



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

Departamento de Biología Celular y Tisular

**PAPEL DE LAS CLAUDINAS -6, -7 Y -9 EN
LA INVASIVIDAD CELULAR**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A :

Biol. Torres Martínez Ana Cristina

TUTOR PRINCIPAL: DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA

COMITÉ TUTORAL: DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA

DR. ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ

MÉXICO D. F.

SEPTIEMBRE 2011



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

Departamento de Biología Celular y Tisular

**PAPEL DE LAS CLAUDINAS -6, -7 Y -9 EN
LA INVASIVIDAD CELULAR**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A :

Biol. Torres Martínez Ana Cristina

TUTOR PRINCIPAL: DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA

COMITÉ TUTORAL: DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA

DR. ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ

MÉXICO D. F.

SEPTIEMBRE 2011



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de junio de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **TORRES MARTÍNEZ ANA CRISTINA** con número de cuenta **402021915** con la tesis titulada: **"PAPEL DE LAS CLAUDINAS -6, -7, Y -9 EN LA INVASIVIDAD CELULAR."** realizada bajo la dirección de: **DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA.**

Presidente:	DRA.	YOLANDA LÓPEZ VIDAL
Vocal:	DR.	JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA
Secretario:	DR.	LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Suplente:	DRA.	TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
Suplente:	DR.	ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 01 de septiembre de 2011

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

*A los apoyos recibidos por CONACYT (No. 231856) y PAPIIT
(IN208910-2)*

A los miembros de mi Comité Tutor por su asesoría y apoyo:

DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA

DR. ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ

AGRADECIMIENTOS

A mi familia:

Especialmente a mis padres, porque fueron mi guía y una de mis más grandes motivaciones, gracias por su apoyo incondicional, su paciencia, sus enseñanzas, sus consejos, su comprensión, su cariño, sé que siempre me darán lo mejor de sí y ello me alentará para continuar con esta larga jornada, a cada momento los llevo en mi corazón y les estaré eternamente agradecida. Los Amo Mucho!!!!!!!

A mi hermana Ale gracias por tus consejos y por animarme a nunca abandonar mis sueños.

A Gabriel por tu enorme paciencia y apoyo incondicional y por alentarme siempre a dar lo mejor de mí y luchar por mis metas, gracias por creer en mí.

A mis tutores:

A la Dra. Erika y al Dr. Montaña por ser la base principal de mi aprendizaje y de mi formación, gracias a sus enseñanzas, sus experiencias, sus conocimientos, sus lecciones, esencialmente por el gran apoyo y la confianza que me han brindado a lo largo de mi estancia en esta institución, se que siempre contare con ustedes, les guardo un gran cariño y les agradezco infinitamente.

A mis amigos:

A Osva, Vero, y Bernardo porque para mí representan un gran ejemplo y motivación para seguir adelante, gracias por sus enseñanzas, por compartir su tiempo, por sus consejos y por su grandiosa amistad.

A Bere por todo el tiempo que hemos compartido en esta institución, las experiencias, las alegrías, el arduo trabajo, por todas las vivencias que nos han hecho crecer juntas, por tu amistad incondicional.

A Pao y Sam por su gran apoyo en todos los aspectos, por permitirme compartir mis experiencias y conocimientos, por ponerle una chispa especial a mi estancia en el laboratorio, por su alegría, gracias en verdad por su amistad.

A Yam y Jane por su paciencia, su persistencia, su dedicación, por permitirme mostrarles una gran parte de lo ya aprendido, por su ayuda, por hacer del laboratorio un lugar más ameno y comfortable, por la amistad que me brindan.

A Christian, Monse, Luis por sus consejos, por alentarme a seguir firme, por sus aportaciones, todo ello me hace crecer día a día.

A Cristi y Gaby por todo el apoyo, los consejos, las recomendaciones, por darme siempre un poco de su tiempo para solucionar dudas, se les aprecia de todo corazón.

A la Dra. Ma. Cristina Castañeda Patlan, por su asesoría técnica en el desarrollo de la tesis.

INDICE

Resumen.....	9
Abstract.....	11
Introducción.....	12
Adhesión celular y procesos invasivos.....	14
Degradación de la Matriz Extracelular.....	15
Metaloproteasas de Matriz.....	17
Gelatinasas (MMP-2 y (MMP-9).....	20
Movilidad de las células tumorales.....	22
Uniones Intercelulares.....	22
Desmosomas, Uniones Gap y Uniones Adherentes.....	23
Uniones estrechas.....	24
JAM.....	25
Ocludina.....	26
Tricelulina.....	26
Claudinas.....	27
Expresión de Claudinas y cáncer.....	30
Claudinas, Invasión tumoral y Metástasis.....	32
Planteamiento del Problema.....	33
Hipótesis.....	35
Objetivos.....	36
Materiales y Método.....	37
Anticuerpos, plásmidos y enzimas.....	37
Cultivos celulares.....	37

Construcción de los vectores pcludn2GFP, pcludn6GFP, pcludn7GFP, pcludn9GFP.....	38
Transfección de las células AGS y MCF-7.....	38
Fraccionamiento celular y Western Blot.....	39
Imágenes de microscopia confocal e inmunofluorescencia.....	40
Detección de mRNA de las claudinas 2, 6, 7 y 9 en las células AGS y MCF-7 transfectadas.....	40
Inmunoprecipitación.....	40
Zimogramas.....	41
Resultados.....	42
Discusión de resultados.....	51
Conclusiones.....	56
Perspectivas.....	57
Bibliografía.....	58
ANEXO I.....	67

RESUMEN

Durante el desarrollo del cáncer se llevan a cabo múltiples cambios en las células que involucran la alteración de rutas esenciales para el funcionamiento adecuado de las mismas. Como consecuencia, existe un descontrol en las células del tejido lo que finaliza en la adquisición de un fenotipo tumoral, la célula entonces desarrolla una serie de ventajas que le permiten la formación del tumor, entre las cuales se encuentra la capacidad de invadir y metastatizar, para ello las células necesitan degradar localmente la membrana basal y la matriz extracelular (MEC). Esta degradación se lleva a cabo mediante la acción de enzimas llamadas metaloproteasas, su acción degradadora es muy importante ya que puede alterar los contactos célula-célula y célula-MEC. Las Uniones estrechas (UE) se localizan en la parte más apical de las células epiteliales. Los cambios en la expresión de proteínas que conforman a las UE como las claudinas durante el desarrollo del tumor concuerda con la idea de que este proceso se acompaña por el desensamble de las UE y la pérdida de la adhesión célula-célula. Actualmente se ha sugerido que las claudinas juegan un papel muy importante en la invasividad y la metástasis. Los estudios apuntan a que el aumento en la expresión de estas claudinas en algunos tipos de cáncer se asocia con un aumento en la capacidad invasiva de dichos carcinomas, como resultado del aumento en la actividad de MMPs. En este sentido, existen reportes que señalan que las claudinas -1, -2 -3, -4 y -5 reclutan y promueven la activación de MMP-2. La disminución de claudina-10, disminuye la invasividad celular a través de la “down-regulation” de MMP-2 y MT1-MMP en el carcinoma hepatocelular y la sobreexpresión de claudinas 6, 7 y 9 aumentan la proliferación y el potencial invasivo de células del adenocarcinoma gástrico. De acuerdo con lo anterior, el objetivo del presente estudio radica en determinar si la sobreexpresión de claudinas 6, 7 y 9 conlleva a la activación de MMPs y si esta activación es directa o indirecta. Para abordar los objetivos planteados, se realizaron transfecciones con vectores específicos para cada claudina en células de adenocarcinoma gástrico (AGS) y de cáncer de mama (MCF-7) y se corroboró la sobreexpresión de dichas proteínas por ensayos de RT-PCR, western blot e inmunofluorescencias. Para determinar la interacción de las claudinas con las MMPs y la activación de las mismas, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación y zimografía. Los resultados utilizando células AGS muestran una probable interacción de claudina-9 con

MMP-2 y MMP-9 y una correlación entre la sobreexpresión de claudina-7 y -9 con una disminución en la actividad de MMP-2. Por otro lado, en células MCF-7 se observó colocalización de claudina-2 y -7 con MMP-2 y claudina-6 con MMP-9 y una correlación entre la sobreexpresión de claudina-2 y un aumento en la actividad de MMP-2. Los resultados sugieren que, independientemente del origen de la línea celular, claudina-9 parece encontrarse en cercanía con la MMP-9 y claudina-7 con la MMP-2. Se requiere de más experimentos para determinar el mecanismo por el cuál estas claudinas pueden promover la activación de las MMPs, sin embargo se sugiere que las claudinas tienen un papel muy importante en este evento.

ABSTRACT

Tight junctions (TJ) are the most typical structures of epithelial and endothelial cells. Claudins belong to the integral transmembrane proteins that are responsible for correct assembly of the TJ structure. Changes in the expression of claudins during tumor development promote TJ disassembly and the loss of cell-cell adhesion playing a role in invasiveness and metastasis. Expression of claudins in some types of cancer is associated with increased invasive capacity as a result of increased activity of metalloproteinases (MMPs). Claudins -1, -2, -3 and -4 can recruit and promote the activation of MMP-2. Decrease in claudin 10 expression diminishes cell invasiveness through down-regulation of MMP-2 and MT1-MMP in hepatocellular carcinoma. Expression of claudin-6, -7 or -9 in human gastric adenocarcinomas has a role as a prognostic marker of poor survival. To evaluate the mechanism by these claudins can promote invasiveness; we determine whether overexpression of claudins-6, -7 or -9 leads to activation of MMPs. Human gastric adenocarcinoma cells (AGS) and breast cancer cells (MCF-7) were transfected with these claudins and immunoprecipitation and zymography assays were performed. The results show a probable interaction of claudin-9 with MMP-2 and MMP-9 in AGS cells and a correlation between overexpression of claudin-7 and -9 with a decrease in the activity of MMP-2. Similarly colocalization of claudin-6 and -7 with MMP-2 and claudin -6, -7 and -9 with MMP-9 was observed in MCF-7 cells. These results suggest an important role for claudin-7 and -9 in the activation of these metalloproteinases.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad reconocida a nivel mundial. Desde hace algunas décadas la investigación biomédica ha tratado de ampliar la información acerca de los mecanismos y las vías de señalización involucradas en la carcinogénesis así como las etapas iniciales de la progresión tumoral. En general, durante este proceso se originan mutaciones en genes que regulan rutas esenciales de función celular permitiendo un descontrol en las células del tejido y como consecuencia la adquisición de un fenotipo tumoral. De esta forma la célula desarrolla una serie de capacidades como: a) insensibilidad a señales que regulan el crecimiento celular, b) potencial replicativo ilimitado, c) evasión de mecanismos normales de apoptosis, d) pérdida de diferenciación y polaridad celular, e) autosuficiencia de factores de crecimiento, f) activación continua de angiogénesis, g) invasión, infiltración y metástasis; siendo estas últimas algunas características distintivas que definen la malignidad del tumor.¹ Un tumor que todavía no ha llegado a un fenotipo invasivo a menudo se refiere como carcinoma “*in situ*”. La metástasis se refiere a la capacidad que tiene un tumor primario de salir a la circulación, viajar a través de ella e instalarse en un tejido distante y formar un tumor secundario. Este proceso se compone de 5 pasos que son denominados comúnmente como la cascada metastásica^{1,2,3}:

- 1) Invasión y migración.
- 2) Angiogénesis.
- 3) Intravasación.
- 4) Extravasación
- 5) Colonización.

El primer paso en el proceso de metástasis es esencialmente la invasión tumoral. Hasta el momento se han realizado diversos estudios sobre los mecanismos moleculares involucrados en la invasión de las células tumorales así como la relación que tienen éstas con el estroma circundante con el cual interactúan. Invasión no solo se relaciona con la capacidad que tienen las células para empujar el tejido adyacente, si no también, la capacidad que tienen para invadir de forma activa y por lo tanto, destruir estos tejidos.^{2,3}

El crecimiento invasivo en condiciones normales, es un programa morfogenético muy complejo en el cual la respuesta proliferativa está integrada por una serie de eventos aparentemente independientes tales como la migración, sobrevivencia, degradación de matriz y la inducción de la polaridad celular. En el primer paso de esta secuencia una célula dentro de una colonia o tejido sólido es instruida para ejercer daño sobre las uniones intercelulares y adquirir un fenotipo motil fibroblastoide iniciando el desprendimiento del sitio primario de crecimiento. Esta dramática remodelación es acompañada por rearrreglos del citoesqueleto y el incremento de proteasas de matriz extracelular las cuales degradan componentes de la lámina basal permitiendo el movimiento celular a través del ambiente circundante^{3,4}. Durante esta fase, las células que invaden pueden inducir una remodelación constante y dinámica de los contactos de adhesión mediados por integrinas con la matriz extracelular, el cual provee un soporte mecánico para la migración celular y previene la inducción de apoptosis.

En tejidos transformados existe una implementación aberrante de estas interacciones entre las células tumorales y el tejido blanco, que son responsables de la progresión del cáncer y la metástasis, un proceso en el cual las células neoplásicas debilitan al tejido e invaden compartimentos foráneos donde puedan migrar, proliferar y sobrevivir (figura 1) . Clásicamente este proceso involucra una serie de pasos interrelacionados los cuales incluyen disociación de las células malignas del tumor primario, invasión local, angiogénesis, intravasación al sistema linfático, sobrevivencia en la circulación, extravasación y proliferación en un sitio u órgano distante⁴.

Durante el proceso de invasión tumoral las células son capaces de activar enzimas para degradar localmente la membrana basal y la matriz extracelular de los epitelios las cuales representan una barrera física y continua que les impide invadir al tejido circundante. Estas células malignas pueden disociarse del tumor primario mediante la pérdida de su capacidad de adhesión célula-célula y así invadir el estroma circundante. De esta forma el potencial invasivo de las células tumorales depende de tres fenómenos: a) alteraciones en la adhesión celular b) degradación proteolítica de la matriz extracelular y c) movilidad de las células tumorales^{5,6}.

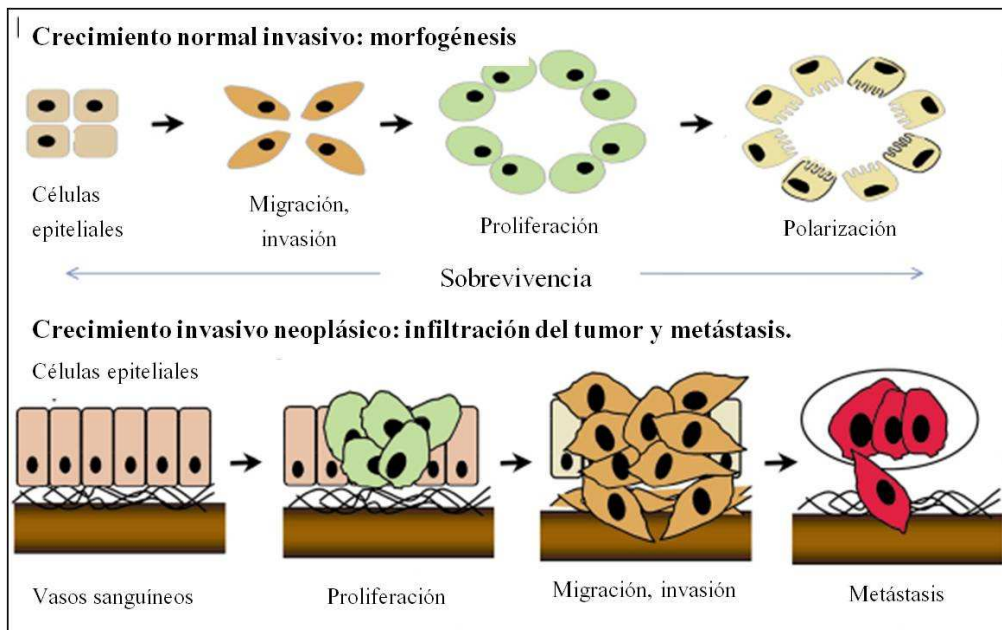


Figura 1. Crecimiento invasivo en condiciones fisiológicas y patológicas.
(Comoglio, M. Trusolino, L. 2002)

ADHESIÓN CELULAR Y PROCESOS INVASIVOS

El mantenimiento de la arquitectura normal del tejido es de suma importancia para el adecuado funcionamiento del mismo. En la invasión tumoral inicialmente se encuentran desregulados los mecanismos de adhesión celular y se llevan a cabo diversas alteraciones en estos sistemas los cuales pueden jugar un papel dual y aparentemente contradictorio ya que, por una parte las células tumorales necesitan debilitar las uniones que estabilizan su localización normal (anclajes) pero al mismo tiempo necesitan mantener y/o desarrollar mecanismos de adhesión al sustrato que les garanticen los puntos de apoyo necesarios para avanzar a través del tejido circundante y que les proporcionen señales de supervivencia y proliferación. Como consecuencia, diferentes moléculas de adhesión pueden actuar como promotores o supresores de la invasión celular^{5,7}.

Entre las moléculas de adhesión que pueden actuar como supresoras de la invasividad se encuentran las cadherinas, proteínas de membrana dependientes de calcio que participan en la formación de uniones adherentes. La E-cadherina tiene un papel como supresora de la invasividad, el cual se ha demostrado por diversos estudios en donde se ha observado una reducción de su expresión en tumores invasivos. Así mismo el incremento o la reducción en

su expresión provocan respectivamente la inhibición o estimulación de la invasividad en células tumorales⁸. Finalmente se ha observado que los factores de transcripción de la familia Snail, que reprimen fuertemente la expresión del gen de la E-cadherina, están implicados en la diferenciación de células epiteliales a mesenquimatosas y confieren un fenotipo invasor a las células epiteliales que los expresan^{7,8,9}.

Por otro lado, existen moléculas de adhesión que desempeñan un papel como promotoras de invasión y metástasis. Por ejemplo la proteína ICAM-I (*intercelular adhesión moleculare-I*) facilita la invasividad de células de melanoma. Las integrinas desempeñan también un papel fundamental en el comportamiento invasor de las células tumorales a través de la regulación de diversos fenómenos. Su papel en la progresión de tipos específicos de cánceres humanos y en la metástasis está bien descrito en estudios recientes. Por ejemplo, se ha demostrado que el patrón de expresión de integrinas se ve alterado por la transformación neoplásica y que tales cambios afectan a la regulación de diversas cascadas proteolíticas. También se ha comprobado que algunas integrinas pueden actuar como supresoras de tumorigenesis como es el caso de integrina $\alpha_2\beta_1$ en células de carcinoma de mama^{8,10}.

DEGRADACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

La matriz extracelular (MEC) es una entidad estructuralmente compleja que rodea y soporta a las células que se encuentran en los tejidos de los mamíferos, también comúnmente conocida como tejido conectivo. Está formada por un conjunto de macromoléculas que se localizan entre las células de un determinado tejido, o en el lado externo de la membrana plasmática de cualquier célula¹¹. Estos componentes son en general producidos por las mismas células o los aporta el torrente sanguíneo. En ambos casos forman el medio donde las células sobreviven, se multiplican y desempeñan sus funciones.

Las macromoléculas que constituyen la matriz extracelular son: (1) colágena (2) elastina (3) proteoglicanos y (4) glicoproteínas multifuncionales (laminina, fibronectina, tenascina, trombospondina y otras). Cada una desempeña funciones de manera integrada con las demás; esto hace que la matriz sea considerada como un verdadero complejo funcional¹².

Las colágenas y el sistema elástico constituyen la arquitectura de la matriz extracelular. Las glicoproteínas actúan como moléculas de adhesión del sustrato intercelular, importantes en las interacciones célula-célula y célula-matriz. Los glicosaminoglicanos y proteoglicanos tienen un papel fundamental en el equilibrio hidroelectrolítico y ácido básico^{12, 13}.

La matriz extracelular requiere reorganizarse para satisfacer las necesidades fisiológicas de los tejidos, además de una regeneración constante lo cual lleva a cabo mediante la degradación de algunos componentes y la producción de otros nuevos por parte de la célula. En diferentes procesos como el desarrollo, morfogénesis, remodelación y reparación de tejidos se lleva a cabo la degradación de la matriz extracelular (MEC). Este evento es perfectamente regulado bajo condiciones fisiológicas normales, sin embargo, cuando se encuentra desregulado puede ser la causa de muchas patologías, tales como artritis, cáncer, encefalomiелitis, úlceras crónicas, fibrosis, etc^{14, 15}.

Durante el véneto neoplásico los tumores permanecen confinados en los tejidos debido a que las membranas basales y la matriz extracelular de los epitelios constituyen una barrera física, lo que impide eficazmente su diseminación local y sistémica. La superación de esta barrera por las células invasoras implica la degradación localizada de los distintos componentes de la MEC. Las macromoléculas de la matriz extracelular son muy importantes para crear el ambiente celular requerido durante el desarrollo, morfogénesis y degradación. Varios tipos de proteinasas están implicadas en la degradación de la MEC¹⁵.

Las proteasas pueden clasificarse en cinco grupos de acuerdo con el elemento esencial de su centro activo: aspartilproteasas, cisteínproteasas, serínproteasas, treonínproteasas y metaloproteasas conteniendo un residuo de ácido aspártico, cisteína, serina, treonina o un catión como Zn^{2+} respectivamente. En la degradación proteolítica de la matriz extracelular participan fundamentalmente las metaloproteasas, cuyos productos facilitan la progresión tumoral¹⁶.

Metaloproteasas de Matriz Extracelular

Las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) son endopeptidasas dependientes de zinc. Son sintetizadas como precursores inactivos (pro-MMPs) que requieren la eliminación proteolítica de un propéptido para su activación. Su pH óptimo es neutro y son inhibibles por agentes quelantes, así como, por un grupo de proteínas denominadas TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteases*)^{16,17}.

Las MMPs son secretadas por la célula o se anclan a la membrana plasmática. Estructuralmente están constituidas por un péptido señal, un propéptido de alrededor de 80 aminoácidos, un dominio catalítico de alrededor de 170 aminoácidos y un dominio hemopexina (Hpx) de alrededor de 200 aminoácidos. Algunas excepciones son la MMP-7, MMP-26 y MMP-23, que carecen del dominio Hpx, y la MMP-23 que tiene un dominio único rico en cisteína y un dominio parecido a una inmunoglobulina después del dominio catalítico. Las MMPs de membrana tienen un dominio transmembranal y un dominio carboxilo terminal citoplasmático¹⁷ (figura 2).

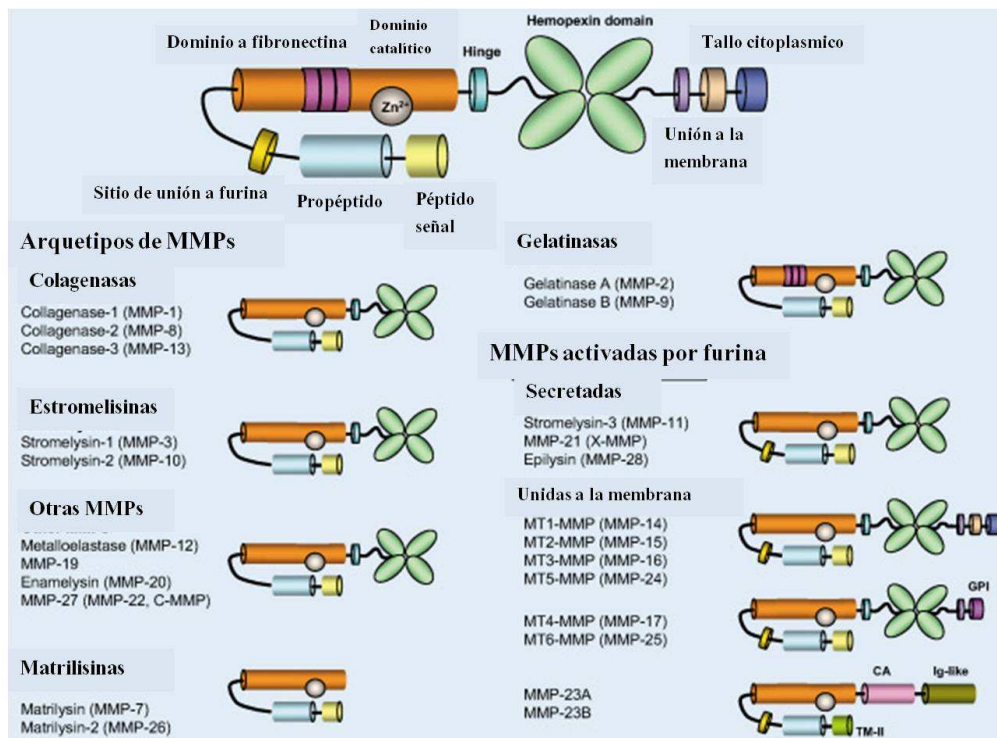


Figura 2. Estructura básica y variantes de metaloproteasas de matriz extracelular (Lopez-Otin C., et. al. 2004).

Las MMPs se secretan inicialmente en un estado enzimáticamente inactivo el cual se mantiene gracias a la formación de un enlace entre un residuo de cisteína (Cys 73) en el propéptido y un ion Zn^{2+} en el dominio catalítico, este enlace le da estabilidad a la proteína para mantenerse en su forma inactiva. La activación de las MMPs involucra una ruptura del enlace Zn^{2+} -Cys⁷³, mecanismo al que se le llama “cysteine switch”, el cual es mediado por la remoción proteolítica del propéptido o modificación química del residuo de cisteína. Esta alteración causa una reducción en la masa molecular y genera una enzima completamente activa¹⁸.

A la fecha se conocen 24 MMPs diferentes en vertebrados de las cuales 23 son encontradas en humanos¹⁸. Estas enzimas se descubrieron originalmente para la degradación de sustratos de la matriz extracelular con un papel predominante en la homeostasis de la misma, pero ahora está claro que tiene una funcionalidad más amplia. Tales funciones incluyen: efectos opuestos en la angiogénesis a través de la degradación de la matriz, así como también liberación de inhibidores de angiogénesis; regulación del crecimiento celular a través de la escisión de receptores y factores de crecimiento unidos a la superficie; liberación de factores de crecimiento secuestrados en la MEC; regulación de apoptosis a través de la liberación de factores de sobrevivencia y muerte; alteración de la motilidad celular a través de la degradación de moléculas de adhesión; efectos sobre el sistema inmune y defensa del hospedero; modulación de la actividad biológica de las quimiocinas¹⁹.

Las metaloproteasas juegan un papel fundamental en la invasión tumoral. La actividad y la expresión de las MMPs está regulada a diferentes niveles: transcripción de genes, activación de zimógenos, secreción de enzima, y por inhibidores endógenos llamados inhibidores tisulares de Metaloproteasas (TIMPs). Los TIMPs son una familia de cuatro proteínas de secreción que se unen al sitio catalítico de las MMPs en una relación estequiométrica de 1:1¹². Los TIMPs inhiben la actividad de las MMPs solubles, asociadas a la membrana celular o que se encuentran unidas a la MEC. Además de su capacidad de inhibir la actividad de las MMPs, los TIMPs participan en la activación de estas enzimas al formar complejos con sus formas latentes.

Tal es el caso del TIMP-2, que forma un complejo con pro-MMP-2 y MT1-MMP (MMP-14) para la activación de esta proenzima, y de TIMP-1, que participa en la activación de MMP-9 al formar el complejo de activación pro-MMP-9/MMP-3/TIMP-1 en el espacio extracelular²⁰.

Tradicionalmente la familia de las MMPs se clasifica en 5 subfamilias atendiendo a sus características estructurales y a su especificidad de sustrato: colagenasas, gelatinasas, estromielisinas, matrilisinas y metaloproteasas de membrana o MT-MMP^{16, 17, 21}. (Tabla 1)

Subgrupos	Metaloproteasas (MMPs)	Nombre	Sustrato
Colagenasas	MMP-1	Colagenasa-1	Colágena I, II, III, VII, VIII, X y gelatina
	MMP-8	Colagenasa-2	
	MMP-13	Colagenasa-3	
Gelatinasas	MMP-2	Gelatinasa A	Colágena I, IV, V, VII, X, XI, XIV y gelatina
	MMP-9	Gelatinasa B	
Estromielisinas	MMP-3	Estromielisina-1	Colágena II, IV, IX, X, gelatina, $\alpha\beta$ -caseína
	MMP-10	Estromielisina-2	
	MMP-11	Estromielisina-3	
Matrilisinas	MMP-7	Matrilisina-1	Colágena I, II, III, V, IV, X y caseína
	MMP-26	Matrilisina-2	
MMPs tipo-membrana	MMP-14	MT1-MMP	Gelatina, fibronectina y laminina
	MMP-15	MT2-MMP	
	MMP-16	MT3-MMP	Fibrinógeno y fibrina
	MMP-17	MT4-MMP	Gelatina, fibronectina
	MMP-24	MT5-MMP	Gelatina
	MMP-25	MT6-MMP	
Otras MMPs	MMP-12	Metaloelastasa	Colágena IV, elastina
	MMP-19	RASI-1	Colágena I, IV y gelatina
	MMP-20	Enamelisina	
	MMP-23	CA-MMP	Gelatina
	MMP-26	Matrilisina-2, endometasa	Colágena IV y gelatina
	MMP-28	Epilisina	Gelatina

Tabla 1. Tipos de metaloproteasas de matriz extracelular y sus diferentes sustratos.

(Modificado de Snehasikta S. et. al 2011)

Las colagenasas (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18) tienen la capacidad de degradar colágenas intersticiales I, II y III en un sitio específico del extremo N-terminal. Las colagenasas principalmente regulan a la alza la remodelación de tejidos incluyendo el

desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas y diferentes tipos de tumores malignos. Las gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9) se incluyen dentro de esta categoría. Las estromelisininas (MMP-3, MMP-10 y MMP-11) tienen un dominio estructural similar a las colagenasas pero ellas no pueden degradar al colágeno fibrilar nativo.

La MMP-3 puede activar a varias MMPs incluyendo a proMMP-1, 3, 7, 8, 9 y 13, y así mismas son activadas por plasmina, calicreína, quimasa y triptasa. El grupo de las matrilisininas (MMP-7, 27 y 26) carece del dominio C-terminal. MMP-7 es sintetizada por células epiteliales y se secreta apicalmente. Además de los componentes de la matriz, estas enzimas degradan moléculas de superficie celular como pro- α defensina, ligando-Fas, TNF- α y E-cadherina. Finalmente se encuentra el grupo de las Metaloproteasas de membrana (MMP-14, 15, 16 y 24), proteínas transmembrana (17 y 25) y ancladas al fosfolípido glucosil fosfatidil inositol (GPI). Todas tienen sitios de reconocimiento a furina en el C-terminal del propéptido por lo tanto se activan intracelularmente y la enzima activa probablemente se expresan en la superficie celular. Todas las MMT-MMPs excepto MMP-17 pueden activar a proMMP-2^{12, 20,21}.

Gelatinasas (MMP-2 y MMP-9)

Las gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9), se caracterizan por digerir fácilmente colágena desnaturalizada y gelatina. Estas enzimas tienen tres secuencias peptídicas repetidas análogas a los motivos de la fibronectina tipo II, insertados en el dominio catalítico el cual se une a colágena, gelatina y laminina. MMP-2 pero no MMP-9 digiere colágeno tipo I, II y III. Así mismo son capaces de degradar el colágeno tipo IV que forma parte de las membranas basales de los epitelios. Esto sugiere que las gelatinasas podrían desempeñar un papel decisivo en la capacidad de las células tumorales de origen epitelial para atravesar dichas membranas basales e invadir el estroma de los tejidos circundantes¹⁷.

La MMP-2 o gelatinasa A es expresada ubicuamente como una proenzima de 72 kDa y está sujeta a glicosilación extensa. La activación de proMMP-2 se lleva a cabo en la superficie celular y está mediada por MT-MMPs. Se requiere la formación de un complejo entre proMMP-2 y TIMP-2 a través de su dominio C-terminal permitiendo al dominio inhibitorio

N-terminal de TIMP-2 unirse a MT-MMP1 en la superficie celular, es así como, pro-MMP-2 unida en la superficie celular es activada por uno de los monómeros de MT-MMP1 que está libre de TIMP-2. Por otra parte, el monómero de MT-MMP1 inhibido por TIMP-2 puede actuar como un receptor de proMMP-2²².

La agrupación de MT-MMP1 en la superficie celular a través de interacciones con el dominio hemopexina facilita el proceso de activación (figura 3). Jo et. al reportaron que el máximo incremento en la activación de proMMP-2 se observa en un rango de TIMP-2/MT-MMP1 de 0.05 sugiriendo que un gran número de MT-MMP1 libres pueden rodear el complejo proMMP-2/TIMP-2/MT-MMP1 para una activación mas eficaz²³.

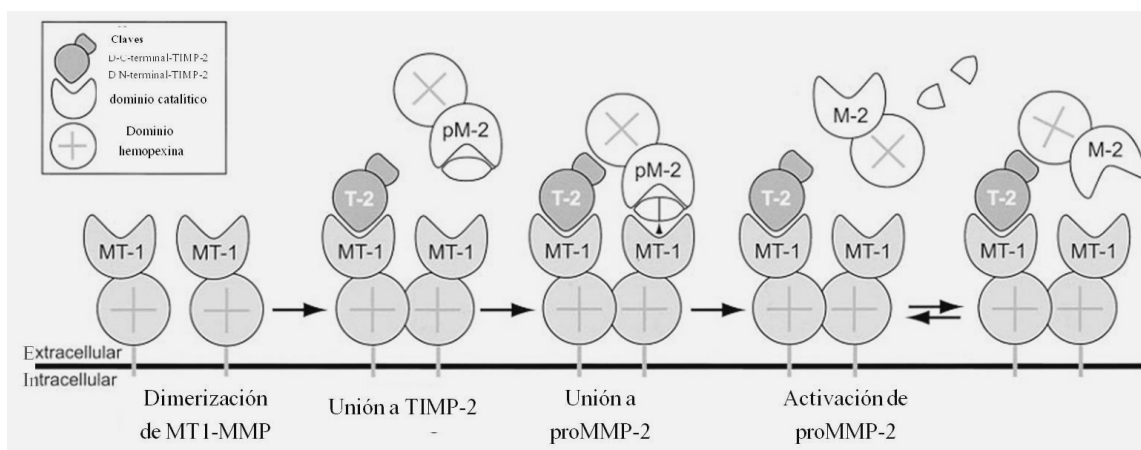


Figura 3. Modelo de activación de proMMP-2 por MT1-MMP y TIMP-2. La forma activa de MT1-MMP (MT-1) sobre la membrana se une a una molécula de TIMP-2 (T-2) inhibiendo su actividad. MT1-MMP puede formar dímeros o multímeros en la superficie celular. Pro-MMP-2 (pM-2) se une al C-terminal de TIMP-2 a través de su dominio tipo hemopexina. El monómero activo de MT1-MMP se une al dominio catalítico de proMMP-2 activándola parcialmente. (Visse, R. 2009)

La MMP-9 o gelatinasa B se expresa como una proenzima de 92 kDa, la cual una vez activa se convierte en una enzima madura de 83 kDa. El gran tamaño de MMP-9 en relación con MMP-2 se puede atribuir a la inserción de una colágena tipo V que es fuertemente O-glicosilada y que enlaza al dominio de metaloproteasa con el dominio tipo hemopexina²⁴. La activación de MMP-9 es mediada por la remoción del pro-dominio por una serinoproteasa u otras MMPs o puede serlo por una respuesta directa al estrés oxidante que altera al “switch de cisteína”. Mientras exista un solapamiento considerable en los

sustratos degradados por MMP-2 y MMP-9, MMP-9 es incapaz de dirigir la proteólisis de colágena I²⁵.

MOVILIDAD DE LAS CÉLULAS TUMORALES

Como ya se ha discutido anteriormente varias proteasas extracelulares degradan la MEC y, por tanto, establecen una base para la invasión de células tumorales. El fenotipo invasor de las células implica la capacidad de moverse activamente lo cual se correlaciona directamente con su potencial metastásico. Las células invasivas pueden moverse en respuesta a factores extracelulares solubles de una manera direccional o aleatoria o en respuesta a componentes inmovilizados en la matriz extracelular. Este movimiento es de tipo ameboide, e implica reordenamientos constantes del citoesqueleto y alteraciones continuas de los complejos de adhesión. La despolimerización de los filamentos de actina en la parte posterior de la célula en movimiento y su ensamblaje en la región anterior da lugar a tres tipos de protuberancias: filipodios, lamelipodios y pseudópodos. En estas protuberancias se establecen uniones focales mediante la interacción de las integrinas presentes en la membrana plasmática de las células tumorales con sus ligandos de la matriz extracelular, uniones que proporcionan el anclaje necesario para el desplazamiento de la célula, al tiempo que este tipo de uniones locales se debilita en la parte posterior, permitiendo su retracción².

Es claro que durante el desarrollo del cáncer la acción de degradación de las MMPs sobre la MEC es muy importante porque es capaz de alterar las uniones célula-MEC y célula-célula.

UNIONES INTERCELULARES

Las células epiteliales y endoteliales de los tejidos forman barreras para mantener a los órganos en subcompartimentos funcionales. Este aislamiento y compartimentalización es crucial para la función de los órganos en todos los organismos multicelulares. Las células controlan estas barreras selectivas regulando el movimiento de agua, iones y otras proteínas a través de las monocapas, generando así la polaridad y función celular. El movimiento de

iones y moléculas es conocido como permeabilidad paracelular y es regulada por los sitios de contactos célula-célula²⁶.

Los contactos célula-célula están lejos de ser estructuras estáticas que mantienen la barrera simplemente por la unión de las células, de hecho estos contactos se someten a constante remodelación para permitir la extrusión de células apoptóticas así como la incorporación de nuevas células epiteliales diferenciadas derivadas de células progenitoras sin la pérdida de la función de barrera. Durante la cicatrización de heridas, las células epiteliales pueden experimentar movimientos coordinados y proliferar para cerrar la herida y establecer nuevos contactos célula-célula²⁷.

Los contactos célula-célula en los epitelios consisten de tres principales estructuras adhesivas: uniones estrechas (UE), uniones adherentes (UA), y desmosomas, así como también las uniones Gap para la comunicación celular²⁸ (figura 4).

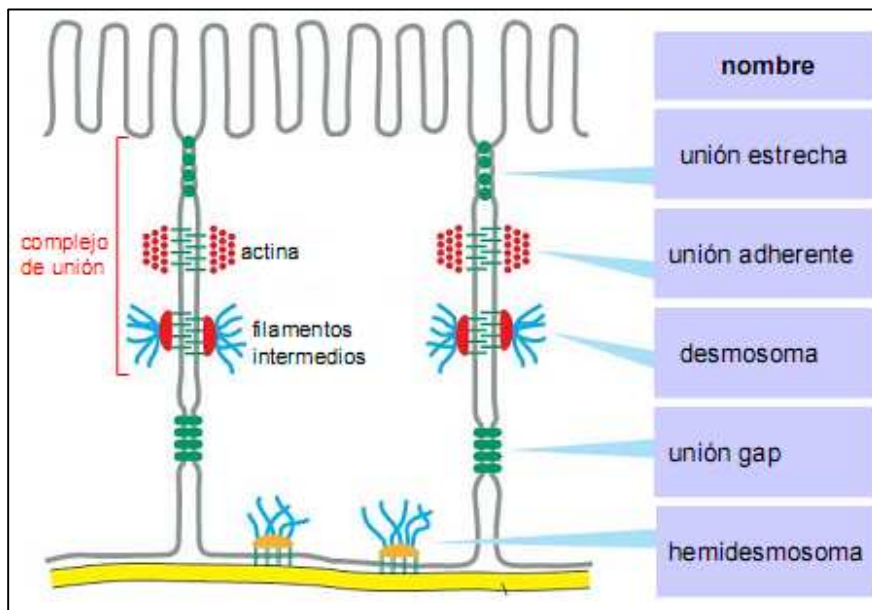


Figura 4. Complejo multimolecular de uniones intercelulares. (Lodish et al. 2003)

Desmosomas, Uniones GAP y Uniones adherentes

Los desmosomas son puntos adherentes que forman una red continua que se extiende a todo el tejido a través de la unión de sus proteínas integrales de membrana (desmocolina y

desmogleína) mediante desmoplaquinas (placoglobina y placofilina) a filamentos intermedios. Los desmosomas son cruciales para la integridad del tejido ya que proporcionan cierta rigidez, y pueden regularse por la proteína cinasa C cuando se requiere la remodelación dinámica de la adhesión célula-célula^{28,29}.

Las uniones Gap (UG) son conexiones o nexos que permiten la difusión de metabolitos pequeños, segundos mensajeros, iones y otras moléculas entre células vecinas. La comunicación a través de las uniones Gap es esencial para la transducción eléctrica, señalización y nutrición. Están formadas por dos hemicanales, llamados conexones que se encuentran insertos en la membrana de dos células contiguas, la apertura o el cierre de estos canales es un proceso dinámico altamente regulado a diferentes niveles^{28,30}.

Las uniones adherentes (UA) son microdominios que le proporcionan la fuerza mecánica al epitelio. Las proteínas integrales de membrana más abundantes pertenecen a la familia de las cadherinas principalmente la E-cadherina. Las interacciones homotípicas dependientes de calcio entre las cadherinas y el espacio extracelular conducen a fuertes interacciones célula-célula³¹.

Uniones estrechas

Las uniones estrechas (UE) son las uniones intercelulares más apicales de las células epiteliales y endoteliales. Dos principales funciones definidas por las UE son la regulación de la permeabilidad paracelular mediante la función de barrera, regulando la difusión de iones, agua y moléculas de tamaño mediano ($< 15\text{\AA}$); y el mantenimiento de la polaridad celular mediante la función de cerca, restringiendo el libre movimiento de proteínas y lípidos entre las superficies apical y basolateral^{32, 33}. Por tanto, las UE establecen compartimentos separados en los organismos multicelulares y también son cruciales para el intercambio de sustancias entre el ambiente celular interno y externo. Las proteínas transmembranales que constituyen a las UE se encuentran conectadas al citoesqueleto vinculando así los sitios de adhesión matriz-célula y célula-célula³⁴.

Las UE pertenecen a un complejo multimolecular compuesto por aproximadamente 40 proteínas diferentes, entre las cuales se encuentran: 1) proteínas placa o de anclaje (*scaffolding proteins*) que constituyen un andamiaje para el ensamble de las UE, reclutan proteínas citosólicas para el ensamble con el citoesqueleto o están involucradas en la regulación de procesos como la transcripción, polaridad, proliferación y diferenciación celular; 2) proteínas que regulan el tráfico vesicular y 3) proteínas transmembranales como la proteína JAM (*junctional adhesión molecule*), ocludina, tricelulina y claudinas^{30,35,36} (Figura 5).

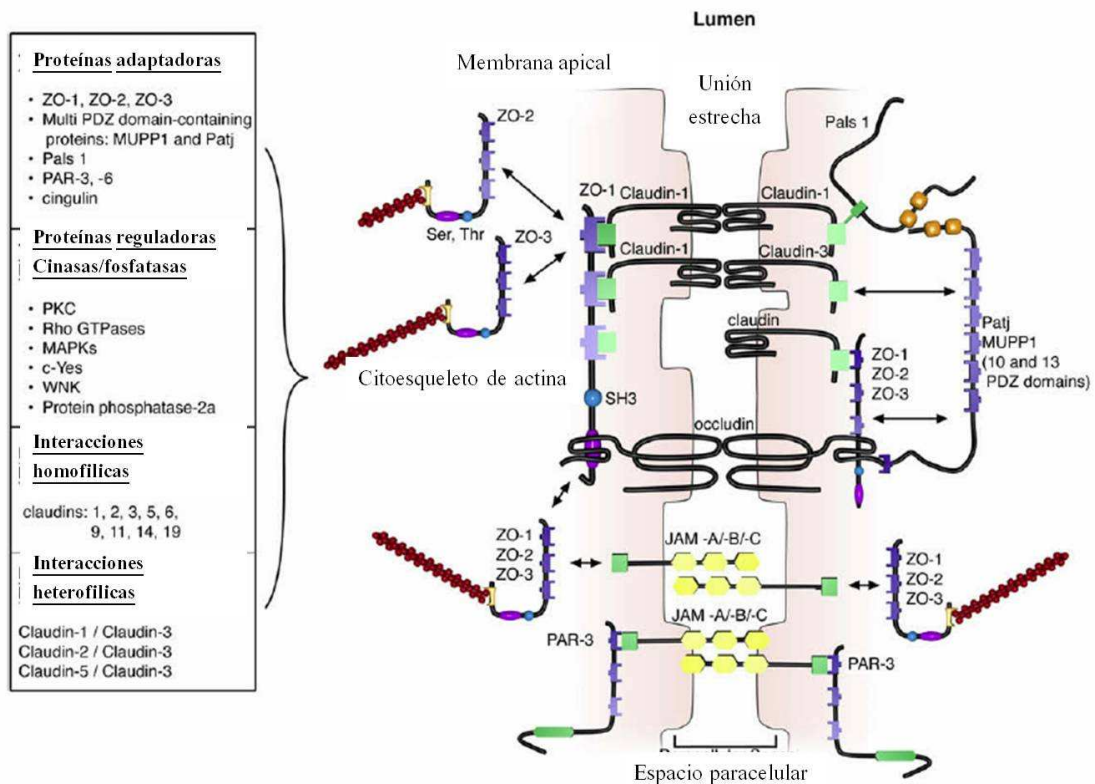


Figura 5. Estructura molecular de las Uniones Estrechas. (Groschwitz and Hogan, J. Allergy, 2009)

JAM

La JAM es una proteína glicosilada que ha sido localizada junto con la ocludina y claudinas en las UE. Pertenece a una superfamilia de inmunoglobulinas y tiene un solo dominio transmembranal. Su porción extracelular está plegada dentro de dos dominios similares a inmunoglobulinas tipo V, y posee un dominio carboxi-terminal intracelular corto. Las

proteínas JAM están involucradas en la transmigración celular y en el ensamble de las uniones celulares, así como, en los mecanismos de adhesión de células epiteliales y endoteliales³⁶.

Ocludina

Esta proteína se identificó como la primera proteína integral de membrana localizada en las uniones estrechas. Su peso molecular aproximado es de 60 kDa, tiene cuatro dominios transmembranales y tres regiones intracitoplasmáticas (un dominio carboxilo terminal largo, un dominio amino terminal corto y una asa intracelular corta). El dominio carboxilo terminal es rico en residuos de serina, treonina y tirosina los cuales son blancos para diferentes tipos de proteínas de anclaje y proteínas cinasas^{30, 36,37}. Esta región de ocludina es responsable de la asociación con ZO-I. En estudios de microscopia electrónica por inmunoréplica se ha podido medir la presencia de las UE utilizando anticuerpos contra ocludina indicando que esta proteína se incorpora directamente en estas uniones. La ocludina puede ser fosforilada en residuos de serina/treonina y la forma fosforilada parece ser preferencialmente expresada en las UE, mientras que la ocludina no fosforilada se detecta a lo largo de la membrana basolateral. Sin embargo, se ha demostrado también que las UE pueden formarse sin ocludina, como es el caso de las células endoteliales, en tejidos no neuronales y en algunas especies las células de sertoli^{35,37}.

Diversos estudios muestran que la ocludina participa en las funciones de barrera de las uniones estrechas. Por ejemplo, la sobreexpresión de ocludina en monocapas de células MDCK (células epiteliales derivadas de riñón canino) incrementa el número de UE aumentando los valores de resistencia transepitelial³⁸.

Tricelulina

Es la única proteína conocida que se encuentra muy concentrada en las UE orientada verticalmente en las hebras de la UE en los contactos tricelulares. La tricelulina está formada por 4 dominios transmembranales y tiene una secuencia similar a la ocludina en el dominio citoplasmático C-terminal de aproximadamente 130 aminoácidos. Al igual que ocludina, tricelulina también une a ZO-I por medio de esta región³⁹.

El silenciamiento de la tricelulina en células epiteliales resulta en una organización anormal de las UE tricelulares y hay un daño en la función de barrera epitelial⁴⁰. Interesantemente la disminución de ocludina en cultivos de células epiteliales causa la localización de la tricelulina hacia los contactos bicelulares de las UE, indicando la importancia de ocludina para la concentración de tricelulina en las UE tricelulares⁴¹. Cuando la tricelulina se expresa en células L (fibroblastos de ratón) que sobreexpresan a claudina-1, se observa que las hebras de UE incrementan su número de entrecruzamientos comparadas con las que se forman en las células L que solo expresan claudina-1, lo que sugiere que la tricelulina influye en la morfología de las hebras de la UE⁴¹.

Claudinas

Las claudinas pertenecen a una familia multigénica constituida hasta la fecha de 24 isoformas en mamíferos, son proteínas de 20 a 27 kDa, comparten la misma topología con la ocludina, sin embargo no tienen ninguna similitud en cuanto a su secuencia⁴².

Las claudinas son proteínas integrales de membrana con cuatro dominios transmembranales, una secuencia amino terminal muy corta (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 aminoácidos. Las regiones citoplásmicas son las más diversas en secuencia y varían en longitud de 21 a 63 residuos de aminoácidos^{42, 43}. La primer asa extracelular, constituida de 49 a 52 residuos, contiene una secuencia altamente conservada (GLWxxC), la cual se ha reportado que determina el flujo de iones y pequeñas moléculas a través de la vía paracelular. Diversos estudios han demostrado que la segunda asa extracelular (constituida por 16 a 33 residuos de aminoácidos) de las claudinas 3 y 4 funciona como receptor para la enterotoxina de *C. perfringens*. Por último, la secuencia carboxilo terminal funciona como anclaje para proteínas citoplásmicas tales como proteínas ZO-1, -2, -3, proteínas con dominios PDZ (MUPP) y PALS-1, una proteína asociada a las uniones estrechas (PATJ)^{43,44} (figura 6).

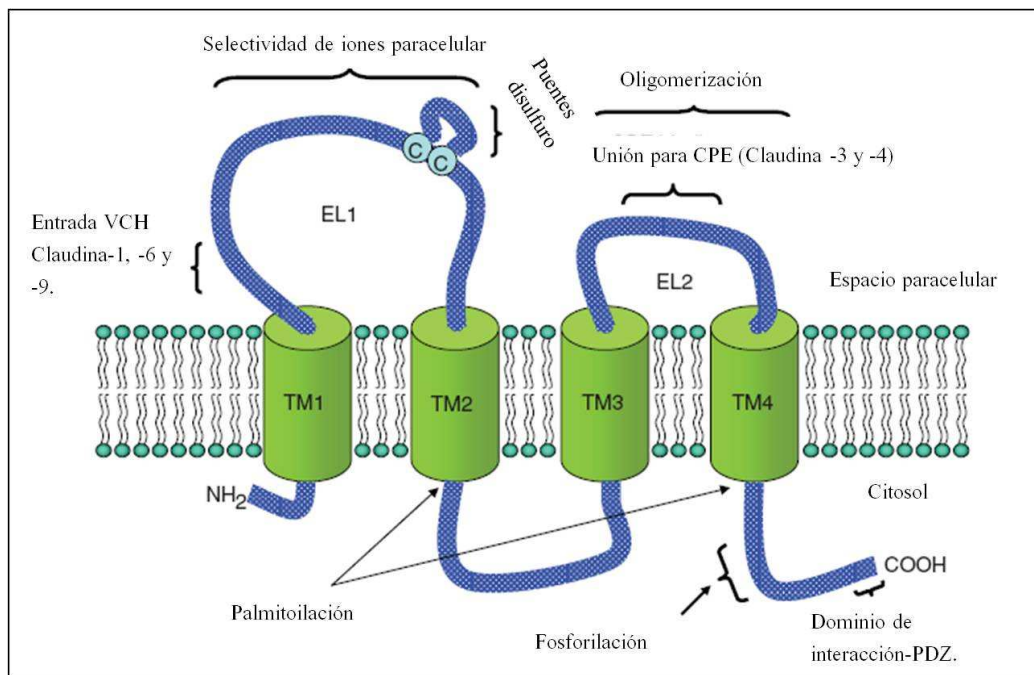


Figura 6. Estructura de las claudinas. (Morin P. J., Lal-Nang M., 2009)

Las claudinas son los componentes clave de la estructura y función de las UE. La función más obvia de las claudinas es generar las hebras de las UE. Cuando las claudinas se sobreexpresan en fibroblastos de ratón carentes de UE endógenas, las claudinas exógenas se concentran en los contactos célula-célula entre células adyacentes y generan hebras de UE^{45,46}.

Las claudinas pueden formar uniones de manera homo y heterotípica, es decir, entre dos claudinas del mismo tipo o entre claudinas de diferente tipo (Figura 7). Así mismo, las claudinas pueden interactuar con proteínas de la misma familia en la membrana plasmática de la misma célula (interacción-cis) y entre las membranas de dos células adyacentes (interacción-trans)⁴⁷. Por ejemplo, el co-cultivo de células L expresando claudinas-1, -2 y -3 revelan que la combinación de claudinas -1/-3 y claudinas -2/-3 pero no claudinas -1/-2 pueden formar interacciones heterotípicas⁴⁸. Las diferentes interacciones entre claudinas dan lugar a la formación de poros paracelulares de diferentes diámetros que pueden ir desde los 4 a los 50 Å. Las cargas presentes en los dominios extracelulares de estas proteínas permiten la discriminación entre aniones y cationes.

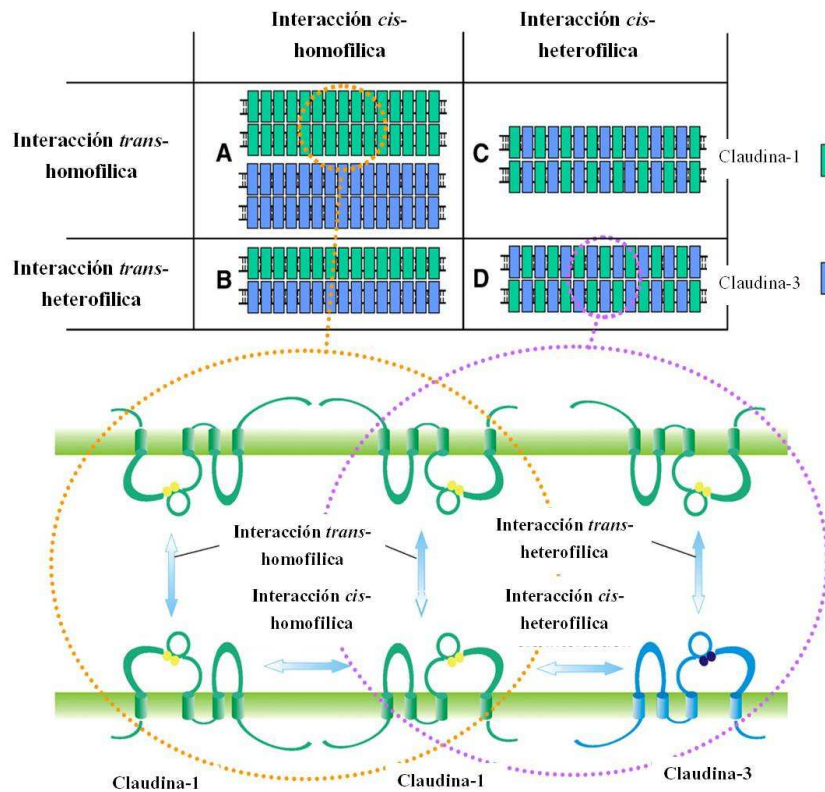


Figura 7. Posibilidades de interacción de las claudinas. Por ejemplo claudina-1 y claudina-3. Parte inferior: interacciones homofílicas y heterofílicas, *-cis* y *-trans*. Parte superior: esquema de hebras de UE que consisten en (A) interacciones *-cis* y *-trans* homofílicas, (B) interacciones *-cis* homofílica y *-trans* heterofílicas, (C) interacciones *-cis* heterofílicas y *-trans* homofílica, y (D) interacción *-cis* y *-trans* heterofílicas. (Krause G. et. al. 2008)

Se ha reportado que las claudinas son los principales constituyentes de las uniones estrechas y reguladores importantes de la permeabilidad paracelular. La ausencia en la expresión normal de claudina-1 en la epidermis de ratón resulta en una dramática pérdida de agua transepitelial provocando la muerte neonatal, lo que sugiere que la proteína es indispensable para crear y mantener la barrera epidérmica⁴⁹. Estudios *in vitro* usando monocapas de diversas células epiteliales (p.e. MDCK o LLC-PK₁) muestran que la expresión de claudina-1, -4, -7, -8, -14 y -15 incrementa dramáticamente la resistencia eléctrica transepitelial (TER)^{49,50}. Las claudinas pueden sufrir modificaciones postraduccionales que pueden influir en su actividad, localización e interacciones con otras proteínas. La fosforilación de las claudinas puede inducir alteraciones en la permeabilidad paracelular para iones y moléculas no cargadas, ya que estas son moduladas por diferentes mecanismos de señalización.

En células de ovario, se ha mostrado que claudina-3 y -4 son sustratos de la proteína cinasa A (PKA) y proteína cinasa C (PKC), respectivamente⁵¹.

La expresión de claudinas puede ser regulada por diversas moléculas como factores de crecimiento y citocinas, dando una respuesta diferencial dependiendo de la combinación del estímulo y del tipo de claudina analizada. Se ha encontrado por ejemplo, que en monocapas de células epiteliales renales tratadas con el factor de crecimiento epidermal (EGF) la expresión de claudina-3 y -4 se incrementa mientras que la de claudina-2 disminuye. Estos cambios fueron mediados por la activación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK)^{49,52}.

Expresión de claudinas y cáncer

La evidencia de la alteración de las UE en epitelios cancerosos se conoce desde hace poco más de 30 años. Observaciones en tumores han mostrado la disminución o la falta de UE, aumento en la permeabilidad paracelular de moléculas traza, disminución en la TER, y discontinuidades y reducciones en el número de hebras de UE detectado por microscopía por criofractura. En conjunto, estos resultados muestran una reducción de la función de la barrera epitelial de las células cancerosas. Por lo tanto, la pérdida de las UE constituye un paso esencial en el desarrollo del cáncer⁵³. Recientemente se reportó la deslocalización de claudinas de la membrana celular y esto parece encontrarse comúnmente en células transformadas.

Así mismo se ha mostrado que, mientras una claudina en particular se encuentra silenciada en ciertos tipos de cáncer, la misma proteína se encuentra sobreexpresada en otros carcinomas, lo que sugiere que la función de cada claudina puede ser tejido-específica y puede depender de un circuito molecular en particular de la célula^{54, 55,56}.

Se han observado cambios en la expresión de claudinas durante el desarrollo del tumor. Por ejemplo se ha reportado que claudina-3 y -4 se encuentran frecuentemente sobre-reguladas en carcinomas de ovario, mama, próstata, cérvix, gástrico y pancreático, mientras que claudina-2 se encuentra sub-regulada en cáncer de mama y próstata⁵⁷. Claudina-7

disminuye en carcinomas ductales invasivos en cáncer de mama metastásico^{57, 58}. La expresión y distribución de claudina-1 se asocia con el estado de disociación celular en células de cáncer pancreático a través de la activación de la proteína cinasa 2 activada por mitogenos (MAPK-2)⁵⁷ (Tabla 2).

Protein	Cancer type	Expression	Reference
Claudin 1	Breast	Down	Hoevel et al. (2002), Kramer et al. (2000), Tokes et al. (2005a, b)
	Cervical	Down	Sobel et al. (2005)
	Colon	Up	de Oliveira et al. (2005), Dhawan et al. (2005)
	Epidermis: Keratinized (pearl)	Up	Morita et al. (2004)
	Esophagus	Up	Gyorffy et al. (2005), Morita et al. (2004)
	Gastric	Up	Resnick et al. (2005)
Claudin 2	Cervical	Down	Sobel et al. (2005)
	Colon	Up	Aung et al. (2006)
	Esophagus	Up	
Claudin 3	Breast	Up	Kominsky et al. (2004)
	Colon	Up	de Oliveira et al. (2005)
	Esophagus	Up	Gyorffy et al. (2005), Montgomery et al. (2006)
	Gastric	Up	Resnick et al. (2005), Montgomery et al. (2006)
	Ovary	Up	Rangel et al. (2003), Santin et al. (2005), Zhu et al. (2006), Hough et al. (2000)
	Pancreas	Up	Missiaglia et al. (2004)
Claudin 4	Prostate	Up	Long et al. (2001)
	Biliary tract	Up	Lodi et al. (2006)
Claudin 5	Breast	Down	Tokes et al. (2005a, b)
	Cervical	Up	Kominsky et al. (2004)
	Colon	Down	Sobel et al. (2005)
Claudin 7	Colon	Up	de Oliveira et al. (2005)
	Pancreas	Up	Missiaglia et al. (2004)
Claudin 10	Breast	Down	Kominsky et al. (2003), Tokes et al. (2005a)
	Cervical	Down	Sobel et al. (2005)
	Esophagus	Up	Montgomery et al. (2006)
	Gastric	Down	Usami et al. (2006)
	Head and neck	Up	Montgomery et al. (2006)
	Uterus	Down	Al Moustafa et al. (2002)
Claudin 23	Liver	Up	Tobioka et al. (2004a)
Occludin	Gastric	Down	Cheung et al. (2005)
	Breast	Down	Kato and Kato (2003)
	Cervical	Down	Polette et al. (2005)
	Colon	Down	Sobel et al. (2005)
	Epidermis: Keratinized (pearl)	Down	Tobioka et al. (2002)
	Unkeratinized	Up	Morita et al. (2004)
Gastrointestinal	Down	Morita et al. (2004)	
			Kimura et al. (1997), Yin et al. (2002)

Tabla 2. Cambios en la expresión de proteínas de UE en algunos carcinomas. (Gonzalez-Mariscal et al. 2007)

Los cambios en la expresión de claudinas en los tejidos puede permitir el paso de nutrientes y factores de crecimiento y promover la proliferación de células cancerosas. Del mismo modo se ha relacionado la alteración en la expresión de claudinas en etapas tempranas y tardías de varios tipos de cáncer con el incremento de la invasividad, el potencial metastásico, el mal pronóstico y la recurrencia del tumor.

Claudinas, invasión tumoral y metástasis

En los carcinomas, el paso inicial en la diseminación metastásica incluye como ya se ha mencionado, la separación de las células epiteliales de la matriz extracelular debido a la desorganización del citoesqueleto de actina. Las células cancerosas sobreviven mediante el uso de mecanismos autocrinos y paracrinos que suprimen la apoptosis, estimulan la invasión de tejidos y promueven el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos para asegurar el suministro de oxígeno ⁶⁰.

Estudios recientes muestran que la expresión de ciertas claudinas, especialmente claudina-1 y 4 incrementa durante la metástasis y la inhibición de su expresión muestra efectos claros en las capacidades metastásicas de células cancerosas de una manera tejido-específica⁶¹.

Recientemente se demostró el significado biológico de la expresión alterada de claudina-1 en células de cáncer de colon. Un incremento en la expresión de claudina-1 fue observado en carcinoma de colon primario humano y en muestras metastásicas del mismo y en líneas celulares derivadas de tumores primarios y metastásicos, comparados con su contraparte normal⁶². Un resultado importante en este estudio fue la localización nuclear de claudina-1 en un grupo significativo de muestras de cáncer de colon. Así mismo, en líneas celulares de cáncer de colon derivadas de tumores primarios, la transfección con claudina-1 induce el desarrollo de una morfología fibroblastoide, una mayor independencia de anclaje así como también un incremento en la actividad de MMP-2 y MMP-9⁶³.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La estructura y función de las UE se encuentran frecuentemente alteradas en carcinomas humanos, donde la pérdida de estas uniones puede favorecer, como muchos otros mecanismos, al progreso del cáncer. Los cambios en la expresión de las claudinas durante el desarrollo del tumor concuerda con la idea de que este proceso se acompaña por el desensamble de las UE y la pérdida de la adhesión célula-célula, proceso que puede jugar un papel muy importante en la pérdida de la diferenciación, de la cohesión celular, la proliferación incontrolada y en la invasividad^{49, 53}.

Se ha asociado la alteración en la expresión de claudinas (aumento y/o disminución en la expresión), así como los cambios en la localización subcelular con diferentes tipos de tumores. Actualmente se ha sugerido que las claudinas juegan un papel muy importante en la invasividad y metástasis. Los estudios apuntan a que el aumento en la expresión de estas claudinas en algunos tipos de cáncer (como cáncer de colon, ovario, páncreas y adenocarcinoma gástrico) se asocia a un aumento en la capacidad invasiva de dichos carcinomas, como resultado del aumento en la actividad de MMPs.

Por ejemplo existen reportes que señalan que las claudinas -1,-2,-3 y -4 reclutan y promueven la activación de (MMP-2)^{62, 64, 65, 66}. Así mismo se ha reportado que Claudina-5 interacciona directamente con MMP-2 induciendo su activación⁶⁷.

La disminución de claudina 10, disminuye la invasividad celular a través de la disminución y probable degradación de MMP-2 y MT1-MMP en carcinoma hepatocelular⁶⁸. También se ha visto que el aumento en la expresión de claudina-7 aumenta la invasividad de carcinomas gástricos y cáncer de ovario⁶⁹. El aumento en la expresión de claudina-1 aumenta la invasividad de cáncer de lengua de células escamosas⁷⁰.

Con base en lo anterior, el papel que tiene cada claudina es diferente dependiendo del origen del cáncer en estudio. A la fecha existe evidencia de que las claudinas 6, 7 y 9 se expresan en adenocarcinoma gástrico⁷³. Otra observación fue que en ensayos “*in vitro*” la sobreexpresión de las claudinas 6, 7 y 9 incrementaron la velocidad de proliferación, de

migración y de invasividad de células AGS, siendo la sobreexpresión de la claudina 9 la que aumentó significativamente estos procesos⁷⁴.

Con base en lo anterior, el presente estudio pretende ayudar a comprender si la expresión de claudinas 6, 7 y 9 promueve la activación de metaloproteasas en células de adenocarcinoma gástrico AGS y en células de cáncer de mama MCF-7.

HIPÓTESIS

Dado que tenemos evidencia de que las claudinas 6, 7 y 9 se encuentran expresadas en cáncer gástrico y se ha reportado que la alteración en la expresión de algunas isoformas está asociada con la capacidad invasiva de muchos carcinomas promoviendo la activación de metaloproteasas, se propone que la sobreexpresión de las claudinas 6, 7 y/o 9 en células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) y en células de cáncer de mama (MCF-7), está asociada con la activación de metaloproteasas como la MMP-2 y MMP-9.

OBJETIVOS

General

- Determinar si la sobreexpresión de claudinas 6, 7 y 9 activa a MMPs y si esta activación es directa o indirecta.

Particulares

- Sobreexpresar las claudinas 6, 7 y 9 en las líneas celulares AGS y MCF-7.
- Analizar si existe interacción de estas claudinas con las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9.
- Determinar si la sobreexpresión de claudinas regula la actividad de las MMP-2 y MMP-9.

MATERIALES Y MÉTODO

Anticuerpos, plásmidos, enzimas. Se emplearon anticuerpos primarios policlonales de cabra anti-claudina-6 y 9 (Santa Cruz, Biotechnology Inc.), anticuerpos primarios de conejo anti-claudina -1 -2, -7 y anticuerpos primarios de ratón anti-GFP (ZYMED) y anti-MMP-2 y anti-MMP-9 (Calbiochem). Además anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (HRP) conejo anti-IgG de cabra-HRP, cabra anti-IgG de ratón-HRP y cabra anti conejo-HRP (ZYMED) y anticuerpos secundarios acoplados a Rhodamina (Abcam). El anticuerpo anti- α actina fue donado por el Dr. José Manuel Hernández del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV. Se utilizó el vector plasmídico pcDNA 3.1/NT-GFP y las enzimas de restricción EcoRI, EcoRV, HindIII, BamHI, KpnI, XbaI (Invitrogen). Se empleó además Trizol, Lipofectamina 2000, el Kit single step RT-PCR y los iniciadores que se indican en la tabla siguiente (Invitrogen). El medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), el suero fetal bovino (FBS), L-glutamina, piruvato de sodio, antibiótico estreptomycin-penicilina, antibiótico-antimicótico y Geneticina (G-418) fueron adquiridos con GIBCO.

hACTINA forward	5`- TGAAGGTGACAGCAGTCGGTTG-3`
hACTINA reverse	5`- GGCTTTTAGGATGGCAAGGGAC-3`
hCLDN2 forward	5`- GAAGACGCTTCTACTGAGAG-3`
hCLDN2 reverse	5`- CACGATCCAGTGGTAGTG -3`
hCLDN6 forward	5`-CAGTGCAGCTCCTTCAACC-3`
hCLDN6 reverse	5`-CTGTTGGGCACTGCCACTTC-3`
hCLDN7 forward	5`-TTTCTGAGGGCGGAAATGGC-3`
hCLDN7 reverse	5`-GGCATCTAGACACTCCCATAGC-3`
hCLDN9 forward	5`-ATGGCTTCGACCGGCTTAG-3`
hCLDN9 reverse	5`-CAGGGCATCTGGTCATCAGG-3`

Cultivos celulares. Para el abordaje de este proyecto, se utilizaron las líneas celulares epiteliales AGS derivadas de adenocarcinoma gástrico humano y MCF-7 derivadas de carcinoma mamario humano. Se sembraron células AGS y MCF-7 en cajas petri p-100 y se

mantuvieron con medio de cultivo DMEM (caja de petri p-100 7-10 ml aprox.) suplementado con: 10 µg/ml o 0.1 U/ml de Insulina (10 mg/ml de SIGMA), 2mM de Piruvato de Sodio (GIBCO 100 mM), 2 mM de L-Glutamina (GIBCO 200 mM), 100 U/ml/100 µg/ml de Penicilina/Estreptomicina (GIBCO 10,000U/ml/10,000 µg/ml), 5% de Suero Fetal Bovino (GIBCO), y se incubaron en condiciones de 37°C y 5% de CO₂. Las transfectantes estables fueron seleccionadas y mantenidas con medio DMEM con 400 µg/ml de G-418.

Construcción de los vectores pcln2GFP, pcln6GFP, pcln7GFP, pcln9GFP. A partir del RNA total extraído de la línea celular AGS y con el kit single step RT-PCR se obtuvo el cDNA de las claudinas 2, 6, 7 y 9 empujando los iniciadores correspondientes. Para cada reacción se colocaron 10 µl de mezcla de reacción, 0.5 µl de iniciador A (10 µM), 0.5 de iniciador B (10 µM), 2.5 µl de RNA (0.1 µg/ µl), 0.4 µl de RT-Taq, 6.1 µl de H₂O, y se sintetizó el cDNA bajo las siguientes condiciones: 55°C por 30 min, 94°C por 2 min, 40 ciclos de: 94°C por 20 seg, 56.9°C (cldn 6 y 7) o 59.7°C (cldn) por 30 seg, 72°C por 40 seg y 72°C por 7 min. Para construir cada vector se tomaron 4 µl del producto obtenido de RT-PCR y se incubaron con 1 µl del vector TOPO pcDNA3.1/NT-GFP y 1 µl de la solución salina por 5 min a temperatura ambiente y posteriormente 20 min a 4°C. Se transformaron las células competentes de *Escherichia coli* DH5α con 2 µl de esta reacción de clonación y se seleccionaron las células transformadas en placas de agar LB-Ampicilina 100 µg/ml. Se seleccionaron 10 colonias para cada construcción y se realizó la extracción de plásmidos por mini-prep (Invitrogen). Se corroboró el sentido en el que se insertó la secuencia deseada empleando la enzima PstI para las construcciones denominadas pcln9GFP y pcln7GFP y las enzimas XcmI y EcoRV para la construcción pcln-2 GFP. Se secuenciaron las construcciones obtenidas para verificar que no hubiera mutaciones.

Transfección de células AGS y MCF-7. Las células se sembraron en placas de 6 pozos (5 x 10⁵ células/pozo) para alcanzar la confluencia al tercer día. Se lavaron 2 veces con PBS y se cambió el medio por Opti-MEM (GIBCO). La transfección se llevó a cabo con Lipofectamina 2000 de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Invitrogen). Las

transfectantes estables fueron seleccionadas en medio DMEM (GIBCO) suplementado con 10 µg/ml de Insulina 10 mg/ml, 2 mM de Piruvato de Sodio 100 mM, 2 mM de L-Glutamina 200 ml, 100 U/ml/ 100 µg/ml de Penicilina/Estreptomicina 10,000 U/ml/10,000 µg/ml, 5% de Suero Fetal Bovino, adicionando 700 µg/ml de G-418 por 10 días.

Fraccionamiento celular y Western Blot. Las células AGS y MCF-7 transfectadas y no transfectadas se sembraron en cajas p-100 a confluencia, se lavaron con PBS frio y se resuspendieron en 1 ml de buffer A (20 mM Tris base, 0.25 M Dextrosa anhidra, 10 mM EGTA, 2 mM EDTA) con inhibidores de proteasas y fosfatasas (aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 20 µg/ml, inhibidor de tripsina 1 mg/ml, coctel I y coctel II de inhibidores de fosfatasas 10 µl/ ml) a 4°C. Las suspensiones celulares se sonicaron y se centrifugaron a 39,000 rpm (156,553 x g) 30 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se colocó en un tubo nuevo y se marco como fracción citosolica. El precipitado se resuspendió con 150 µl de amortiguador A en presencia de 1% de Tritón X-100 con inhibidores de proteasas y fosfatasas como se describió anteriormente. Se incubó 1 h a 4°C con agitación suave, se centrifugo a 39,000 rpm, 30 min. a 4°C, y se colocó el sobrenadante (fracción membranal) en tubos eppendorf previamente marcados y colocados en hielo. El precipitado resultante se resuspendió en 150 µl de amortiguador de lisis (150 mM NaCL, 50 mM tris base, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, IGEPAL 1%, Desoxicolato de sodio 0.1%, Dodecil sulfato de sodio 0.1% (SDS)) con inhibidores de proteasas y fosfatasas a 4°C. Se incubó 1 h a 4°C con agitación suave y se centrifugó a 39,000 rpm, 30 min a 4°C. El sobrenadante resultante (fracción de citoesqueleto) se colocó en tubos eppendorf previamente marcados y colocados en hielo. Finalmente se tomaron alícuotas de cada fracción para la cuantificación de proteína empleando el kit de determinación de proteína de BioRad. Se realizó la electroforesis cargando de 20-50 µg de proteína por cada muestra, en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 15% o en algunos casos al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con 5% de leche libre de grasas en TBS durante al menos 1 hr y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4°C con agitación suave. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con TTBS y se incubaron las membranas con el

segundo anticuerpo correspondiente durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación suave. La detección de las proteínas se llevó a cabo mediante el método de quimioluminiscencia con los reactivos del kit PIERCE (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate) como sustrato para la reacción.

Imágenes de microscopia confocal e inmunofluorescencia. Se sembraron células AGS y MCF-7 en cubreobjetos tratados con Poly-D-Lisina, a 90% de confluencia, se retiró el medio de cultivo y se lavó 3 veces por 5 min con PBS frío. Se fijaron las células adicionando metanol absoluto frío por 10 min a -20°C , se permeabilizaron con tritón X-100 (al 0.1% en PBS) por 5 min a temperatura ambiente, se bloquearon incubando con BSA libre de IgG al 0.5% en PBS por 30 min a 4°C y finalmente se incubaron toda la noche con los anticuerpos específicos para claudina-1 a una dilución de 1:100 en PBS. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron en un lugar oscuro con el anticuerpo secundario Rabbit anti-mouse IgG (Rodamina) a una dilución de 1:100 en PBS con 1% de BSA por 1h a temperatura ambiente. Finalmente se lavaron 3 veces con PBS por 5 min y los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con DAPI, se sellaron con barniz y se observaron al microscopio confocal.

Detección de mRNA de las claudinas 2, 6, 7 y 9 en las células AGS y MCF-7 transfectadas. Se extrajo el RNA total de las células transfectadas con trizol siguiendo las especificaciones del fabricante (Invitrogen). A partir del RNA extraído se llevó a cabo el RT-PCR con el kit single step RT-PCR (Invitrogen) empleando los iniciadores antes mencionados. Para cada reacción se colocaron 10 μl de mezcla de reacción, 0.5 μl de iniciador A (10 μM), 0.5 de iniciador B (10 μM), 2.5 μl de RNA (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 0.4 μl de RT-Taq, 6.1 μl de H_2O , y se sintetizó el cDNA bajo las siguientes condiciones: 55°C por 30 min, 94°C por 2 min, 40 ciclos de: 94°C por 20 seg, 56.9°C (cldn 6 y 7) o 59.7°C (cldn) por 30seg, 72°C por 40seg y 72°C por 7 min. Los productos de cada reacción de resolvieron en geles de agarosa al 1%.

Inmunoprecipitación. Se cultivaron las células AGS y MCF-7 en cajas petri p-100 hasta 90% de confluencia, se lisaron con buffer de lisis para IP (50mM de Tris, 150mM de NaCl

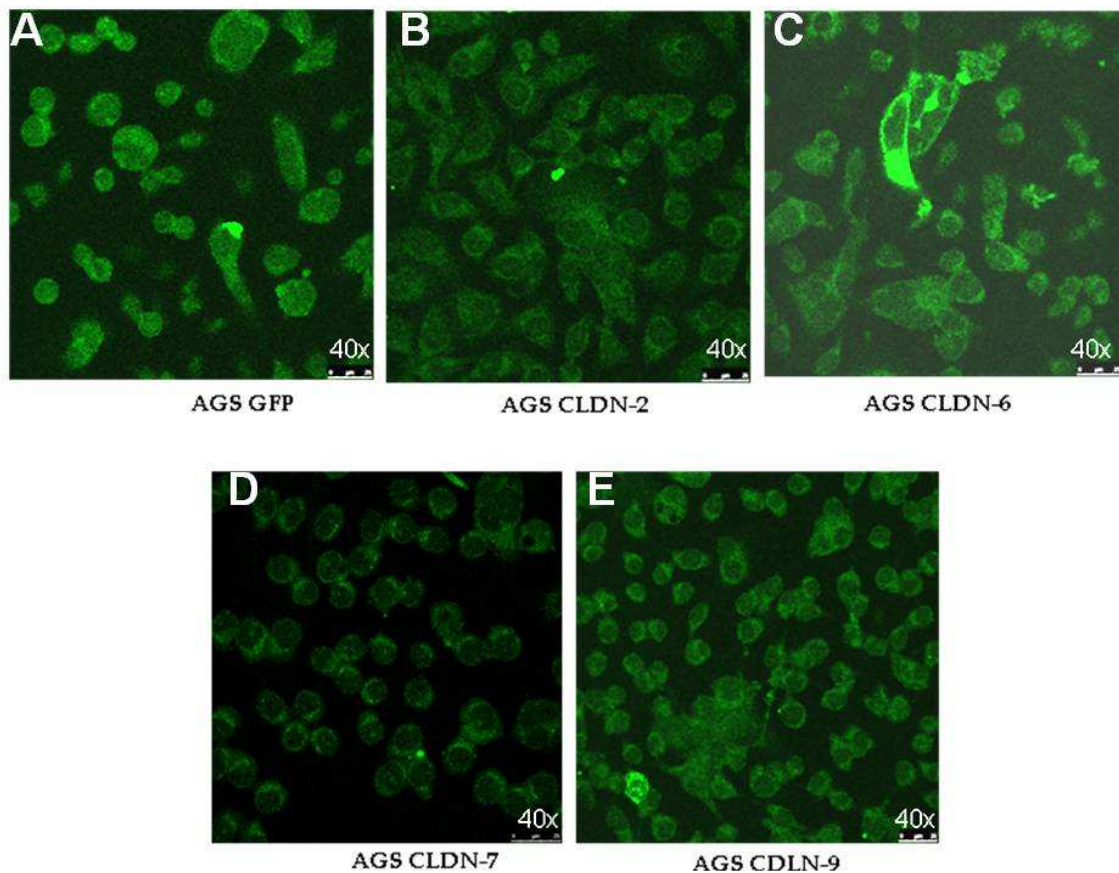
y 0.5% de Tritón X-100 con inhibidores de proteasas 1 mg/ml de tripsina, 5 mg/ml de leupeptina e inhibidores de fosfatasas 10 μ l/ml de inhibidores de fosfatasas coctel I y II). Posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min y se recupero el sobrenadante para realizar cuantificación de proteína ajustando la concentración a 1mg/ml. A continuación se pre-clareo incubando 1 mg/ml de proteína + 10 μ l de suero pre-inmune + 10 μ l de proteína G Sefarosa por 1 h con agitación suave, se centrifugo para recuperar el sobrenadante y se incubo con 1 μ g de anticuerpo primario (1 μ g Rabbit anti- cldn-2, Rabbit anti-cldn-7, Goat anti-cldn6, Goat anti-cldn-9) toda la noche a 4°C con agitación suave. Al día siguiente se agrego 25 μ l de proteína G Sefarosa y se incubo durante 2 h máximo. Finalmente se centrifugo para obtener el Inmunoprecipitado (IP) y se realizaron 2 lavados, uno con 600 mM de NaCl y otro con 150 mM de NaCl, ambos con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Finalmente se le adiciono 25 μ l de buffer de Laemli 4x y se sometió a Western Blot para revelar contra MMP-2 o MMP-9.

Zimogramas. Se realizo zimografía en geles de poliacrilamida co-polimerizado con gelatina soluble (colágena desnaturalizada), el gel resultante de la electroforesis se lavo 3 veces durante 1 h con una solución de Tritón X-100 al 2% y se incubo en un buffer que favorece la actividad de las proteasas (50 mM de Tris, 0.15 M de NaCl y 0.1 M de CaCl₂) a 37°C por 24 hrs. Se tiño con azul de Coomasie y se destiño hasta obtener bandas claras. Los zimogramas se realizaron con sobrenadantes obtenidos de células AGS y MCF-7 transfectadas, cultivadas en placas de 6 pozos a una densidad de 5×10^5 por pozo para alcanzar la confluencia al tercer día y condicionando el medio por 24hr sin SFB. Se concentro la proteína con amicon ultra-250K centrifugando a 4000rpm durante 15 min, se les adiciono buffer de Laemli 4x y se sometieron a electroforesis.

RESULTADOS

Para evaluar si la sobreexpresión de claudinas promueve la activación de las MMPs, se transfectaron células AGS y MCF-7 con vectores que contenían las secuencias específicas para las claudinas -2, -6, -7 y -9. La claudina-2 se utilizó como un control negativo. Para corroborar la sobreexpresión de las claudinas y su localización, se realizaron ensayos de microscopia confocal, ensayos de Western blot y RT-PCR.

Las células AGS y MCF-7 se transfectaron con los plásmidos correspondientes para cada proteína pcln2GFP, pcln6GFP, pcln7GFP, pcln9GFP; estas construcciones se realizaron empleando el vector TOPO pcDNA3.1/NT-GFP. La proteína GFP se acopló a la región N-terminal de cada claudina ya que la región C-terminal es muy importante para la funcionalidad de las claudinas.



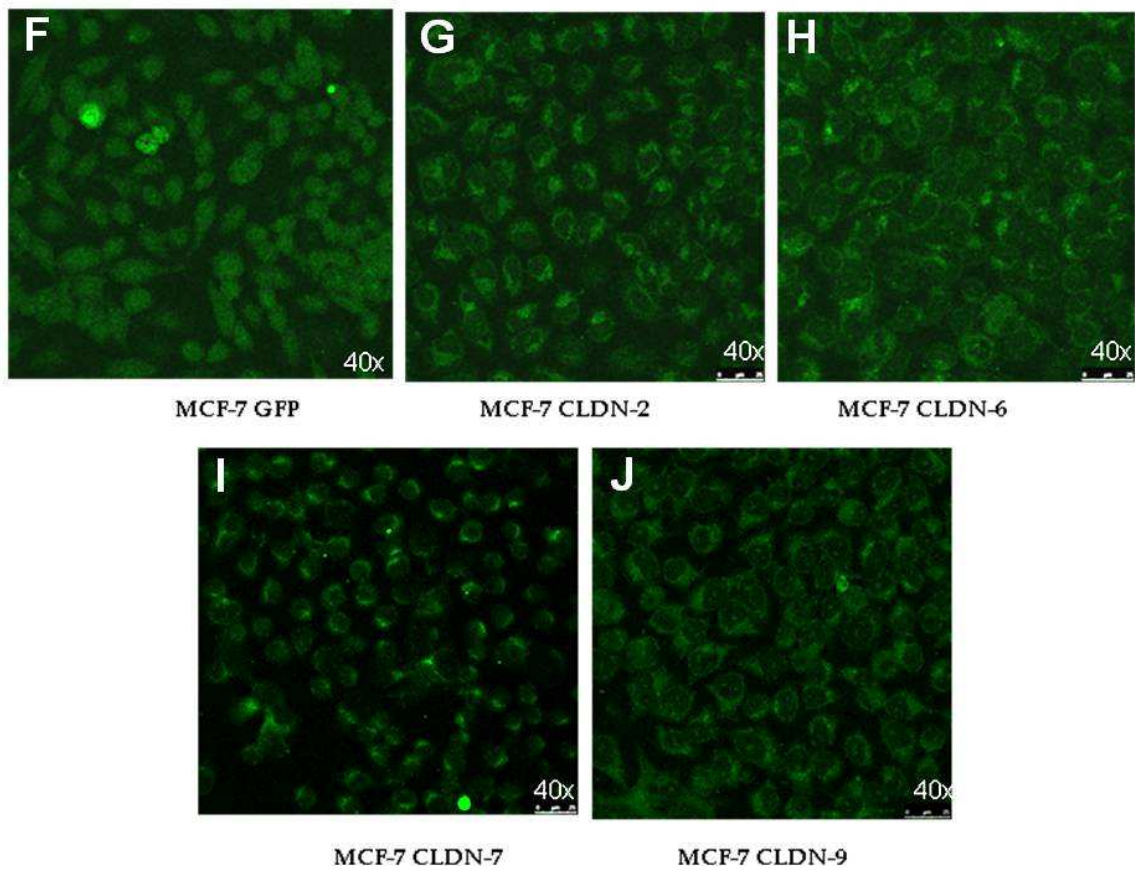


Figura 8. Microscopia confocal que muestra la localización de las claudinas -2, -6, -7 y -9 transfectadas en las células AGS y MCF-7 acopladas a la proteína verde fluorescente (GFP), observadas a un aumento de 40x.

En la Figura 8 se muestran las imágenes obtenidas por microscopia confocal de las células AGS y MCF-7 transfectadas con cada una de las claudinas. Las células AGS no forman UE funcionales por lo que podemos observar que las claudinas 2, 6, 7 y 9 transfectadas no se localizan en los contactos célula-célula sino que se encuentran en el citosol (B,C,D,E) y en algunos casos como claudina 7 y 9 alrededor del núcleo (D,E). Así mismo, en las células MCF-7 podemos observar el mismo patrón de localización de las claudinas en regiones citosólicas (G,H,I,J) y perinucleares como el caso de claudina 7 (I). Cabe mencionar que la localización de las claudinas en estas líneas celulares no es un artificio ya que en un trabajo previo se realizaron las mismas transfecciones en una línea celular normal que forma monocapas bien definidas y la localización de cada una de las claudinas se observó en la membrana plasmática⁷⁴.

De la misma manera, se realizaron ensayos de Western blot de las células AGS y MCF-7 para confirmar la sobreexpresión de las proteínas. En las figuras 9 y 10 se muestran los niveles de proteína de las claudinas -2, -6, -7 y -9 utilizando anticuerpos específicos contra dichas claudinas y en las figuras 11 y 12 utilizando un anticuerpo contra la GFP acoplada a cada una de las claudinas.

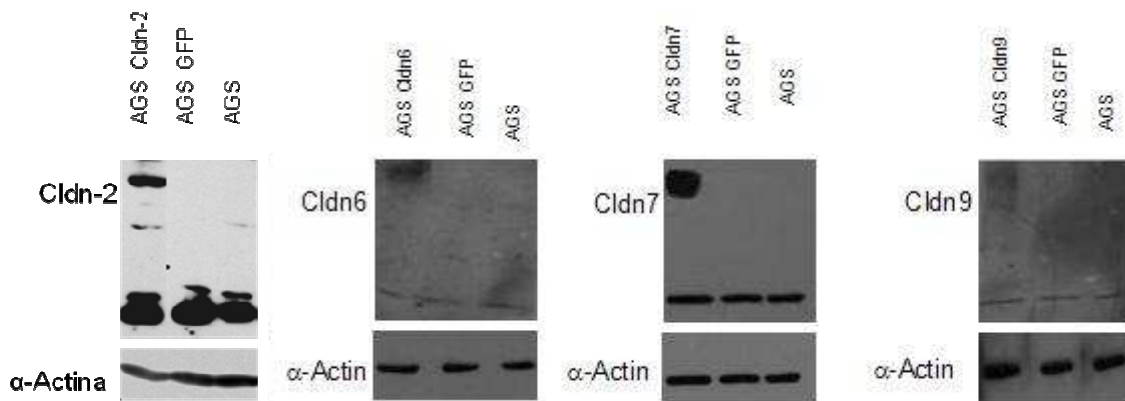


Figura 9. Western blot de extractos totales de células AGS mostrando la sobreexpresión de claudinas -2, -6, -7 y -9. La proteína sobreexpresada tiene un peso aproximado de 50kDa ya que se encuentra fusionada a la GFP. En las células AGS control y con el vector vacío se observa únicamente la proteína endógena de aproximadamente 25kDa. Se muestra α -actina como control de carga.

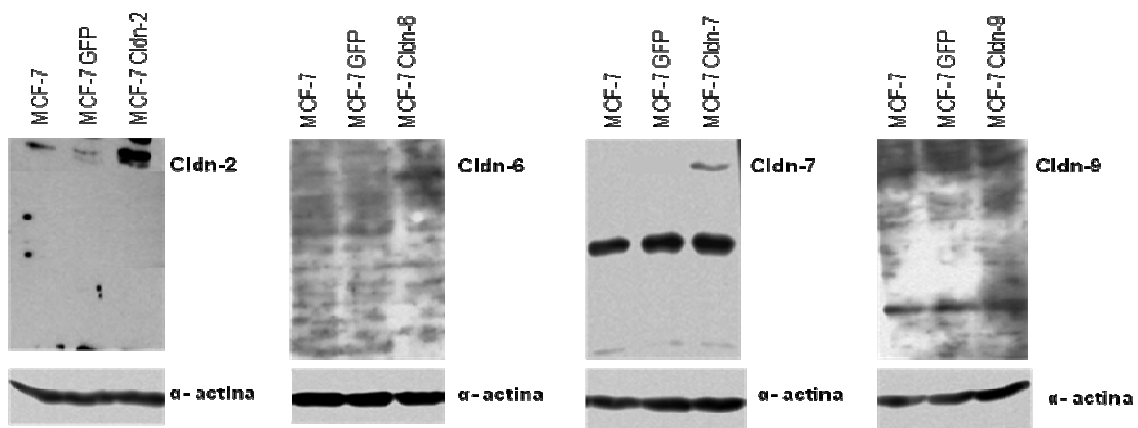


Figura 10. Western blot de extractos totales de las células MCF-7 mostrando la sobreexpresión de claudinas-2, -6, -7 y -9. Los pesos moleculares de las proteínas son los mismos observados en las células AGS. Se muestra α -actina como control de carga.

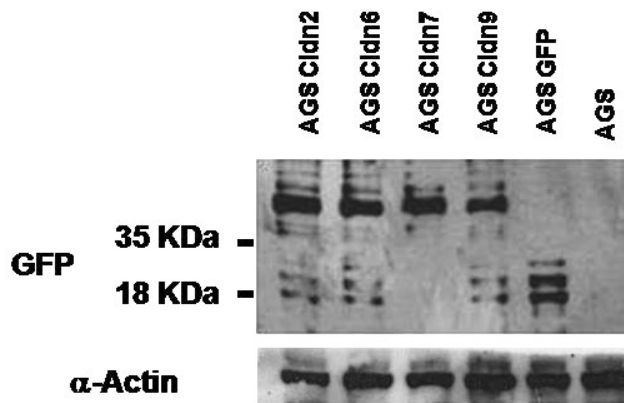


Figura 11. Western blot mostrando la sobreexpresión de claudinas -2, -6, -7 y -9 realizados a partir de extractos totales de las células AGS evidenciada con un anticuerpo específico para la proteína verde fluorescente (GFP). Las proteínas sobreexpresadas tienen un peso de aproximadamente de 50 kDa que corresponden a cada claudina fusionada a la GFP, en el caso de AGS con el vector vacío se observa solo la banda correspondiente a la GFP que es de aproximadamente 25 kDa. Se muestra α -actina como control de carga.

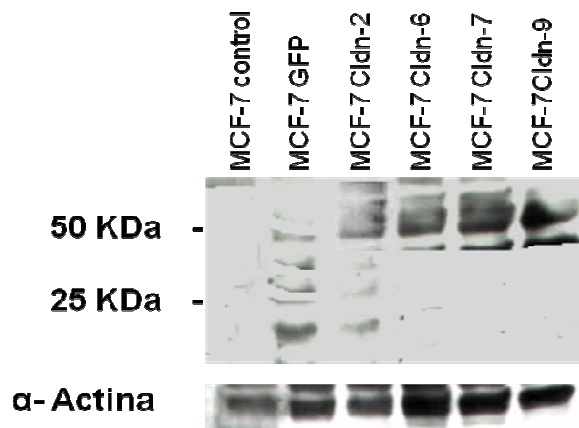


Figura 12. Western blot mostrando la sobreexpresión de claudinas -2, -6, -7 y -9 realizados a partir de extractos totales de las células MCF-7 evidenciada con un anticuerpo específico para la proteína verde fluorescente (GFP). Los pesos moleculares de las proteínas son los mismos observados en las células AGS. Se muestra α -Actina como control de carga.

Para determinar los niveles de RNAm en las líneas transfectadas se realizaron ensayos de RT-PCR. En las figuras 13 y 14 se observa un aumento del RNAm de las claudinas transfectadas en las células AGS y MCF-7, respectivamente.

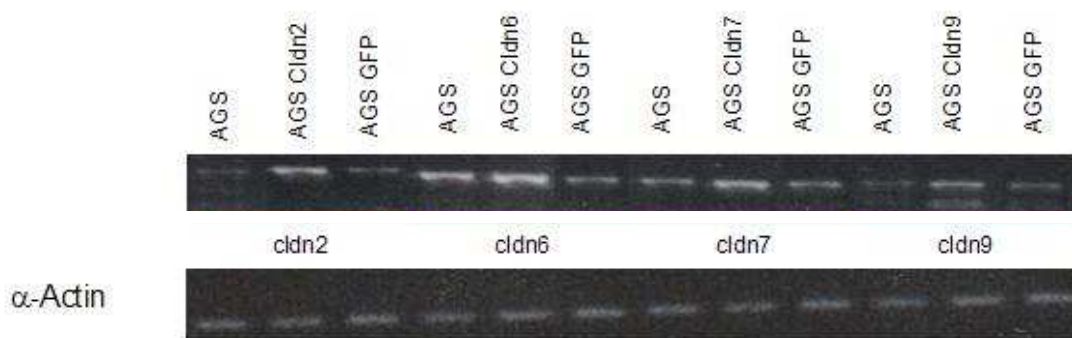


Figura 13. RT-PCR empleando el RNA total extraído de las células AGS control, AGS con el vector vacío y AGS con el vector específico de cada proteína. Se observa un aumento de los niveles de RNAm de las proteínas sobreexpresadas. Se utilizó α -actina como control de carga.

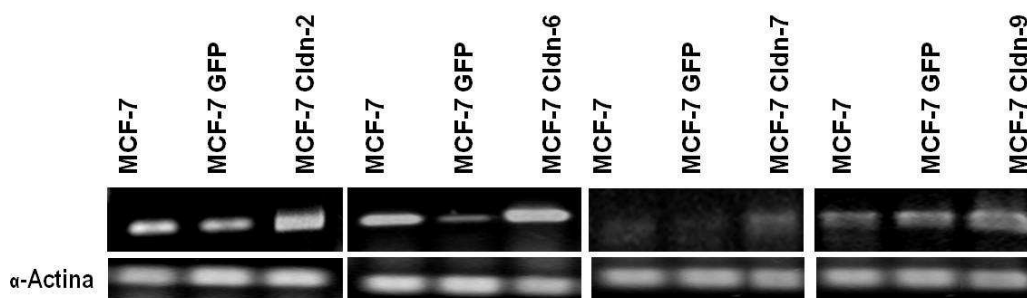


Figura 14. RT-PCR empleando el RNA total extraído de las células MCF-7 control, MCF-7 con el vector vacío y MCF-7 con el vector específico de cada proteína. Se observa un aumento de los niveles de RNAm de las proteínas sobreexpresadas. Se utilizó α -actina como control de carga.

Posteriormente, para determinar el papel que tiene la sobreexpresión de dichas proteínas en la expresión de metaloproteasas y establecer si existen interacciones entre ellas, se realizaron ensayos de Western Blot y de inmunoprecipitación. Para determinar si la sobreexpresión de las claudinas modificaba la expresión de MMP-2 y MMP-9, se

realizaron Western blot de extractos totales de las células AGS y MCF-7 transfectadas (Figura 15). En el caso de las células AGS, se observó un aumento de MMP-2 en las células transfectadas con claudina 9 y un aumento de MMP-9 en las células transfectadas con claudina 2, 6 y 7; en el caso de las células MCF-7 no se observó ningún cambio significativo con ninguna de las dos MMPs.

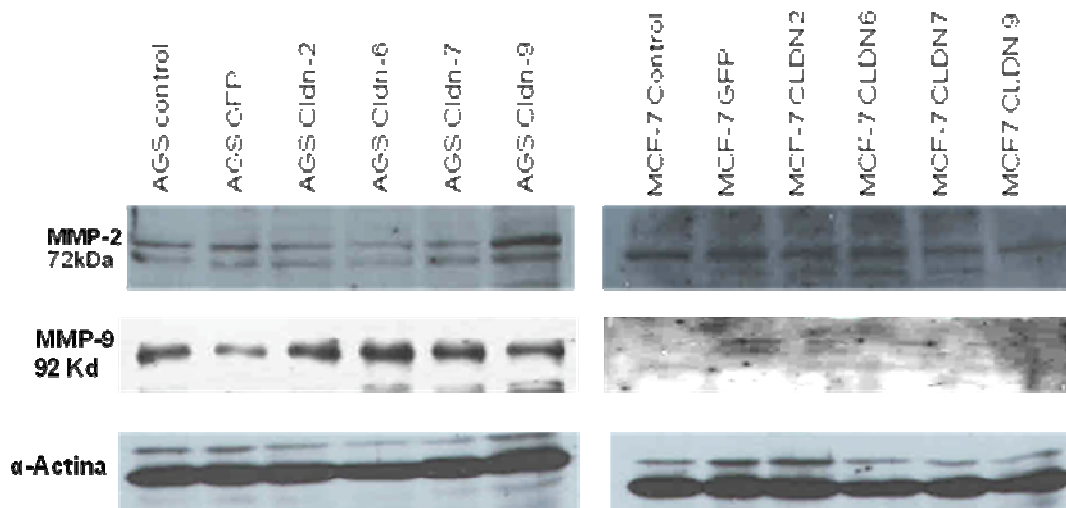


Figura 15. Wester Blot de células AGS y MCF-7 control, con el vector vacío (GFP) y transfectadas con el vector específico para cada claudina, en donde se muestra la expresión a nivel de proteína de MMP-2 y MMP-9. Se utilizó α -Actina como control de carga.

En seguida se procedió a analizar si las claudinas sobreexpresadas colocalizan con las MMPs-2 y -9. Para ello se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cada claudina en ambas líneas celulares empleando a la proteína G Sefarosa para formar los complejos. Como se muestra en la Figura 16, en las células AGS transfectadas con claudina 9 se observó claramente la co-inmunoprecipitación con MMP-2 y MMP-9 y de claudina 7 con MMP-9. En el caso de las células MCF-7 transfectadas con claudinas 2 y 7 se observó co-inmunoprecipitación con MMP-2, y de claudinas 6 y 9 con MMP-9. Estos resultados nos sugieren que la sobreexpresión de ciertas claudinas en las células AGS y MCF-7 puede promover su colocalización con estas metaloproteasas lo que favorece la formación de complejos y muy probablemente su activación importante para la invasividad de estas células.

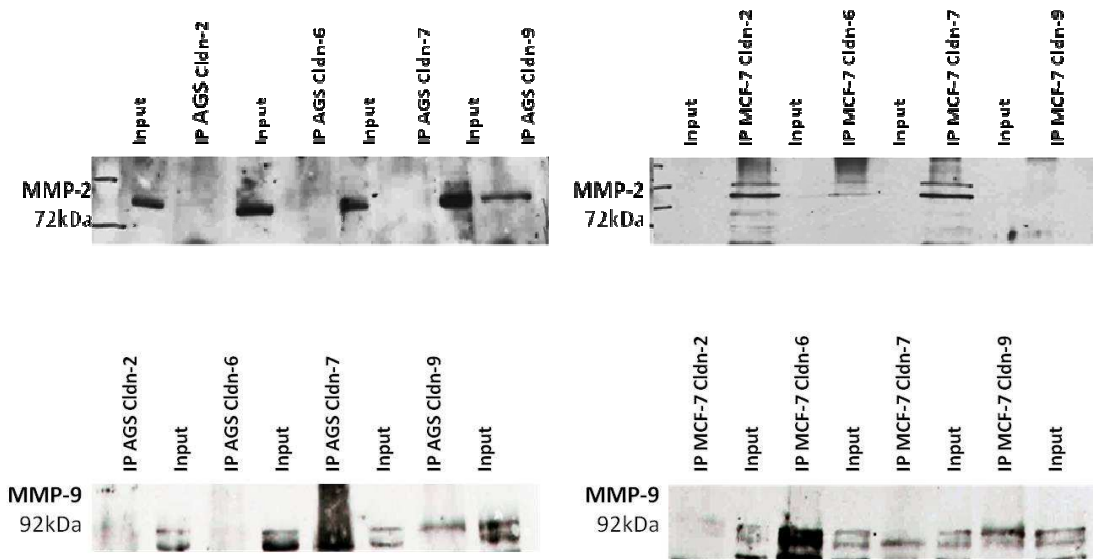


Figura 16. Inmunoprecipitados de claudina -2 (24kDa), -6 (23kDa), -7 (22kDa) y -9 (22kDa) empleando anticuerpos específicos para cada proteína en células AGS y MCF-7 transfectadas. Se muestra la expresión de MMP-2 y MMP-9 detectadas por quimioluminiscencia. Como control se muestra el “input” para cada inmunoprecipitado.

Finalmente se ha reportado que algunas isoformas de claudinas están involucradas en la activación de metaloproteasas por lo que se evaluó si la sobreexpresión de estas claudinas favorece la activación de la MMP-2 y la MMP-9. Para ello se realizaron zimogramas utilizando geles co-polimerizados con gelatina en los cuales se cargaron muestras de los medios condicionados obtenidos del cultivo a confluencia de las células AGS transfectadas (figura 17). En esta imagen se observó un aumento de proMMP-2 en las células sobreexpresadas con claudinas -2 y -6. En el caso de las células MCF-7 que sobreexpresan a claudina-2 se observa un aumento de la actividad de MMP-2 (figura 18). Por lo tanto que se sugiere una regulación diferencial de la actividad de estas metaloproteasas a través de las claudinas.

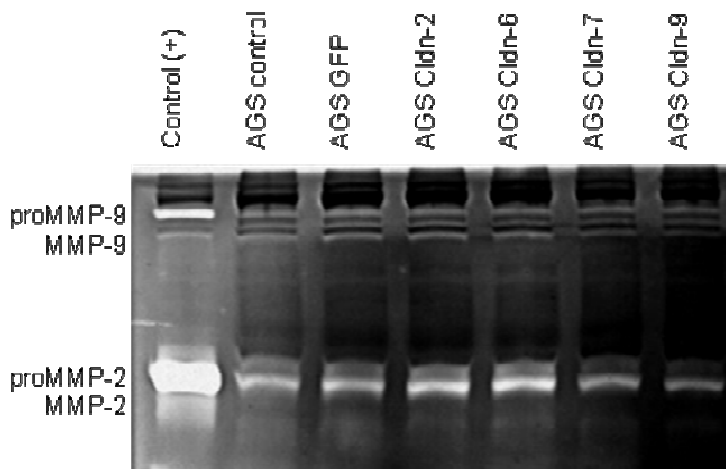


Figura 17. Zimograma obtenido de sobrenadantes de células AGS transfectadas, incubadas 24h sin SFB cultivadas a confluencia. Los sobrenadantes fueron concentrados con amicon ultra-2.

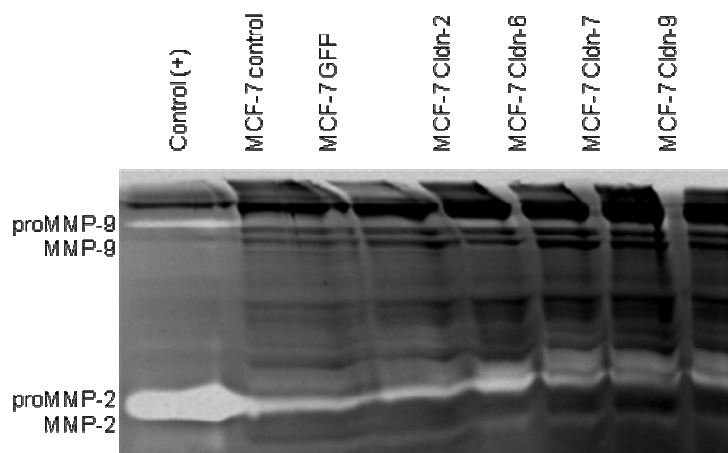


Figura 18. Zimograma obtenido de sobrenadantes de células MCF-7 transfectadas, incubadas 24h sin SFB cultivadas a confluencia. Los sobrenadantes fueron concentrados con amicon ultra-2.

Estudios previos han mostrado que la sobreexpresión de algunas claudinas produce cambios en la expresión de claudinas endógenas⁷⁴. Por ello, se decidió evaluar si la sobreexpresión de las claudinas 6, 7 y 9 alteraba la expresión de la Claudina-1 endógena, la cual se ha reportado que promueve la activación de la MMP-9⁶⁷. Para ello se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para claudina-1 acoplados a

rhodamina en las células AGS transfectadas (Fig. 9). Los resultados muestran que, al igual que las claudinas transfectadas, claudina-1 se encuentra en el citosol.

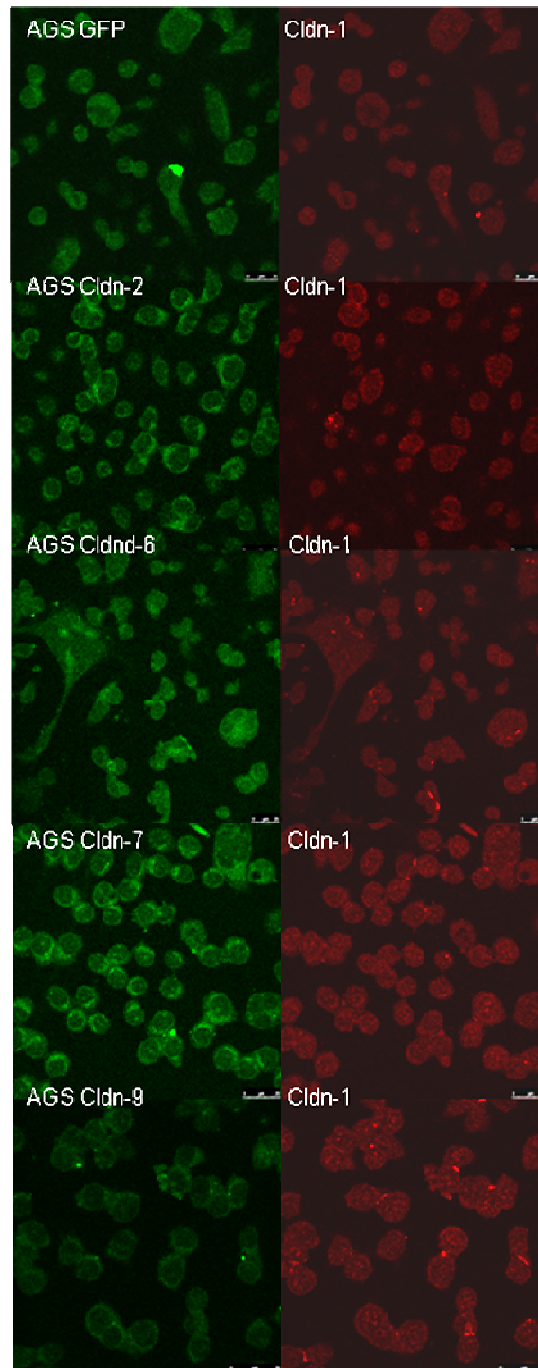


Figura 9. Microscopia confocal de las claudinas transfectadas fusionadas a la GFP (verde) y de claudina-1 endógena, detectada con un anticuerpo acoplados a Rhodamina (rojo).

DISCUSION DE RESULTADOS

Las claudinas son componentes importantes de las uniones estrechas (UE) ya que son responsables del mantenimiento de la polaridad y la permeabilidad de los epitelios y juegan un papel muy importante en la arquitectura y la homeostasis del tejido. Desde hace algunas décadas el estudio de la función y distribución de estas proteínas ha adquirido un gran interés debido a que se han encontrado diferencias en los patrones de expresión en tejidos neoplásicos comparados con tejidos normales⁵⁶. Estas diferencias son observadas en etapas tempranas de la transformación celular, lo que aumenta la importancia de las claudinas como posibles marcadores moleculares en el diagnóstico del cáncer^{75, 76, 77,78}. Se ha reportado a la claudina-10 como una proteína con valor pronóstico en los carcinomas hepatocelular y colorrectal^{79, 62}.

Es claro que uno de los primeros eventos que favorecen la progresión del cáncer es justamente la alteración o el daño de los contactos célula-célula y célula-matriz extracelular (MEC). Esto provoca una desregulación y/o pérdida en la expresión de proteínas que forman parte de estas uniones provocando la pérdida de adhesión, polaridad de las células y el desensamble de las uniones, lo que da lugar a la invasividad, migración y finalmente a la metástasis.

El proceso de tumorigenesis se favorece por la ruptura de las uniones intercelulares, dentro de las cuales se encuentran las uniones estrechas. Para que se lleve a cabo esta disociación se requiere que la localización y la expresión de las proteínas que conforman a estas uniones se alteren. Diversos reportes muestran la sobreexpresión o la pérdida de la expresión de ciertas claudinas en diferentes tejidos neoplásicos. Por ejemplo, claudina-7 se ha encontrado disminuida en carcinoma ductal invasivo⁸⁰, cabeza y cuello⁸¹ y cáncer de mama metastásico⁸². En carcinoma hepatocelular y renal disminuye la expresión de claudina-4 y -5⁸⁵. En cáncer de colon la expresión de claudina-1 se encuentra incrementada⁸⁶. Claudina-3 y claudina-4 se encuentran frecuentemente elevadas en cáncer de ovario, próstata⁸³, cáncer de mama⁸⁴. Se ha reportado que estas alteraciones correlacionan con el aumento en la invasividad⁶⁴.

Uno de los primeros eventos en los procesos de invasión es el desprendimiento de la célula tumoral para atravesar el tejido e invadir los órganos contiguos degradando la matriz extracelular mediante enzimas llamadas metaloproteasas (MMPs). Si bien es cierto que las metaloproteasas degradan solo proteínas de matriz extracelular, recientemente se sabe que también pueden degradar otro tipo de proteínas que no necesariamente pertenecen a la matriz, algunas de ellas son moléculas de adhesión célula-célula, como N-cadherina y E-cadherina⁸⁷. Estudios previos de nuestro laboratorio muestran la sobreexpresión de claudina-6, 7 y -9 en biopsias provenientes de pacientes con adenocarcinoma humano⁷³. La sobreexpresión de estas tres proteínas, incrementa la capacidad de migración e invasión de células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) y la sobreexpresión de claudina-7 y -9 de células derivadas de cáncer de mama humano (MCF-7)⁷⁴. El mecanismo por el cuál las claudinas promueven la invasividad aun no se conoce, aunque se sugiere que las claudinas pueden tener funciones intrínsecas que promuevan la invasión celular. Estas funciones están relacionadas con un incremento en la actividad de las MMPs⁸⁸. Algunos trabajos reportan que la expresión de claudina-1 aumenta la invasividad celular a través del incremento en la expresión de MMP-2⁷⁰.

De acuerdo con lo anterior, en el presente trabajo estudiamos el papel que juega la sobreexpresión de las claudinas -6, -7 y -9 en la expresión y actividad de las metaloproteasas, como un evento importante para la invasividad celular. Para ello, se utilizaron dos líneas celulares derivadas de cáncer, la línea AGS y la MCF-7. Cabe mencionar que las células AGS no forman uniones estrechas funcionales por lo que las claudinas endógenas no se localizan en los contactos célula-célula. De la misma manera, las claudinas sobreexpresadas no se localizan en la membrana plasmática sino en el citosol. Esto concuerda con previos reportes en los que se muestra que bajo ciertas condiciones, como el aumento en las concentraciones de factores de crecimiento, la alteración en los niveles de fosforilación de las claudinas o bajo diversas condiciones patológicas, las claudinas pueden localizarse en regiones citoplasmáticas o nucleares sin que se degraden.^{59, 62, 63,89}. Aun no se conoce con certeza la función que pueda llegar a desempeñar las claudinas en el citosol, sin embargo se han relacionado con procesos de tráfico vesicular o interacciones con la matriz extracelular⁶³.

En el caso de las células MCF-7, las claudinas endógenas como claudina-1 y claudina-7 se encuentran en la membrana celular y en el citosol^{80, 93}. Las claudinas 6, 7 y 9 que se sobreexpresaron se localizaron también en el citosol, característica observada en la mayoría de las líneas celulares derivadas de diferentes tipos de cáncer.

En el presente estudio se encontró que la sobreexpresión de claudina-9 induce un aumento en la expresión de MMP-2 y la sobreexpresión de claudinas-6 y -7 de MMP-9 en las células AGS. Estos datos en conjunto sugieren que el aumento en la capacidad invasiva de estas células observado previamente⁷⁴ se debe inicialmente al aumento en la expresión de estas metaloproteasas.

Actualmente, se le ha conferido un papel muy importante a ciertas claudinas como activadoras de metaloproteasas⁹⁰ a través de la formación de complejos con otras MMPs, por ejemplo claudina-1, -2 y -3 promueven la activación de proMMP2 a través de MT1-MMP, así mismo claudina-5 promueve la activación de proMMP2 a través de MT1-MMP, MT2-MMP, MT4-MMP, MT5-MMP^{62, 67}. De acuerdo con lo anterior, quisimos evaluar si el aumento en la expresión de las MMP-2 y -9 observado en este trabajo fue promovido por una probable interacción con las claudinas sobreexpresadas. Nuestras observaciones mostraron la co-inmunoprecipitación de claudina-9 con la MMP-2 y de claudina-7 y claudina-9 con la MMP-9 en las células AGS. En el caso de las células MCF-7 se observó la colocalización de claudina-2 y-7 con MMP-2 y de claudina-6 y -9 con MMP-9. En general estos resultados sugieren que las claudinas-6, -7 y -9 se encuentran en una proximidad tal que pudieran estar interaccionando con estas metaloproteasas probablemente por mecanismos reportados previamente como la formación de complejos con otras metaloproteasas. Por ejemplo se ha reportado que la primera asa de claudina-1 puede interaccionar con el dominio catalítico de MT-MMP-1 y MMP-2⁶⁷.

Adicionalmente, los resultados de inmunoprecipitación mostraron que puede darse la interacción de una claudina con una metaloproteasa o más de una claudina con una metaloproteasa. En las células AGS las claudinas 7 y 9 co-localizaron con la MMP-9 y en las células MCF-7 las claudinas 2 y 7 co-localizaron con la MMP-2. En contraste, en las células AGS la claudina-9 co-localizó con MMP-2 y en las células MCF-7 la claudina-6 co-

localizó con MMP-9. Esto sugiere que los mecanismos que regulan la actividad de estas enzimas pueden diferir de acuerdo al origen de la línea celular por lo que será importante estudiar la existencia de regiones no conservadas en cada una de estas proteínas que hagan más específica la interacción.

Posteriormente, evaluamos el efecto de la sobreexpresión de las claudinas 6, 7 y 9 sobre la actividad de las metaloproteasas. Interesantemente en las células AGS observamos una correlación entre la sobreexpresión de claudina-2 y -6 con un aumento en la actividad de MMP-2, así como la sobreexpresión de claudina-7 y -9 con la disminución en la actividad de MMP-2. En el caso de las células MCF-7 se observó la correlación entre la sobreexpresión de claudina-2 y el aumento en la actividad de MMP-2.

Estas observaciones apuntan hacia una regulación diferencial de estas metaloproteasas, por una parte el aumento en la actividad basal de la MMP-2 promovido por la sobreexpresión de claudina-2 y -6 en las células AGS y por claudina-2 en las células MCF-7 podría estar relacionado con el incremento en la capacidad de invasión de las células. Este dato correlaciona con un estudio previo donde se demuestra que la sobreexpresión de claudina-2 en células AGS aumenta la capacidad de invasión de esta línea celular⁹¹. Ya que en este estudio en los ensayos de inmunoprecipitación con células AGS no se observó colocalización de claudina 2 y 6 con ninguna de las MMPs, sugerimos que el aumento en la actividad de las MMPs podría llevarse a cabo de manera indirecta través de un intermediario por ejemplo la MT-MMP1. Por otro lado, la disminución en la actividad de MMP-2 por la sobreexpresión de claudina-7 y -9 podría estar involucrada con la inhibición de su activación, es decir, que estas claudinas estén actuando como inhibidores de las metaloproteasas de manera “directa” ya que en este caso si se observó la colocalización con estas claudinas. Se sabe por ejemplo que los TIMPs inhiben la activación de las MMPs a través de la interacción de su región N-terminal con el dominio catalítico de las MMPs⁹² por lo tanto podemos sugerir que las claudinas posiblemente inhiban a esta metaloproteasas al reemplazar a alguno de estos inhibidores e interaccionando a través de su región N-terminal.

Finalmente, se ha reportado que claudina-1 promueve la activación de MMP-2⁶⁷ e incrementa la capacidad de migración y supervivencia celular^{64, 66}. Estudios previos del laboratorio muestran que la sobreexpresión de las claudinas 6, 7 y 9 aumentan los niveles de RNA y proteína de claudina-1 y ZO-1⁷⁴. Para evaluar si la claudina-1 pueda tener algún papel importante en la activación de MMP-2 y MMP-9 en esta línea celular, en estudios futuros se pretende evaluar si el aumento en la claudina-1, mostrado en este trabajo, está relacionado con el aumento en la actividad de estas MMPs.

CONCLUSIONES

Efecto de la sobreexpresión de claudina-6, -7 y -9 en las células AGS.

- ✓ La sobreexpresión de claudinas-9 aumenta los niveles de expresión de MMP-2 y la sobreexpresión de claudina-6 y -7 aumenta la expresión de MMP-9.
- ✓ Claudina-9 se encuentra en cercanía con MMP-2 y MMP-9 y claudina-7 con MMP-9.
- ✓ La sobreexpresión de claudina-6 incrementa la actividad de MMP-2.
- ✓ La sobreexpresión de claudina-6, -7 y -9 incrementa la cantidad de claudina-1 endógena.

Efecto de la sobreexpresión de claudina-6, -7 y -9 en las células MCF-7.

- ✓ Claudina-2 y -7 se encuentra en cercanía con MMP-2 y claudina-6 y -9 con MMP-9.
- ✓ La sobreexpresión de claudina-2 aumenta la actividad de MMP-2.

PERSPECTIVAS

Aun faltan estudios por realizar para determinar los mecanismos que están involucrados en la función de las claudinas en los procesos de invasividad celular en estas líneas celulares.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hanahan D, Weinberg R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell Press*. 100: 57–70.
2. Leber M. F, Efferth T. 2009. Molecular principles of cancer invasion and metastasis. *Int. J. Oncol.* 34: 881-895.
3. Kopfstein, L. and Christofori G. 2006. Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 449–468.
4. Comoglio PM, Trusolino L. 2002. Invasive growth: from development to metastasis. *J Clin Invest.* 109(7):857-62.
5. Cadiñanos J, López-Otín C, Freije JM. 2009. Invasión tumoral y metástasis. Artículo de Revisión. 37-64.
6. Duffy, MJ., McGowan P.M., Gallagher W.M. 2008. Cancer invasion and metastasis: changing views. *J Pathol*; 214: 283–293.
7. Guarino, M. 2007. Epithelial–mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 2153–2160.
8. Christofori G. 2003. Changing neighbors, changing behavior: cell adhesion molecule-mediated signaling during tumor progression. *EMBO J.* 22: 2318-2323.
9. Herzig M, Savarese F, Novatchkova M, Semb H and Christofori G. 2007. Tumor progression induced by the loss of E-cadherin independent of beta-catenin/Tcf-mediated Wnt signaling. *Oncogene* 26:2290-2298.
10. Bourboulia, D., and Stetler-Stevenson W. G.. 2010. Matrix MetalloProteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of Metallo Proteinases (TIMPs): positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol* ; 20(3): 161–168.
11. Silvera A. L, Barrios, C. de Z. 2002. La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. *Salud Uninorte. Barranquilla*, 16: 9-18.
12. Álvaro N. T., Noguera-Salvá R, Fariñas G. F. 2009. La matriz extracelular: morfología, función y biotensegridad. *Rev Esp Patol*, 42, 4: 249-261.
13. Soo-Hyun K., Turnbull J., and Guimond s. 2011. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol.* 209, 139–151.

14. Tracey M. A., Wen J. G. 2008. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1788: 872-891.
15. Alexander J. S., and Elrod J. W. 2002. Extracellular matrix, junctional integrity and matrix metalloproteinase interactions in endothelial permeability regulation. *J. Anat.* 200, pp561–574.
16. Visse R., Nagase H. 2009. Matrix metalloproteases and tissue inhibitors of metalloproteases, structure, function and biochemistry. *Circ Res*.92: 827-839
17. Nigase H., Visse R., Murphy G. 2006. Structure and function of matrix metalloproteases and TIMPs. *Cardiovascular Research*. 69: 562-573.
18. Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z. 2010. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 141: 52-65.
19. Clark I. M, Swingler T. E, Sampieri C. L, Edwards D. R. 2008. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* 40(6-7):1362-78 1362–1378
20. Swarnakar S., Paul S., Pradeepkumar S. L. and Reiter R.J. 2011. Matrix metalloproteinases in health and disease: regulation by melatonin. *J. Pineal Res.* 2011; 50:8–20.
21. Slawomir M., Wojtowicz-Praga, R. B., Dickson and Hawkins M. J. 1997. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Investigational New Drugs*.15: 61-75.
22. Wang Z, Juttermann R, Soloway PD. 2000. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *J Biol Chem.* ;275:26411–26415.
23. Jo Y, Yeon J, Kim HJ, Lee ST. 2000. Analysis of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 effect on pro-matrix metalloproteinase-2 activation by membrane-type 1 matrix metalloproteinase using baculovirus/ insect-cell expression system. *Biochem J*. 345:511–519.
24. Mattu T. S, Royle L, Langridge J, Wormald M. R, Van den Steen P. E, Van Damme J, Opendakker G, Harvey DJ, Dwek R. A, Rudd P. M . 2000. O-glycan analysis of natural human neutrophil gelatinase. *Biochemistry*. 26;39 (51):15695-704.
25. Chakrabarti S, Patel K. D. 2005. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res* 31:599–621

26. Findley M. K, Koval M. 2009. Regulation and Roles for Claudin-family Tight Junction Proteins. *IUBMB Life*, 61(4): 431–437.
27. Brennan K, Offiah G, McSherry EA, Hopkins AM. 2010. Tight Junctions: A Barrier to the Initiation and Progression of Breast Cancer. *J Biomed Biotechnol.* 2010:460607.
28. Giepmans N. G. Ben, Sven C.D. van IJzendoorns. 2008. Epithelial cell–cell junctions and plasma membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta.* 12; 4C: 2, 3
29. Simpson, L. C., Green, J. K. 2007. Desmosomes: New Perspectives on a classic. *J. Invest. Derm.* 127:2499-2515.
30. Margolis, B., Shin, K., and Fogg, V. C., 2006. Tight Junctions and cell Polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22:207-35
31. Nelson, J. W., Hartsock, A., 2007. Adherents and Tight Junctions: structure, function and connection to the actin cytoskeleton. *Bio et Biophysic A.* 660-669.
32. Tsukita, S., Furuse, M., Itoh, M. 2001. Multifunctional Strands in Tigh Junction. *Nat Rev. / Mol Cell Biol.* 2:285-293.
33. Anderson, J. M. 2001. Molecular structure of Tight Junctions and their role in epithelial transport. *New Physiol. Sci.* 15: 126-130.
34. Carola Förster. 2008. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol.* 130(1):55-70.
35. Mitic, L.L., Van Itallie, C. M. Anderson, J. M. 2000. Molecular Physiology and Pathophysiology of tight junctions. *J.l Physiol Gast. Liver.* 279: G250-G254.
36. Schneeberger, E. E., Lynch, R. D. 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *J. Cell Physiol.* 286: C1213-C 1228.
37. Mariscal, G. L., Tapia R., Chamorro D., 2007. Crosstalk of Tight Junction components with signaling pathways. *Bio et Biophys A.* 1778:729-256.
38. Balda, M. S. et. al. 1996. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical- basolateral

- intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J. Cell Biol.* 134: 1031-1049
39. Riazuddin S, Ahmed Z. M, Fanning A. S, Lagziel A, Kitajiri S, Ramzan K, Khan S. N, Chattaraj P, Friedman P. L, Anderson J. M, et al. 2006. Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am J Hum Genet* 79: 1040–1051.
40. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S. 2005. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 171: 939–945.
41. Ikenouchi J, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S. 2008. Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell* 19: 4687–4693.
42. Furuse, M. 2010. Molecular Basis of the Core Structure of Tight Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2(1):a002907.
43. Franke, w. w. 2009. Discovering the Molecular Components of Intercellular Junctions, A Historical View. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*1:a003061.
44. Turksen, K., Troy, T. C. 2004. Barriers built on claudins. *J. Cell Sci.* 117: 2435-2458.
45. Furuse M, Sasaki H, Tsukita S. 1999. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol* 147: 891–903.
46. Kubota K, Furuse M, Sasaki H, Sonoda N, Fujita K, Nagafuchi A, Tsukita S. 1999. Ca(2p)-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions. *Curr Biol.* 9: 1035–1038.
47. Piontek J, Winkler L, Wolburg H, Müller SL, Zuleger N, Piehl C, Wiesner B, Krause G, Blasig IE. 2008. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J.* 22(1):146-58.
48. Daugherty B.L, Ward C, Smith T, Ritzenthaler J.D, Koval M. 2007. Regulation of heterotypic claudin compatibility. *J Biol Chem.* 282: 30005–30013
49. Oliveira, S. S., Morgado-Díaz, J. A. 2007. Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. *Cell and Mol. L. Sci,* 64:17-28.

50. Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., et al. 2002. Claudin- based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lessons from claudin-1 deficient mice. *J. Cell Biol.* 156: 1099-1111.
51. D' Souza, T., Agarwal, R., and Morin, P. J., 2005. Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP- dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *J. Biol. Chem.* 289: 26233-26240
52. Sing, A.B. and Harris, R. C. 2004. Epithelial growth factor receptor activation differentially regulates claudins expression and enhances transepithelial resistance in Madin- Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 279: 3543-3552
53. Gonzalez-Mariscal L., Lechuga S., Garay E. 2007. Role of tight junctions in cell proliferation and cáncer. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* (49) 1–57.
54. Singh A. B., Sharma A., and Dhawan, P. 2010. Claudin Family of Proteins and Cancer: An Overview. *Journal of Oncology.* 10.1155. 1-11.
55. Swisshelm K., Macek R., Kubbies M. 2005. Role of claudins in tumorogenesis. *Elsevier.* 57:919-928.
56. Hewitt K. J., Agarwal, R. Morin, P.T. 2006. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC. Cancer.* 6:186.
57. Soini, Y. 2005. Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumors. *Histopathology.* 46:5551–560.
58. Kominsky S. L, Argani P., Korz D. et al. 2003. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene*, 22:13, 2021–2033.
59. Sauer T., Pedersen M. K, Ebeltoft, K. and Næss, O. 2005 Reduced expression of Claudin-7 in fine needle aspirates from breast carcinomas correlate with grading and metastatic disease. *Cytopathology*, 16: 4, 193–198.
60. Mehlen P, Puisieux A. 2006. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer.* 6:449–58.
61. Chao Y.-C., Pan S.-H., Yang S.-C. et al. 2009. Claudin-1 is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179: 2, 123–133.

62. Dhawan P, Singh A.B, Deane N.G, No Y, Shiou S.R, Schmidt C, et al. 2005. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest.* 115:1765–76.
63. Morin, J. P. 2005. Claudins proteins in Human Cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res.* 65: 9603-9603.
64. Agarwal R., D` Souza, Morin J. P. 2005. Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer Res* 65: (16) 7378-7385.
65. Lee L. Y., Wu C.M., Wang C.C., Yu J.S., Liang Y., Huang K.H., Lo C. H., Hwang T. L. 2008. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in gastric cancer and their relation to claudin-4 expression. *Histol Histopathol.* 23 (5): 515-21.
66. Takehara M., Nishimura T., Mima S., Hoshino T., Mizushima T. 2009. Effect of claudin expression on paracellular permeability, migration and invasion of colonic cancer cells. *Biol Pharm. Buil.* 32 (5): 825-831.
67. Miyamori, H., Takino T., Kobayashi Y., Tokai H., Ithon Y., Seik M., Sato H. 2001. Claudin promotes activation of pro-matrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-type matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 276 (30): 28204-28211.
68. Ip Chi Y., Cheung S. T., Lee Y. T., Ho J. C., Tat fan S. 2007. Inhibition of hepatocellular carcinoma invasion by suppression of claudin-10 in HLE cells. *Mol Cancer Ther.* 6 (11): 2858-2867.
69. Johnson A. H., Frierson H. F., Zaika A., Powell S. M., Crowe S., Moskaluk C.A., El-Rifai W. 2005. Expression of tight junction protein claudin-7 is an early event in gastric tumorigenesis. *A. J. P.* 167 (2): 577-584.
70. Oku N., Sasabe E., Ueta E., Yamamoto T., Osaki T. 2006. Tight junction protein claudin-1 enhances the invasive activity of oral squamous cell carcinoma cells by promoting cleavage of laminin-5 γ 2 chain via metalloprotease MMP-2 and membrane-type MMP-1. *Cáncer Research.* 66 (10): 5251-5257.
71. Groschwitz K. R. and Simon P. Hogan. 2009. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *Clin Immunol.*

72. Gerd Krause, Lars Winkler, Sebastian L. Mueller, Reiner F. Haseloff, Jörg Piontek, Ingolf E. Blasig. 2008. Review Structure and function of claudins. *Biochimica et Biophysica Acta* (1778); 631–645.
73. Rendón-Huerta Erika, Fortoul Teresa, Gorráez María Teresa, García-Samper Xochitl, Alvarez-Fernández Georgina, Zavala-Zendejas Veronica, Montaña Luis Felipe. 2010. Distribution and expression pattern of claudin 6, 7 and 9 in diffuse- and intestinal-type gastric adenocarcinomas. *J Gastrointest Cancer*. 41(1):52-9.)
74. Zavala-Zendejas VE, Torres-Martínez AC, Salas-Morales B, Fortoul T, Montaña LF, Rendón-Huerta E.P. 2011. Claudin-6, -7 or -9 overexpression in the human gastric adenocarcinoma cell line AGS increase its invasiveness, migration and proliferation rate. *Cancer Investigation*, 29:1-11.
75. Turksen K. Tammy-Claire Troy. 2011. Junctions gone bad: Claudins and loss of the barrier in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1816: 73–79.
76. Marchiando, A.M., Graham, W.V. Turner J.R.. 2010. Epithelial barriers in homeostasis and disease, *Annu. Rev. Pathol.* 5:119–144.
77. Martin, T.A. Jiang, W.G. 2001. Tight junctions and their role in cancer metastasis, *Histol.* 16:1183–1195.
78. Martin, T.A. Jiang, W.G. 2009. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis, *Biochim. Biophys. Acta.* 1788: 872–891.
79. Cheung ST, Leung KL, Ip YC, Chen X, Fong DY, Ng IO, Fan ST, So S. 2005. Claudin-10 expression level is associated with recurrence of primary hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 15;11(2 Pt 1):551-6.
80. Kominsky, S. L Argani, P. Korz D. et al., 2003. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene*, 22: 13, pp. 2021–2033.
81. Y.Usami,H. Chiba, F.Nakayama et al., 2006. Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion andmetastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Human Pathology.* 37: 5, pp. 569–577.

82. Sauer T., Pedersen M. K., Ebeltoft K., and Næss O., 2005. Reduced expression of Claudin-7 in fine needle aspirates from breast carcinomas correlate with grading and metastatic disease. *Cytopathology*, 16: 4, pp. 193–198.
83. Michl P., Barth C., Buchholz M. et al. 2003. Claudin-4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer. *Cancer Research*, 63: 19, pp. 6265–6271.
84. Rangel L. B. A, Agarwal R., D’Souza T. et al. 2003. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clinical Cancer Research*. 9: 7, pp. 2567–2575.
85. Soini Y. 2005. Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. *Histopathology*, 46: 5, pp. 551–560.
86. Miwa N., Furuse M., Tsukita S., Niikawa N., Nakamura Y., Furukawa Y., 2000. Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol. Res.* 12: 469–476.
87. Hartland SN, Murphy F, Aucott RL, et al. 2009. Active matrix metalloproteinase-2 promotes apoptosis of hepatic stellate cells via the cleavage of cellular N-cadherin. *Liver Int*; 29:966–78.
88. Ibrahim O. Bello BDSa, Suvi-Tuuli Vilen DDS, Ahti Niinimaa, Saara Kantola DDS, Ylermi Soini MD, Tuula Salo DDS. 2008. Expression of claudins 1, 4, 5, and 7 and occludin, and relationship with prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Human Pathology* 39, 1212–1220.
89. Blackman B, Russell T, Nordeen SK, Medina D, Neville MC. 2005. Claudin 7 expression and localization in the normal murine mammary gland and murine mammary tumors. *Breast Cancer Res*, 7:R248-R255.
90. Singh A. B., Sharma A., and Dhawan, P. 2010. Claudin Family of Proteins and Cancer: An Overview. *Journal of Oncology* :10.1155. 1-11.
91. Mima, S.; Takehara, M.; Takada, H.; Nishimura, T.; Hoshino, T.; Mizushima, T. 2008. NSAIDs suppress the expression of claudin-2 to promote invasion activity of cancer cells. *Carcinogenesis*, 29, 1994–2000.

92. Visse, R and Nagase H. 2003. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Circ. Res.*;92;827-839.
93. Akasaka et. al. 2010. Anti-apoptotic effect of claudin-1 in tamoxifen treated human breast cancer MCF-7 cells. *BMC Cancer* 10:548.

ANEXO 1

MEDIO DE CULTIVO

D-MEM solo

Disolver un sobre del medio en aproximadamente 800 ml de agua tratando de no dejar nada de medio en el sobre

Adicionar 2 g de NaHCO₃ y disolver

Ajustar a pH = 7.4 (puede quedar 0.1 o 0.2 abajo)

Levar a 1 L de volumen con agua

Esterilizar por filtración separando en botellas de 500 ml etiquetadas

Por cada 100 ml de medio DMEM solo adicionar:

0.1 ml de Insulina de SIGMA de 10 mg/mL (10 µg/ml o 0.1 U/ml)

0.2 ml de Piruvato de Sodio de GIBCO 100mM (2mM)

1.0 ml de L-Glutamina de GIBCO 200 mM (2mM)

1.0 ml de Penicilina/Estreptomicina de GIBCO 10,000U/ml/10,000 µg/ml (100U/ml/100 µg/ml)

5.0 ml de Suero Fetal Bovino de GIBCO (5%)

DMEM para congelamiento de células.

DMEM + GLICEROL 10% Para 10 ml de medio total:

1.25 ml de Glicerol al 80%

8.75 ml de DMEM suplementado.

PBS 1X pH = 7.5, para lavado de los cultivos celulares.

Para 1L

Pesar 9.6 g de PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) de GIBCO

Disolver en 900 ml de agua

Ajustar el pH

Aforar con ddH₂O, esterilizar por filtración y guardar en refrigeración.

BUFFER A pH = 7.5, para extracción y cuantificación de proteínas.

Para preparar 100 ml:

0.242 g de Tris base (PM = 121.14 g/mol, C₄H₁₁NO₃) de SIGMA (20 mM)

4.506 g de Dextrosa Anhidra (PM = 180.16 g/mol, C₆H₁₂O₆) de SIGMA (0.25 M)

0.38 g de EGTA (PM = 380.4 g/mol, C₁₄H₂₄N₂O₁₀) de SIGMA (10 mM)

0.058 g de EDTA (PM = 292.2 g/mol, C₁₀H₁₆N₂O₈) de SIGMA (2 mM)

Disolver los compuestos y ajustar el pH

Aforar a 100 ml con agua

Almacenar en Refrigeración

Antes de emplear adicionar los siguientes inhibidores, por cada ml de Buffer a emplear:

4 µl de Leupeptina 5 mg/mL (20 µg/ml)

10 µl de Coctail de Inhibidores de Fosfatasas I de SIGMA (dil 1:100)

10 µl de Coctail de Inhibidores de Fosfatasas II de SIGMA (dil 1:100)

1 mg de Inhibidor de Tripsina de SIGMA (1mg/ml)

Una vez adicionados los inhibidores dejar el buffer en hielo para su uso.

BUFFER DE LISIS pH = 7.5, para extracción de proteínas.

Para preparar 100 ml:

0.8766 g de NaCl (150 mM)

0.6057 g de Tris base (PM = 121.14 g/mol, C₄H₁₁NO₃) de SIGMA (50 mM)

0.038 g de EGTA (PM = 380.4 g/mol, C₁₄H₂₄N₂O₁₀) de SIGMA (1 mM)

0.029 g de EDTA (PM = 292.2 g/mol, C₁₀H₁₆N₂O₈) de SIGMA (1 mM)

1.0 ml de IGEPAL (1%)

1.0 ml de Solución de Desoxicolato de Sodio al 10% (0.1%)

0.1 g de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) (0.1%)

Disolver los compuestos y ajustar el pH

Aforar a 100 ml con agua

Almacenar en Refrigeración

Antes de emplear adicionar los siguientes inhibidores, por cada ml de Buffer a emplear:

4 µl de Leupeptina 5 mg/mL (20 µg/ml)

10 µl de Coctail de Inhibidores de Fosfatasas I de SIGMA (dil 1:100)

10 µl de Coctail de Inhibidores de Fosfatasas II de SIGMA (dil 1:100)

1 mg de Inhibidor de Tripsina de SIGMA (1mg/ml)

Buffer de Laemli 4X

Para 50 ml: 20 ml de SDS al 10% (4%)

12.5 ml de Tris 0.5 M pH = 6.8 (0.125M)

10 ml de Glicerol (20%)

0.02 g de Azul de Bromofenol (0.04%)

Disolver y aforar a 50 ml

Alicuotar en tubos de 15 ml

Almacenar en congelación

Usar la mitad del volumen de este buffer en el volumen de la muestra.

Antes de emplear la muestra para corrimiento electroforético adicionar β -Mercaptoetanol para tener una concentración del 5%.

ACRILAMIDA 30.8%

Para 100 ml: 30 g de Acrilamida (BIO-RAD) (30%)

0.8 g de Bis N, N'- metilen bis acrilamida (BIO-RAD) (0.8%)

Disolver poco a poco la acrilamida en 50 ml de ddH₂O y posteriormente disolver la bis acrilamida.

Llevar a 100 ml con ddH₂O y guardar en refrigeración.

TRIS 1.5M pH=8.8

Para 100 ml: 18.171g de Tris

Disolver poco a poco en 50 ml de ddH₂O, ajustar el pH y posteriormente aforar a 100ml.

TRIS 0.5M pH= 6.8

Para 100ml: 6.057g de Tris

Disolver poco a poco en 50 ml de ddH₂O, ajustar el pH y posteriormente aforar a 100ml.

Gel Separador al 12.5%

12.5 ml de Acrilamida 30.8%

7.5 ml de Tris 1.5 M pH = 8.8

9.55 ml de ddH₂O

150 µl de SDS al 20%

15 µl de TEMED

150 µl de Persulfato de Amonio al 10%

Gel Concentrador

2.5 ml de Acrilamida 30.8%

3.75 ml de Tris 0.5 M pH = 6.8

8.55 ml de ddH₂O

75 µl de SDS al 20%

15 µl de TEMED

150 µl de Persulfato de Amonio al 10%

Amortiguador para Electroforesis, pH = 8.3

Para 4L: 12.13 g de Tris (25 mM)

57.65 g de Glicina (192 mM)

4 g de SDS (0.1%)

Aforar con ddH₂O

Amortiguador de Transferencia, pH = 8.3

Para 1 L: 3.03 g de Tris (25 mM)

14.4 g de Glicina (192 mM)

200 ml de Metanol (20%)

Nota: No ajustar pH con ácidos o bases, el pH de 8.3 se obtiene si se pesan correctamente los ingredientes.

Aforar con ddH₂O y guardar en refrigeración.

Para lavados de membranas se utilizó TBS 1X, pH = 7.6

Para 1L:

2.423 g de Tris (20 mM)

8 g de NaCl (136 mM)

Aforar con ddH₂O y guardar en refrigeración.

Para lavados e incubaciones con anticuerpos de membranas se utilizó TTBS 1X, pH = 7.6

Para 1L:

2.423 g de Tris (20 mM)

8 g de NaCl (136 mM)

1 ml de Tween 20 (0.1%)

Aforar con ddH₂O y guardar en refrigeración.

ZIMOGRAMAS

Gel concentrador (5ml)

Agua desionizada	3.1ml
Tris 0.5M pH 6.8	1.25ml
Acrilamida/Bisacrilamida (38/2)	0.5ml
TEMED	10 μ l
Persulfato de Amonio	50 μ l

Gel separador (10ml)

Agua desioniozada	3.4ml
Tris 1.5M pH 8.8	2.5ml
Gelatina	2ml
Acrilamida/bisacrilamida (38/2)	2ml
TEMED	10 μ l
Persulfato de Amonio	50 μ l

Acrilamida/bisacrilamida 100ml

Acrilamida 38g

Bisacrilamida 2g

Disolver en agua desionizada

Gelatina

250mg en 50ml de agua desionizada

Tris 1.5M pH=8.8

Tris 18.17g

SDS al 10% 4ml

Disolver en 100ml y ajustar pH

Tris 0.5M pH=6.8

Tris 6.05g

SDS al 10% 4ml

Disolver en 100ml y ajustar pH

Buffer de incubación

Aforar a 1L, ajustar pH= 7.4

Tris 50Mm 6.057g

CaCl₂ 0.1M 4.41g

NaCl 0.15M 8.76g

NaN₃ 0.2g

Solución teñidora

Metanol 10%

Acido acético 10%

Glicerol 10%

Azul de coomasie al 1% 10%

Solución desteñidora

Metanol 10%

Acido acético 10%

Glicerol 10%

INMUNOPRECIPITACION

Para 500ml de NaCl 600mM

3.0285g de Tris (50mM)

17.4g de Na Cl (600mM)

Ajustar pH a 8.3

Para 500 ml de NaCl 150mM

3.0285 de Tris (50mM)

4.35g de NaCl (150mM)

Ajustar pH a 7.5

Para 500ml de Tris 20mM

1.211g de Tris (20Mm)

Ajustar pH a 7.5 y de preferencia esterilizar.

Lavado de perlas de proteína G Sefarosa

- ✓ Se lavan 3 veces con Tris 20mM pH 7.5, en un volumen 1:1
- ✓ Se centrifugan a 9000 rpm
- ✓ Se guardan a 4°C hasta utilizarse.

Inhibidores

- ✓ Inhibidor de tripsina (1mg/ml)
- ✓ Cocktel de fosfatasas y proteasas dil 1:100 (10µl/ml)
- ✓ Leupeptina 20 µg/ml (4 µl de la sol. 5mg/ml)
- ✓ Aprotinina 10 µg/ml (10 µl de la sol. 1mg/ml)