



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ALTERACIÓN DE LAS UNIONES ESTRECHAS  
DE CÉLULAS ENDOTELIALES POR CITOCINAS  
SECRETADAS DE CÉLULAS AGS**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIOLOGO**

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

**JHAZIEL CALEB TOVAR MOTA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DRA. ERIKA PATRICIA RENDON HUERTA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2017**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## Hoja de datos del jurado

### 1. Datos del alumno

Apellido paterno: Tovar  
Apellido materno: Mota  
Nombre (s): Jahaziel Caleb  
Teléfono: 5531219514  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Carrera: Biología  
Número de cuenta: 307286378

### 2. Datos del tutor

Grado: Dr  
Nombre (s): Erika Patricia  
Apellido paterno: Rendón  
Apellido materno: Huerta

### 3. Datos del sinodal 1

Grado: Dr  
Nombre (s): Teresa Imelda  
Apellido paterno: Fortoul  
Apellido materno: Vander Goes

### 4. Datos del sinodal 2

Grado: Dr  
Nombre (s): Miguel  
Apellido paterno: Santibáñez  
Apellido materno: Andrade

### 5. Datos del sinodal 3

Grado: M en C  
Nombre (s): Ana Cristina  
Apellido paterno: Torres  
Apellido materno: Martínez

### 6. Datos del sinodal 4

Grado: Dr  
Nombre (s): Luis Felipe  
Apellido paterno: Montaña  
Apellido materno: Estrada

### 7. Datos del trabajo escrito:

Título: Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS  
Número de páginas: 52  
Año: 2017

## Agradecimientos

Quiero agradecer a los integrantes de mi familia, amigos y tutores que han compartido conmigo su tiempo, esfuerzo, conocimiento y amor. Porque este trabajo es resultado todo lo que ustedes han dado. Gracias.

# ÍNDICE

<b>1. Resumen</b>	1
<b>2. Introducción</b>	2
2.1 Uniones intercelulares	2
2.1.1 Uniones adherentes	4
2.1.2 Desmosomas	4
2.1.3 Uniones estrechas	4
2.2 Proteínas de las Uniones estrechas	6
2.3 Proteínas transmembranales de las UE	7
2.3.1 JAM-A	7
2.3.2 Ocludina	8
2.3.3 Tricelulina	8
2.3.4 Claudinas	9
2.4 Endotelio y claudinas	13
2.5 Claudinas y cáncer	15
2.5.1 Claudinas y señalización celular en cáncer	18
2.5.2 Claudinas y cáncer gástrico	18
2.6 Microambiente tumoral del cáncer gástrico	21
2.6.1 Interleucina-8	21
2.6.2 Interleucina-6	22
2.6.3 COX-2/PGE2	23
<b>3. Justificación</b>	24
<b>4. Hipótesis</b>	25
<b>5. Objetivos</b>	25
<b>6. Metodología</b>	26
6.1 Líneas celulares	26
6.2 Cultivo primario de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVECs)	28
6.3 Obtención de medios condicionados	29
6.4 Determinación de citocinas en medios condicionados	29
6.5 Caracterización de la TER en HUVECs	30
6.6 Marcaje de células U937 con timidina tritiada para los ensayos de Adhesión	30
6.7 Ensayos de adhesión en HUVECs	31
6.8 Determinación de PGE2 en medios condicionados	31
6.9 Análisis estadístico de los datos	32
<b>7. Resultados</b>	32
7.1 Citocinas en los medios condicionados	32
7.2 Efectos de los medios condicionados sobre la TER en HUVECs	34
7.3 Efecto de los medios condicionados sobre la adhesión leucocitaria en HUVECs	35
7.4 Determinación de PGE2 en medios condicionados	35
<b>8. Discusión</b>	37

<b>9. Conclusiones</b> .....	44
<b>10. Perspectivas</b> .....	44
<b>11. Anexo</b> .....	44
11.1 Protocolo para aislar células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVECs).....	44
<b>12. Bibliografía</b> .....	47

## 1. Resumen

El cáncer gástrico es un problema de salud mundial, pues su tasa de mortalidad es elevada, esto se debe principalmente a que las fases en las que se detecta esta enfermedad son muy avanzadas y generalmente el tumor primario ya ha hecho metástasis. El cáncer gástrico hace metástasis al hígado, peritoneo, pulmones, hueso, cerebro y con mayor frecuencia utilizan la ruta sanguínea para lo cual necesitan atravesar la monocapa constituida por las células endoteliales.

El endotelio es el epitelio de los vasos sanguíneos y linfáticos, los vasos sanguíneos cumplen con funciones de distribución de nutrientes e intercambio gaseoso. Las células del sistema inmune se unen a estos vasos para pasar del torrente sanguíneo a los tejidos cuando hay algún tipo de daño tisular o infección. Pero las células cancerosas también interaccionan con las células endoteliales para extravasarse al torrente sanguíneo y hacer metástasis, al inducir de angiogénesis.

La sobreexpresión de claudina-6 y claudina-9, proteínas de uniones estrechas, incrementan la invasividad, la migración y la tasa de proliferación, de células de adenocarcinoma gástrico (AGS). De acuerdo con lo anterior la presente investigación pretende describir cuál es el efecto de los factores solubles secretados por células (AGS), específicamente citocinas, sobre la función y expresión de proteínas de las uniones estrechas de las células endoteliales (HUVECs).

Nuestros resultados muestran que las células AGS y AGS transfectadas para la sobreexpresión de claudina-6 secretan constitutivamente altas concentraciones de IL-8, PGE2 y concentraciones muy bajas de IL-6. Las células AGS que sobreexpresan a claudina-6 y -9 disminuyeron la resistencia eléctrica transepitelial (TER) de las células endoteliales. PGE2 podría ser el componente que afecte la TER, sin descartar que podría haber un conjunto de factores solubles, además de los detectados, que también estén alterando la función y expresión de proteínas de las uniones estrechas del endotelio.

## **2. Introducción**

En México, el cáncer gástrico (CG) se encuentra en el sexto lugar de incidencia, sin embargo la tasa de mortalidad es muy alta ya que, del total de personas que son diagnosticadas con CG aproximadamente el 80% mueren<sup>1</sup>. El CG, acorde con la “clasificación de Lauren”, se clasifica histológicamente en dos subtipos: el intestinal y el difuso. El subtipo intestinal es estructuralmente parecido al cáncer de colon, es precedido por gastritis crónica y a menudo se relaciona con factores ambientales como la infección por *Helicobacter pylori*, la dieta y el estilo de vida. El subtipo difuso es más común en mujeres, la esperanza de vida es menor que la del subtipo intestinal y está asociado con anomalías genéticas<sup>2,3</sup>.

La mayor causa de muerte relacionada con el cáncer son las metástasis, proceso en el cual las células del tumor primario se dispersan a otras partes del cuerpo a través de los vasos sanguíneos, vasos linfáticos o tejido adyacente, perdiendo la homeostasis del organismo<sup>4</sup>. En el CG, el subtipo intestinal tiende a realizar metástasis al hígado y pulmones a través de la circulación sanguínea y de los vasos linfáticos, mientras que el subtipo difuso hace metástasis al peritoneo, hueso y ovarios a través de la vía transcelómica y ocasionalmente por circulación sanguínea<sup>5,6</sup>.

Para realizar el proceso de metástasis, las células cancerígenas se transportan a través de tejidos adyacentes, durante este proceso se liberan del tejido al que pertenecen debido a que las uniones intercelulares se desarticulan provocando que se pierda la adhesión celular. La adhesión celular se establece por diferentes tipos de uniones intercelulares, como las uniones estrechas (UE), las uniones adherentes (UA) y los desmosomas<sup>7</sup> (Fig. 1).

### **2.1 Uniones Intercelulares**

Las uniones intercelulares son complejos proteicos compuestos por proteínas transmembranales, proteínas citosólicas y su asociación con proteínas del citoesqueleto. Su importancia radica en su función principal, que es mantener a las



## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

células unidas para la formación de tejidos. Por ejemplo, los tejidos epiteliales, que llevan a cabo dos funciones estrechamente relacionadas con las uniones intercelulares, ellos delimitan compartimentos y participan en el intercambio controlado de iones y moléculas. En los epitelios las uniones intercelulares garantizan una fuerte adhesión, a partir de esta, se genera la función de barrera selectiva y muestran un fenotipo celular polarizado, el polo apical y el polo basal<sup>8</sup>.

Adicionalmente las uniones intercelulares regulan procesos fundamentales como la diferenciación celular, la inhibición de proliferación por contacto y la apoptosis; la regulación de estos procesos se debe a las conexiones que tienen las uniones intercelulares con la gran parte de las vías de señalización celular que controlan el comportamiento de la célula. Por lo tanto las proteínas que conforman a las uniones intercelulares no solo mantienen la integridad de los tejidos sino que funcionan como biosensores que modulan el comportamiento celular en respuesta al microambiente<sup>9</sup>.

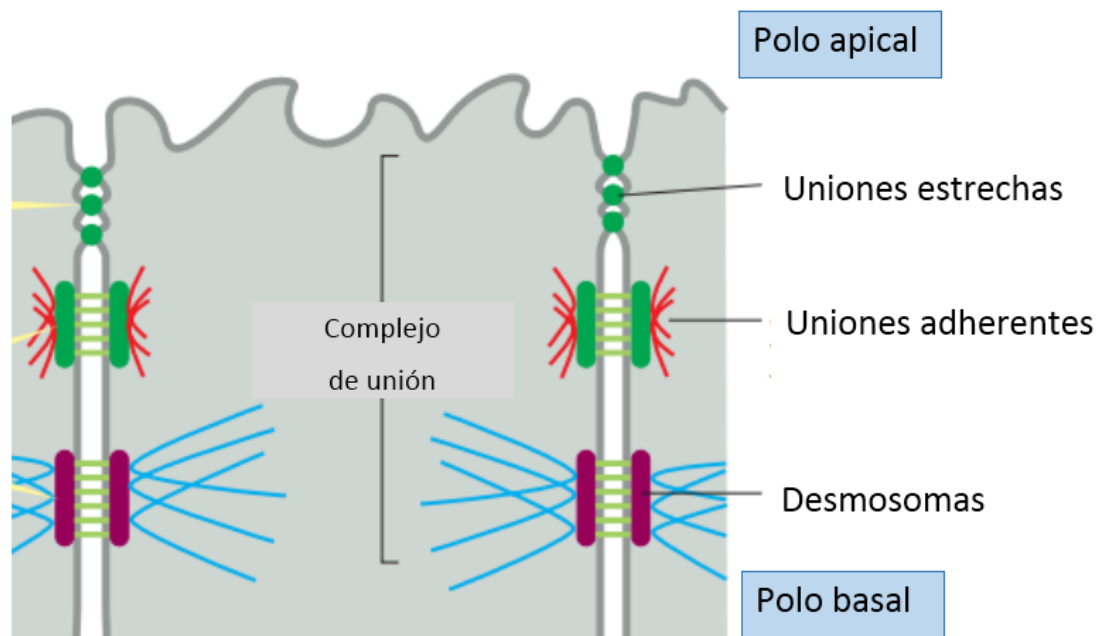


Fig. 1. Uniones intercelulares. Modificado de Alberts et. al. 2015.

### **2.1.1 Uniones adherentes**

Las uniones adherentes (UA) están involucradas en la proliferación celular, la polaridad celular, y la organización de muchos tipos celulares, como células epiteliales, fibroblastos, músculo cardíaco y neuronas. Estas uniones resisten fuerzas disociativas y las transmiten a las células adyacentes, de esta manera soportan mecánicamente la remodelación durante la embriogénesis, la regeneración celular y la cicatrización. Las proteínas que las conforman están asociadas al citoesqueleto a través de los filamentos de actina.

Las principales moléculas de adhesión involucradas son glicoproteínas transmembranales llamadas cadherinas, que forman parte de una superfamilia de proteínas las cuales tienen más de dos dominios extracelulares, en su mayoría, operan como receptores de adhesión homofílicos para facilitar el reconocimiento celular. También se encuentran las proteínas citoplasmáticas p120 catenina y  $\beta$ -catenina, las cuales se unen a las colas citoplasmáticas de las cadherinas y en conjunto controlan la función y formación de este tipo de uniones<sup>10,11</sup>.

### **2.1.2 Desmosomas**

Los desmosomas son dominios membranales que están adaptados para soportar el estrés mecánico. Este tipo de unión debido a su estructura y función se encuentra en tejidos que se ven sometidos a fuerzas físicas como el corazón y la piel. Las proteínas que componen a los desmosomas, son parte de la familia de las cadherinas, llamadas desmogleína y desmocolina que se encuentran en la membrana plasmática. Estas proteínas están ancladas a una placa proteica, formada por placoglobina y placofilina en el citosol, que está asociada al citoesqueleto a través de los filamentos intermedios<sup>12</sup>.

### **2.1.3 Uniones estrechas**

Las uniones estrechas (UE) se localizan en la región más apical de las células epiteliales y endoteliales, estas uniones tienen dos funciones clásicas; la función de barrera y la función de cerca.

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

La primera regula el paso de iones, agua y varias moléculas a través de la vía paracelular y está relacionada con procesos como edema, diarrea y metástasis. La segunda función, mantiene la polaridad celular formando una cerca que impide el movimiento de moléculas de la región basolateral a la apical y viceversa.<sup>13</sup>. (Fig. 2).

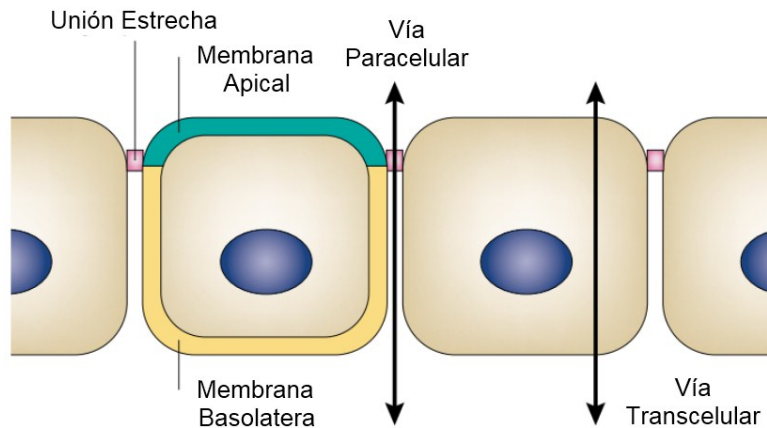


Fig. 2. Polaridad y vía paracelular generada por las Uniones estrechas. Tsukita et. al. 2001.

Las UE se generan por puntos de contacto entre membranas de células adyacentes. (Fig.3). Las UEs forman hileras de filamentos proteínicos llamadas cadenas, en los cuales las proteínas transmembranales se extienden a lo largo del espacio extracelular para interactuar con proteínas de las células adyacentes. Las propiedades fisiológicas de las UE dependen de distintos factores; como el número de cadenas presentes, la magnitud del estrés físico ejercido sobre el tejido y la composición proteica de las uniones. El número de cadenas y composición de proteínas en las UE se correlaciona con la impermeabilidad en la barrera, por ejemplo, el túbulo proximal contorneado del riñón de ratón tiene una sola cadena de UE, esto lo hace electrofisiológicamente más débil, mientras la vejiga tiene hasta cinco cadenas de UE y es relativamente impermeable a iones y solutos<sup>14</sup>.

Las UE son altamente dinámicas, dado que constantemente se encuentran bajo remodelación de las proteínas que las conforman, mientras conservan su integridad

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

estructural. A través de técnicas como FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*), se ha reportado que en monocapas de la línea celular MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) proteínas de andamiaje y el citoesqueleto se encuentran en remodelación de forma constitutiva, mientras que proteínas transmembranales como claudina-1, claudina-2 y claudina-4 muestran diferentes niveles de expresión posteriormente a tratamientos con citocinas proinflamatorias como  $\text{TNF}\alpha$ <sup>14,15</sup>.

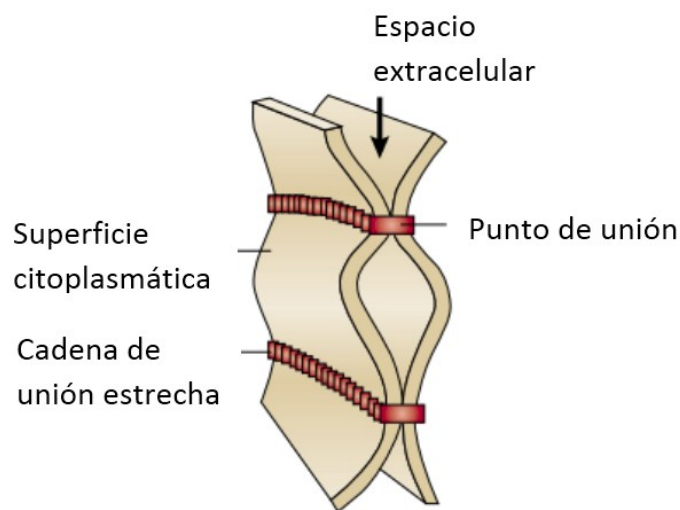


Fig. 3. Puntos de contactos generados por la interacción de las uniones estrechas. Tsukita et. al. 2001.

### **2.2 Proteínas de las Uniones estrechas**

Las UE de células epiteliales y endoteliales están compuestas por proteínas transmembranales, entre ellas, las proteínas con dominios MARVEL como ocludina, tricelulina y la proteína MARVELD3, la proteína BVES (*blood vessel epicardial substance*) que cuenta con 3 dominios transmembranales, proteínas de adhesión JAM (*junctional adhesion molecule*), la proteína CRB3 (*crumbs homologue 3*), y de manera muy importante una familia de proteínas llamadas claudinas.

Todas las proteínas transmembranales se asocian al complejo de proteínas citosólicas, constituido por proteínas de andamio que se encuentran localizadas en

# Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

la periferia de la membrana plasmática, que a su vez están unidas a filamentos de actina y microtúbulos por medio de proteínas adaptadoras como cingulina y miosinas. Como ejemplo de las proteínas de andamio se encuentra, ZO-1, la cual pertenece a una familia de proteínas de alto peso molecular (220 kDa), en su extremo amino terminal tiene dominios de unión a proteínas transmembranales, como las claudina, ocludina y JAM's <sup>16,17</sup> (Fig. 4).

## 2.3 Proteínas transmembranales de las UE

### 2.3.1 JAM-A

Las proteínas JAM (*Junctional adhesion molecule*), pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, pesan aproximadamente 40 kDa, cuentan con un dominio transmembranal y son componentes importantes de las UE (Fig. 4). Como miembro de proteínas JAM, JAM-A está involucrada en funciones de barrera en las UE, también participa en el desarrollo de la polaridad apicobasal de células epiteliales y se localiza en la membrana lateral de células endoteliales y epiteliales. JAM-A se expresa en otros tipos celulares como plaquetas y células presentadoras de antígeno, participa en procesos de migración leucocitaria, activación plaquetaria, angiogénesis y ensamble de las UE<sup>18,19</sup>

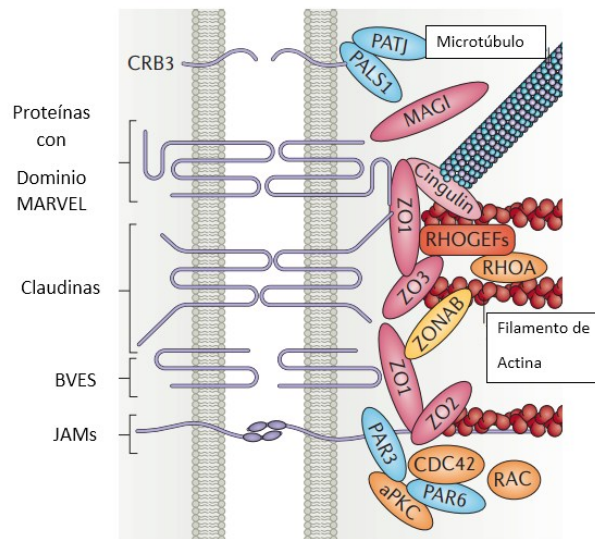


Fig. 4. Tipos de proteínas en las UE. Zihni et. al. 2016

### 2.3.2 Ocludina

Ocludina es una proteína con un peso aproximado de 65 KDa, cuenta con cuatro dominios transmembranales, dos asas extracelulares y una intracelular, sus extremos carboxilo y amino terminal son citoplasmáticos (Fig. 5). Cada dominio de la proteína muestra distintas funciones y características reguladoras. El extremo carboxilo interacciona con la proteína ZO-1 e interviene en la dimerización de la proteína y se sabe que al menos una de las asas extracelulares contribuye a la estabilidad de las UE. Las funciones de la ocludina se han estudiado en diversos modelos, como en células MDCK (*Madin-Darby canine kidney cells*), en las cuales la sobreexpresión a esta proteína incrementó en la resistencia eléctrica transepitelial (TER). En experimentos con ratones knock-out (occludin<sup>-/-</sup>), los roedores presentaron fenotipos histológicos caracterizados por inflamación crónica y una pobre integridad de las UE en varios tejidos epiteliales<sup>20</sup>.

En células HUVECs la reducción en la expresión de ocludina a través de proteólisis o estimulando con factores como VEGF (vascular endothelial growth factor) o fosfolipasa D2, tiene una asociación directa con el incremento de la permeabilidad endotelial. En tumores cerebrales de humanos, la microvasculatura presenta UE débiles debido a la pobre expresión de ocludina, provocando edema cerebral, esto se atribuye a la expresión aumentada de VEGF por el tumor<sup>20,21</sup>.

### 2.3.3 Tricelulina

La tricelulina tiene al menos 4 isoformas descritas y la más grande de ellas tiene un peso molecular aproximado de 61 kDa. Son proteínas con 4 dominios transmembranales y debe su nombre a que se encuentra localizada en UE tricelulares, formando un tubo central entre las células, por el cual se regula el paso de macromoléculas pero no de iones, esta paradoja se explica debido a que el tubo central es lo suficientemente ancho pero las propiedades físicas del mismo solo permiten que el 1% de iones atraviesen por este. La tricelulina se encuentra en tejidos epiteliales y en UE bicelulares y tricelulares del endotelio cerebral humano,

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

así como en células endoteliales de la barrera hemato-ocular. La expresión de esta proteína como todas las de las UE, se altera durante procesos como la transición epitelio-mesénquima<sup>22,23</sup>.

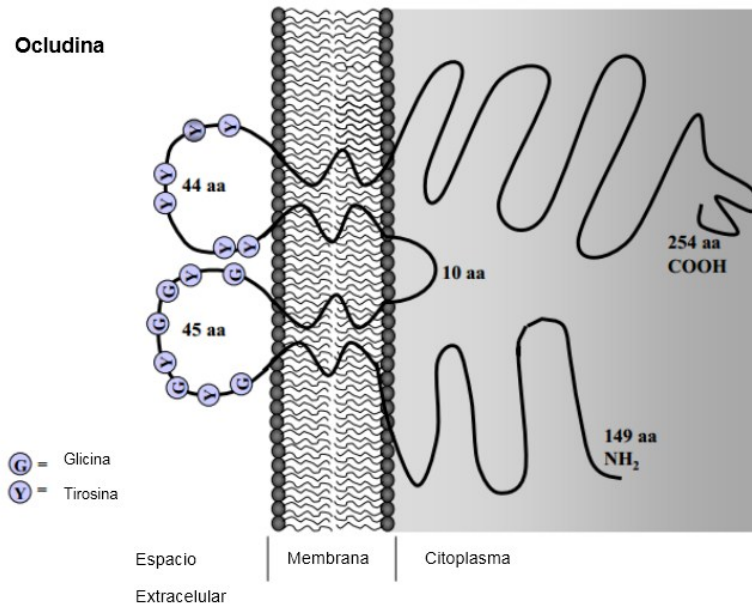


Fig. 5. Representación esquemática de ocludina. Feldamn et. al. 2005.

### 2.3.4 Claudinas

Las claudinas son proteínas transmembranales con 26 isoformas reportadas en mamíferos que pertenecen a una familia multigénica dispersa en diferentes cromosomas (Tabla 1). La familia de las claudinas es el constituyente proteico más importante de las UE, dado que son esenciales para la formación de las cadenas en las UE y su peso molecular se encuentra entre los 20-34 kDa. Estructuralmente presentan un extremo amino terminal corto, que se encuentra en el citoplasma, 2 asas extracelulares formadas por cuatro dominios transmembranales, un asa intracelular y una cola carboxilo terminal citoplasmática. Las claudinas regulan el paso de pequeñas moléculas e iones a través de la vía paracelular debido a su permeabilidad selectiva. Para cumplir este papel las claudinas muestran una preferencia de carga específica para cationes (Na, K y Ca) o aniones (Cl)<sup>24</sup>.

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

Nombre de la proteína	Nombre del Gen	Cromosoma Humano	Número de aminoácidos (N-T1-E1-T2-I-T3-E2-T4-C)	Masa molecular (kDa)
Claudina 1	<i>CLDN1</i>	3q28-29	211 (7-21-53-21-13-21-27-21-27)	22.8
Claudina 2	<i>CLDN2</i>	Xq11.23	230 (7-21-53-21-14-21-25-21-47)	24.4
Claudina 3	<i>CLDN3</i>	7q11.23	220 (8-21-51-21-14-21-23-21-40)	23.3
Claudina 4	<i>CLDN4</i>	7q11.23	209 (7-21-53-21-15-21-22-21-28)	22.1
Claudina 5	<i>CLDN5</i>	22q11.2	303 (92-21-53-21-20-21-16-21-38)	31.6
Claudina 6	<i>CLDN6</i>	16p13.3	220 (7-21-53-21-14-21-23-21-39)	23.3
Claudina 7	<i>CLDN7</i>	17p13.1	211 (7-21-53-21-15-21-22-21-30)	22.4
Claudina 8	<i>CLDN8</i>	21q22.1	225 (7-21-53-21-15-21-28-21-38)	24.8
Claudina 9	<i>CLDN9</i>	16p13.21	217 (7-21-53-21-14-21-22-21-37)	22.9
Claudina 10	<i>CLDN10</i>	13q32.1	226 (0-21-57-21-14-21-24-21-47)	24.3
Claudina 11	<i>CLDN11</i>	3q26.2	207 (1-21-60-21-19-21-14-21-29)	22
Claudina 12	<i>CLDN12</i>	7q21.13	244 (10-21-56-21-27-21-18-21-49)	27.1
Claudina 14	<i>CLDN14</i>	21q.2213	239 (7-21-53-21-13-21-26-21-56)	25.7
Claudina 15	<i>CLDN15</i>	7q22.1	228 (3-21-55-21-19-21-17-21-50)	24.4
Claudina 16	<i>CLDN16</i>	3q.28	305 (73-21-56-21-14-21-33-21-45)	33.8
Claudina 17	<i>CLDN17</i>	21q22.1	119 (topología no descrita)	24.6
Claudina 18	<i>CLDN18</i>	3q22.3	261 (6-21-53-21-21-21-31-21-66)	27.9
Claudina 19	<i>CLDN19</i>	1p34.2	224 (7-21-53-21-15-21-22-21-43)	23.2
Claudina 20	<i>CLDN20</i>	6q25.3	219 (7-21-53-21-16-21-21-21-38)	23.5
Claudina 21	<i>CLDN21</i>	4q35.1	229 (10-21-50-21-22-21-19-21-44)	25.4
Claudina 22	<i>CLDN22</i>	4q35.1	220	24.5



## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

			(10-20-51-21-15-21-26-21-35)	
Claudina 23	<i>CLDN23</i>	8p23.1	292 (3-21-57-21-8-21-29-21-111)	31.9
Claudina 24	<i>CLDN24</i>	4q31.5	220 (10-21-50-21-15-21-23-21-38)	24.4
Claudina 25	<i>CLDN25</i>	11q23.2	276 (27-21-115-21-13-21-20-21-17)	31.1
Claudina 26	<i>CLDN26</i>	(no descrito)	223 (6-21-78-21-7-21-34-21-14)	24.2
Claudina 27	<i>CLDN27</i>	(no descrito)	208 (topología no descrita)	21.6

Tabla 1. Localización cromosómica y características de las claudinas humanas. (Modificado de Markov et. al. 2017)

**La primer asa extracelular** (de aproximadamente 42-56 residuos de aminoácidos) regula la selectividad paracelular de aniones y cationes debido a las propiedades que le confieren sus aminoácidos con carga. Esta asa posee 2 residuos de cisteína conservados en la mayoría de las claudinas, que forman un enlace disulfuro y que incrementan la estabilidad de la proteína; además, la primer asa contiene un motivo altamente conservado que le da identidad a las claudinas (Fig. 6), la parte central de este motivo está compuesto por la secuencia G-L-W que, en claudina-1 es utilizado como receptor por el virus de la hepatitis C, este motivo firma está presente y es necesario en todas las claudinas para el correcto plegamiento de la primer asa.<sup>25</sup>

**La segunda asa extracelular** (de aproximadamente 16-33 residuos de aminoácidos) está involucrada en la formación de dímeros con claudinas de las membranas celulares opuestas. Estas interacciones son del tipo hidrofóbica y son mediadas por residuos de aminoácidos aromáticos que se encuentran conservados. Adicionalmente en la segunda asa extracelular de claudina-3 y claudina-4 se encuentra el sitio de unión para la enterotoxina de *Clostridium perfringens*, un agente causal para la intoxicación alimentaria en seres humanos.<sup>25</sup>

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

**El extremo carboxilo terminal** es una secuencia larga, altamente divergente entre claudinas y que se localiza en el citoplasma. Juega un papel importante para la mayoría de las claudinas en el proceso de salida del retículo endoplásmico y su transporte hacia las UE. En la mayoría de las claudinas 12, -22, -25 y -27, la secuencia final del extremo carboxilo posee un motivo dipéptido hidrofóbico (Y-V); este motivo se une a dominios PDZ de proteínas andamio como: ZO1, ZO2, ZO3 y MUPP1. La región de la cola citoplasmática (localizada después del cuarto dominio transmembranal) y la región del asa intracelular (ubicada antes del segundo dominio transmembranal) son sitios donde se lleva a cabo la palmitoilación en pares de cisteínas. Las colas citoplasmáticas de la mayoría de las claudinas tienen sitios de fosforilación predichos pero no se conservan en todas las isoformas de la familia.<sup>25</sup>

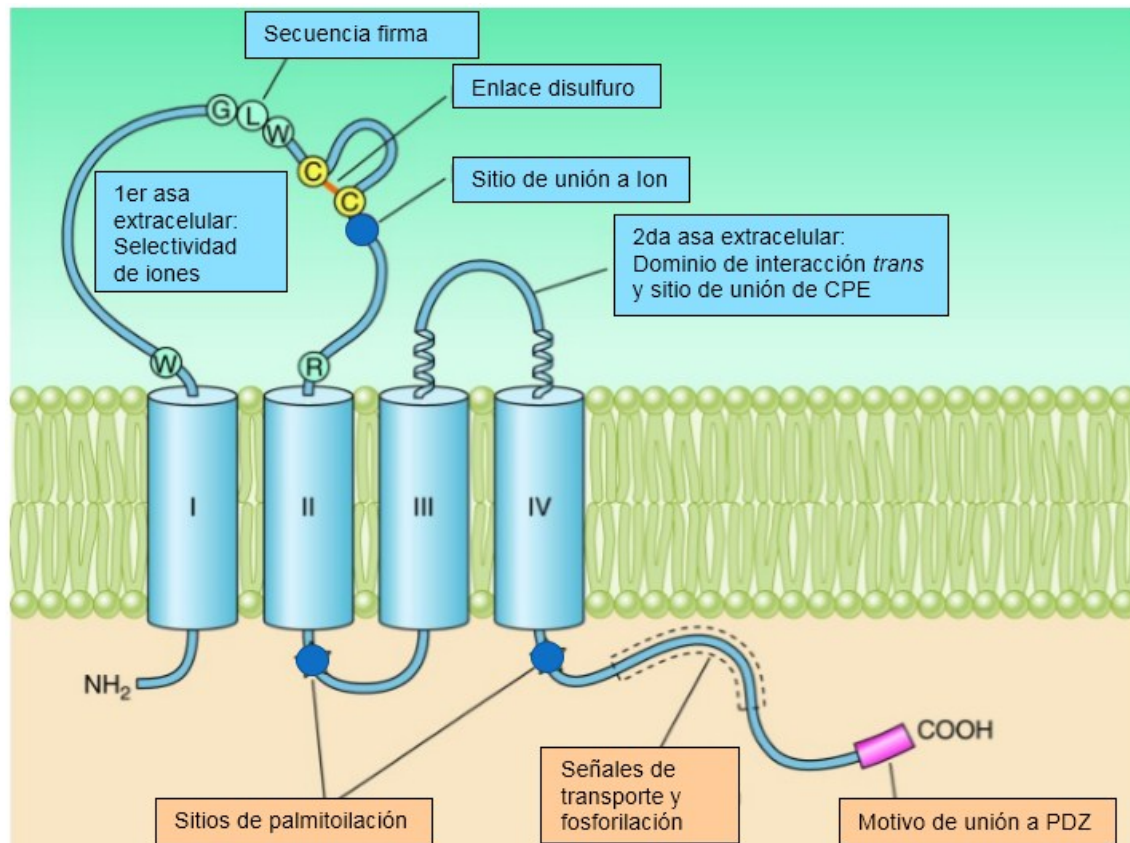


Fig. 6. Modelo de la proteína claudina. Gunzel et. al. 2013

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

Las claudinas funcionan como poros paracelulares y se agrupan en dos categorías: claudinas de cierre hermético (ej. claudina-1, -3, -5, -11, -14 y -19) y claudinas formadoras de poros de fuga (ej. claudina-2, -10, -15 y -17), por ejemplo la expresión de claudina 2 incrementa la permeabilidad de Na en el epitelio y en caso contrario claudina 4 reduce el flujo de Na<sup>26</sup>. Las claudinas forman interacciones homotípicas (entre el mismo tipo de claudina), e interacciones heterotípicas (entre diferentes tipos de claudina), esta característica les confiere gran potencial para formar diferentes interacciones y características de poro<sup>27</sup>. Las claudinas están expresadas en todos los tejidos epiteliales, además diferentes claudinas pueden expresarse simultáneamente (Tabla 2).

Tissue	Claudin
Stomach	3, 4, 5, 12, 18, 23
Intestine	1-5, 7, 8, 10, 12, 13 (rodent), 15, 18-2, 20, 21, 23
Liver	1-3, 5-9, 14
Gall bladder	1-4, 10 > 7, 8
Respiratory tract	1, 3-5, 7, 10, 18-1 (proximal); 3-5, 7, 8, 15, 18-1 (distal)
Epidermis	1, 4, 7 > 3, 5, 8, 11, 12, 17
Eye	1, 4, 7 (cornea & conjunctiva); 10 (conjunctiva)
Salivary gland	10 > 1, 2, 3, 4, 7, 8, 12
Mammary gland	1-5, 7, 8, 15, 16
Taste bud	4, 6, 7, 8
Exocrine pancreas	1-5, 7
Retinal pigment epithelium	19 > 3, 10 (human); 1 > 3 (rodent)
Choroid plexus	1, 2, 5, 11
Cochlea	1, 2, 3, 8, 9, 10, 12, 14, 18 (Organ of Corti & striae vascularis marginal cells); 11 (striae vascularis basal cells)
Ovary	1, 5
Prostate	1, 3, 4, 5, 7, 8, 10
Epididymis	4, 7 > 2, 5, 10
Seminiferous tubule	3, 5, 11
Urinary bladder	4, 8, 12

Tabla 2. Expresión de claudinas en el tracto gastrointestinal, respiratorio y otros tejidos epiteliales en mamíferos. (Modificado de Gunzel et. al. 2013)

### **2.4 Endotelio y claudinas**

En organismos multicelulares, el tejido vascular es necesario para establecer la circulación que distribuye los nutrientes y el oxígeno, remueve productos de desecho y funciona como medio para la comunicación entre órganos. El tejido vascular se compone de vasos linfáticos y vasos sanguíneos que, a su vez estos se

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

componen de células endoteliales (CE) que dan lugar a la capa más interna de los vasos formando el endotelio. Las CE tienen una variedad de funciones esenciales como la morfogénesis vascular, la regulación de la presión sanguínea y la coagulación durante la inflamación<sup>28</sup>.

Las CE forman una barrera semipermeable entre el plasma circulante y el espacio intersticial de los tejidos adyacentes, esta barrera se forma por uniones intercelulares, formando una monocapa selectiva que restringe el transporte de proteínas en función del tamaño a través de la barrera endotelial. Moléculas con un radio menor de 3 nm difunden de manera pasiva a través de las uniones, mientras que proteínas de alto peso molecular como la albumina y las células sanguíneas son retenidas en la circulación<sup>29</sup>.

De manera similar a las células epiteliales, las CE tienen regiones especializadas de unión en las cuales están presentes las uniones adherentes y las uniones estrechas. En algunas CE como las de las venas y los vasos linfáticos se localizan complejos parecidos a los desmosomas llamados complejos adherentes. En el endotelio, las UA y UE aunque tienen componentes proteicos diferentes, comparten una característica en común, estos dos tipos de uniones forman únicamente enlaces homofílicos formados por proteínas transmembranales, formando una estructura de cierre pericelular<sup>30</sup>.

Las uniones estrechas, ocupan la posición más apical sellando la superficie que da hacia el lumen del vaso, su función es regular el paso de iones y solutos a través de la vía paracelular. En las UE del endotelio claudina-5 se expresa de manera ubicua, las claudina-1,-3, y 12 son específicas del endotelio en el cerebro, mientras que la claudina-1, y la claudina 2 se presentan en los vasos retinianos<sup>31</sup>.

En condiciones fisiológicas, el endotelio está involucrado en la respuesta inmune, ya que los leucocitos se transportan desde la circulación sanguínea hacia el sitio de salida, habilitados por mecanismos que les permiten cruzar la barrera de la pared del vaso sanguíneo en dirección hacia el tejido.

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

La extravasación de los leucocitos sucede cuando se presentan señales inflamatorias causadas por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), generados por agentes infecciosos o tejidos que sufrieron daño tisular respectivamente. Este tipo de señales inflamatorias son reconocidas por células afectadas en el tejido y por células del sistema inmune residentes de tejido, dando lugar a la liberación de citocinas y otros mediadores proinflamatorios que activan a las células endoteliales<sup>32</sup>.

Entre otros efectos que supone la activación de la célula endotelial, como la expresión de moléculas de adhesión para que los leucocitos puedan adherirse al endotelio, la desregulación de las uniones endoteliales es un paso central en la extravasación de los leucocitos para poder llegar al tejido<sup>32</sup>. Por ejemplo, en vasos sanguíneos cerebrales de ratas, donde se indujo el reclutamiento de neutrófilos a través de inyecciones de IL-1 $\beta$ , se demostró la pérdida de proteínas de las uniones estrechas como ocludina y ZO-1<sup>33</sup>. También la desregulación de claudinas ha sido reportada en procesos inflamatorios que afectan a vénulas retinianas, específicamente la claudinas -1 y -3<sup>34</sup>.

### **2.5 Claudinas y cáncer**

La mayoría de las muertes asociadas a cáncer (aproximadamente 95 %) representan procesos cancerígenos que se originan en epitelios, como la cavidad oral, esófago, estómago, colon, recto, próstata, ovario, vejiga, riñón, pulmón, páncreas, mama e hígado. A pesar de las diferentes morfologías y especialización de función de los epitelios en los tejidos y órganos, las células epiteliales comparten rasgos comunes, como la polarización en la arquitectura de las células; en cáncer, un epitelio transformado pierde esta arquitectura y se caracteriza por un incremento en la permeabilidad. Un requerimiento importante para el fenotipo polarizado de las células epiteliales, es la correcta función de las UE, esto implica la participación de claudinas, en el cáncer las células no poseen UE funcionales ya que la expresión y localización de claudinas está alterada<sup>35</sup>.

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

Las claudinas son componentes integrales de las UE, cumplen un papel esencial en el mantenimiento de la integridad celular, pero la desregulación de su expresión y distribución celular ha sido ampliamente documentada y asociada con la progresión y metástasis en distintos tipos de cáncer<sup>36</sup> (Tabla 3). La desregulación de las claudinas es consistente con la disrupción de las UE durante el proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM), un evento clave que promueve la metástasis. Durante este proceso las células epiteliales modifican sus estructuras de adhesión célula-célula, alteran su polaridad, reorganizan su citoesqueleto, se aíslan del tejido que provienen y desarrollan motilidad<sup>37</sup>.

En el proceso de TEM no todos los miembros de la familia de las claudinas disminuyen su expresión, se ha descrito que claudina-3 y claudina-4 se encuentran sobreexpresadas en varios tipos de cáncer como: cáncer de próstata, ovario y páncreas<sup>38</sup>.

Cancer origin	Claudin subtype									
	Claudin-1	Claudin-2	Claudin-3	Claudin-4	Claudin-5	Claudin-7	Claudin-10	Claudin-16	Claudin-18	Claudin-23
Breast	↑↓		↑↓	↑↓		↓				
Lung, adenocarcinoma	↓				↑					
Lung, squamous cell carcinoma	↑				↓					
Esophagus, squamous neoplasia	↑↓		↑	↑		↑↓				
Stomach	↑		↑	↑↓		↑			↑↓	↓
Large intestine	↑↓	↑	↑	↑↓	↑	↑↓				
Liver, hepatocellular carcinoma	↑↓	↑		↓		↑↓	↑			
Biliary tract				↑		↑			↑	
Pancreas	↓		↑	↑	↑				↑	
Bladder				↑↓						
Kidney	↑		↑	↑		↑				
Prostate	↑		↑	↑	↓	↑				
Ovary, epithelial carcinoma	↓		↓	↑	↑	↑		↑		
Uterine cervix	↓	↓		↓		↓				
Uterine corpus			↑	↑		↓				

“↑” increased, “↓” decreased expression in tissue of interest

Tabla 3. Expresión desregulada de claudinas en cáncer originados de distintos órganos. (Modificado de Osanai et. al. 2017)

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

Un factor importante que tiene la desregulación de claudinas en los distintos tipos de cáncer, es la localización de la proteína, debido a que pueden deslocalizarse de la membrana plasmática. Por ejemplo, en cáncer colorrectal está demostrado un aumento en la expresión y deslocalización de claudina-1 hacia citoplasma y núcleo<sup>39</sup>. De manera similar en el adenocarcinoma de pulmón, la claudina-2 se deslocaliza y muestra una distribución nuclear, esto se ha asociado con el aumento en la proliferación de este tipo de células<sup>40</sup>.

Se ha demostrado que los cambios en la expresión de claudinas en células de cáncer es tejido específica, por lo que dichos cambios tienen relevancia funcional en el crecimiento y progresión de cada tipo de cáncer. Estos datos se han obtenido en experimentos de manipulación genética *in vitro* e *in vivo* para demostrar los efectos causales de los cambios en la expresión de claudinas en células cancerígenas<sup>41</sup>. Un modelo de este tipo de experimentos se realizó en células de carcinoma hepatocelular, en las que se indujo la sobreexpresión de claudina-1, promoviendo la TEM a través de la vía de señalización c-Abl/Raf/Ras/ERK<sup>42</sup>. Otros ejemplos de la expresión diferencial de claudinas según el tejido, se presenta en células de cáncer de mama, en las que la pérdida de la expresión de claudina-7 correlaciona con un mal pronóstico, mientras que en cáncer de ovario la sobreexpresión de claudina-7 promueve la invasión<sup>43</sup>.

También se ha reportado a claudina-6 como un marcador altamente sensible para tumores de células germinales, incluyendo seminomas, carcinomas embrionales, tumores de saco vitelino y coriocarcinomas. Claudina-6 está expresada frecuentemente en adenocarcinomas gástricos productores de alfa-fetoproteína y adenocarcinomas pulmonares malignos de tipo fetal. Esta sobreexpresión de claudina-6 en tumores de este tipo se asocia a mecanismos que promueven un fenotipo celular troncal embrionario, lo que parece correlacionar con tumores más agresivos<sup>44</sup>. En cáncer pulmonar la sobreexpresión de claudina-9 se encuentra estrechamente relacionada con el proceso de metástasis, ya que se ve involucrada en procesos de invasión y motilidad<sup>45</sup>.



### 2.5.1 Claudinas y señalización celular en cáncer

Experimentos *in vitro* e *in vivo* demuestran que las claudinas modulan funciones celulares como proliferación y migración a través de procesos clave en la señalización de Notch, Wnt/ $\beta$ -catenina y JAK/STAT-3<sup>46</sup>.

Se ha detallado que el silenciamiento de moléculas como APC (*adenomatous polyposis coli*) y PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), modula la expresión de claudinas, induce la pérdida de la polaridad celular y promueve la TEM. De manera inversa, al modular genéticamente la expresión de claudinas se afectan las cascadas de señalización involucradas, sugiriendo un proceso de regulación a través de retroalimentación<sup>47</sup>. Un ejemplo del proceso mencionado, es la sobreactivación de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina en cáncer de colon, la cual induce la expresión de claudina-1 y claudina-2, y de manera similar la sobreexpresión de claudina-1 induce la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina<sup>48</sup>.

En las células HT-29 de cáncer colorrectal, se ha definido que el factor de crecimiento epidermal (EGF) activa a las vías de ERK1/2 y PI3K-AKT como reguladores importantes para el incremento de la expresión de claudina-3, esto le confiere a la línea celular un aumento en su potencial de invasión<sup>49</sup>. En cáncer de colon la sobreexpresión de claudina-1 modula la señalización a través de Notch alterando las propiedades de barrera y la homeostasis inmunológica, consiguiendo una mayor susceptibilidad a la inflamación asociada a este tipo de cáncer<sup>50</sup>.

Por otro lado, en modelos de cáncer de mama con una baja expresión de claudinas, se ha demostrado que la vía de señalización IL-6/JAK/STAT3 es importante para la formación de tumores en cáncer de mama y está involucrada en el fenotipo de células troncales de cáncer de mama<sup>51</sup>.

### 2.5.2 Claudinas y cáncer gástrico

El cáncer gástrico está clasificado acorde al “sistema de Lauren” en 2 entidades histomorfológicas distintas, el subtipo intestinal y el subtipo difuso, estos difieren en su epidemiología, patogénesis y desenlace clínico<sup>52</sup>.



## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

En un estudio de 118 casos de cáncer gástrico se analizó la expresión de claudina-1, -3,-4 y -5; de manera general, en la mayoría de los casos claudina 4 mostró una sobreexpresión y claudina-5 de manera contraria tuvo una baja expresión. Claudina-1, -3,-4 y -5 manifestaron una mayor expresión en el subtipo intestinal, la expresión de claudina-3 se asocia con un mejor pronóstico para los pacientes con el subtipo intestinal, al contrario de los niveles de expresión del subtipo intestinal, en el subtipo difuso los niveles de expresión de claudina-1, -3,-4 y -5 fueron más bajos, posiblemente la baja expresión de estas claudinas son determinantes para que se presente el subtipo difuso, debido a la pérdida de adhesión entre las células<sup>53</sup>.

La claudina-4 está propuesta como un marcador para lesiones precursoras de adenocarcinoma gástrico, metaplasias intestinales y displasias en el epitelio gástrico. Se ha descrito que las células de cáncer gástrico que expresan claudina-4, muestran un nivel elevado de expresión de metaloproteasas de matriz (MMP) 2 y 9, este comportamiento promueve su invasión. Otros grupos de investigación han propuesto clasificar a los subtipos de cáncer gástrico dependiendo de la expresión de claudinas; claudina-3 y claudina-4 como marcadores del subtipo intestinal y claudina-18 para el subtipo difuso<sup>54,55</sup>.

Hay estudios sobre los niveles de expresión y efectos funcionales de otros miembros de la familia de las claudinas en células de adenocarcinoma gástrico, entre ellos, las claudinas -6, -7 y -9. Esto se debe a que claudina-6 está involucrada en la diferenciación epitelial y en la formación de la barrera de permeabilidad epidermal. A su vez la expresión de claudina-7 ha sido propuesta como un evento temprano en la tumorigénesis gástrica y también se asocia como un marcador del subtipo intestinal del cáncer gástrico. Así mismo, claudina-9 se expresa en etapas del desarrollo y es importante para la unión y comunicación de las células endoteliales<sup>56</sup>.

El análisis de la expresión de claudina-6, -7 y -9 en biopsias de cáncer gástrico, indica que, estas 3 claudinas se expresan en los dos subtipos (intestinal y difuso), con la particularidad de que la expresión es mayor en el subtipo difuso. La expresión

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

elevada de claudina-9 se relaciona con una alta tasa de mortalidad, (66 %) para el subtipo difuso después de 2 años de seguimiento. Por lo que la expresión de claudina-6, -7 y -9 está estrechamente relacionada con la carcinogénesis gástrica y la detección de dichas claudinas son un marcador de pronóstico útil para ambos subtipos de adenocarcinoma gástrico<sup>56</sup>.

La investigación acerca de los efectos de claudina-6, -7 y -9 en cáncer gástrico, se han llevado a cabo en el modelo de línea celular AGS (*human gastric adenocarcinoma*). La transfección de células AGS para la sobreexpresión de claudina-6, -7 y -9, ha permitido dilucidar que estas proteínas inducen un aumento en la tasa de invasión, migración y proliferación; las células que sobreexpresan a las claudinas -6 y 9 tienen una mayor tasa de invasión que las que sobreexpresan a claudina-7<sup>57</sup>. El proceso de invasión en células AGS transfectadas para sobreexpresar claudina-6, -7 y -9 es facilitado por la secreción de MMPs, principalmente MMP-2 y MMP-9. Estas endopeptidasas dependientes de zinc degradan colágena de tipo IV, que forman parte de las membranas basales de los epitelios, por lo tanto se infiere que las células que expresen claudina-6, -7 y -9 tendrán un mayor potencial de invasión<sup>57,58</sup>.

En el CG, el subtipo difuso hace metástasis pero pocas veces lo hace a través de la circulación sanguínea, a diferencia del subtipo intestinal, el cual utiliza de manera principal los vasos sanguíneos<sup>5</sup>. Para que las células de CG logren hacer metástasis a través de la circulación sanguínea, además de secretar MMP's que degraden las membranas basales de los epitelios a los que pertenecen, necesitan formar un microambiente tumoral, compuesto por quimiocinas, factores de crecimiento y citocinas, que alteran la homeostasis del tejido y del endotelio adyacente. Estas moléculas solubles promueven el proceso de metástasis, debido a que provocan un aumento en la permeabilidad de la barrera endotelial y el desensamble de las uniones intercelulares en el endotelio<sup>59</sup>.

## **2.6 Microambiente tumoral del cáncer gástrico**

Estudios sobre el microambiente tumoral, describen una asociación cercana entre la inflamación y el cáncer, esta asociación tiene similitudes con el proceso inflamación crónica que presentan heridas que no pueden sanar. Aproximadamente el 20 % de las muertes por cáncer en el mundo, está asociada con inflamación crónica, lo cual puede conducir al desarrollo de cáncer gástrico, de enfermedad inflamatoria intestinal, de cáncer colorrectal, de carcinoma hepatocelular y de pancreatitis crónica<sup>60</sup>. La inflamación crónica genera un microambiente que facilita la transformación celular y la propagación del cáncer, el daño tisular crónico induce una respuesta de reparación que incluye factores de crecimiento y sobrevivencia, enzimas remodeladoras del tejido y citocinas reguladoras del sistema inmune<sup>61</sup>.

Citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias promueven la progresión del tumor a través de la activación del factor nuclear KB (NF-KB), la sobrerregulación de la angiogénesis y de moléculas de adhesión en el endotelio, estos procesos, promueven la metástasis y la progresión del cáncer. En pacientes con cáncer gástrico avanzado, la mayoría de las citocinas que promueven o suprimen la inmunidad antitumoral del hospedero aparecen con niveles elevados en suero y localmente<sup>62</sup>.

### **2.6.1 Interleucina-8**

**Interleucina-8 (IL-8)** es una citocina de la familia de las quimiocinas CXC, que originalmente se clasificó como un quimioatrayente de neutrófilos y actualmente se conoce que está involucrada en la progresión del tumor y la metástasis en varios tipos de cáncer en humanos. Se ha propuesto que las células tumorales producen IL-8 como un factor de crecimiento autócrino, que promueve el crecimiento del tumor, su invasión y su metastasis<sup>63,64</sup>.

En líneas celulares de adenocarcinoma gástrico (SCG-7901 y TMK-1), se ha mostrado la expresión constitutiva de IL-8 y ha sido asociada experimentalmente tanto *in vitro* como *in vivo* con la tumorigénesis y angiogénesis<sup>65</sup>.

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

Experimentos con la línea celular SCG-7901, muestran que a diferencia de otros tipos de cáncer, la presencia de IL-8 *in vitro*, no ejerce efecto sobre la proliferación de las células, pero si existe una asociación con el crecimiento del tumor *in vivo*. Se sugiere que IL-8 participa en el crecimiento del tumor de manera indirecta, como la inducción de angiogénesis. Además estos estudios muestran que la IL-8 promueve, la adhesión al endotelio, el incremento de la migración celular e invasión; la sobreexpresión de MMP-9, de ICAM y la baja expresión de E-cadherina<sup>66</sup>.

Durante el proceso de metástasis, las células cancerígenas del tumor primario pueden invadir tejidos adyacentes y posteriormente entrar en la circulación sanguínea migrando a través de la pared de los vasos sanguíneos (intravasación); para que se lleve a cabo el proceso de intravasación, es necesario la disrupción de las uniones endoteliales<sup>67</sup>.

Dentro de las alteraciones que se observan en los componentes de las UE, (como claudina-5, ocludina, ZO-1 y JAM-A se encuentran los cambios de la permeabilidad vascular, la cual está regulada por varios factores químicos y biológicos como MCP-1 (*monocyte chemotactic protein 1*), IL-8 y otras citocinas quimiotácticas<sup>68</sup>.

IL-8 es una quimiocina que incrementa la permeabilidad endotelial, a través de la desregulación de las uniones estrechas, de la activación del receptor CXCR2 (que estimula la fosforilación del receptor VEGFR, CXCR2 y VEGFR), de la activación de la vía PI3K/Akt/Rho/Rock, la polimerización de actina y fosforilación de VE-cadherina y ocludina induciendo un remodelamiento de las uniones adherentes y de las uniones estrechas. Se ha observado una desregulación de ocludina que puede estar involucrada con la disminución de expresión de claudina-5 y ZO-1<sup>68</sup>.

### 2.6.2 Interleucina-6

**Interleucina-6 (IL-6)**, es una citocina multifuncional, juega un papel central en los mecanismos de defensa del organismo y promueve el desarrollo de varios tipos de cáncer. La IL-6 evita que las células de hepatoma, de cáncer cervicouterino y de cáncer gástrico entren a apoptosis inducida por radiación UV, generación de

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

radicales libres y fármacos antitumorales. IL-6 está asociada con el estado de la enfermedad y el pronóstico en el cáncer gástrico<sup>69,70</sup>.

El mecanismo propuesto para ejercer estas funciones se refieren a la unión de la IL-6 a su receptor (IL-6R), posteriormente la asociación de IL-6R con gp130, por medio de JAK (*Janus-associated kinase*) y la fosforilación de STAT1 y STAT3, para promover su activación; La activación de STAT3 promueve su translocación al núcleo y se unió a los promotores de genes blanco como ciclina D1, Bcl-2, Bcl-xL, metaloproteasas de matriz extracelular y VEGF, promoviendo su transcripción. Estos genes están implicados en la regulación de la sobrevivencia celular, angiogénesis, evasión del sistema inmune e inflamación en el microambiente tumoral<sup>71</sup>. Está demostrado que la activación de STAT3 juega un papel crucial para la sobrevivencia celular y que su activación constitutiva es un marcador de mal pronóstico en cáncer gástrico humano<sup>72</sup>.

Reportes indican que la IL-6 promueve la motilidad celular e invasión de células AGS, inducidos por la activación de la vía de señalización Src/RhoA/ROCK. La expresión de RhoA en las células AGS correlaciona con la expresión de IL-6, y es un factor de mal pronóstico en pacientes con adenocarcinoma gástrico<sup>73</sup>.

### **2.6.3 COX-2/PGE2**

La ciclooxigenasa es una enzima localizada en la membrana del núcleo y del retículo endoplásmico y es responsable de la conversión de ácido araquidónico en varias prostaglandinas (PGs). Las prostaglandinas son una familia de mediadores lipídicos con diversas funciones biológicas. Los miembros de la familia de las prostaglandinas PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, PGG<sub>2</sub> y PGH<sub>2</sub> están ampliamente distribuidos por el cuerpo y juegan diferentes papeles en el metabolismo<sup>74</sup>.

A la fecha se han reportado dos isoformas de COX. COX-1 y COX-2, aunque comparten un 65% en nivel de homología, la actividad y los niveles de expresión son diferentes para cada enzima. COX-2 está compuesta por 604 residuos de aminoácidos, se expresa solo bajo condiciones fisiológicas específicas, no así en

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

órganos como el riñón y el cerebro donde la expresión es constitutiva. La acción de COX2 se induce por factores de crecimiento y citocinas, esta enzima está involucrada en procesos patológicos como la inflamación y carcinogénesis<sup>75</sup>.

En cáncer gástrico se ha relacionado la sobreexpresión de COX-2, la con el estadio clínico de la metástasis y el subtipo intestinal. De los productos sintetizados por COX-2, se ha reportado que la PGE<sub>2</sub> está sobreexpresada en diversos tumores y está involucrada en la carcinogénesis<sup>76</sup>.

El crecimiento y la metástasis de los tumores depende de la formación de nuevos vasos sanguíneos, PGE<sub>2</sub> promueve la formación de vasos sanguíneos. En cáncer gástrico, la sobreexpresión de COX-2 induce el incremento de PGE<sub>2</sub> y la angiogénesis. Además reportes describen que en el epitelio del colon, la PGE<sub>2</sub> induce la disrupción de las UE, a través de la deslocalización de claudina 4, lo que sugiere que puede estar involucrado en la desregulación de la permeabilidad endotelial<sup>77,78</sup>.

### 3. Justificación

Debido a la alta tasa de mortalidad que provoca el cáncer gástrico, la búsqueda de marcadores, que ayuden a detectar cambios muy tempranos a nivel celular y para su adecuado pronóstico es muy importante. Las claudinas, proteínas transmembranales de las uniones estrechas, cumplen con las características para ser propuestas como marcadores en el cáncer gástrico debido a que su expresión induce un incremento en la proliferación, la migración y la invasividad celular.

Las células cancerígenas secretan factores solubles al medio extracelular formando un microambiente tumoral, formado por moléculas como citocinas, factores de crecimiento y mediadores promover el proceso de metástasis, ya sea a través de los tejidos adyacentes o a través de la circulación sanguínea. Para que la metástasis se lleve a cabo a través de la circulación sanguínea, es necesario que se desensamblen las uniones intercelulares del endotelio, específicamente las uniones estrechas.

# Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

Estudios *in vitro* han demostrado que las células de cáncer gástrico humano (AGS) que sobreexpresan a claudina-6 y claudina-9, inducen la activación de MMP-2 promoviendo la invasividad celular.

Por este motivo, es importante identificar el tipo de citocinas que secretan las células AGS y las diferencias presentes en el microambiente tumoral de las células de cáncer gástrico que sobreexpresan claudina-6 y claudina-9, para determinar su efecto sobre las proteínas que constituyen las UE de las células endoteliales de cordón umbilical y sobre algunos parámetros fisiológicos como la resistencia eléctrica transepitelial.

## 4. Hipótesis

- Debido a que las células AGS que sobreexpresan claudina-6 y claudina-9 incrementan su tasa de proliferación, invasión y migración con respecto a las células control entonces se espera que secreten una mayor concentración de citocinas proinflamatorias.
- Dado que las citocinas proinflamatorias alteran las uniones estrechas, entonces se espera que los sobrenadantes de las células AGS que sobreexpresan claudina-6 y claudina-9 induzcan un cambio drástico en la TER de las células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVECs)

## 5. Objetivos

### *General:*

- Determinar el efecto de las citocinas proinflamatorias secretadas por células AGS que sobreexpresan claudina-6 y claudina-9 sobre las uniones estrechas de HUVECs.

### *Particulares:*

- Identificar las citocinas secretadas por las células AGS y las AGS que sobreexpresan claudina-6 y claudina-9 en medios condicionados.

# Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

- Evaluar el efecto de medios condicionados de células AGS que sobreexpresan a claudina-6 y claudina-9 sobre la TER de HUVECs.
- Caracterizar el efecto de los medios condicionados de células AGS que sobreexpresan claudina-6 y claudina-9 sobre la adhesión leucocitaria en HUVECs, para determinar si la alteración en la TER es un evento independiente de la adhesión leucocitaria.

## 6. Metodología

### 6.1 Líneas celulares

- AGS

Se utilizó a la línea celular AGS, derivada de adenocarcinoma gástrico humano, la cual fue cultivada y propagada en medio Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640 GIBCO), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biowest), 2 mM de L-glutamina (Biowest), 1mg/mL de insulina (PISA), 2 mM de piruvato de sodio (Biowest) y (10,000 U/mL)/(10,000 µg/mL) de penicilina/estreptomina (Biowest). Se utilizaron células AGS previamente transfectadas con el vector pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO para sobreexpresar a claudinas-6 y -9 de forma estable. Se agregó geneticina al medio de cultivo de las células transfectadas para mantener la expresión constitutiva de las claudinas. El cultivo y propagación se mantuvo en condiciones de 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### *Propagación*

Se realizó el cultivo de la línea celular en cajas P100, hasta alcanzar un 90 % de confluencia. Se retiró el medio de cultivo, se realizaron 3 lavados, con 5 mL PBS estéril cada uno, se retiró el PBS y se agregó 500 µL de tripsina (GIBCO). Posteriormente se dejó incubando durante 7 minutos para la pérdida de adhesión celular, se resuspendió el contenido de la caja. Se tomó la suspensión de células/tripsina y se colocó en tubos cónicos de 15 mL con 2 mL de medio de cultivo para inactivar a la tripsina y se centrifugaron los tubos a 1500 rpm durante 5 minutos. Finalmente se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular



## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

con 1 mL de medio de cultivo, se hizo conteo celular, utilizando caja de Neubauer y se sembró la cantidad de células deseada.

### *Congelamiento*

Se utilizaron cultivos al 90 % de confluencia, los cuales fueron lavados con PBS estéril, se tripsinizaron, se colocaron en tubos cónicos de 15 mL, se centrifugaron a 1500 rpm y después posteriormente de resuspender los cultivos con 1 mL de medio, se hizo conteo celular, utilizando caja de Neubauer. Se congelaron  $1 \times 10^6$  células por criovial, en medio de cultivo con glicerol al 10% y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

- U-937

La línea celular U-937, son monocitos derivados de linfoma histiocítico humano, esta línea celular fue utilizada para los ensayos de adhesión celular.

Esta línea fue cultivada y propagada en medio Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640 GIBCO), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biowest), 2 mM de L-glutamina (Biowest), 2 mM de piruvato de sodio (Biowest) y (10,000 U/mL)/(10,000  $\mu\text{g/mL}$ ) de penicilina/estreptomicina (Biowest). El cultivo y propagación se mantuvo en condiciones de  $37^{\circ}\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ .

### *Propagación*

El cultivo se realizó en suspensión en botellas de  $25\text{cm}^2$ . Cuando la densidad celular era aproximadamente del 70 %, se tomó el medio de cultivo con las células y se colocó en tubos cónicos de 15 mL, se centrifugó a 1500 RPMI por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular con 1 mL de medio y se hizo conteo celular utilizando caja de Neubauer y se sembró la cantidad de células deseada.

### *Congelamiento*

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

Se crecieron las células en botellas de 25cm<sup>2</sup> a una densidad aproximada del 70 %, se tomó el medio de cultivo con las células y se colocó en tubos cónicos de 15 mL, se centrifugó a 1500 RPMI por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante, posteriormente se resuspendió el botón celular con 1 mL de medio y se hizo conteo celular utilizando caja de Neubauer. Se congelaron 1X10<sup>6</sup> células por criovial, en medio de cultivo con DMSO (SIGMA) al 5 % y se almacenaron en nitrógeno líquido.

### **6.2 Cultivo primario de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVECs)**

Se aislaron células endoteliales de cordones umbilicales humanos (anexo) y se realizaron cultivos en cajas de Petri P100, se cultivaron y propagaron en medio M-199 suplementado con SFB (Biowest) al 10 %, 20 µg/ml de factor de crecimiento celular para endotelio (SIGMA), 1 UI/ml heparina (PISA), 2 mM de L-glutamina (Biowest) y (10,000 U/mL)/ (10,000 µg/mL) de penicilina/estreptomicina (Biowest). El cultivo y propagación se mantuvo en condiciones de 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### *Propagación*

Se realizó el cultivo en cajas Petri P100 hasta alcanzar el 90 % de confluencia. Se retiró el medio de cultivo en el que estaban, se realizaron 3 lavados, con 5 mL de PBS estéril cada uno, se retiró el PBS y se agregó 500 µL de tripsina (GIBCO), posteriormente se dejó incubando durante 3 minutos para permitir que las células se despegaran de las cajas y pasando el tiempo de incubación se resuspendió el contenido de la caja. Se tomó la suspensión de células/tripsina y se colocó en tubos cónicos de 15 mL, a los cuales se adiciono 2 mL de medio para inactivar a la tripsina, consecutivamente se centrifugaron los tubos a 1500 rpm durante 5 minutos. Finalmente se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular con 1 mL de medio de cultivo, se hizo conteo celular, utilizando caja de Neubauer y se sembró la cantidad de células deseada.

# Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

## *Congelamiento*

Se utilizaron cultivos al 90 % de confluencia, los cuales fueron lavados con PBS estéril, se tripsinizaron, se colocaron en tubos cónicos de 15 mL, se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos y después de resuspender los cultivos con 1 mL de medio, se hizo conteo celular utilizando caja de Neubauer. Se congelaron  $1 \times 10^6$  células por criovial, en una solución 90% de SFB/10% de DMSO y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## **6.3 Obtención de medios condicionados**

Para estudiar el efecto en las UE de HUVECs por las citocinas secretadas por las células AGS, se obtuvieron medios condicionados de células AGS sin transfectar (AGS control), AGS transfectadas solo con el vector (AGS-GFP), células AGS transfectadas para la sobreexpresión de claudina-6 (AGS-Cldn6) y células AGS transfectadas para la sobreexpresión de claudina-9 (AGS-Cldn9).

Para ello se sembraron  $1.5 \times 10^6$  células por caja P100, con medio RPMI-1640 suplementado y con rojo de fenol. Una vez confluentes, se retiró el medio y cada caja se lavó 3 veces con 5 mL de PBS/RPMI (sin rojo de fenol y sin suplementar) (1:1), posteriormente se agregó 8 ml de RPMI-1640 sin suplementar, se esperó 24 y 48 horas, y al terminar cada tiempo se tomó el sobrenadante de cada caja y se colocó en tubos cónicos de 15 mL, se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se concentró 10 veces utilizando amicones estériles de 10 kDa y se centrifugó a 4000 rpm por 25 minutos. El concentrado obtenido se filtró en membranas de  $0.22 \mu\text{m}$  para garantizar la esterilidad. Finalmente se colocaron en tubos de 1.5 mL y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## **6.4 Determinación de citocinas en medios condicionados**

Para determinar el tipo de citocinas proinflamatorias presentes y sus concentraciones se utilizó el kit comercial de citometría de flujo (CBA/Human inflammatory cytokines-BD).

Este kit utiliza perlas de captura acopladas a anticuerpos contra las diferentes citocinas proinflamatorias. Primeramente, se preparó la mezcla de perlas de captura

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

de citocinas (IL-8, IL-6, IL-2, INF-gamma, IL-1 $\beta$  e IL-10) y se preparó la curva estándar por diluciones seriadas a partir de un vial de citocinas liofilizadas. A todos los tubos tanto de la curva estándar como los de las muestras agregaron 50  $\mu$ L de la mezcla de perlas de captura. A los tubos donde se analizaron las muestras se colocó 50  $\mu$ L del medio condicionado y 50  $\mu$ L del reactivo de revelado. Finalmente se dejó incubar por 3 horas y se llevó a tomar la lectura cuantificó en un citómetro FACScalibur. La determinación de citocinas se realizó para cada condición por triplicado.

### **6.5 Caracterización de la TER en HUVECs**

Se determinó el comportamiento de la TER después de que las células HUVEC fueron estimuladas con medios condicionados de 48 horas, de células AGS control y AGS transfectadas, con la intención de conocer la integridad de la barrera permeable formada por las UE.

Para ello se utilizó un lector automatizado de la TER (xCELLigence). Primeramente, se sembraron en pozos de 0.32 cm<sup>2</sup> 6.5X10<sup>4</sup> células HUVEC por pozo, estos pozos por debajo del área de cultivo cuentan con microelectródos que sensan la TER, el cultivo se mantuvo en medio M-199 en condiciones de 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se esperó 23 horas hasta que se estabilizó la TER en cada pozo, entonces se agregaron a cada pozo los estímulos, como control positivo se agregó 10 ng/mL de TNF- $\alpha$ , a los pozos donde se estimuló con los medios condicionados, se colocaron 100  $\mu$ L de medio M-199 y 100  $\mu$ L del medio condicionado. Se programó al lector para que tomara los datos cada 10 minutos. La caracterización de la TER se realizó por triplicado para cada condición.

### **6.6 Marcaje de células U937 con timidina tritiada para los ensayos de adhesión**

Se cultivó la línea celular U-937, derivada de monocitos de leucemia humana, en medio RPMI-1640 suplementado con timidina tritiada (1 $\mu$ Ci/mL), se mantuvo en condiciones de 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>, durante 48 horas. La timidina tritiada es un isotopo capaz de incorporarse al DNA; al lisar estas células es posible medir la

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

radiación que emiten e inferir el porcentaje de células presentes en un experimento. Cuando terminó el tiempo de marcaje se lavaron las células con PBS estéril y se resuspendieron en medio M-199.

### **6.7 Ensayos de adhesión en HUVECs**

Se realizaron ensayos de adhesión de células U937 para determinar el efecto de medios condicionados de células AGS Cldn-6 y Cldn-9 provocaban un efecto distinto que las células AGS control, sobre la adhesión en las HUVECs.

En placas de 24 pozos, se sembraron  $4 \times 10^5$  de HUVECs por pozo en medio M-199 en condiciones de  $37^\circ \text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Cuando las células alcanzaron la confluencia, se retiró el medio que tenían, se realizaron 3 lavados con PBS estéril y posteriormente se agregaron los estímulos durante 3 horas: como control negativo medio M-199, como control positivo medio condicionado de células MDA-321 y los diferentes medios condicionados de células AGS control y AGS transfectadas de 24 y 48 horas. A continuación, se agregaron las células U-937 previamente marcadas con timidina tritiada a una densidad de  $2 \times 10^5$  células U-937/cm<sup>2</sup> y se dejaron en co-cultivo durante 3 horas. Al concluir este tiempo se realizaron 3 lavados con PBS estéril y se lisaron los co-cultivos con 500  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.2 nM por pozo. Consecutivamente los lisados celulares se mezclaron con 5 mL de líquido de centelleo y la radioactividad se detectó en un lector de emisiones beta (1600 TR Packard, USA). Los ensayos de adhesión se realizaron por triplicado para cada condición.

### **6.8 Determinación de PGE2 en medios condicionados.**

Para determinar la concentración de PGE2 presente en los medios condicionados, se usó un kit comercial (Prostaglandin E<sub>2</sub> ELISA Kit-Monoclonal, Cayman CHEMICAL).

En primera instancia se preparó el amortiguador de ELISA y el amortiguador de lavado según las indicaciones del fabricante y se preparó el estándar de PGE2, reconstituyendo el vial con 1 mL de amortiguador de ELISA. Se preparó la curva

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

estándar en tubos de 1.5 mL realizando diluciones seriadas a partir del estándar de PGE2. El ensayo se hizo en una placa de 96 pozos pretratada para el reconocimiento de PGE2. Se colocaron 50  $\mu$ L de medio RPMI-1640 como blanco, 50  $\mu$ L de cada tubo de la curva estándar por duplicado, 50  $\mu$ L de cada medio condicionado, consecutivamente se añadieron 50  $\mu$ L de anticuerpo monoclonal contra PGE2 en cada pozo a excepción de los blancos. Se cubrió la placa con película plástica y se incubó a 4°C por 18 horas, se eliminó el medio que había en los pozos y se realizaron 5 lavados con el amortiguador de lavado, se agregó 200  $\mu$ L del reactivo revelado a cada pozo, se cubrió la placa con película plástica y se incubó por 1 hora cubriendo la placa de la luz. Finalmente se cuantificaron las concentraciones en un lector de placas de ELISA a 405 nm por medio de un software indicado por el fabricante.

### **6.9 Análisis estadístico de los datos**

Las concentraciones de citocinas en los medios condicionados, los datos de los ensayos de adhesión y la concentración de PGE2 en los medios condicionados, se analizaron utilizando un software de análisis estadístico (GraphPad 7.02), con la finalidad de valorar si existían diferencias significativas. Se realizó el análisis de los datos utilizando ANOVA de una vía, con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ , se utilizó como estadística descriptiva el promedio y desviación estándar.

## **7. Resultados**

### **7.1 Citocinas en medios condicionados**

Los medios condicionados de las células AGS, así como de las AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-9, mostraron cantidades significativas de IL-8 e IL-6. Dichas concentraciones aumentaron tres veces más a las 48 h.

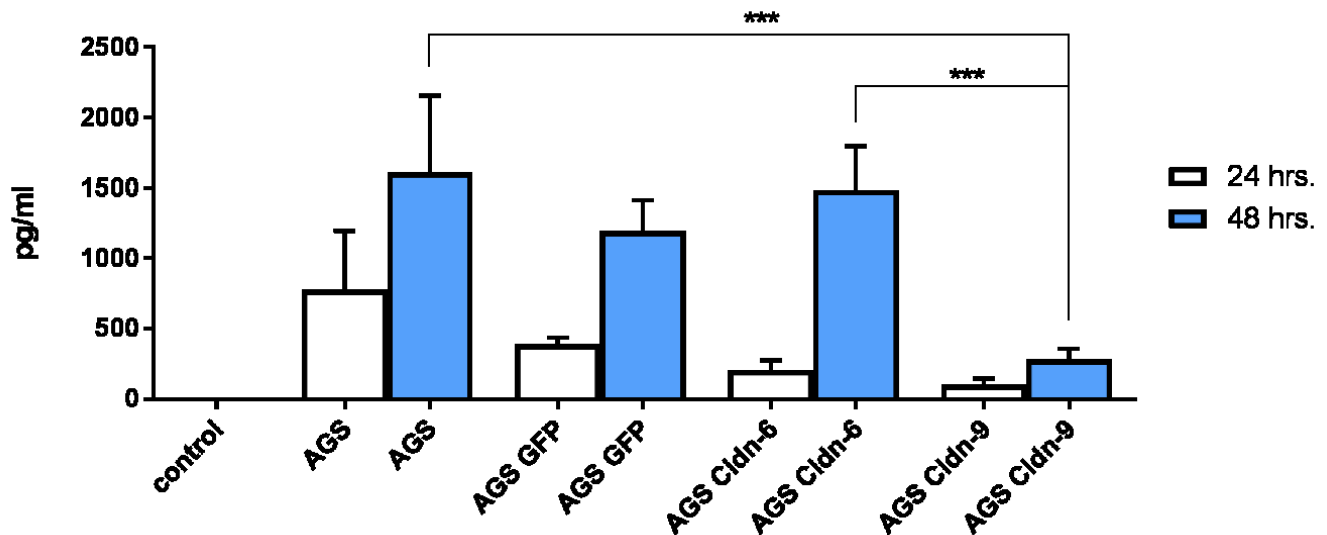
La concentración de IL-8 fue similar en todos los medios condicionados, promedio de 455 pg/mL a las 24 horas y 1429 pg/ml a las 48 horas, a excepción de los medios condicionados de las células AGS-Cldn-9, donde el promedio fue de 101pg/mL a las 24 horas y 278 pg/ml a las 48 horas, esta fue aproximadamente 4 veces menor

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

que la observada en las AGS control y las AGS-Cldn-6. La concentración de IL-6 solo fue detectable en medios condicionados de 48 horas para todas las condiciones y las concentraciones de IL-6 fueron similares (entre 15 y 30 pg/ml), a excepción de la concentración de las células AGS-Cldn-6, en donde la concentración de IL-6 fue aproximadamente la mitad de la concentración observada en las demás condiciones (10 pg/ml). (Fig.7)

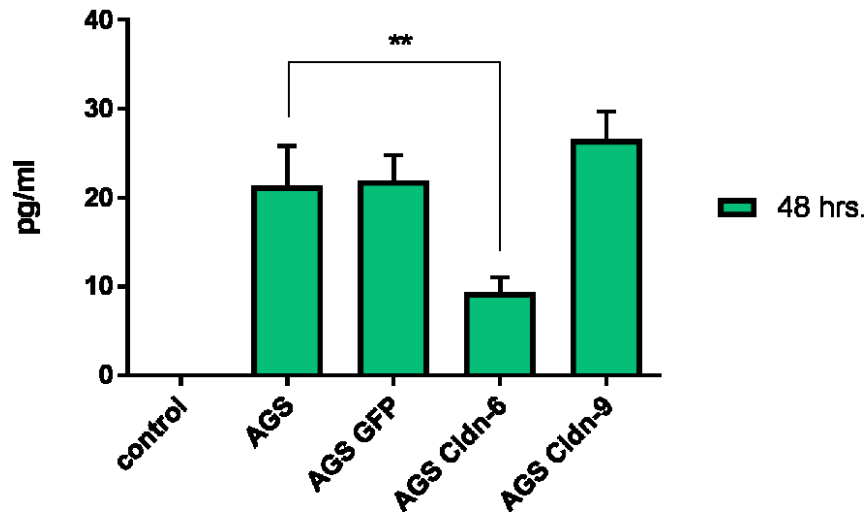
Cabe mencionar que con las técnicas utilizadas en este proyecto, las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-10 y TNF $\alpha$  no fueron detectadas en ninguno de los medios condicionados.

A)



## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

B)



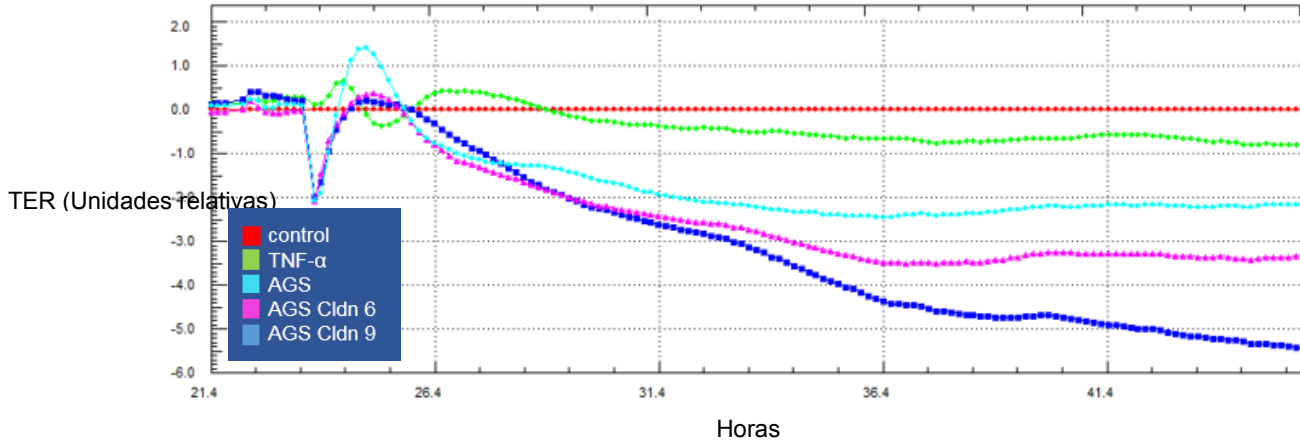
**Figura 7. Concentración de citocinas en medios condicionados.** a) Cuantificación de IL-8 por citometría de flujo en medios condicionados de células AGS control (AGS y AGS GFP) y en las células AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-9 obtenidos a las 24 y 48 horas de incubación. b) Cuantificación de IL-6 por citometría de flujo en medios condicionados de células AGS control (AGS y AGS GFP) y en AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-9 obtenidos tras 48 horas de incubación. Control= medio RPMI-1640 sin suplementar, AGS-GFP= Células AGS transfectadas con el vector y GFP como gen reportero. Los experimentos se realizaron por triplicado. (\*\*)=  $p < 0.01$ . (\*\*\*) =  $p < 0.001$ .

### 7.2 Efecto de los medios condicionados sobre la TER en HUVECs

Posterior al tiempo de estabilización de la TER y la sucesiva adición de los medios condicionados (23 horas), la TER disminuyó en todas las condiciones. Los medios condicionados de las células AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-9, produjeron una caída más abrupta que el medio de las células AGS control. Aproximadamente después de las 36 horas de lectura, la TER disminuyó en las HUVECs incubadas con los medios condicionados de células AGS y células AGS-Cldn-6 alcanzando su nivel más bajo y se mantuvo hasta las 45 horas de monitoreo. La TER de las HUVECs estimuladas con los medios condicionados de células AGS-Cldn-9 se mantuvo disminuyendo (Fig. 8).



## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS



**Figura 8. Disminución de la TER por los medios condicionados de células AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-9.** Determinación de la TER en HUVECs estimuladas con medios condicionados de células AGS control y células AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-9. Las lecturas se hicieron cada 10 minutos en un lector automatizado (xCELLigence). Control= medio M-199 sin suplementar, TNF- $\alpha$ =10 ng/mL, AGS GFP= Células AGS transfectadas con el vector vacío.

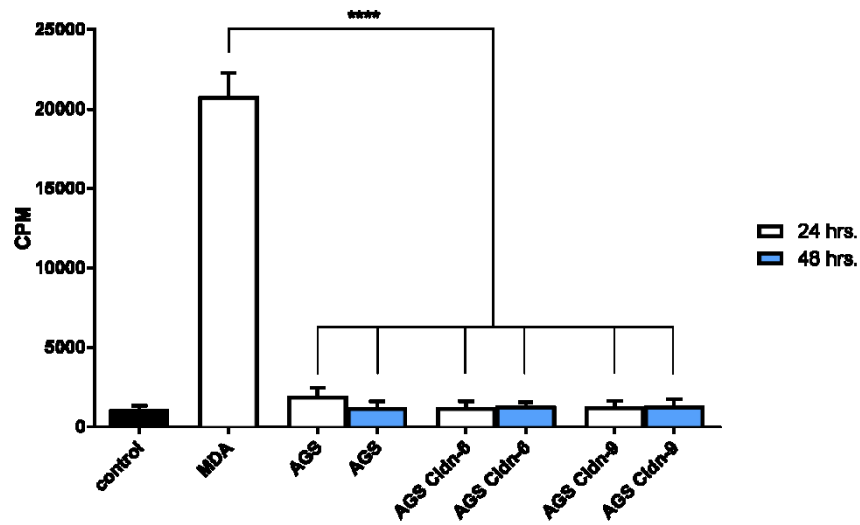
### 7.3 Efecto de los medios condicionados sobre la adhesión leucocitaria en HUVECs

Ninguno de los medios condicionados indujo incremento o disminución de la adhesión de células U937 en las HUVECs. Los niveles de adhesión observados cuando las HUVECs fueron incubadas con los medios condicionados, fueron los mismos que los observados con los medios de las células AGS control. Los resultados observados con el control positivo (sobrenadante de la línea celular de cáncer de mama MDA-231) y el control negativo (medio M-199) fueron los esperados (Fig. 9).

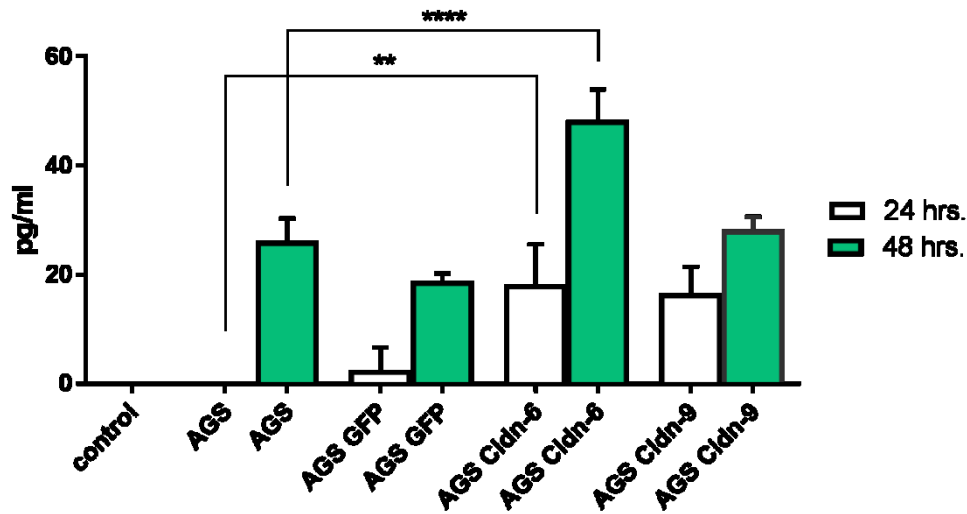
### 7.4 Determinación de PGE2 en medios condicionados

La concentración de PGE2 en medios condicionados de células AGS-Cldn-6 (18.2 pg/ml) y AGS-Cldn-9 (16.5 pg/ml) tomados a las 24 horas, fue significativamente mayor, dado que no se detectó PGE2 en los medios de las células AGS control. De los medios condicionados a las 48 h. solo los de las células AGS-Cldn-6 (48.3 pg/ml) mostraron una diferencia significativa respecto a la concentración de PGE2 (Fig.10).

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS



**Figura 9. Cuantificación de la radioactividad como medida indirecta de la adhesión de células U937 en HUVECs.** Las lecturas se hicieron después de la estimulación con medios condicionados de células AGS control, células AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-9. Las lecturas se hicieron en un lector de emisiones beta. CPM=cuentas por minuto, control= medio M-199 sin suplementar, MDA= control positivo, AGS GFP= Células AGS transfectadas con el vector vacío (\*\*\*\*)= $p < 0.0001$ .



**Figura 10. Concentración de PGE2 en medios condicionados de células AGS.** La concentración de PGE2 de medios condicionados colectados a las 24 y 48 h. se cuantifico por ensayos de ELISA. La cuantificación se hizo en un lector de placas de ELISA a 405 nm. Control= medio M-199 sin suplementar, AGS GFP= Células AGS transfectadas con el vector vacío. AGS-Cldn-6= Células AGS transfectadas que sobreexpresan claudina-6. AGS-Cldn-9= Células AGS transfectadas que sobreexpresan claudina-9. (\*\*)= $p < 0.01$ , (\*\*\*\*)= $p < 0.0001$ .

## 8. Discusión

Las UEs, cumplen con funciones fisiológicamente importantes, como formar una barrera semipermeable, regular el paso de iones y regular la polaridad celular. En células endoteliales, las UEs regulan también el paso de células del sistema inmune a través de la vía paracelular. Sin embargo, el ensamble o desensamble de estas uniones es regulada por diversos factores entre los cuales se encuentra el microambiente tumoral formado por los factores solubles secretados por las células cancerígenas<sup>29</sup>.

Este microambiente influye en el comportamiento integral del entorno y de las mismas células transformadas. El endotelio como parte de este entorno, está bajo el efecto de citocinas, mediadores lipídicos como las prostaglandinas, metaloproteasas de matriz y factores de crecimiento, por lo que las UEs pueden ser directamente afectados por estos<sup>61</sup>.

Previo al presente estudio, nuestro grupo de investigación caracterizó la sobreexpresión de claudina-6, -7 y -9 en biopsias de cáncer gástrico y posteriormente, se demostró que las claudinas-6 y -9 incrementan la tasa de proliferación, de invasividad y de migración de las células AGS.<sup>56,57</sup>.

Con el fin de determinar si los factores solubles presentes en los medios condicionados de las células AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-9 inducen cambios en las UEs de las células endoteliales, nuestro trabajo se enfocó en identificar las citocinas proinflamatorias presentes en estos medios condicionados.

Los resultados indicaron la presencia de IL-8 e IL-6 y ausencia de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-10 y TNF $\alpha$ , en todos los medios condicionados de las células evaluados. En cuanto a las concentraciones de IL-8, los medios condicionados de las células AGS-Cldn-9 mostraron concentraciones bajas de IL-8 (101pg/mL a las 24 horas y 278 pg/ml a las 48 horas). Los medios condicionados de las células restantes no mostraron diferencias significativas en la concentración de esa citocina. En promedio la concentración estuvo entre: 455 pg/mL a las 24 horas y 1429 pg/ml a las 48 horas.

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

En lo que se refiere a la IL-6 los resultados mostraron que los medios condicionados de las células AGS-Cldn-6 tuvieron las concentraciones más bajas (9 pg/ml). Los medios condicionados de las células restantes revelaron en promedio concentraciones de IL-6 de 23 pg/ml.

En el presente proyecto esperábamos que las células AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-9 mostraran mayores concentraciones de citocinas proinflamatorias en los medios condicionados, respecto a las células AGS control, sin embargo los resultados mostraron que no existe tal aumento y en todas las condiciones parecen mostrarse un concentraciones similares, pero de manera contraria a lo esperado, la sobreexpresión de claudina-6 correlaciona con una disminución en la concentración de IL-6 y la sobreexpresión de claudina-9 correlaciona con la disminución en la concentración de IL-8. A la fecha no se ha descrito una relación entre estas proteínas, quizá los efectos observados en la disminución de las interleucinas podrían explicarse mediante la inhibición de su transcripción, por procesos de inhibición en el entrecruzamiento de vías de transducción de señales.

Se ha demostrado *in vitro e in vivo* que IL-8 en cáncer de colon es un factor de crecimiento autócrino, que aumenta procesos como la permeabilidad vascular y la angiogénesis, pero aunque la mayoría de las condiciones presenta concentraciones similares, las células AGS-Cldn-9 posiblemente al mostrar una concentración menor, represente una ventaja al ser menos inmunogénico. De manera parecida, las células AGS-Cldn-6 muestran una concentración menor de IL-6 que las demás condiciones, puede parecer una desventaja para estas células ya que se ha caracterizado que IL-6 induce la migración e invasividad celular, pero nuestros resultados sugieren que estas células son menos inmunogénicas y es posible que esta sea la razón por la cual el cáncer gástrico tenga una alta tasa de mortalidad al no poder ser detectado por el sistema inmune y poder montar una respuesta en contra<sup>63-73</sup>.

Basándonos en estudios previos, se supuso que la integridad de la barrera formada por las uniones estrechas se iba a modificar en función de la concentración

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

disponible de IL-8 en los medios condicionados. Ya que la unión de IL-8 a su receptor (CXCR2) fosforila al receptor de VEGF (VEGFR) en una forma de transactivación, esta acción promueve que el endotelio incremente su permeabilidad a través de la activación de la vía PI3K/Akt/Rho/Rock, de la polimerización de actina y la fosforilación de VE-cadherina y ocludina.

Así que para determinar si hay cambios en la integridad de la barrera semipermeable que forman las UEs en las células endoteliales se midió la TER, un parámetro funcional es ampliamente aceptado para conocer la dinámica de las UEs en los epitelio o endotelios<sup>79</sup>.

Los resultados del comportamiento de la TER en las HUVECs, tras ser estimuladas con los medios condicionados de 48 horas de todas las células evaluadas mostraron que contrario a lo que se esperaba, el cambio en la TER no está en función directa de las concentraciones que se han caracterizado de IL-8, ya que el efecto observado con los medios condicionados de AGS-Cldn-9, fueron los que provocaron la mayor caída en la TER, aunque estos medios contenían la menor concentración de IL-8. A pesar de esto, nuestra hipótesis inicial se cumplió parcialmente, pues aunque la caída en la TER no fue mediada directamente por IL-8, los medios condicionados de las células transfectadas produjeron una mayor caída de la TER. Esto sugiere que los factores solubles (dentro de los cuales pueden estar las citocinas) presentes en los medios condicionados de las células AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-9, provocan una mayor alteración en la integridad de la barrera endotelial mediada por uniones UEs.

De acuerdo a lo obtenido en los resultados de la TER, se analizó si la caída en esta era independiente del proceso de adhesión leucocitaria en las células endoteliales, pues se ha descrito que los factores solubles secretados por células cancerígenas reclutan células del sistema inmune y que la adhesión de esas células inducen una cascada de señalización que desensambla las UEs endoteliales para que los leucocitos puedan intra y extravasar el endotelio hacia el tejido de donde provienen las señales de quimiotaxis<sup>32</sup>.

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

Se conoce que TNF $\alpha$  y IL-1 $\beta$  son las principales citocinas que inducen la activación del endotelio. Cuando el endotelio se activa, expresa de moléculas de adhesión como selectinas e integrinas, con las cuales las células del sistema inmune interaccionan para adherirse al endotelio. Los experimentos en los que se determinó la secreción de citocinas, indicaron que IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  estaban ausentes en nuestros medios condicionados, lo que sugiere que la adhesión leucocitaria, no está involucrada en la alteración de la integridad de la barrera endotelial reflejada en los parámetros de la TER. Sin embargo no se descarta la posibilidad de que algún otro factor soluble estuviese activando a las células endoteliales<sup>32</sup>.

Los experimentos de adhesión leucocitaria confirmaron esta hipótesis, pues ninguno de los medios condicionados indujo adhesión en las HUVECs. La explicación está soportada como se mencionó anteriormente por la ausencia de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  como las principales citocinas activadoras del endotelio. Lo cual indica que la caída en la TER provocada por los medios condicionados de las células AGS, alteran la integridad de la barrera endotelial independientemente de los procesos asociados a la adhesión leucocitaria. Esto sugiere indirectamente que otros factores solubles presentes en los medios condicionados, ejercen la caída de la TER.

Otro factor secretado por células de cáncer gástrico, la PGE2 podría tener efecto sobre la integridad de la barrera endotelial. En varios tipos de cáncer, entre ellos el cáncer gástrico, la enzima COX-2 encargada de transformar ácido araquidónico para producir PGE2 se sobreexpresa, consecuentemente la producción de PGE2 se ve aumentada, además se ha descrito que ejerce efectos angiogénicos sobre el endotelio y hay evidencia de que desregula proteínas de las uniones estrechas como claudina-4 por lo que se determinó si PGE2 podría estar contribuyendo con la disminución de la TER<sup>76-78</sup>.

Los resultados de la caracterización de PGE2 muestran que los medios condicionados de las células AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-9 tienen concentraciones más altas (17pg/ml y 38 pg/mL a las 24 y 48 horas respectivamente) que las células AGS control (1 pg/ml y 22 pg/mL a las 24 y 48 horas respectivamente). Este indicio

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

sugiere que PGE2 puede influir en la caída drástica de la TER. Sin embargo, el resultado individual de la concentración de PGE2 en los medios condicionados de células AGS-Cldn-9 (28pg/mL a las 48 horas) no revela una diferencia significativa con respecto a las células AGS control (26 pg/ml). Aunado a que la concentración de IL-8 en este medio condicionado es baja (101pg/mL a las 24 horas y 278 pg/ml a las 48 horas).

Debido a que no existe una correlación directa entre las concentraciones de IL-8, PGE2 y el comportamiento observado en la TER resta por estudiar otros factores solubles que están regulando la caída de la TER en las HUVECs. Uno de los factores solubles que puede estar involucrado es el VEGF (*vascular endothelial growth factor*), ya que se ha reportado que esta proteína tiene la facultad de aumentar la permeabilidad endotelial y estudios en humanos de biopsias de cáncer gástrico muestran la presencia de esta proteína, la cual está asociada a un mal pronóstico<sup>80,81</sup>.

Cuando la barrera endotelial se vuelve laxa, propicia procesos de angiogénesis y la extravasación de células cancerígenas al torrente sanguíneo. Dado que las células de cáncer gástrico que expresan a las claudinas -6 y -9 promueven el crecimiento y la posibilidad de hacer metástasis, los factores solubles con los que forman su microambiente tumoral podrían ejercer una alteración mayor en la barrera endotelial<sup>67</sup>.

Una explicación sobre los resultados obtenidos en nuestro estudio, con los medios condicionados de las células AGS en los que no se indujo adhesión en las HUVECs, es que si esto sucede *in vivo*, podría representar una ventaja para el tumor y su desarrollo, porque a pesar de que secreta una potente quimiocina (IL-8), no secreta factores que puedan activar al endotelio para expresar moléculas de adhesión que permitan que leucocitos lleguen al sitio del tumor, lo que le confiere la ventaja de evadir el reconocimiento por monocitos (Fig.11).

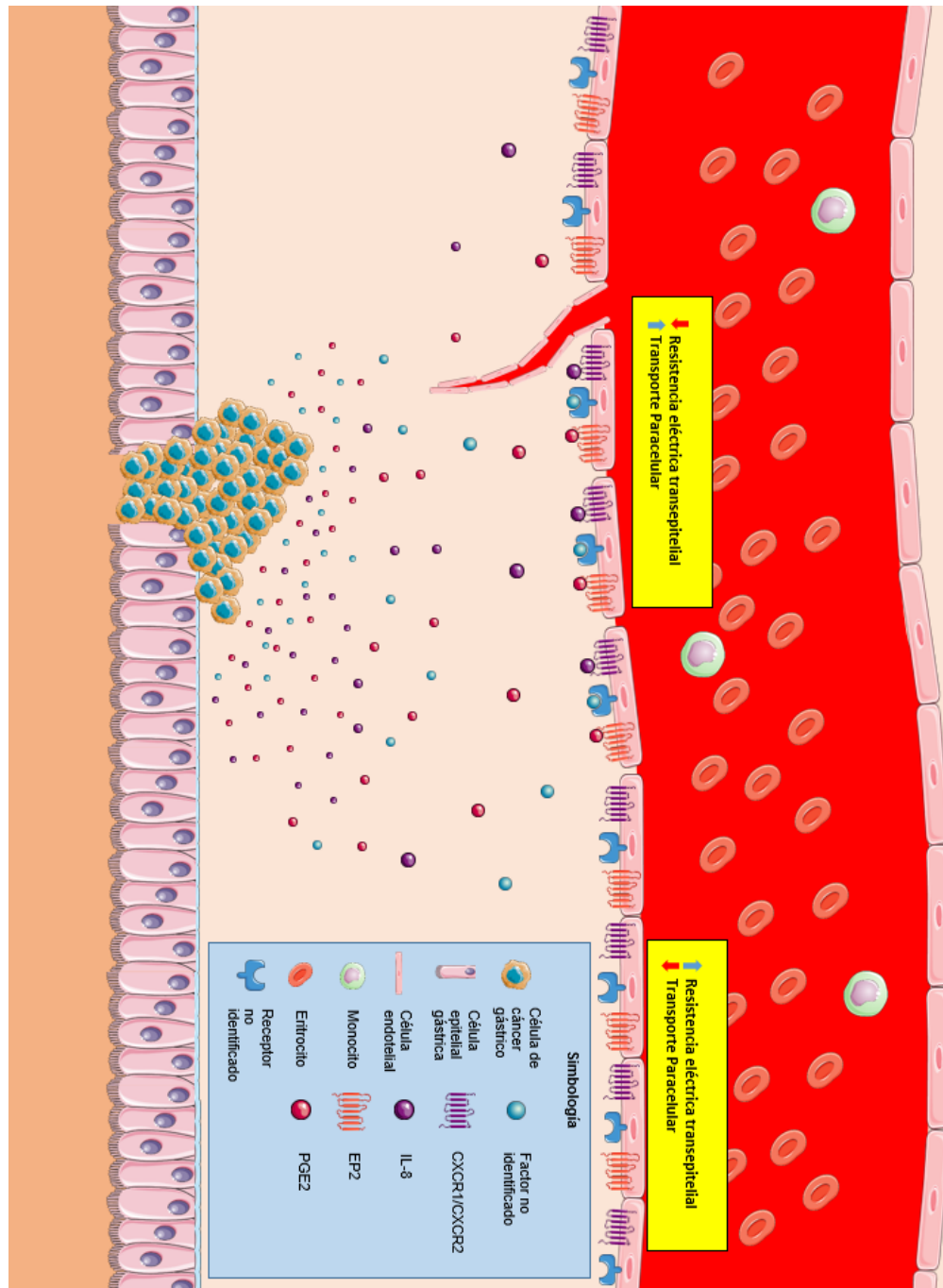
## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

En conclusión, podemos mencionar, que al parecer el cáncer gástrico orchestra muchos factores a su favor, como los que hemos mencionado en este trabajo, pero cabe destacar la presencia de claudina-6 y claudina-9 en las células que provocan dichos efectos, dando crédito a su correlación con la progresión de esta enfermedad, razón por la cual seguiremos proponiendo a estas proteínas como marcadores de pronóstico y estudiando el comportamiento de las células que las expresan.



# Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS



**Figura 11. Efecto de factores solubles secretados por células de cáncer gástrico sobre células endoteliales.**

## 9. Conclusiones

- La sobreexpresión de claudinas-6 y -9 disminuye significativamente la TER en HUVECs.
- La disminución observada de la TER en todas las condiciones, es un efecto independiente de la adhesión leucocitaria.
- La sobreexpresión de claudina-9 disminuye la secreción de IL-8.
- Las células AGS-Cldn-6 y AGS-Cldn-6 secretan concentraciones significativas de PGE2.
- IL-8 y PGE2 ejercen un efecto sobre la integridad de las UEs en el endotelio, sin embargo, existen otros factores aun no identificados en los medios condicionados, que también pueden alterar a las UEs.

## 10. Perspectivas

Debido al efecto que ejercen los factores solubles observados en este estudio sobre la TER de HUVECs será importante determinar: 1) que proteínas de las UEs se alteran en cuanto a su localización o expresión, 2) Estudiar que otros factores solubles pueden estar alterando las UEs del endotelio, 3) Estudiar los mecanismos de adhesión e invasividad de las células AGS con las células endoteliales.

Conocer todos estos aspectos será importante para entender los mecanismos que usan las células de cáncer gástrico que expresan claudina-6 y claudina-9 en la progresión de esta enfermedad, además de dar soporte al uso de estas 2 proteínas como marcadores pronóstico.

## 11. Anexo

### 11.1 Protocolo para aislar células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVECs)

*Material estéril por cada cordón umbilical a procesar:*

- Colagenasa tipo II liofilizada (GIBCO) al 0.01 % en HEPES.

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

- Tubo cónico de 50 ml para centrifugar con 2ml de medio M-199 solo con 10% de suero bovino fetal.
- 1 tubo cónico de 50 ml lleno con PBS.
- Un frasco con 300 ml de solución salina donde se pueda incubar el cordón.
- 1 bolsa chica de plástico para tapar el frasco con solución salina cuando tenga el cordón.
- Papel (estraza 90X45cm para cubrir perfectamente la plancha de la campana).
- 1 hoja de papel aluminio del mismo tamaño que el papel estroza.
- 2 pinzas quirúrgicas "Kelly".
- 2 cinchos de electricista.
- 1 jeringa de 10 ml.
- 1 cánula de metal.
- 1 recipiente para desechar la sangre del cordón.
- 3 gasas.
- Aspersor con etanol al 70 %.
- 2 pares de guantes desechables de látex y lentes de protección.
- 1 campana de flujo laminar de nivel 2 de bioseguridad.
- 1 baño maría que se pueda ajustar a 37°C de temperatura-
- Gelatina para las placas (piel de cerdo al 0.2% en PBS).
- 1 placa Petri P60 para cultivo celular.
- 4 ml de medio M-199 suplementado con mitógeno endotelial, heparina y glutamina y 10% de suero bovino fetal.

### *Procedimiento:*

1. Agregar gelatina a una placa P60 hasta que se cubra toda la superficie, retirar el excedente, dejar mínimo 15 minutos en la incubadora a 37 °C.

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

2. Posteriormente aspirar la gelatina y colocarle los 4ml de M-199 suplementado para que la gelatina absorba algunos nutrientes y sea una mejor matriz celular, dejar la placa dentro de la incubadora hasta que se vayan a sembrar las células HUVEC.
3. Colocarse doble guante en cada mano.
4. Limpiar la campana con etanol al 70 %.
5. Colocar el PBS, la solución salina, y el tubo con medio a 38°C en un baño maría.
6. Colocar la hoja de papel estroza en la campana seguido de la hoja de papel aluminio para la protección de la campana.
7. Acomodar las pinzas, jeringas, cánulas, gasas etc. a utilizar dentro de la campana.
8. Meter el PBS y el tubo con medio ya tibio, dentro de la campana, dejar el frasco con solución salina para que se mantenga caliente. Colocar la colagenasa a entibiarse con el afán de que no esté mucho tiempo calentándose porque puede ir perdiendo actividad.
9. Colocar el cordón sobre la campana y limpiar la sangre exteriormente con etanol al 70 % y una gasa, exprimir los extremos para sacar los coágulos posibles de forma manual.
10. Meter una cánula en la vena (que es la que tiene el lumen más grande), asegurar la cánula por fuera con una pinza.
11. Ocluir con 2 dedos el extremo no canulado del cordón, posteriormente inyectar con una jeringa PBS al cordón, a través de la cánula, hasta que se vuelva turgente y el embolo de la jeringa se oponga a seguir empujando. Esta maniobra permite corroborar que el cordón no tiene fugas y simultáneamente se puede estimar cuanto volumen le cabe a la vena para llenarla posteriormente con colagenasa.
12. Consecuentemente se desecha la solución en el recipiente de desecho, tratar de exprimir el cordón y notar el color de la solución que sale, si es color sangre volver a pasar PBS hasta que se salga transparente (2 o 3 lavados).

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

13. En caso de detectar una fuga, cortar el cordón a la altura de la fuga y repetir el paso anterior, evitar apretar las pinzas constantemente, como tiene dientes pueden perforar el cordón.
14. Sellar el extremo no canulado con un cincho de electricista y colocar otro cincho por debajo de la pinza.
15. Inyectar colagenasa al 0.01 % hasta que el cordón se vuelva turgente otra vez (aproximadamente 15 ml).
16. Colocar el cordón dentro del frasco con solución salina, taparlo con la bolsa e incubarlo en el baño maría 15 minutos a 37 ° C.
17. Succionar con la jeringa un poco de colagenasa para poder masajear, después del masaje se pinza el extremo no canulado del cordón (con las pinzas que no se habían usado hasta ahora) por encima del cincho y se corta dicho extremo por debajo de la pinza, posteriormente se deja caer la solución en el tubo falcón con medio para centrifugar.
18. Rellenar el cordón con PBS, repetir el masaje y recolectar el PBS en el tubo para centrifugar.
19. Repetir el paso anterior.
20. Centrifugar el tubo a 1200 RPM por 10 minutos.
21. Desechar el sobrenadante, cuidando de no tirar el botón celular.
22. Resuspender el botón con 3 ml de medio suplementado (previamente llevado a 37°C).
23. Agregarlo en la placa e incubar a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>.
24. Al otro día hacer 3 lavados con PBS para lavar la sangre y ver si se obtuvieron células HUVEC (en caso de que aún se observen estructuras flotando como eritrocitos se pueden realizar más lavados).
25. Colocar medio suplementado nuevamente e incubar a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>.
26. Cambiar el medio de cultivo cada tercer día.

## 12. Bibliografía

1. GLOBOCAN. Fact Sheets by population in Mexico. 1–4 (2012). Available at: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx). (Accessed: 25th April 2017)
2. Ming, S. Chun, C. Gastric carcinoma: A pathobiological classification. *Cancer* **39**, 2475–2485 (1977).
3. Hu, B. *et al.* Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *Journal of Gastrointestinal Oncology* (2012). doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2012.021
4. Alizadeh, A. M., Shiri, S. & Farsinejad, S. Metastasis review: from bench to bedside. *Tumor Biology* **35**, 8483–8523 (2014).
5. Riihimäki, M., Hemminki, A., Sundquist, K., Sundquist, J. & Hemminki, K. Metastatic spread in patients with gastric cancer. *Oncotarget* **7**, 52307–52316 (2016).
6. Marrelli, D. *et al.* Different patterns of recurrence in gastric cancer depending on Lauren's histological type: Longitudinal study. *World J. Surg.* **26**, 1160–1165 (2002).
7. Perez-Moreno, M., Jamora, C. & Fuchs, E. Sticky business: Orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* (2003). doi:10.1016/S0092-8674(03)00108-9
8. Knust, E. & Bossinger, O. Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science* (80-. ). **298**, 1955–1959 (2002).
9. Cavallaro, U. & Dejana, E. Adhesion molecule signalling: not always a sticky business. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 189–197 (2011).
10. Yonemura, S. Cadherin-actin interactions at adherens junctions. *Current Opinion in Cell Biology* **23**, 515–522 (2011).
11. Harris, T. J. C. & Tepass, U. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 502–514 (2010).
12. Kowalczyk, A. P. & Green, K. J. Structure, function, and regulation of desmosomes. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **116**, 95–118 (2013).
13. Sawada, N. Tight junction-related human diseases. *Pathology International* **63**, 1–12 (2013).
14. Capaldo, C. T. & Nusrat, A. Claudin switching: Physiological plasticity of the Tight Junction. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **42**, 22–29 (2015).
15. Shen, L., Weber, C. R. & Turner, J. R. The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state. *J. Cell Biol.* (2008). doi:10.1083/jcb.200711165
16. Van Itallie, C. M. & Anderson, J. M. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin. Cell Dev. Biol.* **36**, 157–65 (2014).
17. Zihni, C., Mills, C., Matter, K. & Balda, M. S. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 564–580 (2016).
18. Zhao, C. *et al.* Dysregulation of JAM-A plays an important role in human tumor progression. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **7**, 7242–7248 (2014).
19. Tsukita, S., Furuse, M. & Itoh, M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol.*

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

- Cell Biol.* **2**, 285–293 (2001).
20. Cummins, P. M. Occludin: one protein, many forms. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 242–250 (2012).
  21. Feldman, G. J., Mullin, J. M. & Ryan, M. P. Occludin: Structure, function and regulation. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 883–917 (2005).
  22. Haseloff, R. F., Dithmer, S., Winkler, L., Wolburg, H. & Blasig, I. E. Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood–brain barrier: Structural and functional aspects. *Semin. Cell Dev. Biol.* **38**, 16–25 (2015).
  23. Krug, S. M. *et al.* Tricellulin Forms a Barrier to Macromolecules in Tricellular Tight Junctions without Affecting Ion Permeability. *Mol. Biol. Cell* **20**, 3713–3724 (2009).
  24. Tabariès, S. & Siegel, P. M. The role of claudins in cancer metastasis. *Oncogene* **36**, 1176–1190 (2017).
  25. Günzel, D. & Yu, A. S. L. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol. Rev.* **93**, 525–69 (2013).
  26. Krug, S. M., Schulzke, J. D. & Fromm, M. Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **36**, 166–176 (2014).
  27. Koval, M. Differential pathways of claudin oligomerization and integration into tight junctions. *Tissue Barriers* **1**, e24518 (2013).
  28. Nikitenko, L. L. Vascular endothelium in cancer. *Cell and Tissue Research* **335**, 223–240 (2009).
  29. Komarova, Y. A., Kruse, K., Mehta, D. & Malik, A. B. Protein Interactions at Endothelial Junctions and Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Circ. Res.* **120**, 179–206 (2017).
  30. Dejana, E., Tournier-Lasserre, E. & Weinstein, B. M. The Control of Vascular Integrity by Endothelial Cell Junctions: Molecular Basis and Pathological Implications. *Developmental Cell* **16**, 209–221 (2009).
  31. Lampugnani, M. G. Endothelial cell-to-cell junctions: Adhesion and signaling in physiology and pathology. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, (2012).
  32. Vestweber, D. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 692–704 (2015).
  33. Bolton, S. J., Anthony, D. C. & Perry, V. H. Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience* **86**, 1245–1257 (1998).
  34. Xu, H., Dawson, R., Crane, I. J. & Liversidge, J. Leukocyte diapedesis in vivo induces transient loss of tight junction protein at the blood-retina barrier. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 2487–2494 (2005).
  35. González-Mariscal, L., Lechuga, S. & Garay, E. Role of tight junctions in cell proliferation and cancer. *Prog. Histochem. Cytochem.* **42**, 1–57 (2007).
  36. Singh, A. B. & Dhawan, P. Claudins and cancer: Fall of the soldiers entrusted to protect the gate and keep the barrier intact. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **42**, 58–65 (2015).



## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

37. Nakayama, F. *et al.* Hypermethylation-modulated downregulation of claudin-7 expression promotes the progression of colorectal carcinoma. *Pathobiology* **75**, 177–185 (2008).
38. Lin, X., Shang, X., Manorek, G. & Howell, S. B. Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition by Claudin-3 and Claudin-4. *PLoS One* **8**, e67496 (2013).
39. Dhawan, P. *et al.* Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J. Clin. Invest.* **115**, 1765–1776 (2005).
40. Ikari, A. *et al.* Nuclear distribution of claudin-2 increases cell proliferation in human lung adenocarcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 2079–2088 (2014).
41. Singh, A. B. & Dhawan, P. Claudins and cancer: Fall of the soldiers entrusted to protect the gate and keep the barrier intact. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **42**, 58–65 (2015).
42. Suh, Y. *et al.* Claudin-1 induces epithelial-mesenchymal transition through activation of the c-Abl-ERK signaling pathway in human liver cells. *Oncogene* **36**, 1167–1168 (2017).
43. Kominsky, S. L. *et al.* 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**, 2021–2033 (2003).
44. Ushiku, T., Shinozaki-Ushiku, A., Maeda, D., Morita, S. & Fukayama, M. Distinct expression pattern of claudin-6, a primitive phenotypic tight junction molecule, in germ cell tumours and visceral carcinomas. *Histopathology* **61**, 1043–1056 (2012).
45. Sharma, R. K. *et al.* A spontaneous metastasis model reveals the significance of claudin-9 overexpression in lung cancer metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **33**, 263–275 (2016).
46. Singh, A. B., Uppada, S. B. & Dhawan, P. Claudin proteins, outside-in signaling, and carcinogenesis. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* **469**, 69–75 (2017).
47. Semba, S., Satake, S., Matsushita, M. & Yokozaki, H. Phosphatase activity of nuclear PTEN is required for CDX2-mediated intestinal differentiation of gastric carcinoma. *Cancer Lett.* **274**, 143–150 (2009).
48. Bhat, A. A. *et al.* Caudal homeobox protein Cdx-2 cooperates with Wnt pathway to regulate claudin-1 expression in colon cancer cells. *PLoS One* **7**, (2012).
49. de Souza, W. F. *et al.* Claudin-3 Overexpression Increases the Malignant Potential of Colorectal Cancer Cells: Roles of ERK1/2 and PI3K-Akt as Modulators of EGFR signaling. *PLoS One* **8**, (2013).
50. Pope, J. L. *et al.* Claudin-1 regulates intestinal epithelial homeostasis through the modulation of Notch-signalling. *Gut* **63**, 622–634 (2014).
51. Wei, W. *et al.* STAT3 signaling is activated preferentially in tumor-initiating cells in claudin-low models of human breast cancer. *Stem Cells* **32**, 2571–2582 (2014).
52. Tsukamoto, T. *et al.* Gastric adenocarcinoma with chief cell differentiation. *Pathol. Int.* **57**, 517–522 (2007).
53. Soini, Y., Tammola, S., Helin, H. & Martikainen, P. Claudins 1, 3, 4 and 5 in gastric carcinoma, loss of claudin expression associates with the diffuse subtype. *Virchows Arch.* **448**, 52–58 (2006).
54. Cunningham, S. C. *et al.* Claudin-4, mitogen-activated protein kinase kinase 4, and stratifin



## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

- are markers of gastric adenocarcinoma precursor lesions. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **15**, 281–287 (2006).
55. Matsuda, Y. *et al.* Gastric and intestinal claudin expression at the invasive front of gastric carcinoma. *Cancer Sci.* **98**, 1014–1019 (2007).
  56. Rendón-Huerta, E. *et al.* Distribution and expression pattern of claudins 6, 7, and 9 in diffuse- and intestinal-type gastric adenocarcinomas. *J. Gastrointest. Cancer* **41**, 52–59 (2010).
  57. Zavala-Zendejas, V. E. *et al.* Claudin-6, 7, or 9 Overexpression in the Human Gastric Adenocarcinoma Cell Line AGS Increases Its Invasiveness, Migration, and Proliferation Rate. *Cancer Invest.* **29**, 1–11 (2011).
  58. Kessenbrock, K., Plaks, V. & Werb, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell* **141**, 52–67 (2010).
  59. Zhong, J., Chen, Y. & Wang, L. J. Emerging molecular basis of hematogenous metastasis in gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology* **22**, 2434–2440 (2016).
  60. Balkwill, F. & Mantovani, A. Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet* **357**, 539–545 (2001).
  61. Koebel, C. M. *et al.* Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* **450**, 903–907 (2007).
  62. Tsujimoto, H. *et al.* Roles of inflammatory cytokines in the progression of gastric cancer: Friends or foes? *Gastric Cancer* **13**, 212–221 (2010).
  63. Xie, K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* **12**, 375–391 (2001).
  64. Matsuo, Y. *et al.* CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1 $\alpha$  co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* **124**, 853–861 (2009).
  65. Kuai, W.-X. *et al.* Interleukin-8 associates with adhesion, migration, invasion and chemosensitivity of human gastric cancer cells. *World J. Gastroenterol.* **18**, 979–85 (2012).
  66. Ju, D. *et al.* Interleukin-8 is associated with adhesion, migration and invasion in human gastric cancer SCG-7901 cells. *Med. Oncol.* **29**, 91–99 (2012).
  67. Reymond, N., D'Água, B. B. & Ridley, A. J. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 858–870 (2013).
  68. Yu, H. *et al.* Interleukin-8 regulates endothelial permeability by down-regulation of tight junction but not dependent on integrins induced focal adhesions. *Int. J. Biol. Sci.* **9**, 966–979 (2013).
  69. Chen, W. & Kuo, M. IL-6 inhibits apoptosis and retains oxidative DNA lesions in human gastric cancer AGS cells through up-regulation of anti-apoptotic gene. *Carcinogenesis* **22**, 1947–1953 (2001).
  70. Chung, Y.-C. & Chang, Y.-F. Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer. *J. Surg. Oncol.* **83**, 222–226 (2003).
  71. Wang, Z. *et al.* Activation of STAT3 in Human Gastric Cancer Cells via Interleukin (IL)-6-Type Cytokine Signaling Correlates with Clinical Implications. *PLoS One* **8**, (2013).

## Alteración de las uniones estrechas de células endoteliales por citocinas secretadas de células AGS

---

72. Xiong, H. *et al.* Constitutive activation of STAT3 is predictive of poor prognosis in human gastric cancer. *J. Mol. Med. (Berl)*. **90**, 1037–1046 (2012).
73. Lin, M. T. *et al.* IL-6 induces AGS gastric cancer cell invasion via activation of the c-Src/RhoA/ROCK signaling pathway. *Int. J. Cancer* **120**, 2600–2608 (2007).
74. Smyth, E. M., Grosser, T., Wang, M., Yu, Y. & FitzGerald, G. A. Prostanoids in health and disease. *J. Lipid Res.* **50**, S423–S428 (2008).
75. Ristimäki, A., Honkanen, N., Jänkälä, H., Sipponen, P. & Härkönen, M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res.* **57**, 1276–1280 (1997).
76. Brown, J. R. & DuBois, R. N. COX-2: A molecular target for colorectal cancer prevention. *J. Clin. Oncol.* **23**, 2840–2855 (2005).
77. Uefuji, K., Ichikura, T. & Mochizuki, H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clin. Cancer Res.* **6**, 135–138 (2000).
78. Lejeune, M., Moreau, F. & Chadee, K. Prostaglandin E2 produced by entamoeba histolytica signals via EP4 receptor and alters claudin-4 to increase ion permeability of tight junctions. *Am. J. Pathol.* **179**, 807–818 (2011).
79. Srinivasan, B. *et al.* TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems. *J. Lab. Autom.* **20**, 107–126 (2015).
80. García-Román, J. & Zentella-Dehesa, A. Vascular permeability changes involved in tumor metastasis. *Cancer Lett.* **335**, 259–69 (2013).
81. Chen, J. *et al.* High expressions of galectin-1 and VEGF are associated with poor prognosis in gastric cancer patients. *Tumor Biol.* **35**, 2513–2519 (2014).