



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto de la sobre expresión de Claudina -6 y -9 en
células troncales de adenocarcinoma gástrico**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Priscila Anhel Medrano González



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. José Francisco Gallardo Vera**

Ciudad de México, 2018



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

Medrano
González
Priscila Anhel
57904522
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
310109518

2. Datos de tutor

Dr.
José Francisco
Gallardo
Vera

3. Datos del sinodal 1

Dra
Erika Patricia
Rendón
Huerta

4. Datos del sinodal 2

Dr
Luis Felipe
Montaño
Estrada

5. Datos del sinodal 3

Dra
Laura
Kawasaki
Watanabe

6. Datos del sinodal 4

Dr
Luis Felipe
Jiménez
García

7. Datos del trabajo escrito

Efecto de la sobre expresión de Claudina -6 y -9 en células troncales de adenocarcinoma gástrico
69p
2018



"El mejor científico está abierto a la experiencia, y esta empieza con un romance, es decir, la idea de que todo es posible."

Ray Bradbury



AGRADECIMIENTOS

A Dios, que gracias a él todo es posible.

A mis padres por siempre impulsarme a crecer, por inculcarme valores que me permiten llevar mis labores con honestidad y compromiso. Gracias por enseñarme que el trabajo duro trae sus recompensas y, sobre todo, por su cariño y apoyo incondicional. Serán siempre mi mayor ejemplo por seguir.

A mi hermano, por ser el mejor compañero de aventuras que pude haber tenido. Gracias por acompañarme en cada obstáculo, logro y proyecto de mi vida, por enseñarme a no rendirme y que hay más de una forma de llegar a una meta. La vida nunca hubiera sido igual sin ti.

Al resto de mi familia, que siempre está apoyándome y acompañándome en cada etapa de mi vida.

A mi mejor amiga Karla, por su amistad, apoyo, motivación y ejemplo que me ha dado. Gracias por motivarme a levantarme cuando las cosas parecieran no funcionar, por darle siempre optimismo a mi vida y enseñarme lo que es la amistad sana y sincera. Desde siempre, creciendo juntas.

A Paco, por tu apoyo de manera paciente y constante durante la realización de mi tesis, a motivarme cuando no obtenía resultados y pensar de manera crítica en la resolución de éstos. Por todo el apoyo y las enseñanzas, tanto en el ámbito académico como personal.

A la Dra Erika y el Dr Montaña, por creer en mí y en el proyecto, a pesar de todas las dificultades que se nos atravesaron. Gracias por brindarme un espacio en su laboratorio, por todas las facilidades que me dieron durante la realización de mi tesis y por enseñarme con su ejemplo a analizar y cuestionar. Guardaré con mucho cariño todas sus enseñanzas.

A mis amigas Pau, Joss y Dennis, por todo el apoyo, aventuras y enseñanzas que me dieron durante la carrera. Mis recuerdos más bonitos de la facultad son con ustedes.

A mis amigos y compañeros del laboratorio Eli, Hanen, Jahaziel, Rous, Franklin, Ale, Chris, Naresh, Martín, Anita y Pris por su apoyo y compañía. A Jazmín que, a pesar de trabajar poco tiempo juntas en el laboratorio, me enseñó muchísimas cosas. Gracias por tu amistad, risas y buenos momentos que pasamos juntas.

Y finalmente, a mi universidad, que no sólo me brindó educación de calidad y me otorgó las herramientas necesarias para formarme como bióloga sino, además, me dio amigos que serán para toda la vida y la oportunidad de conocer personas que me aportaron enseñanzas valiosas tanto para mi formación profesional como para mi vida personal. Con orgullo y vocación ejerceré lo que siempre ha sido para mí la carrera más bonita: Biología.



ÍNDICE

RESUMEN	1
1.- Introducción	2
2.- Antecedentes	4
2.1 Uniones estrechas	4
2.2 Claudinas	4
2.3 Cáncer gástrico y claudinas	7
2.3.1 Claudina-6 y -9	9
2.4 Células Troncales de Cáncer (CTC)	10
2.4.1 Características	11
2.4.2 Origen	12
2.4.3 Identificación de CTC	13
2.5 Marcadores de CTC gástrico	14
2.5.1 CD24	14
2.5.2 CD44	16
2.5.3 DCLK1	18
2.5.4 Villin	19
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
4. JUSTIFICACIÓN	21
5. HIPÓTESIS	22
6. OBJETIVO	22
6.1 OBJETIVOS PARTICULARES	22
7. MATERIALES Y MÉTODOS	23
7.1 Clonación	23
7.1.1 Amplificación de la secuencia de Claudina-6 y -9 por PCR	23
7.1.2 Ligación de los productos amplificados por PCR	23
7.1.3 Transformación de la cepa DH5 α	24
7.1.4 PCR de colonias	25
7.2 Transfección	25
7.2.1 Cultivo de la línea celular AGS	25



7.2.2	Transfección con lipofectamina	26
7.3	Citometría de flujo	26
7.3.1	Separación celular activada por fluorescencia (FACS).....	26
7.3.2	Adquisición de datos.....	27
7.4	Microscopía de fluorescencia	28
7.5	Análisis estadístico	28
8.	RESULTADOS	29
8.1	Clonación de Cldn-6 y Cldn-9 en el vector pmaxGFP	29
8.2	Presencia del inserto y validación del sentido de Cldn-6 y -9	33
8.3	Transfección de células AGS con el vector pmaxGFP y los vectores recombinantes ..	37
8.4	Enriquecimiento de la población GFP+ de los cultivos transfectados	39
8.5	Expresión de Cldn-6 y -9 en las líneas transfectadas	42
8.6	Expresión de marcadores de CTC	44
9.	DISCUSIÓN.....	46
10.	CONCLUSIÓN	50
11.	PERSPECTIVAS	51
	ANEXO	52
	REFERENCIAS.....	54



ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Estructura general de las claudinas.....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 2. Clasificación de claudinas de acuerdo al grado de similitud entre ellas</i>	<i>7</i>
<i>Figura 3. Sitio de corte del vector pmaxGFP y reconstitución de la secuencia de GFP en los primers.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 4. PCR de bacterias que contenían las secuencias de Cldn-6 y Cldn-9</i>	<i>31</i>
<i>Figura 5. Determinación de la TM óptima de los primers</i>	<i>31</i>
<i>Figura 6. Integridad del vector e insertos para la clonación de los vectores pmaxGFP Cldn6 y pmax Cldn9.</i>	<i>32</i>
<i>Figura 7. Colonias obtenidas después de la transformación.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 8. Presencia del inserto en las colonias seleccionadas.....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 9. Sitios de corte de la enzima PstI.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 10. Verificación del sentido del inserto por restricción..</i>	<i>35</i>
<i>Figura 11. Alineamiento de los datos de secuenciación.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 12. Verificación del sentido de los insertos por secuenciación.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 13. Sitio de corte de la enzima AFIII.</i>	<i>39</i>
<i>Figura 14. Transfección estable de la línea celular AGS.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 15. Sorting de los cultivos AGS-GFP, AGS-CLDN6 y AGS-CLDN-9.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 16. Patrón de expresión de GFP en células transfectadas.</i>	<i>42</i>
<i>Figura 17. Sobre expresión de Claudina-6 y -9 en las líneas AGS-CLDN6 y AGS-CLDN9.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 18. Células AGS presentan una pequeña subpoblación CD24+.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 19. Cambio en la expresión de los marcadores de CTC por la sobre expresión de Cldn-6 y -9</i>	<i>45</i>



ABREVIATURAS

ALDH1	Aldehído deshidrogenasa 1
APC	Alofocianina
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (<i>basic fibroblast growth factor</i>)
Bves	Sustancia epicardial de vasos linfáticos (Blood vessel epicardial substance)
CD24	Cúmulo de diferenciación 24 (<i>Cluster of differentiation 24</i>)
CD44	Cúmulo de diferenciación 44 (<i>Cluster of differentiation 44</i>)
CD44s	Isoforma estándar de CD44
CD44v	Isoforma variable de CD44
CHO, línea celular	Ovario de ratón chino
Cldn	Claudina
CMV	Citomegalovirus
CRB3	Porción homóloga 3 (<i>Crumbs homologue 3</i>)
CTC	CTC (<i>Cancer Stem Cells</i>)
C-terminal	Carboxilo terminal
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DCLK1	Cinasa 1 tipo doblecortina (<i>Doublecortin Like Kinase 1</i>)
DMEM	Medio esencial mínimo (<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>)
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (Epitelial Growth Factor)
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green fluorescent protein</i>)
GPI	Glucosil fosfatidil inositol
HIF	Factor inducible por hipoxia (<i>Hypoxia-inducible factors</i>)
JAM	Molécula de adhesión de la unión (<i>junctional adhesion molecules</i>)
kDa	Kilodalton



mA	Miliamperios
MAGUK	Guanilato quinasas asociadas a membranas (<i>Membrane-Associated guanylate kinase homologs</i>)
MPP	Metaloproteasa
N-terminal	Amino terminal
PBS	Buffer fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
SHH	Sonic Hedgehog
SNP	Polimorfismo de un nucleótido (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SV40	Virus 40 vacuolado del simio
TAE	Tris-acetato-EDTA
TEM	Transición Epitelio Mesénquima
Transportadores ABC	Transportadores dependientes de ATP (ATP-Binding Cassette)
UTR	Región no traducida del gen (<i>untranslated región</i>)
ZO	Uniones ocludentes (<i>Zonula Occludens</i>)



RESUMEN

El cáncer representa un problema de salud a nivel mundial. Tan sólo en el año 2012 la agencia internacional para la investigación en cáncer (IARC) registró 14 millones de casos nuevos y 8.2 millones de defunciones a causa de esta enfermedad. De todos los tipos de cáncer, los derivados de tejidos epiteliales representan cerca del 95%.

Las uniones estrechas confieren polaridad y selectividad al paso de moléculas del flujo paracelular de los epitelios, además de estar involucradas en diversas vías de señalización. Las claudinas, proteínas de 4 dominios transmembranales, son los principales componentes de las uniones estrechas y se han visto desreguladas en diversos tipos de cáncer. Particularmente, en cáncer gástrico, la sobre expresión de Claudina-6 y -9 incrementa el potencial invasivo, migración y tasa de proliferación. Cabe destacar que la expresión de dichas claudinas, 6 y 9, se restringe a tejidos durante el desarrollo embrionario, siendo su expresión débil o ausente en tejidos adultos.

Se sabe que no todas las células que conforman un tumor son idénticas, sino que existe heterogeneidad fenotípica dentro de éste, y que en muchos tipos de tumores hay una organización jerárquica similar al de las células troncales. Esta observación aunada a ensayos funcionales y moleculares llevaron a la identificación de una subpoblación llamada células troncales de cáncer (CTC), las cuales son responsables de la iniciación, recurrencia y metástasis tumoral, además, están involucradas en la resistencia a los tratamientos con quimio y radioterapia.

Las células que mantienen y confieren la agresividad tumoral son aquellas que retoman los mecanismos de una célula troncal normal, la sobre expresión de Claudina-6 y -9 podría estar asociada al enriquecimiento de esta subpoblación. Este trabajo pretende dilucidar la asociación de la expresión de dichas claudinas con las CTC a través de la expresión de marcadores previamente reportados para esta subpoblación: CD24, CD44, Villin y DCLK1.

Palabras clave: Claudina-6, Claudina.9, CTC, cáncer gástrico, CD24, CD44, villin, DCLK1.



1.- Introducción

"Medio siglo de investigación sobre el cáncer ha generado un enorme cuerpo de observaciones sobre el comportamiento de esta enfermedad, sin embargo no hay ideas sobre cómo comienza y progresa hacia sus conclusiones potencialmente mortales ¹".

Dr. Robert A. Weinberg

Las células troncales son un grupo celular con capacidad de auto-renovación, que le permite dar lugar a otras células troncales, y de diferenciación que generan células más diversas con diferentes funciones biológicas ². De acuerdo al potencial de diferenciación, las células troncales pueden ser: totipotentes, las cuales están presentes en los blastómeros de la mórula y dan lugar a tejidos embrionarios y extra embrionarios; las células troncales pluripotentes, que están presentes en las células de la masa interna celular del blastocisto, y dan lugar a todos los tipos celulares del embrión, incluyendo a las células somáticas y germinales; por su parte, las células troncales multipotentes son capaces de dar lugar a diversos tipos celulares de un mismo tejido, como el caso de las células troncales hematopoyéticas. Hacia la etapa final de diferenciación, se encuentran las células troncales unipotentes, que son capaces de dar origen a un solo tipo celular maduro, son células progenitoras comprometidas con un linaje específico, y a este nivel se encuentran las células progenitoras endoteliales o células epiteliales de la córnea ³.

Hacia 2006, se descubrió que células somáticas maduras podían ser reprogramadas en células troncales pluripotentes por la expresión ectópica de 4 factores transcripcionales, demostrando entre otras cosas, que el desarrollo podía ser potencialmente revertido. Pruebas *in vitro* e *in vivo* demostraron que estas células pluripotentes inducidas podrían dar lugar a teratomas sugiriendo que el cáncer posee un origen embrionario. Posteriormente, se propuso al cáncer como un problema en el desarrollo, basado en diversos estudios en los que células malignas se diferenciaban a un tejido normal al ser colocadas en un blastocisto ⁴. Aunado a otras



pruebas, se ha visto la asociación entre las características de un tumor con las de un fenotipo del desarrollo temprano.

Las células troncales de cáncer (CSC) son una pequeña población de células dentro del tumor que retoma las propiedades de una célula troncal, tales como alta capacidad para generar clonas por autorrenovación, y de dar lugar a poblaciones celulares heterogéneas con un alto potencial de plasticidad. Esta subpoblación posee resistencia a factores de estrés dentro del tumor como bajos niveles de oxígeno y de nutrientes, además, son resistentes a la inducción de muerte por agentes quimioterapéuticos ⁵.

Los tratamientos que reciben los pacientes con cáncer gástrico son multimodales que incluyen cirugía, radiación y quimioterapia, entre otros. Sin embargo, aún con la implementación de diversos tratamientos, las células troncales de cáncer siguen presentes y eventualmente llevan a la reaparición tumoral ⁶. Por ello, resulta importante dilucidar los mecanismos que rigen y mantienen a las CSC, lo cual representaría una primera aproximación en el tratamiento dirigido contra esta población, que, aunado a tratamientos convencionales, podrían llevar a la disminución del tumor y del riesgo de adquirir propiedades de CSC por parte de las células del tumor ⁷.



2.- Antecedentes

2.1 Uniones estrechas

Las uniones estrechas son un complejo de proteínas de unión intercelular, esenciales para la función de algunos tejidos. Han sido observadas en células epiteliales, del endotelio vascular, células mesoteliales, células de Schwann, oligodendrocitos y células de Sertoli, entre otros ⁸. Forman barreras selectivamente permeables que permiten el paso de algunos iones, solutos, agua y células a través del flujo paracelular (función de compuerta); además, demarcan el límite entre la región lateral y basolateral sirviendo como barrera de la difusión intramembrana de proteínas y macromoléculas entre estas dos regiones (función de valla). Las uniones estrechas regulan una variedad de moléculas de señalización involucradas en procesos de diferenciación, proliferación y polaridad celular ⁹.

Las uniones estrechas están conformadas por dos tipos principales de componentes transmembranales: las proteínas de cuatro dominios transmembranales como las ocludinas, tricelulinas y claudinas, y las proteínas de un dominio transmembranal como JAM, CRB3 y Bves. Además, se distinguen proteínas citoplasmáticas que poseen roles de adaptadores, proteínas de andamiaje y proteínas que conectan a proteínas de la membrana con el citoesqueleto de actina, tales como zónula ocludens (ZO), cingulina, H6, simplequina, ZA-1TJ, entre otros ^{10,11}.

2.2 Claudinas

Las claudinas (Cldn) son los principales componentes de las uniones estrechas¹², cruciales en la regulación de la permeabilidad celular al modular la resistencia epitelial y el paso de ciertos iones. Esta selectividad depende de las claudinas expresadas en los tejidos ¹³. Se han reportado hasta la fecha 27 genes de Claudinas en mamíferos ¹⁴; en humanos, la longitud de las claudinas oscila entre 207 y 305 aminoácidos y su peso molecular se encuentra entre 21 y 34 kDa [4].



Son proteínas de 4 pasos transmembranales con una región corta amino terminal (de 4 a 5 residuos) y una región variable en tamaño y secuencia carboxilo terminal (21 a 106 residuos), orientadas hacia el citoplasma ^{12,13} (figura 1). Poseen dos asas extracelulares: La primera está implicada en la función de barrera al determinar selectivamente la carga del transporte paracelular; contiene alrededor de 60 residuos con dos cisteínas conservadas que confieren estabilidad a la estructura y de las cuales no hay evidencia aún de que éstas formen puentes disulfuro ¹⁵. La mayoría de las claudinas tienen un motivo conservado en la primera asa extracelular: GLWxxC(8-10 aa)C ¹⁶. Las cargas positivas y negativas en esta asa confieren las propiedades de los poros que forman. La segunda asa extracelular contiene alrededor de 24 residuos, posee función de estrechamiento del espacio intercelular¹², así como la formación de dímeros con claudinas opuestas por su motivo hélice-vuelta-hélice, a través de interacciones hidrofóbicas entre residuos conservados ¹³. Además, en algunas isoformas de claudinas, esta asa extracelular se ha visto implicada, como receptor, de la enterotoxina de *Clostridium perfringens* ¹⁷. Las secuencias de la primera y cuarta región transmembranal son altamente conservadas entre las diferentes isoformas ¹³. La región carboxilo terminal es la más heterogénea entre todas las isoformas, contiene un sitio YV (a excepción de Claudina-12) que se une a proteínas con dominios PDZ (Cldn -1 a -9 y -17 S/TYV, Cldn-10 y -15 AYV, Cldn-11 AHV, Cldn-12 HTT, Cldn-13 LDV, Cldn-14, -18 y -20 DYV, Cldn-16 TRV y Cldn-19 DRV)^{18,19}, la cual le permite interactuar con moléculas asociadas a las uniones estrechas como MAGUK, ZO-1, ZO-2, ZO-3, entre otras ¹⁷.

Poseen, además, sitios de fosforilación en la región del tallo citoplasmático, justo después del cuarto dominio transmembranal además de otros sitios de fosforilación que no son conservados y que son únicos de cada claudina. Su función es modular la función de claudinas específicas al ser blanco de cinasas como MAPK, PKA, PKC, entre otras. Por otro lado, se distinguen sitios de palmitoilación en la región del asa intracelular, después del segundo dominio transmembranal y que están involucrados con la correcta localización de la claudina en las uniones estrechas ²⁰.



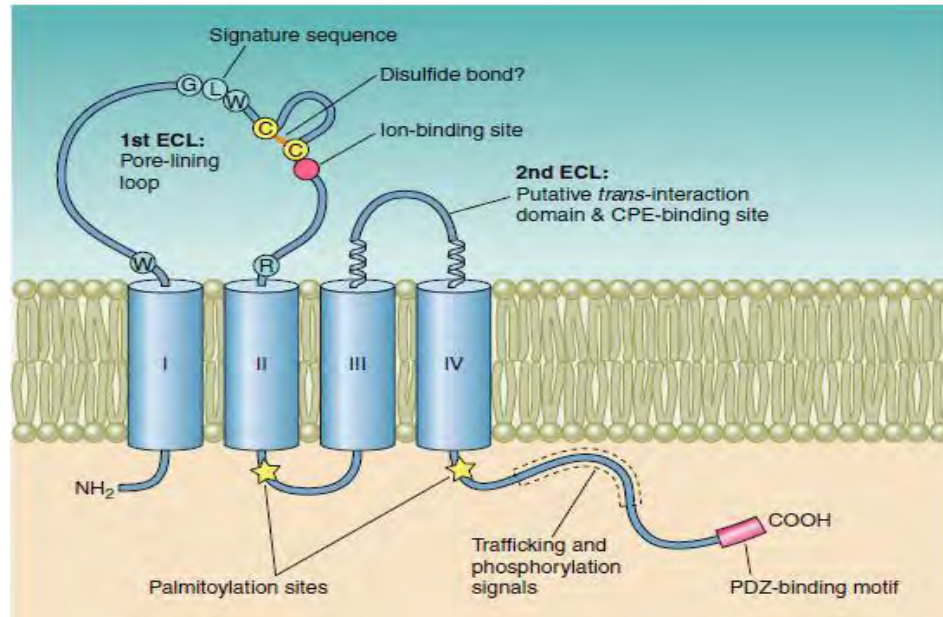


Figura 1. Estructura general de las claudinas (Gunzel y Yu, 2013)

Basado en la similitud de las secuencias de las claudinas, se distinguen dos grupos: Las claudinas clásicas, que exhiben secuencias con mayor similitud (Cldn -1 a la -9, -14, -17, -19, -20), y las claudinas no clásicas, que incluye a miembros que están menos relacionados (Cldn -10, -11, -12, -15, -16, -18 y el resto de las claudinas). Algunos pares de claudinas muestran secuencias muy similares y están localizados en cercana proximidad en el genoma humano, como los genes de Cldn-6 y -9 (*CLND6* y *CLDN9*, respectivamente) separados únicamente por 200pb; *CLDN22* y *CLDN24*, *CLDN8* y *CLDN17* ó *CLDN4* y *CLDN3* (Figura 2). Esta estructura genómica sugiere que algunas claudinas han surgido por duplicación génica ¹³.



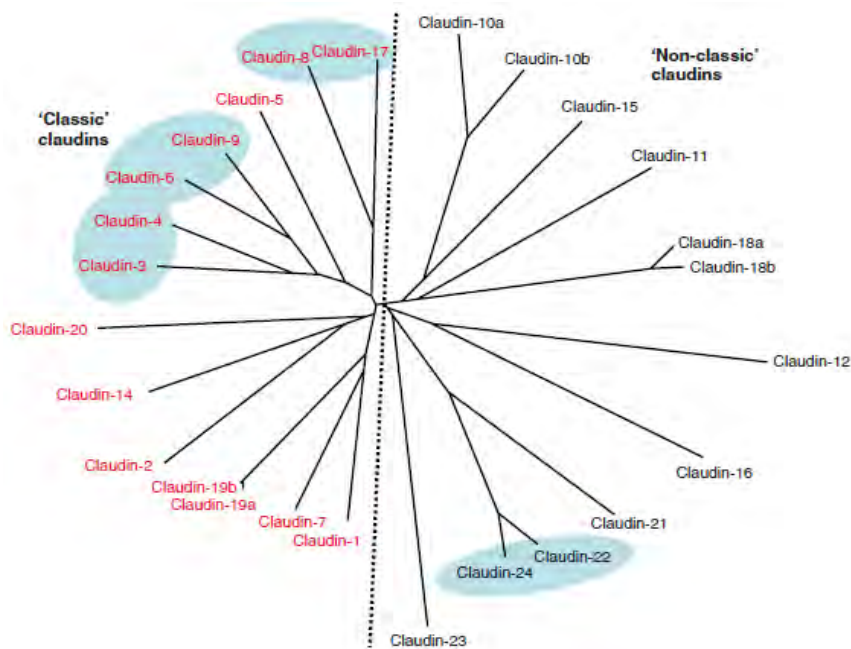


Figura 2. Clasificación de claudinas de acuerdo al grado de similitud entre ellas (Lal-Nag y Morin, 2009)

2.3 Cáncer gástrico y claudinas

El cáncer gástrico ocupa el sexto lugar de incidencia en México y a nivel mundial ²¹ y la mayoría de los casos corresponde a adenocarcinomas (90-95%). Los factores de riesgo para cáncer gástrico incluyen fumar, dieta alta en sales, alto consumo de carne, infección por *Helicobacter pylori*, entre otros ²². De acuerdo con la clasificación de Lauren, se distinguen dos tipos de adenocarcinomas: el de tipo intestinal, que es caracterizado por la formación de estructuras tipo glándula y está asociada a factores de riesgo ambientales y dieta como alto consumo de sal o infección por *Helicobacter pylori*; y el de tipo difuso, que presenta una histología pobremente diferenciada y carece de estructuras glandulares, éstos pacientes son generalmente más jóvenes, mujeres y tienen peor pronóstico que los de tipo intestinal ²³. La incidencia de cáncer gástrico es mayor en Asia, Latinoamérica y en el centro y este de Europa ²³; tiene una incidencia mayor en hombres que en mujeres ²⁴.



La disrupción en la función de barrera y de permeabilidad de las uniones estrechas no sólo se ha visto asociada con diversas condiciones pato-fisiológicas como trastornos de los riñones, enfermedades inflamatorias del intestino, ictericia o diarrea, sino que además representa un evento temprano en la tumorigénesis. En tejidos epiteliales, las uniones estrechas impiden el paso de factores de crecimiento de la parte luminal hacia la región basal-lateral de los epitelios, donde se encuentran receptores a esos factores de crecimiento. Cuando la integridad de esta “barrera” se ve comprometida, puede haber un flujo desmedido de estos factores de crecimiento ¹⁹. De esta manera, el decremento en la expresión de algunas claudinas es responsable de la disrupción de las uniones estrechas durante la tumorigénesis, y la pérdida de las uniones estrechas está asociada con neoplasia ²⁵. Se ha visto, por ejemplo, en cáncer de mama, una disminución en la expresión a nivel de proteína y de mRNA de Claudina-2 ²⁶ y Claudina-1 ²⁷ respecto a muestras de tejido normal; En cáncer de próstata, la pérdida en la expresión de Claudina-1 y -7 correlacionaba con tejidos poco diferenciados ²⁸, mientras que en cáncer de esófago, la reducción en la expresión de Claudina-7 se encontró asociada con invasión a vasos y nódulos linfáticos ²⁹. En cáncer gástrico se ha encontrado una expresión reducida de Claudina-11 en tejidos primarios, y en células epiteliales normales en los que se silencia su expresión, se observa un incremento en su motilidad e invasividad ³⁰.

Sin embargo, la expresión de claudinas no siempre se ve disminuida. Se ha visto una sobre expresión de las claudinas -1, -3 y -4 en tejidos de pacientes con cáncer colorrectal comparado con muestras de tejido normal ³¹, por su parte, en melanomas se ha encontrado una sobre expresión de Claudina-1 con una expresión aberrante en membrana, núcleo y citoplasma ³². Se han propuesto algunos mecanismos para explicar cómo la sobre expresión de ciertas claudinas podría contribuir a la tumorigénesis, sin embargo, aún no se han comprobado estos mecanismos: ya sea que 1) su sobre expresión podría directamente alterar la estructura y función de las uniones estrechas, 2) que al estar involucradas con algunas vías de señalización, su sobre expresión pudiera alterarlas o bien, 3) que aquellas claudinas sobre expresadas y deslocalizadas pudieran funcionar como una molécula oncogénica ¹⁹.



La expresión desregulada de claudinas ocurre de manera tejido, tumor y estadio específico³³ y algunas de sus isoformas han resultado útiles al ser propuestas como marcadores pronósticos de supervivencia y recurrencia para ciertos tipos de cáncer²⁵. En cáncer gástrico, se ha visto una expresión incrementada de Claudina -3, -4 y -7 y una expresión a la baja de Claudina-18. La expresión de Claudina-3 y -4, aunada a una pérdida en la expresión de Claudina-18, indica la presencia de lesiones pre malignas, especialmente cuando las claudinas están localizadas en el citoplasma, mientras que la expresión de Claudina-3 o la expresión a la baja de Claudina-18 se han asociado con un pobre pronóstico, especialmente en cáncer gástrico de tipo intestinal³⁴.

2.3.1 Claudina-6 y -9

El gen de Claudina-6 contiene 2 exones, su transcripción da lugar a una isoforma de 220 aminoácidos con un peso molecular de 23.29 kDa. Claudina-6 regula la permeabilidad a sodio y cloruro, y se expresa principalmente en células troncales embrionarias (en ratón), en células de linaje epitelial durante el desarrollo embrionario y en tumores de células germinales. Su expresión es muy baja o ausente en ratones adultos³⁵. Claudina-6 junto con Claudina-9 y Claudina-13 se expresan en el riñón durante el desarrollo embrionario, mientras que en riñón adulto se detectó una baja expresión de Claudina-6³⁶. Durante la diferenciación de células troncales de ratón, las células positivas a Cldn6 decrecían drásticamente, siendo claudina-6 un indicador sensible a la diferenciación temprana; su regulación a la baja estaba acompañada con una pérdida de las características pluripotentes³⁷.

El gen de Claudina-9 contiene 1 exón que da lugar a una proteína de 217 aminoácidos y un peso molecular de 22.84 kDa. Se expresa en pulmón, glándula pituitaria, intestino, ojo y cerebro³⁸. Claudina-9 se expresa en el oído y es requerido para la preservación de células sensoriales: las concentraciones perilinfáticas de potasio son altas y Claudina-9 es un regulador del paso de sodio y potasio³⁹. Su expresión se ha visto involucrada en procesos de metástasis: subpoblaciones agresivas de carcinoma de pulmón capaces de metastatizar a hígado fueron



aisladas de células poco metastásicas. Los perfiles de expresión de genes revelaron altos niveles de Claudina-9 en aquellas con dicha capacidad metastásica ⁴⁰.

En biopsias de pacientes con cáncer gástrico se encontró la expresión de Claudina-6 en muestras de tipo difuso e intestinal, mientras que la expresión de Claudina-9 fue principalmente en muestras de tipo intestinal; la expresión de estas claudinas se encontró principalmente en la región citosólica, y una expresión débil en la membrana. Una fuerte expresión de Claudina-9 se encontró asociada con una mayor tasa de mortalidad en cáncer gástrico de tipo intestinal ⁴¹. Al sobre expresar Claudina-6, -7 y -9 en una línea celular (AGS), se incrementaba su potencial invasivo; Claudina-6 y -9 incrementaban la migración celular y su tasa de proliferación, mientras que la sobre expresión de Claudina-7 y -9 incrementaba la expresión endógena de Claudina-1 ⁴². Claudina-6 podría inducir la activación de metaloproteasa-2 (MMP-2) a través de la expresión de Claudina-1 facilitando la migración celular e invasividad ⁴³.

2.4 Células Troncales de Cáncer (CTC)

En la década de 1960 diversos experimentos en ratones demostraron la existencia de precursores en la médula ósea que eran capaces de dar lugar a células de diferentes estirpes hematopoyéticas. En ratones irradiados letalmente, en los que la médula ósea había sido erradicada completamente, se realizaron trasplantes de células de una población muy pequeña (representaba el 0.05% de células totales de la médula ósea) y eran capaces de reconstituir permanentemente los diferentes linajes hematopoyéticos ⁴⁴. Investigaciones posteriores llevaron a la identificación de una población con esas características que expresaban los marcadores CD34+/CD38-/Lin- ^{45,46}. A principios de 1990 diversos estudios mostraron que, en varias formas de leucemia mieloide aguda, las células capaces de implantarse en ratones inmunodeficientes correspondían a una subpoblación definida como CD34+/D38-, compartiendo así marcadores de superficie con células progenitoras normales; además, reconstituían la heterogeneidad fenotípica observada en el donador original. Se demostró que las poblaciones celulares malignas



presentaban una organización jerárquica, similar al sistema de las células troncales ⁴⁷. Posteriormente, se observó en tumores sólidos el mismo fenómeno: en cáncer de mama se identificó una población CD44⁺/CD24^{-low} que tiene la capacidad de mantener el crecimiento tumoral cuando son trasplantados en ratones y de recrear la heterogeneidad fenotípica de los tumores parentales ⁴⁸. A la fecha, las CTC han sido descritas en un amplio espectro de tumores sólidos en diversos tejidos: pulmón, colon, próstata, ovario, cerebro, melanoma, estómago, entre otros ^{49,50}.

2.4.1 Características

Las CTC son una clase de células de cáncer pluripotentes que tienen un comportamiento análogo a las células troncales normales. Se han visto involucradas en procesos fundamentales del desarrollo tumoral, proliferación celular, diseminación metastásica, recurrencia, así como resistencia a tratamientos con quimio y radioterapia ⁴⁹. Debido a su capacidad de autorrenovación, son consideradas una población inmortal ⁵¹. Las características a continuación descritas permiten explicar sus diferentes papeles durante el inicio y desarrollo del tumor.

Las CTC presentan propiedades compartidas con las células troncales normales, como la capacidad de autorrenovación, de dar lugar a células más diferenciadas, tienen una alta expresión de telomerasa, mayor capacidad de evasión de apoptosis y la habilidad de migrar generando en muchos casos metástasis ⁵². Tienen, además, encendidas vías de señalización que son comúnmente activas en las células troncales normales: la vía Wnt juega un rol importante en la autorrenovación y proliferación de células troncales adultas y embrionarias; mutaciones en esta vía han sido identificadas en varios tipos de cáncer y una excesiva activación de esta vía en células troncales normales lleva a su transformación en CTC. La vía Notch es esencial en la proliferación celular y apoptosis durante el desarrollo; la activación de Notch puede prevenir una proliferación excesiva de las células troncales normales y protegerlas de una transformación maligna. Esta vía ha sido vista como un promotor de la transformación durante la tumorigénesis en algunos tejidos



mientras que actúa como inhibidor de estas características en otros tejidos. Por su parte, la vía Hedgehog juega un papel importante en la autorrenovación de una variedad de células troncales. La sobre activación de esta vía ha sido implicada en procesos de carcinogénesis al promover la sobrevida en múltiples tipos de cáncer ⁵³.

En procesos de metástasis se considera a las CTC como las responsables de dicho proceso. La habilidad de las células para migrar de un lugar a otro es un proceso crítico durante el desarrollo embrionario, la regeneración de tejidos y la cicatrización de heridas ⁵⁴. La diseminación de células tumorales está relacionada con este proceso, y ocurre a través de la transdiferenciación de células epiteliales en células mesenquimales conocido como Transición Epitelio Mesénquima (TEM), en el cual ocurre la pérdida en la diferenciación epitelial, la adquisición de un fenotipo migratorio y la pérdida de adhesión celular. La TEM confiere, en algunos casos, la habilidad para degradar proteínas de la matriz extracelular facilitando un comportamiento invasivo. Además, las células que sufren este proceso adquieren resistencia a la senescencia y apoptosis ⁵⁵. Durante la colonización metastásica, las células deben ser capaces de iniciar un proceso en reversa y la plasticidad de las CTC sugiere que son las responsables de este proceso ⁵⁶.

Por otro lado, las CTC son resistentes a la radiación ionizante y quimioterapia. La resistencia a quimioterapia se debe a que poseen una respuesta eficiente al daño al DNA, tienen una tasa de replicación lenta (algunos agentes químicos tienen como blanco las células altamente proliferativas) y poseen transportadores ABC que expulsan los fármacos de la célula y expresan moléculas mediadoras como aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1) que confieren resistencia a agentes quimioterapéuticos en células troncales normales ⁵⁰.

2.4.2 Origen

Existen diferentes teorías acerca del origen de las CTC. Debido a la alta similitud con las células troncales normales en cuanto a sus propiedades, fenotipo, funciones y marcadores de



superficie, una teoría propone que esta población se origina de células troncales o progenitoras normales, las cuales adquieren la habilidad de generar tumores debido a mutaciones genéticas o alteraciones en el microambiente. Una teoría alternativa sugiere que su origen radica en células somáticas normales, los cuales adquieren características de tipo troncal y un comportamiento maligno a través de un proceso de transición epitelio mesénquima ⁵⁷.

2.4.3 Identificación de CTC

Para identificar estas poblaciones se han desarrollado diferentes métodos. El ensayo de población lateral, consiste en la identificación de una población de células que expulsa el colorante de Hoechst, mecanismo que se da a través de transportadores ABC, dichas células son capaces de expulsar agentes quimioterapéuticos, resultando en resistencia a quimioterapia. Esta técnica no requiere de marcadores específicos y puede aplicarse a diferentes tipos de tejidos; sin embargo, debido a la baja especificidad, baja pureza de células aisladas y a la toxicidad del colorante, el uso de esta técnica es muy limitado. Por su parte, la técnica de formación de esferoides consiste en cultivar células en medio libre de suero que contiene varios factores de crecimiento como el factor de crecimiento epitelial (EGF) o el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), entre otros. Bajo estas condiciones, las células inmaduras crecen lentamente y forman conglomerados no adherentes (esferoides) mientras que las células diferenciadas mueren. La desventaja de esta técnica radica en la obtención de una población heterogénea en la que sólo una pequeña fracción de la población tiene habilidad de auto renovación.

Un método más común para identificar a esta población es por la expresión de marcadores de superficie. Las CTC usualmente expresan marcadores específicos, que, aunado a experimentos posteriores, se comprueban las características de estas poblaciones. Comúnmente un número pequeño de células aisladas por algún marcador son inyectados en ratones inmunodeficientes para corroborar su habilidad para formar tumores. Algunos ensayos incluyen el pasaje serial de tumores en modelos animales. Estos ensayos *in vivo* son considerados fisiológicamente



relevantes ya que demuestra la habilidad de formar tumores, capacidad de autorrenovación y de dar lugar a una progenie heterogénea ⁵⁸.

2.5 Marcadores de CTC gástrico

2.5.1 CD24

Es una proteína de superficie celular altamente glicosilada compuesta de una proteína central pequeña. Presenta patrones altamente variables de N- y O- glicosilación dependientes del contexto celular; así, su peso molecular puede variar de 25 a 75 kDa. Está unido a la membrana a través de un anclaje de glucosil fosfatidil inositol (GPI) ⁵⁹ que es unida durante su procesamiento en el retículo endoplásmico ⁶⁰. El cDNA de CD24, en humanos, está compuesto por un marco abierto de lectura corto de 0.24kb y una región larga 3' UTR de 1.8kb, la cual se ha visto asociada con una mayor estabilidad del RNA mensajero ⁶¹. Durante las modificaciones postraduccionales, se remueven dos terceras partes de los aminoácidos originales, resultando en un péptido maduro de 32 residuos ⁶².

En humanos, se encontró una expresión diferencial de CD24 en diferentes estadios de diferenciación de células B: en aquellas que se encuentran en la médula ósea, había una fuerte expresión, mientras que en células B maduras se observó una expresión disminuida, perdiendo su expresión en células plasmáticas y células B de memoria. Se expresa, además, en timocitos CD4⁺CD8⁺, donde se ha visto que juega un papel importante en la proliferación; Durante el desarrollo embrionario, se ha reportado su expresión en páncreas y sistema nervioso⁶⁰. Se vio en un estudio *in vitro* que células troncales pluripotentes humanas adquirirían mayores niveles de expresión de CD24 durante la diferenciación neural, así como en células troncales neurales durante la diferenciación a neuroblastos y neuronas ⁶². En células diferenciadas se ha visto su expresión en células epiteliales y musculares. ⁶⁰.



Está involucrada en vías de transducción de señales a través de su interacción con proteínas asociadas, los cuales pueden interactuar con CD24 en la misma célula (cis) o células adyacentes (trans)⁶². CD24 recluta proteínas tirosina cinasas de la familia Src vía balsas lipídicas, el cual activa vías involucradas en el desarrollo de células B y T, apoptosis, unión celular y estallido respiratorio de granulocitos ⁶¹. Por otro lado, hay una estrecha relación entre la expresión de CD24 y el factor kB nuclear (NF-kB) en el cual NF-kB regula la expresión de CD24 a la alta después de daño tisular, y posteriormente éste suprime la actividad de NF-kB, llevando a una disminución en la expresión de citocinas inflamatorias. CD24 también se ha visto involucrada en la vía Hedgehog al ser el promotor de CD24 un blanco de Gli1, un componente de la vía Sonic Hedgehog ⁶².

Se ha reportado como marcador de CTC de páncreas, intestino, mama, sistema nervioso y gástrico ^{63,64}. Se ha visto una fuerte expresión de CD24 en meduloblastomas, neurocitomas y neuroblastomas indiferenciados ⁵⁹. En cáncer de páncreas, células CD44⁺/CD24⁺ eran capaces de generar tumores en ratones inmunodeficientes, tenían capacidad de autorrenovación, daban lugar a progenie diferenciada y generaban una morfología similar al cáncer primario del paciente. Por su parte, en tumores del tracto gastrointestinal se ha observado una sobre expresión de CD24 en adenomas y adenocarcinomas de esófago, estómago e intestino grueso y delgado, respecto a muestras de tejido normal ⁶⁰. En cáncer gástrico, CD24 está involucrado en procesos de proliferación, migración y quimio sensibilidad ⁶⁵, así como a un incremento en la invasividad y un peor pronóstico ⁶⁶. En un estudio con líneas celulares de cáncer gástrico, MKN45 y SGC7901, se enriqueció la población con fenotipo tipo troncal al crecerlas como esferoides en medio libre de suero; las células derivadas de estos esferoides presentaban una mayor proporción de células que expresaban CD24 y CD44 respecto a las células parentales ⁶⁷, mientras que en otro estudio con la línea celular AGS las células CD44⁺/CD24⁺ presentaban propiedades tumorigénicas, de autorrenovación y eran capaces de dar lugar a progenie diferenciada al inyectarlas en ratones inmunodeficientes, además de incrementar la expresión de vías de señalización Sonic Hedgehog, patched 1 y GLI13, componentes de la vía Sonic Hedgehog (SHH), importante en la regulación de la autorrenovación de células troncales de diferentes tipos de cáncer ⁶⁸.



CD24 tiene un rol importante en la proliferación y diferenciación celular, los cuales podrían contribuir en procesos de carcinogénesis. Se une de manera específica a P-selectina, que se expresa principalmente en plaquetas y endotelio, proporcionando a la célula la capacidad de desplazarse y atravesar el endotelio vascular ⁶⁰.

2.5.2 CD44

La familia de proteínas CD44 son una clase de glucoproteínas transmembranales involucradas en la adhesión celular y la transducción de señales. Posee 3 dominios: un dominio citoplásmico de 70 aminoácidos, un dominio transmembranal de 23 aminoácidos y un dominio extracelular que incluye un tallo de 44 aminoácidos, una región variable mayor a 381 aminoácidos y una región globular N-terminal con 224 aminoácidos. La familia de CD44 consiste en más de 20 diferentes isoformas con un peso molecular de 80- 200 kDa ⁶⁹. El gen de CD44 consiste en 20 exones y 19 intrones; 10 de estos exones son expresados en todas las isoformas (exones constantes), mientras que los 10 exones centrales son variables y sufren *splicing* alternativo formando diferentes versiones de la proteína en la región del tallo, dando lugar a las isoformas variables de CD44 (CD44v). La isoforma estándar (CD44s) de la proteína es la más pequeña y contiene sólo los 10 exones constantes, y se encuentra expresada en la mayoría de las células de vertebrados; en humanos se expresa en leucocitos, fibroblastos, células epiteliales, queratinocitos, células mesenquimales, hepatocitos y algunas células endoteliales⁷, mientras que las isoformas variables son expresadas en algunas células y bajo condiciones específicas, principalmente en diferentes tipos de cánceres en etapas avanzadas. La introducción de nuevos exones en las isoformas variables modula la afinidad de unión a sus ligandos, como el ácido hialurónico, al inducir cambios conformacionales o permitir a las isoformas tener una nueva función como correceptor al generar nuevos sitios de unión para algunos factores de crecimiento, receptores, entre otros ⁷⁰.



El dominio intracelular de CD44 juega un papel importante en la transducción de señales ya que contiene una señal de localización nuclear que puede ser cortada de la membrana y translocarse al núcleo regulando la expresión de genes blanco como CD44, ciclina D1, MMP-9, HIF-2 α , c-myc y twist1. La unión de proteínas del citoesqueleto ankirina y ERM (ezrina, radixina, moesina) al tallo citoplásmico de CD44 involucra a CD44 en el remodelamiento del citoesqueleto de actina con funciones involucradas en la regulación de la TEM, a la motilidad y la migración celular ⁷⁰.

CD44 sufre de modificaciones post-traduccionales, incluyendo N- y O- glicosilación, fosforilación, sulfatación y corte de dominio ⁷⁰. Los exones variantes pueden introducir nuevos sitios de glucosilación: el exón v3 contiene un motivo Ser-Gly-Ser-Gly que da lugar a modificaciones por condroitin sulfato y heparán sulfato ⁷¹. Cambios en la glucosilación de CD44, la inserción de exones variantes, su agrupamiento en la membrana y la modulación por el dominio citoplásmico pueden determinar la forma activa o inactiva de CD44. CD44 modificado por condroitin sulfato se une a otros componentes de la matriz extracelular como colágeno y fibronectina; modificaciones por heparan sulfato de CD44 con el exón variante 3 se une a factores de crecimiento de unión a heparan ⁷¹.

La unión de CD44 con el ácido hialurónico juega un papel importante en los mecanismos de migración dirigida o *homing* en la localización de células troncales en sitios específicos. En un modelo de ratón con daño renal, las células troncales mesenquimales que se le inyectaron fueron reclutadas al riñón dañado. Dicho reclutamiento era bloqueado al añadir un anticuerpo competitivo de CD44 ⁷², además, puede modular la secreción y activación de MMP-2 ⁷³, lo cual lo convierte en una molécula implicada en procesos de migración.

CD44 es un marcador ampliamente reportado de CTC de diferentes tipos de tejido (intestino, mama, cabeza, cuello, páncreas ovario y gástrico) ⁶⁴. En cáncer gástrico se han visto las propiedades tipo troncales en células que expresan dicho marcador: en un estudio con líneas celulares de cáncer gástrico (MKN-45, MKN-74 y NCI-N87) la subpoblación CD44⁺ era capaz de



formar esferoides en medio libre de suero, tenía habilidad tumorigénica cuando eran inyectados en ratones inmunodeficientes y la habilidad para dar lugar a progenie CD44⁻ ⁷⁴. También ha mostrado incrementar la resistencia a fármacos: células CD44⁺ de 3 líneas celulares diferentes de cáncer gástrico (AGS, MKN-45 y NCI-N87) mostraron mayor resistencia a 5-fluorouracil y cicplatino respecto a células que no expresaban dicho marcador; además, incrementaba su capacidad migratoria de invasión y crecimiento independiente de anclaje ⁷⁵.

El papel de CD44 en promover metástasis e invasión celular recae en su rol nativo en motilidad, activación y adhesión celular. Además, se ha visto una correlación en la expresión de CD44 con un pobre pronóstico y pobre respuesta al tratamiento en cáncer gástrico, condrosarcoma, cáncer de mama y hepatoblastoma ⁶⁹.

2.5.3 DCLK1

DCLK1 o Cinasa 1 tipo doblecortina, contiene un dominio N-terminal de unión a microtúbulos tipo doblecortina, una proteína implicada en la migración a través del sistema nervioso central y periférico de neuronas durante el desarrollo embrionario ⁷⁶, y un dominio C-terminal serina/treonina cinasa. Entre estos dos dominios hay una región rica en serina/prolina en la cual se cree que pueden unirse otras proteínas⁷⁷. Contiene al menos 4 variantes por *splicing*. Su sobre expresión estimula la elongación de microtúbulos independiente de su función de cinasa ⁷⁸.

Se expresa en neuronas postmitóticas, células de la glia radial, precursores neuronales, estómago, intestino y páncreas ⁷⁹. Fue inicialmente propuesto como marcador quiescente de células troncales gastrointestinales, sin embargo, la mayoría de las células DCLK1+ en el intestino no corresponden a células troncales, sino a células en penacho de larga vida, quiescentes y que regulan y contribuyen al nicho de células troncales ⁷⁸. Posteriormente, se demostró que DCLK1 no corresponde a un marcador de células troncales intestinales, pero sí de CTC de intestino ⁸⁰. En



cáncer gástrico, DCLK1 se expresa durante el desarrollo embrionario en la región del cuerpo y antro; así como en tejido dañado del estómago, regeneración y metaplasia ⁸¹. En un modelo murino en el que se formaban tumores por la eliminación del gen *Smad3* (*Smad3^{-/-}*), se observó una prominente expansión de las células positivas a DCLK1 y no expresaban marcadores asociados con linajes diferenciados ⁸². La sobre expresión de DCLK1 en muestras de pacientes se vio correlacionada con el estadio e invasión linfovascular ⁸³.

2.5.4 Villin

Es una proteína de 95 kDa miembro de la super familia de gelsolina, los cuales regulan la longitud de los filamentos de actina al cortar filamentos y/o cubriendo los extremos ⁸⁴. Villin puede polimerizar y despolimerizar los filamentos de actina por su actividad de cortar, nuclear, empaquetar y terminar la elongación (*capping*) de los filamentos de actina. Su unión a actina es dependiente de calcio y puede unirse por dos sitios: uno en la región central (corresponde a un dominio conservado con gelsolina) y un segundo sitio en su dominio C- terminal. La función de Villin está controlada por modificaciones post-traduccionales: la función de *capping* es regulada por calcio (incrementándolo) y fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) (disminuyéndolo); la nucleación de actina es inhibida por la fosforilación de tirosinas, mientras que el calcio promueve la nucleación de filamentos de actina; El corte por parte de Villin es potencializado por la fosforilación de tirosinas de Villin y es inhibido por la asociación de Villin con PIP₂. La función de empaquetamiento es potencializado por la unión de Villin con PIP₂ pero es inhibido por la fosforilación de Villin ⁸⁵.

Es expresada a altos niveles en el epitelio intestinal, saco vitelino y túbulo proximales de riñón y a bajos niveles en el antro del estómago murino embrionario antes del día 16.5 para ser subsecuentemente silenciado ⁷⁷. Durante el desarrollo embrionario, Villin se asocia con la superficie apical de células epiteliales antes de que el citoesqueleto de actina se haya establecido, lo cual sugiere que su distribución no depende en su totalidad por la densidad de microfilamentos



de actina ⁸⁵. La superficie apical de las células epiteliales posee una morfología característica consistiendo en microvellosidades, sitios en los cuales los filamentos de actina tienen una localización predominante, y con ello las proteínas que regulan su polimerización. Villin ha sido implicado en diversas funciones: morfología celular, transducción de señales, TEM, invasión celular y apoptosis ⁸⁵.

Fue el primer biomarcador de células troncales gástricas, de larga vida y capaces de regenerar células de diferentes linajes del epitelio gástrico ⁸⁶ cuyas células están enriquecidas en la curvatura menor del antro ⁸⁷. En un modelo murino al que se eliminó la expresión de Klf4, el cual juega un papel importante en la reprogramación de células diferenciadas a células troncales pluripotentes inducidas, llevaba a hipertrofia y posteriormente a adenomas gástricos a la semana 80 en células con el promotor de Villin activo ⁸⁶. En muestras de tejido de pacientes con cáncer gástrico avanzado se observó una fuerte expresión de Villin de las muestras de tipo intestinal, con distribución en las microvellosidades, mientras que la expresión de Villin en carcinomas de tipo difuso el porcentaje varió de 10% a 100% y podían pero no necesariamente expresarse en las microvellosidades ⁸⁸. En otro estudio, se observó una fuerte expresión de Villin en las criptas metaplásicas en la mucosa del antro que exhibían metaplasia intestinal mientras que el tejido adyacente no metaplásico revelaba una tinción apical más tenue. No se observó expresión de Villin en la región del cuerpo del estómago ⁸⁹.

Se han reportado dos casos de metástasis para células de cáncer gástrico positivas a Villin: metástasis cutánea después de 15 años de haberse realizado gastrectomía de un adenocarcinoma gástrico avanzado. La examinación histopatológica reveló células de adenocarcinoma poco diferenciadas y positivas a Villin ⁹⁰; células de adenocarcinoma gástrico que metastatizaron a la mama derecha, la biopsia mostró células positivas a Villin y otros marcadores. Su expresión puede ser útil para identificar células que metastatizan de adenocarcinoma de estómago ⁹¹.



3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cambio en los patrones de expresión y localización de las claudinas se ha visto en diferentes tipos de cáncer ^{19,33,34}. En cáncer de mama, la desregulación de Claudinas-3, -4 y -7 enriquece las características de tipo “stem” y de transición epitelio mesénquima (TEM) ⁹². Por otro lado, en trabajos sobre cáncer gástrico, se detectó una sobre expresión de claudinas-6, -7 y -9 en biopsias de tipo difuso e intestinal, principalmente en la región citosólica⁴¹, mientras que en un estudio in vitro, la línea celular de adenocarcinoma gástrico, AGS, incrementó su potencial invasivo, migratorio y su tasa de proliferación al sobre expresar dichas claudinas ⁴². Claudina-9 se expresa en el riñón neonatal de ratón y su expresión en la edad adulta es nulo o muy bajo ³⁸, mientras que claudina-6 es sobre expresada en células troncales y participa en la formación del epitelio en embriones de ratón, pudiendo estar relacionada con procesos de desdiferenciación es decir, procesos de desarrollo inverso en el que las células diferenciadas terminales con funciones especializadas regresan a una fase menos diferenciada dentro de su propio linaje celular ⁹³. Por ello, es de interés investigar si la sobre expresión de Claudina-6 y -9 están implicados en la adquisición de un fenotipo troncal.

4. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que ya se han identificado algunos marcadores de CTC gástrico como CD44, CD24, Villin o DCLK1 ^{68,77} poco se sabe sobre el efecto que tiene la sobre expresión de ciertas claudinas involucradas en la expresión de dichos marcadores y la adquisición de un fenotipo desdiferenciado con la formación y regulación de CTC. Dados los efectos que tiene su expresión en células de cáncer gástrico, Claudina-6 y -9 podrían contribuir al enriquecimiento de CTC, pudiéndose establecer así las bases para un diagnóstico temprano y proponer nuevas terapias contra el cáncer.



5. HIPÓTESIS

La sobre expresión de Cldn -6 ó -9 modificará la expresión de marcadores de CTC en la línea celular de adenocarcinoma gástrico (AGS).

6. OBJETIVO

- ❖ Demostrar que la sobre expresión de Claudinas -6 y -9 induce un incremento en la expresión de marcadores de CTC.

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Clonar la secuencia de Claudina-6 y -9 en el vector pmaxGFP
- 2.-Transfectar células AGS con los vectores recombinantes que contienen la secuencia de Claudina-6 ó Claudina-9
- 3.- Evaluar la expresión de CD44, CD24, Villin y DCLK1 en células sin transfectar y transfectadas



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Clonación

7.1.1 Amplificación de la secuencia de Claudina-6 y -9 por PCR

Para obtener la secuencia de Claudina-6 y -9, se partió de un constructo previamente realizado con el vector pcDNA3.1/ NT-GFP-TOPO (Invitrogen). Para aislar el plásmido, se realizó un miniprep de diferentes gliceroles de *Escherichia coli*, cepa DH5 α , que contenían el vector. Se mantuvieron en cultivo toda la noche en medio LB suplementado con ampicilina a una concentración de 70 μ g/mL, y se corroboró por PCR la presencia del inserto. Para la amplificación, se utilizaron las siguientes parejas de cebadores para Claudina-6: *forward* 5' CTCGAATGGCCTCTGCCGGAATGCA 3' y *reverse* 5' TCAGACGTAATTCTTGGTAGGGT 3'; y los siguientes cebadores para Claudina-9: *forward* 5' CTCGAATGGCTTCGACCGGCTTAGA 3' y *reverse* 5' TCACACGTAGTCCCTCTGTCCA 3' (Integrated DNA Technologies). Para establecer la temperatura de alineamiento, se realizó un gradiente con las siguientes temperaturas: 59, 61, 63, 65 y 67°C. Así, las condiciones de la reacción fueron: 3 minutos de desnaturalización a 95°C, 35 segundos a 95°C, 35 segundos a 63°C y 45 segundos a 72°C por 35 ciclos; como extensión final se estableció un minuto a 72°C. La reacción se realizó en volumen de 25 μ L con la enzima kapa taq (Kapa Biosystems). Los productos resultantes se corrieron en un gel de agarosa al 0.8% a 50 mA para la visualización de la banda esperada (668pb de Cldn-6 y 659pb de Cldn-9). Posteriormente, se purificaron los productos de PCR.

7.1.2 Ligación de los productos amplificados por PCR

El constructo se realizó en el vector pmaxGFP (amaxa) el cual se digirió con la enzima Eco53KI (New England Biolabs) por 2 horas, posteriormente se desfosforiló el vector con la enzima fosfatasa alcalina CIP (New England Biolabs) para evitar su recircularización. Posteriormente, se eliminaron los nucleótidos excedentes, producto de la actividad extendasa de la polimerasa,



(*polishing*) con la enzima T4 DNA polimerasa (New England Biolabs). Para la ligación, se realizó la reacción en 10µL con la enzima T3 ligasa (New England Biolabs) por 2 horas de acuerdo con las indicaciones del fabricante, en un radio 1:3 (100ng vector: 57.8ng inserto) según la siguiente fórmula:

$$\frac{(ng \text{ vector})(Kb \text{ tamaño del inserto})}{Kb \text{ tamaño inserto}} \times \text{radio} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} = ng \text{ del inserto}$$

Los productos de PCR y todas las reacciones con enzimas se purificaron con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Todos los geles de agarosa se corrieron en buffer TAE 1X y se cargaron 5µL de los productos de PCR. Se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) y el buffer de carga Blue/orange Loading Dye 6X (Promega). Las electroforesis se realizaron a 50 mA (miliamperios) por 1.3 horas, después se tiñeron los geles en una solución de bromuro de etidio (5ng/mL) para observarlos bajo luz UV.

7.1.3 Transformación de la cepa DH5α

La cepa de *Escherichia coli* DH5α se usó para la clonación del vector recombinante. Se utilizaron 5µL de la reacción de ligación en 50µL de la solución de bacterias competentes. La transformación se realizó por choque de térmico: se colocaron 30 minutos en hielo, 90 segundos a 42°C y 5 minutos en hielo; para la recuperación se les añadió 1mL de medio LB y se incubaron 1 hora a 37°C. Posteriormente, se plaquearon las bacterias en medio LB agar suplementado con kanamicina a una concentración de 50µg/mL y se dejaron crecer toda la noche a 37°C. A las colonias que crecieron tanto para claudina-6 como para claudina-9 se les realizó un PCR de colonias para corroborar la presencia del inserto. Las colonias seleccionadas se crecieron en medio LB para la posterior purificación de los plásmidos por midiprep. Se corroboró que el inserto estuviera en sentido por restricción de la enzima PstI (New England Biolabs) digiriéndose 1µg del plásmido con 20 unidades de enzima por 2.5 horas a 37°C. Los plásmidos recombinantes se



mandaron a secuenciar al Instituto de Fisiología Celular, UNAM. El resto del vector se utilizó para la transfección.

Para el cultivo de bacterias, se crecieron en medio LB (Affymetrix) toda la noche a 37°C y a 250 rpm. Para obtener colonias aisladas, se prepararon cajas Petri con 10 mL de LB agar (Affymetrix). Los glicerol se prepararon centrifugando el cultivo a 4000 rpm por 20 minutos y posteriormente resuspendiendo la pastilla en medio LB con glicerol al 30% y se almacenaron a -70 ° C para su posterior utilización. El midi prep se realizó con el kit Wizard Plus Midipreps DNA purification System (Promega) y la cuantificación de DNA se realizó en el equipo Nanodrop 2000 (ThermoFisher) a 260 nm.

7.1.4 PCR de colonias

Para corroborar la presencia del inserto, se picaron y lisaron algunas colonias. Para ello, se tomó colonias al azar y se disolvió en 100µL de agua estéril. Se mantuvo a 95°C por 10 min y se centrifugó a 14000rpm por 5 min. El DNA se encuentra en el sobrenadante del tubo.

7.2 Transfección

7.2.1 Cultivo de la línea celular AGS

La línea celular de adenocarcinoma gástrico AGS se mantuvo en cultivo con medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biowest), 2mM de L-glutamina (Biowest), 100 U/mL de penicilina-estreptomina (Biowest), y 2mM de piruvato de sodio (Corning). Los cultivos se incubaron a 37°C, 5% CO₂. El mantenimiento se realizó cambiando de medio cada 2 días y lavando con PBS antes de colocar medio nuevo.



7.2.2 Transfección con lipofectamina

Antes de la transfección, se realizó una curva de geneticina en el cultivo de células AGS: se mantuvieron en cultivo a una confluencia del 90% con medio DMEM y geneticina a diferentes concentraciones (400, 500, 600, 700, 800 y 900 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 10 días y se determinó la concentración óptima para la selección de células transfectadas. Para realizar una transfección estable, se digirió el vector con la enzima *AfIII* (new england) por 19 horas y se corroboró la completa linealización del vector por gel. El cultivo se realizó en placas de 6 pozos con una confluencia del 90% (4.5×10^5 células por pozo), se lavó dos veces con PBS y se adicionó medio Opti-MEM (GIBCO). Posteriormente, para la formación de los liposomas, se utilizaron 5 μL de lipofectamina 2000 (Invitrogen) y 2.5 μg de DNA por pozo; se incubó el cultivo con los liposomas 6 horas para después retirar el medio de transfección y añadir medio DMEM suplementado. Se mantuvo el cultivo cambiando de medio cada 2 días sin lavados de PBS y adicionando geneticina a una concentración final de 500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ tres días después de la transfección. Una curva de geneticina previamente realizada determinó que son requeridos 10 días con antibiótico de selección para eliminar las células no resistentes.

7.3 Citometría de flujo

7.3.1 Separación celular activada por fluorescencia (FACS)

Dado que no todas las células transfectadas expresaban GFP, se separaron por *sorting* celular aquellas positivas a esta fluorescencia en el equipo FACS Aria (BD Biosciences). Los cultivos se mantuvieron 10 días en condiciones normales (DMEM suplementado con geneticina) antes de realizar el siguiente *sorting*. Para los cultivos transfectados para sobre expresar Cldn-6 y -9, se realizó posteriormente un *sorting* en placa de 96 pozos, sembrando una célula por pozo, para obtener así diferentes clonas. Se seleccionó la clona con mayor expresión de GFP.



7.3.2 Adquisición de datos

Las células se cultivaron en cajas p100, se lavaron dos veces con PBS y se despegaron incubando 5 minutos con PBS + EDTA. La suspensión celular se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm y se resuspendió en buffer de citometría. Se incubaron 4×10^5 células con los anticuerpos CD24 Alexa Fluor 405 (Novus Biologicals, 1:200), CD44 Alexa Fluor 594 (Biolegend, 1:200) y los isotipos IgG2bk Alexa Fluor 405 (Novus Biologicals, 1:200) e IgG2bk Alexa Fluor 594 (Biolegend 1:400), todos anticuerpos de rata, por 30 minutos para marcar epítomos de las moléculas de superficie celular y sus respectivos controles de pegado inespecífico. Posteriormente, se fijaron y permeabilizaron las células usando la solución Cytofix/Cytoperm y Permwash (BD biosciences), respectivamente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se incubaron las células por 50 minutos con los siguientes anticuerpos: DCLK1 APC (LifeSpan BioSciences, 1:50), Villin PE (LifeSpan BioSciences, 1:100), cabra anti Claudina-6 (Santa Cruz, 1:100), cabra anti Claudina-9 (Santa Cruz, 1:100) y los isotipos de conejo: IgG-APC (R&D Systems, 1:800) e IgG-PE (Novus Biologicals, 1:4000). Para detectar la expresión de Cldn-6 y -9, se incubó 30 min con el anticuerpo secundario anti- cabra Alexa Fluor 594 (1:400). Todas las marcas se incubaron a 4°C en oscuridad.

Para los controles de compensación, se utilizó el kit AbC Total Antibody Compensation Bead (Thermo Fisher Scientific) incubando 10 μ L de la solución de perlas de compensación y 90 μ L de buffer de citometría con las siguientes cantidades de anticuerpo: 0.2 μ L CD44 Alexa Fluor 594 (Biolegend), 0.2 μ L Villin PE (LifeSpan BioSciences) y 0.3 μ L DCLK1 APC (LifeSpan BioSciences) por 20 minutos a temperatura ambiente y cubiertos de la luz. La señal de GFP y CD24 se compensó con una solución de células positivas y negativas a dichas moléculas.

La intensidad de fluorescencia fue determinada por el equipo Attune Nxt (Thermo Fisher Scientific) y el análisis de los datos se realizó con el programa FlowJo.



7.4 Microscopía de fluorescencia

Para saber la localización y patrones de expresión de GFP en las células transfectadas, las células sobrantes que se procesaron para citometría se fijaron en laminillas. Para ello, las células en suspensión se incubaron 20 min a 4°C con DAPI (Sigma-Aldrich, 1µg/mL) y se realizaron dos lavados con buffer de citometría. Posteriormente, se realizó cytospin centrifugando a 700 rpm, 5 min a 4°C con portaobjetos. Se les añadió 10µL de solución de montaje (Dako) por laminilla y se visualizaron en el microscopio confocal (Nikon, Tokyo, Japan) usando una longitud de excitación de 488 nm.

7.5 Análisis estadístico

Se realizó una prueba de ANOVA de una vía para evaluar si existían diferencias significativas entre las intensidades medias de fluorescencia de los grupos experimentales: AGS-WT, AGS-GFP, AGS-CLDN6 y AGS-CLDN9. Posteriormente se realizó la prueba de comparación múltiple de Dunnett para evaluar el cambio entre las transfectantes respecto al control de transfección y la línea *wild type*. Se consideró un cambio significativo a aquellos valores que obtenían un valor de $p < 0.5$.



8. RESULTADOS

8.1 Clonación de Cldn-6 y Cldn-9 en el vector pmaxGFP

Para la clonación en el vector pmaxGFP se utilizó la enzima Eco53KI, que corta los últimos 8 nucleótidos de la secuencia de GFP (Figura 3 a y b). Para reconstituir los nucleótidos cortados, se utilizaron primers que contenían esta secuencia, cambiando el codón de paro por uno de inicio (Fig 3c).

Para obtener los insertos, se buscó en diferentes gliceroles de bacterias transformadas con el vector pCDNA 3.1, la presencia de las secuencias de Cldn-6 y Cldn-9. Para ello se mantuvieron en cultivo en medio LB (suplementado con 70 µg/mL de ampicilina) toda la noche a 37°C, y se aislaron los plásmidos por miniprep. Una vez purificados, se pudo realizar un PCR para cada una de estas muestras, utilizando para cada caso primers de Claudina-6 y de Claudina-9 en reacciones separadas. Esto, para corroborar la amplificación específica de dichos primers, debido a la alta similitud que hay entre estas claudinas. Los productos de PCR esperados para Claudina-6 y -9 son de 668 y 659 pb, respectivamente. La electroforesis (Figura 4) muestra las 8 muestras en las que se buscaron los insertos a clonar: las primeras 4 muestras en ambos geles corresponden a muestras que deben contener la secuencia de Claudina-9, las siguientes 4 muestras deben contener la secuencia de Claudina-6. Los templados que se consideraron para amplificar el inserto de Claudina-6 y Claudina-9 son los carriles 6 y 5, respectivamente.

Debido a que se obtenían dos bandas como productos de PCR, se determinó la temperatura de alineamiento óptima probando 5 temperaturas diferentes (59, 61, 63, 65 y 67°C). La temperatura óptima para ambos templados fue de 63°C (Figura 5).

Para la ligación, una vez que el vector se digirió con la enzima Eco53KI (Figura 6a), se eliminaron los grupos fosfato de los extremos del vector con la enzima fosfatasa alcalina CIP (New England Biolabs), el cual remueve los grupos fosfato en el extremo 5'. Debido a la ausencia de este grupo fosfato, la ligasa no puede catalizar un enlace fosfodiéster con el grupo OH del extremo 3', evitando así la recircularización del vector y con ello reduciendo la posibilidad de obtener colonias con el plásmido no recombinado.



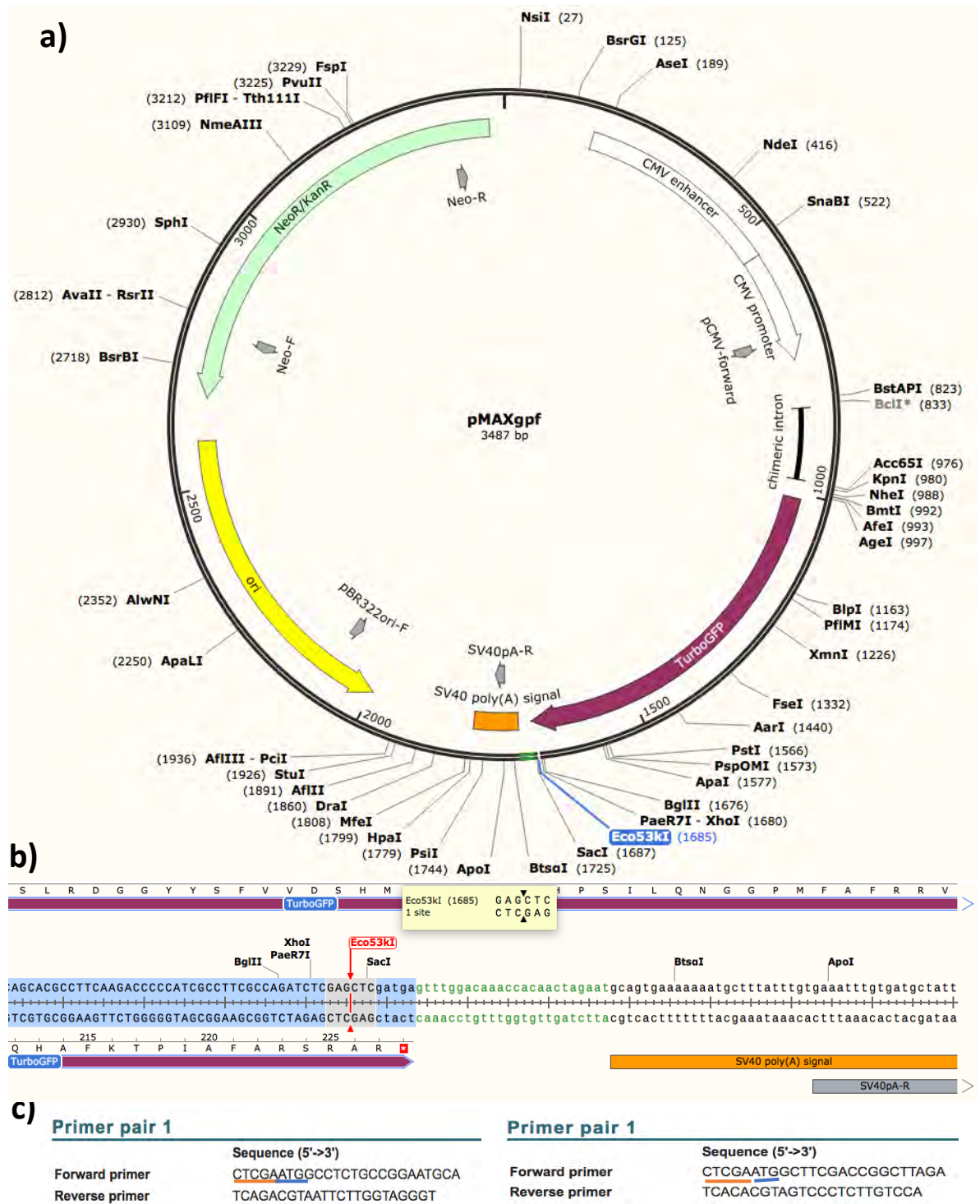


Figura 3. Sitio de corte del vector pmaxGFP y reconstitución de la secuencia de GFP en los primers.
 a) La digestión del vector por la enzima Eco53KI resulta en un corte de la secuencia de GFP, b) generando extremos romos en el vector. c) El diseño de los primers permite reconstituir este fragmento (línea roja) tanto para la amplificación de Cldn-6 (derecha) como de Cldn-9 (izquierda). La línea azul muestra el cambio de codón de paro por uno de inicio. Los sitios de corte del vector se analizaron con SnapGene.



Por otro lado, la enzima *Taq* DNA polimerasa puede tener actividad extendasa, que consiste en la adición de un nucleótido en el extremo 3' del polinucleótido amplificado⁹⁴, por lo que los productos de PCR pueden contener extremos protuberantes en dicho extremo. Esta adición puede ser un factor crítico que determine la eficiencia de la clonación de los insertos en el vector⁹⁵. Por ello, para “quitar” o “pulir” estos extremos protuberantes 3', se utilizó la enzima T4 DNA polimerasa que tiene actividad 3'-5' exonucleasa. La integridad del vector y de los insertos se corroboró al correr las muestras en un gel de agarosa (Figura 6).

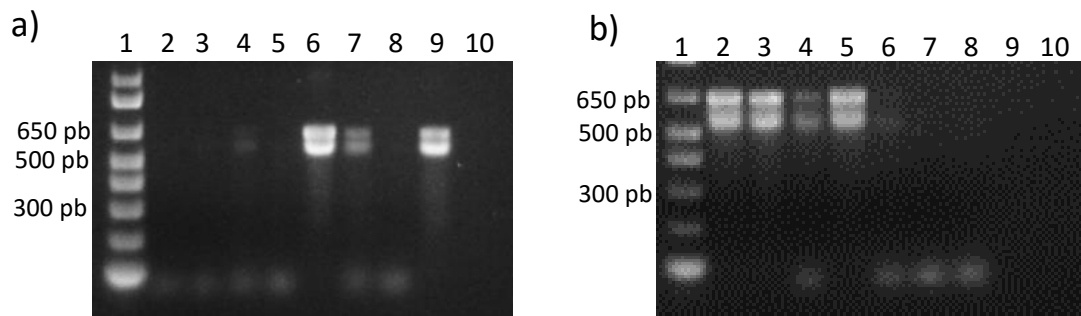


Figura 4. PCR de bacterias que contenían las secuencias de Cldn-6 y Cldn-9. Se tomaron 9 muestras de bacterias conservadas en glicerol (carriles 2-10) para seleccionar aquellos que contienen la secuencia de Cldn-6 y Cldn-9. Las reacciones se realizaron con primers de Cldn-6 (inciso a) y con primers de Cldn-9 (inciso b). Carriles 2-5 contienen templados de Cldn-9, carriles 6-9 contienen templados de Cldn-6 y el carril 10 contiene el vector pcDNA sin inserto como control negativo.

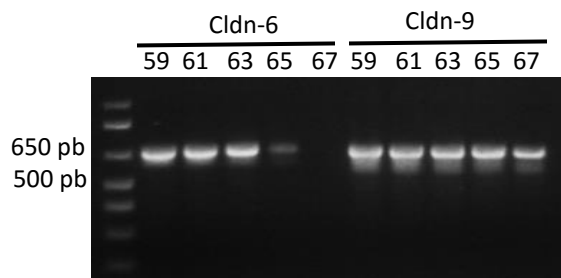


Figura 5. Determinación de la TM óptima de los primers. 5 temperaturas de alineamiento fueron probadas para cada templado. La temperatura se muestra en grados Celsius.

Una vez realizada la ligación, se transformaron bacterias competentes por choque térmico y se plaquearon en medio LB con kanamicina. Se obtuvieron múltiples colonias para el vector pmaxGFP Cldn9 y sólo una colonia para el vector pmaxGFP Cldn6 (Figura 7).



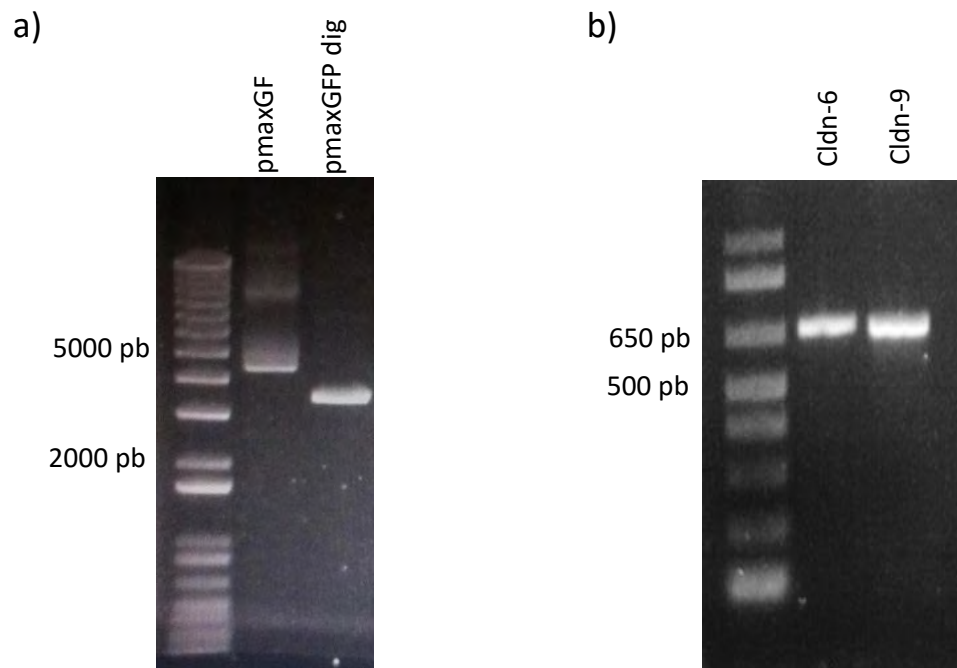


Figura 6. Integridad del vector e insertos para la clonación de los vectores pmaxGFP Cldn6 y pmax Cldn9. a) Vector pmaxGFP digerido y desfosforilado; y b) productos de PCR después de ser pulidos.

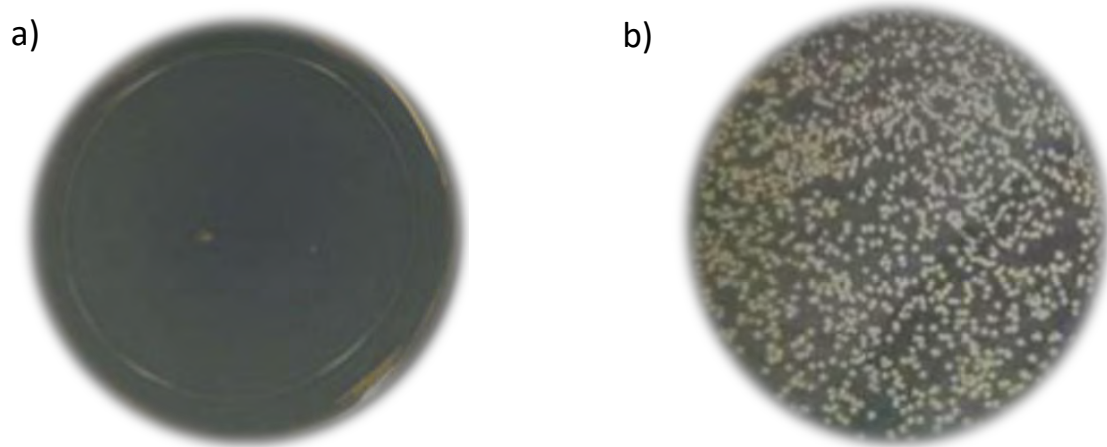


Figura 7. Colonias obtenidas después de la transformación. a) Se obtuvo una colonia transformando con el vector pmax cldn6 y b) se obtuvieron múltiples colonias con el vector pmax cldn9



8.2 Presencia del inserto y validación del sentido de Cldn-6 y -9

Para validar la presencia de los insertos, se realizó PCR a la única colonia que creció para Cldn-6 y se seleccionaron 10 colonias para Cldn-9, en las cuales se encontró que todas contenían sus respectivos insertos (Figura 8). Para corroborar que las secuencias se insertaron en sentido correcto, se realizó una digestión con la enzima PstI que hace un corte en el vector, separando los últimos 127 nucleótidos de la secuencia de GFP, y un corte en la secuencia de Claudina-6 y -9, en el nucleótido 233 (Figura 9) por lo que el peso esperado del fragmento más pequeño es de 360 pb para ambos vectores (pmaxGFP Cldn6 y pmaxGFP Cln9). Si las secuencias de las claudinas se insertaron en el sentido opuesto, el peso de dicho fragmento sería de 557 y 548pb (claudina-6 y -9, respectivamente). En el caso de la colonia de Claudina-6, la banda corresponde al patrón esperado, mientras que de las 5 colonias a las que se les realizó la prueba de restricción, 3 de ellas presentaron dicho patrón (Figura 10).

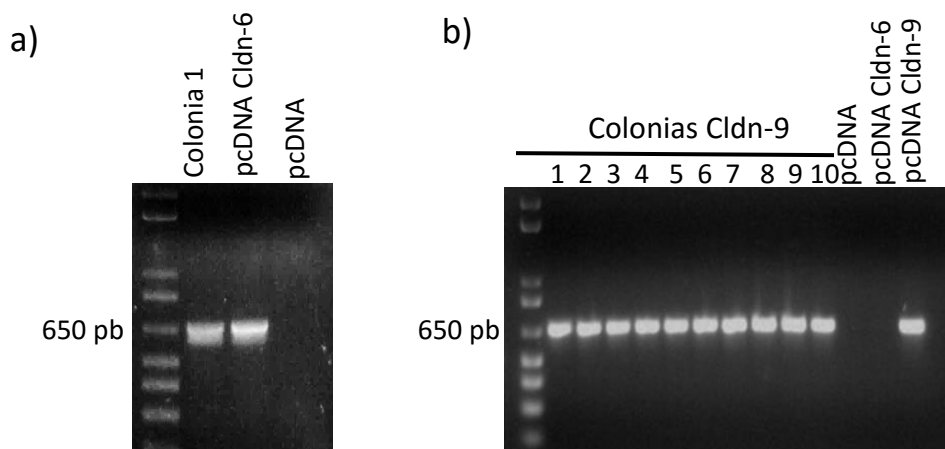


Figura 8. Presencia del inserto en las colonias seleccionadas. a) La única colonia del inserto de Cldn6 contenía dicha secuencia, b) las 10 colonias seleccionadas del inserto de Cldn-9 contenían la secuencia.



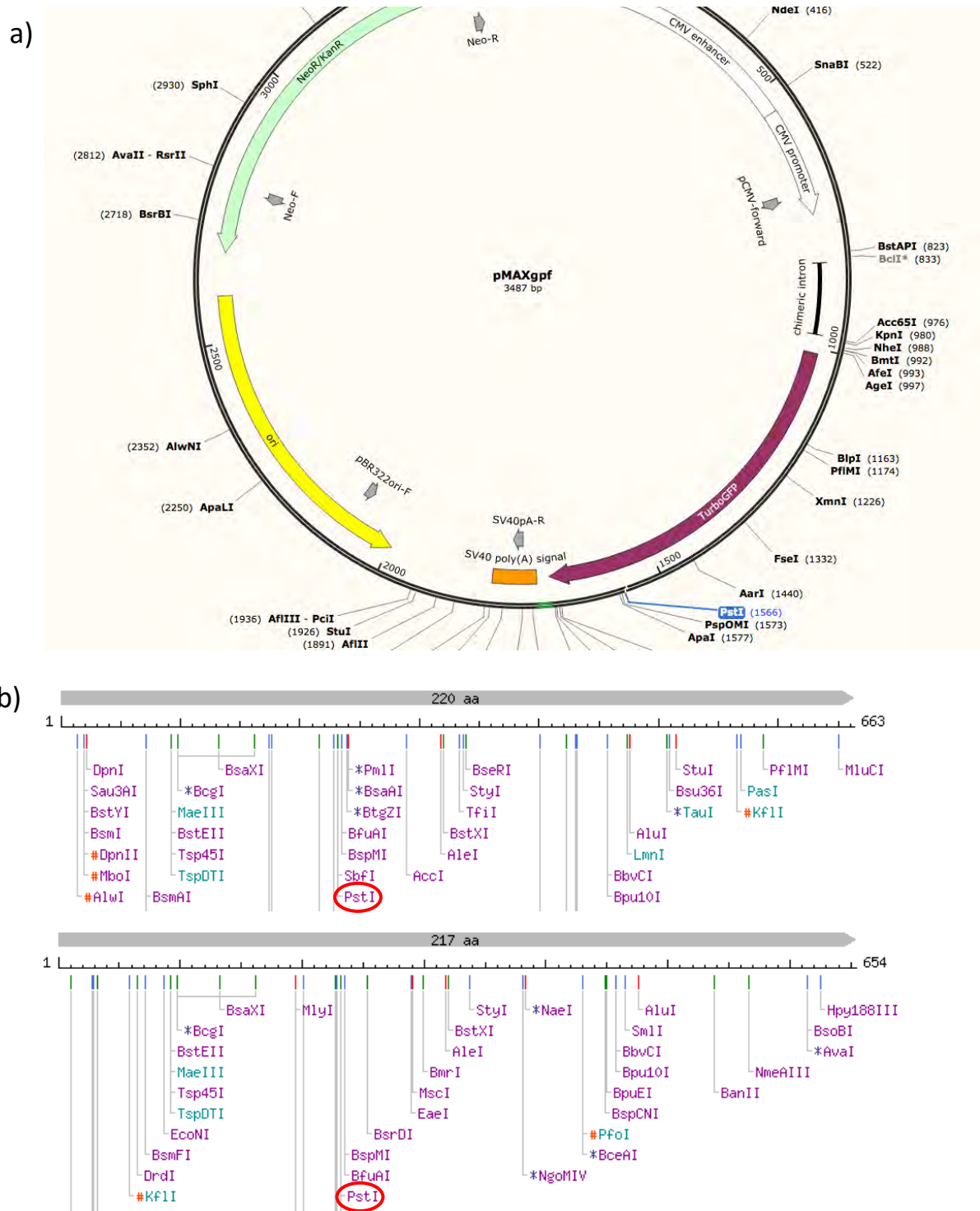


Figura 9. Sitios de corte de la enzima PstI. a) PstI corta al vector en el nucleótido 1566, los últimos 127 nucleótidos de la secuencia de GFP b) El corte en las secuencias de Claudina-6 y -9 se realiza en el nucleótido 233 para ambos casos. Los sitios de corte para las claudinas se consultaron en NEB cutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>).



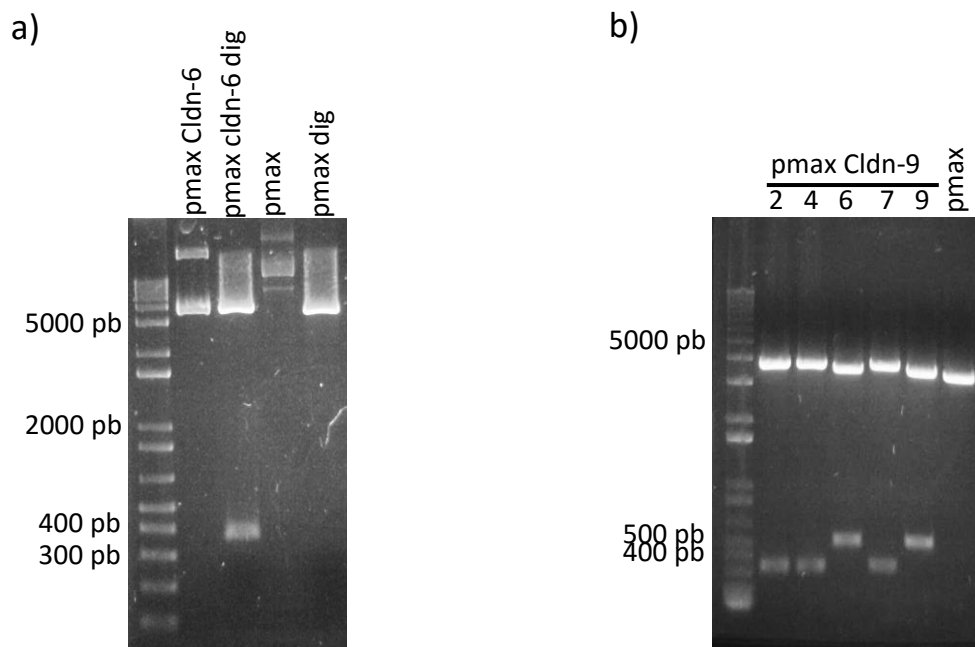


Figura 10. Verificación del sentido del inserto por ensayos de restricción. La digestión por la enzima *Pst*I de los vectores recombinantes libera dos fragmentos de los cuales, uno de ellos debe tener un peso de 360pb para los vectores de Claudina-6 y -9 a) La única colonia de Claudina-6 presenta el fragmento esperado, por lo que el inserto se encuentra en sentido correcto b) de las 10 colonias de Claudina-9 a las que se corroboró la presencia del inserto, se seleccionaron 5 al azar para corroborar el sentido. 3 de ellos presentaron el fragmento esperado (colonias 2,4 y 7).

Se mandaron a secuenciar los vectores recombinantes para verificar el sentido y la integridad de la secuencia de las claudinas. Las colonias seleccionadas para la secuenciación fueron la colonia 1 para Claudina-6 y la colonia 2 para Claudina-9. Para corroborar la integridad de las secuencias de las claudinas, se realizó un alineamiento en la plataforma BLAST de NCBI, en la que fue posible corroborar la presencia de una mutación (Figura 11). El inserto de Claudina-6 presentó un cambio de nucleótido en el codón 33, cambiando de ACC a ACT; sin embargo, corresponde a una mutación sinónima en la que el cambio codifica de igual manera treonina. Este cambio corresponde, además, a un polimorfismo reportado en la base de datos de SNPs de NCBI, por lo que dicha mutación no cambiaría el funcionamiento de la claudina. Por su parte, el inserto de Claudina-9 no presentó mutación alguna.



a)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1142 bits(618)	0.0	620/621(99%)	0/621(0%)	Plus/Minus
Features: claudin-6 precursor				
Query 1	TGCTGGGCTGGGTGAATGGCCTGGTCTCCTGTGCCCTGCCCATGTGGAAGGTGACTGCTT			60
Sbjct 3065853	TGCTGGGCTGGGTGAATGGCCTGGTCTCCTGTGCCCTGCCCATGTGGAAGGTGACTGCTT			3065794
Query 61	TCATCGGCAACAGCATCGTGGTGGCCAGGTGGTGTGGGAGGGCCTGTGGATGTCTCGG			120
Sbjct 3065793	TCATCGGCAACAGCATCGTGGTGGCCAGGTGGTGTGGGAGGGCCTGTGGATGTCTCGG			3065734
Query 121	TGGTGCAGAGCACCGGCCAGATGCAGTGAAGGTGTACGACTCACTGCTGGCGCTGCCAC			180
Sbjct 3065733	TGGTGCAGAGCACCGGCCAGATGCAGTGAAGGTGTACGACTCACTGCTGGCGCTGCCAC			3065674
Query 181	AGGACCTGCAGGCTGCAGTGCCTCTGTGTATCGCCCTCCTTGTGGCCCTGTTCGGCT			240
Sbjct 3065673	AGGACCTGCAGGCTGCAGTGCCTCTGTGTATCGCCCTCCTTGTGGCCCTGTTCGGCT			3065614
Query 241	TGCTGGTCTACCTTGCTGGGGCCAAGTGTACCACCTGTCTGGAGGAGAAGGATTCGAAGG			300
Sbjct 3065613	TGCTGGTCTACCTTGCTGGGGCCAAGTGTACCACCTGTCTGGAGGAGAAGGATTCGAAGG			3065554
Query 301	CCCGCCTGGTGCACCTCTGGGATTTGCTTTGTATCTCAGGGGTCTGACGCTAATCC			360
Sbjct 3065553	CCCGCCTGGTGCACCTCTGGGATTTGCTTTGTATCTCAGGGGTCTGACGCTAATCC			3065494
Query 361	CCGTGTGCTGGACGGCGCATGCCATCATCCGGACTTCTATAACCCCTGGTGGCTGAGG			420
Sbjct 3065493	CCGTGTGCTGGACGGCGCATGCCATCATCCGGACTTCTATAACCCCTGGTGGCTGAGG			3065434
Query 421	CCCAAAGCGGGAGCTGGGGCCCTCCCTCTACTGGGCTGGGGCGGCTCAGGCCTTTTGT			480
Sbjct 3065433	CCCAAAGCGGGAGCTGGGGCCCTCCCTCTACTGGGCTGGGGCGGCTCAGGCCTTTTGT			3065374
Query 481	TGCTGGGTGGGGGTTGCTGTGCTGCACCTGCCCCCTCgggggggTCCAGGGCCCCAGCC			540
Sbjct 3065373	TGCTGGGTGGGGGTTGCTGTGCTGCACCTGCCCCCTCGGGGGGTTCCAGGGCCCCAGCC			3065314
Query 541	ATTACATGGCCCGTACTCAACATCTGCCCTGCCATCTCTCGGGGGCCCTCGAGTACC			600
Sbjct 3065313	ATTACATGGCCCGTACTCAACATCTGCCCTGCCATCTCTCGGGGGCCCTCGAGTACC			3065254
Query 601	CTACCAAGAATTACGTCTGAC 621			
Sbjct 3065253	CTACCAAGAATTACGTCTGAC 3065233			

b)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1140 bits(617)	0.0	617/617(100%)	0/617(0%)	Plus/Plus
Features: claudin-9				
Query 3	TGGCTGTGCTGGGCTGGCTGGGGACCCCTGGTGTCTTGCGCCCTGCCCTGTGGAAGGTGA			62
Sbjct 3063275	TGGCTGTGCTGGGCTGGCTGGGGACCCCTGGTGTCTTGCGCCCTGCCCTGTGGAAGGTGA			3063334
Query 63	CCGCCCTTTCATCGGCAACAGCATCGTGGTGGCCAGGTGGTGTGGGAGGGCCTGTGGATGT			122
Sbjct 3063335	CCGCCCTTTCATCGGCAACAGCATCGTGGTGGCCAGGTGGTGTGGGAGGGCCTGTGGATGT			3063394
Query 123	CCTGCGTGGTGCAGAGCACGGGCCAGATGCAGTGAAGGTGTACGACTCACTGCTGGCTC			182
Sbjct 3063395	CCTGCGTGGTGCAGAGCACGGGCCAGATGCAGTGAAGGTGTACGACTCACTGCTGGCTC			3063454
Query 183	TGCCGAGGACCTGCAGGCCGACGTCGCCCTCTGTGTATTGCCCTCCTGCTGGCCCTGC			242
Sbjct 3063455	TGCCGAGGACCTGCAGGCCGACGTCGCCCTCTGTGTATTGCCCTCCTGCTGGCCCTGC			3063514
Query 243	TTGGCCTCCTGGTGGCCATCACAGGTGCCAGTGTACCAGTGTGTGGAGGACGAAGGTG			302
Sbjct 3063515	TTGGCCTCCTGGTGGCCATCACAGGTGCCAGTGTACCAGTGTGTGGAGGACGAAGGTG			3063574
Query 303	CCAAGGCCGATCGTGTCTACCGCGGGGGTTCATCCTCCTCCTCGCCGGCATCCTGGTGC			362
Sbjct 3063575	CCAAGGCCGATCGTGTCTACCGCGGGGGTTCATCCTCCTCCTCGCCGGCATCCTGGTGC			3063634
Query 363	TCATCCCTGTGTGCTGGACGGCGACGCCATCATCCAGGACTTCTACAACCCCTGGTGG			422
Sbjct 3063635	TCATCCCTGTGTGCTGGACGGCGACGCCATCATCCAGGACTTCTACAACCCCTGGTGG			3063694
Query 423	CTGAGGCCCTCAAGCGGGAGCTGGGGCCCTCCCTCTACCTGGGCTGGGCGGCGGCTGCAC			482
Sbjct 3063695	CTGAGGCCCTCAAGCGGGAGCTGGGGCCCTCCCTCTACCTGGGCTGGGCGGCGGCTGCAC			3063754
Query 483	TGCTTATGCTGGGCGGGGGCTCCTCTGCTGCACGTGCCCCCGCCCAAGTTCGAGCGGC			542
Sbjct 3063755	TGCTTATGCTGGGCGGGGGCTCCTCTGCTGCACGTGCCCCCGCCCAAGTTCGAGCGGC			3063814
Query 543	CCCGCGGACCTCGGCTGGGCTACTCCATCCCTCCCGCTCGGGTGCATCTGGACTGGACA			602
Sbjct 3063815	CCCGCGGACCTCGGCTGGGCTACTCCATCCCTCCCGCTCGGGTGCATCTGGACTGGACA			3063874
Query 603	AGAGGGACTACGTGTGA 619			
Sbjct 3063875	AGAGGGACTACGTGTGA 3063891			

Figura 11. Alineamiento de los datos de secuenciación. Una vez obtenida la secuenciación de la colonia 1 y 2 (claudina-6 y -9, respectivamente), se realizó un blast con la ayuda de la plataforma en línea (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se muestra el alineamiento con los primers Forward. a) Para la secuencia de Claudina-6 se encontró una mutación sinónima en el codón 33, en la tercera posición (cuadro rojo). b) Para la secuencia de Claudina-9 se encontró una similitud del 100%.



Para verificar el sentido de los insertos con los datos de secuenciación, se analizó la información obtenida con los primers *Reverse*, buscando el codón de inicio de las claudinas y verificando río arriba los últimos nucleótidos de la secuencia de GFP. Para los dos vectores recombinantes se identificó la secuencia de GFP y el codón de inicio (Figura 12), corroborándose así la inserción en sentido correcto de la secuencia de ambas claudinas.

8.3 Transfección de células AGS con el vector pmaxGFP y los vectores recombinantes

Una vez corroborada la secuencia y la validación del sentido de los insertos, se prepararon los plásmidos para la transfección. Para que la transfección fuese estable, se digirieron los vectores con la enzima AflII que realiza un corte en un sitio no esencial para el funcionamiento del vector (Figura 13). Se corroboró por una electroforesis la completa digestión de los vectores (figura 14 a). En el gel pueden distinguirse las diferentes conformaciones del plásmido no digerido: la forma super enrollada, que es la topología más compacta, sólo puede formarse cuando las dos hebras de DNA están intactas y es la forma que migra más rápido en el gel. Si una de las hebras se rompe, el plásmido tomará otra conformación conocida como círculo abierto y migra más lento. Cuando las dos hebras se rompen en la misma posición, el plásmido adquiere una conformación lineal; ésta forma migra más lento que la conformación super enrollada pero más rápido que la conformación en círculo abierto⁹⁶. En los vectores pmaxGFP y pmaxGFP Cldn9 se distinguen las tres conformaciones descritas, mientras que en el vector pmaxGFP Cldn6 se distinguen cuatro. Las topologías adicionales observadas en el gel pueden corresponder a diferentes tipos de DNA super enrollado⁹⁷ u oligómeros del plásmido⁹⁸ como resultado de la adición de dicha secuencia.

Una vez corroborada la completa digestión de los vectores, se transfectó la línea celular AGS por la formación de liposomas. Después de haber transcurrido 10 días de la transfección, no todas las células que sobrevivieron en el medio condicionado (con geneticina) expresaban la proteína GFP. En particular, en la línea AGS-CLDN9 se obtuvo la menor frecuencia de células positivas a GFP (Figura 14b).



a) **Claudina-6**

NTACGGAGGGAANNNGGNGGGCGTGCTTGCNACGTGGAGGCTTCAAGCTACCCGNTACGA
 GGCCGACCCCGGGGATCGGGCGACTTCAAGGNTGGTGGGCACCCGGCTTCCCGAGGA
 CAGCGTGGATCTTACCCGACAAGATCATCCCGCAGCAACGCCACCGTGGAGGCACCTGCAC
 CCCATGGGCGATAACGTGCTGGTGGGCGAGCTTCGCCCGCACCTTCAAGAGCGCCATCCACCCAGCATCCT
 TACTACAGCTTCGTGGTGGACAGCCACATGCACTTCAAGAGCGCCATCCACCCAGCATCCT
 GCAGAACGGGGCCCCATGTTGCGCTTCCGCCGCGTGGAGGAGCTGCACAGCAACACCGAG
 CTGGGCATCGTGGAGTACCAGCACGCCTTCAAGACCCCATCGCCTTCGCCAGATCTCGAGC
 TCGAATGCGCTCTGCCGGAATGCAGATCCTGGGAGTGCCTGACACTGCTGGGCTGGGTG
 AATGGCCTGGTCTCCTGTGCCCTGCCCATGTGGAAGGTGACTGCTTTCATCGGCAACAGCA
 TCGTGGTGGCCAGGTGGTGTGGGAGGGCCTGTGGATGTCCTGCGTGGTGCAGAGCACCGG
 CCAGATGCAGTGAAGGTGTACGACTCACTGCTGGCGCTGCCACAGGACCTGCAGGCTGCA
 CGTGCCCTCTGTGTCATCGCCCTCCTTGTGGCCCTGTTGCGCTTGTGGTCTACCTTGTGG
 GGCAAGTGTACCACCTGTGTGGAGGAGAAGGATTCCAAGGCCCGCCTGGTGTACCTCT
 GGGATTGTCTTTGTCATCTCAGGGGTCTGACGCTAATCCCCGTGTGCTGGACGGCGCATG
 CCATCATCCGGGACTTCTATAACCCCTGGTGGCTGAGGCCAAAAGCGGGAGCTGGGGGC
 CTCCCTCTACTTGGGCTGGGCGGCCTCAGGCCTTTTGTGCTGGGTGGGGGGTGTGTGCT
 GCACTTGGCCCTCGGGGGGTCCAGGGCCCCAGCCATTACATGGCCCGCTACTCAACATCT
 GCCTGCCNTNNNGNNTNNNNNN

Claudina-9

CGGTGAGCCTTCAAGGNTAACCCGGNTACAGAAGGCCCGGGCNGGCGTTGAATCGGCGGA
 CTTTCAAAGGTTGGTGGGGCACCCGGCTTCCNCGAGGGACAGGCGTGATCCTTCAACCG
 AACAAAGAATCATCCAGCAGCAACGCCAACCGTGGGAGCACCTGCACCCCATGGGGCGAN
 AAACGTGCTGGTGGGCGAGCTTTCGCCCGCACCTCAGCCTTGCAGGACGGGGGGGCTACTAC
 AGCTTCGTGGTGGACAGCCACATGCACTTCAAGAGCGCCATCCACCCAGCATCCTGCAGAA
 CGGGGGCCCCATGTTGCGCTTCCGCCGCGTGGAGGGAGCTGCACAGCAACACCGAGCTGGGC
 ATCGTGGAGTACCAGCACGCCTTCAAGACCCCATCGCCTTCGCCAGATCTCGAGCTCGAAT
 GGCTTCGACCCGGCTTAGAACTGCTGGGCATGACCCTGGCTGTGCTGGGCTGGTGGGACC
 CTGGTGTCTGCGCCCTGCCCTGTGGAAGGTGACCGCCTTTCATCGGCAACAGCATCGTGGT
 GGCCAGGTGGTGTGGGAGGGCCTGTGGATGTCCTGCGTGGTGCAGAGCACGGGCCAGATG
 CAGTGCAAGGTGTACGACTCACTGCTGGCTTCCCGCAGGACCTGCAGGCCGACGTCGCCCT
 CTGTGTCATTGCCCTCCTGCTGGCCCTGGCTTGGCCTCCTGGTGGCCATCACAGGTGCCAGT
 GTACCACGTGTGTGGAGGACGAAGGTGCCAAGGCCCGTATCGTGCTCACCGCGGGGGTCA
 CCTCCTCCTCGCCGGCATCCTGGTGCTCATCCCTGTGTGCTGGACGGCGCACGCCATCATCC
 AGGACTTCTACAACCCCTGGTGGCTGAGGCCCTCAAGCGGGAGCTGGGGGGCTCCCTCTAC
 CTCGGCTGGGCGGGCGGCTGCACTGCTTATGCTGGGCGGGGGCTCCTCTGATGCACGTGCC
 CCCGCCCCAGGTCGAGCGGCCCGCGGACCTCGGCTTGGGCTANTNNTCNCNTCNCNTNN
 NNNNNNN

b)

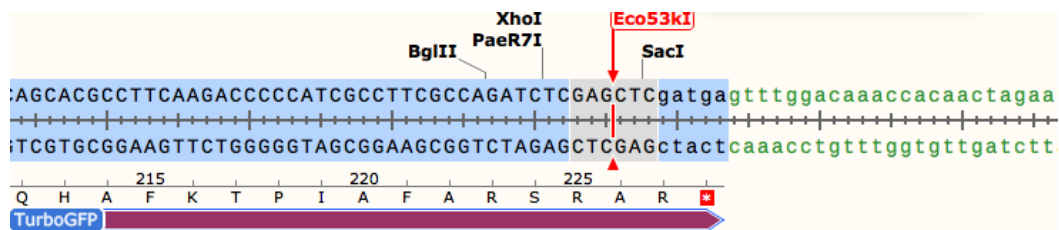


Figura 12. Verificación del sentido de los insertos por secuenciación. a) Con los datos de secuenciación con los primers Reverse se identificó el codón de inicio de las claudinas (color rojo y subrayadas en amarillo) y se corroboró que se insertaron en sentido correcto al identificar río arriba los últimos nucleótidos de la secuencia de GFP (datos subrayados en negro, inciso a e inciso b)



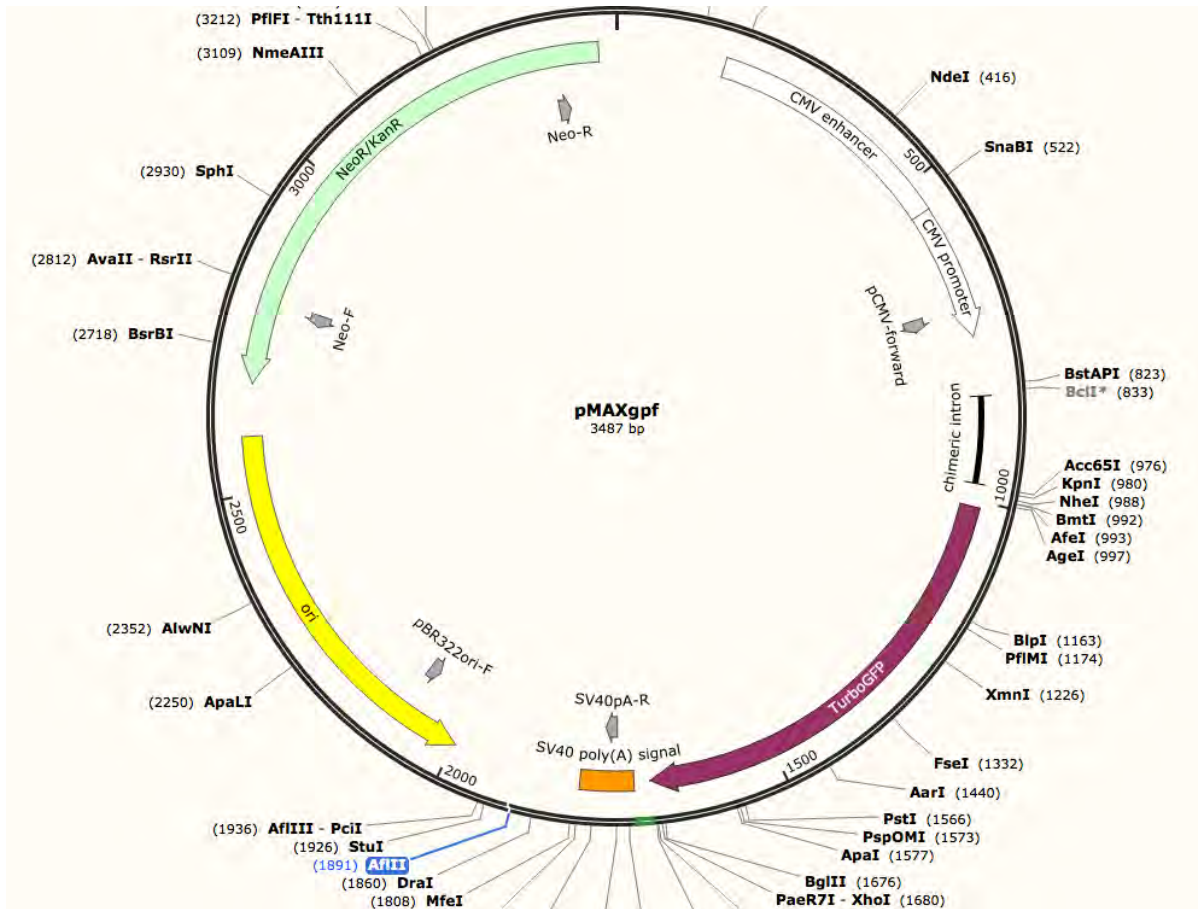


Figura 13. Sitio de corte de la enzima AflIII. El corte catalizado por AflIII (marca azul) no interfiere con las secuencias reguladoras como el promotor y el enhancer, ni la secuencia de GFP.

8.4 Enriquecimiento de la población GFP+ de los cultivos transfectados

Para el enriquecer la expresión de GFP en los cultivos, se realizaron *sorting* seriadados en las tres líneas. Fueron necesarios 3 *sorting* para el cultivo con el vector vacío y para el cultivo transfectado con el vector pmaxGFP Cldn6 (Figura 15). Cabe destacar que mientras la expresión de GFP en el cultivo transfectado con el vector pmaxGFP se mantuvo estable, las células transfectadas con el vector recombinante pmaxGFP Cldn6 se mantuvieron estables únicamente por un mes en cultivo continuo (7 pasajes), después del cual se observó una población negativa que gradualmente crecía en proporción. Por otro lado, con 3 *sorting* fue imposible establecer una línea positiva en su totalidad a GFP en los cultivos con el vector pmaxGFP Cldn9 (Figura 15),



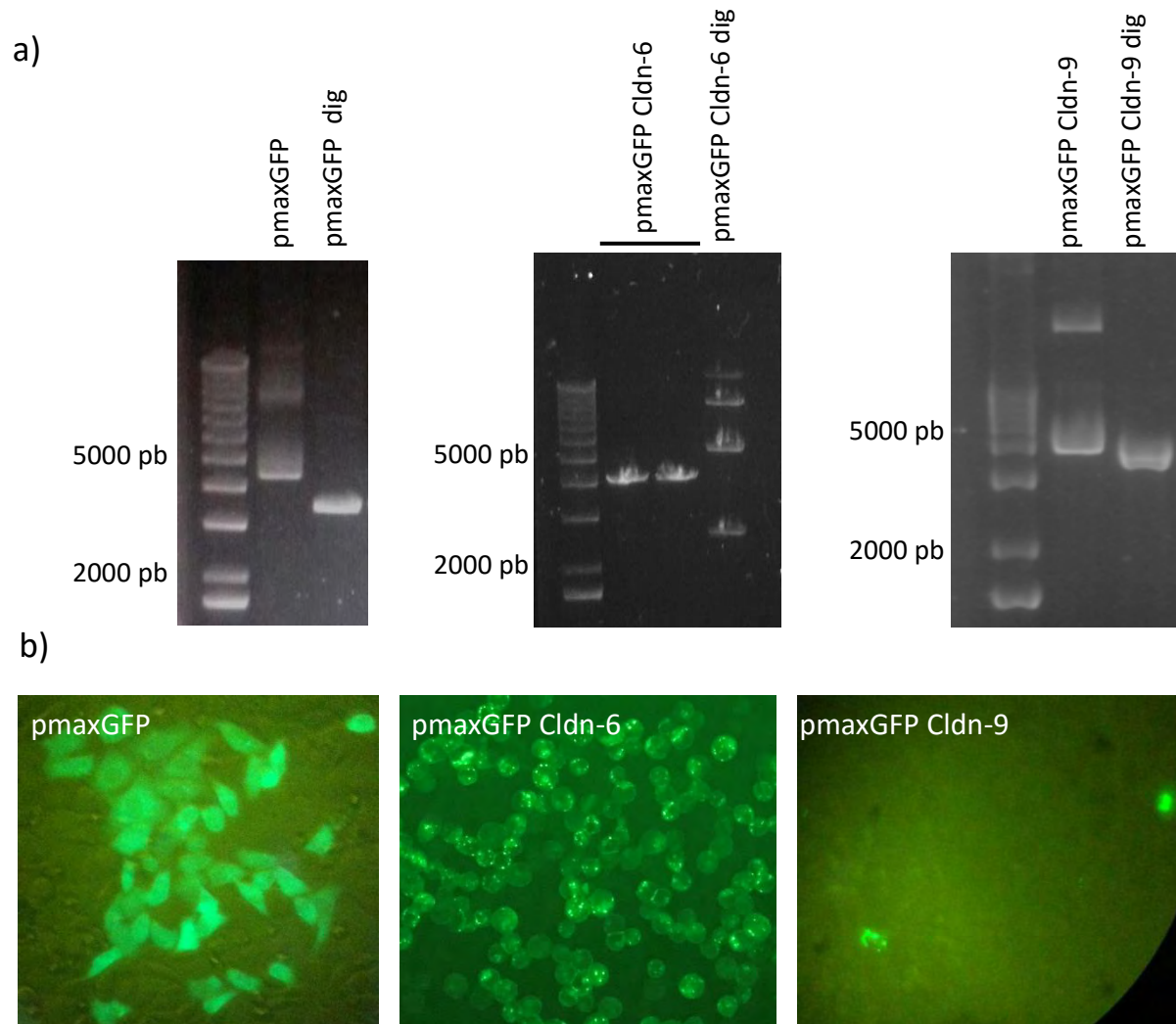


Figura 14. Transfección estable de la línea celular AGS. a) La transfección se realizó con los vectores *pmaxGFP*, *pmax Cldn-6* y *pmax Cldn-9* digeridos para permitir su incorporación al genoma de las células. b) Cultivo de células después de la transfección. *pmaxGFP* y *pmaxGFP Cldn-9* son células en cultivo. *pmaxGFP Cldn-6* son células fijadas y procesadas por cytopsin.

además, al igual que en los cultivos de Cldn6, la población negativa a GFP crecía a mayor velocidad, dominando en proporción el cultivo. En las líneas transfectadas con las secuencias de las claudinas, la síntesis de una proteína fusionada GFP-Claudina confiere una desventaja respecto a las células con el vector que no sintetizaban la proteína fluorescente, en especial con la línea transfectada con Claudina-9, en la cual la población negativa a GFP prevalecía a pesar del enriquecimiento por *sorting*. Por ello, se procedió a realizar un *sorting* en placa, en el cual se



obtuvieron cultivos a partir de una sola célula, tanto para los cultivos transfectados con Cldn-6 como con Cldn-9.

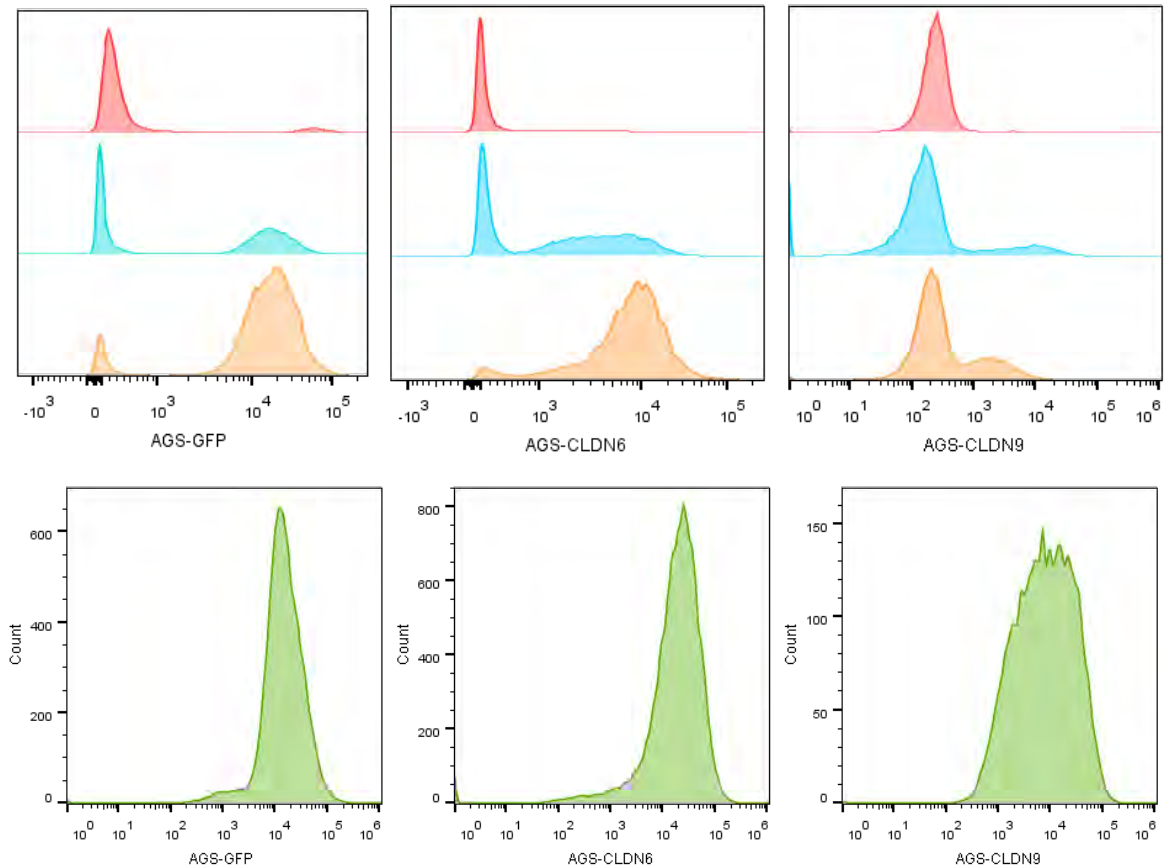


Figura 15. Sorting de los cultivos AGS-GFP, AGS-CLDN6 y AGS-CLDN-9. Expresión de GFP después de la transfección (rojo). El enriquecimiento de la expresión de GFP se obtuvo por sorting seriadados: 1 (azul) y 2 (naranja). En el caso de la línea AGS-GFP sólo fue requerido un tercer sorting, mientras que para las líneas AGS-CLDN6 y AGS-CLDN9 el cultivo se estableció a partir de una clona (verde).

Las células transfectadas con el vector vacío y el vector recombinante presentaban diferentes patrones de expresión de GFP: Mientras que la distribución de GFP en la línea AGS-GFP es ubicua, en las líneas AGS-CLDN6 Y AGS-CLDN9 es puntual (Figura 14b y 16), preferentemente en la membrana y con menor frecuencia en el citoplasma (Figura 16). A pesar de ser las claudinas proteínas integrales de membrana, se ha observado su expresión deslocalizada tanto en condiciones normales como en tejido neoplásico. Aunque no se conoce el rol de las claudinas



citoplásmicas, puede estar asociado a tráfico vesicular o interacciones con la matriz extracelular
13.

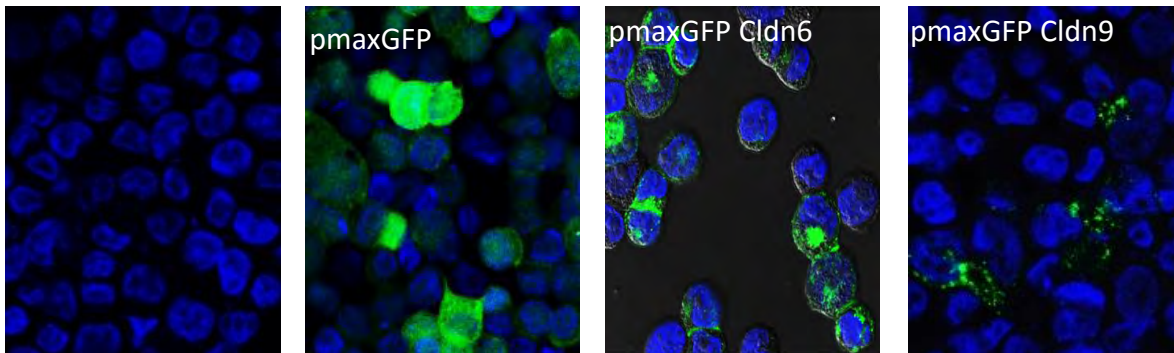


Figura 16. Patrón de expresión de GFP en células transfectadas. Se observa una expresión de GFP focalizada con los vectores recombinantes, mientras que en las células transfectadas con el vector vacío se distingue una expresión en todo el citoplasma. La expresión de las claudinas fusionadas a GFP se localiza principalmente en membrana, con una menor distribución en citoplasma.

8.5 Expresión de Cldn-6 y -9 en las líneas transfectadas

Una vez establecidos los cultivos, se corroboró el incremento en la expresión de las claudinas respecto a la línea *wild type* y transfectada con el vector vacío. La expresión de Cldn-6 y -9 se incrementó, como era esperado, en las líneas AGS-CLDN6 y AGS-CLDN9, respectivamente (Figura 17). Sin embargo, a pesar de no representar cambios significativos, la transfección logró incrementar la expresión de Cldn-6 un 70% la IMF respecto a la línea *wild type* y el doble respecto al control de transfección (GFP), es decir, se incrementó la población positiva de Cldn-6 de un 42% y 31%, respectivamente a cerca de un 80% de la población; por su parte, la expresión de Cldn-9 se incrementó 2.4 y 2.1 veces la IMF respecto a la línea *wild type* y con el vector vacío, respectivamente, representando un incremento de 6.6% y 10.4% a cerca de un 80% de la población. Cabe destacar que la expresión de Cldn-9 es más homogénea entre la población respecto a la expresión de Cldn-6 y que en la línea *wild type* la expresión de Cldn-6 es mucho mayor a la de Cldn-9 (Figura 17a).

Se detectó además el incremento conjunto de Claudina-6 y -9 en las dos líneas generadas con los vectores recombinantes, lo cual podría deberse a su arreglo exón-intrón y su localización



cercana que, se sabe, puede llevar a una regulación coordinada, como en casos reportados para Cldn-3 y Cldn-4¹³. Sin embargo, es importante considerar que los anticuerpos dirigidos contra estas claudinas son policlonales y debido a la alta similitud que hay entre ellas, se podrían estar reconociendo epítomos en común de ambas isoformas de claudina, pudiendo llevar a falsos positivos en el incremento coordinado de éstas (Figura 17b).

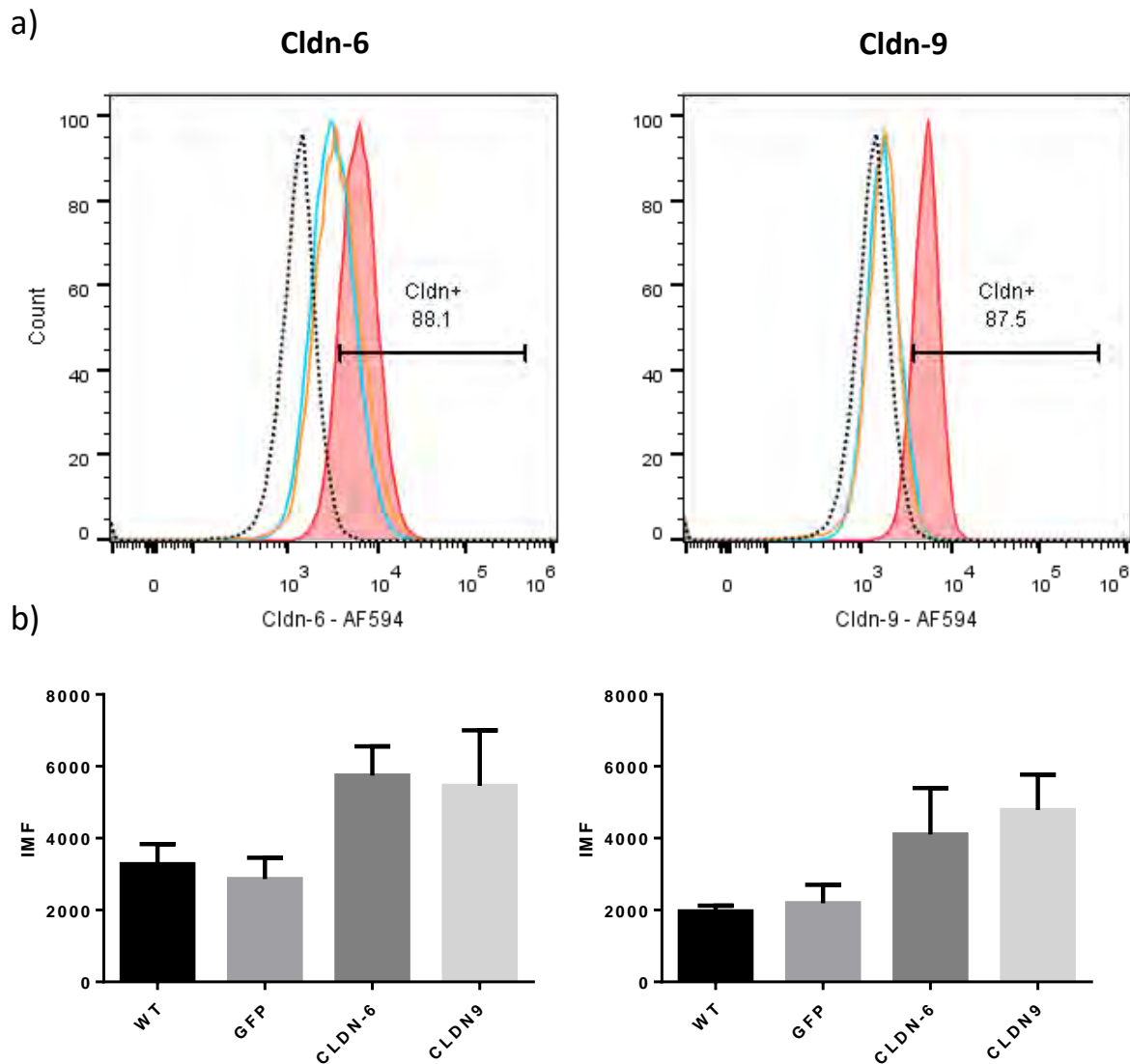


Figura 17. Sobre expresión de Claudina-6 y -9 en las líneas AGS-CLDN6 y AGS-CLDN9. a) La expresión de Cldn-6 (izquierda) y de Cldn-9 (derecha) incrementó respecto a la línea wild type (naranja) y con el vector vacío (azul) obteniendo cerca del 80% de la población positiva a dichas claudinas. Las líneas punteadas representan al control de pegado inespecífico. b) El incremento en la expresión de ambas claudinas ocurrió de manera simultánea en las líneas AGS CLDN6 y AGS CLDN9, siendo mayor la expresión de Cldn-6 y de Cldn-9 en la línea transfectada con el vector que contiene su respectiva secuencia.



8.6 La sobre expresión de Cldn-9 induce una disminución en la expresión de CD24 y el incremento de CD44

La expresión de CD24, en las diferentes líneas analizadas, distingue dos distribuciones poblacionales: CD24⁻ y CD24⁺ siendo ésta última cerca del 4% de la población en la línea *wild type* (Figura 18), que disminuye con la sobre expresión de Cldn-6 y más aún con Cldn-9 (Figura 19). Cabe señalar que la población CD24⁺ corresponde a células poco granulares y de menor tamaño dentro de la población (Figura 19).

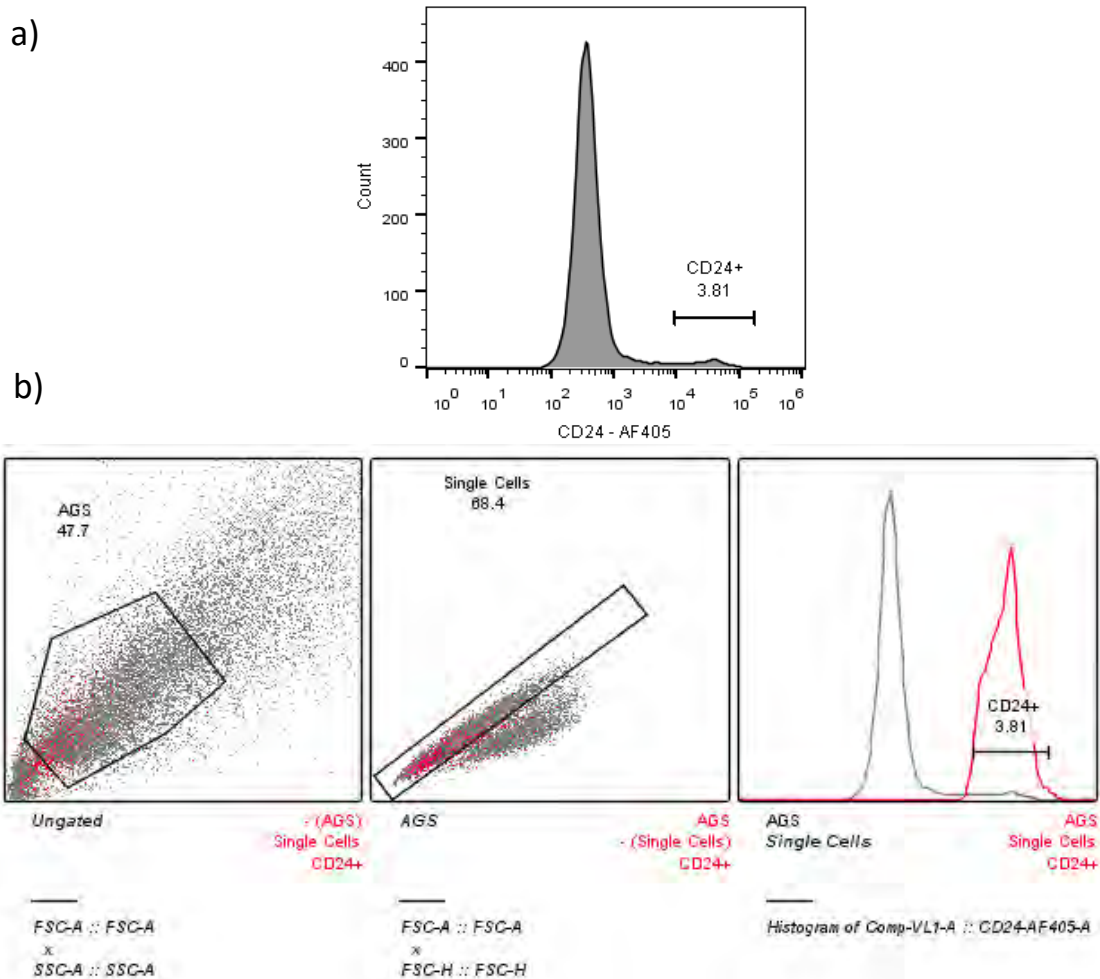


Figura 18. Células AGS presentan una pequeña subpoblación CD24⁺. a) Las células con una expresión positiva a CD24 constituyen cerca del 4% de la población. b) Regiones seleccionadas de las que proviene la población CD24⁺. Dot plot izquierda: la población CD24⁺ corresponde a células con un fenotipo poco granular y de pequeño tamaño (puntos rojos), se muestra el tamaño (eje x) y granularidad (eje y); en medio, selección de células individuales por tamaño-área (eje x) y tamaño-altura (eje y); izquierda: el histograma muestra en rojo una ampliación de la pequeña población positiva a CD24⁺.



Por su parte, CD44 incrementa significativamente con la sobre expresión de Cldn-9 respecto al control de transfección, AGS-GFP, no así con el incremento de Cldn-6. Sin embargo, la sobre expresión de Cldn-6 sigue la misma tendencia. DCLK1 y Villin incrementan ligeramente su expresión con la sobre expresión de Cldn-9 y Cldn-6, respectivamente, sin embargo, no representan cambios significativos (Figura 19).

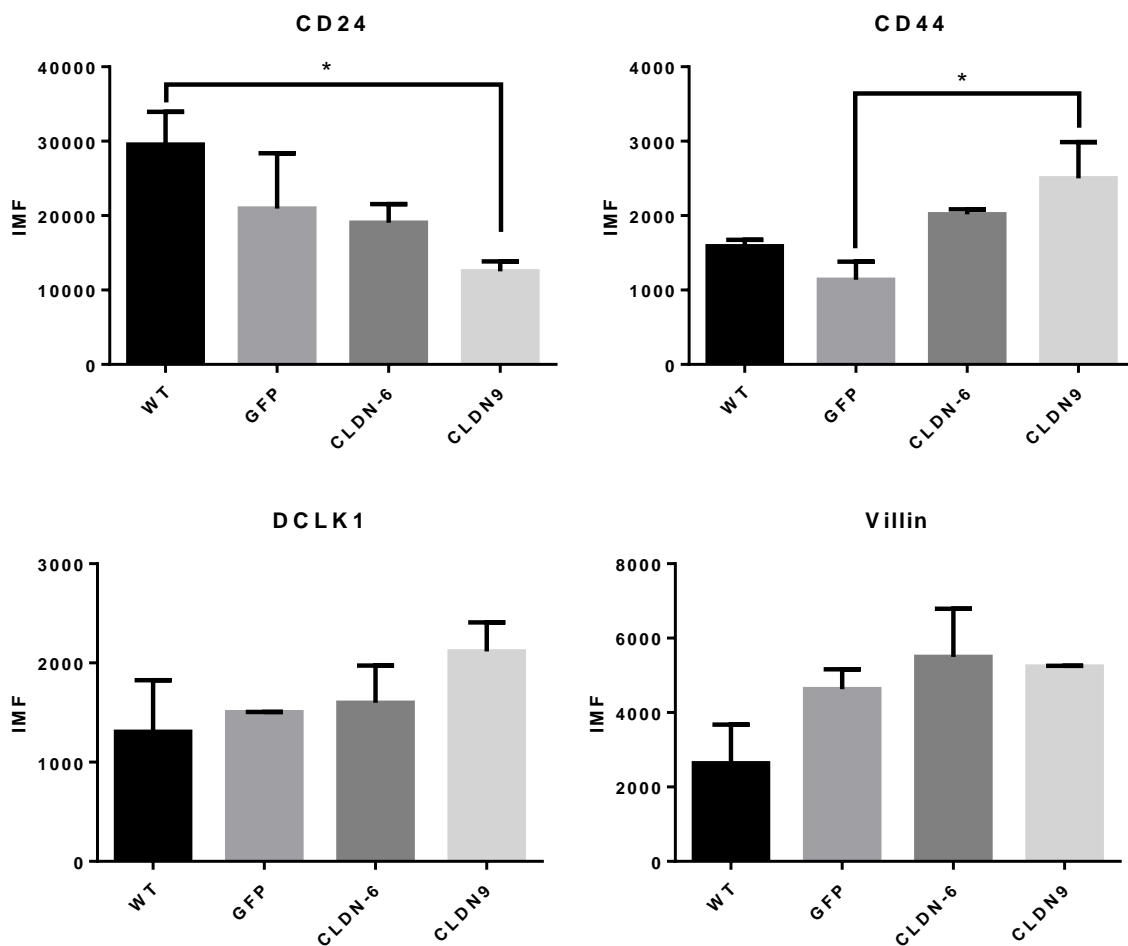


Figura 19. Cambio en la expresión de los marcadores de CTC por la sobre expresión de Cldn-6 y -9. La sobre expresión de Cldn -9 incrementa de manera significativa la expresión de CD44 y disminuye la expresión de CD24. No se observaron cambios significativos en la expresión de DCLK1 y Villin. * valor de $p < 0.5$.



9. DISCUSIÓN

Inicialmente, la línea celular AGS se había transfectado con el vector pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO, el cual se utilizó para clonar las secuencias de Cldn-6 o Cldn-9, sin embargo, la expresión de estas claudinas fusionadas a GFP se perdía, aún en medios de selección con geneticina. En el vector pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO el promotor SV40 regula la expresión del gen de resistencia a geneticina, mientras que el promotor CMV regula la expresión de las proteínas fusionadas. *Ho y colaboradores*⁹⁹, reportan una mayor estabilidad de expresión con el promotor SV40 respecto a CMV en células CHO transfectadas; se ha reportado, además, que los niveles de expresión regulados por el promotor CMV decrecen con el tiempo en los cultivos, debido a su silenciamiento asociado a metilación¹⁰⁰; por lo que la pérdida de expresión de claudinas fusionadas a GFP en dicho vector, pudo deberse al silenciamiento del promotor CMV. No obstante, el silenciamiento de transgenes, en células de mamífero en cultivo, se ha visto suprimido al incluir un enhancer transcripcional¹⁰¹. El vector utilizado en este proyecto (pmaxGFP) en el cual se clonó nuevamente la secuencia de claudina -6 y -9, contiene un enhancer río arriba al promotor CMV, el cual puede mejorar la expresión del transgen respecto al vector pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO.

Adicionalmente, a diferencia del vector pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO que contiene la secuencia de GFP de *Aequorea victoria*, el vector pmaxGFP contiene la secuencia del GFP de un copépodo (*Pontellina plumata*), cuya proteína posee una cinética rápida de plegamiento, la cual puede deberse a la ausencia de cis-prolinas, que se sabe, retardan el plegamiento de GFP de *A. victoria*; además, presenta una tasa de maduración más rápida, ya que su residuo E89 ayuda a la sustracción de protones en un proceso esencial de deshidrogenación durante la maduración del cromóforo. Otra característica única de esta proteína es un poro lleno de agua, el cual podría facilitar el transporte de oxígeno al cromóforo prematuro y acelerar su maduración¹⁰². Estas características de plegamiento y maduración rápida, contribuyen a una señal de fluorescencia temprana y una mayor eficiencia en la detección del cromóforo. Otra ventaja que presenta el vector pmaxGFP respecto a pCDNA 3.1 es el tamaño (3.486 kb y 6.176 kb, respectivamente). Se ha reportado que el tamaño del vector juega un papel importante en la eficiencia de la



transfección. En un estudio *in vitro*, se transfectaron líneas celulares con minicírculos, los cuales son plásmidos a los que se les han retirado las secuencias que corresponden al origen de replicación y de resistencia a antibiótico que reconoce la maquinaria procarionte, observando una mayor eficiencia de expresión de su gen reportero. Esto puede deberse a que los complejos formados con los lípidos catiónicos son más pequeños, mejorando así su coeficiente de difusión y su paso por la vía endocítica de la célula; además, se ha visto que la tasa de transporte de proteínas del citoplasma al núcleo es influenciada por el tamaño de la proteína, de la misma manera, el tamaño de las moléculas de DNA puede determinar su transporte al núcleo ¹⁰³. Otros estudios han confirmado la importancia del tamaño del vector en la eficiencia de la transfección ^{104,105}. De esta manera, las ventajas que ofreció este vector fueron superiores con respecto al vector pcDNA 3.1, lo que permitió una mayor estabilidad en la expresión de las proteínas de interés, Cldn-6 y -9.

Al sobre expresar dichas claudinas se generaron algunas modificaciones en la expresión de los marcadores de CTC (CD24 y CD44). Además, cabe destacar que la población CD24⁺ es menos abundante que la población CD24⁻ y son más pequeñas en tamaño y menos granulares con base en los parámetros FSC y SSC. Se sabe que las células de mamífero incrementan en tamaño con su edad, y recientemente se ha sugerido, que el tamaño de las células juega un papel importante en la tasa de proliferación, al ser necesario alcanzar un tamaño mínimo crítico para dividirse. Esta idea se ha basado en diversas observaciones de diferentes modelos biológicos en los que se observó que las células más grandes tienden a dividirse más rápido y reducir su tiempo de vida; por el contrario, las células modificadas que tienen un tamaño pequeño, poseen una tasa menor de replicación y una vida media más larga. Cabe resaltar, en este contexto, a las células troncales adultas que son, por lo general, quiescentes y de menor tamaño que su progenie diferenciada ¹⁰⁶. En cuanto a las CTC, se han reportado conclusiones opuestas: mientras que en una línea celular de meduloblastoma y en células poliploides gigantes de cáncer, observaron que la población enriquecida en características de tipo troncal eran aquellas que tenían mayor tamaño; en un modelo de cáncer de próstata se observó que las células más pequeñas tendían a



ser más tumorigénicas, lo cual se vio manifestado en el número y tamaño de los tumores generados ¹⁰⁶. Aunque la población CD24⁺ encontrada en la línea AGS podría corresponder a una población quiescente, similar al de una célula troncal, son necesarios más estudios para corroborar dicha aseveración.

Aunque CD24 es mayormente conocido por su participación en la regulación de algunos procesos como apoptosis, diferenciación y migración en diversos tejidos, su función en el tracto gastro intestinal continúa siendo desconocido. A pesar de que en diversos estudios no se ha demostrado su expresión en el epitelio gástrico normal, se sabe que está sobre expresado en adenocarcinoma gástrico y CTC gástrico ¹⁰⁷. En la línea AGS se observó una pequeña población positiva a este marcador que resultó significativamente menor al sobre expresar Cldn-9 y se observó una expresión baja al sobre expresar Cldn-6. Aunque ya se ha visto una asociación entre la expresión de CD24 con Cldn-7 en cáncer de mama ¹⁰⁸, no se ha reportado una relación entre la expresión de CD24 y Cldn-6 o -9. Dado que CD24 se expresa en células troncales pluripotentes estándar e inducidas ^{109, 110} y tanto Cldn-6 como Cldn-9 se expresan preferentemente en etapas tempranas del desarrollo, resulta lógico esperar un incremento de CD24 con la sobre expresión de dichas claudinas, sin embargo, la población CD24⁺ se vio disminuida. Cabe resaltar que existe cierta heterogeneidad entre células troncales pluripotentes; por ejemplo, en diferentes líneas celulares pluripotentes se observaron diferentes niveles de expresión de moléculas asociadas a marcadores pluripotentes como la expresión de Nanog u Oct4; inclusive en células individuales de cultivos sometidos a las mismas condiciones se observó heterogeneidad en la expresión de ciertas moléculas, demarcando diferentes perfiles de expresión ¹¹¹; ésta variación está asociada a diferencias en la propensión de células individuales para autorrenovarse o guiar las señales hacia diferenciación ¹¹¹. Por otro lado, Cldn-6 exhibe altos niveles de expresión en células troncales siendo no sólo la única claudina específica para este estadio, sino además, sus niveles de expresión son mayores a marcadores previamente reportados para células troncales pluripotentes como TDGF-1, EPCAM ó CD24 ¹¹². Al ser reportados Cldn-6 y CD24 en células pluripotentes, la disminución de CD24 podría deberse a la proporción que representa la expresión de Cldn-6 frente a CD24 o bien, puede ser resultado de la heterogeneidad existente dentro de



una población de células troncales pluripotentes. Respecto a Cldn-9, no se conoce, durante la embriogénesis, la etapa específica en la que se detecta su expresión ni a qué nivel de diferenciación corresponde. Resulta incierto, entonces, si la alta expresión de Cldn-6 y -9 así como la baja expresión de CD24 corresponden a una misma población, por lo cual se requiere seguir investigando este tema.

Por otro lado, el incremento en la expresión de CD44 en células que sobre expresan Cldn-6 y -9 permite explicar el potencial invasivo y migratorio observado en estudios previos. Cabe señalar que el anticuerpo usado para medir CD44 va dirigido contra una región común a todas las isoformas por lo que el incremento observado fue de manera global para esta proteína. Se ha reportado que la expresión de CD44 es un marcador para diferenciar entre células parcial y completamente reprogramadas al observar su alta expresión en fibroblastos y su pérdida gradual durante el proceso de reprogramación hasta ser ausente en células troncales pluripotentes inducidas ya establecidas ¹¹³. En cáncer de cabeza y cuello, la expresión de CD44 correspondía a una población con características multipotentes ¹¹⁴, sin embargo, la isoforma CD44 v3 está asociada con el control de células troncales pluripotentes. De esta manera, la expresión de CD44 no es específica para algún estadio del desarrollo, sin embargo puede regular la activación de metaloproteasas y el reordenamiento de proteínas del citoesqueleto, procesos importantes en la diseminación tumoral, así como su participación durante la angiogénesis ¹¹⁵ y la adquisición de un fenotipo troncal por la translocación de su dominio intracelular al núcleo, el cual activa moléculas asociadas a troncalidad ¹¹⁶. Respecto a la expresión conjunta de CD24 y CD44 existe cierta controversia: en biopsias de pacientes con cáncer gástrico no cardial, sólo la expresión de CD44 estaba asociada a un pobre pronóstico ¹¹⁷ y en líneas celulares de cáncer gástrico, la expresión de CD24 no mostró correlación con tumorigenicidad *in vitro* o *in vivo* ⁷⁴. Sin embargo, otros estudios revelan el fenotipo CD24+CD44+ como la población que corresponde a las CTC gástrico ⁶⁸ o la asociación de CD24 con la progresión tumoral e invasividad en tejidos de cáncer gástrico ¹¹⁸. Por lo que resulta importante determinar el papel de las subpoblaciones resultantes por la combinación de estos marcadores.



Por otro lado, Villin y DCLK1 se expresan en células troncales del epitelio gástrico^{87,119} y su incremento no fue significativo en células que sobre expresan Cldn-6 ó -9, pero se observó cierta tendencia incrementa de dichas moléculas. La sobre expresión de las claudinas pudo llevar a un estado más indiferenciado, activando mecanismos que no involucran el cambio en la expresión de marcadores de células progenitoras multilinaje.

A pesar de la identificación de diversos marcadores moleculares de CTC, aún no se sabe si todos ellos representan a la misma población o qué combinación de éstos describe mejor a un fenotipo indiferenciado responsable de la agresividad, recurrencia y metástasis tumoral. Aunado a ello, la relación entre la embriogénesis y las CTC permanece elusivo, de modo que las CTC no han sido relacionadas a estadíos específicos del desarrollo embrionario.

10. CONCLUSIÓN

En este trabajo se observó un incremento en la expresión de CD44 y una disminución de CD24, enriqueciendo así sólo a la población CD44 positiva, lo que sugiere que la sobre expresión de dichas claudinas modifica, ya sea positiva o negativamente, la expresión de los marcadores de CTC. A pesar de la identificación de diversos marcadores moleculares de CTC, aún no se sabe si todos ellos representan a la misma población o qué combinación de éstos describe mejor a un fenotipo indiferenciado responsable de la agresividad, recurrencia y metástasis tumoral, por lo que son necesarios más estudios para confirmar el papel de Cldn-6 y -9 en la regulación de las CTC.



11. PERSPECTIVAS

- Silenciar la expresión de Cldn-6 y -9 para corroborar los efectos observados en este trabajo
- Dilucidar qué subpoblaciones resultan de la combinación de los marcadores Villin, DCLK1, CD24, CD44 y Cldn-6 y -9.
- Evaluar el potencial invasivo, migratorio y tumorigénico de las poblaciones resultantes, así como su habilidad para formar tumores en un modelo murino y esferoides en medios no adherentes.



ANEXO

Reactivos y soluciones:

Medio LB (Affymetrix):

Para 1L, disolver 20g. Esterilizar en autoclave.

Contiene: 10g/L peptona de caseína, 5g/L extracto de levadura y 10g/L cloruro de sodio

Medio LB agar (Affymetrix):

Para 1L, disolver 35g. Esterilizar en autoclave

Contiene: 10g/L peptona de caseína, 5g/L extracto de levadura, 5g/L cloruro de sodio y 15g/L agar.

TAE 50X:

Para 1L

Tris 242g, Ácido acético 57.1mL, Na₂EDTA 7.43g

Se disuelve con agua y se afora hasta 1L.

TAE 1X:

Para 500mL. Disolver 10mL de buffer TAE 50X en agua y aforar a 500mL

DMEM

Disolver 1 sobre de medio en 800mL de agua desionizada, adicionar 2g de NaHCO₃ y ajustar pH a 7.4. Aforar a 1L y esterilizar por filtración.

DMEM para criopreservación de células:

Solución de DMEM con DMSO al 5%. Por cada 10 mL de medio total, se utilizan 500 µL de DMSO y 9.5mL de medio



PBS 10X pH=7.5

Para 1L:

Disolver en 800mL de agua desionizada 79g de cloruro de sodio (NaCl), 15g de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) y 6g de fosfato de sodio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Ajustar pH a 7.2 y aforar.

Buffer de citometría:

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

Disolver en 500 μL de PBS 5 μL de Suero Fetal Bovino y 0.45g de azida de sodio

PBS + EDTA:

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



REFERENCIAS

1. Weinberg, R. A. Coming Full Circle—From Endless Complexity to Simplicity and Back Again. *Cell* **157**, 267–271 (2014).
2. Hui, H., Tang, Y., Hu, M. & Zhao, X. in *Stem Cells in Clinic and Research 3–4* (InTech, 2011). doi:10.5772/23755
3. Can, A. A Concise Review on the Classification and Nomenclature of Stem Cells. *Turkish J. Haematol. Off. J. Turkish Soc. Haematol.* **25**, 57–9 (2008).
4. Liu, J. The Dualistic Origin of Human Tumors. *Semin. Cancer Biol.* (2018). doi:10.1016/j.semcancer.2018.07.004
5. Aponte, P. M. & Caicedo, A. Stemness in Cancer: Stem Cells, Cancer Stem Cells, and Their Microenvironment. *Stem Cells Int.* **2017**, 1–17 (2017).
6. Bekaii-Saab, T. & El-Rayes, B. Identifying and targeting cancer stem cells in the treatment of gastric cancer. *Cancer* **123**, 1303–1312 (2017).
7. Brungs, D. *et al.* Gastric cancer stem cells: evidence, potential markers, and clinical implications. *J. Gastroenterol.* **51**, 313–326 (2016).
8. Chiba, H., Osanai, M., Murata, M., Kojima, T. & Sawada, N. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1778**, 588–600 (2008).
9. Shin, K., Fogg, V. C. & Margolis, B. Tight Junctions and Cell Polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 207–235 (2006).
10. Mitic, L. L. & Anderson, J. M. MOLECULAR ARCHITECTURE OF TIGHT JUNCTIONS. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 121–142 (1998).
11. Balda, M. S. & Matter, K. Tight junctions at a glance. *J. Cell Sci.* **121**, 3677–3682 (2008).
12. Krause, G. *et al.* Structure and function of claudins. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1778**, 631–645 (2008).
13. Lal-Nag, M. & Morin, P. J. The claudins. *Genome Biol.* **10**, 235 (2009).
14. Mineta, K. *et al.* Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett.* **585**, 606–612 (2011).
15. Van Itallie, C. M. & Anderson, J. M. CLAUDINS AND EPITHELIAL PARACELLULAR TRANSPORT. *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 403–429 (2006).
16. Furuse, M. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a002907 (2010).
17. Angelow, S., Ahlstrom, R. & Yu, A. S. L. Biology of claudins. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **295**, F867–76 (2008).
18. Schneeberger, E. E. & Lynch, R. D. The tight junction: a multifunctional complex. *AJP Cell Physiol.* **286**, C1213–C1228 (2004).
19. Singh, A. B., Sharma, A. & Dhawan, P. Claudin Family of Proteins and Cancer : An Overview. **2010**, (2010).
20. Günzel, D. & Yu, A. S. L. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol. Rev.* **93**, 525–69 (2013).
21. GLOBOCAN Cancer Fact Sheets: stomach Cancers. Available at: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/stomach-new.asp>. (Accessed: 13th May 2018)



22. Liu, X. & Meltzer, S. J. Gastric Cancer in the Era of Precision Medicine. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **3**, 348–358 (2017).
23. Hamilton, J. P. & Meltzer, S. J. A Review of the Genomics of Gastric Cancer. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 416–425 (2006).
24. Ajani, J. A. *et al.* Gastric adenocarcinoma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, 17036 (2017).
25. Osanai, M., Takasawa, A., Murata, M. & Sawada, N. Claudins in cancer: bench to bedside. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* **469**, 55–67 (2017).
26. Kim, T. H. *et al.* Down-regulation of claudin-2 in breast carcinomas is associated with advanced disease. *Histopathology* **53**, 48–55 (2008).
27. Tokés, A.-M. *et al.* Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res.* **7**, R296-305 (2005).
28. Sheehan, G. M. *et al.* Loss of claudins-1 and -7 and expression of claudins-3 and -4 correlate with prognostic variables in prostatic adenocarcinomas. *Hum. Pathol.* **38**, 564–569 (2007).
29. Usami, Y. *et al.* Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hum. Pathol.* **37**, 569–77 (2006).
30. Agarwal, R. *et al.* Silencing of claudin-11 is associated with increased invasiveness of gastric cancer cells. *PLoS One* **4**, e8002 (2009).
31. de Oliveira, S. S., de Oliveira, I. M., De Souza, W. & Morgado-Díaz, J. A. Claudins upregulation in human colorectal cancer. *FEBS Lett.* **579**, 6179–6185 (2005).
32. Leotlela, P. D. *et al.* Claudin-1 overexpression in melanoma is regulated by PKC and contributes to melanoma cell motility. *Oncogene* **26**, 3846–3856 (2007).
33. Singh, A. B., Uppada, S. B. & Dhawan, P. Claudin proteins, outside-in signaling, and carcinogenesis. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* **469**, 69–75 (2017).
34. Matsuda, Y. *et al.* Gastric and intestinal claudin expression at the invasive front of gastric carcinoma. *Cancer Sci.* **98**, 1014–1019 (2007).
35. Rendon-Huerta, E., Torres-Martínez, A. & Montañó, L. CLDN6 (claudin 6). *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* **6**, 396–399 (2013).
36. Abuazza, G. *et al.* Claudins 6, 9, and 13 are developmentally expressed renal tight junction proteins. doi:10.1152/ajprenal.00063.2006
37. Wang, L. *et al.* Claudin 6: a novel surface marker for characterizing mouse pluripotent stem cells. *Cell Res.* **22**, 1082–1085 (2012).
38. Rendon-Huerta, E., Torres-Martínez, A. & Montañó, L. CLDN9 (claudin 9). *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* **17**, 400–403 (2013).
39. Nakano, Y. *et al.* A claudin-9-based ion permeability barrier is essential for hearing. *PLoS Genet.* **5**, e1000610 (2009).
40. Tabariès, S. & Siegel, P. M. The role of claudins in cancer metastasis. *Oncogene* **36**, 1176–1190 (2017).
41. 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).
42. 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).



43. Torres-Martínez, A. C., Gallardo-Vera, J. F., Lara-Holguin, A. N., Montañó, L. F. & Rendón-Huerta, E. P. Claudin-6 enhances cell invasiveness through claudin-1 in AGS human adenocarcinoma gastric cancer cells. *Exp. Cell Res.* **350**, 226–235 (2017).
44. Spangrude, G., Heimfeld, S. & Weissman, I. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science (80-)*. **241**, 58–62 (1988).
45. Bhatia, M., Wang, J. C., Kapp, U., Bonnet, D. & Dick, J. E. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5320–5 (1997).
46. Manz, M. G., Miyamoto, T., Akashi, K. & Weissman, I. L. Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 11872–11877 (2002).
47. Dalerba, P., Cho, R. W. & Clarke, M. F. Cancer Stem Cells: Models and Concepts. *Annu. Rev. Med.* **58**, 267–284 (2007).
48. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3983–8 (2003).
49. Chen, K., Huang, Y. & Chen, J. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol. Sin.* **34**, 732–740 (2013).
50. López-Gómez, M. *et al.* Current evidence for cancer stem cells in gastrointestinal tumors and future research perspectives. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **107**, 54–71 (2016).
51. Chang, J. C. Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance. *Medicine (Baltimore)*. **95**, S20–S25 (2016).
52. Ciufa Kobayashi, C. & Ribeiro De Noronha, M. Cancer stem cells: a new approach to tumor development. *rev assoC Med bras* **61**, 86–93 (2015).
53. Wang, Z. *et al.* The molecular mechanism and regulatory pathways of cancer stem cells. *Cancer Transl. Med.* **2**, 147–153 (2016).
54. Shiozawa, Y., Nie, B., Pienta, K. J., Morgan, T. M. & Taichman, R. S. Cancer stem cells and their role in metastasis. *Pharmacol. Ther.* **138**, 285–93 (2013).
55. Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 178–196 (2014).
56. Thiery, J. P., Aclouque, H., Huang, R. Y. J. & Nieto, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871–90 (2009).
57. Yu, Z., Pestell, T. G., Lisanti, M. P. & Pestell, R. G. Cancer stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 2144–2151 (2012).
58. Abbaszadegan, M. R. *et al.* Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: A review. *J. Cell. Physiol.* **232**, 2008–2018 (2017).
59. Kristiansen, G., Sammar, M. & Altevogt, P. Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J. Mol. Histol.* **35**, 255–62 (2004).
60. Sagiv, E. & Arber, N. The novel oncogene *CD24* and its arising role in the carcinogenesis of the GI tract: from research to therapy. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 125–133 (2008).
61. Fang, X., Zheng, P., Tang, J. & Liu, Y. CD24: from A to Z. *Cell. Mol. Immunol.* **7**, 100–103 (2010).
62. Gilliam, D. T., Menon, V., Bretz, N. P. & Pruszak, J. The CD24 surface antigen in neural development and disease. *Neurobiol. Dis.* **99**, 133–144 (2017).



63. Klonisch, T. *et al.* Cancer stem cell markers in common cancers – therapeutic implications. *Trends Mol. Med.* **14**, 450–460 (2008).
64. Kim, Y. S., Kaidina, A. M., Chiang, J.-H., Yarygin, K. N. & Lupatov, A. Y. Cancer stem cell molecular markers verified in vivo. *Biochem. (Moscow), Suppl. Ser. B Biomed. Chem.* **11**, 43–54 (2017).
65. Jiao, X.-L., Zhao, C., Niu, M. & Chen, D. Downregulation of CD24 inhibits invasive growth, facilitates apoptosis and enhances chemosensitivity in gastric cancer AGS cells. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **17**, 1709–15 (2013).
66. Wang, Y.-C. *et al.* CD24 mediates gastric carcinogenesis and promotes gastric cancer progression via STAT3 activation. *Apoptosis* **19**, 643–656 (2014).
67. WANG, X. *et al.* Characterization of sphere-forming cells with stem-like properties from the gastric cancer cell lines MKN45 and SGC7901. *Mol. Med. Rep.* **10**, 2937–2941 (2014).
68. Zhang, C., Li, C., He, F., Cai, Y. & Yang, H. Identification of CD44+CD24+ gastric cancer stem cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **137**, 1679–1686 (2011).
69. Mattheolabakis, G., Milane, L., Singh, A. & Amiji, M. M. Hyaluronic acid targeting of CD44 for cancer therapy: from receptor biology to nanomedicine. *J. Drug Target.* **23**, 605–618 (2015).
70. Yan, Y., Zuo, X. & Wei, D. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Transl. Med.* **4**, 1033–43 (2015).
71. Isacke, C. M. & Yarwood, H. The hyaluronan receptor, CD44. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 718–21 (2002).
72. Herrera, M. B. *et al.* Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury. *Kidney Int.* **72**, 430–441 (2007).
73. Takahashi, K., Eto, H. & Tanabe, K. K. Involvement of CD44 in matrix metalloproteinase-2 regulation in human melanoma cells. *Int. J. cancer* **80**, 387–95 (1999).
74. Takaishi, S. *et al.* Identification of Gastric Cancer Stem Cells Using the Cell Surface Marker CD44. *Stem Cells* **27**, 1006–1020 (2009).
75. Yoon, C. *et al.* CD44 Expression Denotes a Subpopulation of Gastric Cancer Cells in Which Hedgehog Signaling Promotes Chemotherapy Resistance. *Clin. Cancer Res.* **20**, 3974–3988 (2014).
76. Gleeson, J. G., Lin, P. T., Flanagan, L. A. & Walsh, C. A. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* **23**, 257–71 (1999).
77. Qiao, X. T. & Gumucio, D. L. Current molecular markers for gastric progenitor cells and gastric cancer stem cells. *J. Gastroenterol.* **46**, 855–865 (2011).
78. Westphalen, C. B., Quante, M. & Wang, T. C. Functional implication of Dclk1 and Dclk1-expressing cells in cancer. *Small GTPases* **8**, 164–171 (2017).
79. Madka, V. & Rao, C. V. Cancer stem cell markers as potential targets for epithelial cancers. *Indian J. Exp. Biol.* **49**, 826–35 (2011).
80. Nakanishi, Y. *et al.* Dclk1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine. *Nat. Genet.* **45**, 98–103 (2013).
81. Saqui-Salces, M. *et al.* Gastric tuft cells express DCLK1 and are expanded in hyperplasia. *Histochem. Cell Biol.* **136**, 191–204 (2011).
82. Nam, K. T. *et al.* Gastric tumor development in Smad3-deficient mice initiates from



- forestomach/glandular transition zone along the lesser curvature. *Lab. Investig.* **92**, 883–895 (2012).
83. Meng, Q. *et al.* [Expression of doublecortin-like kinase 1 in human gastric cancer and its correlation with prognosis]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* **35**, 639–44 (2013).
 84. Hampton, C. M., Liu, J., Taylor, D. W., DeRosier, D. J. & Taylor, K. A. The 3D Structure of Villin as an Unusual F-Actin Crosslinker. *Structure* **16**, 1882–1891 (2008).
 85. Khurana, S. & George, S. P. Regulation of cell structure and function by actin-binding proteins: Villin's perspective. *FEBS Lett.* **582**, 2128–2139 (2008).
 86. Zhao, Y., Feng, F. & Zhou, Y.-N. Stem cells in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* **21**, 112–23 (2015).
 87. Qiao, X. T. *et al.* Prospective Identification of a Multilineage Progenitor in Murine Stomach Epithelium. *Gastroenterology* **133**, 1989–1998.e3 (2007).
 88. Osborn, M. *et al.* Villin, intestinal brush border hydrolases and keratin polypeptides in intestinal metaplasia and gastric cancer; an immunohistologic study emphasizing the different degrees of intestinal and gastric differentiation in signet ring cell carcinomas. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* **413**, 303–12 (1988).
 89. Moll, R., Robine, S., Dudouet, B. & Louvard, D. Villin: a cytoskeletal protein and a differentiation marker expressed in some human adenocarcinomas. *Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* **54**, 155–69 (1987).
 90. Liu, F. *et al.* Cutaneous metastases from gastric adenocarcinoma 15 years after curative gastrectomy. *An. Bras. Dermatol.* **90**, 46–50 (2015).
 91. He, C.-L., Chen, P., Xia, B.-L., Xiao, Q. & Cai, F.-L. Breast metastasis of gastric signet-ring cell carcinoma: a case report and literature review. *World J. Surg. Oncol.* **13**, 120 (2015).
 92. Hennessy, B. T. *et al.* Characterization of a Naturally Occurring Breast Cancer Subset Enriched in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Stem Cell Characteristics. *Cancer Res.* **69**, (2009).
 93. Turksen, K. & Troy, T. C. Claudin-6: A novel tight junction molecule is developmentally regulated in mouse embryonic epithelium. *Dev. Dyn.* **222**, 292–300 (2001).
 94. Costa, G. L. & Weiner, M. P. Polishing with T4 or Pfu polymerase increases the efficiency of cloning of PCR fragments. *Nucleic Acids Res.* **22**, (1994).
 95. HU, G. DNA Polymerase-Catalyzed Addition of Nontemplated Extra Nucleotides to the 3' of a DNA Fragment. *DNA Cell Biol.* **12**, 763–770 (1993).
 96. De Mattos, J. C. P., Dantas, F. J. S., Caldeira-de-Araújo, A. & Moraes, M. O. Agarose gel electrophoresis system in the classroom: Detection of DNA strand breaks through the alteration of plasmid topology. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **32**, 254–257 (2006).
 97. Huang, X., Yu, J., Zhang, Z. & Cao, K. DNA Spiral Supercoiling and Intramolecular Topological Interlink. *J Microb. Biochem Technol* **3**, 1 (2011).
 98. Schmidt, T., Friehs, K., Schleef, M., Voss, C. & Flaschel, E. Quantitative Analysis of Plasmid Forms by Agarose and Capillary Gel Electrophoresis. *Anal. Biochem.* **274**, 235–240 (1999).
 99. Ho, S. C. L., Mariati, Yeo, J. H. M., Fang, S. G. & Yang, Y. Impact of Using Different Promoters and Matrix Attachment Regions on Recombinant Protein Expression Level and Stability in Stably Transfected CHO Cells. *Mol. Biotechnol.* **57**, 138–144 (2015).
 100. Wang, W. *et al.* Impact of different promoters, promoter mutation, and an enhancer on recombinant protein expression in CHO cells. *Sci. Rep.* **7**, 10416 (2017).



101. Francastel, C., Walters, M. C., Groudine, M. & Martin, D. I. A functional enhancer suppresses silencing of a transgene and prevents its localization close to centromeric heterochromatin. *Cell* **99**, 259–69 (1999).
102. Evdokimov, A. G. *et al.* Structural basis for the fast maturation of Arthropoda green fluorescent protein. *EMBO Rep.* **7**, 1006–12 (2006).
103. Darquet, A.-M., Cameron, B., Wils, P., Scherman, D. & Crouzet, J. A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. *Gene Ther.* **4**, 1341–1349 (1997).
104. Kreiss, P. *et al.* Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Res.* **27**, 3792–8 (1999).
105. Walker, W. E., Porteous, D. J. & Boyd, A. C. The effects of plasmid copy number and sequence context upon transfection efficiency. *J. Control. Release* **94**, 245–52 (2004).
106. Li, Q., Rycaj, K., Chen, X. & Tang, D. G. Cancer stem cells and cell size: A causal link? *Semin Cancer Biol* **35**, 191–199 (2015).
107. Duckworth, C. A., Clyde, D. & Pritchard, D. M. CD24 is expressed in gastric parietal cells and regulates apoptosis and the response to *Helicobacter felis* infection in the murine stomach. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **303**, G915–G926 (2012).
108. Brentani, M. *et al.* Prognostic significance of CD24 and claudin-7 immunoexpression in ductal invasive breast cancer. *Oncol. Rep.* **27**, 28–38 (2011).
109. Shakiba, N. *et al.* CD24 tracks divergent pluripotent states in mouse and human cells. *Nat. Commun.* **6**, 7329 (2015).
110. Sundberg, M. *et al.* CD marker expression profiles of human embryonic stem cells and their neural derivatives, determined using flow-cytometric analysis, reveal a novel CD marker for exclusion of pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* **2**, 113–124 (2009).
111. Torres-Padilla, M.-E. & Chambers, I. Transcription factor heterogeneity in pluripotent stem cells: a stochastic advantage. *Development* **141**, 2173–81 (2014).
112. Ben-David, U., Nudel, N. & Benvenisty, N. Immunologic and chemical targeting of the tight-junction protein Claudin-6 eliminates tumorigenic human pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* **4**, 1992 (2013).
113. Quintanilla, R. H., Asprer, J. S. T., Vaz, C., Tanavde, V. & Lakshmipathy, U. CD44 is a negative cell surface marker for pluripotent stem cell identification during human fibroblast reprogramming. *PLoS One* **9**, e85419 (2014).
114. W Bourguignon, L. Y., Earle, C. & Shiina, M. Molecular Sciences Activation of Matrix Hyaluronan-Mediated CD44 Signaling, Epigenetic Regulation and Chemoresistance in Head and Neck Cancer Stem Cells. doi:10.3390/ijms18091849
115. Senbanjo, L. T. & Chellaiah, M. A. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front. Cell Dev. Biol.* **5**, (2017).
116. Cho, Y. *et al.* Cleaved CD44 intracellular domain supports activation of stemness factors and promotes tumorigenesis of breast cancer. *Oncotarget* **6**, 8709–21 (2015).
117. Cao, X. *et al.* CD44 but not CD24 expression is related to poor prognosis in non-cardia adenocarcinoma of the stomach. *BMC Gastroenterol.* **14**, 157 (2014).
118. CD24 Expression in Gastric Adenocarcinoma Is Associated with Tumor Invasiveness. *Korean J. Pathol.* **38**, 388–93 (2004).
119. Gagliardi, G. & Bellows, C. F. DCLK1 expression in gastrointestinal stem cells and



neoplasia. (2012). doi:10.7243/2049-7962-1-12

