejidos sutúrales del cráneo. Los ratones deficientes de Twist, mueren en el día embrionario 11.5 debido a un fallo en el cierre del tubo neural y por defectos en el mesénquima de la cabeza, somitas y brotes de las extremidades<sup>73,74,75</sup>. La expresión de Twist es inducida por el factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) durante la embriogénesis, por el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), por el factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ) y por la vía de señalización Wnt<sup>76</sup>. La proteína Twist humana está compuesta por 202 residuos de aa y contiene muchos motivos funcionales, como la proteína de unión





p300/CREB (aa 30-64), además es capaz de formar una dimerización con proteínas asociadas como E12 y E47, las cuales tienen un papel importante durante la hematopoyesis y en la neurogénesis<sup>77</sup>.

Se ha reportado una sobreexpresión de Twist-1 en una gran variedad de tumores, como en el cáncer de mama, próstata, pulmón, piel, hígado, carcinomas gástricos, melanomas, osteosarcomas y rhabdomyosarcomas, y debido a que su expresión se encuentra asociada con su capacidad para promover la TEM, ésta correlaciona con un mal pronóstico clínico, ya que es capaz de reprimir la expresión de E-cadherina uniéndose directamente a su promotor en la secuencia E-box (5'-CANNTG-3'), aumentando su capacidad metatásica<sup>78,79</sup>. También se ha demostrado que Twist es capaz de silenciar indirectamente la expresión de E-cadherina reclutando la metiltransferasa SET8, la cual se encarga de metilar histonas para silenciar genes, esto a su vez conlleva a un incremento de la expresión de marcadores mesenquimales como N-cadherina y Vimentina<sup>80,81</sup>. Estudios han demostrado que Twist-1 también se encuentra involucrada en otras etapas durante la invasión tumoral y el proceso de metástasis, como en la formación de invadopodia, la migración intravascular, la extravasación y en la formación del mimetismo vasculogénico, ya que encuentran implicadas múltiples vías de señalización que involucran a Twist durante el proceso de metástasis (Figura 5)<sup>82,83</sup>. Por si fuera poco, se ha demostrado que las proteínas Twist también tienen la capacidad para anular la senescencia y la apoptosis inducidas por oncogenes<sup>84</sup>. Twist también desempeña un papel vital para la generación de resistencia a fármacos en diferentes tipos de cáncer, ya que se ha observado que, bajo tratamientos con quimioterapia, aumenta la expresión de Twist y varios transportadores de membrana dependientes de ATP como los transportadores ABC (los cuales aumentan la salida del fármaco de las células, reduciendo la concentración intracelular del mismo). Curiosamente, se ha identificado un sitio de unión para Twist en los promotores de los transportadores ABC<sup>85</sup>.



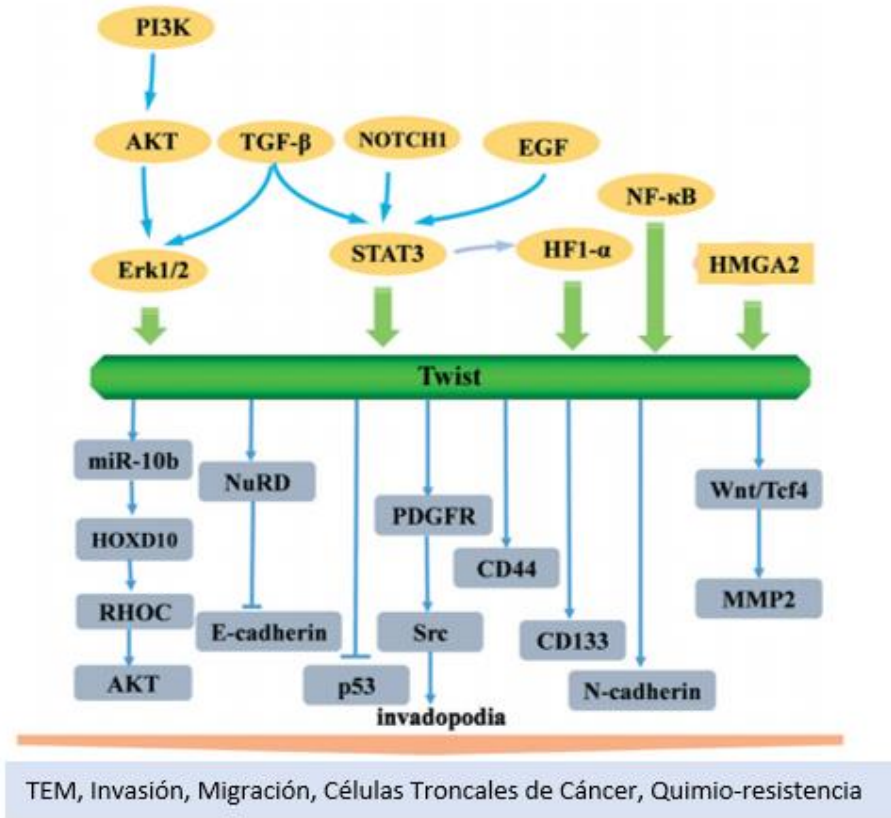


Figura 5. Vías de señalización para Twist involucradas durante la invasión tumoral y la metástasis. Se observa que Twist promueve la formación de invadopodia, la migración celular y la invasión, además de la expresión de genes relacionados a la TEM como N-cadherina y CD44. (Pei et al, 2017).

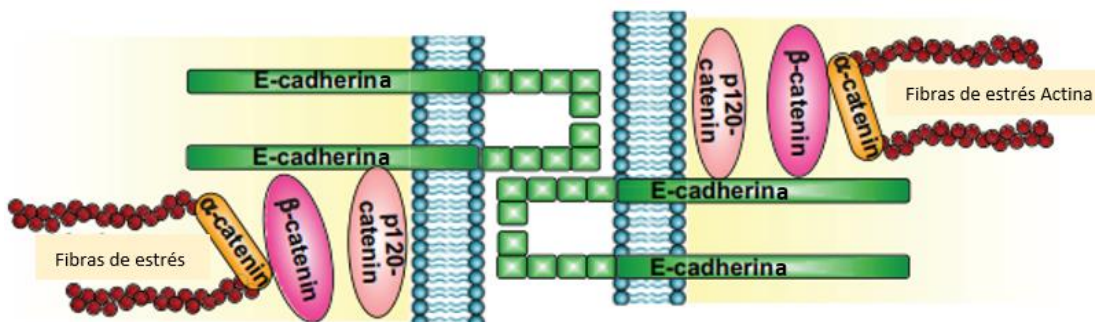
### 2.6.3 E-cadherina

Las cadherinas clásicas son moléculas de adhesión que se componen de glicoproteínas transmembranales que contienen: 5 dominios extracelulares dependientes de calcio que confieren interacciones homotípicas; una cola citoplasmática que permite la unión a varios efectores para la transducción de señales a la célula como catenina p120; y la parte carboxilo terminal la cual se une directamente a  $\beta$ -catenina, que a su vez, se une a  $\alpha$ -catenina que media un enlace dinámico al citoesqueleto de actina (Figura 6)<sup>86,87</sup>. El gen E-cadherina (*CDH1*) se encuentra en el cromosoma 16q22.1 y su región génica comprende 16 exones con un tamaño entre 115 y 2245 pb y 15 intrones, llegando así a los 100kb de largo<sup>88</sup>.



La expresión de E-cadherina o su localización en la superficie celular a menudo se pierde en tumores avanzados y se ha vinculado, al menos en algunos casos, a una mayor incidencia de metástasis y recurrencia tumoral, ya la pérdida de la expresión de E-cadherina es un evento clave de la TEM por lo que, la pérdida de las uniones homofílicas entre las E-cadherinas permite que las células se disocien del tumor primario, invadan los tejidos circundantes y migren a sitios distantes para así establecer tumores metastásicos<sup>89,90</sup>. La pérdida de la expresión de E-cadherina se debe principalmente al silenciamiento transcripcional del promotor de E-cadherina por hipermetilación o desacetilación de histonas, o por la sobrerregulación de los represores transcripcionales como Snail, Slug, Zeb-1 y Twist, los cuales pueden bloquear directamente el promotor de E-cadherina<sup>89,91</sup>.

Recientemente se ha postulado que el papel de la E-cadherina en la carcinogénesis no se limita solo a la metástasis y la invasión, sino que también juega un papel importante en la modulación de la señalización intracelular y, por lo tanto, en la promoción del crecimiento celular, ya que se encuentran involucradas varias vías de señalización incluidas la vía de Wnt, las GTPasas de la familia Rho y se cree que el EGFR juega un papel activo durante el proceso de la TEM<sup>92,93</sup>. En la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina, las  $\beta$ -cateninas libres pueden acumularse en el citoplasma, trasladándose posteriormente al núcleo, donde se une a los miembros de la familia TCF/LEF1 y activa la expresión de los genes blanco de Wnt, incluido el CD44, MYC, ciclina D1 y MMP-7<sup>93</sup>.



*Figura 6. E-cadherina. Representación esquemática de las uniones célula-célula mediadas por E-cadherina, la cual es una proteína transmembranal de un solo cruce transmembranal, cuyo dominio extracelular se compone de 5 dominios de unión a  $Ca^{2+}$  y media interacciones homofílicas específicas con las células vecinas. (Canel et al, 2013)*



#### 2.6.4 N-cadherina

La cadherina neural (N-cadherina) es una cadherina clásica de 130 kDa localizada en las uniones adherentes y expresada en el sistema neural, y al igual que todas las cadherinas clásicas, cuenta con 5 dominios extracelulares los cuales contienen sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  y determinantes moleculares que son necesarios para la formación de enlaces homofílicos, seguidos por un dominio transmembranal de un solo paso y 2 dominios de unión a cateninas bien conservados en su porción citoplasmática<sup>94,95,96</sup>. A diferencia de otras cadherinas que solo pueden formar enlaces homofílicos, la N-cadherina puede formar dímeros cis y trans-heterofílicos con R-cadherina (retiniana)<sup>97</sup>. Durante la embriogénesis, la expresión de N-cadherina es detectable por primera vez durante la gastrulación en las células de la línea primitiva, ya que se someten a una TEM y se encargan de formar el mesodermo. La regulación de la expresión de N-cadherina a la alta en estas células, es paralela a la regulación hacia la baja de la E-cadherina, un fenómeno conocido como el interruptor de la E a la N-cadherina<sup>97</sup>. La N-cadherina se encuentra expresada fuertemente en el ectodermo neural y en general, el patrón de expresión durante la embriogénesis parece correlacionarse con los cambios en la forma y motilidad de las células, lo que sugiere un papel potencial en la transición del fenotipo epitelial a mesenquimal<sup>98</sup>.

La N-cadherina se expresa con frecuencia en varios tipos de tumores: carcinomas pobremente diferenciados, melanomas, neuroblastomas y mieloma múltiple. El mecanismo por el cual una mayor expresión de N-cadherina promueve la malignidad no está del todo dilucidado, sin embargo numerosos estudios han demostrado que la pérdida de E-cadherina y la expresión aberrante de N-cadherina hacen que las células tumorales pierdan su polaridad, resistan la apoptosis, se vuelvan invasivas y metastásicas<sup>99</sup>. Además de modular estas características, N-cadherina también promueve la metástasis al facilitar las interacciones con el endotelio (que a su vez también expresa VE-cadherina y N-cadherina) permitiendo que las células tumorales accedan a la vasculatura. Otro estudio muestra que N-cadherina también está involucrada en la angiogénesis y en el mantenimiento de la estabilidad de los vasos sanguíneos<sup>99,100</sup>. Estudios *in vitro* han demostrado que las células de melanoma, que expresan N-cadherina, se adhieren y migran sobre los fibroblastos y este fenómeno es inhibido por anticuerpos que bloquean la función de la N-cadherina<sup>97</sup>.



## 2.7.- Metástasis

El término metástasis es utilizado para describir el proceso de propagación de las células cancerosas desde el tumor primario hacia tejidos circundantes y órganos distantes, y es la causa principal de morbilidad y mortalidad por cáncer<sup>101</sup>. Las metástasis son resultado de un conjunto de procesos complejos y de varios pasos denominados colectivamente la cascada de invasión-metástasis. Esta cascada incluye 7 pasos principales: (1) Las células tumorales invaden localmente a través de la MEC circundante y las capas de células estromales, (2) intravasan hacia el lumen de los vasos sanguíneos, (3) sobreviven a los rigores del transporte a través de la vasculatura, (4) se detienen en sitios de órganos distantes, (5) extravasan en el parénquima de tejidos distantes, (6) inicialmente sobreviven en estos microentornos externos para formar micrometástasis, y (7) reinician sus programas proliferativos en sitios metastásicos, generando así crecimientos neoplásicos macroscópicos, clínicamente detectables. Afortunadamente, la metástasis se conoce como un proceso muy ineficiente ya que muy pocas de las células tumorales primarias liberadas en la circulación se convierten en metástasis, esto es debido a la muerte de las células tumorales durante la circulación sanguínea, causada por la exposición al estrés, las fuerzas hemodinámicas y al ataque inmunitario de las células efectoras citotóxicas.<sup>102-105</sup>

En muchos tumores primarios con propiedades invasivas, la adherencia intercelular se reduce, a menudo debido a una pérdida de la expresión de E-cadherina, generalmente por la activación de los represores transcripcionales Snail, Zeb1 y Twist, sin embargo también se puede reducir la expresión por mutaciones que resultan en una proteína inactiva, silenciamiento génico por la metilación del promotor o regulación por disminución estimulada por los receptores de factores de crecimiento<sup>106,107</sup>. Como se mencionaba anteriormente, la pérdida de la expresión de E-cadherina, es uno de los marcadores más utilizados para la TEM, donde las células que pasan por este complejo proceso sufren cambios que se asocian con una mayor migración y resistencia a la anoikis (muerte celular programada inducida por la pérdida del anclaje de la célula con la matriz extracelular o células vecinas)<sup>108</sup>. Además de ser más migrativas, las células que se encuentran bajo una TEM muestran otras propiedades asociadas con la progresión del cáncer y la metástasis<sup>109</sup>. El programa de TEM confiere a las células epiteliales, tanto normales como neoplásicas, las propiedades críticas para la invasión y la diseminación metastásica, especialmente una motilidad aumentada y la capacidad de degradar los componentes de la MEC.



Aunque algunos modelos tradicionales de tumorigénesis afirman que la metástasis es un evento tardío durante la progresión tumoral, algunos estudios han demostrado que la adquisición de los rasgos asociados a la TEM y el proceso de diseminación puede ocurrir en eventos muy tempranos de la progresión tumoral<sup>109,110</sup>. Por otra parte, también se ha demostrado que las células troncales de cáncer EpCAM+, CD24- y CD44+, expresan en un nivel bajo algunos genes asociados con la TEM, mientras que células madre ALDH+ tienen un fenotipo epitelial y se encuentran más asociadas con un estado de autorenovación. Estas CTC tienden a permanecer en un estado de transición entre fenotipos epiteliales y mesénquimales, lo cual sugiere que este fenómeno de plasticidad desempeña un papel clave en la capacidad de las CTC para hacer metástasis<sup>111</sup>.

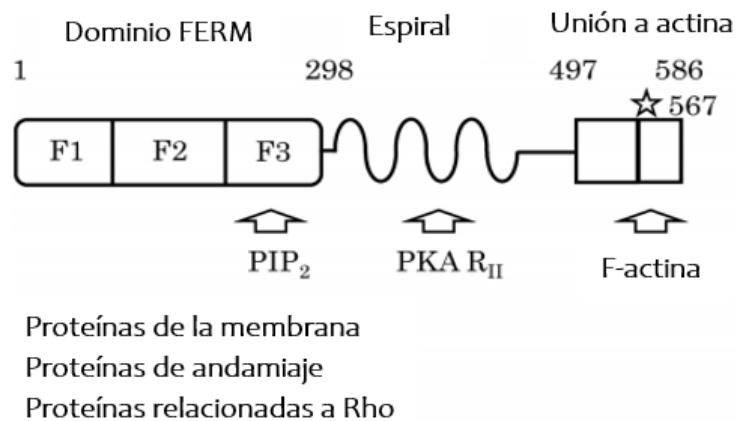
Las células tumorales son capaces de migrar como células individuales o como grupos multicelulares. Las células que migran individualmente suelen emplear rasgos mesenquimales de migración con dinámica de adhesión mediada por interacciones integrina-matriz extracelular caracterizada por la generación de altas fuerzas de tracción, el uso de proteasas para la escisión de la MEC y la formación de contactos focales en sitios de agrupamiento de integrinas. Por otro lado, se ha sugerido que la migración colectiva en cáncer es potencialmente la forma clínicamente predominante durante la metástasis. La migración colectiva es distinta de la migración individual, principalmente en que se requiere una cohesión célula-célula, polarización colectiva de células y coordinación de la actividad del citoesqueleto. Las células líderes guían el agregado multicelular por la degradación proteolítica de la MEC en el frente y arrastrando las células del borde interno y posterior. Las células pueden migrar colectivamente utilizando una variedad de modos que incluyen los filamentos, el modelo de esferoides o el modelo organoide de migración colectiva<sup>112-115</sup>.

### 2.7.1.- Proteínas ERM

Las proteínas Ezrina, Radixina y Moesina (ERM) son altamente homólogas y pertenecen a la superfamilia FERM, cuyo miembro organizador es la banda cuatro punto uno (4.1), debido a que sus secuencias de aa se conservan dentro de las proteínas ERM y la proteína 4.1 de eritrocitos. Se concentran en las estructuras de la superficie celular como, microvellosidades, filopodios, urópodos,



fibras de retracción y sitios de adhesión celular. Dentro de esta superfamilia, los miembros comparten un dominio común, el dominio FERM (4.1, ERM), el cual se encuentra altamente conservado (85%) y que en la mayoría de los casos media su asociación con proteínas integrales de la membrana celular, proteínas de andamiaje, proteínas Rho y al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>). El dominio FERM de aproximadamente 1-296 residuos de aa también es conocido como dominio de asociación ERM al extremo N-terminal (N-ERMAD) a través del cual pueden interactuar con las proteínas de las membranas celulares<sup>116-118</sup>. A su vez el dominio FERM se compone de tres módulos estructurales (F1, F2 y F3), también denominados subdominios A, B y C. Este dominio es seguido por una región larga con una alta propensión hacia la conformación  $\alpha$ -helicoidal ( $\sim$  200aa), el cual juega un papel clave en la activación de estas proteínas, además también es importante para la asociación con PKA. Las proteínas ERM terminan en un dominio C-terminal (C-ERMAD) el cual consta de 107 residuos de aa, y contiene el sitio de unión a los filamentos de actina, a través del cual las proteínas ERM son capaces de interactuar con el citoesqueleto de actina (Figura 7)<sup>119,120</sup>.



*Figura 7. Estructura de las proteínas ERM. El extremo N-terminal consiste de tres módulos F1, F2 y F3 (dominio FERM), y se encuentra vinculado a través de una estructura  $\alpha$ -helicoidal al dominio de unión a los filamentos de actina en el extremo C-terminal (Kawaguchi et al, 2017).*



El dominio C-terminal de las proteínas ERM puede unirse al dominio FERM (extremo N-terminal) de la misma molécula a través de la autoasociación, para formar un monómero, o con otra proteína ERM para un homo o heterodímero. Esta interacción intramolecular conduce a una conformación cerrada o interacción cabeza-cola, y el consiguiente enmascaramiento de los sitios de unión de la membrana y la actina, lo que resulta en la inactivación de las proteínas. Las proteínas ERM permanecerán en esta conformación inactiva hasta que el dominio FERM se una al fosfatidilinositol (4,5) bifosfato, que se encuentra en la membrana celular, lo que hace que el residuo de aa de treonina conservado T567, T564 y T558, para Ezrina, Radixina y Moesina respectivamente sea más accesible para su fosforilación, permitiendo que adquiera su conformación abierta y por lo tanto su forma activa<sup>117,121</sup>. Varias cinasas en células de vertebrados pueden fosforilar ERM en esta treonina reguladora, que incluye la cinasa RhoA, PKC $\alpha$ , PKC $\theta$ , NIK, Mst4 y LOK<sup>122</sup>.

Como se mencionó anteriormente, las proteínas ERM son capaces de interactuar a través de sus dominios FERM con tres tipos de proteínas: proteínas transmembranales, proteínas de andamiaje y moléculas de señalización. Alguna de las interacciones directas entre las proteínas ERM y proteínas transmembranales, incluyen receptores de adhesión. Se encontró que el dominio N-terminal de las proteínas ERM se unía directamente al dominio citoplásmico del receptor de hialuronato CD44, mientras que las proteínas ERM de longitud completa se unían solo en condiciones bajas en sal o en presencia de fosfoinositidos, especialmente PIP2<sup>123-125</sup>. Aunque también se ha demostrado que pueden unirse a otras proteínas de adhesión como CD43, ICAM-2 tanto en linfocitos T como en células NK (Figura 8)<sup>125,126</sup>

Las proteínas ERM se han caracterizado principalmente por su papel en la morfogénesis epitelial, adhesión y migración, tres eventos clave, que al ser alterados pueden participar en la inducción de un fenotipo canceroso. Vale la pena mencionar que una regulación a la baja o a la alta en la expresión de las proteínas ERM, también causa defectos en la posición de los cromosomas y esto puede dar lugar a células cancerosas aneuploides, debido a que se sabe que las proteínas ERM también participan en la rigidez de la corteza celular durante la mitosis, facilitando la morfogénesis del huso mitótico<sup>117,126,127</sup>. Otra forma en que las proteínas ERM se encuentran involucradas en el crecimiento tumoral, es mediante la alteración de vías de señalización involucradas en la supervivencia y





proliferación celular como las MAPK<sup>128</sup>. Se ha demostrado que la sobreexpresión de la proteína Ezrina conduce a un mayor potencial metastásico en el osteosarcoma, el carcinoma hepatocelular, cáncer de mama, cáncer de pulmón y en cáncer pancreático. También se ha demostrado que la Moesina es capaz de promover la metástasis en ciertos tipos de cáncer, por ejemplo, en cáncer cervicouterino promueve la metástasis a través de la vía Rho/ROCK. Se han encontrado mayores niveles de Moesina y Radixina en tumores pancreáticos que habían metastatizado hacia los ganglios linfáticos, en comparación con los cánceres que no hacían metástasis<sup>129</sup>.

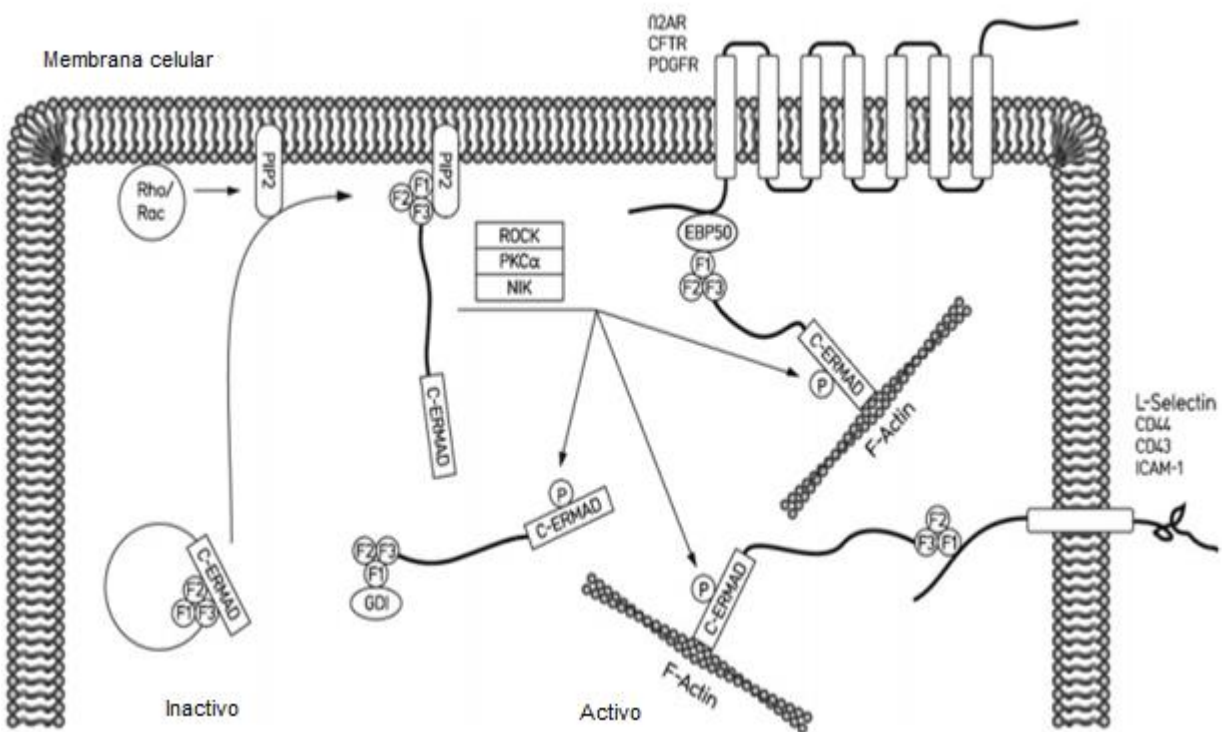


Figura 8. Activación de las proteínas ERM. Las proteínas ERM deben interactuar a través de su dominio FERM con PIP2, seguido de una fosforilación en el residuo de treonina conservado en el extremo C-terminal. La proteína activada de forma estable, puede vincularse con los filamentos de actina, a proteínas de adhesión celular (CD44, CD43 e ICAMs) y a proteínas GDI que regulan las funciones de proteínas pequeñas que se unen a GTP (Niggli et al, 2008).



## 2.7.2.- Ezrina

La proteína Ezrina es un miembro de la familia ERM, aunque también es conocida como cytovillin, p81, 80k y villin-2. El gen de la proteína Ezrina cuenta con 13 exones y se ha mapeado en el cromosoma 6. Se ha demostrado que su mayor expresión dentro de las células se concentra en las proyecciones de la superficie como en las microvellosidades, en los bordes de las células en expansión y en filopodios. Ezrina también puede localizarse en los surcos de escisión durante la citogénesis y dentro de las uniones célula-célula, esto indica donde se encuentra remodelando la red del citoesqueleto junto con la modificación de las moléculas de adhesión, esto confirma su papel como regulador de la morfología celular y la unión celular<sup>123,130</sup>.

Diversos estudios han demostrado que Ezrina puede existir tanto en su forma activa como inactiva, ya que es capaz de plegarse, asociando el dominio C-ERMAD con la región  $\alpha$ -helicoidal, seguida de una segunda asociación del dominio N-FERM/C-ERMAD de cualquier miembro de la familia ERM, lo que enmascara los sitios de unión a los filamentos de actina e impide la oligomerización espontánea. Cuando Ezrina está en el citoplasma, se encuentra en su forma inactiva y es necesaria la interacción con PIP2 en la membrana plasmática para su correcta activación, lo cual provoca un cambio conformacional, alterando la interacción de N-FERM/C-ERMAD de las proteínas ERM. Una vez unido a PIP2, se desenmascara el aa Thr567 para su posterior fosforilación y el dominio de unión a actina del extremo C-terminal queda libre para interactuar con el citoesqueleto. Múltiples cinasas son capaces de alterar la función de Ezrina, en particular a través de la fosforilación en los residuos de Ser66, Tyr81, Tyr145, Tyr353, Tyr477 o Thr567. Es importante destacar que se ha demostrado que la fosforilación en la Thr567 aumenta la capacidad de Ezrina para interactuar con los filamentos de actina e inhibir el regreso a su forma inactiva, a este proceso de activación se le ha denominado el modelo de dos pasos. Se ha encontrado un sinnúmero de cinasas que son capaces de fosforilar el residuo de treonina C-terminal de las proteínas ERM, como los son la proteína cinasa C (PKC)  $\alpha$ , PKC $\theta$ , las cinasas Rho/ROCK, el receptor de cinasa 2 acoplado a proteínas G (GRK2), Cdc42 y la cinasa de interacción Nck (NIK)<sup>131-133</sup>.

Aunque Ezrina se expresa en la mayoría de los tejidos normales y cancerosos, su expresión es significativamente mayor en los cánceres de origen mesenquimal. Varios trabajos han mostrado que la sobreexpresión de Ezrina aumenta de manera significativa la migración del melanoma metastásico, en



las células de cáncer de páncreas y en carcinoma hepatocelular. Por otro lado, el silenciamiento o la inhibición de Ezrina contribuye en la disminución de la motilidad celular. La distribución anormal de Ezrina se ha correlacionado con un mal pronóstico de los pacientes con cáncer de mama, donde se ha encontrado que Ezrina se reubica de las regiones apicales observadas en líneas celulares no tumorigénicas, hacia proyecciones móviles en líneas celulares invasivas y en el citoplasma de tumores de mama; esta localización aberrante promueve la adquisición de una TEM. Además, otro estudio demostró que durante la migración celular como en el caso de la cicatrización de heridas, Ezrina no solamente se localizó en las protuberancias de membrana de las células epiteliales migratorias, sino que también promovió la formación de las mismas<sup>117,119,134</sup>. Otro estudio demostró que, en cáncer de próstata, c-Myc induce la invasión celular y un crecimiento independiente de anclaje celular, regulando la expresión de Ezrina en presencia de andrógenos. Resulta curioso, como la propia Ezrina, a través de un circuito de retroalimentación positivo que involucra la vía de señalización PI3K/AKT puede regular los niveles de expresión de c-Myc, siendo crucial para los procesos de invasión y migración celular. Sin embargo, la implicación de Ezrina en el cáncer también se debe a las principales moléculas relacionadas con procesos metastásicos, como el caso de CD44, el cual es un receptor transmembranal multifuncional implicado en la invasión de células tumorales y la metástasis. CD44 interactúa con Ezrina durante la migración, la adhesión celular, la progresión tumoral y la metástasis.<sup>126,135</sup>.

### 3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha reportado una expresión anormal de las claudinas en diferentes tipos de cánceres epiteliales humanos, permitiéndoles un pasaje de nutrientes y de factores de crecimiento, promoviendo así su proliferación<sup>35</sup>. En un estudio *in vitro* utilizando células derivadas de cáncer gástrico se observó que la sobreexpresión de Cldn-6 aumenta la migración celular, sin embargo el aumento es considerablemente mayor al sobreexpresar Cldn-9<sup>35</sup>. Un estudio utilizando biopsias de pacientes con cáncer gástrico mostró que la sobreexpresión de Cldn-9 se encuentra asociada con una mayor tasa de mortalidad, ya que para el cáncer de tipo difuso la expresión fue de 66% y para el tipo intestinal de 25%<sup>38</sup>. Trabajos recientes confirman una expresión citosólica de Cldn-9 en una línea celular de cáncer



de pulmón, lo cual se asoció como un elemento importante para conducir a metástasis de pulmón. Esto demuestra que la localización de las claudinas en el citosol también afecta algunos programas de señalización y la transcripción de varios genes en células de cáncer<sup>39</sup>. Por otro lado, durante la TEM ocurre una reorganización del citoesqueleto y cambios en la forma de las células, una regulación a la baja de la expresión de genes epiteliales y la consecuente activación de genes que ayudan a definir el fenotipo mesenquimal, un aumento de protuberancias celulares, motilidad, y en muchos casos, la capacidad de degradar proteínas de la matriz extracelular<sup>54,55</sup>. Considerando todos los cambios que ocurren durante la TEM resulta interesante que la sobreexpresión de Ezrina aumenta de manera significativa la migración celular, además se ha observado que la distribución anormal de Ezrina correlaciona con un mal pronóstico, ya que de expresarse en las regiones apicales en líneas celulares no tumorogénicas, su expresión se modifica hacia el citoplasma y a proyecciones móviles como los filopodios en líneas celulares invasivas, además de que esta localización aberrante resulta en la adquisición de un TEM<sup>17,119,134</sup>. Por lo cual resulta interesante estudiar si la sobreexpresión de Cldn-6 o Cldn-9 se encuentra relacionada con una expresión anormal de Ezrina durante la TEM y dilucidar los procesos de migración e invasividad involucrados.

#### 4.- JUSTIFICACIÓN

La TEM conlleva a procesos de migración e invasividad favorecidos por cambios en la membrana celular como el aumento en la formación de protuberancias móviles como filopodios<sup>119,134</sup>, la capacidad de degradar proteínas de la MEC y la regulación del fenotipo mesenquimal a través de citocinas como la IL-8. La participación de Ezrina y de las claudinas 6 y 9 en estos procesos está bien documentada sin embargo no hay estudios que muestren una relación directa entre estas proteínas. El presente trabajo pretende determinar si la expresión de Ezrina es regulada por los cambios de expresión en las claudinas 6 o 9.



## 5.- HIPÓTESIS

Si la expresión de Ezrina está regulada por las claudinas 6 o 9, entonces se activará y redistribuirá a la membrana celular cuando haya un aumento en la expresión de estas claudinas.

## 6.- OBJETIVO

- Demostrar que la sobreexpresión de Cldn-6 o 9 en células AGS induce un incremento en la expresión de Ezrina durante la TEM.

## 7.- OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la expresión de Ezrina y marcadores de TEM en células AGS
- Inducir la TEM en células AGS mediante tratamiento con IL-8
- Determinar la participación de Ezrina en la migración celular
- Determinar si Ezrina sufre un cambio de ubicación del citoplasma hacia los filopodios durante la migración.

## 8.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1.- Cultivo de la línea celular AGS

La línea celular AGS fue cultivada en cajas petri P100 con 7ml de medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biowest), 2mM de L-glutamina (Biowest), 100 U/mL de anti-anti (penicilina-estreptomicina (Biowest )) y 2mM de piruvato de sodio (Corning). Los cultivos se realizaron dentro de una campana de flujo laminar y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se mantuvieron en observación cada 24h con la ayuda de un microscopio invertido, el medio se



retiró y se cambió cada tercer día después de dos lavados de 5mL con buffer de fosfatos (PBS) a un pH de 7.2. Cuando las células llegaron a una confluencia de 90-95% se despegaron de la caja petri incubándolas durante 5 minutos con la ayuda de 1ml de tripsina (Gibco) 1x por caja. Se centrifugaron a 1500 RPM durante 5 minutos y el botón celular se resuspendió en 1ml de DMEM. Las células se contaron con la ayuda de una cámara de Neubauer y se agregaron las células requeridas en nuevas cajas petri.

Las células AGS se transfectaron con el vector pmaxGFP-Cldn6 y pmax-Cldn9 (amaxa), se digirió el vector con la enzima *AflIII* (new England) durante 19h y se corroboró la completa linealización del vector por gel. Se utilizaron 5µL de lipofectamina 2000 (Invitrogen) y 2.5µg de DNA. Se demostró la correcta transfección mediante PCR (Medrano, P.A. (2018). Efecto de la sobre expresión de Claudina-6 y -9 en células troncales de adenocarcinoma gástrico [Tesis de licenciatura, UNAM] Repositorio de tesis TESIUNAM. <http://132.248.9.195/ptd2018/septiembre/0780071/Index.html>).

Para el cultivo de las células transfectadas con Cldn-6 y Cldn-9 (AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-9) se adicionó geneticina (500µg/mL) por cada ml de medio para mantener la selección de las células.

## 7.2.- Separación celular activada por fluorescencia (FACS)

La línea celular AGS se había transfectado con anterioridad con un vector con el que se sobreexpresaba a Cldn-6 o a Cldn-9 como una proteína de fusión a GFP. Sin embargo las células transfectadas con Cldn-6 no expresaban el patrón de distribución esperado (ubicada en la membrana y en citoplasma), por lo que fueron sometidas a un *sorting* celular mediante el equipo FACSaria (BD Biosciences). De esta selección se sembró una célula por pozo en una placa de 96 pozos, para obtener distintas clonas y así seleccionar aquellas que expresaran el patrón correcto. Las células se mantuvieron en cultivo con geneticina hasta la confluencia, posteriormente se monitoreó el patrón de expresión de GFP en un microscopio de epifluorescencia y se seleccionaron las clonas con mayor expresión y el patrón de distribución correcto de GFP. Finalmente se seleccionó la clona D-10, ya que expresó de una manera correcta y persistente la expresión de GFP a lo largo de diferentes pasajes celulares.



### 7.3.- Migración e invasividad celular

#### 7.3.1.- Ensayo de herida

La IL-8 recombinante (Biolegend) se encontraba a una concentración de 0.2mg/ml y fue necesario llevarla a una concentración final de 3,800 pg/ml, ya que se utilizó una curva de dosis respuesta, determinando esta concentración como la más adecuada para inducir la TEM.

Para conocer la capacidad de migración celular fue necesario realizar una herida en cajas de 6 pozos (Biofil) donde se encontraban las células cultivadas. Los cultivos celulares se mantuvieron a una confluencia del 95 a 100% antes de realizar la herida tanto en las células AGS-WT, como en las células AGS-Cldn-6, AGS-Cldn-9 y AGS-GFP respectivamente. Se requirieron dos grupos para el experimento, el grupo control (WT, GFP, Cldn-6 y Cldn-9) y el grupo experimental, el cual fueron las mismas células, pero se adicionó IL-8 (3,800 pg/ml) en el medio. Se trazó una línea recta con la ayuda de una punta de 200ul sobre la superficie de las cajas de 6 pozos donde se encontraban creciendo las células, y cada pozo fue lavado inmediatamente 2 veces con 2ml de PBS. A cada caja del grupo control se le agregó 2ml de DMEM sin SFB, mientras que al grupo experimental se le adicionó 2ml de la solución del DMEM sin SFB con IL-8 (3,800pg/ml). Una vez que transcurrieron las 24 horas, se analizaron bajo el microscopio invertido (10X) las heridas que se realizaron y se evaluó si el grupo experimental había cerrado más las heridas que el grupo control mediante el uso de la aplicación T-scratch.

#### 7.3.2.- Ensayo de invasividad por Transwell

Para conocer la capacidad de invasividad celular se utilizaron placas de 24 pozos de 8um (BioCoat) con 12 insertos de matrigel. Se sembraron un aproximado de 50,000 células AGS-WT, AGS-GFP, AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn9 en cada uno de los insertos respectivamente, 4 insertos fueron utilizados para sembrar los grupos control, mientras que los otros 8 insertos se utilizaron para sembrar las células con IL-8. A cada inserto del grupo control se le adicionó un volumen de 500ul de DMEM sin suplementar, mientras a los grupos experimentales, además de adicionar los 500ul de medio sin suplementar,



también se les adicionó IL-8 (3,800pg/ml) en el medio. En cada uno de los pozos se agregó 750ul de DMEM suplementado con 5% de SFB y se colocaron los insertos por encima de los pozos. Las células se mantuvieron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante un periodo de 24h. Una vez terminado el tiempo del ensayo se procedió a eliminar las células que no migraron con la ayuda de un hisopo, se rasparon las células con el hisopo por la parte de adentro del inserto y posteriormente se colocaron los insertos en pozos que contenían 1mL de metanol frío durante 2 minutos para fijar las células. Una vez transcurrido el lapso de tiempo se procedió a teñir las células que migraron adicionando 80ul de toluidina al 0.1% en la parte de abajo de la membrana de matrigel y finalmente se retiró el excedente enjuagando 2 veces los insertos con agua desionizada. Se recortaron las membranas, se montaron en portaobjetos y se adicionó una gota de aceite de inmersión. Las células se contaron en 3 diferentes campos y se sacó el porcentaje de invasividad.

#### 7.4.- Western Blot

Para conocer los niveles de expresión de proteína fue necesario obtener lisados totales de los cultivos celulares AGS-WT, AGS-GFP, AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-9. Por cada caja Petri fue necesario agregar 1 ml de buffer de lisis, 10 µl/ml de inhibidores de fosfatasa 2 y 3 (Sigma), 10 µl/ml de aprotinina (Sigma), 1mg/ml de inhibidor de tripsina y 4 µl/ml de leupeptina (Sigma). Posteriormente se requirió el uso del sonicador (Vibra-cell) para terminar de romper membranas y restos celulares que no hubieran sido degradados por el buffer de lisis, finalmente se centrifugaron los lisados totales a 12,000 RPM a 4°C durante 30 minutos. Por cada cultivo celular se obtuvo 1ml de sobrenadante, de los cuales se tomaron 100 µl para la cuantificación de proteína mediante el método de Bradford. De los 900 µl restantes se agregó la mitad del volumen final de buffer de Laemmli 2x, quedando un volumen final de 1350 µl por lisado. Finalmente se agregó a cada muestra 5% del volumen final de β-mercaptoetanol (Bio-Rad) y se colocaron en baño María de 95-100°C durante 5 minutos para desnaturalizar.

Para buscar la proteína Ezrina se requirió elaborar un gel de poliacrilamida-SDS a una concentración de 12%, ya que su peso molecular estimado esta entre 87-90 kDa. Se cargaron 30 µg de





proteína por lisado y la electroforesis se corrió a 0.50 A. Posteriormente se recortaron los geles y se montaron en la cámara de transferencia semihúmeda (Bio-Rad) de la siguiente manera: cojín, membrana de nitrocelulosa, gel y otro cojín, manteniendo siempre humedecidos los cojines, la membrana y el gel en buffer de transferencia y evitando la formación de burbujas. La transferencia se programó a 12mA durante 1 hora. Una vez que finalizó la transferencia, se tiñó con rojo de Ponceau para visualizar que las proteínas hubieran corrido bien y se hubieran transferido de una forma correcta a la membrana de nitrocelulosa. Para el bloqueo de sitios inespecíficos se incubó la membrana en leche en polvo libre de grasas a una concentración de 5% en TBS durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente se utilizaron los diferentes anticuerpos primarios; Ezrina (SC-58758) 1:500, Snail (SC-28199) 1:300, Twist (SC-81417) 1:300,  $\alpha$ -Actina (Donado por el Dr. José Manuel Hernández, CINVESTAV-México) 1:500 y N/R-Cadherina (SC-271386) 1:300 diluidos en TTBS y se dejaron incubando durante toda la noche a 4°C. Una vez terminada la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TTBS para quitar los excedentes del anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-mouse (Invitrogen) 1:10,000 y 1:3,000, mientras que el anti-rabbit (Thermo) 1:1500 diluidos en TTBS y se dejaron incubando en agitación a temperatura ambiente durante 45 minutos, una vez transcurrido ese tiempo, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TTBS y un lavado final de TBS para quitar los excedentes.

Las membranas se incubaron durante 5 minutos con 500  $\mu$ l de cada reactivo del kit de quimioluminiscencia (Thermo) y finalmente, para observar la expresión de las proteínas de interés, la membrana se expuso sobre el escáner digital (C-Digit LI-COR) con una calidad de exposición estándar.

## 7.5.- Inmunofluorescencias

Las células AGS-WT, AGS-GFP, AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-9 se sembraron individualmente en cubreobjetos colocados sobre placas de 6 pozos con 3 ml de DMEM durante 2 días hasta alcanzar una confluencia de 90-95%. A diferencia de los ensayos de migración celular en donde no se suplementó el DMEM con SFB, todos los demás ensayos se realizaron con 10% de SFB. Las células se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 10 minutos a 4°C y posteriormente se realizaron 5 lavados de 5



minutos cada uno con PBS. El permeabilizado se realizó con TritonX-100 (Bio-Rad) al 0.05% durante 10 minutos a temperatura ambiente y se mantuvieron en agitación, posteriormente se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno con PBS. Para el bloqueo inespecífico se utilizó PBS/BSA al 2% durante 1h a temperatura ambiente y se mantuvo en agitación, posteriormente se realizaron 5 lavados de PBS/Tween-20 al 0.05%. Para la dilución de los anticuerpos se utilizó PBS y se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios; Ezrina (SC-58758) 1:200 y N/R-cadherina (SC-271386) 1:200. Los anticuerpos se dejaron incubando a 4°C durante toda la noche, posteriormente se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno con PBS/Tween-20 al 0.05%. Finalmente, los anticuerpos secundarios se diluyeron en PBS/BSA al 1% y se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios con los fluorocromos: Alexa Fluor (Abcam) (647) 1:500 y Alexa Fluor (Abcam) (680) 1:500, se dejaron incubando durante 1h a temperatura ambiente, en agitación y fuera de la luz. Posteriormente se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno con PBS/Tween-20 al 0.05%. Para la contratinción se utilizó DAPI (Sigma-Aldrich, 1µg/mL) 2.5µM y se incubó durante 10 minutos a 4°C, se realizaron 5 lavados con PBS para quitar los excesos. Finalmente se añadieron 16µl de DaKo como solución de montaje y los cubreobjetos se sellaron con barniz sobre un portaobjetos. Para observar las muestras se utilizó el microscopio (Leica TCS-SP5) con un aumento de 63x.

#### 7.6.- Análisis estadístico

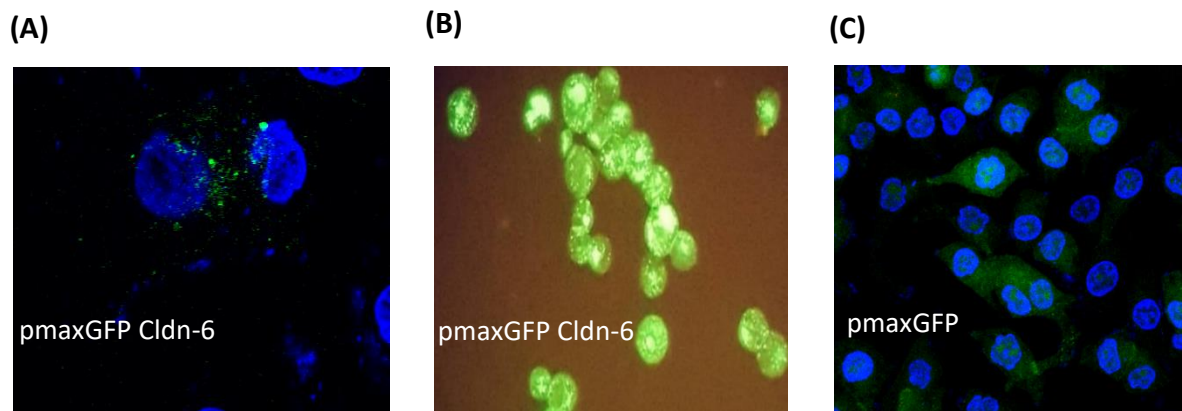
Se utilizó el software estadístico Graph Pad Prism 7.0 para analizar los datos experimentales. Se utilizó la prueba T de Student y ANOVA para analizar las diferencias entre grupos. Se consideró un cambio significativo a los valores con una  $p < 0.05$ .



## 8.- RESULTADOS.

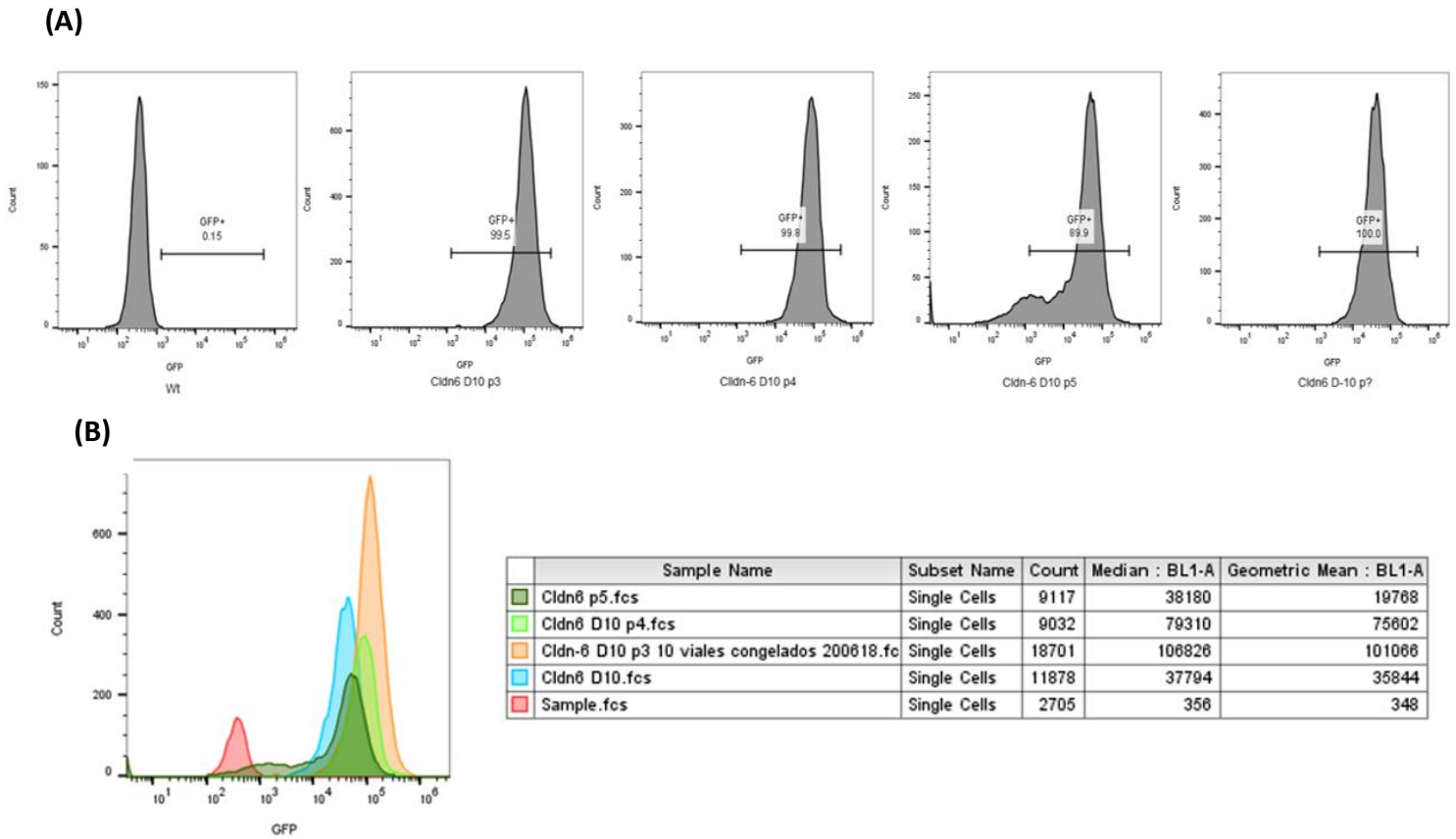
### 8.1.- Separación celular y enriquecimiento de la expresión de cldn-6.

La línea celular AGS ya había sido transfectada con anterioridad con el vector pmax cldn-6, sin embargo, tanto la expresión como la localización de la Cldn-6 se perdía con el tiempo, se realizó un sorting celular, sembrando una célula positiva a GFP. De dicha selección la clona D-10 expresó el patrón correcto de GFP, se mantuvo en crecimiento celular durante aproximadamente 3 meses continuos manteniendo dicha expresión a lo largo de diferentes pasajes celulares (Figura 9A,B). También se realizó la transfección con GFP para utilizar como control de eficiencia de transfección (Figura 9C). Análisis de la expresión de Cldn-6 por ensayos de citometría mostraron que en el pasaje 5 comenzaba a exhibirse un pequeño pico negativo (10.1%) de la población total, por lo que se pensó que la expresión de cldn-6 comenzaba a perderse sin embargo, después de diferentes pasajes posteriores (aproximadamente por el pasaje 12) las células comenzaron a recuperar la expresión de cldn-6 (100%) dejando de lado la población negativa. Dado que esta clona se mantuvo estable se decidió usarla para los futuros experimentos (Figura 10).



**Figura 9. Patrón de expresión de GFP en la clona D-10 de las células transfectadas con Cldn-6.** (A) La ubicación de Cldn-6 fusionada a GFP se encuentra principalmente en la membrana celular, (B) seguida por una menor expresión citoplasmática (pmaxGFP Cldn-6), (C) mientras que la expresión de GFP sola, se encuentra por todo el citoplasma (pmaxGFP)





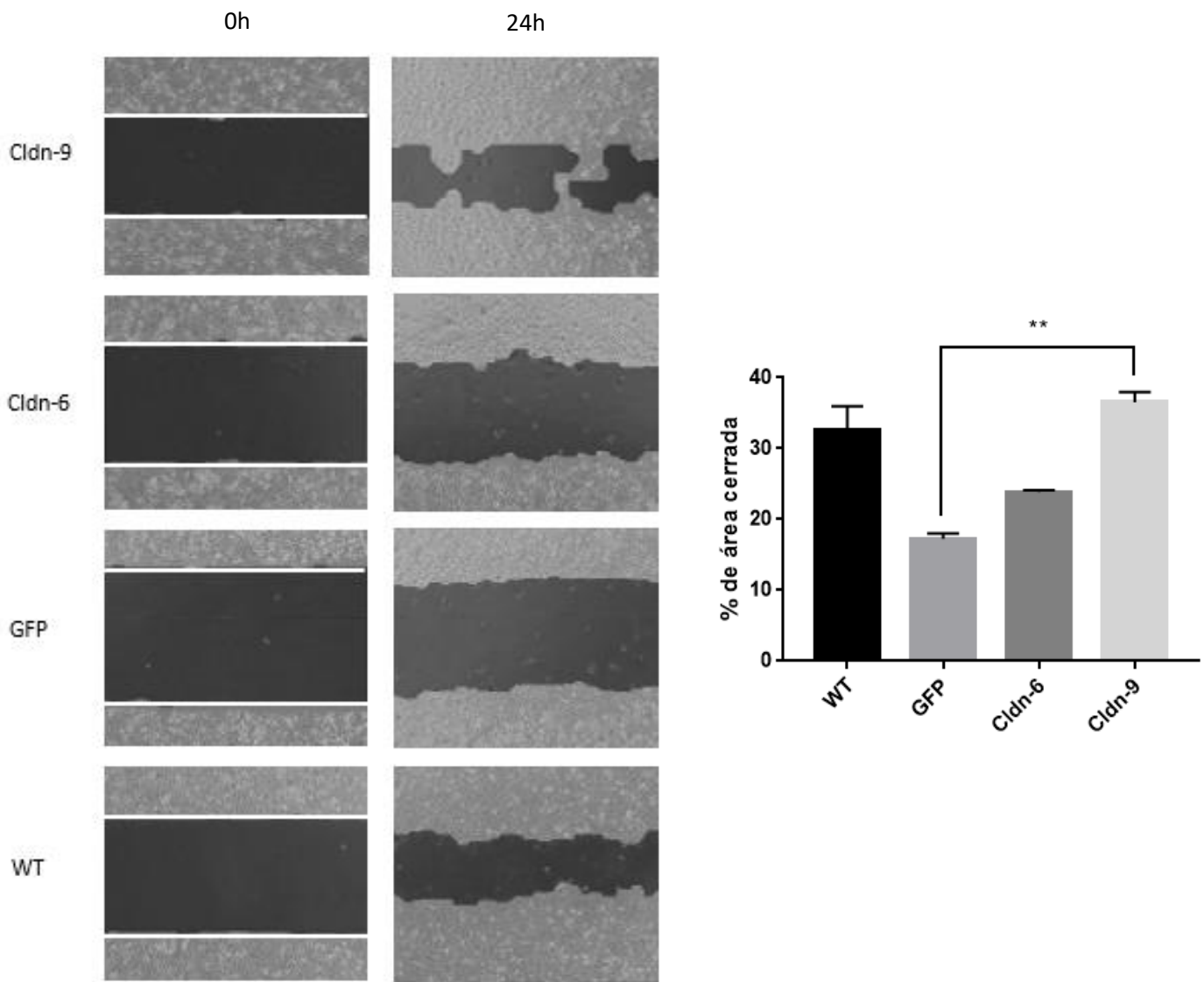
**Figura 10. Porcentaje de expresión de GFP en la clona D-10 después de diferentes pasajes celulares.** (A) La expresión de GFP en el pasaje 3 fue de 99.5%, disminuyendo hasta un 89.9% en el pasaje 5, sin embargo después de varios pasajes más, la expresión de GFP se recuperó en su totalidad. (B) Comparación de las gráficas de expresión de GFP durante varios pasajes celulares contra las células sin transfectar (sample).

## 8.2.- La sobreexpresión de Cldn-9 aumenta la migración e invasividad celular.

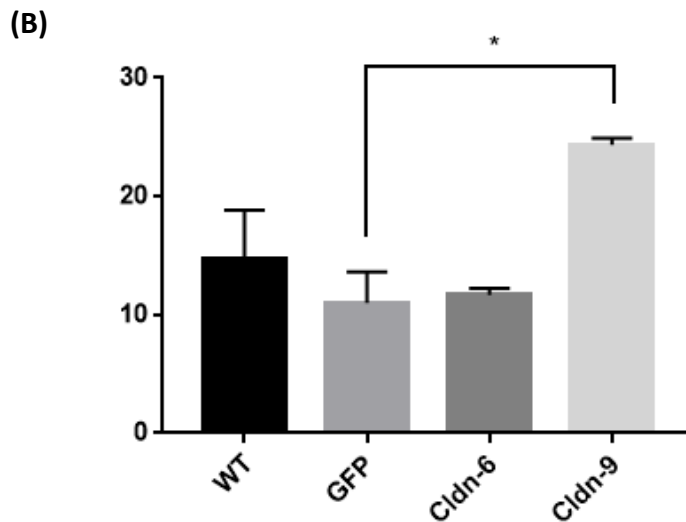
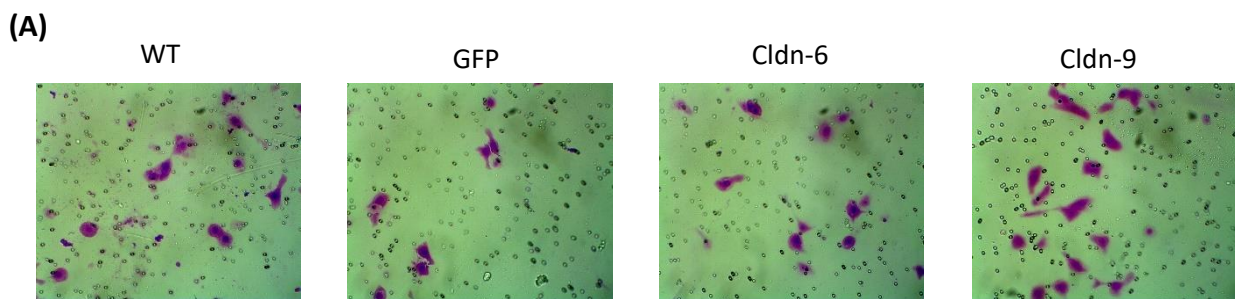
Para evaluar el potencial de migración de las células AGS-WT, AGS-GFP, AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-9 se realizaron ensayos de herida. Las células que más migraron fueron las AGS-Cldn-9, mientras que las AGS-Cldn-6 tuvieron un compartimiento parecido al control de transfección GFP. Resultó interesante observar que las células AGS-WT fueron capaces de cerrar la herida con mayor facilidad que las células AGS-Cldn-6. Estos resultados mostraron que, durante las primeras 24 h las células que sobreexpresan Cldn-9 migran más que las demás líneas celulares, por lo que la Cldn-9 promueve



mecanismos de migración celular (Figura 11). Los resultados obtenidos al evaluar la capacidad invasiva de todas las células fueron muy similares a los obtenidos en los ensayos de migración. En este caso se observó que las células AGS-WT invadieron poco y las células AGS-Cldn-6 mostraron incluso una invasividad menor que las AGS-WT. Como ya se esperaba, las células transfectadas con Cldn-9 fueron las células que tuvieron una capacidad invasiva mayor ( $p < 0.01$ ) comparada con el grupo control (GFP), por lo que se asume que la sobreexpresión de Cldn-9 confiere hasta un 40% más de capacidad de migración e invasividad a las células AGS (Figura 12).



**Figura 11. La sobreexpresión de Cldn-9 aumenta la migración celular.** Se infligió una herida a una capa celular y el cultivo continuó por 24h adicionales. Los cierres de las heridas fueron fotografiados a las 0 y 24h. La transfección con Cldn-9 aumentó la migración celular, mientras que la transfección con Cldn-6 se comportó como el control de transfección GFP, migrando inclusive menos que las WT. Se realizaron dos experimentos separados con los mismos resultados. Las barras indican la SD **\*\*P < 0.001**.

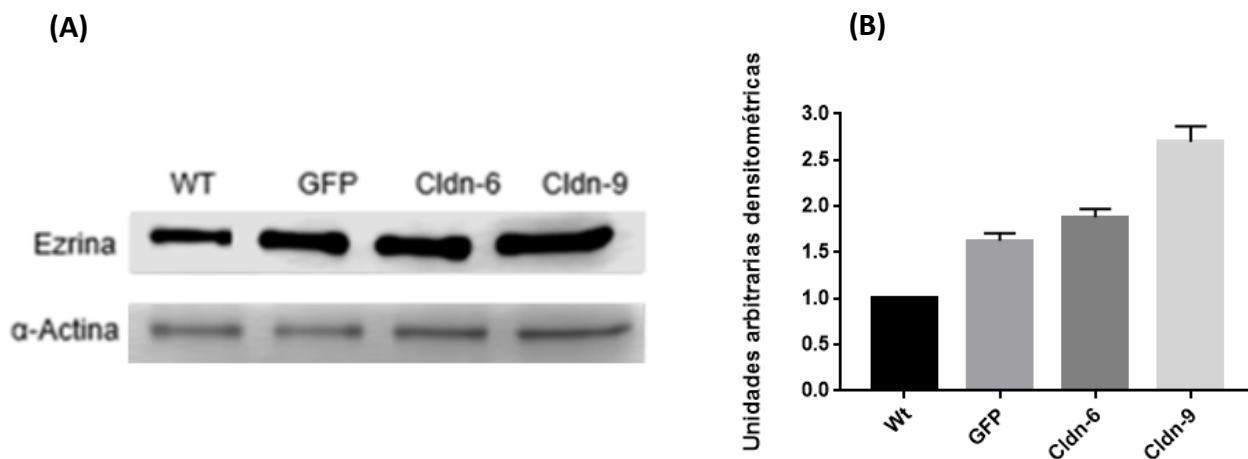


**Figura 12. La sobreexpresión de Cldn-9 aumenta la invasividad celular.** (A) Las células se cultivaron en los insertos recubiertos por matrigel durante un periodo de 24h y se contaron las células invasoras. (B) Representación gráfica de los datos obtenidos. Los valores se representan como la media  $\pm$  SD (n=3) **\*p < 0.01**.



### 8.3.- La sobreexpresión de Cldn-9 induce una mayor expresión de Ezrina.

Debido a que las células AGS-Cldn-9 migraban e invadían más, se procedió a evaluar cuáles proteínas podían estar participando en estos eventos, por lo que se propuso a la proteína Ezrina la cual se ha demostrado que se sobreexpresa en diversos tipos de cánceres metastásicos e invasivos. Los resultados obtenidos en los ensayos de WB mostraron que la expresión de Ezrina fue significativamente más alta en las células AGS-Cldn-9, seguida de las células AGS-Cldn-6 y AGS-WT (Figura 13). Estos resultados correlacionan con los obtenidos en los ensayos de herida y de migración por lo que se puede sugerir que la sobreexpresión de Cldn-9 está relacionada con el aumento en la expresión de Ezrina y en consecuencia con los procesos de migración e invasividad.



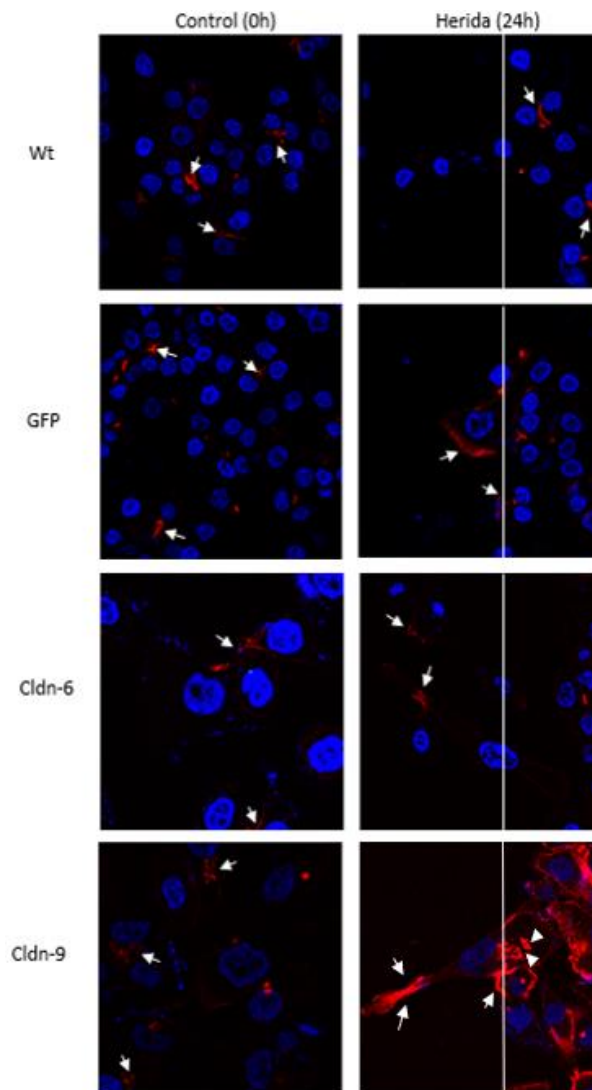
**Figura 13. Expresión de Ezrina en las líneas AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-9.** (A) Se observa una mayor expresión de Ezrina en AGS-Cldn-9. (B) Cuantificación de los datos del western blot. Los datos fueron normalizados con  $\alpha$ -actina. Las barras representan la media  $\pm$  SD (n=3).

### 8.4.- Participación de Ezrina en la migración de células AGS-Cldn-9.

Dado que ya se ha reportado la expresión de Ezrina en estructuras como filopodios celulares durante la migración celular, se evaluó la expresión de la misma durante la migración de las células



AGS-WT, AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-9. Como se ha reportado, la expresión de Ezrina antes de inducir la migración por la herida, se observó en regiones específicas del citoplasma y de la membrana en todas las células. A las 24 h posteriores a la aplicación de la herida, la expresión de Ezrina se observó a nivel de la membrana celular en las células que se encontraban en el sitio de la protrusión. Como era de esperarse, en las células AGS-Cldn-9 que habían mostrado un mayor potencial de migración, la expresión de Ezrina aumentó significativamente en regiones perimembranales y en las prolongaciones celulares (Figura 14), lo que refuerza la idea de una relación entre ambas proteínas.



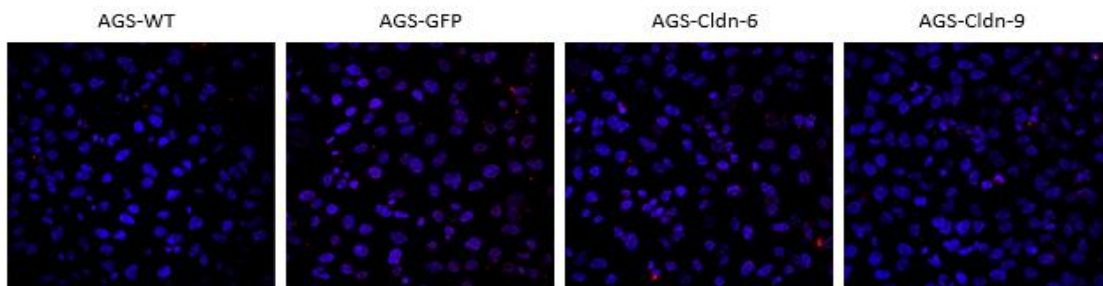
**Figura 14. Ubicación de Ezrina en células AGS.** Se observa la localización citoplasmática y membranal de Ezrina a las 0h (Flechas) y el aumento significativo de su expresión en las zonas de protrusión (filopodios) de las células que se encuentran migrando, como las AGS-Cldn-9 a las 24 h de haber realizado la herida (Rojo para Ezrina y azul para núcleo).





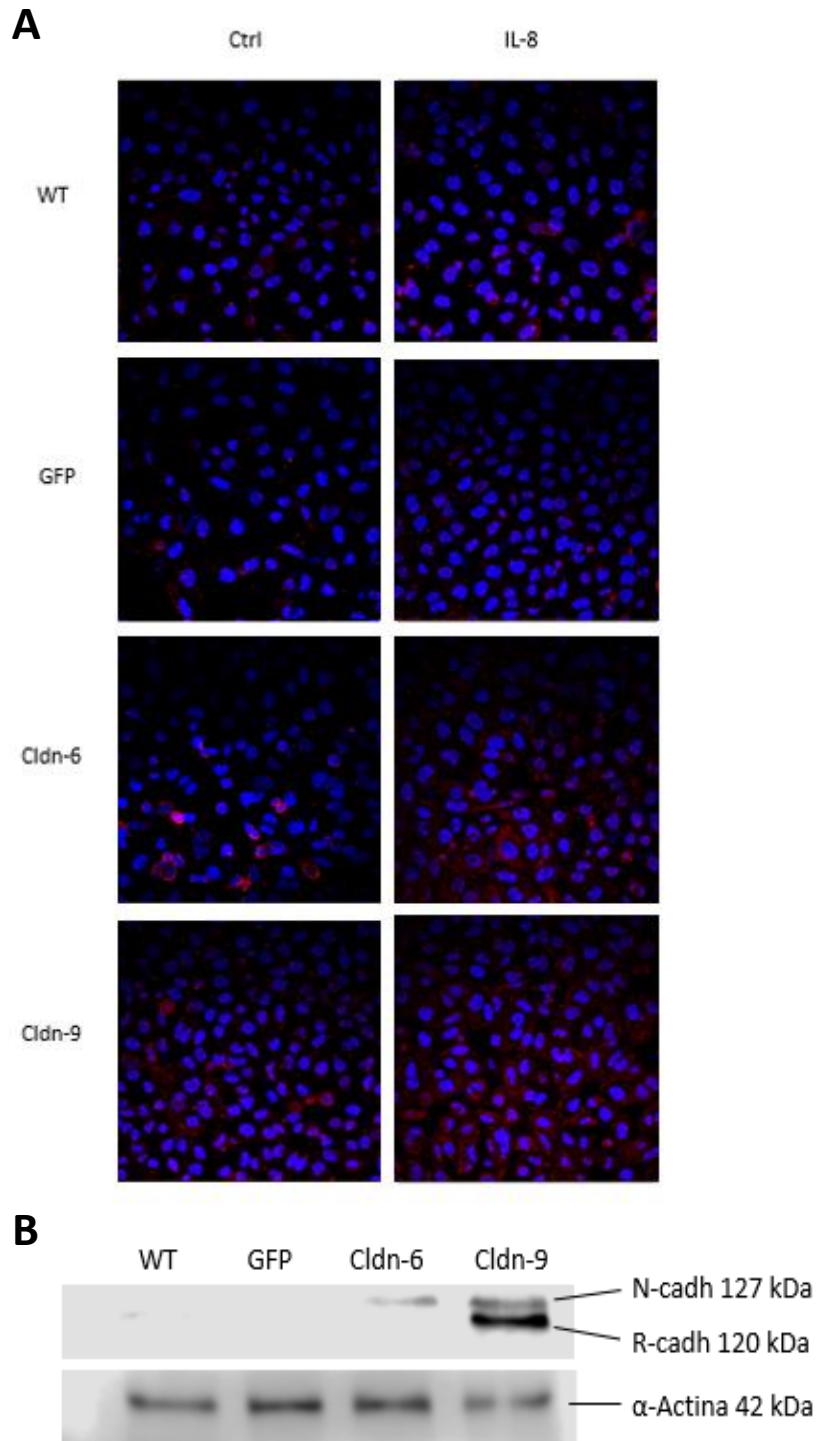
### 8.5.- IL-8 induce la expresión de marcadores asociados a la TEM.

Algunos de los factores involucrados en la inducción de la TEM es la presencia de citocinas en el microambiente celular. Dado que se ha reportado que la IL-8 induce la TEM en células AGS y eso conlleva al aumento en la expresión de Cldn-6 y Cldn-9, se evaluó la expresión de marcadores de la TEM en células AGS tratadas con IL-8 generando un microambiente de inflamación crónica. Al evaluar la expresión del marcador epitelial E-cadherina, se encontró que su expresión fue muy débil a nula en todas las células AGS (Figura 15). Por otro lado, uno de los marcadores de la TEM que ya se encontraba expresado de forma constitutiva en las células AGS fue N-cadherina, aunque su expresión se vio aumentada en todas las células después de adicionar la IL-8 al medio (Figura 16A). Cabe resaltar que la expresión de N-cadherina se vio exacerbada en las células que sobreexpresaban Cldn-9. Sin embargo, el ensayo de Western Blot reveló que solamente se ve aumentada la expresión de N-cadherina en AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-9, pero resulta aún más interesante que la IL-8 además de aumentar su expresión, también fue capaz de estimular la expresión de R-cadherina en las células transfectadas con Cldn-9 (Figura 16B). De los marcadores que por excelencia se encuentran involucrados en la TEM, el factor de transcripción Snail-1 no se observó expresado de manera constitutiva en ninguna línea celular, sin embargo al adicionar IL-8 al medio, su expresión aumentó de manera significativa en las 4 líneas celulares (Figura 17). Por otro lado Twist, el otro factor transcripcional involucrado, se expresó débil pero constitutivamente en las 4 líneas celulares, sin embargo, su expresión aumentó de manera significativa en las células AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-9



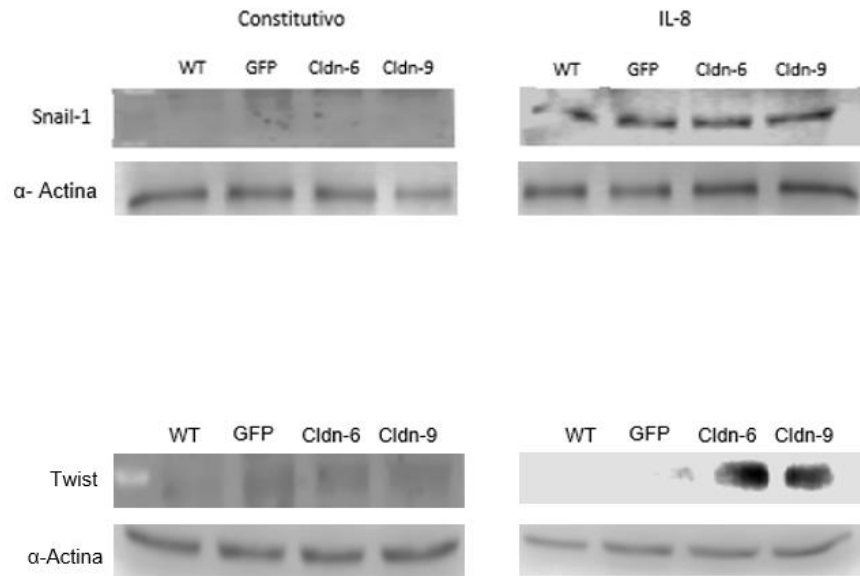
**Figura 15. Expresión de E-cadherina en células AGS por inmunofluorescencia (Rojo para E-cadherina y azul para núcleo). La expresión de E-cadherina basal es débil o nula**





**Figura 16. Expresión de N-Cadherina por ensayos de Inmunofluorescencia (A) y Western Blot (B).** Todas las células expresan N-cadherina de forma constitutiva sin embargo, al adicionar IL-8 en el medio la expresión de N-cadherina aumentó observando una expresión mucho mayor en las células AGS-Cldn-9. El WB mostró que solo en células que sobreexpresan Cldn-6 y Cldn-9 la IL-8 aumenta la expresión de N-cadherina (Rojo para N-cadherina y azul para núcleos).





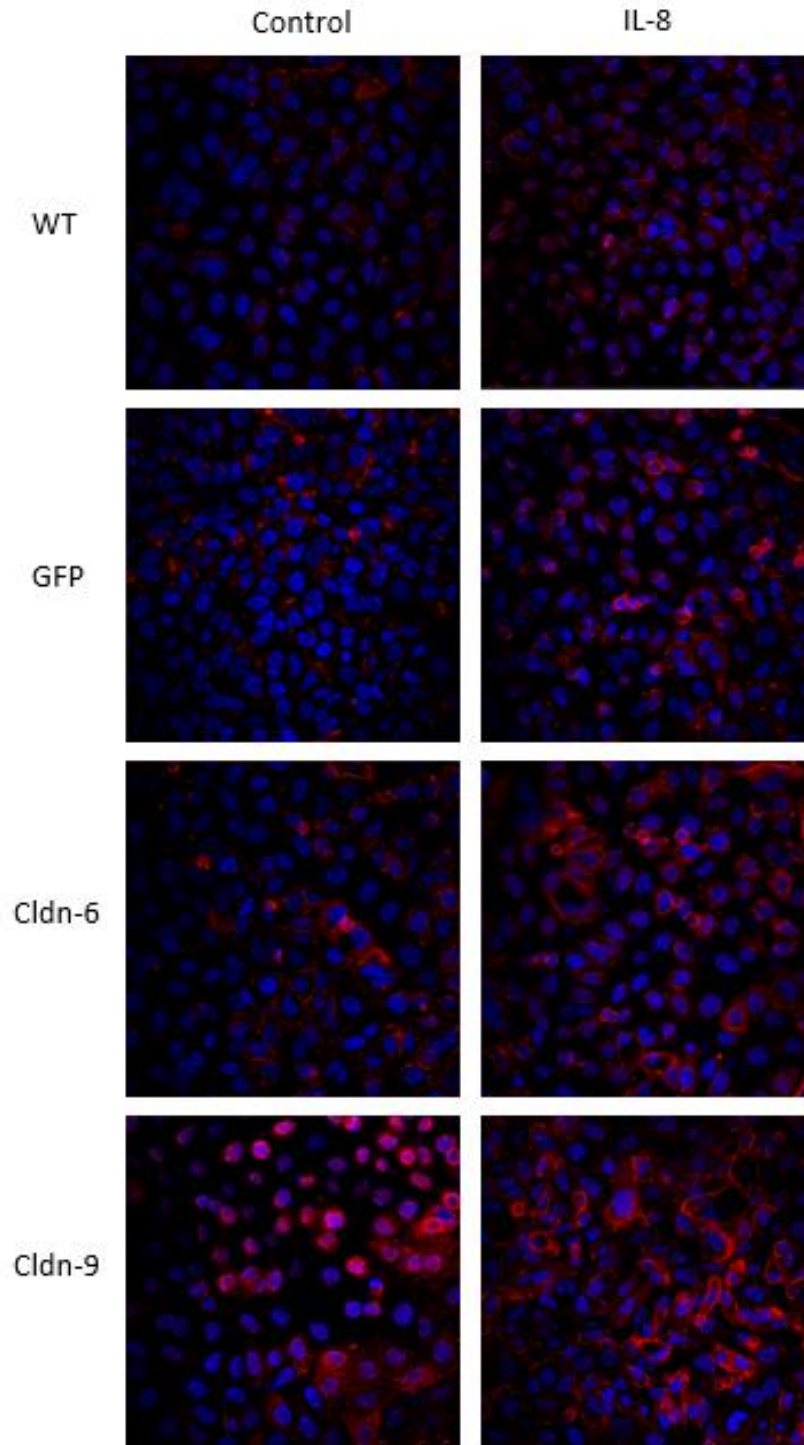
**Figura 17. IL-8 induce la expresión de Snail y Twist.** IL-8 induce la expresión de Snail-1 en todas las líneas celulares y de Twist únicamente en células AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-9, por lo que se confirma que la IL-8 induce un fenotipo celular mesenquimal.

#### 8.6.- IL-8 promueve un aumento en la expresión de Ezrina en células AGS-Cldn-9.

Dado que la IL-8 promueve la expresión de proteínas que inducen un fenotipo celular mesenquimal, se evaluó el efecto de esta citocina sobre la expresión de Ezrina y su relación con los marcadores de TEM. Los resultados obtenidos mostraron que las células AGS-Cldn-9 fueron las células que tuvieron una mayor expresión de Ezrina (Figura 18), inclusive el grupo control ya mostraba una mayor expresión de la proteína que las demás líneas celulares. La adición de IL-8 en el medio incrementó significativamente la expresión de Ezrina y promovió cambios en su localización subcelular. Inicialmente Ezrina se localizaba predominantemente en la región perinuclear y nuclear y con la IL-8 se redistribuyó a la membrana plasmática en la mayor parte de las células (Figura 18).

Cabe mencionar que la IL-8 promovió cambios morfológicos como un fenotipo celular más alargado, núcleos ovalados y un menor contacto entre célula-célula, eventos que correlacionan con la expresión de los factores de transcripción previamente descritos.





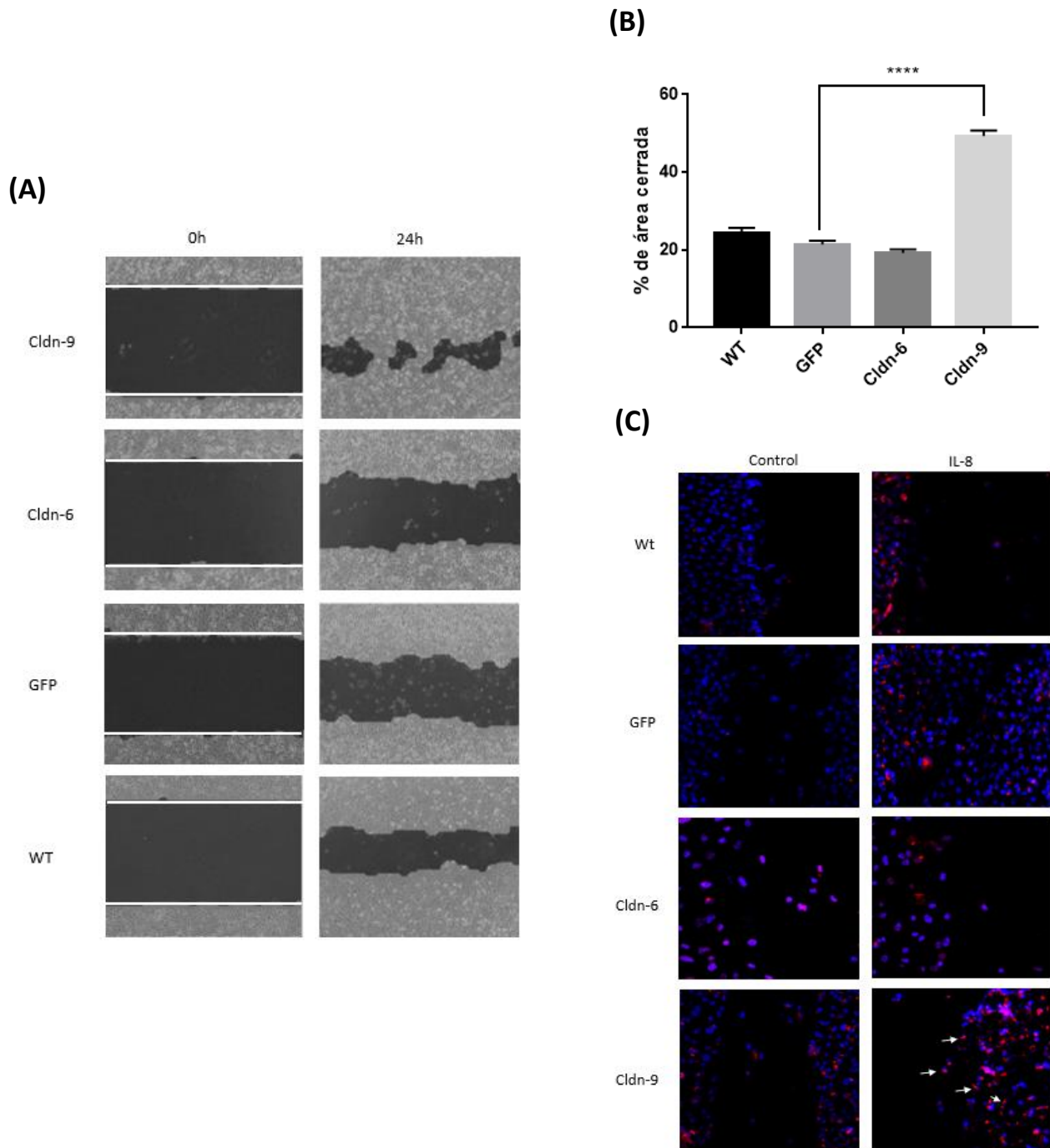
**Figura 18. IL-8 promueve la expresión de Ezrina en células AGS-Cldn-9.** La expresión basal de Ezrina (Alexa 680) aumenta al adicionar IL-8 en el medio en todas las líneas celulares, observándose la mayor expresión en las células AGS-Cldn9, además de redistribuirse de regiones perinucleares a zonas membranales (Rojo para Ezrina y azul para núcleos).



### 8.7.- Ezrina promueve la migración en células AGS-Cldn-9 con un fenotipo mesenquimal.

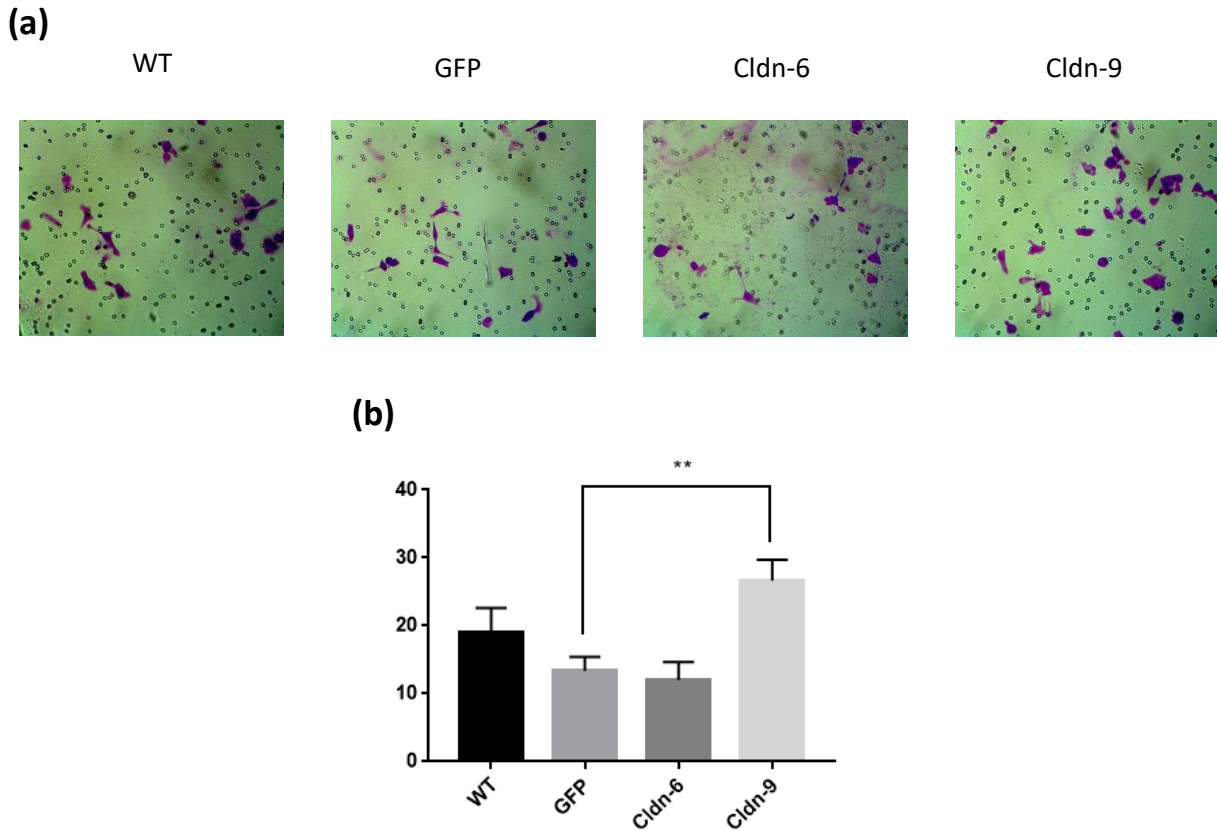
Dado que la IL-8 induce la TEM y aumenta la expresión de Ezrina, se evaluó si efectivamente en las células que migraban hay una mayor expresión de Ezrina. Los resultados obtenidos mostraron que una vez que las células se encontraban en el proceso de la TEM, las células AGS-Cldn-9 incrementaron la migración de manera significativa, comparadas con las células AGS-WT, cerrando en un 90% el espacio producido en el ensayo de herida comparada con el 71.5% de las células AGS-WT. Las células AGS-Cldn-6 no mostraron cambios significativos al menos durante las primeras 24 h del proceso de migración celular (Figura 19). Al comparar los ensayos de invasividad realizados en ausencia de IL-8 (Figura 12) con los obtenidos en presencia de IL-8 (Figura 20), la IL-8 ejerce el mismo efecto sobre la capacidad invasiva de las células AGS-Cldn-9 a las 24 h de tratamiento sin embargo, es importante notar que la IL-8 induce cambios morfológicos en las células las cuales adquirieron formas más alargadas con núcleos más ovalados, un fenotipo parecido a las células mesenquimales. Estos resultados sugieren que la IL-8 confiere a las células características fenotípicas parecidas a las células mesenquimales y una mayor capacidad de migración, sin observar cambios significativos en la invasividad.





**Figura 19. La IL-8 aumenta la migración celular mediada por Ezrina en células AGS-Cldn-9.** (A) La IL-8 (3800pg/ml) promueve una mayor capacidad invasiva a las células AGS-Cldn-9 a las 24 h de tratamiento. (B) Cuantificación relativa de los ensayos de herida representado en porcentaje de área cerrada. Los datos son medias  $\pm$  SD de dos experimentos independientes \*\*\*\* $p < 0.0001$ . (C) Ensayos de Inmunofluorescencia donde se observa la redistribución subcelular de Ezrina (Alexa 680) en las células en migración.





**Figura 20. La sobreexpresión de Cldn-9 aumenta la invasividad celular.** Las células AGS fueron estimuladas con IL-8 y se llevó a cabo el ensayo de invasión. (A) Las células AGS-Cldn-9 tuvieron una mayor capacidad invasiva en un tiempo de 24h de cultivo. (B) Representación gráfica de los datos obtenidos. Los valores se representan como la media  $\pm$  SD (n=3)  $p < 0.001$

## 9.- DISCUSIÓN

La expresión de claudinas promueve la migración e invasividad celular.

El aumento en la expresión de claudinas en tejidos donde no deberían expresarse, causa diversos problemas generalmente asociados a la promoción del cáncer, tal es el caso de la sobreexpresión de Cldn-9, la cual una de sus principales funciones es asociarse al citoesqueleto de



actina, controlar la resistencia transepitelial y la permeabilidad iónica<sup>136</sup>. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que al sobreexpresar Cldn-9 en la línea celular de cáncer gástrico AGS, las células cambiaron su fenotipo hacia uno más alargado y mesenquimal, y adquirieron una mayor capacidad de migración. Esto correlaciona con diversos estudios reportados en donde se observa la asociación directa de la sobreexpresión de Cldn-9 con una mayor invasividad, motilidad y una mayor capacidad metastásica en un modelo de cáncer de pulmón<sup>33</sup>, oncocitomas pituitarios invasivos<sup>137</sup>, células de hígado humano (HL 7702) y en células AGS<sup>35, 138</sup>.

Al igual que la capacidad de migración, la capacidad invasiva observada fue mayor en las células AGS-Cldn-9, seguidas de las AGS-Cldn-6. Las muertes asociadas al cáncer gástrico de tipo intestinal en donde la expresión de Cldn-9 va de moderada a alta es del 25% comparado con el 66% de muertes asociadas al cáncer gástrico de tipo difuso en donde la expresión de Cldn-9 es alta. La capacidad invasiva y metastásica de las células en el cáncer gástrico de tipo difuso son mayores por lo que la Cldn-9 podría tener un papel importante durante el inicio, la progresión, la invasión y la metástasis. Tomando en consideración los resultados de este trabajo, se puede sugerir a Cldn-9 como un marcador molecular temprano para el diagnóstico de este tipo de cáncer.

**La sobreexpresión de claudinas aumenta la expresión de Ezrina.**

Una vez comprobado que Cldn-9 aumentó tanto la migración como la invasividad celular, se procedió a evaluar qué otras proteínas se encontraban involucradas en estos procesos. Como se ha demostrado previamente, la expresión y la ubicación anormal de Ezrina puede usarse como un marcador de diagnóstico temprano del adenocarcinoma gástrico y, dado que participa en procesos del rearreglo del citoesqueleto, podría estar involucrada en el incremento de la migración e invasividad<sup>139</sup>. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que Ezrina se expresó más en las células AGS-Cldn-9, las cuales tuvieron la mayor migración e invasividad. Por otro lado, las células AGS-Cldn-9 mostraron un fenotipo “hummingbird” con proyecciones en forma de aguja y protuberancias en forma de lamelipodios y filopodios. Como han demostrado trabajos anteriores, la formación de estas estructuras





requiere la polimerización de actina a menudo regulada por las GTPasas Cdc42 y Rac1 las cuales aumentan la formación de los complejos Actina-ERM-CD44<sup>140,141</sup>. Cabe resaltar que las claudinas se encuentran involucradas en la regulación del crecimiento celular, la diferenciación, la invasión y la migración celular a través de vías de señalización. Una de las vías que se encuentra aumentada por la sobreexpresión de Cldn-9 es la vía de Tyk2/STAT3. La fosforilación de Ezrina en el residuo T567 por STAT-3 está bien documentado, aunque el mecanismo no está del todo claro<sup>138,142,143</sup>. Un punto importante será determinar si Cldn-9 promueve la fosforilación de Ezrina a través de la inducción de la vía de Tyk2/STAT-3.

### Ezrina participa en la migración celular por medio de la formación de filopodios

En los últimos años se ha documentado que Ezrina se une directamente a PI3K e influye en muchas vías de señalización que afectan las funciones celulares relacionadas a la tumorigénesis y metástasis, incluidas las vías MAPK-ERK 1/2, PI3K-Akt y las proteínas Rho. Por otro lado, Ezrina participa en la regulación de la forma celular asociándose con F-actina y CD44<sup>130,146</sup>, la motilidad en donde participa en la formación de filopodios y lamelipodios<sup>147,148</sup>, la adhesión y la transducción de señales<sup>144</sup>. En este trabajo se demostró que en las células AGS-Cldn-9, la expresión de Ezrina aumentó y se localizó en los sitios de protrusión de las membranas celulares como en la formación de filopodios de las células en migración en donde podría estar participando en el mantenimiento de la arquitectura membranal como ya ha sido reportado<sup>141,145</sup>. Será interesante determinar si el mecanismo para ello involucra a Cdc42, el cual puede activar a las proteínas ERM a través de la activación de MRCK promoviendo su interacción con los filamentos de actina y consecuentemente inducir la formación de filopodios.

Finalmente se ha demostrado que la sobreexpresión tanto de Cldn-6 y sobre todo de Cldn-9 inducen cambios en la polimerización de actina<sup>133</sup>, mostrando muchas más fibras de estrés, sin embargo, resulta aún más interesante que la sobreexpresión de Cldn-9 exhibió la formación de pseudópodos y filopodios los cuales se encuentran estrechamente relacionados con el rearrreglo del citoesqueleto de actina que a su vez puede estar mediado por la alta expresión de ezrina<sup>35,133-135</sup>. Tomando en cuenta estas observaciones, se puede asumir una relación entre la sobreexpresión de Cldn-9 y Ezrina.



La IL-8 induce la expresión de marcadores asociados a la TEM.

La TEM es un proceso fisiológico crucial que promueve la motilidad celular, la cicatrización de heridas, la regeneración de tejidos, la fibrogénesis y la metástasis tumoral. Durante este proceso, las células tumorales obtienen las mayores capacidades de invasión y metástasis mediante la pérdida de su polaridad transformándose hacia un fenotipo mesenquimal, perdiendo sus características epiteliales y adquiriendo una morfología fibroblastoide, reduciendo la polaridad celular y los contactos célula-célula y disminuyendo la expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina y las citoqueratinas REF. Particularmente, la TEM facilita que las células cancerosas inicien la metástasis a través de la motilidad e invasividad de las células que se encuentran en la parte más externa del tumor principal. Estos eventos se encuentran orquestados por factores transcripcionales que impulsan el proceso de la TEM tales como Snail, Twist y Slug así como una expresión aberrante de N-cadherina la cual aumenta la invasión y la metástasis en varias líneas celulares<sup>149,150,151</sup>, y R-cadherina.

Está documentada que la IL-8 en altas concentraciones y en tiempos cortos (2h) induce la expresión de algunos marcadores de TEM en mucosas gástricas sanas, confirmando así el potencial terapéutico que representa el evitar una inflamación crónica.<sup>154</sup>

En este trabajo se mostró que la IL-8 induce la expresión de marcadores del proceso de TEM en todas las células. Snail y Twist no se expresaron de manera constitutiva en las células AGS, sin embargo el tratamiento con la IL-8 indujo un aumento significativo en la expresión de Snail y Twist en todas las células siendo más evidente en las células AGS-Cldn6 y AGS-Cldn9.

En lo que respecta a N- y R-Cadherinas, los mecanismos propuestos por los cuales N-cadherina aumenta la motilidad e invasividad celular son por su interacción con el RCF1 activando continuamente la vía de señalización MAPK-ERK o debido a que N-cadherina puede mejorar la interacción con células del estroma y el endotelio, estimulando la supervivencia de las células tumorales y promoviendo el acceso dentro y fuera del sistema circulatorio<sup>152</sup>. La alta expresión de R-Cadherina, la cual tiene una alta homología con N-cadherina, es necesaria para la TEM que ocurre en los riñones en desarrollo, para inducir la invasividad y motilidad en células de cáncer de mama (BT-20)<sup>153</sup> y en desarrollo del músculo estriado. Se han reportado también altos niveles de RNAm de R-cadherina en



líneas celulares de carcinoma de vejiga y próstata. Como ya se ha reportado<sup>155,156</sup>, la expresión de E-Cadherina fue indetectable en todas las células AGS, por lo que se esperaba una expresión de N-Cadherina elevada. Los resultados mostraron la expresión constitutiva de N-Cadherina en todas las células evaluadas, sin embargo la IL-8 aumentó la expresión de N-Cadherina significativamente, reforzando así la idea de que IL-8 juega un papel importante en el proceso de la TEM. De manera interesante se observó que la IL-8 promovió la expresión de R-Cadherina únicamente en las células AGS-Cldn-9.

Esto refuerza los resultados previos en los que las células AGS-Cldn-9 poseen una mayor invasividad y migración. Los resultados obtenidos sugieren que la R-cadherina y la N-cadherina podrían estar implicadas en estos procesos en las células que sobreexpresan Cldn-9.

La IL-8 promueve un aumento en la expresión de Ezrina en AGS-Cldn-9.

Durante la TEM las células tumorales presentan una remodelación del citoesqueleto que es importante para promover la movilidad y plasticidad celular<sup>157</sup>. Dado que Ezrina participa en los procesos de rearreglo de citoesqueleto<sup>147</sup>, resultó interesante estudiar si la expresión de Ezrina cambia durante los cambios de la estructura celular provocados por IL-8. Como se observó en el ensayo de inmunofluorescencia las células AGS-Cldn-9 fueron las células que tuvieron una mayor expresión de Ezrina, sin embargo también fue interesante notar su localización perinuclear, ya que en un estudio se mostró que la expresión de Ezrina dentro de una mucosa gástrica sana es membranal y rara vez citoplasmática, sin embargo en la mayoría de los tumores Ezrina se expresa de manera citoplasmática y en muy pocos casos también puede tener una acentuación perinuclear<sup>158</sup>. Por otro lado, también se ha demostrado que los patrones de expresión de Ezrina cambian claramente con la etapa del tumor, ya que en cáncer de mama durante los estadios tempranos (IA), la distribución de Ezrina es principalmente perinuclear, aunque también existe una ligera expresión citoplasmática. En los tumores con estadio IIB, Ezrina adquiere una mayor expresión citoplasmática y perinuclear, sin embargo también se ha observado una expresión membranal débil, mientras que en tumores grandes de estadio IIIB, Ezrina se limita casi exclusivamente a una distribución citoplasmática<sup>159</sup>. Por lo que resultó interesante observar



como las células AGS-Cldn-9 además de aumentar su expresión de Ezrina por medio de la IL-8, también modificó su localización perinuclear hacia una localización citoplasmática y membranal.

Sin embargo, en las células AGS-Cldn-6 se observó que la expresión de Ezrina pasó de tener una expresión mayormente membranal a una expresión citoplasmática y perinuclear.

Aunque se conoce mucho sobre la función que cumple Ezrina, se conoce poco sobre su regulación y su relación con IL-8, un reporte mostró que la expresión de Ezrina humana puede ser regulada directamente por la acción de diversas citocinas como IL-2, IL-8 e IL-10 en cáncer de colón<sup>160</sup>, sin embargo aún se desconoce el mecanismo por el cual se encuentra involucrada la vía de señalización entre IL-8 y Ezrina. Finalmente, estos resultados sugieren que Cldn-9 y Ezrina pueden ser utilizados como marcadores moleculares tempranos en el inicio y progreso de la carcinogénesis gástrica.

**Ezrina aumenta la migración celular durante la TEM.**

Durante la TEM las células sufren diferentes cambios morfológicos, uno de los más evidentes es la formación de pseudópodos o filopodios<sup>161</sup>. Ezrina es capaz de formar y estabilizar estas protrusiones membranales<sup>148</sup>, por lo cual se puede sugerir que existe una relación entre el fenotipo mesenquimal, la migración y la expresión de Ezrina. Por otro lado, la IL-6 y la IL-8 participan en la progresión de la TEM activando la vía de señalización de Wnt y STAT<sup>161</sup>, además de que STAT también es capaz de fosforilar a Ezrina y consecuentemente activarla<sup>136,137</sup>. Los resultados mostrados en este trabajo mostraron que la IL-8 modificó el fenotipo celular en las células AGS-Cldn-9, volviéndose más alargadas y menos cohesivas, muy parecidas al fenotipo de las células mesenquimales<sup>162</sup>, además de los cambios fenotípicos, también se observó que la sobreexpresión de Cldn-9 y la IL-8 aumentaron la capacidad de migración celular. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en el ensayo de invasividad por lo que se puede pensar que la TEM es un proceso largo y al menos durante las primeras 24h no existen grandes cambios durante la invasividad celular.

En este trabajo también se mostró que Ezrina participó en los procesos de migración celular, ya que su expresión fue alta en los sitios de protrusión membranal en células que se encontraban migrando, esto



correlaciona con un estudio similar en donde se observa que un RNA de silenciamiento dirigido contra Ezrina disminuye de manera significativa la migración celular debido a que actina no se une a glicoproteínas transmembranales como CD44, además la expresión de algunos marcadores epiteliales como E-Cadherina aumentaron, mientras que la expresión de algunos marcadores mesenquimales como la Vimentina se vieron disminuídos<sup>163</sup>.

## 10.- CONCLUSIONES.

Este trabajo demostró que la sobreexpresión de Cldn-9 en la línea celular de cáncer gástrico AGS aumenta las capacidades de migración e invasividad celular y la expresión de Ezrina. Cldn-9 aumenta significativamente la migración e invasividad celular y por ende la expresión de Ezrina en estructuras como los filopodios, lo que sugiere que el rearrreglo del citoesqueleto y la formación de los filopodios se encuentran mediados por Ezrina. La presencia de IL-8 en células AGS-Cldn-9 indujo la expresión de marcadores asociados a la TEM y promovió la redistribución subcelular de Ezrina de regiones perinucleares a citoplasmáticas y membranales. Tomando en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo se puede sugerir a Cldn-9 y Ezrina como marcadores moleculares tempranos en el desarrollo de cáncer gástrico. Sin embargo, aún faltan estudios para dilucidar el mecanismo molecular por el cual están relacionados Cldn-9, Ezrina e IL-8.

## 11.- PERSPECTIVAS.

- Bloquear los receptores de IL-8 CXCR 1/2 y demostrar que no existe un aumento en la expresión de Ezrina.
- Utilizar un RNA de interferencia contra Ezrina en células AGS-Cldn-9 y demostrar que la migración y la invasión disminuye.
- Determinar si Cdc42 se encuentra involucrada en la activación de Ezrina.
- Determinar si Cldn-9 promueve la fosforilación de Ezrina a través de la vía de Tyk2/STAT-3.



ANEXO.

**DMEM**

Disolver 1 sobre de medio en 800mL de agua desionizada, adicionar 2g de  $\text{NaHCO}_3$  y ajustar pH a 7.4. Aforar a 1L y esterilizar por filtración.

**DMEM para criopreservación de células:**

Solución de DMEM con DMSO al 5%. Por cada 10 mL de medio total, se utilizan 500  $\mu\text{L}$  de DMSO y 9.5mL de medio suplementado

**PBS 10X pH=7.5**

Para 1L:

Disolver en 800mL de agua desionizada 79g de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ), 15g de fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y 6g de fosfato de sodio monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). Ajustar pH a 7.2 y aforar.

**Buffer de citometría:**

La solución contiene Suero Fetal Bovino al 1% y azida de sodio al 0.09%

Disolver en 500  $\mu\text{L}$  de PBS 5  $\mu\text{L}$  de Suero Fetal Bovino y 0.45g de azida de sodio

**PBS + EDTA:**

Para 1L: Disolver en agua destilada 0.2g de EDTA para obtener una solución con una concentración final de 0.5mM



## REFERENCIAS

1. - Bonilha, V. (2007). Focus on Molecules: Ezrin. *Experimental Eye Research*, 84, 613-614.
2. - Sedzro, D., Bellah, S., Akbar, H. & Billah, S. (2018). Structure and Functions: ERM Protein Family. *Cell Biology*, 6(2), 20-32.
3. - Zhang, Y., Zhang, L., Zhang, G., Li, S., Duan, J., Cheng, J., Ding, G., Zhou, C., Zhang, J., Luo, P., Cai, D., Kuang, L., Zhou, Y., Tong, L., Yu, X., Zhang, L., Xu, L., Yu, L., Shi, X. & Ke, A. (2014). Osteosarcoma metastasis: prospective role of ezrin. *Tumor Biology*, 35, 5055-5059.
4. - Bruce, B., Khanna, G., Ren, L., Landerberg, G., Jirstrom, K., Powell, C., Borczuk, A., Keller, E., Wojno, K. & Meltzer, P. (2007). Expression of the cytoskeleton linker protein ezrin in human cancers. *Clinical Experimental Metastasis*, 24, 69-78.
5. - Konstantinovskiy, S., Davidson, B. & Reich, R. (2012). Ezrin and BCAR1/ p130Cas mediate breast cancer growth as 3-D spheroids. *Clinical Experimental Metastasis*, 29, 527-540.
- 6.- Sarrió, D., Rodríguez, M., Dotor, A., Calero, F., Hardisson, D. & Palacios, J. (2006). Abnormal ezrin localization is associated with clinicopathological features in invasive breast carcinomas. *Breast Cancer Research Treatment*, 98, 71-79.
7. - Giepmans, B. & Ijzendoorn, S. (2009). Epithelial cell–cell junctions and plasma membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788, 820-831.
8. - Knust, E. & Bossinger, O. (2002). Composition and Formation of Intercellular Junctions in Epithelial Cells. *Science*, 298, 1955-1959.
9. - Bardone, S. & Carezzano, J. (2013). The cellular junctions and the emergence of animals. *The Biologist*, 11, 353-363.
10. - Zihni, C., Mills, C. & Balda, M. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature Reviews*, 1-17.
11. - Balda, M. & Matter, K. (2016). Tight junctions as regulators of tissue remodelling. *Cell Biology*, 42, 94-101.
12. - Tsukita, S., Furuse, M. & Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nature Reviews*, 2, 285-293.
13. - Campbell, H., Maiers, J. & DeMali, K. (2017). Interplay between tight junctions & adherens junctions. *Experimental Cell Research*, 61, 1-6.
14. - Shin, K., Fogg, V. & Margolis, B. (2006). Tight Junctions and Cell Polarity. *Cell Dev*, 22, 207-235.
15. - Zendejas, V. & Huerta, E. (2007). Alteración de la integridad de las uniones estrechas en el desarrollo del cáncer. El papel de las claudinas. *Boquimia*, 33(1), 19-29.



16. - Singh, A., Uppada, S. & Dhawan, P. (2017). Claudin proteins, outside-in signaling, and carcinogenesis. *Pflugers Arch.*, 469(1), 69-75.
17. - Tabariès, S. & Siegel, P. (2017). The role of claudins in cancer metastasis. *Oncogene*, 36, 1176-1190.
18. - Singh, A. & Dhawan, P. (2015). Claudins and cancer: Fall of the soldiers entrusted to protect the gate and keep the barrier intact. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 1-8.
19. - Osanai, M., Takasawa, A., Murata, M. & Sawada, N. (2016). Claudins in cancer: bench to bedside. *European Journal of Physiology*, 469(1), 55-67.
20. - Fu, M., Gu, J., Jiang, P., Qian, H., Xu, W. & Zhang, X. (2019). Exosomes in gastric cancer: roles, mechanisms, and applications. *Molecular Cancer*, 18(41), 1-12.
21. - In, H., Embry, M., Gordon, L., Schechter, C., Rosett, J., Castle, P., Kemeny, M. & Rapkin, B. (2018). Can a gastric cancer risk survey identify high-risk patients for endoscopic screening? A pilot study. *Journal of surgical research*, 227, 246-256.
22. - Li, M., Shen, J., Xiao, Z., Wu, X. & Cho, C. (2017). A new look of gastric cancer from epidemiology to clinical management., *Arch Dig Disord*, 1(2), 4-7.
23. - Patel, T., Roy, S. & Ravi, R. (2017). Gastric cancer and related epigenetic alterations. *Ecancer medicalscience*, 11(714), 1-13.
- 24.- Piazuelo, M. & Correa, P. (2013). Gastric cancer: Overview. *Colomb Med*, 44(3), 192-201.
25. - Figueiredo, C., Constanza, M., Leite, M., Pananá, E., Rabkin, C. & Machado, J. (2017). Pathogenesis of Gastric Cancer: Genetics and Molecular Classification. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 277-304.
26. - Van Cutsem, E., Sagaert, X., Topal, B., Haustermans, K. & Prenen, H. (2016). Gastric cancer. *Lancet*, 388, 2654-2664.
27. - Zhao, Y., Feng, F. & Zhou, Y. (2015). Stem cells in gastric cancer. *World J Gastroenterology*, 21(1), 112-123.
28. - Castro, S., Marques, J., Figueiredo, C., Machado, J. & Varon, C. (2017). Gastric cancer: Basic aspects. *Wiley*, 22(1), 1-7.
29. - Brungs, D., Aghmesheh, M., Vine, K., Becker, T., Carolan, M. & Ranson, M. (2015). Gastric cancer stem cells: evidence, potential markers, and clinical implications. *World J Gastroenterology*, 51(4), 313-326.
- 30.- Li, K., Dan, Z. & Nie, Q. (2014). Gastric cancer stem cells in gastric carcinogenesis, progression, prevention and treatment. *World J Gastroenterology*, 20(18), 5420-5426.
31. - Lin, D., Guo, Y., Li, Y., Ruan, Y., Zhang, M., Jin, X., Yang, M., Lu, Y., Song, P., Zhao, S., Dong, B., Xie, Y., Dang, Q. & Quan, C. (2017). Bioinformatic analysis reveals potential properties of human Claudin-6 regulation and functions. *Oncology reports*, 38, 875-885.





- 32.-** Huerta, E., Torres, A. & Montaña, L. (2013). CLDN6 (claudin 6). *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* 6, 396–399.
- 33. -** Huerta, E., Torres, A. & Montaña, L. (2013). CLDN9 (claudin 9). *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* 17, 400–403.
- 34. -** Nokano, Y., Kim, S., Kim, H., Sanneman, J., Zhang, Y., Smith, R., Marcus, D., Wangemann, P., Nessler, R. & Bánfi, B. (2009). A Claudin-9–Based Ion Permeability Barrier Is Essential for Hearing. *Plos Genetics*, 5(8), 1-16.
- 35. -** Zendejas, V., Theez, A., Morales, B., Fortoul, T., Montaña, L. & Huerta, E. (2011). Claudin-6, 7, or 9 Overexpression in the Human Gastric Adenocarcinoma Cell Line AGS Increases Its Invasiveness, Migration, and Proliferation Rate. *Informa Healthcare*, 29(1), 1-11.
- 36.-** Kwon, M. (2013). Emerging Roles of Claudins in Human Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 18148-18180.
- 37.-** Martínez, A., Vera, J., Holguin, A., Montaña, L. & Huerta, E. (2016). Claudin-6 enhances cell invasiveness through claudin-1 in AGS human adenocarcinoma gastric cancer cells. *Experimental Cell Research*, 350(1), 226-235.
- 38.-** Huerta, E., Fortoul, T., Gorráez, T., Garcia, X., Alvarez, G., Zavala, V. & Montaña, L. (2010). Distribution and Expression Pattern of Claudins 6, 7, and 9 in Diffuse- and Intestinal-Type Gastric Adenocarcinomas. *J Gastrointest Canc.*, 41(52), 52-59.
- 39.-** Sharma, R., Chheda, Z., Purkayastha, B., Gutierrez, J., Jala, V. & Haribabu, B. (2015). A spontaneous metastasis model reveals the significance of claudin-9 overexpression in lung cancer metástasis. *Clin Exp Metastasis*, 33(3), 263-275.
- 40.-** Murata, M. (2018). Inflammation and cancer. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 23(50), 1-8.
- 41.-** Chiba, T., Marusawa, H. & Ushijima, T. (2012). Reviews in basic and clinical gastroenterology and hepatology. *Gastroenterology*, 143(3), 550-563.
- 42.-** Valenzuela, M., Canales, J., Corvalán, A. & Quest, A. (2007). Helicobacter pylori -induced inflammation and epigenetic changes during gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterology*, 21(45), 12742-12756.
- 43.-** Senol, K., Özkan, M., Vural, S. & Tez, M. (2014). The Role of Inflammation in Gastric Cancer. *Springer Basel*, 81, 235-257.
- 44.-** Fan, Y., Mao, R. & Yang. (2013). NF-κB and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein Cell*, 4(3), 176-185.
- 45.-** Alfaro, C., Sanmamed, M., Ruíz, M., Teijeira, Á., Oñate, C., Gonzáles, A., Ponz, M., Schalper, K., Gracia, J. & Melero, I. (2017). Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up. *Cancer Treatment Reviews*, 60, 24-31.
- 46.-** Sarvaiya, P., Guo, D., Ulasov, I., Gabikian, P. & Lesniak, M. (2013). Chemokines in tumor progression and metástasis. *Oncotarget*, 4(12), 2171-2185.



- 47.- Akdis, M., Aab, A., Altunbulakl, C., Azkur, K., Costa, R., Cramer, R., Duan, S., Eiwegger, T., Eljaszewicz, A., Ferstl, R., Garbani, R., Globinska, A., Hess, L., Huitema, C., Kubo, T., Konieczna, P., Kovacs, N., Kucuksezer, U., Meyer, N., Morita, H., Olzhausen, J., O'Mahony, L., Pezer, M., Prati, M., Rebane, A., Rhyner, C., Rinaldi, A., Sokolowska, M., Stanic, B., Sugita, K., Treis, A., Veen, W., Wanke, K., Wawrzyniak, M., Wawrzynia, P., Wirz, O., Zakzuk, J. & Akdis, C. (2016). Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor b, and TNF-a: Receptors, functions, and roles in diseases. *Allergy Clin Immunology*, 138(4), 984-1010.
- 48.- Waugh, J. & Wilson, C. (2008). The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Molecular Pathways*, 14(21), 6735- 6741.
- 49.- Dominguez, C., Justin, D. & Palena, C. (2017). Epithelial-mesenchymal transition and inflammation at the site of the primary tumor. *Semin Cancer Biol.* 47, 1-20.
- 50.- Son, H. & Moon, A. (2010). Epithelial-mesenchymal Transition and Cell Invasion. *Toxicology. Res.* 26(4), 245-252.
- 51.- Das, V., Bhattacharya, S., Chikkaputtaiah, C., Hazra, S. & Pal, M. (2018). The basics of epithelial–mesenchymal transition (EMT): A study from a structure, dynamics, and functional perspective. *J Cell Physiol.*, 1-21.
- 52.- Dongre, A. & Weinberg, R. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20, 69-84.
- 53.- Stone, R., Pastar, I., Ojeh, N., Chen, V., Liu, S., Garzon, K. & Canic, M. (2016). Epithelial-Mesenchymal Transition in Tissue Repair and Fibrosis. *Cell Tissue Res.*, 365(3), 1-22.
- 54.- Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 15(3), 1-46.
- 55.- Chen, T., You, Y., Jiang, H. & Wang, Z. (2017). Epithelial-mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation and tumorigenesis. *J Cell Physiol.*, 232(12), 1-21.
- 56.- Zhu, Q., Ma, C., Wang, Q., Song, Y. & Lv, T. (2015). The role of TWIST1 in epithelial-mesenchymal transition and cancers. *Tumor Biology*, 37, 185-197.
- 57.- Xia, P. & Xu, X. (2017). Epithelial–mesenchymal transition and gastric cancer stem cell. *Tumor Biology*, 39(5), 1-5.
- 58.- Yao, D., Dai, C. & Peng, S. (2011). Mechanism of the Mesenchymal–Epithelial Transition and Its Relationship with Metastatic Tumor Formation. *Mol Cancer Res.*, 9(12), 1608-1620.
- 59.- Vaquero, J., Guedj, N., Clapéron, A., Boildoires, T., Paradis, V. & Fouassier, L. (2016). *Journal of Hepatology*, 66, 424-441.
- 60.- Natalwala, A., Spychal, R. & Tselepis, C. (2008). Epithelial-mesenchymal transition mediated tumorigenesis in the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterology*, 28(14), 3792- 3797.



- 61.- Peng, Z., Wang, C., Fang, E., Wang, G. & Tong, Q. (2014). Role of epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer initiation and progression. *World J Gastroenterology*, 20(18), 5403-5410.
- 62.- Huber, M., Kraut, N. & Beug, H. (2005). Molecular requirements for epithelial–mesenchymal transition during tumor progression. *Current Opinion in Cell Biology*, 17, 548-558.
- 63.- Wang, Y., Shi, J., Chai, K., Xuhua, Y. & Zhou, B. (2013). The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets*, 13(9), 963-972.
- 64.- Carmichael, C. & Haigh, J. (2017). The Snail Family in Normal and Malignant Haematopoiesis. *Cells Tissues Organs*, 203, 82-98.
- 65.- Nieto, M. (2002). The Snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Molecular cell biology*, 3, 155-166.
- 66.- Muqbil, I., Wu, J., Aboukameel, A., Mohammad, R. & Azmi, A. (2014). Snail nuclear transport: The gateways regulating epithelial-to-mesenchymal transition? *Seminars in Cancer Biology*, 27, 39-45.
- 67.- Lin, Y., Dong, C. & Zhou, B. (2014). Epigenetic Regulation of EMT: The Snail Story. *Curr Pharm Des.*, 20(11), 1698-1705.
- 68.- Becker, K., Rosivatz, E., Blechschmidt, K., Sarbia, M. & Höfler, H. (2007). Analysis of the E-Cadherin Repressor Snail in Primary Human Cancers. *Cells Tissues Organs*, 185, 185-204.
- 69.- Kaufhold, S. & Bonavida, B. (2014). Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 33(62), 1-19.
- 70.- Herreros, A., Peiró, S., Nassour, M. & Savagner, P. (2010). Snail Family Regulation and Epithelial Mesenchymal Transitions in Breast Cancer Progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15, 135-147.
- 71.- Gimeno, A. & Nieto, A. (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*, 132, 3151-3161.
- 72.- Zheng, H. & Kang, Y. (2014). Multilayer control of the EMT master regulators. *Oncogene*, 33, 1755-1763.
- 73.- Khan, A., Chen, H., Zhang, D. & Fu, J. (2013). Twist: a molecular target in cancer therapeutics. *Tumor Biol.*, 34, 2497-2506.
- 74.- Cakouros, D., Raices, R., Gronthos, S. & Glackin, C. (2010). Twist-ing Cell Fate: Mechanistic Insights Into the Role of Twist in Lineage Specification/Differentiation and Tumorigenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 110, 1288-1298.
- 75.- Barnes, R. & Firulli, A. (2009). A twist of insight - the role of Twist-family bHLH factors in development. *Int J Dev Biol.*, 53(7), 909-924.
- 76.- Yang, M. & Wu, K. (2008). TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): Implications in metastasis and development. *Cell Cycle*. 7(14), 2090-2096.



- 77.-** Wallerand, H., Pasticier, G., Ravaud, A., Ballanher, P., Reiter, R. & Ferriere, J. (2010). The epithelial-mesenchymal transition-inducing factor TWIST is an attractive target in advanced and/or metastatic bladder and prostate cancers. *Urologic Oncology*, 28, 473-479.
- 78.-** Cabrera, E., Safe, B. & Ga, G. (2013). The Role of Transcription Factor TWIST in Cancer Cells. *J Genet Syndr Gene Ther.*,4(1), 1-7.
- 79.-** Baulida, J. (2017). Epithelial-to-mesenchymal transition transcription factors in cancer-associated fibroblasts. *Molecular Oncology*, 11, 847-859.
- 80.-** Mladinich, M., Ruan, D. & Chan, C. (2016). Tackling Cancer Stem Cells via Inhibition of EMT Transcription Factors. *Stem Cells International*, 20(16), 1-10.
- 81.-** Norozi, F., Ahmadzadeh, A., Shahjahani, M., Shahrabi, S. & Saki, N. (2015). Twist as a new prognostic marker in hematological malignancies. *Clin Transl Oncol.*, 18(2), 113-124.
- 82.-** Zhao, Z., Rahman, M., Chen, Z. & Shin, D. (2017). Multiple biological functions of Twist1 in various cancers. *Oncotarget*, 8(12), 20380-20393.
- 83.-** Pei, H., Li, Y., Liu, M. & Chen, Y. (2017). Targeting Twist expression with small molecules. *Med Chem Commun.*, 8, 268-275.
- 84.-** Ansieau, S., Moret, A., Hinkal, G., Bastid, J. & Puisieux, A. (2010). TWISTing an embryonic transcription factor into an oncoprotein. *Oncogene*, 29, 3173-3184.
- 85.-** Saxena, M., Stephens, M., Pathank, H. & Rangarajan, A. (2011). Transcription factors that mediate epithelial–mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell Death and Disease*, 2(7), 1-13
- 86.-** Bruner, H. & Derkden, P. (2018). Loss of E-Cadherin-Dependent Cell –Cell Adhesion and the Development and Progression of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 10(3), 1-20.
- 87.-** Bruser, L. & Bogdan, S. (2017). Adherens Junctions on the Move—Membrane Trafficking of E-Cadherin. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 9(3), 1-18.
- 88.-** Wong, S., Fang, C., Chuah, L., Leong, C. & Ngail, S. (2018). E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*, 121, 11-22.
- 89.-** Canel, M., Serrels, A., Frame, M. & Brunton, V. (2013). E-cadherin–integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *Journal of Cell Science*, 126, 393-401.
- 90.-** Mendonsa, A., Na, T. & Gumbiner, B. (2018). E-cadherin in Contact Inhibition and Cancer. *Oncogene*, 37(35), 4769-4780.
- 91.-** Giehl, K. & Menke, A. (2008). Microenvironmental regulation of E-cadherin-mediated adherens junctions. *Frontiers in Bioscience*, 13, 3975-3985.
- 92.-** Chan, A. (2006). E-cadherin in gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 12(2), 199-203.
- 93.-** Liu, X. & Chu, K. (2014). E-Cadherin and Gastric Cancer: Cause, Consequence, and Applications. *BioMed Research International*, 20(14), 1-9.



- 94.-** Miyamoto, Y., Sakane, F. & Hashimoto, K. (2015). N-cadherin-based adherens junction regulates the maintenance, proliferation, and differentiation of neural progenitor cells during development. *Cell Adhesion & Migration*, 9(3), 183-192.
- 95.-** Derycke, L. & Bracke, M. (2004). N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int. J. Dev. Biol.*, 48, 463-476.
- 96.-** Brusés, J. (2006). N-Cadherin Signaling in Synapse Formation and Neuronal Physiology. *Molecular Neurobiology*, 33(3), 237-252.
- 97.-** Mariotti, A., Perotti, A., Sessa, C. & Ruegg, C. (2007). N-cadherin as a therapeutic target in cancer. *Expert Opin. Investig. Drug*, 16(4), 451-465.
- 98.-** Warga, R. & Kane, D. (2007). A role for N-cadherin in mesodermal morphogenesis during gastrulation. *Developmental Biology*, 310, 211-225.
- 99.-** Blaschuk, O. (2015). N-cadherin antagonists as oncology therapeutics. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 370, 1-4.
- 100.-** Wheelock, M., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y. & Johnson, K. (2007). Cadherin switching. *Journal of Cell Science*, 121(6), 727-735.
- 101.-** Seyfried, T. & Huysentruyt, L. (2013). On the Origin of Cancer Metastasis. *Crit Rev Oncog.*, 18(1-2), 43-73.
- 102.-** Valastyan, S. & Weinberg, R. (2011). Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell*, 147(2), 275-292.
- 103.-** Nguyen, D., Bos, P. & Massagué, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature Reviews Cancer*, 9(4), 274-284.
- 104.-** Mohammad, A., Shiri, S. & Farsinejad, S. (2014). Metastasis review: from bench to bedside. *Tumor Biology*, 35(9), 8483-8523.
- 105.-** Kozłowski, J., Kozłowska, A. & Kocki, J. (2015). Breast cancer metastasis – insight into selected molecular mechanisms of the phenomenon. *Postepy Hig Med Dosw.*, 69, 447-451.
- 106.-** Chiang, A. & Massagué, J. (2008). Molecular Basis of Metastasis. *N Engl J Med.*, 359(26), 2814-2813.
- 107.-** Jolly, M., Ware, K., Gilja, S., Somarelli, J. & Levine, H. (2017). EMT and MET: necessary or permissive for metastasis? *Molecular Oncology*, 11, 755-769.
- 108.-** Micalizzi, D., Haber, D. & Maheswaran, S. (2017). Cancer metastasis through the prism of epithelial-to-mesenchymal transition in circulating tumor cells. *Molecular Oncology*, 11, 770-780.
- 109.-** Karlsson, M., Gonzalez, S., Welin, J. & Fuxe, J. (2017). Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis through the lymphatic system. *Molecular Oncology*, 11, 781-791.
- 110.-** Lambert, A., Pattabiraman, D. & Weinberg, R. (2017). EMERGING BIOLOGICAL PRINCIPLES OF METASTASIS. *Cell*, 168(4), 670-691.



- 111.-** Nandy, S. & Lakshmanaswamy, R. (2017). Cancer Stem Cells and Metastasis. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 137-176.
- 112.-** Campbell, K. & Casanova, J. (2016). A common framework for EMT and collective cell migration. *Development*, 143, 4291-4300.
- 113.-** Bill, R. & Christofori, G. (2015). The relevance of EMT in breast cancer metastasis: Correlation or causality? / *FEBS Letters*, 589, 1577-1587.
- 114.-** Friedl, P. & Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(7), 445-457.
- 115.-** Lintz, M., Muñoz, A. & King, C. (2017). The Mechanics of Single Cell and Collective Migration of Tumor Cells. *Journal of Biomechanical Engineering*, 139, 1-9.
- 116.-** Arpin, M., Chirivino, D., Naba, A. & Zwaenepoel, I. (2011). Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration. *Landes Bioscience*, 5(2), 199-206.
- 117.-** Clucas, J. & Valderrama, F. (2015). ERM proteins in cancer progression. *Journal of Cell Science*, 127, 267-275.
- 118.-** Kawaguchi, K., Yoshida, S., Hatano, R. & Asano S. (2017). Pathophysiological Roles of Ezrin/Radixin/Moesin Proteins. *Biol. Pharm. Bull.*, 40, 381-390.
- 119.-** Ponuwei, G. (2016). A glimpse of the ERM proteins. *Journal of Biomedical Science*, 23(35), 2-6.
- 120.-** Pore, D. & Gupta, N. (2015). Ezrin-Radixin-Moesin family proteins in the regulation of B cell immune response. *Crit Rev Immunol.*, 35(1), 15-31.
- 121.-** Bretscher, A. (1999). Regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(1), 109-116.
- 122.-** Fehon, R., McClatchey, A. & Bretscher, A. (2010). Organizing the Cell Cortex: The role of ERM proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 11(4), 276-287.
- 123.-** Niggli, V. & Rossy, J. (2008). Ezrin/radixin/moesin: Versatile controllers of signaling molecules and of the cortical cytoskeleton. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40, 344-349.
- 124.-** Bretscher, A., Chambers, D., Nguyen, R. & Reczek, D. (2000). ERM-MERLIN AND EBP50 PROTEIN FAMILIES IN PLASMA MEMBRANE ORGANIZATION AND FUNCTION. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 16, 113-143.
- 125.-** Bretscher, A., Edwards, K. & Fehon, R. (2002). ERM PROTEINS AND MERLIN: INTEGRATORS AT THE CELL CORTEX. *Molecular Cell Biology*, 3, 586-599.
- 126.-** Maniti, O., Carvalho, K. & Picart, C. (2013). Model membranes to shed light on the biochemical and physical properties of ezrin/radixin/moesin. *Biochimie.*, 95(1), 3-11.
- 127.-** McClatchey, A. (2003). Merlin and ERM proteins: unappreciated roles in cancer development? *Nature Reviews Cancer*, 3, 877-883.



- 128.-** Adada, M., Canals, D., Hannun, Y. & Obeid, L. (2014). Sphingolipid regulation of ezrin, radixin, and moesin protein families: implications for cell dynamics. *Biochim Biophys Acta*, 1841(5), 727-737.
- 129.-** Bosanquet, D., Ye, L., Harding, K. & Jiang, W. (2014). FERM family proteins and their importance in cellular movements and wound healing (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 34, 3-12.
- 130.-** Martin, T., Harrison, G., Mensel, R. & Jiang, W. (2003). The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 46, 165-186.
- 131.-** Bretscher, A., Reczek, D. & Berryman, M. (1997). Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures. *Journal of Cell Science*, 110, 3011-3018.
- 132.-** Parnell, E. & Yarwood, S. (2014). Interactions between Epac1 and ezrin in the control of endothelial barrier function. *Biochemical Society Transactions*, 42(2), 274-278.
- 133.-** Ren, L. & Khanna, C. (2014). Role of Ezrin in Osteosarcoma Metastasis. *Current advances in Osteosarcoma*, 804, 181-201.
- 134.-** Fernando, H., Martin, T., Jones, A., Kynaston, H., Mensel, R. & Jiang, W. (2010). Expression of the ERM family members (ezrin, radixin and moesin) in breast cancer. *Experimental and therapeutic medicine*, 1, 153-160.
- 135.-** Chuan, Y., Gato, D., Perez, L., Minguez, A., Pang, S., Norstedt, G., Pousette, A. & Morales, A. (2010). Ezrin mediates c-Myc actions in prostate cancer cell invasion. *Oncogene*, 29, 1531-1542.
- 136.-** Caron, T., Scott, K., Fox, J. & Hagen, F. (2015). Tight junction disruption: Helicobacter pylori and dysregulation of the gastric mucosal barrier. *World J. Gastroenterology*, 21(40), 11411-11427.
- 137.-** Hong, L., Wu, Y., Feng, J., Yu, S., Li, C., Wu, Y., Li, Z., Cao, L., Wang, F. & Zhang, Y. (2014). Overexpression of the cell adhesion molecule claudin-9 is associated with invasion in pituitary oncocytomas. *Human Pathology*, 45, 2423-2429.
- 138.-** Liu, H., Wang, M., Liang, N. & Guan, L. (2019). Claudin-9 enhances the metastatic potential of hepatocytes via Tyk2/Stat3 signaling. *Turk J. Gastroenterology*, 30(8), 722-731.
- 139.-** Lin, Z., Zhang, X., Liu, Z., Liu, Q., Wang, L., Lu, Y., Liu, Y., Wang, M., Yang, M., Jin, X. & Quan, C. (2013). The distinct expression patterns of claudin-2, -6, and -11 between human gastric neoplasms and adjacent non-neoplastic tissues. *Diagnostic Pathology*, 8(133), 1-7.
- 140.-** Bourzac, K., Botham, C. & Guillemin, K. (2007). Helicobacter pylori CagA Induces AGS Cell Elongation through a Cell Retraction Defect That Is Independent of Cdc42, Rac1, and Arp2/3. *Infection and immunity*, 75(3), 1203-1213.
- 141.-** Nakamura, N., Oshiro, N., Fukata, Y., Amano, M., Fukata, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Leung, T., Lim, L. & Kaibuchi, K. (2000). Phosphorylation of ERM proteins at filopodia induced by Cdc42. *Genes to Cells*, 5, 571-581.



- 142.-** Mihara, F., Mukaino, M., Shinozaki, M., Kumamaru, H., Kawase, S., Baudoux, M., Ishibashi, T., Kawabata, S., Nishiyama, Y., Sugai, K., Yasutake, K., Okada, S., Nakamura, M. & Okano, H. (2017). Regulation of RhoA by STAT3 coordinates glial scar formation. *J.Cell Biology*, 216(8), 2533-2550.
- 143.-** Derouiche, A. & Geiger, K. (2019). Perspectives for Ezrin and Radixin in Astrocytes: Kinases, Functions and Pathology. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 1-24.
- 144.-** Fais, S. (2004). A role for ezrin in a neglected metastatic tumor function. *Trends in Molecular Medicine*, 10(6), 249-250
- 145.-** Furutani, Y., Matsuno, H., Kawasaki, M., Sasaki, T., Mori, K. & Yoshihara, Y. (2007). Interaction between Telencephalin and ERM Family Proteins Mediates Dendritic Filopodia Formation. *The Journal of Neuroscience*, 27(33), 8866-8876.
- 146.-** Lamb, R., Ozanne, B., Roy, C., McGarry, L., Stipp, C., Mangeat, P. & Jay, D. (1997). Essential functions of ezrin in maintenance of cell shape and lamellipodial extension in normal and transformed fibroblasts. *Current Biology*, 7, 682-688.
- 147.-** Li, L., Xie, Y., Xie, Y., Liao, L., Xu, X., Zhang, Q., Zeng, F., Tao, L., Xie, W., Xie, J., Xu, L. & Li, E. (2017). Ezrin Ser66 phosphorylation regulates invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma cells by mediating filopodia formation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 88, 162-171.
- 148.-** Gandy, K., Canals, D., Adada, M., Wada, M., Roddy, P., Snider, A., Hannun, Y. & Obeid, L. (2013). Sphingosine 1-Phosphate induces filopodia formation through S1P2R activation of ERM proteins. *Biochemistry Journal*, 449(3), 661-672.
- 149.-** Long, X., Ye, Y., Zhang, L., Liu, P., Yu, W., Wei, F., Ren, X. & Yu, J. (2016). IL-8, a novel messenger to cross-link inflammation and tumor EMT via autocrine and paracrine pathways (Review). *International Journal of Oncology*, 48, 5-12.
- 150.-** Palena, C., Hamilton, D. & Fernando, R. (2012). Influence of IL-8 on the epithelial–mesenchymal transition and the tumor microenvironment. *Future Oncol.*, 8(6), 713-722.
- 151.-** Zhao, Z., Wang, S., Lin, Y., Miao, Y., Zeng, Y., Nie, Y., Guo, P., Jiang, G. & Wu, J. (2017). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: Role of the IL-8/IL-8R axis (Review). *Oncology Letters*, 13, 4577-4584.
- 152.-** Gheldof, A. & Berx, G. (2013). Cadherins and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 116, 317-336.
- 153.-** Johnson, E., Theisen, C., Johnson, K. & Wheelock, M. (2004). R-cadherin Influences Cell Motility via Rho Family GTPases. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(30), 31041-31049.
- 154.-** Torres, A., Chavarria, C., Gallardo, F., Montaña, F. & Rendon, H. (2016). IL-8 Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition through pERK1/2 in AGS Cells. *Journal of Gastroenterology and Its Complications*, 1(1), 1-10.
- 155.-** Park, S., Shin, J. & Kee, S. (2017). E-cadherin expression increases cell proliferation by regulating energy metabolism through nuclear factor- $\kappa$ B in AGS cells. *Cancer Science*, 108, 1769-1777.





- 156.-** Caldeira, J., Figueiredo, J., Pereira, C., Carneiro, P., Moreira, A., Pinto, M., Relvas, J., Carneiro, F., Barbosa, M., Casares, F., Janody, F. & Seruca, R. (2015). E-cadherin-defective gastric cancer cells depend on Laminin to survive and invade. *Human Molecular Genetics*, 4(20), 5891-5900.
- 157.-** Wang, A., Lu, C., Ning, Z., Gao, W., Xie, Y., Zhang, N., Liang, J., Abbasi, F., Yan, Q. & Liu, J. (2017). Tumor-associated macrophages promote Ezrin phosphorylation mediated epithelial-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma through FUT4/LeY up-regulation. *Oncotarget*, 8(17), 28247-28259.
- 158.-** Madan, R., Gensler, M., Schlecht, N., Elias, K., Gorbovitsky, E., Belbin, T., Mahmood, R., Breining, D., Qian, H., Childs, G., Locker, J., Smith, R., Haigentz, M., Moore, F. & Prystowsky, M. (2006). Differential tissue and subcellular expression of erm proteins in normal and malignant tissues: cytoplasmic ezrin expression has prognostic significance for head and neck squamous cell carcinoma. *Head & Neck*, 28, 1018-1027.
- 159.-** Kong, J., Liu, S., Jin, H., Shang, Y., Quan, C., Li, Y. & Lin, Z. (2013). High expression of ezrin predicts poor prognosis in uterine cervical cancer. *BMC Cancer*, 13(520), 1-8.
- 160.-** Gao, S., Li, E., Cui, L., Lu, X., Meng, L., Yuan, H., Xie, J., Du, Z., Pang, J. & Xu, L. (2009). Sp1 and AP-1 Regulate Expression of the Human Gene *VIL2* in Esophageal Carcinoma Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284(12), 7995-8004.
- 161.-** Ma, H., Liu, X. & Liang, C. (2016). Inflammatory microenvironment contributes to epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(29), 6619-6628.
- 162.-** Yeung, K. & Yang, J. (2016). Epithelial–mesenchymal transition in tumor metastasis. *Molecular Oncology*, 11, 28-39.
- 163.-** Li, Y., Lin, Z., Chen, B., Jiang, Z., Zhou, T., Hou, Z. & Wang, Y. (2017). Ezrin/NF-κB activation regulates epithelial- mesenchymal transition induced by EGF and promotes metastasis of colorectal cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92, 140-148.

