



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**PAPEL DE LAS CLAUDINAS 6, 7 Y 9 EN LA
EN LA PROLIFERACION, MIGRACION Y
MUERTE CELULAR**

T E S I S

Que para optar por el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

Presenta:

Biól. Berenice Salas Morales

Tutor principal: Dra. Erika P. Rendón Huerta, Facultad de Medicina

Comité tutor: Dra. Vilma Maldonado Lagunas, INMEGEN

Dr. Julio César Carrero Sánchez, IIB

MÉXICO, D.F. del 2013



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.



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 10 de septiembre de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **SALAS MORALES BERENICE** con número de cuenta **99306106**, con la tesis titulada **"PAPEL DE LAS CLAUDINAS 6, 7 Y 9 EN LA PROLIFERACIÓN, MIGRACIÓN Y MUERTE CELULAR"**. realizada bajo la dirección de la **DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA**:

Presidente: DR. GONZÁLO CASTILLO ROJAS
Vocal: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Secretario: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS
Suplente: DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDÉZ
Suplente: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 11 de marzo de 2013

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

AL apoyo recibido por CONACYT (2009-01-112628)

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

Dra. Erika Rendón Huerta

Dra. Vilma Maldonado Lagunas

Dr. Julio César Carrero Sánchez

Agradecimientos

A mi familia:

En primer lugar a mis padres, por ser una gran fuente de inspiración ya que siempre me alientan a salir adelante, pero sobre todo por su apoyo y amor incondicional que es lo más valioso que tengo y sé que siempre podré contar con ustedes, gracias por su confianza y tenerme tanta paciencia.

A Nelly, muchas gracias!!!! ya que me has apoyado durante todo este proceso, te quiero mucho.

A Ana, por darle ese toque de alegría a mis días.

A mi tutora:

Dra. Erika muchas gracias por la confianza depositada en mi, sus enseñanzas y su gran calidad humana. Valoro en gran medida todo lo que he aprendido durante mi estancia en el laboratorio, representa un gran ejemplo a seguir.

Al Dr. Montaña gracias por decir las cosas como son, créame que he aprendido mucho de usted, y agradezcó el apoyo que me brindó.

A Karla por compartir esta nueva experiencia conmigo, por tu sincera amistad y apoyo en todo momento.

A Ana por todo tu apoyo incondicional dentro y fuera del laboratorio, por todas las experiencias vividas a tu lado y brindarme tu linda amistad

A Oswaldo por motivarme a seguir adelante, pero sobre todo por ser un excelente amigo y estar en todo momento conmigo.

A Monse por tu tiempo y ayuda cuando lo necesité, por permitirme compartir un poco de mis experiencias y así aprender juntas, por tu gran amistad.

A Jane por alentarme y escucharme, por brindarme tu valiosa amistad.

A Vero, Adrián, Samantha y Pao, fue agradable compartir el mismo espacio de trabajo en su momento, además de su gran amistad.

A Meche y David por su amistad y apoyo.

A Rafa por aparecer en el momento indicado, por tu amistad.

Al apoyo recibido por PAPIIT (IN225106-2).

A la M en IBB Claudia Garay y Sergio Valdivia López por su ayuda.

INDICE

	Página
Resumen.....	6
Abstract.....	8
Introducción.....	9
Uniones intercelulares.....	9
Uniones estrechas.....	11
Composición molecular.....	13
Proteínas transmembranales.....	15
JAM.....	15
Ocludina.....	15
Tricelulina.....	16
Claudinas.....	17
Estructura.....	18
Cáncer.....	21
Migración, proliferación y apoptosis.....	24
Marcadores moleculares, diagnóstico y terapia.....	26
Planteamiento del problema.....	28
Hipótesis.....	30
Objetivos.....	31
Material y método.....	32
Cultivos celulares.....	32

Construcción de vectores pcln6GFP, pcln7GFP y pcln9GFP.....	32
Transfección de líneas celulares.....	34
Fraccionamiento celular y Western blot.....	34
Microscopía confocal.....	36
Ensayo de invasividad.....	36
Ensayo de regeneración de herida.....	37
Ensayo de proliferación.....	37
Ensayo de apoptosis.....	38
Resultados.....	39
Análisis de la expresión de claudinas en las células C9 y HepG2.....	39
Análisis de la localización subcelular de claudinas.....	40
Efecto de la sobreexpresión de las claudinas en la migración de las células C9.....	49
Efecto de la sobreexpresión de las claudinas en la invasividad de las células C9.....	51
Efecto de la sobreexpresión de las claudinas en la invasividad de las células HepG2.....	53
Evaluación de la proliferación de células C9.....	55
Evaluación de la proliferación de células HepG2.....	56
Evaluación de apoptosis de las células C9.....	57
Evaluación de apoptosis de las células HepG2.....	59

Discusión.....60

Conclusiones.....67

Referencias.....68

Anexo.....73

RESUMEN

La alteración en la expresión y localización subcelular de las claudinas, provoca el libre acceso de factores de crecimiento a regiones basolaterales de la célula manteniendo una señal proliferativa activa promoviendo procesos como la proliferación, migración e invasión celular. El objetivo del presente trabajo fue determinar si la sobreexpresión de claudinas -6, -7 y -9 tienen algún efecto sobre la proliferación, migración, invasión y muerte celular de líneas celulares derivadas de hígado normal de rata (C9) y derivadas de carcinoma hepatocelular humano (HepG2). Se realizaron transfecciones para los genes que codifican para los genes de dichas claudinas en las líneas celulares y se corroboró la sobreexpresión mediante ensayos de Western blot, RT-PCR y microscopía confocal. Para determinar el efecto de la sobreexpresión sobre la proliferación celular, se utilizó el ensayo de incorporación de BrdU. Para evaluar la migración celular se utilizó el ensayo de regeneración de herida, para la invasividad los ensayos en cámaras de matrigel y para evaluar la muerte celular se utilizó el kit *Annexin-V-Cy3 Detection Apoptosis*. Los resultados obtenidos mostraron que la sobreexpresión de las claudinas -7 y -9 aumentó la velocidad de proliferación y la invasión de las células C9 y claudina -6 de las células HepG2. En lo que se refiere a la migración celular, la sobreexpresión de

claudina -9 promovió la regeneración de la herida más rápidamente que las claudinas -6 y -7.

En células C9 la sobreexpresión de las claudina -9 tiene una mayor motilidad, aunque también claudina -6 y -7 logra cerrar por completo la herida. En ambas líneas celulares la sobreexpresión de las tres claudinas evade la apoptosis disminuyendo el porcentaje de células que se van a muerte celular.

Abstract

Transmembrane proteins claudins preserve cell polarity and determine the size and charge of the molecules that pass through the paracellular space in epithelial tissues. Altered claudin expression in early and late stages of several cancers has been related to increased invasiveness and metastatic potential. We have reported an expression of claudin -6, -7 and -9 in human gastric adenocarcinomas and their role in the human adenocarcinoma cells invasiveness. Modification in the expression pattern of tissue-specific claudins may serve as a marker and have a prognostic value in certain tumors. To determine if claudin overexpression confere advantages to hepatocellular cancer cell line (HepG2) and cell line normal, we evaluated the invasive capability of claudins transfected cells in Matrigel invasion chambers and by wound-healing scratch assay. Proliferation rate by Brdu incorporation, and apoptosis by Anexin V detection were also measured. Overexpression of claudin -6 or -9 resulted in increased migration and invasive potential; however claudin-9 transfected cells migrated faster than the others.

Introducción

Un requisito para el funcionamiento adecuado de los órganos es la formación de barreras de difusión que permiten la generación y el mantenimiento de compartimientos en los organismos. Los epitelios y endotelios mantienen esta función a través de estructuras adhesivas especializadas: las uniones intercelulares.

Uniones Intercelulares

Las uniones intercelulares desempeñan un papel fundamental ya que, además de permitir la compartimentalización celular, regulan el paso de diferentes sustancias a través de dos vías de transporte: a) la vía transcelular, dependiente de energía en donde el paso de iones se da mediante canales y bombas que se distribuyen a lo largo de las membranas apical y basolateral y b) la vía paracelular, en donde hay un transporte pasivo de iones y pequeñas moléculas no cargadas (Figura 1). Estos dos tipos de transporte permiten que los epitelios funcionen como barreras permeables capaces de crear gradientes eléctricos y de concentración de moléculas entre los fluidos luminales y serosos¹⁻³.

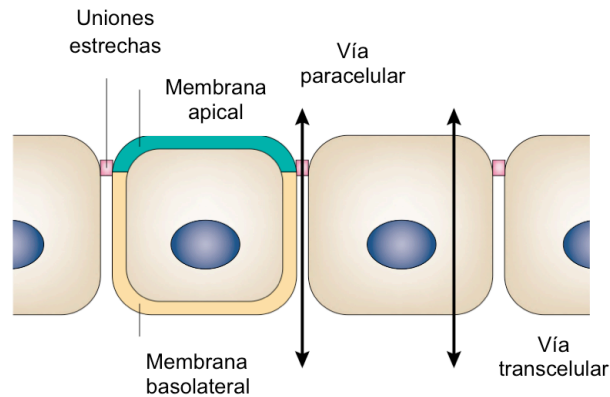


Figura 1. Vías de transporte³.

Las uniones intercelulares están constituidas por las Uniones Comunicantes (o uniones GAP), las Uniones Adherentes, los Desmosomas y las Uniones Estrechas (Figura 2).

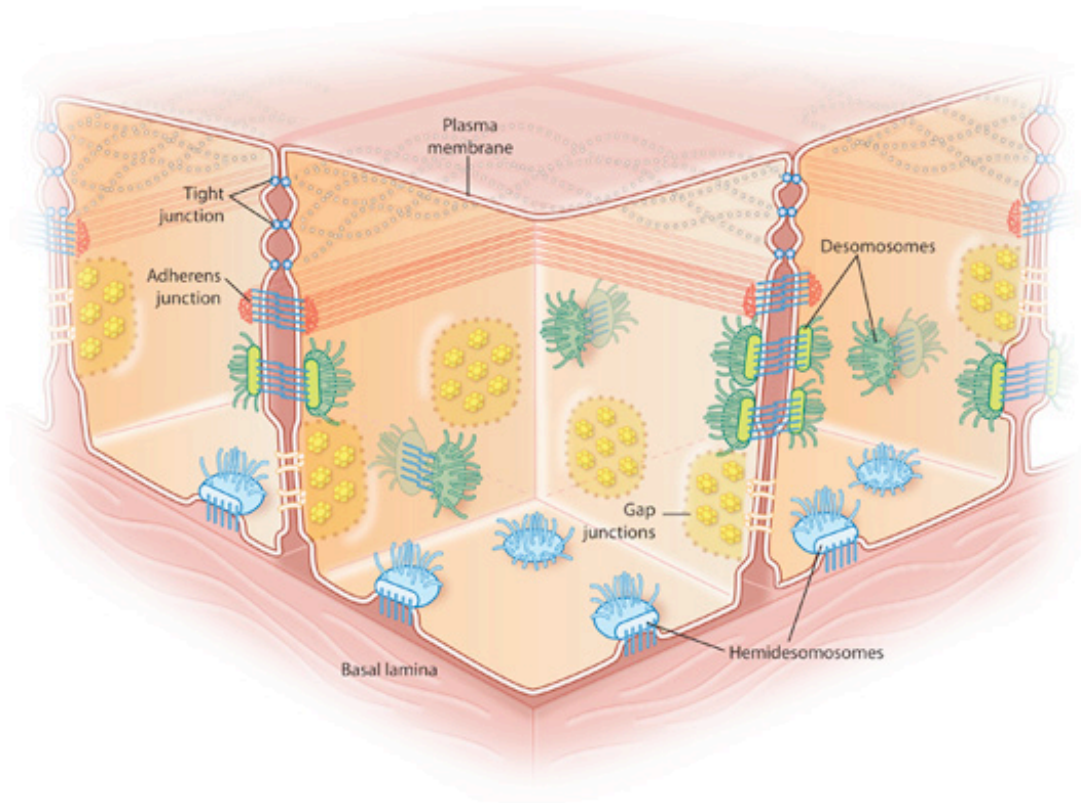


Figura 2. Complejo de uniones intercelulares.

Las uniones **GAP** o uniones comunicantes, son estructuras especializadas de membrana que permiten la comunicación de célula a célula a través del intercambio de pequeñas moléculas que difunden,

a través de canales formados por complejos de proteínas integrales de membrana denominados conexones⁴⁻⁵.

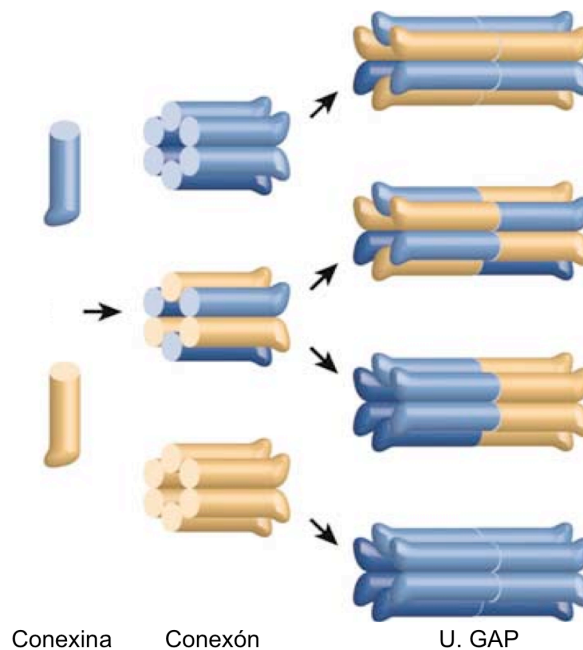


Figura 3. Seis unidades de conexinas forman canales (conexones). Diferentes conexinas pueden interactuar selectivamente para formar dichos canales⁵.

Las Uniones Adherentes (UA) tienen múltiples funciones incluyendo la iniciación y la estabilización de la adherencia célula-célula, la regulación del citoesqueleto de actina, señalización intracelular y regulación transcripcional. Las proteínas predominantes en estas uniones son las cadherinas, que se unen a filamentos de actina y miosina y son dependientes de Ca^{2+} . Dentro de estas uniones se encuentra principalmente la E-cadherina⁶⁻⁷.

Los Desmosomas conforman los sitios de anclaje para filamentos intermedios y puntos de contacto que fijan a células adyacentes por

medio de sus membranas laterales y a las células con la matriz extracelular (hemidesmosomas)⁸.

Uniones estrechas

Las Uniones Estrechas (UEs), son las estructuras que se encuentran en la parte más apical del complejo de unión intercelular en las células epiteliales y endoteliales y constituyen una barrera selectiva, que restringe la difusión entre la membrana apical y basolateral^{6,9-10}.

En imágenes de microscopía por criofractura, las UEs aparecen como una red de filamentos continuos interconectados en una serie de puntos focales en donde las membranas de las células adyacentes se fusionan (Figura 3)¹¹⁻¹².

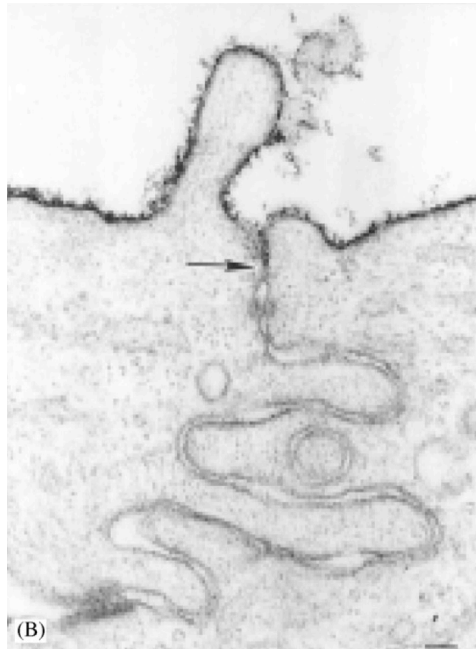
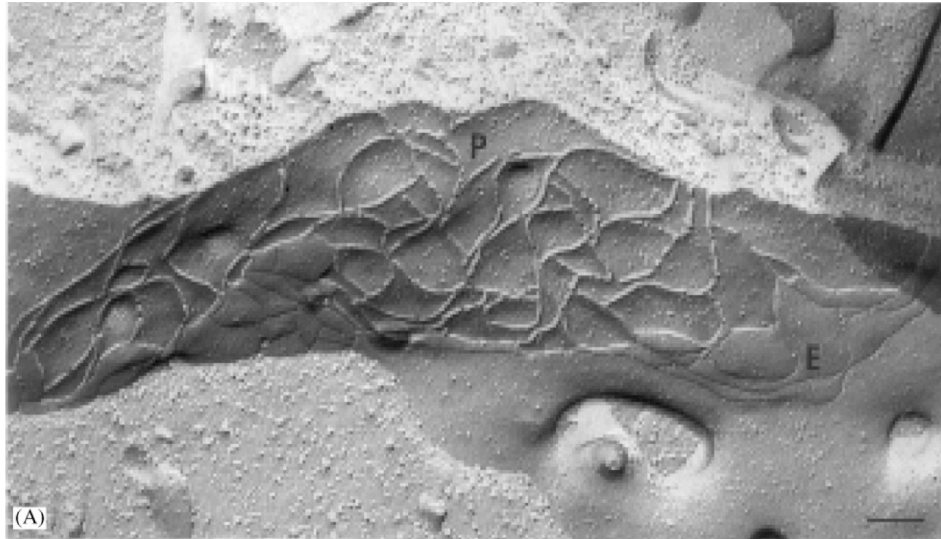


Figura 3. A) Imagen de microscopia por criofractura y B) La flecha indica presencia de las UEs Microscopía electrónica¹².

Las UEs se encargan de regular el paso de iones, agua y pequeñas moléculas de tamaño mediano ($<15\text{\AA}$) a través de la ruta paracelular (función de barrera) y de restringir la difusión de los lípidos y proteínas de membrana entre los compartimentos apical y basolateral, manteniendo así la polaridad celular¹³⁻¹⁴. Las UEs son estructuras dinámicas y están sujetas a modulación durante la remodelación del tejido epitelial, la reparación de heridas, la inflamación y la

transformación celular. Existe una asociación entre la función anormal de las UEs y el desarrollo de tumores¹⁵.

Composición Molecular

Las UEs están conformadas por más de 40 diferentes moléculas, entre las que se encuentran: 1) proteínas citosólicas; que pueden servir como proteínas estructurales o de anclaje, como las *zonula occludens* (ZO) ZO-1, -2 y -3; 2) proteínas de regulación del tráfico vesicular, involucradas en la señalización, proliferación, polaridad, diferenciación celular e incluso en la regulación de la expresión génica; y 3) proteínas transmembranales, como las claudinas, ocludina, tricelulina y las JAM (*junctional adhesion molecule*). Estas proteínas interactúan de manera homotípica con proteínas presentes en la membrana de la célula adyacente formando canales paracelulares capaces de regular el paso de moléculas de acuerdo a su tamaño y carga (Figura 4)¹⁶⁻¹⁸.

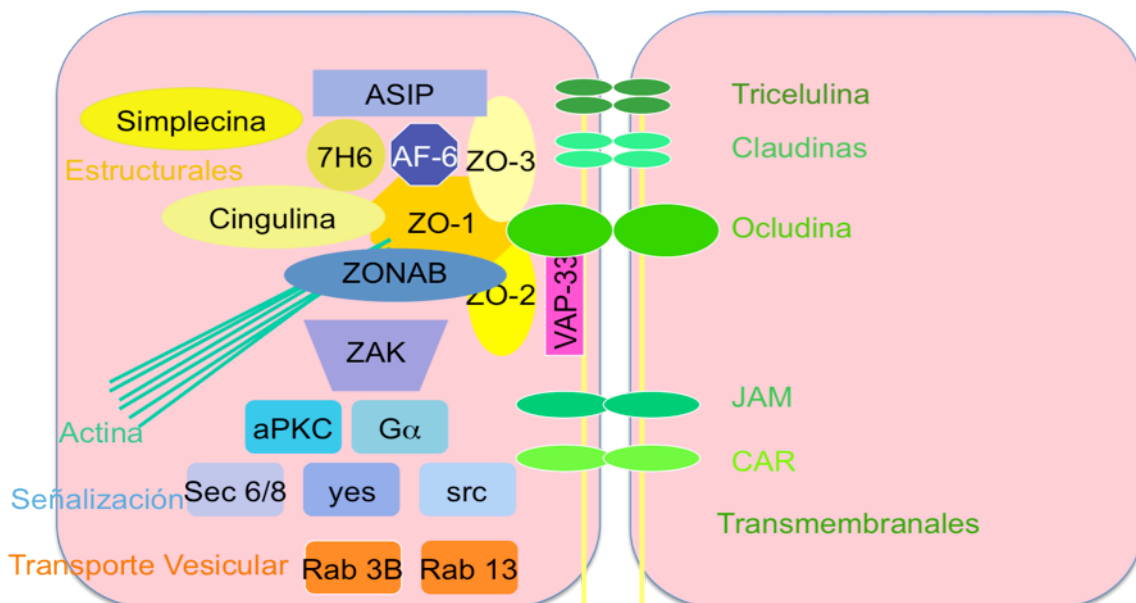


Figura 4. Composición molecular de las Uniones Estrechas (modificado¹⁷).

Proteínas transmembranales

JAM

JAM es una familia de glicoproteínas, cuyo peso molecular es de 43 kDa. Pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas que median la adhesión independiente del Ca^{2+} . Tienen tres dominios estructurales: una región extracelular de 215 aminoácidos que contiene dos dominios variables de tipo Ig, un dominio transmembranal, y una cola corta intracelular de 45 aminoácidos que cuenta con un dominio de unión PDZ. Existen cuatro isoformas, JAM-1 que participa en la adhesión celular a través de interacciones homotípicas, JAM-2 se expresa en células endoteliales, JAM-3 se expresa en plaquetas humanas y media las interacciones entre leucocitos y plaquetas y JAM-4 que se localiza en el glomérulo renal en células epiteliales^{13, 17, 19-20}.

Ocludina

Fue el primer componente transmembranal identificado en las UEs. Con un peso molecular aproximado de 60 kDa, ocludina posee cuatro dominios transmembranales, dos asas extracelulares de tamaño similar y tres dominios citoplasmáticos: una asa intracelular corta, una región amino terminal (N-terminal) y una región carboxilo terminal (C-terminal) larga, la cual es rica en residuos de serina, treonina y tirosina, que frecuentemente son fosforilados por diferentes proteínas cinasas. Esta

región se une directamente a ZO-1, que a su vez se asocia con el citoesqueleto de actina. Ambas asas extracelulares están enriquecidas en residuos de tirosina, y en la primera más de la mitad de los residuos son tirosinas y glicinas (Figura 5)^{12, 21-23}.

Tricelulina

Tricelulina se encuentra concentrada principalmente en los contactos tricelulares. Fue la primera proteína descrita en concentraciones notables en las UEs tricelulares en vertebrados. Esta proteína tiene cuatro dominios transmembranales, dos asas extracelulares y su C-terminal tiene un 32% de homología a la de ocludina y su N-terminal la dirige hacia los contactos tricelulares (Figura 5)²⁴.

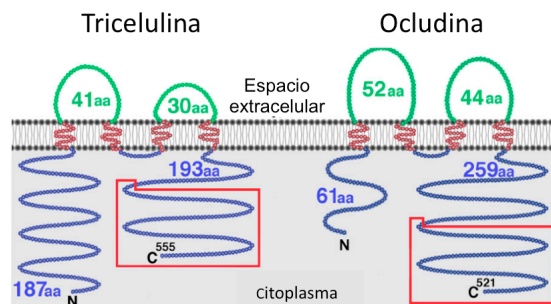


Figura 5. Estructura de tricelulina y ocludina, proteínas de las UEs²⁵.

Estudios recientes en los que se analiza la función fisiológica de tricelulina revelaron que la presencia de la proteína en las UEs bicelulares reduce discontinuidades en las hebras, aumenta la resistencia eléctrica paracelular y disminuye la permeabilidad a los iones

y solutos más grandes sin cambios en la selectividad de iones o preferencia de carga. En los contactos tricelulares, tricelulina específicamente sella las capas de células epiteliales contra el paso de macromoléculas sin afectar significativamente la penetración de iones²⁵⁻²⁶.

Claudinas

Las Claudinas constituyen una familia de proteínas transmembranales de 24 miembros en mamíferos. Tienen un peso molecular que varía entre los 20 a 27 kDa. Se predice que estas proteínas cruzan cuatro veces la membrana plasmática, dejando expuestas dos asas extracelulares. La primer asa con 60 residuos, es importante para la selectividad iónica de la vía paracelular y como correceptor viral, como es el caso de las claudinas -1, -6 y -9 las cuales se ha reportado que son indispensables para la entrada del Virus de la Hepatitis C. Además esta asa presenta dos residuos de cisteína muy conservados que le confieren estabilidad por la formación de un puente disulfuro. La segunda asa extracelular tiene aproximadamente 24 residuos de aminoácidos y se ha reportado que, para el caso de las claudinas -3 y -4, funciona como receptor de toxinas bacterianas como la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (ECP).

Las regiones N-terminal y C-terminal se encuentran expuestos al citosol, siendo el C-terminal importante para determinar la localización de estas proteínas. La región C-terminal se encuentra ampliamente

conservada en los integrantes de esta familia, y contiene sitios de unión a dominios PDZ, con los cuales pueden interactuar con otras proteínas citosólicas como las Zos, la proteína asociada a las UEs (PATJ) y MUPP1, todas estas involucradas en procesos de señalización. La región C-terminal de las claudinas es blanco de modificaciones postraduccionales, que afectan la localización e interacción de las claudinas con otras proteínas. Como la fosforilación, la cual puede presentarse en residuos de serina, treonina y tirosina. Se ha reportado que la fosforilación en residuos de serina y treonina regula su localización membranal y la fosforilación en residuos de tirosina promueve su deslocalización al citosol. Se ha reportado que la fosforilación de las claudinas afecta su localización dentro de la membrana plasmática, lo que provoca cambios en la permeabilidad paracelular. La fosforilación puede ser modulada por la proteína cinasa A (PKA), la proteína cinasa C (PKC), las proteínas activadas por mitógenos (MAPK), entre otras. Por ejemplo, la fosforilación por PKA de claudina -3 y -16, promueve la integración de cludina -16 a las UEs e induce la localización citosólica de claudina -3. Por otro lado, la fosforilación de claudinas -1 y -4, promueve la incorporación de ambas proteínas a las UEs. Otra modificación postraducciona es la palmitoilación, la cual estabiliza su localización en la membrana celular (Figura 6)^{11, 18, 27-30}.

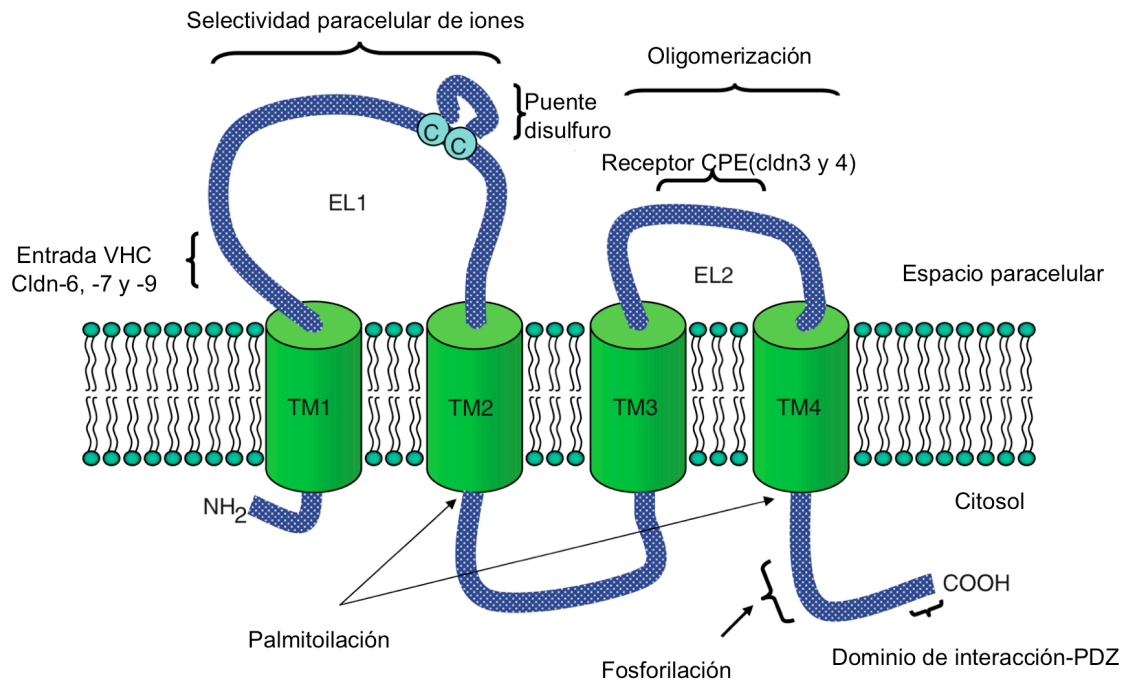


Figura 6. Estructura de las claudinas³⁰.

Hasta ahora se ha demostrado que los epitelios y endotelios expresan una mezcla de diferentes claudinas que es específica para la función de un tejido o de un tipo celular. Las claudinas pueden formar interacciones con proteínas presentes en la membrana plasmática de una misma célula (interacción *cis*) y con claudinas presentes en la membrana de células adyacentes (interacción *trans*). También pueden formar interacciones de tipo homotípicas, entre claudinas del mismo tipo y heterotípicas, entre claudinas diferentes (Figura 7)³¹⁻³². No todas las interacciones heterotípicas son compatibles, por ejemplo claudina -1 se une a claudina -3, pero no a claudina -2, -4 ó -5³³⁻³⁴.

Otras interacciones heterotípicas incompatibles son la claudina -4 con claudina -3 ó claudina -5 y -16 con claudina -19. La razón del por

qué no llevan a cabo estas interacciones son aún desconocidas³⁵.

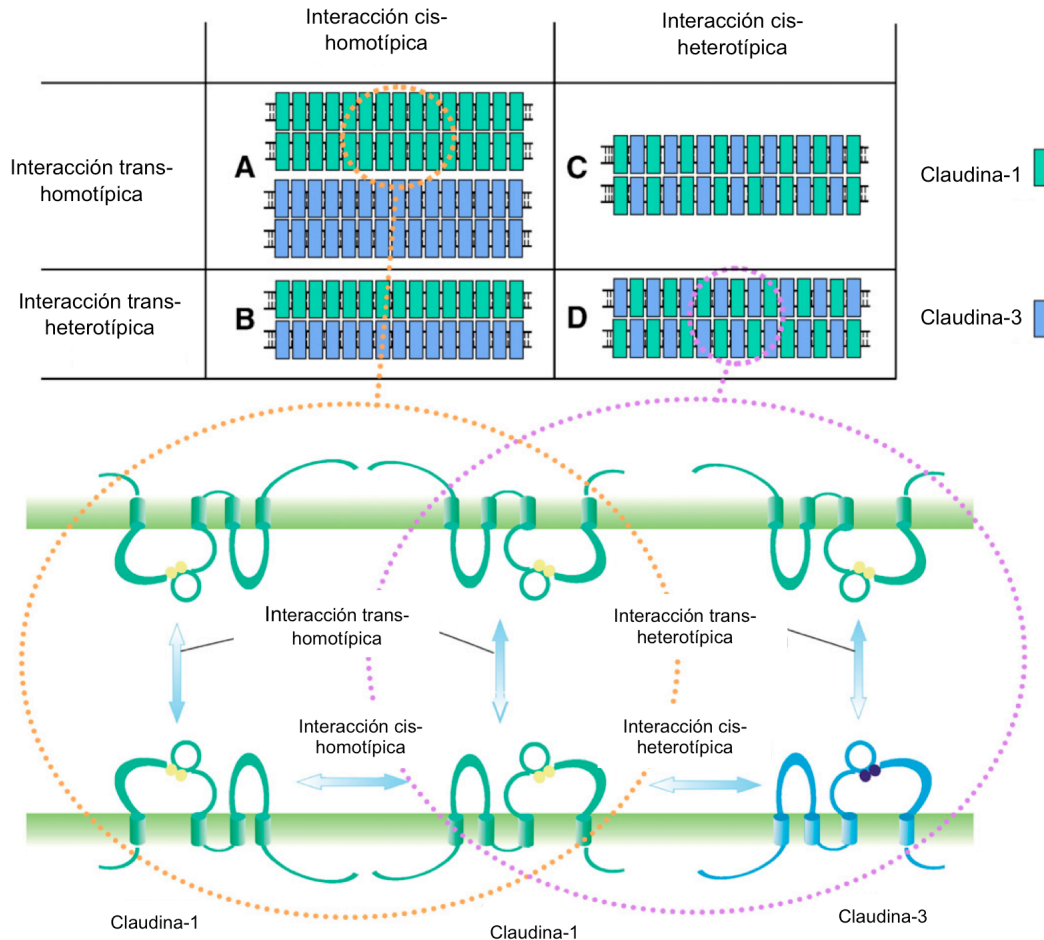


Figura 7. Interacciones de claudinas. Parte inferior: interacciones homofílicas y heterofílicas, -cis y -trans. Parte superior: esquema de hebras de UEs que consisten en A) interacciones -cis y -trans homofílicas, B) interacciones cis homofílica y -trans heterofílica, C) interacciones -cis heterofílicas y -trans homofílicas, y D) interacción -cis y -trans heterofílicas³¹.

Las diferentes interacciones entre las claudinas dan lugar a la formación de poros paracelulares de diferentes diámetros que pueden ir de los 4 a los 50 Å³⁶⁻³⁷. Estudios realizados con diferentes claudinas arrojaron que las claudinas-2 y -10 hacen más laxas las monocapas celulares; mientras que las claudinas-1, -4, -5, -7, -8, -11, -14, -15, -16, -18 y

-19 vuelven más estrechos a los epitelios. Las claudinas -2, -15, -16 y -19 tienen preferencia por los cationes, mientras que la claudina 10a es selectiva a los aniones³⁸.

Claudinas y cáncer

El 90% de los diferentes tipos de cáncer tiene un origen epitelial. Las células tumorales se caracterizan por su descontrol en el crecimiento celular, la pérdida de la diferenciación y de la arquitectura celular. De la misma forma, presentan una función anormal de las UEs con la consecuente disminución de la polaridad celular. La pérdida de la integridad de las UEs puede ser particularmente importante para permitir la difusión de nutrientes y otros factores necesarios para la supervivencia y el crecimiento de las células tumorales. Además, la disminución de la polaridad y la diferenciación puede ser importante para el fenotipo metastásico, donde las células individuales deben abandonar el sitio primario y entrar en los vasos sanguíneos para llegar a sitios distantes³⁹. Se ha encontrado que la expresión de ciertas claudinas se ve alterada en diferentes tipos de cáncer y esta alteración es específica de tejido ya que en algunos casos la misma claudina es silenciada y en otros se sobreexpresa⁴⁰⁻⁴¹.

La alteración de la función de las UEs está reflejada en el aumento y/o disminución de la expresión de las claudinas en la membrana celular, y como consecuencia en la distribución subcelular⁴². Se ha

encontrado que claudina -7 se ve disminuida en cáncer de cabeza, cuello y mama. Por otro lado, claudina -3 y -4 son frecuentemente elevadas en cáncer de páncreas, próstata, ovario y de mama mientras que en hepatocarcinoma disminuye la expresión de claudina -4 y -5. La expresión de claudina -2 y -7 es indetectable en epitelio escamoso cervical, sin embargo en neoplasia cervical es aumentada¹⁵. En la Tabla I se muestran reportes acerca de la expresión y localización alterada de diferentes claudinas en distintos tumores humanos⁴³.

Tabla I. Expresión de claudinas en diferentes tipos de tumores¹⁶

	NEOPLASIA	EXPRESIÓN	LOCALIZACIÓN
Cldn-1	Colon	↑	Citoplasma
	Mama	↓	ND
	Esófago de Barret	↓	ND
	Cervix	↑	ND
Cldn-3	Ovario	↑	Membrana plasmática y citoplasma
	Próstata	↑	¿? Difuso
	Mama	↑	ND
Cldn-4	Ovario	↑	Membrana plasmática y citoplasma
	Páncreas	↑	Membrana plasmática
	Estómago	↓	ND
	Mama	↑	ND
	Próstata	↑	ND
Cldn-6	Glándula mamaria	↓	ND
Cldn-7	Cabeza y cuello	↓	ND
	Mama	↓	Membrana plasmática
	Esófago (fenotipo invasivo)	↓	Membrana plasmática
	Estómago	↑	ND
	Cervix	↑	ND
Cldn-10	Hígado	↑	ND
	Tiroides	↑	ND
Cldn-16	Ovario	↑	ND
Cldn-23	Estómago	↓	ND
	Mama	↓	ND
	Páncreas	↓	ND

ND: No Determinado

Migración, proliferación y apoptosis

La adhesión celular es esencial para la organización del epitelio en un tejido y para la regulación de procesos celulares tales como la diferenciación, la expresión génica, la motilidad, el crecimiento, la proliferación celular y muerte celular⁴⁴.

Durante el proceso de invasión y metástasis ocurren cambios en el acoplamiento de las células con su microambiente y la activación de proteasas extracelulares. Por ejemplo, se encuentra ampliamente estudiado el papel que juegan algunas proteínas involucradas en la adhesión célula-célula, como la E-caderina, la cual está inhibida o desaparece en la mayoría de los cánceres epiteliales, permitiendo la transmisión de señales que inhiben el crecimiento⁴⁵.

Poco se sabe sobre el papel que tienen las proteínas de las UEs en estos procesos, aunque se ha reportado la asociación de los cambios en la expresión y localización de algunas claudinas con fenotipos más invasivos de diferentes tipos de cáncer. Claudina -4 es un potente inhibidor de la invasividad en células de cáncer de páncreas, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*, donde este efecto fue morfológicamente asociado con el incremento de la formación de UEs entre las células tumorales⁴⁶⁻⁴⁷.

La invasividad de células derivadas de tumor primario y metástasis de cáncer de colon, se asocia con el aumento de la expresión de claudina -1 y su deslocalización de la membrana plasmática al citoplasma y núcleo⁴⁵. La sobreexpresión de claudina -7 en células de cáncer de ovario, promueven la invasividad y por otro lado disminuyen la migración celular⁴⁷.

La vida de la mayoría de las células se mantiene principalmente por las señales de sobrevivencia generadas por las interacciones célula-matriz extracelular y célula-célula. Uno de los eventos en los cuales una célula normal muestra pérdida de estas uniones es durante la muerte celular programada o apoptosis. Durante la apoptosis se activan una serie de proteasas, denominadas caspasas, que son importantes en los mecanismos que llevan a la muerte celular promoviendo la destrucción de estructuras, organelos y genoma celular. La expresión de claudina -1 en células tumorales de mama no altera la proliferación celular o la tasa de apoptosis en cultivos en monocapa. Sin embargo, la reexpresión de cludina -1 en células de cáncer de mama da lugar a un aumento de la apoptosis en cultivos tridimensionales, apoyando la hipótesis de que el suministro de nutrientes limitados es una propiedad antitumoral de las UEs funcionales⁴⁸⁻⁴⁹.

Otro estudio en células de cáncer de mama humanas, en tratamientos con tamoxifeno muestra que, claudina -1 tiene un efecto antiapoptótico⁴⁹⁻⁵⁰.

La sobreexpresión de claudina -1 en células de cáncer colorectal, así como de las claudinas -3 y -4 en células de cáncer de ovario aumentan la supervivencia celular al reducir la velocidad de la apoptosis⁵¹. Por otro lado, la sobreexpresión de claudina -1 en células de carcinoma nasofaríngeo reduce la apoptosis en lugar de aumentar la proliferación celular⁵².

Varios informes han demostrado un papel importante para claudina -1 en procesos de metástasis a través de la activación de metaloproteasas, aumento de la migración así como de la supervivencia celular y por otro lado reducción de la tasa de apoptosis⁵³⁻⁵⁴.

Claudinas como marcadores moleculares, diagnóstico y terapia

Se ha sugerido que las claudinas, ya sea solas o en combinación con otras proteínas, pueden ser utilizadas como biomarcadores para la detección, diagnóstico y pronóstico de ciertos tipos de cáncer, como el carcinoma gastrointestinal, principalmente por su capacidad de promover la supervivencia celular, la migración y la invasividad.

Debido a que las claudinas -3 y -4 son altamente expresadas en muchos tipos de cáncer, se han propuesto como posibles blancos terapéuticos para varios tipos de tumores. En xenoinjertos en ratones utilizando células de cáncer de mama que expresan claudinas -3 y -4, se ha observado que el tratamiento con la EPC (enterotoxina de *Clostridium perfringens*) produce una disminución del tumor acompañado por necrosis⁵⁵⁻⁵⁸.

Una alternativa más es la terapia con anticuerpos dirigidos contra la claudina -4 para probar lesiones primarias y metastásicas en cáncer de páncreas, ya que casi el 100% de estos tumores expresan a esta proteína en la membrana, por lo que el desarrollo de inmunoterapias para el tratamiento de esta enfermedad cobra gran importancia. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que debido a que esta claudina se expresa en varios tejidos en condiciones normales, una terapia en contra de la misma podría generar efectos secundarios no deseables⁴⁰.

Planteamiento del problema

Durante la conversión de células normales a células cancerosas los procesos de diferenciación y la polaridad celular se pierden. El fenotipo invasivo se lleva a cabo mediante un proceso llamado “transición epitelio-mesénquima” (EMT), en el cual, se observa una disminución en la adhesión intercelular y un incremento en la motilidad celular. Estas características están asociadas a una pérdida de la polaridad celular, de la diferenciación y de la estructura de las UEs. La alteración continua de las UEs, generada por la sobreexpresión, disminución y cambios en la localización subcelular de las claudinas, permite el libre acceso de factores de crecimiento a regiones basolaterales de la célula manteniendo una señal proliferativa activa favoreciendo el crecimiento continuo de las células.

A la fecha se sabe poco acerca de los mecanismos que regulan la expresión y la localización subcelular de diferentes claudinas, así como el papel que tienen en los procesos de proliferación y migración celular.

Estudios previos en el laboratorio mostraron un aumento en la expresión y cambios en la localización subcelular de las claudinas -6, -7 y -9 en biopsias de adenocarcinoma gástrico humano⁵⁹. Utilizando ensayos *in vitro* donde se sobreexpresaron claudinas -6, -7 ó -9 en células AGS (adenocarcinoma gástrico humano), se observó un

incremento en la velocidad de proliferación, migración e invasividad de esta línea celular, siendo claudina -9 la que tuvo un efecto predominante en los procesos evaluados⁶⁰.

Dado que existen muy pocos estudios en los que se muestra la función de estas proteínas, el presente trabajo pretende determinar si los efectos de la sobreexpresión de claudinas -6, -7 y -9, sobre la proliferación y migración celular se mantienen en líneas celulares de distinto origen. Para ello se utilizarán líneas células derivadas de hepatocitos normales de rata (C9) y derivadas de hepatocarcinoma humano (HepG2).

Hipótesis

La función y la estructura de las UEs se alteran debido a cambios en la expresión y localización de las claudinas. Dado que la sobreexpresión de claudinas -6, -7 y -9 promueve la proliferación y migración de células de adenocarcinoma gástrico humano, nuestra hipótesis es que la sobreexpresión de estas claudinas promoverá los mismos procesos en una línea celular de cáncer hepático.

Objetivos

- Determinar si la sobreexpresión de las claudinas -6, -7 y -9 confiere la capacidad de regeneración de herida de líneas celulares hepáticas.
- Evaluar si la sobreexpresión de estas claudinas promueve la invasividad celular.
- Evaluar si la sobreexpresión de estas claudinas le confiere una ventaja proliferativa a las células.
- Determinar el efecto de la sobreexpresión de claudinas sobre la apoptosis.

Material y métodos

Cultivos celulares

Se utilizó la línea celular derivada de hepatocarcinoma humano, HepG2, y la línea C9 derivada de hígado de rata. Ambas se mantuvieron en medio D-MEM(GIBCO) suplementado con 5% de suero fetal bovino, con 2mM de glutamina, 2mM de piruvato de sodio, 100 U/ml de penicilina/estreptomocina y 0.1 U/ml de insulina, a 37°C en una atmósfera de humedad al 5% de CO₂.

Construcción de vectores pcln6GFP, pcln7GFP y pcln9GFP

A partir del RNA total extraído de la línea celular AGS (Adenocarcinoma Gástrico Humano) y con el Kit Single Step RT-PCR (Invitrogen) se obtuvo el cDNA de las claudinas -6, -7 y -9 empleando los iniciadores correspondientes.

hACTIN forward	5`-TGAAGGTGACAGCAGTCGGTTG-3`
ACTIN reverse	5`-GGCTTTTAGGATGGCAAGGGAC-3`
hCLD6 forward	5`-CAGTGCAGCTCCTCAACC-3`
hCLD6 reverse	5`-CTGTTGGGCACTGCCACTTC-3`
hCLD7 forward	5`-TTTCTGAGGGCGGAAATGGC-3`
hCLD7 reverse	5`-GGCATCTAGACACTCCCATAGC-3`
hCLD9 forward	5`-ATGGCTTCGACCGGCTTAG-3`
hCLD9 reverse	5`-CAGGGCATCTGGTCATCAGG-3`

Se colocaron 10µl de la mezcla de reacción, 0.5µl de Iniciador A 10µM, 0.5µl de Iniciador B 10 µM, 2.5µl de RNA 0.1 µg/µL, 0.4µl de RT/Taq, 6.1µl de H₂O por reacción 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) ó 59.7°C (cldn9) por 30 seg, 72°C por 40 seg, y 7 min a 72°C. Para construir cada vector se tomaron 4µl del producto obtenido de RT-PCR y se incubaron con 1µl del vector TOPO pcDNA3.1/NT-GFP y 1µl de la solución salina por 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente 20 minutos a 4°C. Se transformaron células de *Escherichia coli* DH5α competentes con 2µl 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 *Pst*I para las construcciones denominadas pcldn9GFP y pcldn7GFP y las enzimas *Xcm*I y *Eco*RV para la construcción pcldn6GFP. Se secuenciaron las construcciones obtenidas para verificar la integridad de la secuencia.

Transfección de líneas celulares

Para obtener líneas celulares que sobreexpresaran a las claudinas en estudio, se sembraron células en placas de 6 pozos (8×10^5 células/pozo) hasta alcanzar un 80% de confluencia. Se lavaron dos veces con PBS y se cambió el medio por Opti-Mem (GIBCO). La transfección se llevó a cabo utilizando una mezcla de las construcciones previamente descritas con Lipofectamina 2000 de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Invitrogen). Las células fueron mantenidas por siete días en D-MEM(GIBCO) suplementado con 5% de suero fetal bovino, con 2mM de glutamina, 2mM de piruvato de sodio, 100 U/ml de penicilina/estreptomicina, 0.1 U/ml de insulina y 700 μ g/ml de G-418.

Fraccionamiento celular y Western blot

Para confirmar la sobreexpresión y la localización de las claudinas 6, 7 y 9, se realizó un fraccionamiento celular. Para ello se sembraron células hasta alcanzar confluencia, se lavaron con PBS frío y se resuspendieron en 1ml de amortiguador A (Tris 20 mM, Dextrosa 0.25 M, EGTA 10 mM, EDTA 2 mM, pH 7.5), + inhibidores de proteasas (Leupeptina 20 μ g/ml e inhibidor de Tripsina 1 mg/ml) y cocteles de inhibidores de fosfatasa I y II (SIGMA). Las suspensiones se sonicaron y se centrifugaron a 39,000 rpm (156,553 x g), por 30 min a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos (fracción

citoplasmática) se colocaron en tubos nuevos. El precipitado se resuspendió en 150 µl de amortiguador A con los inhibidores antes mencionados adicionado con 1% de Tritón X-100 y se incubó durante 1 h a 4°C en agitación suave. Posteriormente se centrifugó nuevamente a 39,000 rpm, 30 minutos a 4°C. Se colocó el sobrenadante (fracción membranosa) en tubos nuevos. Se resuspendió el precipitado en 150 µl de amortiguador de lisis (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, IGEPAL 1%, SDS 0.1% y Desoxicolato de Sodio 0.1%) con los mismos inhibidores de proteasas y fosfatasa. Se incubó por 1 h a 4°C con agitación suave y se centrifugó por a 39,000 rpm, 30 min a 4°C. El sobrenadante resultante (fracción de citoesqueleto) se colocó en tubos nuevos previamente marcados y colocados en hielo. Se tomaron alícuotas para determinar la concentración de proteína empleando el kit de determinación de proteína de BioRad.

La detección de las claudinas se evaluó mediante ensayos de Western blot en los que se cargaron 25 µg de proteína en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con 5% de leche libre de grasas en TBS durante 1 h y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes a las claudinas 6, 7 y 9 durante toda la noche a 4°C en agitación suave. Al día siguiente se hicieron 3 lavados con TTBS por 10 min cada uno y se incubaron las membranas

con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. La detección se llevó a cabo mediante el método de quimiluminiscencia con los reactivos del kit PIERCE (*Supersignal West Dura Extended Duration Substrate*).

Microscopia confocal

Con la finalidad de observar la localización de las claudinas sobreexpresadas en las líneas se utilizó microscopía confocal, se crecieron células transfectadas en cubreobjetos a 90% de confluencia, se lavaron con PBS frío dos veces, después se fijaron con metanol absoluto frío durante 10 min y posteriormente se fijaron con metanol absoluto frío a -20°C y se montaron en portaobjetos para su observación.

Ensayo de invasividad en cámaras de matrigel

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de las claudinas sobre la capacidad invasiva de las líneas celulares, se realizaron ensayos de invasividad en cámaras de matrigel. Antes de iniciar el trabajo con las células, los insertos con matrigel se rehidrataron adicionando 0.5ml de medio a temperatura ambiente y se incubaron durante 2h a 37°C y 5% de CO_2 . En placas de 24 pozos se adicionaron 750 μl de medio con 5% de SFB a cada pozo para servir como quimioatrayente. Se colocó un inserto por pozo se sembraron 2.5×10^4 de células en el pozo. La placa se

incubó 36h a 37°C y 5% de CO₂ para permitir la migración de las células. Las células que no migraron y el matrigel se removieron tallando ligeramente con un hisopo. Las células que migraron se fijaron con metanol y se detectaron en la membrana del inserto con azul de toluidina al 1%. Posteriormente se cortó la membrana del inserto y se montó en portaobjetos para contar las células presentes en 3 campos diferentes.

Ensayo de regeneración de herida

Para determinar si la sobreexpresión de las claudinas promovía la migración celular, se sembraron 1×10^5 células transfectadas en placas de seis pozos y se incubaron hasta alcanzar confluencia. Posteriormente se realizó una herida con la punta de una micropipeta, se midió la distancia entre la separación de las células de tres campos diferentes y nuevamente se incubaron para evaluar la migración celular mediante la regeneración de la zona afectada. Los resultados fueron registrados mediante toma fotográfica a diferentes tiempos.

Ensayo de proliferación celular

Para evaluar la velocidad de proliferación de las células transfectadas se empleó el *kit BrdU Cell Proliferation* (Calbiochem). Para ello se colocaron 10 µl de una suspensión de 1×10^4 células/ml de células

HepG2 ó C9 en placas de 96 pozos y se incubaron durante 4 h para permitir su adhesión. Después de este tiempo se adicionaron 20 µl de la solución de BrdU y se incubaron las placas por 30 min a temperatura ambiente. Después se adicionaron 100 µl del anticuerpo secundario acoplado a peroxidada (1:1000) y se incubó por 30 min más. Se retiró y se lavó el exceso de anticuerpo, se reveló y se detectó la cantidad de BrdU incorporada midiendo a 490 nm.

Ensayo de apoptosis

Para determinar si la sobreexpresión de claudinas inhibe los procesos de apoptosis, se utilizó el kit *Annexin V-Cy3 Apoptosis Detection* siguiendo las indicaciones proporcionadas por el distribuidor.

Se sembraron 1×10^5 células, se hicieron lavados con PBS y se despegaron. Posteriormente se resuspendieron en 500 µl de buffer 1X y 5 µl de annexin V-Cy3 y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para inducir la apoptosis en las células, se expusieron a rayos UV durante 20 minutos, las muestras se analizarón por citometría de flujo inmediatamente.

Análisis estadístico. Todos los valores se expresan como promedio \pm desviación estándar (SD). Para evaluar si las diferencias observadas entre dos grupos eran significativas se empleó un análisis de T- de Student.

Resultados

Análisis de la expresión de claudinas endógenas

En primera instancia se analizó la expresión de las claudinas -6, -7 y -9 se de manera endógena en las líneas celulares C9 y HepG2. Como puede observarse en la Figura 8, lisados totales de ambas líneas celulares muestran la expresión de claudinas -6, -7 y -9. Cabe señalar que la línea celular HepG2 muestra una expresión muy baja de claudina-6.

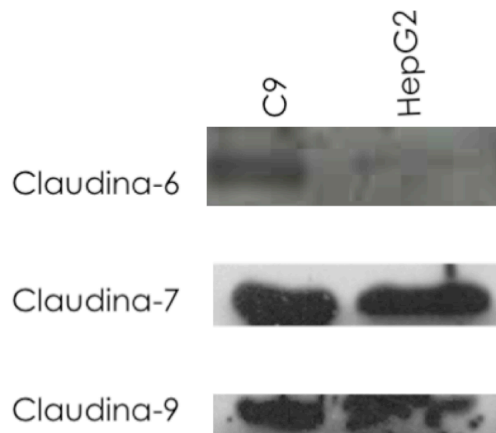


Figura 8. Expresión de las claudinas -6, -7 y -9 en células C9 y HepG2. Análisis por Western blot de lisados totales de ambas líneas celulares.

Pocos son los estudios en los que se muestra una expresión constitutiva de las claudinas-6 y -9. Esta se ha evidenciado en pocas líneas celulares y su expresión se ha observado en el citosol. Se acepta que estas claudinas tienen una expresión restringida al desarrollo embrionario y la vida fetal, disminuyendo su expresión en la etapa posnatal y adulta⁶¹.

Debido a que no existen reportes en los que se muestre cuál es la localización subcelular de estas claudinas en las líneas celulares utilizadas, se realizó un fraccionamiento celular en el que se obtuvieron fracciones de citosol, membrana y citoesqueleto y se evaluó la expresión mediante ensayos de Western blot con anticuerpos específicos. Como lo muestra la Figura 9, la línea celular C9 muestra la expresión de claudinas -6 y -9 en las tres fracciones subcelulares y claudina -7 solo se detectó en la fracción de citosol y citoesqueleto.

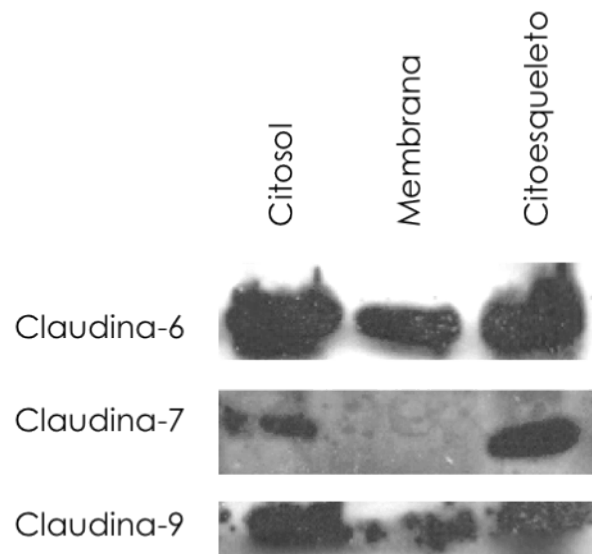


Figura 9. Expresión de claudinas en fracciones subcelulares de la línea celular C9. Se muestra el análisis por Western blot de las fracciones subcelulares obtenidas, marcadas como citosol, membrana y citoesqueleto.

Las células HepG2 expresan claudinas -7 y -9 en las fracciones de citosol y citoesqueleto (Figura 10). Como se mencionó anteriormente, estos resultados están de acuerdo con lo publicado donde se muestra

la expresión citosólica evidenciada en biopsias de carcinoma de células escamosas, cáncer de mama y carcinoma hepatocelular⁶²⁻⁶⁴.

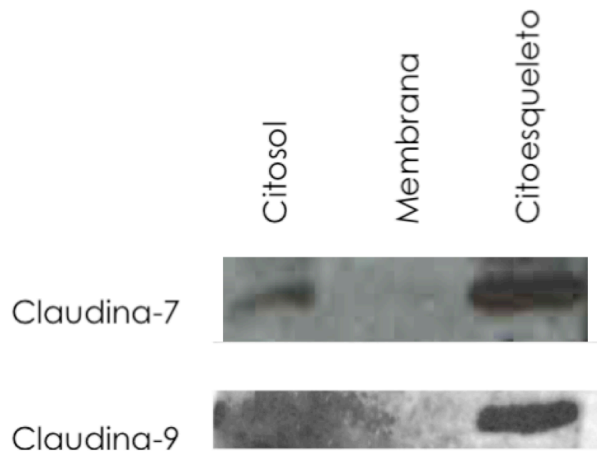


Figura 10. Expresión de claudinas -7 y -9 en fracciones subcelulares de células HepG2. Se muestra el análisis por Western blot en las fracciones de citosol, membrana y citoesqueleto.

Sobreexpresión de claudinas -6, -7 y -9

Para promover la sobreexpresión de las claudinas, se transfectaron las líneas celulares C9 y HepG2, con las construcciones de pcDNA3.1/cldn6, 7 ó 9NT-GFP. Una vez seleccionadas, se corroboró la expresión por RT-PCR, microscopía confocal y Western blot.

En las figuras 11 y 12 se muestra el incremento en los niveles de RNAm de las claudinas -6, -7 y -9 en las líneas transfectadas.

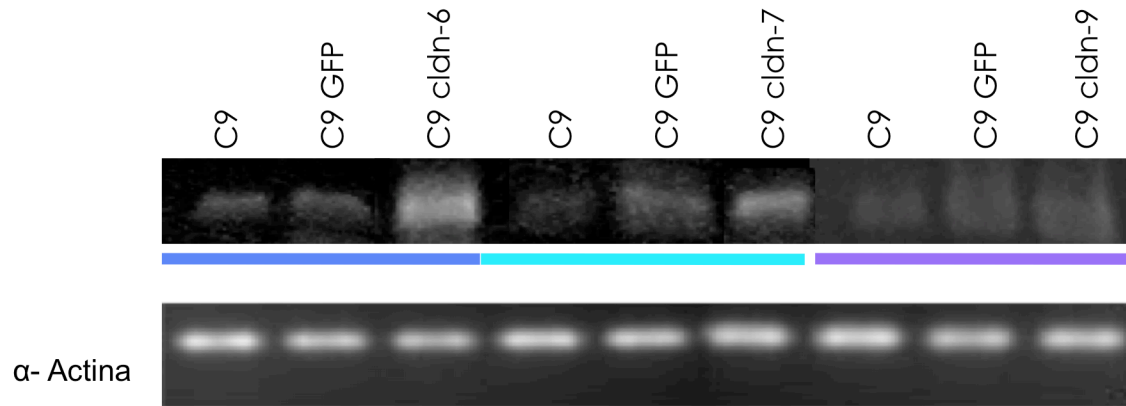


Figura 11. Detección de los niveles de RNAm de claudinas sobreexpresadas en células C9. RT-PCR empleando RNA total extraído de las células control sin transfectar (C9), de células control con el vector vacío (C9 GFP) y de las células transfectadas con el vector específico de cada claudina.

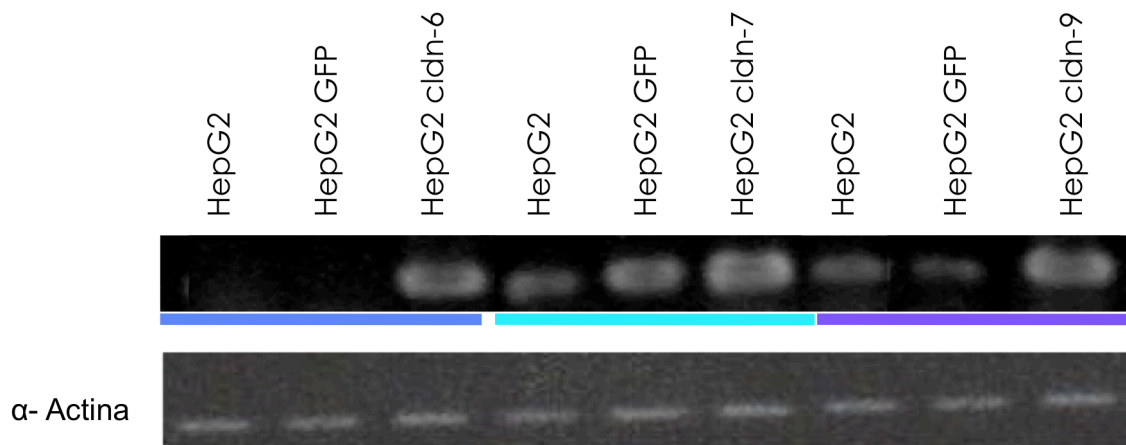
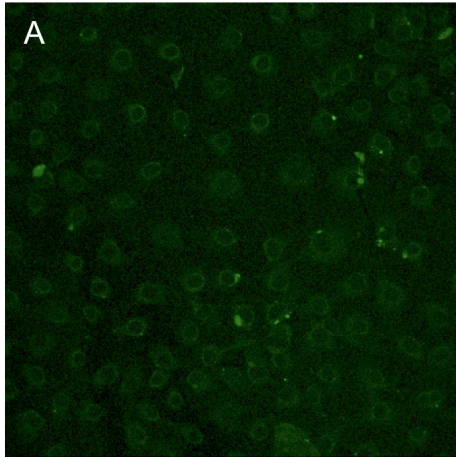


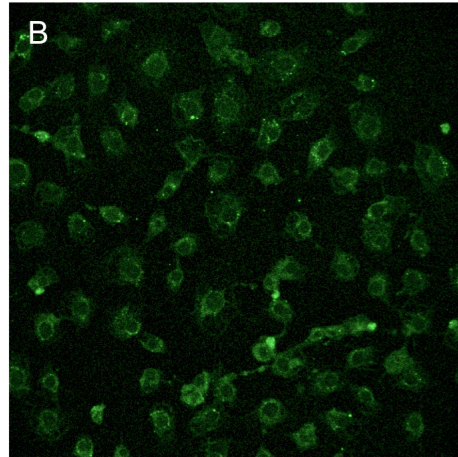
Figura 12. Detección de los niveles de RNAm de claudinas sobreexpresadas en células HepG2. RT-PCR empleando RNA total extraído de las células control sin transfectar (HepG2), de células control con el vector vacío (HepG2 GFP) y de las células transfectadas con el vector específico de cada claudina.

Para determinar la localización celular de las claudinas transfectadas, se realizaron ensayos de Inmunofluorescencia. Las figuras 13 y 14

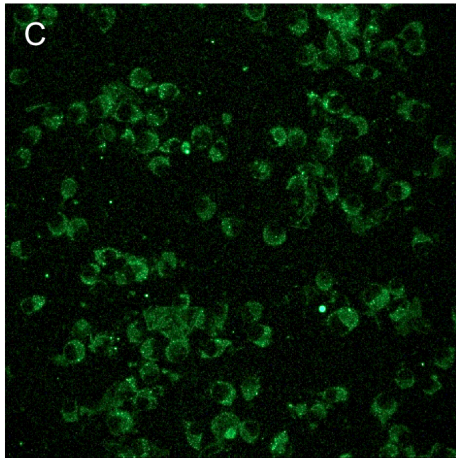
muestran que la expresión de las claudinas transfectadas está confinada principalmente a nivel de citosol en ambas líneas celulares.



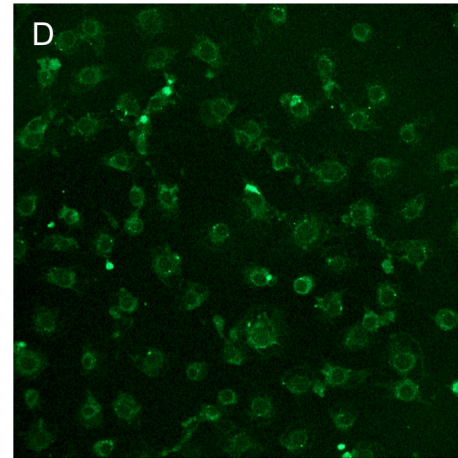
C9 GFP



C9 CLDN-6



C9 CLDN-7



C9 CLDN-9

Figura 13. Sobreexpresión de claudinas -6, -7 y -9. Imágenes de microscopía confocal (40X) en las que se muestra la expresión y localización de las claudinas acopladas a la proteína verde fluorescente (GFP) transfectadas en las células C9.

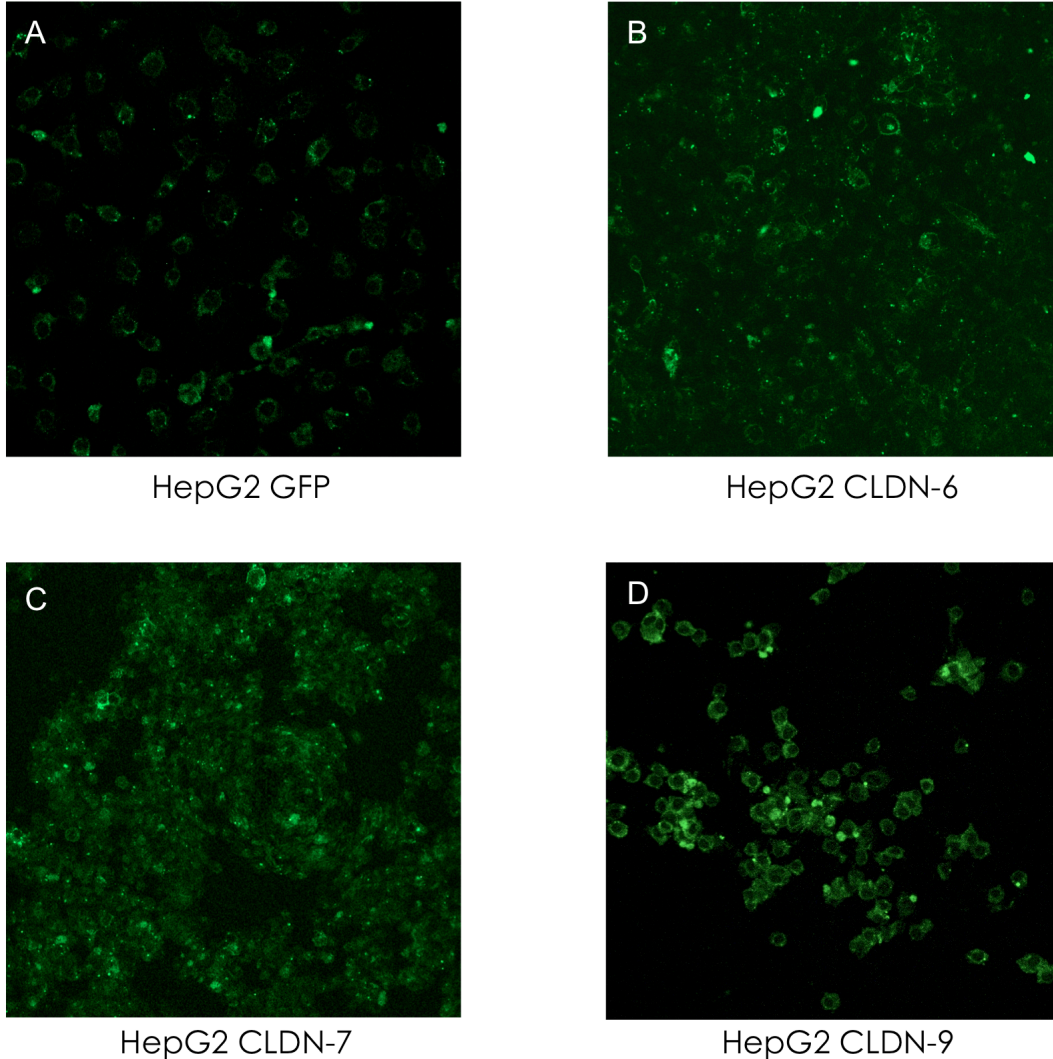


Figura 14. Sobreexpresión de claudinas -6, -7 y -9. Imágenes de microscopía confocal (40X) en las que se muestra la expresión y localización de las claudinas acopladas a la proteína verde fluorescente (GFP) transfectadas en las células HepG2.

Esto coincide con estudios previos en los que se muestra que la sobreexpresión de claudinas promueve su deslocalización⁶⁰. Cabe mencionar que la línea celular HepG2 no forma monocapas sino que crece como cúmulos sobrelapados, por lo que es difícil determinar el nivel de expresión de cada claudina. Tomando en cuenta lo anterior,

las imágenes en la figura 14 sugieren una baja expresión para la claudina -6 a diferencia de las claudinas -7 y -9.

Las figuras 15 y 16 muestran los ensayos de Western blot de lisados obtenidos de las células C9 y HepG2 transfectadas utilizando anticuerpos específicos para las claudinas -6, -7 y -9. En las figuras 17 y 18 se muestran los resultados utilizando un anticuerpo contra la GFP acoplada a cada una de las claudinas.

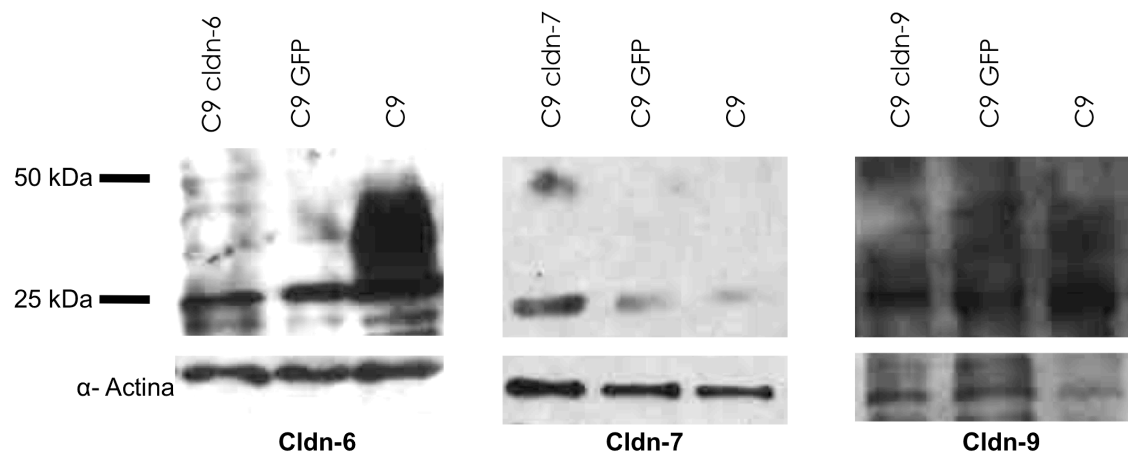


Figura 15. Expresión de las claudinas transfectadas en las células C9. Ensayos de Western blot en los que se detecta una banda de alrededor de 50 kDa (claudinas fusionadas a la GFP), y una banda de 25 kDa (claudinas endógenas). En las células transfectadas con el vector vacío (C9 GFP), así como las células control sin transfectar sólo se observa la claudina endógena.

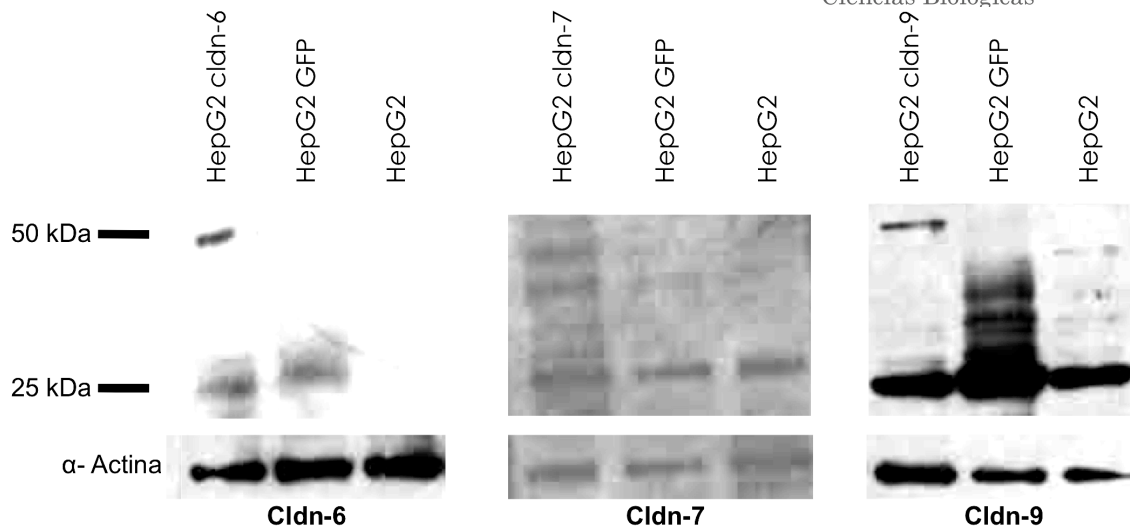


Figura 16. Expresión de las claudinas transfectadas en las células HepG2.

Ensayos de Western blot en los que se detecta una banda de alrededor de 50 kDa (claudinas fusionadas a la GFP), y una banda de 25 kDa (claudinas endógenas). En las células transfectadas con el vector vacío (HepG2 GFP), así como las células control sin transfectar sólo se observa la claudina endógena.

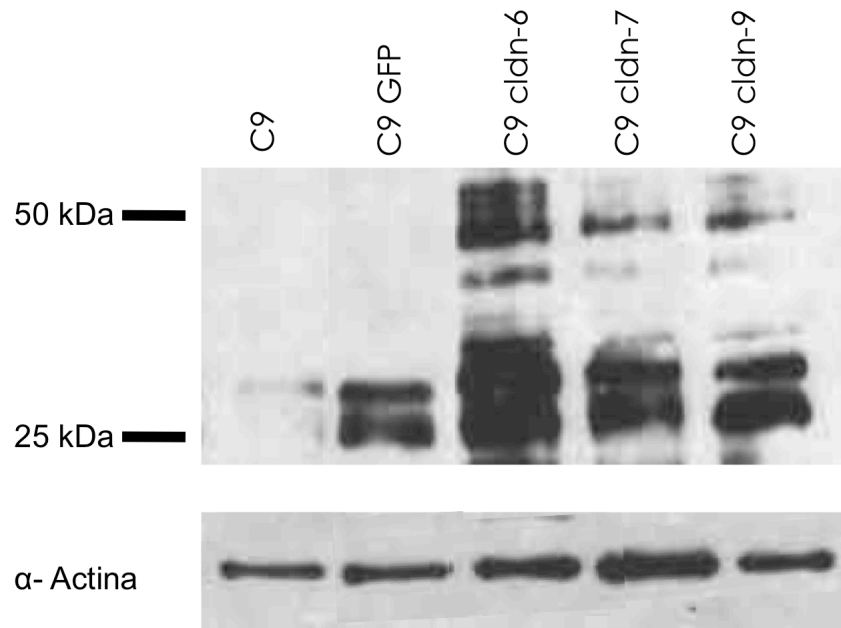


Figura 17. Detección de las claudinas transfectadas en las células C9 mediante Western blot usando un anticuerpo contra la GFP. El análisis de extractos totales mostró una banda de alrededor de 50 kDa (claudinas exógenas fusionadas con la GFP) y una de alrededor de 25 kDa en las células transfectadas con el vector vacío (C9 GFP) correspondiente a la GFP. Las células control sin transfectar no expresan esta proteína.

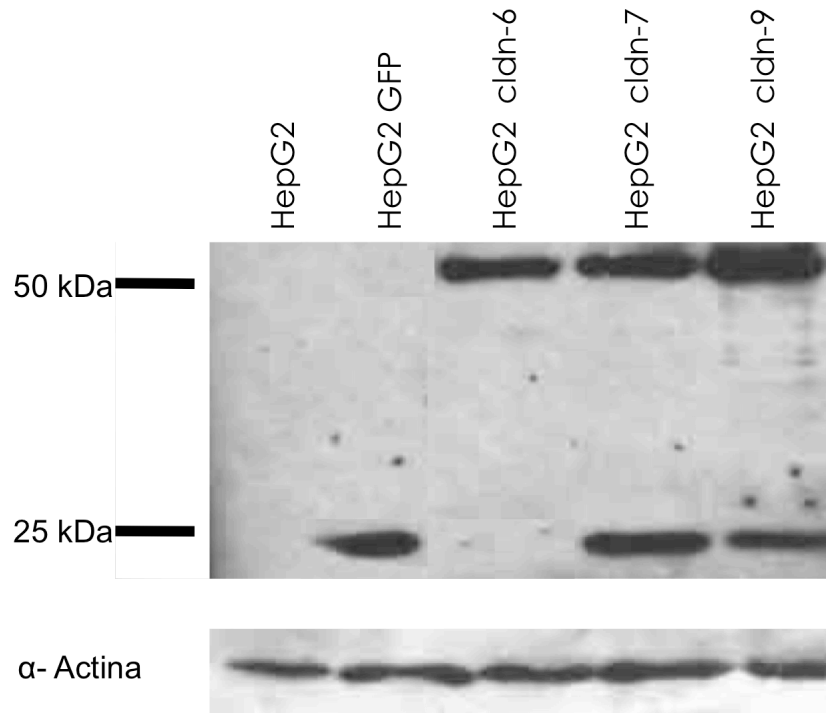


Figura 18. Detección de las claudinas transfectadas en las células HepG2 mediante Western blot usando anticuerpo contra la GFP. El análisis de extractos totales mostró una banda de alrededor de 50 kDa (claudinas exógenas fusionadas con la GFP) y una de alrededor de 25 kDa en las células transfectadas con el vector vacío (HepG2 GFP) correspondiente a la GFP. Las células control sin transfectar no expresan esta proteína.

Cabe mencionar que los anticuerpos comerciales utilizados contra cada una de las claudinas en estudio son anticuerpos policlonales que se generaron en cabra, por lo que las señales que se obtienen en ensayos por Western blot son muy poco confiables. Por lo anterior se realizaron los mismos ensayos utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la GFP. Las bandas obtenidas con los anticuerpos anti-GFP mostraron que para todas las células transfectadas se revela una banda de 50 kDa equivalente a la proteína de fusión GFP-claudina. Por lo anterior, aún cuando los resultados obtenidos con los anticuerpos específicos contra las claudinas no fueron claros, estos resultados confirman que ambas líneas celulares expresan a las proteínas de interés.

Efecto de la sobreexpresión de las claudinas en la migración de las células C9

Para evaluar si la sobreexpresión de las claudinas promueve la migración celular, se realizó el ensayo de regeneración de herida únicamente en las células C9 ya que las HepG2 no tienen esa capacidad. A diferencia de lo reportado con las células AGS transfectadas con las mismas claudinas, los resultados obtenidos mostraron que la sobreexpresión de las claudinas-7 y -9 promueve la migración celular ya que después de 6 h de haber hecho la lesión, las células ya poblaron la zona casi en su totalidad, lo que no se observó con la claudina-6 (Figura 19). Los reportes que a la fecha muestran un efecto de claudinas sobre la migración celular utilizan líneas celulares derivadas de diferentes tipos de cáncer. En este estudio las células C9, células normales derivadas de hígado de rata, mostraron un aumento en la migración celular significativo cuando la claudina -9 se encontraba sobreexpresada.

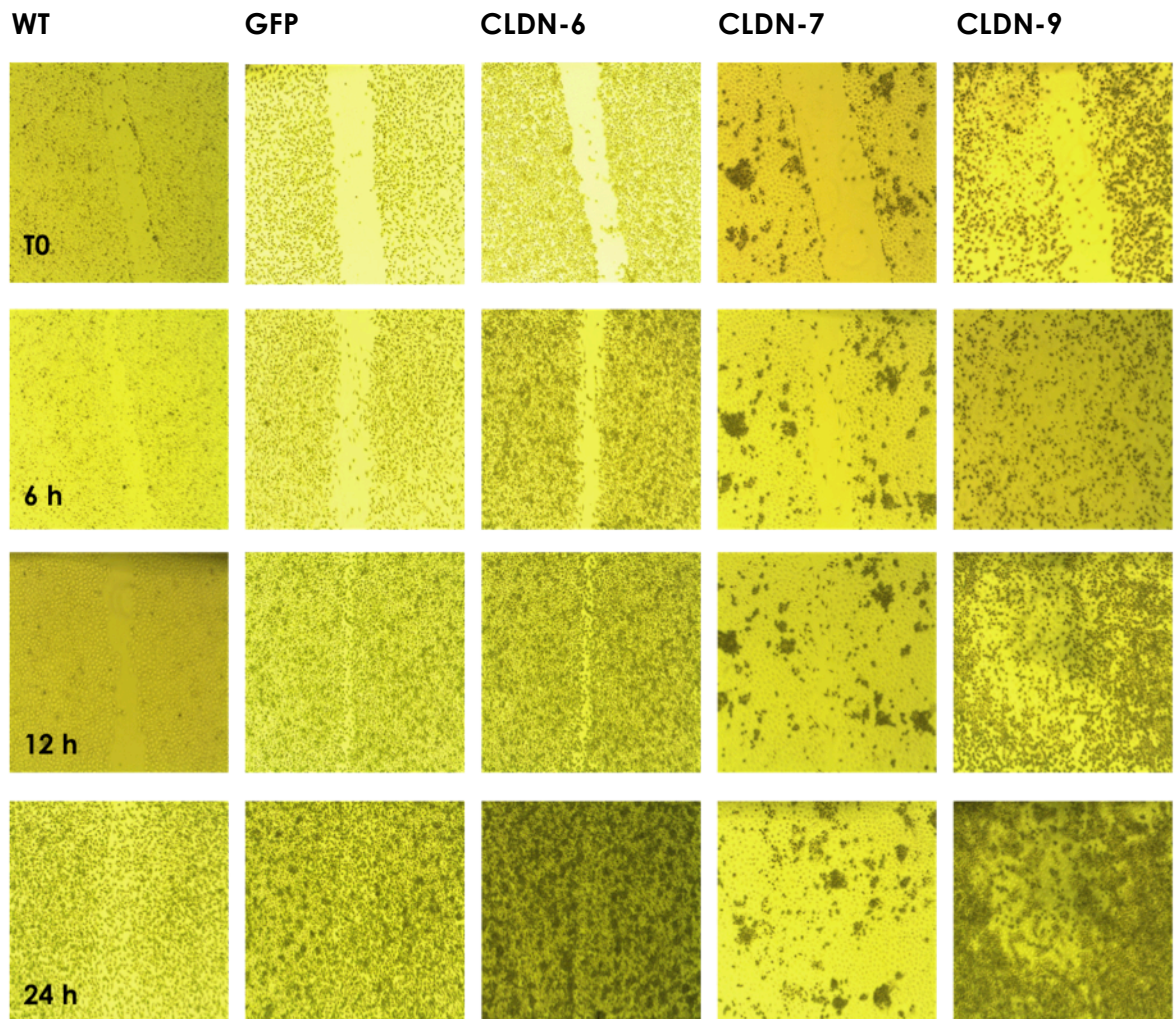


Figura 19. La sobreexpresión de claudina-9 promueve la migración celular en células C9. Las células que sobreexpresan claudina -9 migraron a mayor velocidad que las que sobreexpresan a claudinas-6 y -7.

Efecto de la sobreexpresión de las claudinas en la invasividad de las células C9

La capacidad de invasión de las células transfectadas se evaluó en insertos cubiertos de matrigel, una matriz rica en factores de crecimiento, proteínas de matriz extracelular, inhibidores y enzimas de la degradación de la matriz extracelular (Figura 19 y 20).

Como se puede observar en la figura 20, hubo un aumento en la capacidad de invasión del 50%, 350% y 275%, en las células que sobreexpresan claudinas -6, -7 y -9 respectivamente.

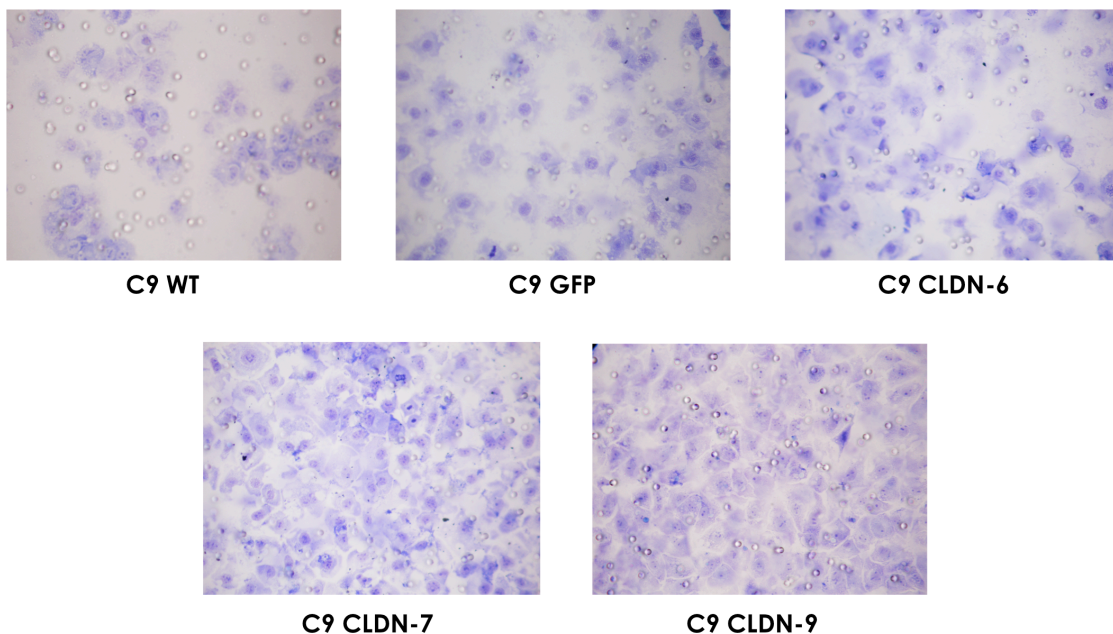
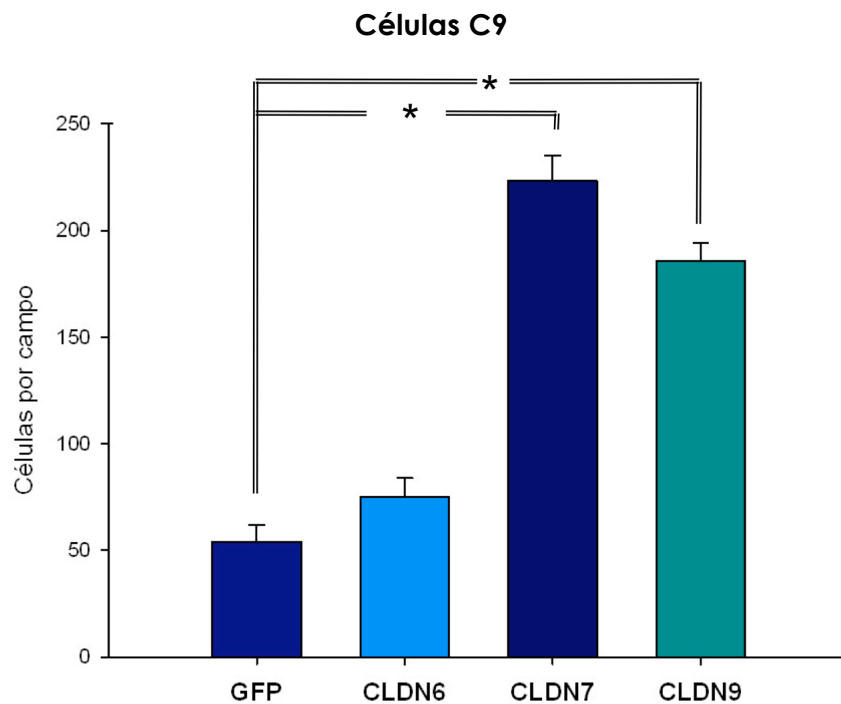


Figura 20. Invasión de Matrigel por las células C9 que sobreexpresan claudinas -6, -7 y -9. La capacidad de invasión de las células que sobreexpresan claudinas -6, -7 y -9 fue mayor que en las células control.



***P=<0.001**

Figura 20. Representación gráfica del efecto de la sobreexpresión de claudinas -6, -7 y -9 sobre la invasividad celular. La invasividad de las células C9 que sobreexpresan a la claudina -7 es tres veces mayor en comparación con las células control. Las células que sobreexpresan claudina -9 también tienen un incremento significativo.

Efecto de la sobreexpresión de las claudinas en la invasividad de las células HepG2

La capacidad de invasión de las células transfectadas se evaluó de la misma manera que para las células C9 (Figura 21). Los resultados obtenidos mostraron que la sobreexpresión de las tres claudinas incrementó significativamente la capacidad de migración celular. Los resultados cuantitativos de estos ensayos (figura 22) muestran que, la sobreexpresión de claudina -9 en estas células aumenta 4 veces la capacidad de invasión con respecto al control.

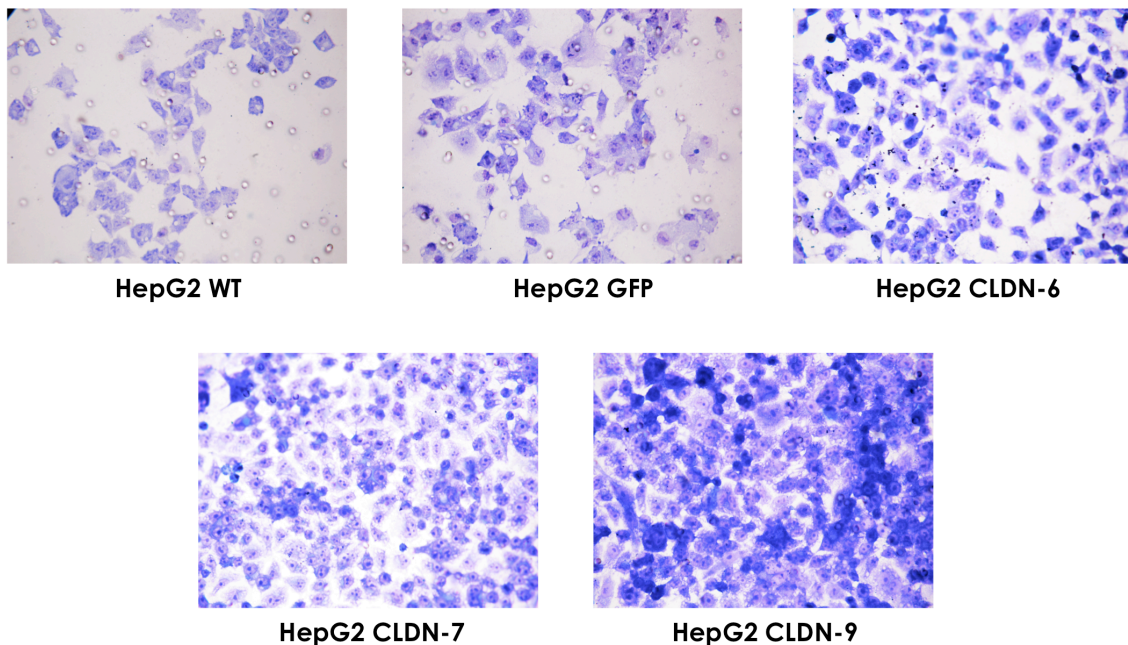
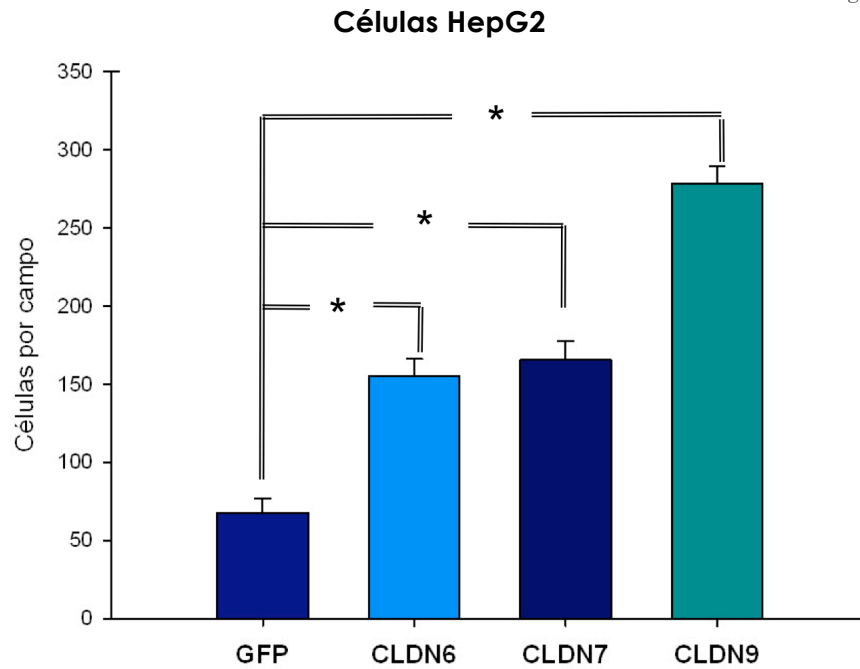


Figura 21. Invasión de Matrigel por las células HepG2 que sobreexpresan claudinas -6, -7 y -9. La capacidad de invasión de las células que sobreexpresan claudinas -6, -7 y -9 fue mayor que en las células control.



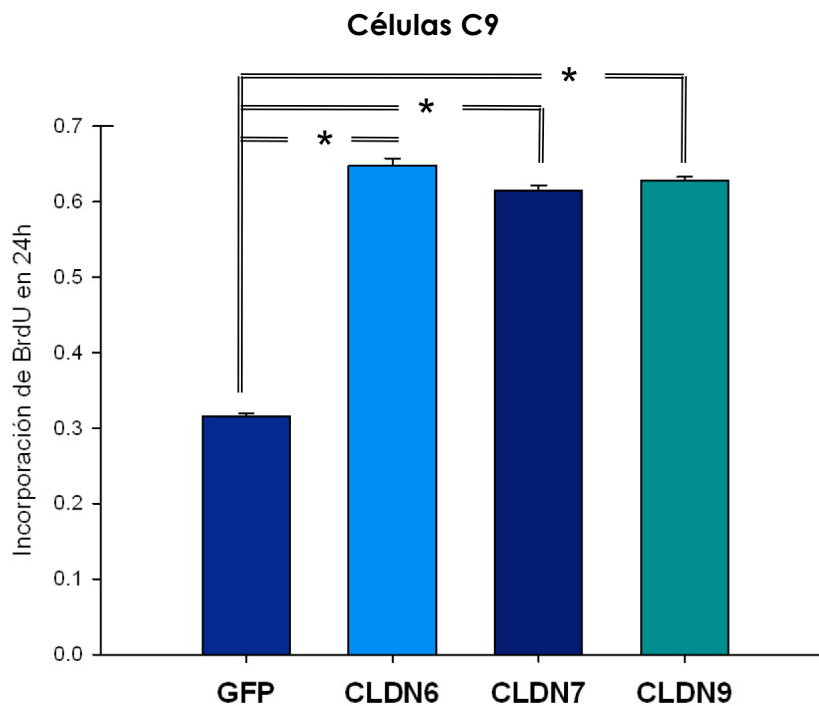
***P=<0.001**

Figura 22. Representación gráfica del efecto de la sobreexpresión de claudinas -6, -7 y -9 sobre la invasividad celular. La invasividad de las células HepG2 que sobreexpresan a la claudina -9 es tres veces mayor en comparación con las células control. Las células que sobreexpresan claudina -6 y -9 también tienen un incremento significativo.

Al igual que para lo reportado en las células AGS, la sobreexpresión de estas claudinas promueve la capacidad de invasión de las células transfectadas⁶⁰. Los mecanismos por medio de los cuales se promueven tales procesos son desconocidos, sin embargo, es importante señalar que claudina-9 tiene un efecto importante en los eventos de proliferación e invasividad celular.

Evaluación de la proliferación de células C9 transfectadas con las claudinas-6, -7 y -9

Dado que la sobreexpresión de estas claudinas promueve la migración y la invasividad celular, se evaluó si había algún efecto sobre la proliferación de estas líneas celulares mediante la incorporación de BrdU partiendo de una misma densidad celular. Como se puede observar en la figura 23, las células transfectadas con claudinas -6, -7 y -9 incrementaron la proliferación 52%, 50% y 50% respectivamente.

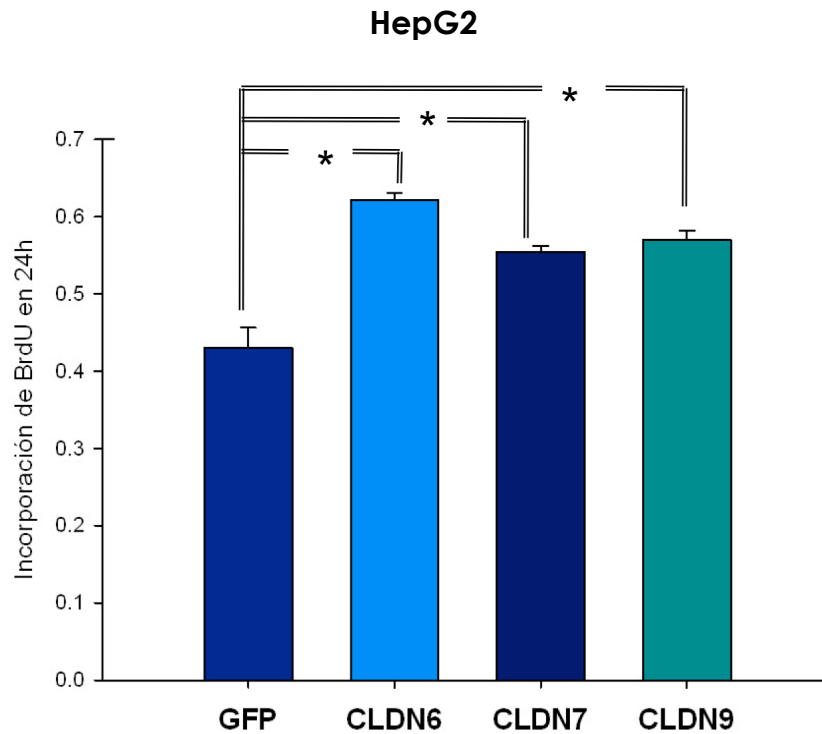


* $P < 0.001$

Figura 23. Proliferación de las células C9 transfectadas con claudinas -6, -7 y -9. La sobreexpresión de las claudinas aumenta la proliferación celular.

Evaluación de la proliferación de células HepG2 transfectadas con las claudinas-6, -7 y -9

Las células HepG2 que sobreexpresan a las claudinas -6, -7 y -9 incrementaron su velocidad de proliferación en un 31%, 22% y 24% respectivamente. En todos los casos el incremento de proliferación fue estadísticamente significativo (Figura 24).



*P=<0.001

Figura 24. Proliferación de las células HepG2 transfectadas con claudinas -6, -7 y -9. La sobreexpresión de las diferentes claudinas aumenta la proliferación celular.

Evaluación de apoptosis de las células C9 y HepG2 transfectadas con claudinas -6, -7 y -9

Debido a que la sobreexpresión de las claudinas-6, -7 o -9 promovió los mecanismos de proliferación e invasión, se decidió evaluar si de la misma forma, esta sobreexpresión confería "resistencia" a las células ante un factor externo de stress que pudiera promover muerte celular. Para ello, ambas líneas celulares se expusieron 20 minutos a rayos UV para inducir la apoptosis y se midieron los efectos de esta exposición utilizando el kit *Annexin V-Cy3 Apoptosis Detection* siguiendo las indicaciones proporcionadas por el distribuidor. Los efectos se midieron por citometría de flujo.

C9

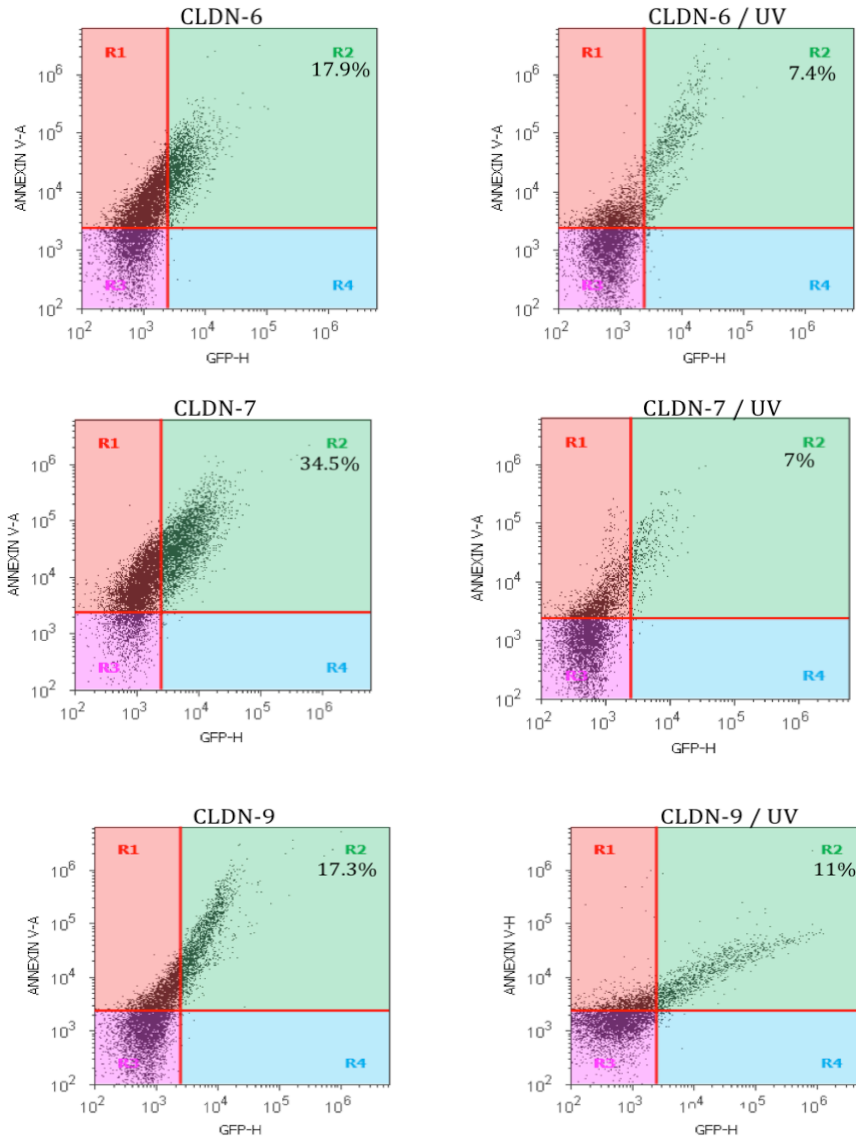


Figura 25. Evaluación de apoptosis en células C9. En el cuadrante R2 se muestra el porcentaje de la población celular que está en apoptosis.

HepG2

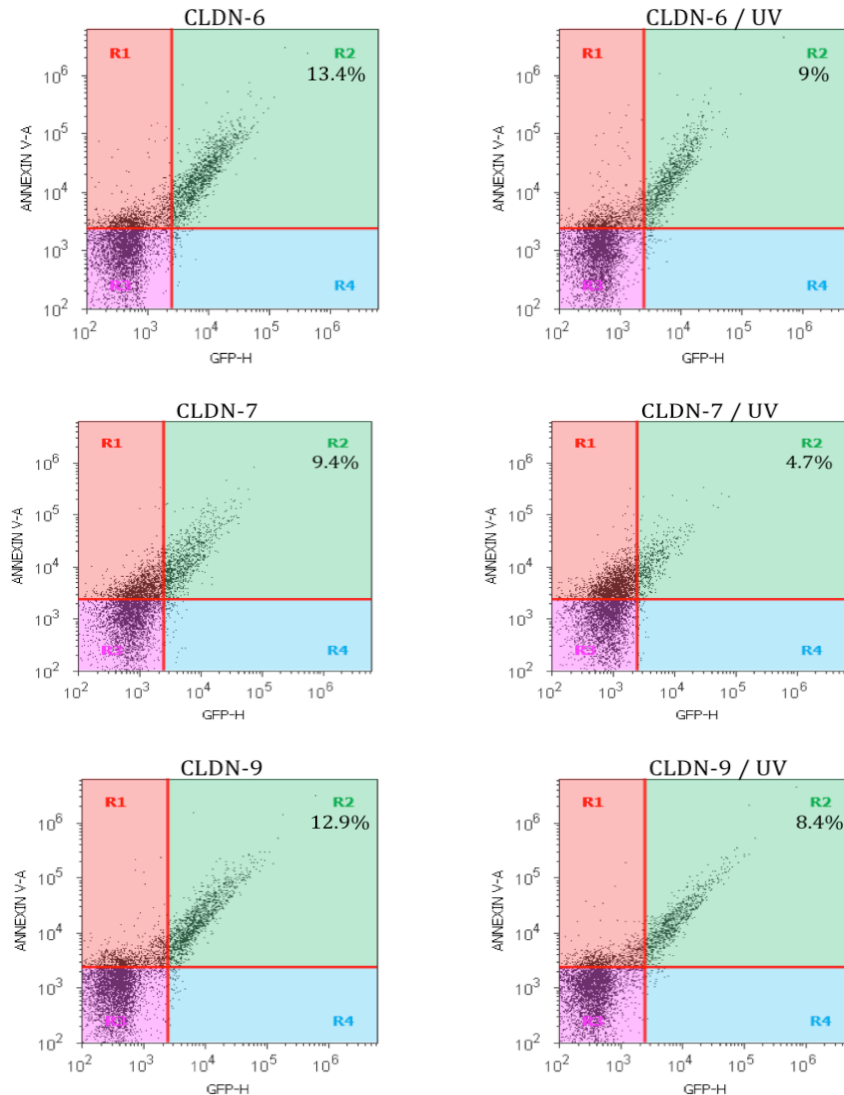


Figura 25. Evaluación de apoptosis en células HepG2. En el cuadrante R2 se muestra el porcentaje de la población celular que está en apoptosis.

En las figuras 24 y 25, se muestran los diagramas de las citometrías de flujo de las células que sobreexpresan claudinas -6, -7 y -9 sin inducción de apoptosis (del lado izquierdo) y los diagramas de las células inducidas a apoptosis (del lado derecho).

Aún cuando no se muestran los resultados con ambas líneas celulares sin transfectar ambas figuras muestran que, al exponer a las células a un factor externo de stress (rayos UV), la expresión de las claudinas “protege”, por algún mecanismo, la cantidad de células que entran en apoptosis. Los datos muestran un efecto mayor para la claudina-7 en las células C9 en donde el porcentaje de células que entran en este proceso se reduce de un 35% a un 7%. Los efectos de “evasión” de apoptosis fueron más evidentes en la línea celular C9 que en la HepG2. Una probable explicación puede ser que la línea celular C9 son células epiteliales normales y las células HepG2 derivan de un hepatoma, por lo que los efectos observados en las células C9 son más evidentes ya que las células HepG2 tienen mecanismos alterados en los cuales las claudinas no pueden ejercer su efecto.

DISCUSIÓN

El alto grado de organización celular observado en los tejidos diferenciados se pierde en diferentes procesos como el cáncer. Esta desorganización se refleja en cambios en la expresión y distribución de proteínas, entre estas, aquellas que están regulando las funciones de las UEs y por ende afectando la polaridad celular. La pérdida de la integridad de las UEs es particularmente importante ya que permiten la difusión de nutrientes y otros factores necesarios para la supervivencia y el crecimiento de las células tumorales. Además, la alteración de estas uniones tiene un papel importante en el control de crecimiento celular, en la pérdida de la polaridad y la diferenciación celular, promoviendo el fenotipo metastásico, donde las células individuales migran y abandonan el sitio primario para entrar en los vasos sanguíneos y llegar a sitios distantes⁵⁸.

A la fecha, se encuentra ampliamente estudiado el papel que juegan algunas proteínas involucradas en la adhesión célula-célula, como la E-cadherina, la cual está inhibida o desaparece en la mayoría de los cánceres epiteliales. Poco se sabe sobre el papel que tienen las proteínas de las UEs en estos procesos, aunque se ha reportado la asociación de los cambios en la expresión y localización de algunas claudinas con fenotipos más invasivos en diferentes tipos de cáncer⁴⁵. Debido a la alta especificidad de los patrones de expresión en el

cáncer de las diferentes claudinas, se ha sugerido que estas proteínas pueden ser utilizadas como posibles marcadores moleculares para el diagnóstico temprano de cáncer. Por ejemplo, un conjunto de cuatro marcadores, incluyendo a claudina-3, se encontró que era suficiente para identificar de forma precisa a 158 tipos de cáncer de ovario, incluyendo ocho tipos de cáncer en estadio temprano. Además, la expresión de claudinas se puede utilizar como un indicador pronóstico, tal es el caso de la disminución de la expresión de claudina-1, la cual se ha demostrado que está asociada con un mal pronóstico de cáncer de colon en estadio II. La expresión de claudina -10 también se ha demostrado que es un factor pronóstico independiente para la recurrencia de carcinoma hepatocelular después de hepatectomía curativa.

En la tumorigénesis las células normales se transforman a células altamente invasivas y proliferativas. Al respecto se ha observado que la expresión de diversas claudinas cambia conforme se desarrolla la capacidad de invasión y migración de las células tumorales⁵⁹. Por ejemplo, la sobreexpresión de claudina -3 y -4 en cáncer de ovario se relaciona con el desarrollo de la capacidad de migración de las células.

El significado de la sobreexpresión de claudinas-6, -7 y -9 en biopsias de adenocarcinoma gástrico humano fue evidenciado en estudios *in vitro* utilizando células AGS. Estos estudios mostraron que la

sobreexpresión de estas claudinas promueve la proliferación, la migración y la invasividad celular⁶⁰. Para determinar si los efectos generados por estas claudinas se encuentran de manera general en diferentes líneas celulares, en este trabajo se utilizaron líneas celulares derivadas de hígado normal (C9) y de hepatoma (HepG2). Nuestras observaciones mostraron que en las células C9 la sobreexpresión de las claudinas -6, -7 -9 incrementó la migración celular, siendo mayor la velocidad de migración en las células que sobreexpresaron claudina -9 ya que el ensayo mostró la regeneración de la herida a las 6 horas. Estos ensayos no se realizaron con la línea celular HepG2 ya que esta línea no crece en monocapa sino en cúmulos.

A la fecha, los reportes que hablan sobre la participación de estas claudinas en la migración celular son escasos. La tumorigenesis involucra un proceso de muchas etapas en las cuales se lleva a cabo la transformación de células normales para hacer que migren e invadan otros tejidos. Este es el caso de la sobreexpresión de claudina-3, la cual estimula la migración de células de cáncer de colon y de claudinas-3 y -4, las cuales aumentan la invasividad de células epiteliales de ovario⁵¹.⁵³. También se ha reportado que la expresión diferencial de claudinas puede promover la invasión y migración celular⁶⁵, sin embargo, los mecanismos que pueda modificar la sobreexpresión de claudinas 6, 7 y 9 en estas células es desconocido.

Al evaluar la capacidad de invasión se observó que la sobreexpresión de claudinas-7 y -9 promovió, de manera significativa, este proceso. En las células HepG2 hubo un incremento significativo en las células transfectadas con las tres claudinas, sin embargo las células que sobreexpresan claudina-9 tienen un mayor efecto, ya que incrementaron 3 veces más la capacidad invasiva. Este efecto coincide con los observados en reportes anteriores utilizando células de cáncer gástrico (AGS)⁶⁰.

Está bien establecido que los cambios en el microambiente iónico de las membranas lateral y apical y la alteración de transportadores de membrana y canales iónicos pueden modificar el pH intracelular y la proliferación celular.

En lo que se refiere a la proliferación celular, la sobreexpresión de las claudinas-6, -7 y -9 incrementó la proliferación en las células C9 en un 52%, 50% y 50% respectivamente (Fig. 23). Este incremento puede asociarse con el aumento en la capacidad invasiva en las células transfectadas con las mismas claudinas.

Por otro lado en la línea celular HepG2 las células transfectadas con las claudinas -6, -7 y -9 el incremento en la proliferación fue de 31%, 22% y 24% respectivamente (Fig. 24). Aún cuando el porcentaje de proliferación fue menor en comparación con la línea C9, en los tres casos fue estadísticamente significativo.

Se ha reportado que, en células de cáncer de mama MCF-7, la sobreexpresión de claudina -6 endógena sensibiliza a las células a entrar en apoptosis ⁶⁶⁻⁶⁷. En otro estudio se observó que la deslocalización de ocludina promovía apoptosis⁶⁸. Para determinar si los efectos observados correlacionaban con evasión de apoptosis, las líneas celulares se expusieron a rayos UV.

Los resultados mostraron que la sobreexpresión de las claudinas-6, -7 y -9 resulta en menos células que entran a apoptosis. En ambas líneas celulares claudina-7 fue la que redujo el porcentaje de células apoptóticas, siendo la línea celular C9 la que redujo el índice apoptótico en un 26%.

En las siguientes tablas se resumen los resultados obtenidos en ambas líneas celulares

Claudina	Línea celular	Migración	Invasividad	Proliferación
6	C9	↑	↑↑↑	↑
	HepG2	ND	↑↑↑	↑
7	C9	↑	↑	↑↑
	HepG2	ND	↑↑	↑↑
9	C9	↑↑	↑↑	↑↑↑
	HepG2	ND	↑	↑↑↑

ND: No Determinado

↑

↑↑

↑↑↑: efecto en orden descendente

El efecto de la sobreexpresión de las claudinas -6, -7 y -9 en las células C9 y HepG2 en la apoptosis.

Claudina	Línea celular	%
6	C9	41
	HepG2	67
7	C9	20
	HepG2	50
9	C9	63
	HepG2	65

Conclusiones

Efecto de la sobreexpresión de claudina -6, -7 y -9 en la línea celular C9

- ✓ La sobreexpresión de claudina -9 promueve la migración celular a mayor velocidad que claudina -6 y -7.
- ✓ La capacidad de invasión de las células que sobreexpresan claudina -7 y -9 resultó significativo.
- ✓ La sobreexpresión de claudina -6, -7 y -9 aumentan la velocidad de proliferación.
- ✓ La sobreexpresión de claudina -7 disminuye el porcentaje de células que entran en apoptosis.

Efecto de la sobreexpresión de claudina -6, -7 y -9 en la línea celular

HepG2

- ✓ La sobreexpresión de claudina -6, -7 y -9 aumenta la invasividad celular, siendo claudina -9 la que tiene un mayor efecto.
- ✓ La sobreexpresión de claudina -6, -7 y -9 aumenta la velocidad de proliferación.
- ✓ La sobreexpresión de claudinas -6, -7 y -9 disminuye el porcentaje de células que entran en apoptosis.

Bibliografía

1. Anderson J. 2001. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News in physiological sciences*. (16):126-130.
2. Balda S. and Matter K. 1998. Tight junctions. *Journal of Cell Science*. (111)541- 547.
3. Shoichiro T., Mikio F. and Masahiko I. 2001. Multifunctional strands in tight junction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2(4):285-93.
4. Hervé JC., Bourmeyster N., Sarrouilhe D. and Duffy HS. 2007. Gap junctional complexes: from partners to functions. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. (1-2):29-65.
5. Gülistan M., Gabriele R. and Thomas W. 2007. Gap Junctions: Basic Structure and Function. *Journal of Investigative Dermatology*. 127, 2516–2524.
6. Hartsock A. and Nelson W. 2008. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1778(3):660-9.
7. Niessen C. 2007. Tight junctions/adherens junctions: basis structure and function. *Journal Investigative Dermatology*. 127(11): 2525-2532.
8. Garrod D. and Chidgey M. 2007. Desmosome structure, composition and function. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1778: 572-587.
9. Balda S. and Matter K. 2009. Tight junctions and the regulation of gene expresión. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1788(4):761-7.
10. Zahraoui A., Louvard D, and Galli T. 2000. Tight Junction, a Platform for Trafficking and Signaling Protein Complexes. *The Journal of Cell Biology*. 151(5):F31-6.
11. Yan-hua Ch., Qun L., Schneeberger, E. and Goodenough D. 2000. Restoration of Tight Junction Structure and Barrier Function by Down-Regulation of the Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in Ras-transformed Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Molecular Biology of the Cell*. 11(3):849-62.
12. González-Mariscal L., Betanzos A., Nava P. and Jaramillo B. 2003. Tight junction proteins. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. 81(1):1-44.
13. Schneeberger E. and Lynch D. 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *American Journal physiology. Cell physiology*. 286(6):C1213-28.
14. Cerejido M, Contreras R, Shoshani L, Flores-Benitez D. and Larre I. 2007. Tight junction and polarity interaction in the transporting epithelial phenotype. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1778(3):770-93.
15. Singh A., Sharma A. and Dhawan. 2010. Claudin Family of Proteins and Cancer: An Overview. *Journal of Oncology*. 2010:1-11.
16. Zavála, Z. V., 2008. Alteración de la integridad de las uniones estrechas en la propagación del cáncer. El papel de las claudinas. *Bioquímica*. 33(1): 19-29.

17. Shin K., Fogg V. and Margolis B. 2008. Tight Junctions and Cell Polarity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 22:207-235.
18. Furuse M. and Tsukita S. 2006. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends in cell Biology*. 16(4): 181-188.
19. Brennan K., Offiah G., McSherry E. and Hopkins A. 2010. Tight Junctions: A Barrier to the Initiation and Progression of Breast Cancer?. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010:1-16.
20. Turksen K. and Troy T. 2004. Barriers built on claudins. *Journal of Cell Science*. 117, 2435-2447.
21. Chiba H., Osanai M., Murata M., Kojima T. and Sawada N. 2008. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1778(3): 588-600.
22. Tsukita S. and Furuse M. 1999. Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players?. *Trends in cell biology*. 9(7):268-73.
23. Assémat E., Bazellières E. Pallesi-Pocachard E., A., Le B. and Massey-Harroche D. 2008. Polarity complex proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1778(3):614-30.
24. Mariano C., Sasaki H., Britesa D., and Brito MA. 2011. A look at tricellulin and its role in tight junction formation and maintenance. *European Journal of Cell Biology*. 90(10):787-796.
25. Ikenouchi J, Furuse M., Furuse K., Sasaki H. and Tsukita S. 2005. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *Journal Cell Biology*. 171, 939-945.
26. Korompay A., Borka K., Lotz G., Somora A., Törsöc P., Erdélyi-Belle B., Kenessey I., Baranyai Z., Zsoldos F., Kupcsulik P., Bodoky G., Schaff Z. and Kiss A. Tricellulin expression in normal and neoplastic human páncreas. *Histopathology*. 60(6B):E76-86.
27. Angelow S., Ahlstrom R. and Yu A. S. 2008. Biology of claudins. *American Jouranal of physiology. Renal physiology*. 295(4):F867-76.
28. Lal-Nag M. and Morin P. 2009. The claudins. *Genome Biology*. 10(8):235.
29. Findley M. and Koval M. 2009. Regulation and Roles for Claudin-family Tight Junction Proteins. *IUBMB*. 61(4):431-7.
30. Schulzke J. and Fromm M. 2009. Tight junctions: molecular structure meets function. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1165:1-6.
31. Krause G., Winkler L., Mueller S., Haseloff R., Piontek J. and Blasig I. 2007. Structure and function of claudins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1778(3):631-645.
32. Daugherty B., Ward C., Smith T., Ritzenthaler J. and Koval M. 2007. Regulation of Heterotypic Claudin Compatibility. *The Journal of Biology Chemistry*. 282(41):30005-30013.
33. Coyne C., Gambling T., Boucher., Carson J. and Johnson L. 2003. Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability.

- American. Journal Physiology. Lung Cell Molecular Physiology. 285, L1166-L1178.
34. Furuse M., Sasaki H. and Tsukita S. 1999. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. The Journal of Cell Biology. 147, 891-903.
 35. Overgaard C. Daugherty B., Mitchell L. and Koval M. Claudins: Control of Barrier Function and Regulation in Response to Oxidant Stress. Antioxidants & Redox signaling. 15(5):1179-93.
 36. Van Itallie C. 2006. Claudins and epithelial paracellular transport. Annual Review of Physiology. 68:403-429.
 37. Salama N., Eddington N., and Fasano, A. 2006. Tight junction modulation and its relationship to drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews. 58, 15-28.
 38. Anderson J. and Van Itallie. 2009. Physiology and Function of the Tight Junction. 1(2):1-16.
 39. Dahiya N., Becker G., Wood W, Zhang Y. and Morin J. 2011. Claudin-7 Is Frequently Overexpressed in Ovarian Cancer and Promotes Invasion. PLoS ONE. 6(7): 1-11.
 40. Swisshelma K., Macek R. and Kubbies M. 2005. Role of claudins in tumorigenesis. Advanced Drug Delivery Reviews. 57(6):919-28.
 41. Hewitt K. , Agarwal R. and Morin J. 2006. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. BMC Cancer. 6:1-8.
 42. Blanchard A., Skliris G., Watson P., Murphy L., Penner C., Ladislav T., Young T., Leygue E. and Myal Y. 2009. Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype. Virchows Arch: an International Journal of Pathology. 454(6):647-56.
 43. González-Mariscal L., Lechuga S., and Garay E. 2007. Role of tight junctions in cell proliferation and cancer. Progress in Histochemistry and Cytochemistry. 42(1):1-57.
 44. Martin T. and Jiang W. 2009. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. Biochimica et Biophysica Acta. 1788(4):872-91.
 45. Dhawan P., Singh A., Deane N., No Y., Shiou S., Schmidt C., Neff J., Washington M. and Beauchamp R. 2005. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. The Journal of Clinical Investigation. 115:1765-76.
 46. Oshima T., Kunisaki C., Yoshihara K., Yamada R., Yamamoto N., Sato T., Makino H., Yamagishi S., Nagano Y., Fujii S., Shiozawa M., Akaike M., Wada N., Rino Y., Masuda M., Tanaka K. and Imada T. 2008. Reduced expression of the *claudin-7* gene correlates with venous invasion and liver metastasis in colorectal cancer. Oncology reports. 19(4):953-9.
 47. Michl P., Barth C., Buchholz M., Lerch M., Rolke M., Holzmann K., Menke A., Fensterer H., Giehl K., Löhr M., Leder G., Iwamura T., Adler G. and Gress T. 2003. Claudin-4 Expression Decreases Invasiveness

- and Metastatic Potential of Pancreatic Cancer. *Cancer research*. 63(19):6265-71.
48. Oliveira S. and Morgado-Díaz J. 2007. Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 64(1):17-28.
 49. Hoevel T., Macek R., Swisshelm K. and Kubbies M. Reexpression of the TJ protein CLDN1 induces apoptosis in breast tumor spheroids. *Internacional Journal of Cancer*. 108(3):374-383.
 50. Akasaka H., Sato F., Morohashi S., Wu Y., Liu Y., Kondo J., Odagiri H., Hakamada K. and Kijima H. 2010. Anti-apoptotic effect of claudin-1 in tamoxifen-treated human breast cancer MCF-7 cells. *BMC Cancer*10:548.
 51. Takehara M., Nishimura T., Mima S., Hocino T. and Mizushima T. 2009. Effect of Claudin Expression on Paracellular Permeability, Migration and Invasion of Colonic Cancer Cells. *Biological and Pharcaceutical bulletin*. 32(5):825-31.
 52. Lee J., Hsiao W., Chen H., Hsu L., Chen P., Lin M., Chiu S., Shih W. and Hsu Y. 2010. Up-regulated claudin-1 expression confers resistance to cell death of nasopharyngeal carcinoma cells. *Internacional Journal of Cancer*. 26(6):1353-66.
 53. Agarwal, R. D'Souza T. and Morin P. 2005. Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer Research*. 65, 7378-7385.
 54. Miyamori H., Takino T., Kobayashi Y., Tokai, H., Itoh Y., Seiki, M. and Sato H. 2001. Claudin promotes activation of pro-matrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-type matrix metalloproteinases. *The Journal Biologinal Chemical*. 276(30):28204-28211.
 55. Kominsky S., Vall M., Korz D., Gabig T., Weitzman S., Argani P. and Sukumar S. 2004. *Clostridium perfringens* enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *The American Journl of Pathology*. 164(5):1627-33.
 56. McClane B. and Chakrabarti G. 2004. New insights into the cytotoxic mechanisms of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Ananerobe*. 10(2):107-14.
 57. Ebihara C., Kondoh M., Hasuike N., Harada M., Mizuguchi H., Horiguchi Y., Fujii M. and Watanabe Y. 2006. Preparation of a claudin-targeting molecule using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *The Journal of Pharamacology and experimental therapeutics*. 316(1):255-260.
 58. Morin P.J. 2005. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Research*. 65, 9603-9606.
 59. Rendón E., Teresa F., Teresa GM., Xochitl GS., Georgina AF, Veronica Z. and Montaña LF. 2010. Distribution and expression pattern of

- claudins 6, 7, and 9 in diffuse- and intestinal-type gastric adenocarcinomas. *Journal of gastrointestinal cancer*. 41(1):52-59.
60. Zavala Z., Torres A., Salas B., Fortoul T., Montaña L. and Rendón E. 2011. Claudin-6, 7, or 9 overexpression in the human gastric adenocarcinoma cell line AGS increases its invasiveness, migration, and proliferation rate.
61. Sullivan LM., Yancocich T., Le P., Martínez D., Santi M., Biegel JA., Pawel BR. and Judkins AR. 2012. Claudin-6 is a nonspecific marker for malignant rhabdoid and other pediatric tumors. *The American Journal Pathology*. 36(1)73-80.
62. Lu S., Singh K., Mangray S., Tavares R., Noble L., Resnick MB. And Yakirevich E. 2012. Claudin expression high-grade invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with the molecular subtype. *Modern Pathology*.
63. Yoshizawa K., Nozaki S., Kato A., Hirai M., Yanase M., Yoshimoto T., Kimura I., Sugiura S., Okamune A., Kitahara H., Noguchi N., Kato K., Ueki K. and Kawashiri S. 2013. Loss of claudin-7 is a negative prognostic factor for invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Oncology Reports*. 29(2):445-450.
64. Brokalaki El, Weber F., Sotiropoulos GC., Daoudaki M., Cicinnati VR. And Beckebaum S. 2012. Claudin-7 expression in hepatocellular carcinoma. *Transplantation Proceedings*. 44(9):2737-2740.
65. Michl P., Barth C., Lerch M., Rolke M., Holzmann K., Menke A., Giehl K., Löhr M., Leder G., Iwanura T., Adler G. and Gress T. 2003. Claudin-4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer. *Cancer Research*. 63, 6265-6271.
66. Ip YC., Cheung ST., Lee YT., Ho JC. and Fan ST. 2007. Inhibition of hepatocellular carcinoma invasion by suppression of claudin-10 in HLE cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 6(11):2858-2867.
67. Turksen K. and Troy T. 2011. Junctions gone bad: Claudins and loss of the barrier in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1816(1):73-9.
68. Osanai M., Murata M., Chiba H., Kojima T. and Sawada N. Epigenetic silencing of claudin-6 promotes anchorage-independent growth of breast carcinoma cells. *Cancer science*. 98(10):1557-62.
69. Beeman N., Webb P. and Baumgarther. 2012. Occludin is required for apoptosis when claudin-claudin interactions are disrupted. *Cell Death and Disease*. 3:e273.

ANEXO

MEDIOS Y SOLUCIONES

D-MEM

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 NaHCO_3 y disolver

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

Llevar a 1 litro 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ó 0.1 U/ml)
- 0.2 ml de Piruvato de Sodio de GIBCO 100mM (2mM)
- 5 ml de L-Glutamina de GIBCO 200 mM (2mM)
- 5 ml de Penicilina/Estreptomicina de GIBCO 10,000U/ml/10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (100U/ml/100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
- 5.0 ml de Suero Fetal Bovino de GIBCO (5%)

PBS pH = 7.5

Para 1 litro:

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

Disolver en 900 ml de agua

Ajustar el pH

Llevar a un litro de volumen final con H₂O desionizada, esterilizar por filtración y guardar en refrigeración

BUFFER A pH = 7.5

Para 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 Fosfatasa I de SIGMA (dil 1:100)
- 10 µl de Coctail de Inhibidores de Fosfatasa 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 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 ml de IGEPAL (1%)
- 1 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 este buffer, adicionar los siguientes inhibidores por cada ml 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

Distribuir 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 su análisis por electroforesis, adicionar 5% de β -Mercaptoetanol.

ACRILAMIDA 30.8% (usar guantes y lentes para protección)

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 H₂O desionizada y posteriormente disolver la bis acrilamida.

Llevar a 100 ml de volumen final con H₂O desionizada y guardar en refrigeración.

TRIS 1.5 M pH = 8.8

- 16.17 g de tris

Disolver el poco a poco el tris en 50 ml de H₂O desionizada y ajustar el pH.

Llevar a 100 ml con H₂O desionizada y guardar en refrigeración.

TRIS 0.5 M pH = 6.8

- 6.05 g de tris

Disolver el poco a poco el tris en 50 ml de H₂O desionizada y ajustar el pH.

Llevar a 100 ml de volumen final con H₂O desionizada y guardar en refrigeración.

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 H₂O desionizada
- 150 µl de SDS al 20%
- 15 µl de TEMED
- 150 µl de Persulfato de Amonio al 10%

Gel Concentrador (5%)

- 2.5 ml de Acrilamida 30.8%
- 3.75 ml de Tris 0.5 M pH = 6.8
- 8.55 ml de H₂O desionizada

- 75 μ l de SDS al 20%
- 15 μ l de TEMED
- 150 μ l de Persulfato de Amonio al 10%

Amortiguador para Electroforesis

Para 4 litros:

- 12.13 g de Tris (25 mM)
- 57.65 g de Glicina (192 mM)
- 4 g de SDS (0.1%)

pH = 8.3

Aforar con H₂O desionizada

Amortiguador de Transferencia

Para 1 litro:

- 3.03 g de Tris (25 mM)
- 14.4 g de Glicina (192 mM)
- 200 ml de Metanol (20%)

pH = 8.3

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

Aforar con H₂O desionizada y guardar en refrigeración.

TBS 1X (Para lavados de membrana)

Para 1 litro:

- 2.423 g de Tris (20 mM)
- 8 g de NaCl (136 mM)

pH = 7.6

Aforar con H₂O desionizada y guardar en refrigeración.

TTBS 1X (Para lavados e incubaciones con anticuerpos)

Para 1 litro:

- 2.423 g de Tris (20 mM)
- 8 g de NaCl (136 mM)

pH = 7.6

- 1 ml de Tween 20 (0.1%)

Aforar con H₂O desionizada y guardar en refrigeración.

Rojo de Ponceau

Para 100 ml

- 0.2 g de Rojo de Ponceau (0.2%)
- 3ml de ácido acético