



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

“Análisis bioinformático de la expresión diferencial de genes de línea celular de adenocarcinoma gástrico (AGS) que sobre expresa a Claudina 6 (CLDN6)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Alejandro Alarcón del Carmen



DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Erika Patricia Rendón Huerta

Ciudad Universitaria, CD. MX. 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del Jurado.

1.- Datos del alumno

Nombre: Alarcón Del Carmen Alejandro.

Teléfono: 5554704273

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

312234498

Presidenta:

Dra. Ana Cristina Torres Martínez.

Vocal:

M. en C. Sergio Hernández López.

Secretaria:

Dra. Erika Patricia Rendón Huerta.

Suplente 1:

Biól. Rafael López Martínez

Suplente 2:

Dr. En C. B. Enrique Macario Herrera Medina.

<< No conoceré el miedo. El miedo mata la mente. El miedo es la pequeña muerte que conduce a la destrucción total. Afrontaré mi miedo, permitiré que pase sobre mí y a través de mí y, cuando haya pasado, giraré el ojo de mi mente para escrutar su camino, allá, donde haya pasado el miedo ya no habrá nada, solo estaré yo >>

Letanía contra el miedo, Frank Herbert, Dune.

Agradecimientos

A mi papá, por enseñarme siempre que la simpleza de una voluntad decidida supera todos los artilugios sofisticados de la mente, a mi hermana, por el profundo e intenso querer fraternal, a mi madre, que no esta aquí ahora para ver este momento, pero que mira eternamente con sus ojos tan vivaces.

A mis amigos más cercanos, Frank, Pau y Brandon, por ser motor de calidez y apoyo durante tantos años.

A la Dra. Erika por su paciencia infinita, por su calidez humana insuperable y sus consejos de vida, al Dr. Montaña por tanto humor, tanta vitalidad y el disco de Jazz.

A Juan Arias del Ángel, que los ángeles guíen tu camino siempre.

A Silvana, por cada momento de acompañamiento, por cada momento de apoyo.

Índice	
Abreviaturas	6
Resumen.....	7
Introducción	9
Hallmarks del cáncer	9
Cáncer gástrico.....	14
Cáncer gástrico y uniones estrechas.....	15
Claudinas y cáncer gástrico	16
Microarreglos de DNA y cáncer	18
Justificación.....	21
Objetivos	22
Objetivo general	22
Objetivos particulares	22
Metodología.....	23
1. Sobreexpresión de CLDN6 en línea celular AGS.	23
1.1 Cultivo de líneas celulares AGS-WT y AGS-CLDN6.	23
1.2 Extracción de RNA.	23
1.3 Hibridación y escaneo de microarreglos	24
2. Procesamiento de datos	24
3. Análisis de las coordenadas principales (PCoA)	26
4. Filtrado de genes falso-positivos por baja varianza a través de las muestras.	26
5. Obtención de genes diferencialmente expresados.	26
6. Análisis de enriquecimiento (GSEA).	29
Resultados	31
Discusión	45
Conclusiones	50
Referencias.....	51
Anexo 1:	61
Anexo 2.....	63

Abreviaturas

BP	Biological process
CC	Cellular compartment CC
CGH	Hibridación genómica comparativa
CLDN1	Claudina 1
CLDN6	Claudina 6
CSC	Cancer Stem Cells
CTH	Cistationina-gama liasa
EGFR	Factor de crecimiento epidermal
ERS	Estrés del retículo endoplásmico
GDE	Genes diferencialmente expresados
GLOBOCAN	
JAM	Junction Adhesión Molecule
limma	Linear Models for Microarray
MM	Mismatch probes
mRNA	RNA mensajero
NK	Natural Killer
PCoA	Análisis de coordenadas principales
PM	Perfect match probes
RE	Retículo Endoplásmico
RMA	Robust Multiarray Average
TEM	Transición Epitelio Mesénquima
TGCA	Atlas del Genoma del Cáncer TGCA
TGF	Factor de Crecimiento Tumoral beta
UE	Uniones estrechas

Resumen

El cáncer gástrico es uno de los problemas de salud pública más relevantes en el mundo y en México, tan solo en el 2020 se reportaron más de 1 millón de casos nuevos detectados, ocasionando el fallecimiento de 769 mil personas durante ese año. A pesar de ser un problema de relevancia mundial, el cáncer permanece como uno de los padecimientos más complejos y difíciles de comprender, en muchos casos, los pacientes tratados contra la enfermedad recaen con nuevos tumores locales e incluso con metástasis avanzada a sitios distales del tumor original. Una de las propuestas para explicar este fenómeno describe la existencia de un grupo celular dentro del tumor, conocido como *Cancer Stem Cells* (o CSC), que tienen la capacidad de resistir los tratamientos farmacológicos además de poseer características troncales que les brindan plasticidad genómica, resistencia al estrés oxidativo e incluso evasión del sistema inmune y capacidad metastásica aumentada.

Algunos de los tipos de cáncer que muestran el comportamiento previamente descrito son los adenocarcinomas gástricos, especialmente aquellos que presentan anomalías en la expresión de proteínas de unión estrecha como son las claudinas, de forma particular se ha asociado la presencia excesiva de la Claudina 6 con un fenotipo tumoral más agresivo, invasivo y proliferativo, sin embargo se desconoce a nivel de transcriptoma que alteraciones ocurren a raíz de esta sobre expresión, a su vez se desconoce si la sobre expresión de esta claudina puede alterar la expresión de genes que desencadenen procesos biológicos relacionados con la troncalidad tumoral.

Debido a lo anterior este trabajo propuso el estudio de aquellos genes alterados tras la sobre expresión de a Claudina 6 en una línea celular de adenocarcinoma gástrico (AGS) mediante el uso de microarreglos. Se encontraron un total de 47 genes diferencialmente expresados en la línea AGS que sobre expresaba Claudina 6, estos principalmente relacionados con el aumento de la hipoxia celular así como con la activación de vías de estos del retículo endoplasmático, posteriormente se hicieron análisis de enriquecimiento donde se encontró que hay una amplia variedad de procesos biológicos relacionados con la adquisición de un fenotipo de CSC como incremento en la angiogénesis, en el reclutamiento de vasos sanguíneos, evasión del sistema

inmune, resistencia a fármacos anticancerígenos y en el proceso de transición epitelio mesénquima (o TEM) que esta involucrada con la adquisición de capacidades migratoria e invasivas. Lo anterior concluye que la Claudina 6 genera un fenotipo relacionado a las CSC, generando microambientes hipóxicos y de estrés celular que desatan la activación de procesos relacionados con la troncalidad tumoral

Introducción

Las enfermedades no transmisibles matan a 41 millones de personas al año, 71% de las muertes a nivel mundial (WHO, 2019). Se predice que el cáncer alcance el primer o segundo lugar como causa de muerte a nivel mundial, así como también se considere la principal barrera para el aumento en la expectativa de vida durante el siglo 21 en todo el mundo (Bray et al., 2018). El término genérico “cáncer” se refiere a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. A grandes rasgos y de forma general, es una enfermedad que consta de la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites físicos y tisulares habituales pudiendo así invadir tejidos adyacentes o propagarse en otros órganos del cuerpo, este proceso recibe el nombre de metástasis y compone la causa principal de muerte por cáncer (WHO, 2019).

Los procesos de replicación celular están regulados de forma precisa y continua durante todas las etapas de la vida y del desarrollo del organismo. La disrupción de estos procesos por diversos factores (ambientales, hereditarios, biológicos y químicos) puede generar daños a nivel de DNA que pueden provocar la generación de células tumorales y éstas a su vez adquieren características que les permiten mantener este fenotipo (NIH, 2019).

Hallmarks del cáncer

Las características de una célula carcinogénica, conocidas como los *hallmarks* del cáncer, fueron descritas por primera vez en el año 2000 por Hanahan y Weingerg (Hanahan y Weinberg, 2000) y se abordan brevemente a continuación (Figura 1).

Mantenimiento de la señal proliferativa. – Los tejidos normales regulan con precisión la producción y liberación de señales de proliferación y crecimiento para dirigir tanto la entrada como la progresión del ciclo celular. Las células cancerígenas alteran la homeostasis de los tejidos, así como del proceso de crecimiento y multiplicación celular mediante la disrupción de estas señales, principalmente mediante factores de crecimiento que se unen a receptores de tirosina cinasa que desatan una cascada de señalización intracelular (Hanahan y Weinberg, 2011).

Como ejemplo de lo anterior podemos encontrar que 40% de los melanomas tienen mutaciones activadoras en la estructura de la proteína *B-Raf* lo que desemboca en la señalización constante de *Raf* hacia la vía de MAP-cinasas, esto da paso a una serie de fosforilaciones río abajo hasta llegar a las cinasa MEKS que fosforilan a las cinasas ERK1 y ERK2 favoreciendo su traslocación al núcleo donde activan factores de transcripción que fomentan la expresión de genes relacionados con el crecimiento, la diferenciación y la mitosis (Zhang y Liu, 2002).

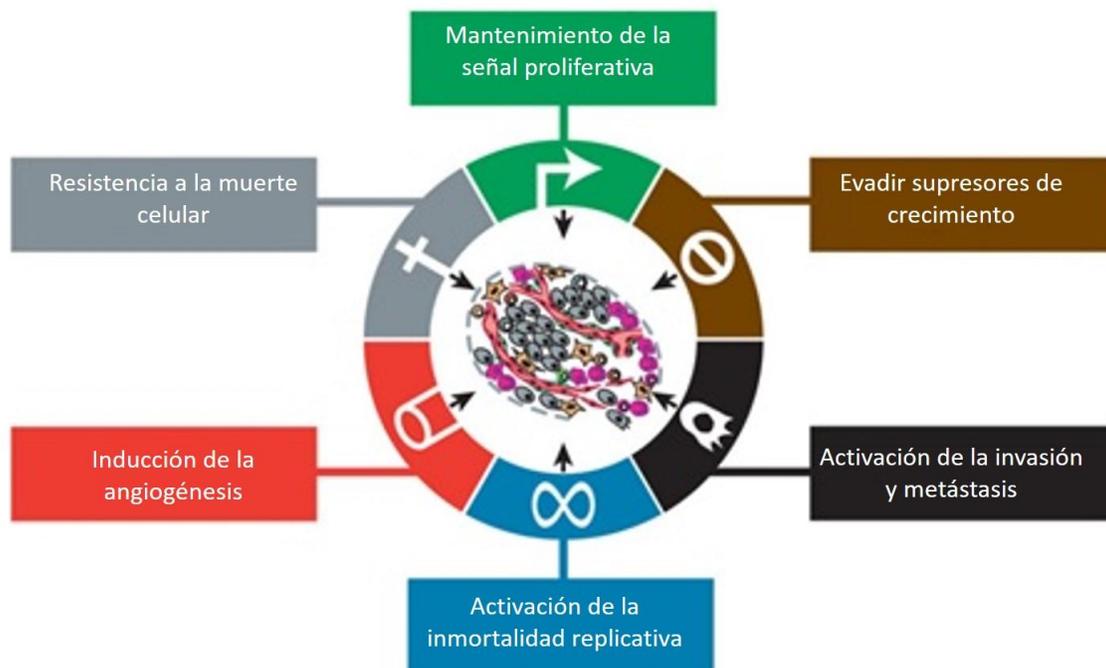


Figura 1.- Hallmarks del cáncer

Se observan los seis hallmarks del cáncer que resumen los cambios que acontecen en la célula en el proceso carcinogénico (Modificado de Hanahan y Weinberg, 2000)

Evasión de supresores de crecimiento. - A la par de las señales proliferativas, las células cancerígenas evitan programas celulares que regulan negativamente la proliferación, muchos de los cuales dependen de la función de genes supresores de tumores (Deepa y Pundir, 2020). Dentro del genoma de las células cancerígenas podemos encontrar típicamente a los genes supresores inactivados de una u otra manera. Ejemplos de genes supresores son aquellos que

codifican para las proteínas RB y TP53 que tienen como función regular el ciclo celular, el crecimiento celular o también la entrada y activación del proceso de apoptosis o senescencia celular (Hanahan y Weinberg, 2011).

Resistencia a la muerte celular. – La muerte celular programada o apoptosis es una barrera celular normal que evita el crecimiento desmedido, así como la proliferación de células dañadas. Durante este proceso, el citoesqueleto, la membrana nuclear y la cromatina se condensan y se fragmentan. La célula se divide en muchos fragmentos conocidos como cuerpos apoptóticos que son posteriormente fagocitados por macrófagos o células adyacentes (Alberts, 2014). Los estímulos que desencadenan la apoptosis son variados sin embargo uno de los más conocidos es la detección de daño en el DNA vía la proteína TP53 que actúa como supresor de tumores (Junttila y Evan, 2009).

Las células cancerígenas han desarrollado varios mecanismos de evasión de la apoptosis, la pérdida o mal funcionamiento de p53, eliminando así uno de los sensores de daño más importantes, el incremento en la expresión de reguladores anti apoptóticos de la familia BCL2 (*B cell lymphoma 2*) así como de señales de supervivencia como el factor de crecimiento insulínico 1 y 2 (Igf 1, Igf 2). Por otro lado, también se ha encontrado una regulación de expresión a la baja de factores pre-apoptóticos como Bax, Bim y Puma (Hanahan y Weinberg, 2011).

Inducción de la angiogénesis. – Al igual que los tejidos sanos del organismo, el tumor requiere una forma de obtener nutrientes, oxígeno y eliminar residuos metabólicos como el dióxido de carbono. Las necesidades anteriores son cubiertas por el proceso de angiogénesis que a grandes rasgos se define como la formación de vasos sanguíneos nuevos que irrigan el tumor y lo conectan con el sistema circulatorio del organismo. Durante el desarrollo embrionario se generan células endoteliales precursoras, conocidas como angioblastos, que tras procesos de migración y diferenciación forman capilaridades nuevas que serán los vasos sanguíneos del embrión, este proceso es conocido como vasculogénesis; en contraste la angiogénesis es la formación de capilaridades a partir de vasos sanguíneos existentes a través de procesos de quimioatracción o estimulación que en este caso surgen del tumor hacia el organismo. El proceso de angiogénesis pasa a un estado quiescente posterior al desarrollo

embrionario sin embargo puede verse activado en sanación de heridas o durante la menstruación de forma temporal (Hanahan y Weinberg, 2011). En los tumores se ha encontrado que el proceso de angiogénesis está permanentemente activado formando de manera constante vasos sanguíneos a partir de los existentes para poder vascularizar toda la zona neoplásica del tumor (Hanahan y Folkman, 1996).

Activación de la inmortalidad replicativa. – Para poder formar tumores macroscópicos, las células cancerígenas necesitan sobrepasar una de las barreras primordiales de la proliferación celular, la senescencia. La senescencia es un programa de regulación de la proliferación que va de la mano con el proceso convencional de envejecimiento, pero también juega un papel importante evitando la proliferación de células dañadas. Los estímulos que la pueden desatar (inclusive de forma prematura) incluyen daño o expresión aberrante de oncogenes, daño al DNA causado por radiación ionizante, especies reactivas de oxígeno y estrés durante el crecimiento celular (Mendelshon, 2015).

El número de veces en las que una célula puede replicarse se regula mediante el acortamiento de telómeros en los extremos de los cromosomas. Estos telómeros son secuencias repetidas de nucleótidos que cumplen una función protectora. Muchos estudios indican que las telomerasas (enzimas encargadas de replicar los telómeros en los extremos cromosómicos) no se expresan en células normales en contraste con una alta expresión encontrada en células tumorales, proponiendo este como un mecanismo de evasión de la senescencia celular adquiriendo la capacidad de replicarse de forma ilimitada (Hiyama et al., 2009).

Activación de la invasión y la metástasis. - La metástasis es un proceso en el que las células tumorales adquieren la capacidad de escapar del tumor primario y conquistar un nuevo microambiente (Alsarraj y Hunter, 2013). El programa de regulación presente durante el desarrollo, conocido como Transición Epitelio Mesénquima (TEM), se ha vuelto motivo de estudio ya que confiere a células epiteliales la capacidad de invadir, resistir la apoptosis y diseminarse. Se sugiere que mediante la TEM las células carcinogénicas podrían estar llevando a cabo sus procesos de invasión y metástasis, facilitando así su invasión a otros órganos (Hanahan y Weinberg, 2011).

Mutaciones e inestabilidad genómica. – Para que una célula pueda ir adquiriendo los *hallmarks* previamente mencionados, se requiere una serie de cambios en su genoma. Esto sugiere que la progresión tumoral tiene múltiples pasos que incluyen la adquisición de genotipos mutantes que confieren alguna ventaja para la supervivencia y crecimiento del tumor (Hanahan y Weinberg, 2013).

Algunas de las mutaciones más comunes son las observadas en genes supresores de tumores como *p53*, *BRAC1* y *BRAC2* que están relacionados a un riesgo elevado de presentar cáncer de ovario y cáncer de mamá, en el caso específico del cáncer gástrico se han reportado mutaciones en los genes *KRAS*, *ARID1A*, *PIK3CA*, *ERBB3*, *PTEN* y *HLA-B*, que en conjunto se consideran factores de alto riesgo respecto al desarrollo de carcinoma gástrico (Ito et al., 2019).

A través de un análisis conocido como hibridación genómica comparativa (CGH) se ha descubierto una ganancia y también pérdida en algunas copias de genes a través de todo el genoma de los varios tipos de tumores, lo que nos muestra una clara pérdida en la habilidad de mantener la integridad genómica de estas células, de igual forma se ha observado que estas zonas del genoma afectadas están relacionadas con la presencia de genes que pueden favorecer la progresión neoplásica (Korkola y Gray 2010).

Evasión del sistema inmune. – El sistema inmune tiene una serie de procesos de vigilancia que de forma normal eliminan a las células cancerígenas, sin embargo, no siempre es eficiente. Las células tumorales han desarrollado mecanismos de evasión para estos procesos (Hanahan y Weinberg, 2011). Un ejemplo es la evasión de las células *Natural Killer* (NK) mediante la expresión de factores como el Factor de Crecimiento Tumoral beta (TGF beta) o mediante la disrupción de la función de sus receptores activadores como el NKG2, también conocido como CD159 (*Cluster of Differentiation 159*) (Bugide et al., 2018).

Promover la inflamación. – El ambiente inflamatorio puede servir como promotor de la adquisición de *hallmarks* por parte del tumor al generar una respuesta que le provee de factores que la favorecen como la formación de especies reactivas de oxígeno y factores de crecimiento en el microambiente tumoral (Hanahan y Weinberg, 2011).

Cáncer gástrico

De acuerdo con estadísticas realizadas por GLOBOCAN (Global Cancer Observatory, 2019) en 2018 el cáncer gástrico ocupó el quinto lugar en número de nuevos casos registrados con 1 033 701 casos lo que representó el 5.6 % de la totalidad global de casos nuevos en ambos sexos y en todas las edades. También se posicionó como el tercer lugar en muertes ocasionadas por cáncer, 8.2% de las muertes registradas para ambos sexos y todas las edades.

En México el cáncer gástrico ocupa el séptimo lugar en nuevos casos registrados y el quinto lugar en muertes relacionadas con cáncer con un total de 6 034 muertes relacionadas a este tipo de cáncer, 7.2 % de la totalidad (Global Cancer Observatory, 2019).

Existen una gran cantidad de factores de riesgo que puede llevar al desarrollo de esta enfermedad, algunos de ellos son infecciones con *Helicobacter pylori*, situación geográfica, hábitos alimenticios, medio ambiente y antecedentes familiares, entre otros (Dittmar, 2015).

De forma particular, el cáncer gástrico se define como el desarrollo de tumores o carcinomas conformados por células con proliferación anormal (así como otros hallmarks del cáncer) en el revestimiento del estómago, este puede ser clasificado de diversas formas, una de ellas se basa en la histología de los tumores desarrollados donde podemos encontrar el subtipo intestinal, difuso e indiferenciado (Lauren, 1965) sin embargo podemos encontrar clasificaciones más modernas donde se incluyen factores histológicos, anatómicos e incluso moleculares. Un ejemplo de lo anteriormente mencionado es la clasificación creada por WHO en el año 2010 donde definen 4 patrones histológicos principalmente, el primer de ellos denominado adenocarcinoma tubular se considera el tipo histológico más común en carcinoma gástrico temprano, tiene a formar estructuras conocidas como polipoides con túbulos ramificados de múltiples tamaños, el segundo tipo de esta clasificación es conocido como adenocarcinoma papilar, es encontrado de igual forma en estadios tempranos del carcinoma gástrico, ocurre en la sección proximal del estómago y esta frecuentemente asociado con metástasis a hígado con un alto grado de invasión a nódulos linfoides (Hu et al., 2012).

El adenocarcinoma mucinoso compone el 10% de los casos registrados e histológicamente se caracteriza por la aparición de bolsas o “piscinas” mucinosas que componen cerca del 50% del volumen del tumor, las células del tumor forman una arquitectura glandular en grupos irregulares o con arquitectura histológica desordenada. Por último, podemos encontrar los adenocarcinomas con células en anillo de sello, este subtipo está caracterizado por células donde las uniones intercelulares son poco visibles y se observa un patrón poco cohesivo, debido a esta morfología poco cohesiva y difusa es común que este tipo de adenocarcinomas invadan el sistema linfático o el duodeno, este último a través de los espacios de la submucosa gástrica o la subserosa de este tejido (Hu et al., 2012).

Esta clase de clasificaciones basadas en la morfología e histología de los tumores gástricos coinciden en que los carcinomas gástricos con peor pronóstico son aquellos que poseen una estructura difusa, poco diferenciada y poco cohesiva, la presencia de estas características se puede relacionar directamente con la pérdida de la estructura dentro del tejido enfermo, la pérdida de polaridad celular así como la pérdida de las uniones estrechas, que cumplen un papel esencial en mantener la homeostasis del tejido y evitan el desarrollo de proliferación celular anormal o la migración (metástasis) de células tumorigénicas, son indicadores importantes del avance y desarrollo de esta enfermedad.

Cáncer gástrico y uniones estrechas.

Las uniones estrechas (UE) son uniones intercelulares localizadas en la región más apical de las células epiteliales y endoteliales, su papel principal radica en regular el intercambio de sustancias entre el medio celular interno y externo que ocurre a través de las barreras endoteliales y epiteliales mediante la formación de compartimientos aislados, estos también actúan como equilibradores de la homeostasis dentro de los órganos siendo la primera barrera a la que se enfrentan moléculas y algunos microorganismos. Por tanto, las dos funciones que se le reconocen a las UE son: primero, la regulación de la permeabilidad paracelular mediante su acción como barrera que controla la difusión de agua, iones y otras moléculas de tamaño mediano, y segundo,

el manteniendo de la polaridad celular limitando el libre movimiento de proteínas y lípidos entre la superficie apical y basolateral (Anderson, 2001).

Varios estudios han establecido una correlación entre la reducción de la integridad o la alteración en la composición de estas uniones estrechas (UE) y la diferenciación tumoral, a su vez, se ha encontrado evidencia experimental que posiciona a las UE como la primera barrera que un tumor debe superar para poder realizar metástasis (Martin y Jiang, 2009).

Las UE están conformadas por más de 40 proteínas que están localizadas en el citosol y en la membrana celular. Dentro de las proteínas transmembranales se encuentran: las claudinas, las JAM (por sus siglas en inglés *Junction Adhesión Molecule*), las ocludinas y tricelulina. La expresión de dichas proteínas puede estar modulada por factores de crecimiento, citocinas, vías de regulación y señalización, y por mecanismos como el de la TEM proveyendo una vía para que las células tumorales obtengan un fenotipo invasivo (Ikenouchi, 2003; Martin et al., 2005). Dentro de las proteínas transmembranales de las UE podemos encontrar a las claudinas, una familia de proteínas esenciales para el mantenimiento de la homeostasis celular (Furuse et al., 1998).

Claudinas y cáncer gástrico

Las claudinas son una familia de proteínas integrales de membrana, se conocen 26 isoformas en los seres humanos y un total de 27 en ratones, su peso molecular varía de 20 a 24 kDa y tienen un parecido a la topología de las ocludinas (Mineta et al., 2011).

Estas proteínas presentan cuatro dominios transmembranales, una secuencia amino terminal corta (compuesta de 2 a 6 residuos de aminoácidos) y una secuencia carboxilo terminal, ambas localizadas en el citosol y dos asas extracelulares separadas por un dominio intracelular de 15 residuos de aminoácidos (Figura 2) (Tsukita y Furuse, 2006).

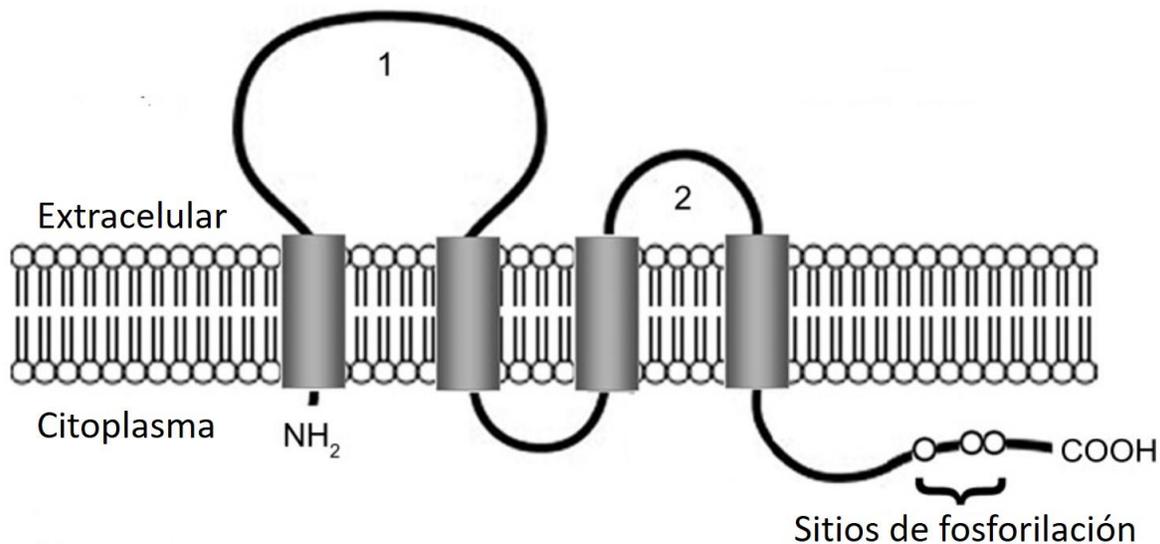


Figura 2. – Estructura de las Claudinas

Las claudinas están conformadas por cuatro dominios transmembranales (en color gris) así como dos asas extracelulares (señalados como 1 y 2) y una intracelular. Los extremos amino y carboxilo terminal se encuentran dentro del citoplasma y se muestran los sitios de fosforilación (Editada de Chen et al., 2013)

La expresión anormal de las claudinas ha sido reportada y relacionada con una mala prognosis, metástasis, invasividad e incluso han sido propuestas como marcadores de desarrollo tumoral temprano. La sobre expresión de Claudina 7 ha sido reportada como un evento temprano en el desarrollo de neoplasia en cáncer cérvico uterino y gástrico (Jhonson et al., 2007). De la misma forma, las Claudinas 3 y 4 se sobreexpresan en tumores pancreáticos, cérvicos, gástricos, de próstata y ováricos (Agarwall et al., 2005; Cunningham, 2006; Nichols et al., 2004). En líneas celulares de cáncer gástrico se ha reportado una correlación entre la sobreexpresión de las Claudinas 6, 7 y 9 y la invasividad, proliferación y migración (Zavala-Zendejas et al., 2010), mientras que en estudios donde se usó una línea celular de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) modificada para sobre expresar a Claudina 6, se encontró una asociación con el aumento en la expresión de Claudina 1 y la activación de la metaloproteasas 2 (MMP-2) y 14 (MMP-14), ambas relacionadas con degradación de la matriz extracelular, migración e invasividad (Torres-Martínez et al., 2017).

Otros estudios más recientes han evaluado distintos mecanismos mediante los cuales las claudinas pueden estar favoreciendo el progreso de los tumores o la formación de estos. Se ha demostrado que, en el caso de los adenocarcinomas colorrectales, la citocina proinflamatoria TNF- α regula la expresión de Claudina 1 (CLDN1) favoreciendo el proceso de la TEM, mediante la deslocalización y sobre expresión de la CLDN1 (Bhat et al., 2016). También se ha observado en líneas celulares de cáncer de mama que la desregulación de claudinas, específicamente la pérdida de su expresión puede favorecer su capacidad de metástasis a través de mecanismos epigenéticos (Yang et al., 2019).

La diferencia que puede generar la presencia o ausencia de algunas de estas proteínas esta entonces bien documentada, sin embargo, se carece de estudios enfocados a entender los efectos que producen los cambios de estas proteínas sobre las vías de señalización global, específicamente en el cáncer gástrico humano.

Microarreglos de DNA y cáncer

Los microarreglos de DNA consisten en múltiples fragmentos de DNA complementario (oligo o “sonda”) que representan a cada gen o grupo de genes relacionados entre ellos adheridos a un soporte físico concreto (vidrio, plástico, silicona) y que se agrupan de forma ordenada de acuerdo con su función, lo que permite identificar a cada uno a través de su secuencia mientras se contenga gran parte del genoma del organismo estudiado (Schema, 2000). Esta tecnología está basada en la complementariedad del DNA, donde las hebras simples de DNA hibridan con su hebra complementaria formando una doble cadena.

La principal función de los microarreglos es medir los niveles de expresión transcripcional global de los genes dentro de una célula o un grupo de células o tejidos bajo condiciones específicas en un momento determinado. En enfermedades multifactoriales como el cáncer, el conocimiento de estos patrones globales es de suma importancia ya que muchas de las características de las células tumorales son adquiridas a través de la expresión anormal de genes que puede desencadenar la activación o supresión de vías de regulación, señalización, metabólicas, así como

de genes supresores o factores de inducción de desarrollo o crecimiento que favorezcan un proceso carcinogénico. También permite caracterizar los diferentes perfiles de expresión génica para entender las diferencias entre los tipos de cáncer, de tumor e incluso explorar nuevos blancos terapéuticos.

La metodología para poder realizar un microarreglo involucra la extracción del RNA mensajero de tejidos o células para posteriormente ser convertido en cDNA con ayuda de la retrotranscripción. Éste es etiquetado con alguna marca fluorescente, comúnmente se utilizan los colorantes Cy3 (naranja fluorescente brillante) y Cy5 (rojo brillante) y finalmente se incuba con el microarreglo para favorecer la hibridación (Schena, 2004). La formación de una imagen de la fluorescencia emitida por el microarreglo se obtiene al ser excitada con un láser y la información se captura a través de un sensor (Figura 3) (Gibson y Muse, 2009).

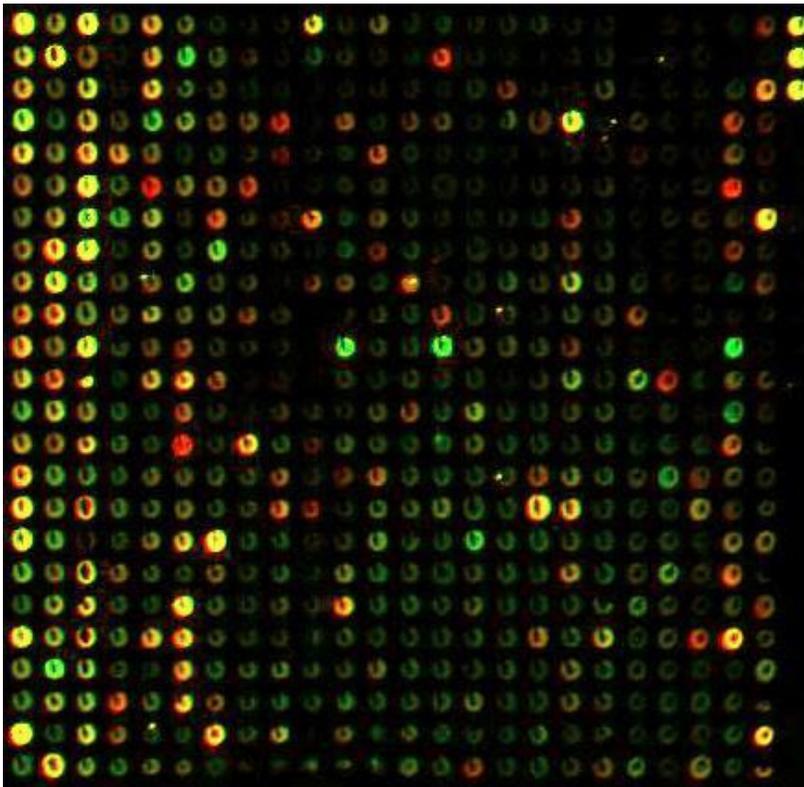


Figura 3. Imagen ejemplo generada de un microarreglo. Cada punto fluorescente corresponde con una secuencia relacionada a un gen o grupos de genes. La intensidad de fluorescencia muestra una medida de la cantidad de cDNA que hibrido con una sonda específica. (Tomada de *UC Davis School of Medicine Microarray Core Facility*).

El principio detrás de la cuantificación de los niveles de expresión es que la intensidad de fluorescencia medida en cada localización específica de la secuencia es directamente proporcional a la cantidad de RNA mensajero (mRNA) con la secuencia complementaria presente en las muestras analizadas (Tarca et al., 2006).

Uno de los objetivos principales del análisis con microarreglos es la identificación de genes que se expresan diferencialmente entre los grupos estudiados, es decir, aquellos genes que se encuentran sobre expresados o sub expresados, lo que genera información acerca de las diferencias moleculares específicas asociadas al evento biológico analizado (Trevino et al., 2007). Esta técnica, más que generar información sobre los niveles absolutos de expresión de un gen en particular, es útil para comparar los niveles de expresión entre condiciones y genes (por ejemplo, en condiciones fisiológicas y de enfermedad).

La capacidad de poder medir e identificar los perfiles de expresión génica brindada por esta técnica y sus análisis ha mejorado la clasificación, diagnóstico e investigación en todos los tipos de cáncer, aún dentro del mismo tejido u órganos. Anteriormente la identificación y clasificación dependían de diferencias morfológicas o evaluaciones patológicas que a veces se llevan a cabo a la par de otras técnicas (Western Blot, PCR) para identificar genes o proteínas relacionadas con estos (Knudsen, 2006). Muchos estudios basados en microarreglos han sido útiles para clasificar grupos de genes específicos para cáncer de ovario, cáncer bucofaríngeo, melanomas, cáncer colorrectal y carcinomas de próstata (Kim, 2004). Los diagnósticos con microarreglos también son útiles para la identificación de carcinomas con mayor sesgo hacia la formación de metástasis (Nielsen et al., 2002).

Por lo anterior, esta tecnología ofrece una amplia gama de opciones para explorar el panorama celular desde una perspectiva molecular que puede ser llevada a la terapia, predicción y correcta detección de células tumorales.

Justificación.

El cáncer gástrico ocupa la quinta posición de los carcinomas más persistentes de acuerdo con datos emitidos por GLOBOCAN en 2020, mientras que en México ocupa el octavo lugar. Biopsias de pacientes con cáncer gástrico muestran una expresión aumentada de Claudina 6 y 9 y ensayos “in vitro” en células de adenocarcinoma gástrico que sobreexpresan a Claudina 6 (AGS-CLDN6) han demostrado que esta claudina promueve la proliferación, migración e invasión celular a través de la activación de la metaloproteasa-2. La caracterización de la expresión global de genes en la línea células AGS-CLDN6 permitirá conocer posibles vías metabólicas y de señalización involucradas con este fenotipo agresivo a través de análisis de enriquecimiento que involucren los procesos biológicos alterados por estos genes y, al mismo tiempo, identificar otras características de interés como el aumento en la habilidad de invasión y metástasis tras esta alteración.

Objetivos

Objetivo general

- Identificar los genes diferencialmente expresados y su relación con diferentes vías metabólicas y de señalización, a partir de los datos generados de un análisis de microarreglos de una línea celular de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) que sobreexpresa a CLDN6.

Objetivos particulares

1. Generar una lista donde se recopilen los genes diferencialmente expresados, así como sus identificadores universales (Entrez ID y Gene Symbol).
2. Identificar las vías metabólicas y de señalización afectadas principalmente por los genes diferencialmente expresados a través de análisis de enriquecimiento (GSEA).
3. Determinar la correlación entre los genes expresados y vías enriquecidas relacionadas a hallmarks del cáncer

Metodología

1. Sobreexpresión de CLDN6 en línea celular AGS.

Para evaluar el impacto de la sobreexpresión de CLDN6 en los niveles de expresión de genes, se utilizó una línea celular de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) transfectada con el vector TOPO pcDNA3.1/NT-GFP que contenía la secuencia que codifica para la CLDN6 para sobreexpresar a esta proteína. Para realizar la transfección, se mezclaron 4µl del vector TOPO pcDNA3.1/NT-GFP y 1µl de la solución salina, se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se incubó 20 min a 4°C. Las células competentes de *Escherichia coli* DH5 Alpha se transformaron con 2 µl de la reacción de clonación previamente preparada y se seleccionaron las células transformadas en placas de agar LB con 100ug/ml de Ampicilina.

Se seleccionaron 10 colonias y se realizó la extracción de plásmidos por mini-prep (Invitrogene). Se corroboró el sentido en el que se insertó la secuencia deseada empleando las enzimas EcoRV (sitio de corte: GAT*ATC) y Kpn1 (sitio de corte:GGTAC*C) para la construcción denominada pcln6GFP. Finalmente, se verificó la ausencia de mutaciones a través de la secuenciación de las construcciones obtenidas (Torres-Martínez, 2011).

1.1 Cultivo de líneas celulares AGS-WT y AGS-CLDN6.

Las células AGS fueron cultivadas en cajas p-100 y se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (8 ml por caja) suplementado con 2 mM de piruvato de sodio (GIBCO 100 mM), 2 mM de L-Glutamina (GIBCO 200 mM), 100 µ/ml de Penicilina/Estreptomicina (GIBCO 10000 U/ml/10000 µ/ml) y 5% de Suero Fetal Bovino (GIBCO) y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂. Las líneas celulares transfectadas se crecieron selectivamente en medio DMEM con 400 µg/ml de Geneticina (G-418).

1.2 Extracción de RNA.

Para extraer el RNA total de las células se adicionaron 3ml de TRIzol (invitrogen) a cada placa de cultivo, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, posteriormente se agregó un mililitro de cloroformo por cada mililitro de TRIzol empleado, se dejó incubar por

3 minutos para inmediatamente centrifugarlo a 4 °C durante 15 minutos a 4,800 rpm. Se adicionó a cada tubo 0.5 ml de isopropanol por cada ml de TRIzol empleado, se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente y se volvió a centrifugar a 4 °C por 10 minutos a 4,800 rpm y se removió el sobrenadante. El precipitado de RNA se lavó con 1 ml de etanol al 75% por cada ml de TRIzol, se centrifugó por 5 minutos a 4 °C a 4800 rpm, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el botón de RNA. Finalmente se disolvió el RNA en agua libre de RNasa incubando a 55 °C por 10 minutos.

1.3. Hibridación y escaneo de microarreglos

Una vez obtenido el cDNA correspondiente a las células AGS-WT y AGS-CLDN6, se determinaron los niveles de expresión génica a través de ensayos de microarreglos. Los cDNAs se hibridaron con chips Affymetrix GeneChipHuman Gene 2.0 ST y fueron escaneados por el escáner Affymetrix modelo X. Los resultados fueron almacenados en archivos individuales correspondientes a cada uno de los experimentos siendo seis en total, tres correspondientes al grupo de células AGS-WT y los tres restantes a las células AGS-CLDN6.

2. Procesamiento de datos.

El procesamiento de los datos obtenidos se realizó utilizando el software R v3.5.2 (R Core Team, 2018).

2.1 Lectura y normalización de archivos CEL

Para leer y normalizar los datos obtenidos del escaneo de los microarreglos hibridados se utilizó la librería oligo 1.46.0 (Carvalho e Irizarry, 2010). La lectura de los archivos se realizó utilizando la función *list.celfiles()* (Carvalho e Irizarry, 2010) que permite agrupar los datos en diferentes variables en la lista de datos de R, la variable creada contiene el nombre de todos los archivos a procesar. Posteriormente se utilizó la función *read.celfiles()* (Carvalho e Irizarry, 2010) que utiliza como guía los archivos listados con la función previa y genera una variable de la clase “Set de expresión” (*Expression Set*). Ésta contiene los valores de

expresión crudos registrados en cada una de las diferentes sondas que hibridaron en los microarreglos (representando cada una a un gen determinado) a través de las diferentes réplicas experimentales, en este caso tres con las células AGS-WT (ERH0010, ERH0011, ERH0012) y tres con las células AGS-CLDN6 (ERH0020, ERH0021, ERH0022).

Los datos obtenidos de cada microarreglo representan una gran densidad de información, por lo que fue importante eliminar las fuentes de variación no biológica, también conocidas como “ruido técnico”, como pueden ser las sondas que muestran una variación anormalmente baja o los posibles falsos positivos. Para poder realizar una comparación en necesario aplicar un método de normalización, para esta finalidad se utilizó la función *rma()* (Carvalho e Irizarry, 2010), la cual aplica el método de Robust Multiarray Average (RMA). Dentro de los microarreglos Affymetrix podemos encontrar dos tipos de sondas: *perfect matches probes* (PM) y *mismatch probes* (MM). Las sondas MM tienen una secuencia casi idéntica a las sondas PM, variando únicamente en el nucleótido 13, y se utilizan para tener una medida del “ruido” de fondo en procesos de normalización y corrección de datos. El valor de expresión para un gen determinado se obtiene contrastando los valores de ambos tipos de sondas. El brillo de las sondas MM a menudo es mayor que el de las sondas PM debido a que pueden registrar hibridación con el cDNA de la muestra, esto puede causar resultados de expresión negativos sin sentido biológico. Usando RMA se utiliza el valor de los *perfect matches* (PM) únicamente, estos son transformados logarítmicamente después de una normalización y una eliminación del ruido de fondo promedio entre los microarreglos (Bolstad et al., 2003). Este método es el más efectivo para realizar la normalización de los datos de expresión en Affymetrix Gene Chips (Irizarry et al., 2003).

2.2 Anotación de los genes expresados.

Para conocer que sonda corresponde a que gen dentro de nuestras muestras hibridadas se utilizó el Identificador de sonda (*Probeset ID*). Para convertir el *probeset ID* en el símbolo del gen así como obtener el nombre completo del gen y su identificador de la base de datos ENTREZ (Geer et al., 2010), se utilizó la librería *affycorertools* (MacDonald, 2018) que permite obtener los datos anteriormente mencionados e incluirlos en el apartado de “*Feature Data*”

de nuestro Set de Expresión a través de la función *annotateEset()*. La función *annotateEset()* requiere un objeto o archivo de anotación para realizar su trabajo, la librería elegida para esto fue “*hugene20sttranscriptcluster.db*” (MacDonald, 2017) que contiene el mapeo entre los identificadores del fabricante y los identificadores en las bases de datos (*accession numbers*).

3. Análisis de las coordenadas principales (PCoA)

Para llevar a cabo la exploración de las relaciones existentes entre los genes detectados y expresado a través de todas las muestras analizadas se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA). Este análisis busca ordenar los grupos experimentales y control a lo largo de ejes conocidos como coordenadas que son a su vez variables sintéticas que buscan albergar la mayor cantidad de variación. Se utilizó una matriz de distancia para poder calcular la disimilitud entre los grupos y corroborar que los programas de transcripción entre ellos los agrupara de acuerdo con su origen.

4. Filtrado de genes falso-positivos por baja varianza a través de las muestras.

Para minimizar el impacto generado por las correcciones múltiples realizadas en este análisis, aplicamos un filtro a las sondas que presentaban valores de señal bajos o que podían ser falsos positivos en los seis microarreglos, así como de aquellos que exhibían poca variación. Esto permite incrementar el poder de nuestro análisis manteniendo bajo control el número de falsos positivos encontrados (Gentleman, 2018). El filtrado se realizó con ayuda de la paquetería *genefilter* y de su función *nsFilter()* (Gentleman, 2018) utilizando un valor de corte/umbral (*var.cutoff*) de 0.5 debido a que se ha reportado que éste es el valor óptimo en el que la mayoría de las sondas se expresarán de forma equitativa (Hackstadt y Jess, 2009).

5. Obtención de genes diferencialmente expresados.

Se realizó un análisis de expresión diferencial para poder identificar los genes que presentan una diferencia estadísticamente significativa en sus niveles de expresión dentro de los

grupos de células AGS-WT y AGS-CLDN6. Para esto, los datos para cada gen se ajustaron al modelo lineal de Bioconductor *limma* (*Linear Models for Microarray*; Ritchie et al., 2015).

Se asume que la fórmula de la regresión lineal es $E[y_j] = Xaj$, donde y_j representa los datos de expresión del gen j , X es la matriz de diseño y aj representa al vector de los coeficientes.

Entonces y_j^T es la j va fila de la matriz de expresión conteniendo el valor de las intensidades de expresión. Los contrastes de interés son dados por $\theta_j = C^Taj$, donde C es la matriz de los contrastes (Smyth, 2005).

La estructura de la matriz de diseño elegida para la obtención de los genes diferencialmente expresados es la siguiente:

WT	CLDN6vsWT
1	0
1	0
1	0
1	1
1	1
1	1

Cada columna representa a uno de los dos grupos analizados en éste trabajo y se asigna un valor general de 1 en la columna WT para tener un coeficiente de contraste al calcular el cambio de expresión transformado con logaritmo base 2 (*log 2 fold change*) de los genes. Esta transformación usando logaritmo base 2 es utilizada para que los datos, en este caso el cambio en el valor de expresión de los genes se distribuya de forma normal y sea comparable. Este cambio de expresión se realiza contrastando los 1 en la columna WT sobre los 0 presentes en la columna CLDN6 vs WT.

Para ajustar los datos generados de la regresión lineal, se utilizó la función *eBayes()* (Ritchie et al, 2015) que aplica el método de *Empirical Bayes* con el fin de que la variabilidad de los

valores de expresión no difiera entre los genes, a través de una prueba de T moderada. La prueba de T es utilizada para poner a prueba la hipótesis nula de que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de dos muestras, la fórmula es la siguiente:

$$t = \frac{x - \mu_0}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

Donde x representa la media muestral, s la desviación estándar y n el tamaño de la muestra. Un problema frecuente al utilizar la prueba de T, en análisis de expresión diferencial de genes, es la generación de una enorme cantidad de falsos positivos. Esto se debe a la carencia de múltiples réplicas (tres en el caso de este trabajo) por lo que se agrega una fuente de variabilidad ajena al proceso biológico estudiado en la estimación de la variación estándar entre los valores de expresión de un mismo gen. Los valores de p que se generan dentro de esta variabilidad entran en el umbral esperado, pero representan finalmente falsos positivos. Por esta razón, Smyth (2004) introdujo un estadístico de T moderado, donde la estimación de la variación se hace a partir de la observación muestral. Sin embargo, también utiliza la media de variación de todos los genes para no reducir la probabilidad de errores de estimación de variación cuando la cantidad de réplicas es pequeña. La modificación de esta estimación de la variación es la siguiente (Smyth, 2004):

$$s_g^2 = \frac{s_g^2 d_g + s_0^2 d_0}{d_g + d_0}$$

Donde S_g^2 representa la variación observada en las tres réplicas de genes y s_0^2 representa la media de la variación de todos los otros genes, los coeficientes d representan los valores o “pesos” cuya finalidad es mantener el valor de la varianza cercano al valor de la media cuando hay pocas replicas, mientras más cercano a 0 sea el valor de d_0 , el valor de la variación tenderá a parecerse más al muestral y viceversa, siendo esto último dependiente del número de réplicas del valor de expresión de ese gen. Finalmente, este valor es sustituido en la fórmula de t moderada (Smyth, 2004):

$$t_{gj} = \frac{\beta_{gj}}{s_g \sqrt{v_{gj}}}$$

Siendo está la razón por la que se prefiere la utilización de una moderación de Bayes empírica.

Los valores de p fueron corregidos usando el método de Benjamini & Hochberg (1995) que consiste en ordenar los valores de p obtenidos asignándoles rangos, el número 1 al valor obtenido más bajo, el 2 al segundo más pequeño y así sucesivamente. Finalmente se calcula su valor ajustado usando la siguiente fórmula:

$$P^{adj} = (i/m)Q$$

Donde i es el rango asignado a dicho valor de p , m representa el número total de pruebas y Q es la tasa de descubrimiento de falsos positivos elegida. El valor de p más grande que cumpla $P < (i/m)Q$ se considera significativo y todos los valores por debajo de su rango se consideran de la misma forma.

Posterior a la aplicación de eBayes, se hizo una selección de los genes diferencialmente expresados con la función *TopTable()* (Ritchie et al., 2015) donde fueron seleccionados a partir de su valor de p ajustado mientras cumplieran un umbral de $p < 0.05$. Un gen es considerado diferencialmente expresado si su valor absoluto de \log_2FC fue mayor o igual a 1.2 y su p -value < 0.05 .

6. Análisis de enriquecimiento (GSEA).

Para determinar los principales procesos biológicos afectados dado el conjunto de genes diferencialmente expresados, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento.

El análisis de enriquecimiento es una aproximación estadística utilizada para descubrir una proporción inusualmente alta (sobrerrepresentación) o baja (subrepresentación) de una clase categórica (en este caso un grupo de genes diferencialmente expresados o GDE) dentro de un universo particular de objetos (todos los genes y sus valores de expresión) de una población heterogénea (Tilford y Siemers, 2009). La finalidad de un análisis de enriquecimiento es encontrar si existen procesos biológicos o algunas funciones celulares que se encuentran representados en nuestras muestras mediante un cotejo de los genes encontrados tras el análisis diferencial y las bases de datos existentes.

La distribución hipergeométrica es una distribución de variable discreta que sirve para describir la probabilidad de k sucesos (número aleatorio de intentos donde el objeto obtenido tiene características específicas) en n intentos, sin reemplazo, dentro de una población finita de tamaño N que contiene exactamente K objetos con esa característica (Rice, 2007).

Para poder realizar este análisis se utilizaron las librerías *GO.db* 3.7.0 (Carlson, 2018) que contiene la información de las *Gene Ontologies*, que recopilan información acerca de los genes, su función, distintos nombres y de los procesos donde son participes y *KEGG.db* 3.2.3 (Carlson, 2016) que brinda información acerca de la *Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes (KEGG)* recopilando procesos, vías de señalización e interacciones de genes.

Resultados

Se analizaron 6 microarreglos de células AGS, 3 de ellos del grupo control (AGS-WT) y los 3 restantes del grupo experimental (AGS-CLDN6). Previo a la normalización se obtuvo la lectura e información de 2 598 544 sondas detectadas, la comparación entre grupos fue graficada (Figura 4) y posteriormente se ajustaron los datos para poder realizar una correcta comparación usando RMA (Figura 5).

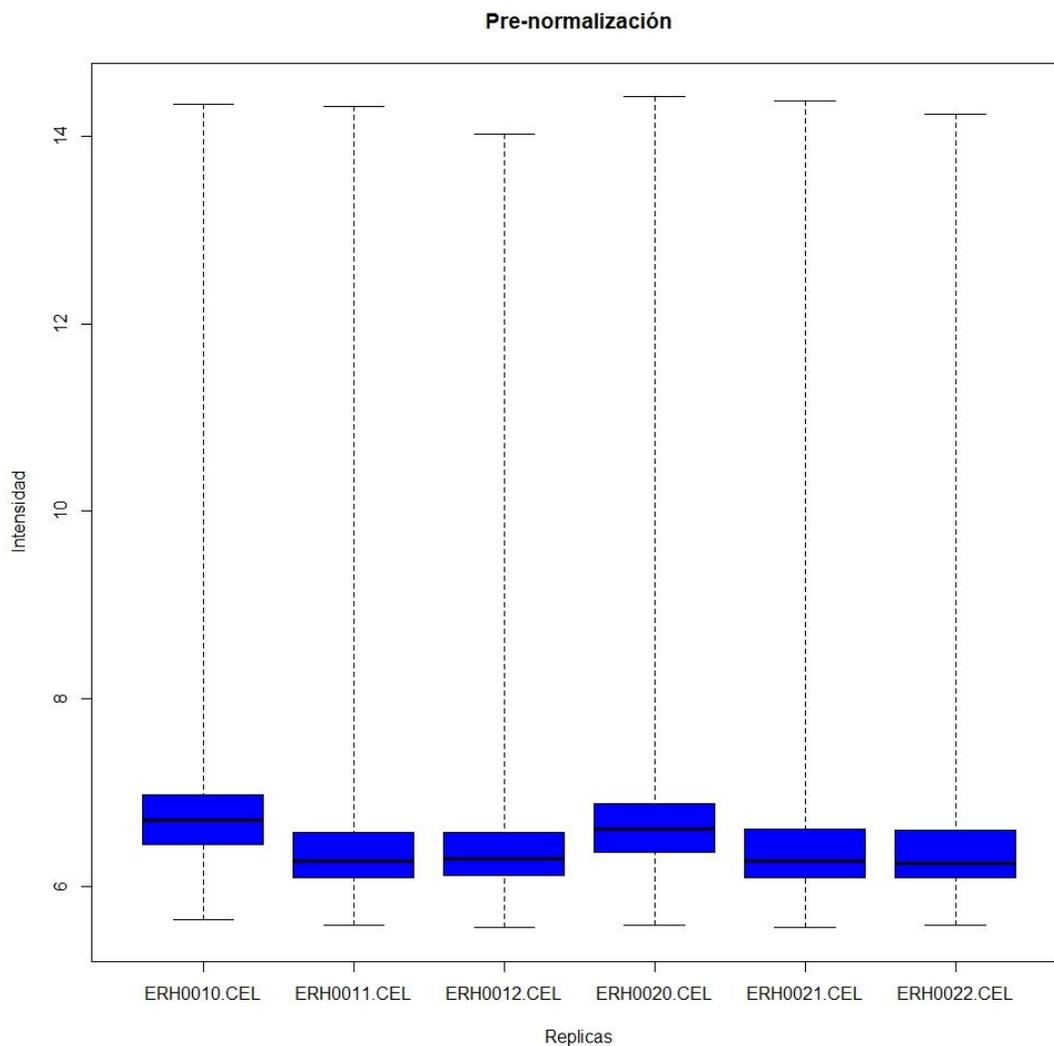


Figura 4.- Niveles de expresión de los genes previos a la normalización.

Se muestran la media de los niveles de expresión de los genes en cada muestra, así como los cuartiles y valores de desviación estándar de las diferentes sondas dentro del microarreglo para el grupo de células AGS-WT (ERH0010, ERH0011, ERH0012) y el grupo de células AGS-CLDN6 (ERH0020, ERH0021, ERH0022). Los valores de expresión fueron transformados mediante un cambio de base logarítmica (logaritmo base 2) para optimizar su visualización.

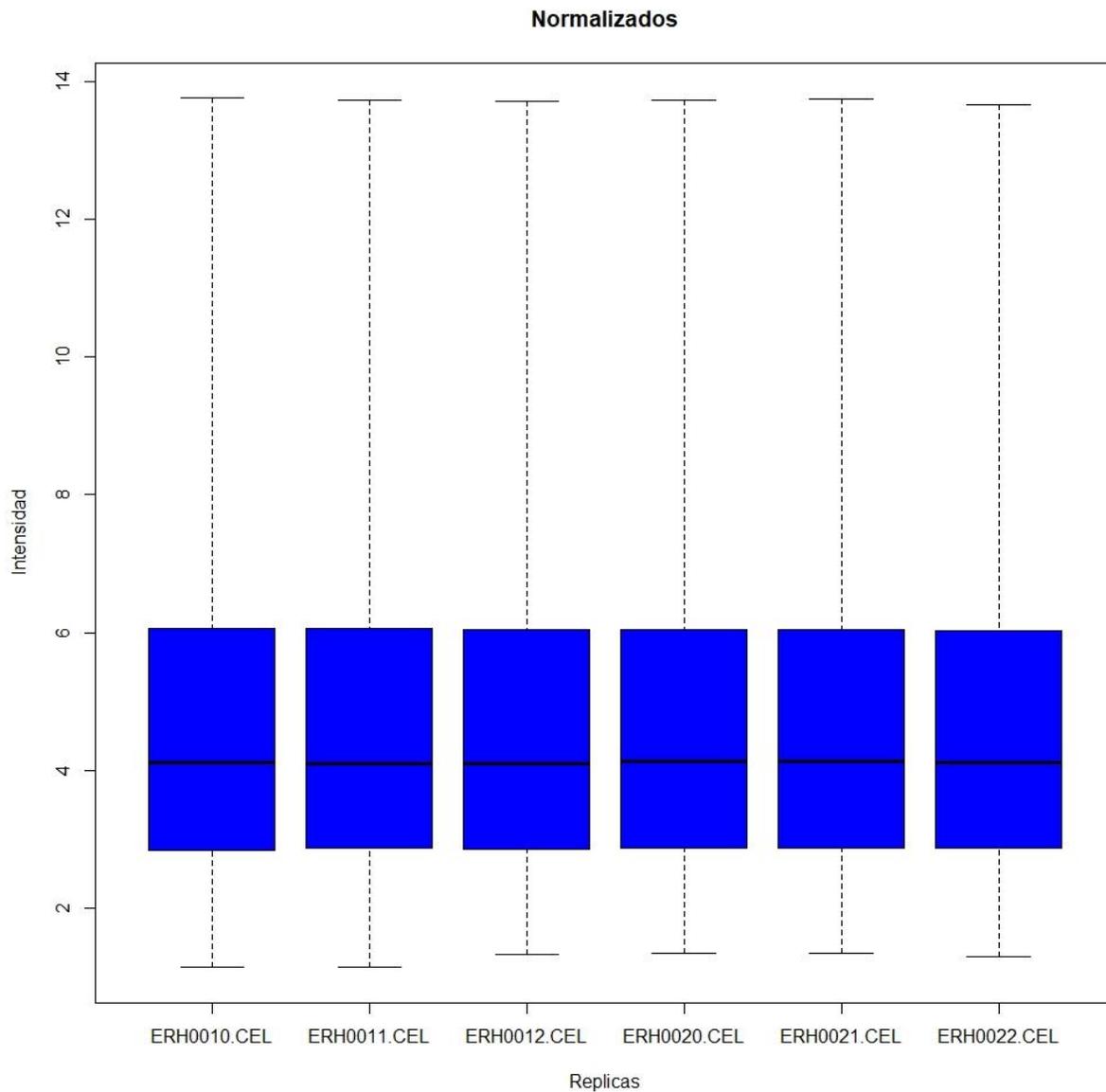


Figura 5.- Datos de expresión de genes normalizados.

Se muestran la media y desviación de los valores de expresión de las sondas dentro de los dos grupos AGS-WT y AGS-CLDN6 posterior a una normalización usando el algoritmo RMA (Robust Multiarray Average).

Se puede observar un cambio en la ubicación de los cuartiles inferiores y superiores entre las muestras analizadas antes de la normalización (Figura 4) en comparación a la distribución de estos tras el uso del algoritmo RMA en la Figura 5. Una vez que se obtiene esta homogeneidad es posible comparar los datos obtenidos entre las muestras analizadas.

Posterior a la normalización de los datos, se realizó un análisis de coordenadas principales para poder conocer la similitud existente entre las réplicas de cada uno de los grupos experimentales (Figura 6). Se observó que el eje 1 divide las muestras en los respectivos grupos (AGS-WT y AGS-CLDN6) agrupándolas de acuerdo con su origen. El eje 2 agrupa a dos réplicas, cada uno de un grupo distinto, generando una distribución alternativa. Lo anterior nos permite inferir que las muestras del grupo control (AGS-WT) son similares entre sí y se alejan en expresión del grupo experimental (AGS-CLDN6), de igual forma se aplica para las muestras del grupo experimental.

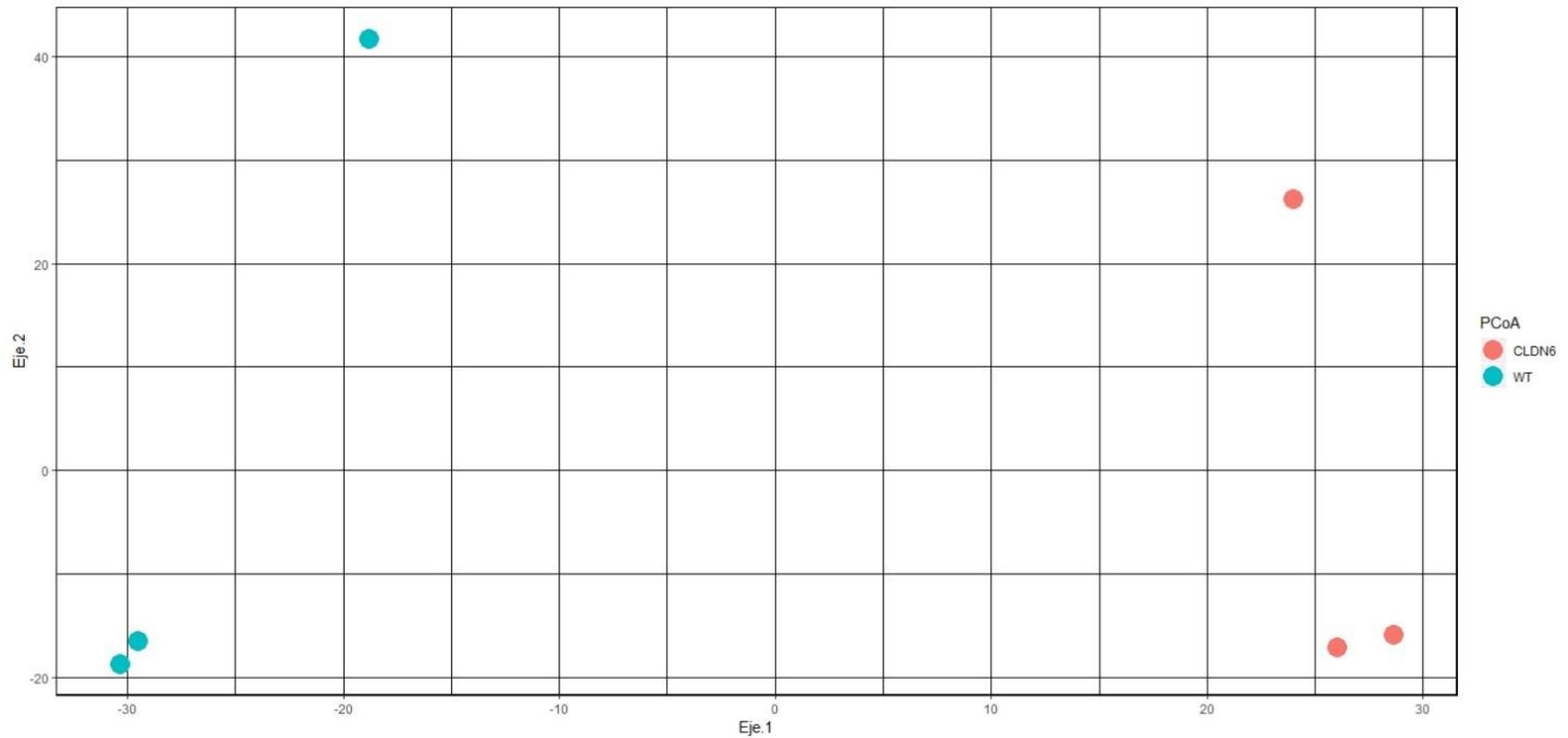


Figura 6.- Análisis de coordenadas principales de los grupos AGS-WT y AGS-CLDN6.

Se muestra la formación de dos grupos separados por el Eje 1, el primero conformado por las tres réplicas de las células AGS-CLDN6 (de color rojo) y el segundo por las tres réplicas de las células AGS-WT (de color azul). También se observa la formación de dos grupos separados por el Eje 2, uno de ellos conformado por 2 réplicas del grupo AGS-WT y 2 réplicas del grupo AGS-CLDN6, y el otro por 1 réplica del grupo AGS-WT y una 1 réplica del grupo AGS-CLDN6.

Posterior a conocer la distribución y similitud de nuestras replicas usando el PCoA, se realizó el análisis de expresión diferencial entre los grupos (AGS-WT y AGS-CLDN-6) utilizando la librería *limma* (*Linear Models for Microarray*; Ritchie et al., 2015). Se encontraron un total de 47 genes (Anexo 1) diferencialmente expresados que fueron seleccionados de acuerdo a un umbral de p ajustada ($\text{adj } p$) < 0.05 , se eligió un valor de $\text{adj } p$ por encima de un valor de p tradicional debido a la fiabilidad que otorga al realizar comparaciones múltiples entre réplicas de grupos experimentales. Esto nos brinda la seguridad de estar eligiendo genes que cumplen con la premisa de estar realmente sobre expresados en las células AGS-CLDN6. Entre los genes sobre expresados que se encontraron podemos identificar algunos de sumo interés debido a publicaciones que reportan su participación en procesos de carcinogénesis, baja supervivencia, resistencia a fármacos, evasión del sistema inmune y capacidad invasiva.

El primero de los genes de interés para este trabajo es el de la CLDN6 que presento un $\log_2\text{FC}$ de 2.17 (Tabla 1). El valor de sobre expresión anterior nos permite confirmar la efectividad de la transfección y la presencia en abundancia del RNA mensajero de este gen respecto a las células AGS-WT.

Se identificó el gen CTH (cistationina-gama liasa) con un $\log_2\text{FC}$ de 1.90 (Tabla 1), éste codifica para una enzima citoplasmática capaz de catalizar la conversión de cisteína a metionina y que se ha reportado como un marcador de mala prognosis en cáncer de próstata y poca supervivencia favoreciendo la progresión de la carcinogénesis y su metástasis (Wang et al, 2019). De igual forma se ha reportado que la inhibición de esta enzima a través del inhibidor *I194496* detiene el crecimiento y metástasis del cáncer de mamá triple negativo mediante la regulación a la baja de algunas vías como la vía de señalización PI3K/Akt (Liu et al., 2021).

Otro de los genes encontrados que genera intereses es ANKRD1 cuyo $\log_2\text{FC}$ es de 1.45 , este gen codifica para el dominio repetitivo de la anquirina 1 que es conocida por su acción como factor de transcripción en varios tipos de cáncer, sin embargo se ha observado que la presencia de ANKRD1 se asocia con la resistencia a los fármacos Afatinib y Osimertinib en

pacientes con cáncer de pulmón con mutaciones en el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) así como con un incremento en la TEM (Takahashi et al., 2018).

LAMP3, que codifica a la proteína lisosomal asociada a la membrana 3, mostro un aumento de su expresión con un log₂FC de 1.59 (Tabla 1). Este gen se asocia a una mala prognosis y baja supervivencia en pacientes con cáncer de ovario (Wang et al., 2017) y, por otro lado, se ha reportado una relación inhibitoria de LAMP3 sobre el oncogén TP53 que favorece el desarrollo y metástasis del osteosarcoma (Liu et al., 2018).

Uno de los genes con el valor de log₂FC más altos es SLC7A11 que codifica para una proteína transmembranal involucrada en el transporte activo de iones, específicamente de cisteína y glutamato. Este se ha relacionado con un estadio avanzado y muy invasivo de cáncer de acuerdo con una revisión profunda en los datos de transcriptómica disponible en la base de datos del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) específicamente en el adenocarcinoma de pulmón (Qian et al., 2022).

El gen ERO1B que codifica para una proteína involucrada en el plegamiento en el retículo endoplásmico (RE), presento un log₂FC de 1.68 (Tabla 1) y se ha descrito que su inhibición en conjunto a otros genes como ATF6a (glicoproteína transmembranal del RE) favorece la supervivencia de pacientes con osteosarcoma mediante la disminución de la resistencia a quimioterapia de las células de osteosarcoma (Yarapureddy et al., 2019).

Otro de los genes que presento una regulación al alta significativa fue NOX1 con un log₂FC de 2.46 (Tabla 1). Este gen codifica para la NADPH oxidasa 1 y se ha reportado sobre expresado en cáncer de colon, así como en adenocarcinomas de intestino delgado. Tiene un papel importante en la señalización de la progresión carcinogénica a través de la desregulación de las especies reactivas de oxígeno (Lu et al., 2020). En el cáncer de vesícula biliar, NOX1 está sobre expresado en los fibroblastos adyacentes a la vesícula biliar como un marcador temprano de pre-carcinogénesis. La sobre expresión de NOX1 en las células del estroma de la vesícula biliar correlacionaba con una mala prognosis y una supervivencia muy baja (Wang et al., 2019). Otro dato relevante que permite entender la importancia de

este gen durante el desarrollo de los carcinomas se reportó recientemente ya que la inhibición de NOX1 mediante el inhibidor GKT771 demostró una disminución en la angiogénesis, invasividad y crecimiento de carcinomas hepatocelulares (Vandierendonck et al., 2021) a través de un tratamiento dependiente de dosis.

<i>Gen</i>	<i>Log2FC</i>	<i>adjp</i>	<i>B</i>
CLDN6	2.170021282	0.003184657	6.129426561
CTH	1.900518414	0.006010241	5.402970848
HERPUD1	2.161601113	0.006010241	5.290620994
LURAP1L	1.630184838	0.007155577	4.901048345
LAMP3	1.592829278	0.014613978	4.234986866
ANKRD1	1.455388658	0.016819067	3.996104168
ERO1B	1.684067374	0.016819067	3.714671799
PCK2	1.378367423	0.016819067	3.667489564
SLC7A11	2.183009136	0.017335496	3.585864412
CLDN1	1.519605532	0.017624349	3.455342445
WARS1	1.523905761	0.017624349	3.421451695
DNAJB11	1.283405454	0.019125777	3.308506822
EDEM1	1.268411109	0.020068183	3.184701447
SDF2L1	1.259067112	0.02035173	3.13393989
WIP1	1.629899719	0.02078421	3.001554694
CREBRF	1.28775888	0.02078421	2.975638944
KDM7A	1.239304079	0.022317875	2.880107087
SEL1L	1.461368232	0.022317875	2.852708165
NOX1	2.466997853	0.027741518	2.63131661
TMEM50B	1.239857481	0.032189526	2.355657426
DNAJB9	1.179686797	0.032189526	2.325445378
MANF	1.120974964	0.032189526	2.304410754
NDRG1	1.124204547	0.035371789	2.114195226
SLC6A9	1.440844979	0.035371789	2.109241607
VEGFA	1.117157944	0.038977331	2.004328871
ADAM20	1.069268521	0.041415618	1.892761275
ASNS	1.410978894	0.046728565	1.768025954

Tabla 1. Genes diferencialmente expresados entre células AGS WT y AGS CLDN6. Se muestran los primeros 25 genes de un total de 47 ordenados de acuerdo con su valor de *p* ajustado por el método Benjamini y Hochberg (adj *p*<0.05). La lista completa de genes puede encontrarse en el Anexo 1.

Además de genes se encontraron un total de 5 RNA's largos no codificantes y un Micro RNA (Anexo 1), de los cuales ninguno superó el umbral de log2FC de 1.5.

Para poder comprender mejor los efectos de este conjunto de genes sobre vías de señalización u otros procesos biológicos de la célula se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento enfocado a conocer los procesos biológicos (BP) y compartimentos celulares (CC) afectados por su expresión diferencial.

Se encontraron un total de 271 procesos biológicos alterados (Anexo 2) de los que se observan los primeros 25 acomodados de acuerdo con su valor de p (Tabla2).

GOBPID	p	Nombre del proceso biológico
GO:0035967	1.6642E-12	Respuesta celular a proteínas topológicamente incorrectas
GO:0006986	3.7226E-12	Respuesta a proteínas no plegadas
GO:0006950	1.0001E-06	Respuesta a estrés
GO:0042981	5.2737E-05	Regulación de la apoptosis
GO:0036498	0.00010201	Respuesta a proteínas no plegadas mediada por IRE-1
GO:0030433	0.00017281	Vía ERAD dependiente de ubiquitinación.
GO:0070887	0.00017371	Respuesta celular a estímulos químicos
GO:0043154	0.00030316	Regulación negativa de la actividad de endopeptidasas relacionadas con proceso apoptótico
GO:0036507	0.00045329	Demansilación de proteínas
GO:0071453	0.00045939	Respuesta celular a variación en niveles de oxígeno
GO:0036499	0.00055553	Respuesta a proteínas no plegadas mediada por PERK
GO:0030970	0.00067277	Transporte de proteínas de RE a citosol.
GO:0044550	0.00079035	Proceso de biosíntesis de metabolitos secundarios
GO:0030968	0.00092413	Respuesta del retículo endoplasmático a proteínas no plegadas
GO:1904292	0.00106521	Regulación de la vía ERAD
GO:0010941	0.00127677	Regulación de la muerte celular.
GO:0061008	0.00135429	Desarrollo del sistema hepatobiliar.
GO:0071542	0.00146432	Diferencia de neuronas dopaminérgicas.
GO:0018272	0.00167493	protein-pyridoxal-5-phosphate linkage via peptidyl-N6-pyridoxal phosphate-L-lysine
GO:0044524	0.00167493	Persulfidación de proteínas.
GO:0060092	0.00167493	Regulación de sinapsis.
GO:0061537	0.00167493	Neurotransmisión.
GO:0061772	0.00167493	Transporte xenobiótico a través de barrera hematoencefálica
GO:0070981	0.00167493	Biosíntesis de L-aspargina

Tabla 2. Lista de procesos biológicos enriquecidos en AGS-CLDN6. Se muestran los primeros 25 GO's de un total de 271 ordenados de acuerdo con su valor de p , se consideraron aquellos que tuvieran un valor de $p < 0.05$. La lista de GO's completa puede ser encontrada en el Anexo 2. GOBPID:

Dentro de los procesos biológicos observados en el top 25 destacan algunos como la “Regulación de la apoptosis” y la “Regulación de la muerte celular”, lo anterior hace sentido al observar que algunos de los genes más sobre expresados en las células AGS-CLDN6 han sido reportados como marcadores de mala prognosis, así como se han asociado a carcinomas más resistentes. Otros de los procesos que resaltan de la lista son la respuesta a niveles de oxígeno y estrés del retículo endoplásmico (ERS) ya que genes como NOX 1 están altamente asociados con la respuesta a especies reactivas de oxígeno.

En el caso particular de los procesos biológicos “Respuesta a proteínas no plegadas” y “Respuesta a proteínas no plegadas mediada por PERK” (Tabla 2) se ha reportado que en el cáncer la alta tasa metabólica, la proliferación desenfrenada, así como la poca vascularización de la masa del tumor acompañada por la sobre expresión de oncogenes y la demanda de síntesis de proteínas y de secreción de moléculas al medio pueden causar una acumulación excesiva de proteínas defectuosas en el RE generando la ruptura de la proteoestasis y activando vías de señalización capaces de favorecer la angiogénesis, el crecimiento tumoral e incluso favoreciendo la evasión inmune del tumor (Hetz et al., 2020).

Se ha reportado que la activación crónica de las vías de señalización desencadenadas por el estrés del RE en los tumores puede influenciar la agresividad de los tumores así como acelerar la carcinogénesis, por ejemplo, la cinasa de proteína tipo 1 del RE (IRE1 α) puede actuar en conjunto con la vía de ERS de UPR para favorecer la expresión de factores de transcripción inducibles por hipoxia que favorecen la angiogénesis y la proliferación de las células tumorales en cáncer de mama triple negativo (Chen et al., 2014). El mismo efecto causado por IRE1 α pero en conjunto con la proteína de unión a la caja X (XBP1) se ha observado en hepatocarcinoma mediante el aumento de la inflamación metabólica y la proliferación de hepatocitos, de igual forma se ha observado que esta combinación de factores puede promover el desarrollo de cáncer de próstata mediante la señalización a través de la expresión del factor de transcripción MYC (Hetz et al., 2019).

En el caso de PERK se ha reportado que la disrupción de su vía de señalización en carcinoma colorrectal humano redujo el tamaño de los tumores mientras que la supresión de su transcripción puede generar señales citotóxicas específicamente en células de tumores metastásicos de cáncer de próstata (Nguyen et al, 2018).

En el caso particular del proceso biológico “Respuesta celular a la variación en niveles de oxígeno” (Tabla 2), podemos encontrar una fuerte relación con los procesos anteriores ya que se ha reportado condiciones hipóxicas características de los carcinomas debido a la alta tasa metabólica y la baja vascularización del tumor. Sin embargo, se pueden señalar otros efectos como la regulación al alza de genes inducibles por hipoxia como el factor de crecimiento vascular endotelial o VEGF, que pueden inducir angiogénesis y permitir a las células del tumor sobrepasar las limitaciones de proliferación (Krock et al., 2011). Otra de las consecuencias que puede tener la hipoxia sobre el programa transcripcional de los tumores es la expresión de enzimas remodeladoras del colágeno o de la matriz extracelular (como pueden ser colagenasas o metaloproteasas) que le permiten llevar a cabo procesos como la extravasación de células cancerígenas, la supervivencia de estas en circulación y el establecimiento de estas en nuevos tejidos (Eisinger-Mathason et al., 2013).

Por otro lado, se encontraron un total de 12 compartimentos celulares afectados en nuestras células AGS-CLDN6 (Tabla 3) de los cuales 6 corresponden o están relacionados con el RE, algunos de los otros compartimentos afectados fueron la membrana nuclear externa, y el citoplasma. De forma interesante se encontraron algunos compartimentos biológicos relacionados a otro tipo de afecciones como son los cuerpos de Lewy que se han asociado a demencia y Alzheimer.

GOCCID	p	Función molecular
GO:0005783	0.000202	Retículo endoplasmático
GO:0044322	0.000558	Compartimento de control de calidad del retículo endoplasmático
GO:0005788	0.001107	Lumen del retículo plasmático
GO:0000839	0.0032	Complejo Hrd1p ERAD-L
GO:0097233	0.0032	Membrana lamelar alveolar del cuerpo
GO:0098827	0.003998	Sub compartimientos del retículo endoplasmático
GO:0042175	0.004392	Membrana nuclear externa
GO:1990037	0.004796	Cuerpos de Lewy
GO:0000835	0.00639	Complejo de ubiquitina ligasa del retículo endoplasmático
GO:0016234	0.006533	Cuerpos de inclusión
GO:0005737	0.007902	Citoplasma
GO:0071438	0.00957	Membrana de invadopodios

Tabla 3. Lista de compartimentos celulares enriquecidos. Se enlista los 12 compartimentos celulares más representados encontrados al realizar el análisis de enriquecimiento, ordenados de acuerdo con su valor de *p*.

Para poder estudiar un panorama más específico de los genes DE y la forma en que estos podrían afectar a las células AGS-CLDN6 a nivel de fenotipo, capacidad de invasividad y mala prognosis, se realizó un análisis detallado de los BP relacionados con algunos *hallmarks* del cáncer específicamente: Muerte celular y apoptosis; Angiogénesis; Evasión del Sistema inmune; Transición Epitelio Mesenquima, migración y proliferación; Respuesta/resistencia a fármacos (Tabla 4).

Los *hallmarks* anteriores no solo están relacionados con carcinomas más agresivos o con capacidad de dispersión y metástasis aumentada sino también con características de troncalidad adquiridas por las células del tumor, conocido como *stemness*.

Muerte celular y apoptosis		
<i>GOid</i>	<i>Nombre</i>	<i>p value</i>
GO:0042981	Regulación del proceso apoptótico	5.27373e-05
GO:0010941	Regulación de la muerte celular	0.001276768
GO:2001234	Regulación negativa de señalización apoptótica	0.048679065
Angiogenesis		
<i>GOid</i>	<i>Nombre</i>	<i>p value</i>
GO:0035886	Diferenciación celular en endotelio vascular	0.017595042
GO:0038091	Regulación positiva de vasos sanguíneos y endotelio durante angiogenesis	0.018276588
GO:1905063	Regulación de diferenciación de células musculares de vasos	0.023205099
GO:0036303	Morfogénesis de vasos sanguíneos	0.029739452
GO:1904018	Regulación positiva de vasculatura	0.035853706
GO:0090050	Regulación positiva de migración celular relacionada con angiogenesis	0.037848302
GO:0001525	Angiogenesis	0.044878869
Evasión de sistema inmune		
<i>GOid</i>	<i>Nombre</i>	<i>p value</i>
GO:0038190	Señalización de vía de Neuropilina activada por VEGF	0.00334717
GO:0060754	Regulación positiva de quimiotaxis de células inflamatorias	0.008347735
GO:0070673	Respuesta a interleucina 18	0.016628443
GO:0097531	Migración de mastocitos	0.018276588
Transición epitelio mesenquima, proliferación y migración		
<i>GOid</i>	<i>Nombre</i>	<i>p value</i>
GO:1903141	Regulación negativa del establecimiento de la barrera endotelial	0.00334717
GO:0048732	Desarrollo de glándulas	0.004802852
GO:0038091	Regulación positiva de la proliferación celular mediante la vía de señalización del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas activado por VEGF	0.005016713
GO:1903392	Regulación negativa de la organización de unión adherente	0.005016713
GO:0038033	Regulación positiva de la quimiotaxis de células endoteliales por la vía de señalización del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular activado por VEGF	0.008347735
GO:0097475	Migración de neuronas motoras	0.010009222
GO:2000048	Regulación negativa de la adhesión célula-célula mediada por cadherina	0.01332417
GO:0045602	Negative regulation of endothelial cell differentiation	0.016628443
GO:0043117	Regulación positiva de la permeabilidad vascular	0.019922076
GO:1901888	Regulación del ensamblaje de unión celular.	0.036956225
GO:0050926	Regulación de la quimiotaxis positiva	0.041073562
GO:0002053	Regulación positiva de la proliferación de células mesenquimales	0.041073562
GO:0002064	Desarrollo de células epiteliales	0.045432872
Resistencia a fármacos		
<i>GOid</i>	<i>Nombre</i>	<i>p value</i>
GO:0031427	Respuesta al metotrexato	0.006683566
GO:0071548	Respuesta a la dexametasona	0.014433005
GO:0042493	Respuesta a los fármacos	0.022303897
GO:0071549	Respuesta celular al estímulo de dexametasona	0.049091297

Tabla 4.- Lista de BP relacionados a CSCs: Se enlistan los BP encontrados al realizar el enriquecimiento de los genes DE en las células AGS-CLDN6 y que se relacionan con los *hallmarks* de troncalidad en cáncer.

Se ha reportado que en los tumores se puede encontrar una amplia heterogeneidad celular con un programa transcripcional alterado y la expresión de ciertos marcadores relacionados a mala prognosis, evasión del sistema inmune o resistencia a fármacos (Chang, 2016). Sin embargo, dentro de la misma población de un tumor es posible aislar algunas células con características similares a las encontradas en células troncales humanas, a este tipo celular se le conoce como *Cancer Stem Cells* (CSC). Algunas de las características descritas para estas células es una alta resistencia a tratamientos farmacológicos, capacidad de evasión del sistema inmune, formación de nuevos tumores, capacidad de realizar metástasis a sitios distantes y la capacidad de llevar a cabo TEM para lograr la extravasación y migración.

Los *hallmarks* señalados en la Tabla 4 permiten confirmar que los genes DE en las células AGS-CLDN6 le otorgan ventajas en los procesos biológicos relacionados a la troncalidad en cáncer. En el apartado de “*Muerte celular*” se encontró enriquecido el proceso de regulación negativa de la señalización apoptótica (GO:2001234), lo que nos permite inferir que estas células presentan una mayor capacidad de detener las vías que conllevan a la apoptosis celular.

Por otro lado, en el apartado de “*Angiogénesis*” podemos encontrar dos BP relacionados con la diferenciación celular hacia endotelio de vasos sanguíneos y musculatura vascular (Tabla 4; GO:0035886, GO:1905063), también se encontraron BP relacionados directamente con la angiogénesis, con la regulación positiva de este proceso y con la migración celular durante el mismo (Tabla 4; GO:0038091, GO:0036303, GO:1904018, GO:0090050, GO:0001525). La aparición de estos BP en el análisis de enriquecimiento es de sumo interés ya que la angiogénesis es uno de los procesos de la carcinogénesis que puede favorecer no solo el acarreamiento de nutrientes hacia el tumor si no también su conexión con el torrente sanguíneo y una posible migración e invasión de otros sitios del organismo.

En los BP relacionados con “*Evasión de sistema inmune*” se encontró enriquecido el proceso de señalización por Neuropilina mediado por VEGF (Tabla 4; GO:0038190) que ha

sido reportado como un evento esencial en la respuesta de los linfocitos T y la respuesta inmune primaria (Romeo et al., 2002). De igual forma se ha descrito en otros trabajos que la vía de señalización relacionada con Neuropilina/VEGF es un marcador de CSC debido a que confiere resistencia a tratamiento en los tumores, así como una mayor capacidad de evasión del sistema inmune (Mercurio, A. 2019).

Uno de los apartados de la Tabla 4 con la mayor cantidad de BP asociados fue la *“Transición epitelio mesénquima, proliferación y migración”* donde algunos de ellos se relacionan directamente con la disrupción de las barreras endoteliales, la regulación negativa de las uniones adherentes y la regulación negativa de las uniones célula-célula mediadas por cadherina (Tabla 4; GO:1903141, GO:1903392, GO:2000048, GO:0043117, GO:1901888). Este grupo de BP son de gran interés debido a que una de las características principales de la TEM es la pérdida de los contactos celulares como los de las UE, así como la reorganización del citoesqueleto y remodelación de la matriz celular para favorecer la migración de las células. Este proceso es fundamental en el desarrollo embrionario durante etapas como la gastrulación, sin embargo la identificación del proceso de TEM en cáncer ha sido altamente asociado con la presencia de CSC (Peng, 2014).

Otra característica importante de la TEM que se puede observar en los BP de ese apartado son los procesos asociados con el aumento en la proliferación celular (Tabla 4; GO:0038091), la regulación positiva de la proliferación de células mesenquimales y la aparición del proceso del desarrollo de células epiteliales (Tabla 4; GO:0002053, GO:0002064) y el proceso de regulación positiva de la permeabilidad vascular (Tabla 4; GO:0043117) que está íntimamente ligado con los procesos de trasvasación y migración de las células a través del sistema circulatorio una vez establecidos los nuevos vasos sanguíneos durante la angiogénesis.

Los resultados anteriores nos llevan a considerar que el aumento en la expresión de CLDN6 en las células AGS-CLDN6 genera cambios en la expresión de genes que han sido ampliamente reportados como marcadores de mala prognosis y han sido relacionados con carcinomas que llevan a cabo la metástasis con mayor frecuencia. Estos genes se ven

reflejados además en el aumento del estrés del RE, acumulación de proteínas mal plegadas que a su vez activa los mecanismos de respuesta a ambos procesos y en conjunto suman al estrés metabólico que potencian el fenotipo agresivo de este adenocarcinoma. Dentro de estos procesos biológicos enriquecidos también podemos encontrar algunos íntimamente asociados con características de troncalidad lo que nos lleva a pensar que la expresión exacerbada de CLDN6 promueve un programa transcripcional que otorga a una población celular las características de troncalidad que, a su vez, le confieren resistencia a fármacos, proliferación acelerada, capacidades de transdiferenciación, evasión del sistema inmune e incluso aumentan su capacidad migratoria.

Discusión

La identificación de las diferencias a nivel transcriptómico usando microarreglos ha demostrado ser una herramienta práctica y poderosa para identificar genes puntuales que permiten discernir entre dos grupos celulares.

En el caso particular de este trabajo, esta técnica nos permitió identificar la presencia de genes relacionados con una mala prognosis que podría ser causada por factores como las vías de respuesta al estrés de RE o la aparición de expresión de genes como VEGF a partir del aumento en la hipoxia de estas células. Es importante remarcar la identificación de procesos biológicos enriquecidos relacionados con características de troncalidad en las CSC ya que funge como perspectiva futura de estudio.

Se ha reportado previamente que una falta de regulación en la expresión y localización de las claudinas puede relacionarse con fenotipos de tumores altamente metastásicos, resistentes a fármacos y con una alta persistencia tras tratamientos farmacológicos (Singh et al., 2010).

La CLDN1 y la CLDN7 han sido reportadas como reguladas a la baja en algunos tipos de cáncer altamente invasivos como cáncer de mamá, esófago y próstata, sin embargo, la

sobre expresión de CLDN-1 se ha relacionado con baja supervivencia en células carcinogénicas de colon, nasofaríngeas, ovario y células orales escamosas (Bhat et al., 2020).

Otro ejemplo de la complejidad que representa la desregulación de la expresión de claudinas en el cáncer, se puede observar en el cáncer de mamá y la expresión aberrante de CLDN1. En el caso particular de los subtipos de cáncer de mamá altamente invasivos como el positivo al receptor de estrógeno (ER+), luminal A y luminal B, la expresión de CLDN1 se encuentra regulada a la baja, pero en los subtipos con un fenotipo más agresivo como el *Basal-like breast cancer* o BLBC por sus siglas, CLDN1 se encuentra expresada a la alta y se ha reportado una deslocalización de la membrana.

El comportamiento anterior se repite en otros tejidos y otros tipos de tumores, en el caso del cáncer de próstata los tumores de mayor tamaño muestran una pérdida de expresión de CLDN1 y CLDN7 mientras que incrementa la expresión de otras como la CLDN3 y la CLDN4 (Sheehan et al., 2007). En el cáncer de ovario se vuelve a encontrar una condición compleja donde la CLDN7 se encuentra significativamente sobre expresada en la gran mayoría de las células epiteliales de estos tumores, de igual forma ha sido relacionado con una baja supervivencia y respuesta a tratamientos como el cisplatino (Kim et al., 2011).

En el caso particular de nuestro modelo de estudio, carcinomas de estómago, se ha observado la desregulación principalmente de la CLDN4 que se presenta en el 90% de las neoplasias y displasias en estudios de contraste entre tejido adyacente, tejido normal y biopsias tumorales (Zhu et al., 2013); la CLDN7 por su parte es una de las claudinas más expresadas en el tejido del estómago y la desregulación de su expresión ha sido relacionada con una supervivencia baja en los pacientes (Hashimoto y Oshima, 2022).

Todo lo anterior nos brinda un panorama de lo confuso y complejo que es la desregulación de estas proteínas de UE no solo a nivel de expresión sino de los efectos que conlleva la desregulación de su localización celular. El entendimiento de estos efectos es esencial no solo para comprender como se afecta el transcriptoma a nivel celular sino

también para encontrar nuevos genes terapéuticos que permitan desarrollar tratamientos más eficaces para combatir esta enfermedad.

Algo que también se encontró en este proyecto es que la sobreexpresión de CLDN6 en células de adenocarcinoma gástrico humano desencadena una serie de cambios a nivel metabólico que a su vez promueven el desarrollo de nuevas capacidades de invasión, migración, resistencia a fármacos y persistencia post-tratamiento.

Se había reportado previamente que las células AGS con una sobreexpresión de CLDN6 presentaban una alta actividad de metaloproteasa-2 (MMP2) lo que le confiere un fenotipo con mayor facilidad de migración e invasividad (Torres-Martínez et al., 2017).

Los resultados encontrados en este trabajo, refuerzan los reportados por Torres-Martínez y col. debido a que los genes DE y su enriquecimiento indican la aparición de un patrón de comportamiento relacionado con la troncalidad observada en los modelos de CSC.

Las claudinas juegan un papel esencial en el mantenimiento de la integridad de las barreras epiteliales y de la polaridad celular. Múltiples reportes han demostrado la conexión que existe entre la TEM y la expresión de claudinas siendo éstas un factor esencial entre la aparición de un fenotipo invasivo y agresivo. La conexión entre estas proteínas y la TEM se ha publicado previamente enfatizando la relación que existe entre la expresión de claudinas y la vía de señalización WNT/ β -catenina. Las CLDN1 y CLDN2 son reguladas a nivel transcripcional por la señalización de WNT a través del factor de unión al enhancer linfoide (LEF) llevando a las células cancerígenas a adquirir características troncales que les otorgan capacidades de transdiferenciación necesarias para mantener la TEM (Nusse, 2008).

La regulación de vías de señalización oncogénicas a través de claudinas no solo se limita a la TEM, se ha reportado que la CLDN18 inhibe la señalización de Akt mediante la modulación de la proteína Yap/Taz y el factor de crecimiento de insulina (IGFR-1R) promoviendo una evasión de la vía de la apoptosis favoreciendo la supervivencia de estas células (Gowrikumar et al., 2019). Un efecto similar se ha observado cuando la CLDN7

interactúa con la molécula de adhesión de células epiteliales (EPCAM) que promueve la proliferación, la regulación a la alta de proteínas anti apoptóticas y la resistencia a fármacos (Nübel et al., 2009). Estos efectos en conjunto a lo observado con CLDN18 forman parte de las características de las CSC.

Otro de los resultados que reforzó la teoría de que la presencia en exceso de CLDN6 en las células AGS-CLDN6 les confiere un fenotipo más troncal fue la aparición de un enriquecimiento en procesos relacionados con los eventos de hipoxia y respuesta a bajos niveles de oxígeno (Tabla 2). Se ha reportado que la hipoxia puede desencadenar vías de señalización que promueven la expresión de genes de troncalidad como POU5F1 desencadenando cambios en las células adultas para que adquieran un fenotipo de troncalidad embrionaria (Takahashi et al., 2007). La aparición de marcadores como CD24 que se utiliza para identificar CSC en otros tipos de carcinomas son de igual forma inducibles por hipoxia, se ha reportado una interacción entre el factor de hipoxia 1 (HIF1) con una región enhancer de CD24 que promueve su expresión (Thomas et al., 2012). El análisis de expresión por microarreglos nos permite observar solo una ventana temporal pequeña del proceso transcripcional de nuestro modelo AGS-CLDN6, pese a esto, la aparición de procesos enriquecidos en estos rubros nos permitió inferir y trazar futuros experimentos que ahondaran en la investigación de estos procesos de troncalidad buscando descubrir el papel que juega CLDN6 en ellos. A este respecto, recientemente demostramos que las células AGS-CLDN6 incrementaron la expresión de los genes SNAI1, NANOG y SOX2 involucrados en la TEM y troncalidad. Los resultados fueron publicados en: Medrano-González P.A., Cruz_villegas F., Alarcón del Carmen A., Montañó L.F. and Rendón-Huerta E.P. *Claudin-6 increases SNAI1, NANOG and SOX2 gene expression in human gastric adenocarcinoma AGS cells*. Molecular Biology Reports. 2022. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11033-022-07976-z> y se anexan en este trabajo.

En conjunto, los resultados de este trabajo nos permitieron conocer un conjunto de genes que se ven expresados diferencialmente entre un grupo de células AGS-WT y uno con una sobre expresión de CLDN-6. Los genes observados en las células AGS-CLDN6 representan

en todos los casos marcadores de mala prognosis, invasividad, agresividad del tumor, resistencia a la apoptosis y una capacidad aumentada de llevar a cabo metástasis con facilidad. Otro aporte importante de este trabajo fue la descripción de procesos biológicos encontrados al analizar este conjunto de genes DE que se relacionan con un aumento en el estrés metabólico, la respuesta a la hipoxia y una serie de procesos que están altamente relacionados con la adquisición de un fenotipo de troncalidad muy similar al de las CSC. Por ello, los diferentes abordajes para estudiar los efectos a nivel celular que se generan a partir de la sobreexpresión de CLDN6, cobran relevancia en este y otros tipos de cáncer.

Conclusiones

El cáncer es una enfermedad que requiere un enfoque multidisciplinario para descifrar su biología fundamental, los análisis de perfilado transcriptómico nos permiten llevar a cabo esta búsqueda de una forma más amplia, las herramientas bioinformáticas presentes en el análisis de microarreglos (y de otras tecnologías más recientes como son el RNA seq y el Single Cell RNA seq) fungen como una guía inicial que permite identificar nuevas líneas de investigación y que arrojan luz en las bases que podrían impulsar los efectos fenotípicos que se observan a nivel no solo experimental si no también clínico.

En el caso de este trabajo se logró encontrar que la presencia de la CLDN6 en altos niveles genera la desregulación en la expresión de sets de genes específicos que están altamente relacionados con procesos de respuesta a proteínas no plegadas, cambios en los niveles de hipoxia y que en general pueden ser asociados como marcadores de mala prognosis clínica, aumento en la agresividad del tumor, resistencia a tratamiento, incremento en la capacidad metastásica y en la resistencia a la apoptosis.

Posteriormente los resultados obtenidos en este trabajo se complementaron con datos de otra índole (citometría y biología molecular principalmente) para lograr describir que todos los procesos biológicos encontrados enriquecidos y que se relacionan con el comportamiento de la CSC y la adquisición de un fenotipo de troncalidad podrían estar relacionadas con la adquisición de marcadores canónicos de troncalidad como *SOX2*, *NANOG*, *Twist*, *CD44* y *DCLK1* (Medrano-González et al., 2022). Respecto a lo anterior, algunos de los genes encontrados en el trabajo de Medrano-González et al., 2019 han sido identificados como marcadores de CSCs,

Referencias

- Agarwal, R., Dsouza, T., y Morin, P. J. (2005). Claudin-3 and Claudin-4 Expression in Ovarian Epithelial Cells Enhances Invasion and Is Associated with Increased Matrix Metalloproteinase-2 Activity. *Cancer Research*, 65(16), 7378–7385.
- Alberts, B. (2014). *Molecular Biology of the Cell: Programed Cell Death (Apoptosis)* Sexta edición. Garland Science.
- Altieri, F., Arcari, P., & Ripp, E. (2013). Gastric cancer: Molecular pathology state. *Current Topics in Gastritis - 2012*. <https://doi.org/10.5772/53757>
- Alsarraj, J. y Hunter, K. W. (2013). Metastatic cancer. En: Ginsburg, G. S., y Willard, H. F. *Genomic and personalized medicine*. (776-788). Amsterdam: Elsevier, Acad. Press.
- Anderson, J. M. (2001). Molecular Structure of Tight Junctions and Their Role in Epithelial Transport. *Physiology*, 16(3), 126–130.
- Benjamini, Y., y Y. Hochberg. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society B* 57: 289-300
- Benjamini, Yoav; Yekutieli, Daniel (2001). "The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency" . *Annals of Statistics*. 29 (4): 1165–1188.
- Bhat, A. A., Ahmad, R., Uppada, S. B., Singh, A. B., & Dhawan, P. (2016). Claudin-1 promotes TNF- α -induced epithelial-mesenchymal transition and migration in colorectal adenocarcinoma cells. *Experimental Cell Research*, 349(1), 119–127.
- Bhat, A. A., Syed, N., Therachiyil, L., Nisar, S., Hashem, S., Macha, M. A., Yadav, S. K., Krishnankutty, R., Muralitharan, S., Al-Naemi, H., Bagga, P., Reddy, R., Dhawan, P., Akobeng, A., Uddin, S., Frenneaux, M. P., El-Rifai, W., y Haris, M. (2020). Claudin-1, a double-edged sword in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 569.

- Bolstad, B.M., Irizarry R. A., Astrand M., and Speed, T.P. (2003), A Comparison of Normalization Methods for High Density Oligonucleotide Array Data Based on Bias and Variance. *Bioinformatics* 19(2):185-193.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., y Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424.
- Carlson, M. (2016). KEGG.db: A set of annotation maps for KEGG. R package version 3.2.3.
- Bugide, S., Janostiak, R., y Wajapeyee, N. (2018). Epigenetic Mechanisms Dictating Eradication of Cancer by Natural Killer Cells. *Trends in Cancer*, 4(8), 553–566.
- Carlson, M. (2018). GO.db: A set of annotation maps describing the entire Gene Ontology. R package version 3.7.0.
- Chang, J. C. (2016). Cancer stem cells. *Medicine*, 95(15).
- Chen, Y.-H., Ding, L., Lu, Z., y Lu, Q. (2013). The claudin family of proteins in human malignancy: a clinical perspective. *Cancer Management and Research*, 367.
- Chen, X., Iliopoulos, D., Zhang, Q., Tang, Q., Greenblatt, M. B., Hatziapostolou, M., Lim, E., Tam, W. L., Ni, M., Chen, Y., Mai, J., Shen, H., Hu, D. Z., Adoro, S., Hu, B., Song, M., Tan, C., Landis, M. D., Ferrari, M., ... Glimcher, L. H. (2014). XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the hif1 α pathway. *Nature*, 508(7494), 103–107. <https://doi.org/10.1038/nature13119>
- Cunningham, S. C. (2006). Claudin-4, Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4, and Stratifin Are Markers of Gastric Adenocarcinoma Precursor Lesions. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 15(2), 281–287.
- Deepa, Pundir, S., y Pundir, C. (2020). Detection of tumor suppressor protein p53 with special emphasis on biosensors: A review. *Analytical Biochemistry*, 588, 113473.

- Dittmar, Y. (2015). Individualized treatment of gastric cancer: Impact of molecular biology and pathohistological features. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 7(11), 292.
- Eisinger-Mathason, T. S. K., Zhang, M., Qiu, Q., Skuli, N., Nakazawa, M. S., Karakasheva, T., Mucaj, V., Shay, J. E. S., Stangenberg, L., Sadri, N., Puré, E., Yoon, S. S., Kirsch, D. G., & Simon, M. C. (2013). Hypoxia-dependent modification of collagen networks promotes sarcoma metastasis. *Cancer Discovery*, 3(10), 1190–1205. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-13-0118>
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., y Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: Novel Integral Membrane Proteins Localizing at Tight Junctions with No Sequence Similarity to Occludin. *The Journal of Cell Biology*, 141(7), 1539–1550.
- Geer L. Y, Marchler-Bauer A, Geer RC, Han L, He J, He S, Liu C, Shi W, Bryant SH. (2010) The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Res.*
- Gentleman R., Carey V., Huber W. y Hahne F. (2018).: genefilter: methods for filtering genes from high-throughput experiments. R package version 1.64.0.
- Global Cancer Observatory. (2019). Retrieved from <https://gco.iarc.fr/>.
- Gowrikumar, S., Singh, A. B., y Dhawan, P. (2019). Role of claudin proteins in regulating cancer stem cells and chemoresistance-potential implication in disease prognosis and therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 53.
- Hackstadt A. J., Hess A. M. (2009) Filtering for increased power for microarray data analysis. *BMC Bioinformatics*.10:11
- Hanahan, D., y Folkman, J. (1996). Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353–364.
- Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70
- Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674.

- Hashimoto, I., y Oshima, T. (2022). Claudins and gastric cancer: An overview. *Cancers*, 14(2), 290. <https://doi.org/10.3390/cancers14020290>
- Hetz, C., Axten, J. M., & Patterson, J. B. (2019). Pharmacological targeting of the unfolded protein response for disease intervention. *Nature Chemical Biology*, 15(8), 764–775. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0326-2>
- Hetz, C., Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2020). Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(8), 421–438. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0250-z>
- Hiyama, K., Hiyama, E., Tanimoto, K., y Nishiyama, M. (2009). Role of Telomeres and Telomerase in Cancer. *Telomeres and Telomerase in Cancer*, 171–180.
- Hu, B., El Hajj, N., Sittler, S., Lammert, N., Barnes, R., & Meloni-Ehrig, A. (2012). Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *Journal of gastrointestinal oncology*, 3(3), 251–261. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2012.021>
- Ikenouchi, J. (2003). Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *Journal of Cell Science*, 116(10), 1959–1967.
- INH (2019). ¿Qué es el cáncer? <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es#causantes>. Consultado 3/10/19
- Irizarry, R. A. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, 4(2), 249–264.
- Ito, T., Matoba, R., Maekawa, H., Sakurada, M., Kushida, T., Orita, H., Wada, R., & Sato, K. (2019). Detection of gene mutations in gastric cancer tissues using a commercial sequencing panel. *Molecular and Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.3892/mco.2019.1926>

- Johnson, A. H., Frierson, H. F., Zaika, A., Powell, S. M., Roche, J., Crowe, S., El-Rifai, W. (2005). Expression of Tight-Junction Protein Claudin-7 Is an Early Event in Gastric Tumorigenesis. *The American Journal of Pathology*, 167(2), 577–584.
- Junttila, M. R., y Evan, G. I. (2009). p53 — a Jack of all trades but master of none. *Nature Reviews Cancer*, 9(11), 821–829.
- Kim, H. (2004). Role of Microarray in Cancer Diagnosis. *Cancer Research and Treatment*, 36(1), 1.
- Kim, C. J., Lee, J.-W., Choi, J.-J., Choi, H. Y., Park, Y.-A., Jeon, H.-K., Sung, C. O., Song, S. Y., Lee, Y.-Y., Choi, C. H., Kim, T.-J., Lee, J.-H., Kim, B.-G., y Bae, D.-S. (2011). High claudin-7 expression is associated with a poor response to platinum-based chemotherapy in epithelial ovarian carcinoma. *European Journal of Cancer*, 47(6), 918–925.
- Knudsen, S. (2006). *Cancer diagnostics with Dna microarrays*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss.
- Korkola, J., & Gray, J. W. (2010). Breast cancer genomes—form and function. *Current Opinion in Genetics & Development*, 20(1), 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.11.005>
- Krock, B. L., Skuli, N., & Simon, M. C. (2011). Hypoxia-induced angiogenesis: Good and evil. *Genes & Cancer*, 2(12), 1117–1133. <https://doi.org/10.1177/1947601911423654>
- Laurén, P. E. K. K. A. (1965). The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 64(1), 31–49. <https://doi.org/10.1111/apm.1965.64.1.31>
- Liu, Y., Wang, L., Zhang, X., Deng, Y., Pan, L., Li, H., Shi, X., & Wang, T. (2021). A novel cystathionine γ -lyase inhibitor, I194496, inhibits the growth and metastasis of human TNBC via downregulating multiple signaling pathways. *Scientific Reports*, 11.

- Liu, S., Yue, J., Du, W., Han, J., & Zhang, W. (2018). Lamp3 plays an oncogenic role in osteosarcoma cells partially by inhibiting TP53. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 23(1).
- Lu, J., Jiang, G., Wu, Y., Antony, S., Meitzler, J. L., Juhasz, A., Liu, H., Roy, K., Makhoulouf, H., Chuaqui, R., Butcher, D., Konaté, M. M., & Doroshov, J. H. (2020). NADPH oxidase 1 is highly expressed in human large and small bowel cancers. *PLOS ONE*, 15(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233208>
- MacDonald, J. W. (2018). affycoretools: Functions useful for those doing repetitive analyses with Affymetrix GeneChips. R package version 1.54.0. <https://doi.org/10.18122/affycoretools.1.54.0>
- MacDonald, J. W. (2017). hugene20sttranscriptcluster.db: Affymetrix hugene20 annotation data (chip hugene20sttranscriptcluster). R package version 8.7.0. <https://doi.org/10.18122/hugene20sttranscriptcluster.db.8.7.0>
- Martin, T. A., Goyal, A., Watkins, G., & Jiang, W. G. (2005). Expression of the Transcription Factors Snail, Slug, and Twist and Their Clinical Significance in Human Breast Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 12(6), 488–496.
- Martin, T. A., & Jiang, W. G. (2009). Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(4), 872–891.
- Mendelsohn, J. (2015). Cellular Senescence en: Mendelsohn, J. *The molecular basis of cancer*. (229-238). Philadelphia, PA: Elsevier Saunders.
- Mercurio, A. (2019). VEGF/neuropilin signaling in cancer stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 490. <https://doi.org/10.3390/ijms20030490>
- Mineta, K., Yamamoto, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tada, Y., Saito, K., Tsukita, S. (2011). Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Letters*, 585(4), 606–612. Nichols, L. S., Ashfaq, R., & Iacobuzio-Donahue, C. A. (2004). Claudin 4 Protein Expression in Primary and Metastatic Pancreatic Cancer Support for Use as a Therapeutic Target. *American Journal of Clinical Pathology*, 121(2), 226–230.
- Nielsen, T. O., West, R. B., Linn, S. C., Alter, O., Knowling, M. A., O'Connell, J. X., Rijn, M. V. D. (2002). Molecular characterisation of soft tissue tumours: a gene expression study. *The Lancet*, 359(9314), 1301–1307.

- Nguyen, H. G., Conn, C. S., Kye, Y., Xue, L., Forester, C. M., Cowan, J. E., Hsieh, A. C., Cunningham, J. T., Truillet, C., Tameire, F., Evans, M. J., Evans, C. P., Yang, J. C., Hann, B., Koumenis, C., Walter, P., Carroll, P. R., & Ruggero, D. (2018). Development of a stress response therapy targeting aggressive prostate cancer. *Science Translational Medicine*, 10(439).
- Nübel Tobias, Preobraschenski, J., Tuncay Hüseyin, Weiss, T., Kuhn, S., Ladwein, M., Langbein, L., y Zöller Margot. (2009). Claudin-7 regulates EPCAM-mediated functions in tumor progression. *Molecular Cancer Research*, 7(3), 285–299. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-08-0200>
- Nusse, R. (2008). Wnt signaling and Stem Cell Control. *Cell Research*, 18(5), 523–527. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.47>
- Peng, Z. (2014). Role of epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer initiation and progression. *World Journal of Gastroenterology*, 20(18), 5403.
- Qian, L., Wang, F., Lu, S.-min, Miao, H.-jie, He, X., Feng, J., Huang, H., Shi, R.-feng, & Zhang, J.-guo. (2022). A comprehensive prognostic and immune analysis of ferroptosis-related genes identifies SLC7A11 as a novel prognostic biomarker in Lung Adenocarcinoma. *Journal of Immunology Research*, 2022, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2022/1951620>
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rice, John A. (2007). *Mathematical Statistics and Data Analysis* (Third ed.). Duxbury Press. p. 42. Si esto es un libro, falta gregar el país.
- Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., and Smyth, G.K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research* 43(7), e47.
- Romeo, P.-H., Lemarchandel, V., & Tordjman, R. (2002). Neuropilin-1 in the immune system. *Neuropilin*, 49–54. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0119-0_4

- Schena, M. (2000). *Microarray biochip technology*. Natick: BioTechniques Books Publication Eaton Pub.
- Schena, M. (2004). *Guide to analysis of Dna microarray data*. Hoboken, NJ: Wiley.
- Sheehan, G. M., Kallakury, B. V. S., Sheehan, C. E., Fisher, H. A. G., Kaufman, R. P., y Ross, J. S. (2007). Loss of claudins-1 and -7 and expression of claudins-3 and -4 correlate with prognostic variables in prostatic adenocarcinomas. *Human Pathology*, 38(4), 564–569. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2006.11.007>
- Singh, A. B., Sharma, A., & Dhawan, P. (2010). Claudin family of proteins and cancer: An overview. *Journal of Oncology*, 2010, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2010/541957>
- Smyth, G. K. (2004). Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments, *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 1: Art 3
- Smyth G.K. (2005) *limma: Linear Models for Microarray Data*. Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor. Statistics for Biology and Health. Springer, New York, Si esto es un libro falta el número de páginas y edición.
- Tarca, A. L., Romero, R., & Draghici, S. (2006). Analysis of microarray experiments of gene expression profiling. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 195(2), 373–388.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, A., Seike, M., Chiba, M., Takahashi, S., Nakamichi, S., Matsumoto, M., Takeuchi, S., Minegishi, Y., Noro, R., Kunugi, S., Kubota, K., & Gemma, A. (2018). Ankyrin repeat domain 1 overexpression is associated with common resistance to

afatinib and osimertinib in EGFR-Mutant Lung Cancer. *Scientific Reports*, 8(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-33190-8>

- Tilford, C. A., y Siemers, N. O. (2009). Gene set enrichment analysis. In Protein Networks and Pathway Analysis (pp. 99-121). Humana Press.
- Trevino, V., Falciani, F. y Barrera-Saldaña, H. (2007). DNA Microarrays: a Powerful Genomic Tool for Biomedical and Clinical Research. *Molecular Medicine*, 13(9-10), pp.527-541.
- Tsukita, S., y Furuse, M. (2006). The Structure and Function of Claudins, Cell Adhesion Molecules at Tight Junctions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 915(1), 129–135.
- Torres-Martínez, A., Gallardo-Vera, J., Lara-Holguin, A., Montañó, L., y Rendón-Huerta, E. (2017). Claudin-6 enhances cell invasiveness through claudin-1 in AGS human adenocarcinoma gastric cancer cells. *Experimental Cell Research*, 350(1), 226–235
- UC Davis School of Medicine, & Department of Medical Microbiology. (2019). UC Davis School of Medicine Microarray Core Facility. Retrieved October 10, 2019, from <https://health.ucdavis.edu/medmicro/microarray/>.
- Vandierendonck, A., Degroote, H., Vanderborght, B., Verhelst, X., Geerts, A., Devisscher, L., & Van Vlierberghe, H. (2021). NOX1 inhibition attenuates the development of a pro-tumorigenic environment in experimental hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 40(1).
<https://doi.org/10.1186/s13046-021-01837-6>
- Wang, F. T., Hassan, M., Ansari, K., Xu, G. L., Li, X. P., & Fan, Y. Z. (2019). Upregulated NOX1 expression in gallbladder cancer-associated fibroblasts predicts a poor prognosis. *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7249>
- Wang, Y. H., Huang, J. T., Chen, W. L., Wang, R. H., Kao, M. C., Pan, Y. R., Chan, S. H., Tsai, K. W., Kung, H. J., Lin, K. T., & Wang, L. H. (2019). Dysregulation of cystathionine γ -lyase promotes prostate cancer progression and metastasis. *EMBO Reports*, 20(10).

- Wang, D., Cao, X., Zhang, Y., Liu, Y., Yao, C., Ge, W., & Xu, Y. (2017). Lamp3 expression correlated with poor clinical outcome in human ovarian cancer. *Tumor Biology*, 39(3), 101042831769501.
- World Health Organization. Global Health Observatory. Geneva: WorldHealth Organization; 2018. who.int/gho/database/en/. Consultado 03/10/19
- Yarapureddy, S., Abril, J., Foote, J., Kumar, S., Asad, O., Sharath, V., Faraj, J., Daniel, D., Dickman, P., White-Collins, A., Hingorani, P., & Sertil, A. R. (2019). ATF6 α activation enhances survival against chemotherapy and serves as a prognostic indicator in osteosarcoma. *Neoplasia*, 21(6), 516–532.
<https://doi.org/10.1016/j.neo.2019.02.004>
- Zavala-Zendejas, V. E., Torres-Martinez, A. C., Salas-Morales, B., Fortoul, T. I., Montañón, L. F., & Rendon-Huerta, E. P. (2010). Claudin-6, 7, or 9 Overexpression in the Human Gastric Adenocarcinoma Cell Line AGS Increases Its Invasiveness, Migration, and Proliferation Rate. *Cancer Investigation*, 29(1), 1–11.
- Zhang, W., & Liu, H. T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, 12(1), 9–18.
<https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290105>
- Zhu, J.-L., Gao, P., Wang, Z.-N., Song, Y.-X., Li, A.-L., Xu, Y.-Y., Wang, M.-X., y Xu, H.-M. (2013). Clinicopathological significance of claudin-4 in gastric carcinoma. *World Journal of Surgical Oncology*, 11(1).

Anexo 1:

Gen	log2FC	p ajustada
AJ510163	6.226236	1.32E-08
U57609	6.716643	1.32E-08
CLDN6	2.170021	0.003185
CTH	1.900518	0.00601
HERPUD1	2.161601	0.00601
ADAM20P1	1.740713	0.007156
LURAP1L	1.630185	0.007156
LAMP3	1.592829	0.014614
ANKRD1	1.455389	0.016819
RPL6	2.346162	0.016819
XLOC_013370	1.396752	0.016819
ERO1B	1.684067	0.016819
XLOC_I2_015661	-1.9251	0.016819
PCK2	1.378367	0.016819
SLC7A11	2.183009	0.017335
RPL19	-1.81966	0.017624
CLDN1	1.519606	0.017624
WARS	1.523906	0.017624
DNAJB11	1.283405	0.019126
TXNIP	-2.06455	0.020068
EDEM1	1.268411	0.020068
SDF2L1	1.259067	0.020352
SNORA14A	-1.53714	0.020784
RNY3	1.944851	0.020784
WIPI1	1.6299	0.020784
CREBRF	1.287759	0.020784
KDM7A	1.239304	0.022318
SEL1L	1.461368	0.022318
NOX1	2.466998	0.027742
ANAPC5	-1.27435	0.027742
LINC01234	-1.20364	0.03219
TMEM50B	1.239857	0.03219
DNAJB9	1.179687	0.03219
ADAM20P1	1.36127	0.03219
MIR4521	-1.14791	0.03219
MANF	1.120975	0.03219
TCP11L2	1.644294	0.03219
JAKMIP2-AS1	-2.43485	0.03288

NDRG1	1.124205	0.035372
SLC6A9	1.440845	0.035372
VEGFA	1.117158	0.038977
ASNS	1.329635	0.041318
ADAM20	1.069269	0.041416
XLOC_000695	1.373396	0.041416
ASNSP1	1.410979	0.046729
LINC01133	1.17889	0.04839
lnc-NLRP12	1.097491	0.049972

Anexo 1.- Lista de Genes Diferencialmente expresados: Se enlistan los 47 genes diferencialmente expresados encontrados AGS-CLDN6.

Anexo 2

GO ID	Pvalue	Termino
GO:0035967	1.6642E-12	Cellular response to topologically incorrect protein
GO:0006986	3.7226E-12	Response to unfolded protein
GO:0006950	1.0001E-06	Response to stress
GO:0042981	5.2737E-05	Regulation of apoptotic process
GO:0036498	0.00010201	Ire1-MEDIATED UNFOLDED PROTEIN RESPONSE
GO:0030433	0.00017281	UBIQUITIN-DEPENDENT erad PATHWAY
GO:0070887	0.00017371	Cellular response to chemical stimulus
GO:0043154	0.00030316	Negative regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process
GO:0036507	0.00045329	Protein demannosylation
GO:0071453	0.00045939	Cellular response to oxygen levels
GO:0036499	0.00055553	Perk-MEDIATED UNFOLDED PROTEIN RESPONSE
GO:0030970	0.00067277	RETROGRADE PROTEIN TRANSPORT, er TO CYTOSOL
GO:0044550	0.00079035	Secondary metabolite biosynthetic process
GO:0030968	0.00092413	Endoplasmic reticulum unfolded protein response
GO:1904292	0.00106521	REGULATION OF erad PATHWAY
GO:0010941	0.00127677	Regulation of cell death
GO:0061008	0.00135429	Hepaticobiliary system development
GO:0071542	0.00146432	Dopaminergic neuron differentiation
GO:0018272	0.00167493	PROTEIN-PYRIDOXAL-5-PHOSPHATE LINKAGE VIA PEPTIDYL-n6-PYRIDOXAL PHOSPHATE-I-LYSINE
GO:0044524	0.00167493	Protein sulfhydration
GO:0060092	0.00167493	Regulation of synaptic transmission, glycinergic
GO:0061537	0.00167493	Glycine secretion, neurotransmission
GO:0061772	0.00167493	Xenobiotic transport across blood-nerve barrier
GO:0070981	0.00167493	L-ASPARAGINE BIOSYNTHETIC PROCESS
GO:0140206	0.00167493	Dipeptide import across plasma membrane
GO:1900170	0.00167493	Negative regulation of glucocorticoid mediated signaling pathway
GO:1901494	0.00167493	Regulation of cysteine metabolic process
GO:1902213	0.00167493	Positive regulation of prolactin signaling pathway
GO:1903545	0.00167493	Cellular response to butyrate
GO:1903572	0.00167493	POSITIVE REGULATION OF PROTEIN KINASE d SIGNALING
GO:1904831	0.00167493	Positive regulation of aortic smooth muscle cell differentiation
GO:1990451	0.00167493	Cellular stress response to acidic ph
GO:1905898	0.00173304	Positive regulation of response to endoplasmic reticulum stress
GO:0048878	0.00189448	Chemical homeostasis
GO:0010498	0.00205614	Proteasomal protein catabolic process
GO:0031960	0.00226512	Response to corticosteroid

GO:0009628	0.0026218	Response to abiotic stimulus
GO:1901565	0.00291199	Organonitrogen compound catabolic process
GO:0003169	0.00334717	Coronary vein morphogenesis
GO:0006436	0.00334717	Tryptophanyl-trna aminoacylation
GO:0019343	0.00334717	Cysteine biosynthetic process via cystathionine
GO:0019543	0.00334717	Propionate catabolic process
GO:0034775	0.00334717	Glutathione transmembrane transport
GO:0035574	0.00334717	HISTONE h4-k20 DEMETHYLATION
GO:0038190	0.00334717	Vegf-ACTIVATED NEUROPILIN SIGNALING PATHWAY
GO:0046327	0.00334717	Glycerol biosynthetic process from pyruvate
GO:0048203	0.00334717	VESICLE TARGETING, TRANS-golgi TO ENDOSOME
GO:0090461	0.00334717	Glutamate homeostasis
GO:0097533	0.00334717	Cellular stress response to acid chemical
GO:1902336	0.00334717	Positive regulation of retinal ganglion cell axon guidance
GO:1903141	0.00334717	Negative regulation of establishment of endothelial barrier
GO:1903786	0.00334717	Regulation of glutathione biosynthetic process
GO:0071456	0.00410215	Cellular response to hypoxia
GO:1903050	0.00410215	Regulation of proteolysis involved in cellular protein catabolic process
GO:0048732	0.00480285	Gland development
GO:1903201	0.00494807	Regulation of oxidative stress-induced cell death
GO:0010033	0.00495152	Response to organic substance
GO:0008065	0.00501671	Establishment of blood-nerve barrier
GO:0030070	0.00501671	Insulin processing
GO:0036510	0.00501671	TRIMMING OF TERMINAL MANNOSE ON c BRANCH
GO:0038091	0.00501671	POSITIVE REGULATION OF CELL PROLIFERATION BY vegf-ACTIVATED PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR RECEPTOR SIGNALING PATHWAY
GO:0042939	0.00501671	Tripeptide transport
GO:0045726	0.00501671	Positive regulation of integrin biosynthetic process
GO:0060948	0.00501671	Cardiac vascular smooth muscle cell development
GO:1903392	0.00501671	Negative regulation of adherens junction organization
GO:1903895	0.00501671	NEGATIVE REGULATION OF ire1-MEDIATED UNFOLDED PROTEIN RESPONSE
GO:1904154	0.00501671	POSITIVE REGULATION OF RETROGRADE PROTEIN TRANSPORT, er TO CYTOSOL
GO:2000211	0.00501671	Regulation of glutamate metabolic process
GO:0044248	0.00540128	Cellular catabolic process
GO:0010951	0.00574026	Negative regulation of endopeptidase activity
GO:2000116	0.00618395	Regulation of cysteine-type endopeptidase activity
GO:0006528	0.00668357	Asparagine metabolic process
GO:0019346	0.00668357	Transsulfuration
GO:0031427	0.00668357	Response to methotrexate
GO:0060319	0.00668357	Primitive erythrocyte differentiation

GO:0070814	0.00668357	Hydrogen sulfide biosynthetic process
GO:1900086	0.00668357	Positive regulation of peptidyl-tyrosine autophosphorylation
GO:1903348	0.00668357	Positive regulation of bicellular tight junction assembly
GO:1904382	0.00668357	MANNANOSE TRIMMING INVOLVED IN GLYCOPROTEIN erad PATHWAY
GO:1904717	0.00668357	REGULATION OF ampa GLUTAMATE RECEPTOR CLUSTERING
GO:0034976	0.00701707	Response to endoplasmic reticulum stress
GO:0003333	0.00730755	Amino acid transmembrane transport
GO:1905897	0.00742267	Regulation of response to endoplasmic reticulum stress
GO:0043436	0.00764198	Oxoacid metabolic process
GO:0065007	0.00770784	Biological regulation
GO:0038033	0.00834773	POSITIVE REGULATION OF ENDOTHELIAL CELL CHEMOTAXIS BY vegf-ACTIVATED VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR SIGNALING PATHWAY
GO:0042938	0.00834773	Dipeptide transport
GO:0060754	0.00834773	Positive regulation of mast cell chemotaxis
GO:0071284	0.00834773	Cellular response to lead ion
GO:0071557	0.00834773	HISTONE h3-k27 DEMETHYLATION
GO:0072592	0.00834773	Oxygen metabolic process
GO:1902882	0.00844674	Regulation of response to oxidative stress
GO:0080135	0.00999765	Regulation of cellular response to stress
GO:0019401	0.01000922	Alditol biosynthetic process
GO:0019471	0.01000922	4-hydroxyproline metabolic process
GO:0033029	0.01000922	Regulation of neutrophil apoptotic process
GO:0051454	0.01000922	Intracellular ph elevation
GO:0061419	0.01000922	POSITIVE REGULATION OF TRANSCRIPTION FROM rna POLYMERASE ii PROMOTER IN RESPONSE TO HYPOXIA
GO:0097475	0.01000922	Motor neuron migration
GO:1901727	0.01000922	Positive regulation of histone deacetylase activity
GO:1902177	0.01000922	Positive regulation of oxidative stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway
GO:1904587	0.01000922	Response to glycoprotein
GO:0006520	0.01021013	Cellular amino acid metabolic process
GO:0043069	0.01095688	Negative regulation of programmed cell death
GO:0006641	0.01139238	Triglyceride metabolic process
GO:1901800	0.01139238	Positive regulation of proteasomal protein catabolic process
GO:0006508	0.01155836	Proteolysis
GO:0044257	0.0116376	Cellular protein catabolic process
GO:0031077	0.01166803	Post-embryonic camera-type eye development
GO:0032287	0.01166803	Peripheral nervous system myelin maintenance
GO:0048842	0.01166803	Positive regulation of axon extension involved in axon guidance
GO:0071455	0.01166803	Cellular response to hyperoxia

GO:1903071	0.01166803	POSITIVE REGULATION OF er-ASSOCIATED UBIQUITIN-DEPENDENT PROTEIN CATABOLIC PROCESS
GO:0032511	0.01332417	Late endosome to vacuole transport via multivesicular body sorting pathway
GO:0097688	0.01332417	Glutamate receptor clustering
GO:2000048	0.01332417	Negative regulation of cell-cell adhesion mediated by cadherin
GO:0014070	0.01341255	Response to organic cyclic compound
GO:0071396	0.01389877	Cellular response to lipid
GO:0006511	0.0141478	Ubiquitin-dependent protein catabolic process
GO:0071548	0.01443301	Response to dexamethasone
GO:0010835	0.01497764	REGULATION OF PROTEIN adp-RIBOSYLATION
GO:0018065	0.01497764	Protein-cofactor linkage
GO:0022417	0.01497764	Protein maturation by protein folding
GO:0035672	0.01497764	Oligopeptide transmembrane transport
GO:0043129	0.01497764	Surfactant homeostasis
GO:0048021	0.01497764	Regulation of melanin biosynthetic process
GO:0060982	0.01497764	Coronary artery morphogenesis
GO:0070544	0.01497764	HISTONE h3-k36 DEMETHYLATION
GO:0045861	0.01536391	Negative regulation of proteolysis
GO:0010243	0.0154721	Response to organonitrogen compound
GO:0016999	0.01548836	Antibiotic metabolic process
GO:0043632	0.01552452	Modification-dependent macromolecule catabolic process
GO:0071496	0.01601867	Cellular response to external stimulus
GO:0010749	0.01662844	Regulation of nitric oxide mediated signal transduction
GO:0015816	0.01662844	Glycine transport
GO:0045602	0.01662844	Negative regulation of endothelial cell differentiation
GO:0070673	0.01662844	Response to interleukin-18
GO:0090037	0.01662844	POSITIVE REGULATION OF PROTEIN KINASE c SIGNALING
GO:0090557	0.01662844	Establishment of endothelial intestinal barrier
GO:0012501	0.01676415	Programmed cell death
GO:0006638	0.01679704	Neutral lipid metabolic process
GO:0003158	0.01733339	Endothelium development
GO:0035886	0.01759504	Vascular smooth muscle cell differentiation
GO:0002576	0.01760429	Platelet degranulation
GO:0009057	0.01796304	Macromolecule catabolic process
GO:0097531	0.01827659	Mast cell migration
GO:0150065	0.01827659	Regulation of deacetylase activity
GO:1903589	0.01827659	Positive regulation of blood vessel endothelial cell proliferation involved in sprouting angiogenesis
GO:0042692	0.01850603	Muscle cell differentiation
GO:1903825	0.01870598	Organic acid transmembrane transport
GO:0042770	0.01898589	SIGNAL TRANSDUCTION IN RESPONSE TO dna DAMAGE

GO:1904380	0.01916629	Endoplasmic reticulum mannanose trimming
GO:0034497	0.01992208	Protein localization to phagophore assembly site
GO:0042538	0.01992208	Hyperosmotic salinity response
GO:0043117	0.01992208	Positive regulation of vascular permeability
GO:0043455	0.01992208	Regulation of secondary metabolic process
GO:0071679	0.01992208	Commissural neuron axon guidance
GO:0071712	0.01992208	Er-ASSOCIATED MISFOLDED PROTEIN CATABOLIC PROCESS
GO:1903909	0.01992208	Regulation of receptor clustering
GO:1903364	0.02041202	Positive regulation of cellular protein catabolic process
GO:0036293	0.02058238	Response to decreased oxygen levels
GO:0000096	0.0207793	Sulfur amino acid metabolic process
GO:0042176	0.02135412	Regulation of protein catabolic process
GO:0033169	0.02156491	HISTONE h3-k9 DEMETHYLATION
GO:0042711	0.02156491	Maternal behavior
GO:0050930	0.02156491	Induction of positive chemotaxis
GO:0051152	0.02156491	Positive regulation of smooth muscle cell differentiation
GO:0098712	0.02156491	L-GLUTAMATE IMPORT ACROSS PLASMA MEMBRANE
GO:1901550	0.02156491	Regulation of endothelial cell development
GO:0042493	0.0223039	Response to drug
GO:0009267	0.02248197	Cellular response to starvation
GO:0043517	0.0232051	POSITIVE REGULATION OF dna DAMAGE RESPONSE, SIGNAL TRANSDUCTION BY P53 CLASS MEDIATOR
GO:0051775	0.0232051	Response to redox state
GO:1905063	0.0232051	Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation
GO:0000098	0.02484264	Sulfur amino acid catabolic process
GO:0001780	0.02484264	Neutrophil homeostasis
GO:0030949	0.02484264	Positive regulation of vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway
GO:0060841	0.02484264	Venous blood vessel development
GO:0070365	0.02484264	Hepatocyte differentiation
GO:1903729	0.02484264	Regulation of plasma membrane organization
GO:0023052	0.0250615	Signaling
GO:0072358	0.02533732	Cardiovascular system development
GO:0071345	0.02617878	Cellular response to cytokine stimulus
GO:0000097	0.02647755	Sulfur amino acid biosynthetic process
GO:0009070	0.02647755	Serine family amino acid biosynthetic process
GO:0032354	0.02647755	Response to follicle-stimulating hormone
GO:0034975	0.02647755	Protein folding in endoplasmic reticulum
GO:2001242	0.02654656	Regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway
GO:0055002	0.02752412	Striated muscle cell development
GO:0051641	0.02773313	Cellular localization
GO:0007154	0.02809544	Cell communication

GO:0060749	0.02810982	Mammary gland alveolus development
GO:1902236	0.02810982	Negative regulation of endoplasmic reticulum stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway
GO:0099173	0.0281839	Postsynapse organization
GO:0070304	0.02918555	Positive regulation of stress-activated protein kinase signaling cascade
GO:0019184	0.02973945	Nonribosomal peptide biosynthetic process
GO:0021756	0.02973945	Striatum development
GO:0035269	0.02973945	PROTEIN o-LINKED MANNOSYLATION
GO:0035994	0.02973945	Response to muscle stretch
GO:0036303	0.02973945	Lymph vessel morphogenesis
GO:0046459	0.02973945	Short-chain fatty acid metabolic process
GO:0048739	0.02973945	Cardiac muscle fiber development
GO:0090190	0.02973945	Positive regulation of branching involved in ureteric bud morphogenesis
GO:1900409	0.02973945	Positive regulation of cellular response to oxidative stress
GO:0052547	0.02976118	Regulation of peptidase activity
GO:0032793	0.03136646	POSITIVE REGULATION OF creb TRANSCRIPTION FACTOR ACTIVITY
GO:1903204	0.03136646	Negative regulation of oxidative stress-induced neuron death
GO:0030324	0.03192583	Lung development
GO:0051346	0.0320535	Negative regulation of hydrolase activity
GO:0006071	0.03299085	Glycerol metabolic process
GO:0006582	0.03299085	Melanin metabolic process
GO:0006925	0.03299085	Inflammatory cell apoptotic process
GO:0010447	0.03299085	Response to acidic ph
GO:0071467	0.03299085	Cellular response to ph
GO:0043123	0.03440435	POSITIVE REGULATION OF i-kappab KINASE/nf-kappab SIGNALING
GO:0035162	0.03461261	Embryonic hemopoiesis
GO:0035455	0.03461261	Response to interferon-alpha
GO:0061436	0.03461261	Establishment of skin barrier
GO:2001026	0.03461261	Regulation of endothelial cell chemotaxis
GO:1904018	0.03585371	Positive regulation of vasculature development
GO:0002052	0.03623176	Positive regulation of neuroblast proliferation
GO:0006516	0.03623176	Glycoprotein catabolic process
GO:0009404	0.03623176	Toxin metabolic process
GO:0016338	0.03623176	Calcium-independent cell-cell adhesion via plasma membrane cell-adhesion molecules
GO:0032469	0.03623176	Endoplasmic reticulum calcium ion homeostasis
GO:0072337	0.03623176	Modified amino acid transport
GO:0090312	0.03623176	Positive regulation of protein deacetylation
GO:1903573	0.03645754	Negative regulation of response to endoplasmic reticulum stress
GO:0045216	0.03658725	Cell-cell junction organization
GO:1901888	0.03695622	Regulation of cell junction assembly
GO:0051234	0.03769222	Establishment of localization

GO:0098657	0.03769854	Import into cell
GO:0002092	0.0378483	Positive regulation of receptor internalization
GO:0006541	0.0378483	Glutamine metabolic process
GO:0009067	0.0378483	Aspartate family amino acid biosynthetic process
GO:0090050	0.0378483	Positive regulation of cell migration involved in sprouting angiogenesis
GO:0009069	0.03801094	Serine family amino acid metabolic process
GO:1900101	0.03946223	Regulation of endoplasmic reticulum unfolded protein response
GO:1900745	0.03946223	POSITIVE REGULATION OF p38mapk CASCADE
GO:0010646	0.03957559	Regulation of cell communication
GO:0002053	0.04107356	Positive REGULATION OF MESENCHYMAL CELL PROLIFERATION
GO:0021591	0.04107356	Ventricular system development
GO:0032292	0.04107356	Peripheral nervous system axon ensheathment
GO:0050926	0.04107356	Regulation of positive chemotaxis
GO:0051894	0.04107356	Positive regulation of focal adhesion assembly
GO:0061217	0.04107356	Regulation of mesonephros development
GO:0048583	0.04138284	Regulation of response to stimulus
GO:0003081	0.04268229	Regulation of systemic arterial blood pressure by renin-angiotensin
GO:0036296	0.04268229	Response to increased oxygen levels
GO:0043090	0.04268229	Amino acid import
GO:0051788	0.04268229	Response to misfolded protein
GO:0070861	0.04268229	Regulation of protein exit from endoplasmic reticulum
GO:0071385	0.04270139	Cellular response to glucocorticoid stimulus
GO:0023051	0.0427469	Regulation of signaling
GO:0031667	0.04395386	Response to nutrient levels
GO:0031063	0.04428843	Regulation of histone deacetylation
GO:0050878	0.04441513	Regulation of body fluid levels
GO:0001525	0.04487887	Angiogenesis
GO:0002064	0.04543287	Epithelial cell development
GO:0048738	0.04583401	Cardiac muscle tissue development
GO:0010575	0.04589197	Positive regulation of vascular endothelial growth factor production
GO:0014044	0.04589197	Schwann CELL DEVELOPMENT
GO:0016577	0.04589197	Histone demethylation
GO:0097421	0.04749292	Liver regeneration
GO:0007275	0.04775289	Multicellular organism development
GO:2001234	0.04867906	Negative regulation of apoptotic signaling pathway
GO:0008214	0.0490913	Protein dealkylation
GO:0019098	0.0490913	Reproductive behavior
GO:0071549	0.0490913	Cellular response to dexamethasone stimulus
GO:0009636	0.04989646	Response to toxic substance

Anexo 2.- Lista de procesos biológicos enriquecidos: Se enlistan los 271 procesos biológicos enriquecidos al introducir los genes diferencialmente expresados encontrados AGS-CLDN6.