



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

“LA ONCOPROTEÍNA E7 DEL PAPILOMAVIRUS HUMANO 16, ALTERA LA EXPRESIÓN
DE LAS CLAUDINAS Y EL SELLADO DE LAS UNIONES ESTRECHAS EN LAS CÉLULAS
EPITELIALES”

TESIS

QUE OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

PERLA YACELI UC UC

DIRECTORA DE TESIS

DRA. LORENZA GONZÁLEZ MARISCAL Y MURIEL
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS, CINVESTAV

COMITÉ TUTOR

DRA. MARTHA ROBLES FLORES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. PATRICIO GARIGLIO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, CINVESTAV

CIUDAD DE MÉXICO, ABRIL DE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



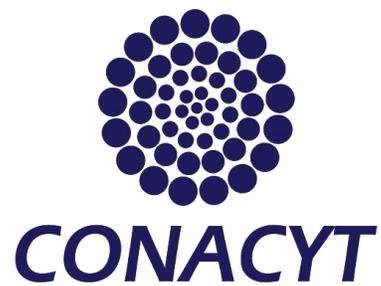
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.

El presente trabajo se realizó con el apoyo del Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT), en el laboratorio 29 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, bajo la dirección de la Dra. Lorenza González Mariscal. Número de becario CONACyT 362696.



A mis padres

A mi hija

**“La virtud como el arte, se consagra constantemente a lo que es difícil de hacer,
y cuánto más dura es la tarea, más brillante es el éxito”**

Aristóteles

Dedicado a los pilares y motores de mi vida

A mi hija:

Perla Sofía Vargas Uc

Eres la razón por la que me hice más fuerte, tu llegada con valentía y alegría me enseñó a que no existen imposibles, y desde entonces eres mi motor, la luz de mis días, mi gran felicidad y mi mayor tesoro. Admiro tu nobleza. Te amo

A mis padres:

Leydy Aracely Uc Canich

Por ser mi principal apoyo en este camino, por sus sacrificios, comprensión y por estar siempre conmigo incondicionalmente, sin ella nada hubiera sido posible. Mi mayor admiración y agradecimiento para ella.

Noé Salvador Uc Brito

Por su apoyo y sabios consejos en mis momentos difíciles para seguir adelante y no desistir, por su fé en mí y por estar ahí siempre. Tu ejemplo me enseña a caminar por la vida. Eres mi guía y maestro en la vida.

A mis abuelos:

Florencia Brito y Pedro Uc (Q.E.P.D)

Mi agradecimiento por sus cuidados y preocupaciones. Me enseñaron y me encaminaron a ser un mejor ser humano. El mejor recuerdo de mi niñez son ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fué realizada bajo la tutoría de la Dra. Lorenza González Mariscal, quien me dió la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo. Mi sincero agradecimiento por su apoyo, paciencia, dedicación y profesionalismo en mi formación como investigadora y por impulsarme a dar lo mejor de mí. Una maestra excepcional.

A mis asesores, los Dres. Martha Robles Flores y Patricio Gariglio, por su apoyo y recomendaciones en cada tutorial. Así como sus contribuciones que enriquecieron mi trabajo.

Agradezco la participación en el desarrollo de este proyecto de: Dr. René Asomoza, Dra. Bibiana Chávez Munguía, Dra. Liora Shioshani, Dr. Arturo Raya Sandino, Dr. Enoc Mariano Cortés Malagón, Dr. Rodolfo Ocádiz Delgado, Dra. Gabriela Martínez Revollar, Dra. Jael Miranda, Q.F.B. Lourdes Alarcón Mortera, Ing. Georgina Ramírez y María Luisa Roldán. Su colaboración, entusiasmo y dedicación fueron de gran importancia.

Este trabajo fué apoyado por el donativo otorgado del proyecto: “Efecto de la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano tipo 16 y de los estrógenos sobre las células troncales y el desarrollo de cáncer del cuello uterino”, CONACYT A1-S-9783, responsable Dr. Jaime de la Garza.

A los auxiliares, M. en C. Dolores Martín Tapia y Biol. Miguel Rojas, por su apoyo técnico en la realización de esta tesis.

A mis hermanas Cynthia Natahaly Uc Uc y Leydy Paola Uc Uc, por su apoyo y compañía.

A Orlando Vargas Sierra, por ser mi compañero en este camino, brindarme su apoyo y creer en mí.

A mis compañeros de laboratorio 29 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias: Misael Cano, Christian Hernández, Helios Gallego, Laura González, Cristina Pinto y Mario Ortega (Q.E.P.D.).

ÍNDICE

Resumen	13
Abstract	14
I. Introducción	15
1. Epidemiología del cáncer cervical	15
2. El virus del papiloma humano	16
3. El genoma del VPH	18
3.1 El ciclo de vida del papilomavirus humano depende de la diferenciación de las células epiteliales del cérvix	19
3.1.1 Replicación del ADN del papilomavirus por círculo rodante	21
3.2 Carcinogénesis cervical	21
3.3 La oncoproteína E6 del VPH	24
3.4 La proteína E7 del VPH tiene una función transactivadora y transformante similar a la proteína E1A del adenovirus	27
3.4.1 Asociación de E7 con el supresor de tumores retinoblastoma (pRb)	29
4. El modelo del ratón transgénico K14E7	30
5. Los epitelios: definición, características y función	32
6. Las uniones estrechas	35
6.1 Localización y estructura	35
6.2 Función de la UE	37
6.3 Composición molecular	41
6.3.1 Proteínas periféricas de la UE	43
6.3.1.1 Proteínas MAGUK de la UE	43
6.3.2 Proteínas integrales de la UE	43

7. Las claudinas	47
7.1.1 La primer asa extracelular de las claudinas determina la permeabilidad paracelular	47
7.1.2 La segunda asa extracelular de las claudinas participa en la interacción molecular entre claudinas y a ella se une la toxina CPE	48
7.1.3 Cola citoplásmica carboxilo terminal de las claudinas	48
7.2 Función de las claudinas	50
7.3 La claudina-1	51
7.3.1 La claudina-1 en el cáncer	52
7.4 La claudina-10	54
7.4.1 La claudina-10 en el cáncer	55
7.5 UEs en los epitelios multi-estratificados de la piel y cérvix	56
7.5.1 Distribución de proteínas de la UE en el epitelio multi-estratificado de la piel	56
7.5.2 Distribución de proteínas de la UE en el epitelio multi-estratificado del cérvix humano	57
II. Objetivo de la tesis	59
III. Hipótesis	59
IV. Material y métodos	60
1. Modelo murino y tratamiento hormonal	60
2. Cultivo celular	60
3. Inmunofluorescencia	61
4. Medición de la intensidad media relativa de la inmunofluorescencia	62
5. Microscopía electrónica de transmisión	62
6. Transfección estable de las células MDCK con la oncoproteína E7	63
7. Amplificación de E7 por PCR	63

8. Western blot	64
11. Microscopía de fuerza atómica	66
V. Resultados	66
VI. Discusión	84
VII. Resumen de resultados	88
VIII. Conclusión	90
IX. Perspectivas	91
Referencias	92

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
aa	Aminoácido
BPV1	Virus del papiloma bovino tipo 1
CK II	Caseína cinasa II
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CPE	Enterotoxina del <i>Clostridium perfringens</i>
CR1	Región conservada 1 de E7
CR2	Región conservada 2 de E7
DMEM	Medio basal Dulbecco modificado por Eagle
ECL1	Primer asa extracelular de claudina
ECL2	Segunda asa extracelular de claudina
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EUA	Estados Unidos de América
E ₂	17β-estradiol
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
LC	Bajo calcio
LCR	Región larga de control
MAGUK	Proteína homóloga a la guanilato cinasa asociada a la membrana
MDCK	Células de riñón de perro Madin Darby
MFA	Microscopio de fuerza atómica
MET	Microscopía electrónica de transmisión
NC	Calcio normal
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
OMS	Organización mundial de la salud
pRb	Proteína retinoblastoma

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDZ	Acrónimo de proteína de densidad postsináptica (PSD95), disco largo (Dlg) y zonula occludens 1 (ZO-1)
RET	Resistencia eléctrica transepitelial
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
SFB	Suero fetal bovino
UE	Unión estrecha
UA	Unión adherente
VPH	Virus del papiloma humano
VPH-EV	VPH asociado a epidermodisplasia verruciforme
ZO-1, -2	Zonula Occludens -1, -2

Resumen

En esta tesis estudiamos el papel de la oncoproteína E7 del papilomavirus humano 16 (VPH16) sobre el sellado de las uniones estrechas (UEs) así como en la expresión de las claudinas en el cérvix murino y en las células MDCK. En los ratones transgénicos K14E7 con tratamiento de 17β -estradiol (E_2), observamos que en el cáncer invasor del cérvix, disminuye la expresión de las claudinas -1 y -10. También encontramos un incremento transitorio en la expresión de la claudina-1 en el cérvix de los ratones K14E7 de 2 meses de edad, y una concentración temprana (2 vs 7 meses) de la claudina-10 en el borde de las células superficiales del cérvix de los ratones FvB que se trataron con E_2 , y en los animales K14E7 tratados o no con E_2 . Estas modificaciones se acompañaron de un aumento en la permeabilidad paracelular del cérvix en los ratones FvB tratados con E_2 de 2 y 7 meses de edad, y de manera más pronunciada en los ratones K14E7 con o sin tratamiento con E_2 . En las células MDCK la expresión de E7 ensanchó el espacio paracelular entre las células adyacentes y alteró la arquitectura de las monocapas. Además, indujo un pico más elevado de resistencia eléctrica transepitelial que se acompañó de una disminución en la expresión de las claudinas -1, -2 y -10, y de un incremento de la claudina-4. E7 además promovió la migración de las células MDCK a través de una matriz 3D, aumentó la rigidez de la membrana apical e indujo la formación de fibras de estrés. Estas observaciones demuestran que la transformación celular inducida por la oncoproteína VPH16 E7, se acompaña por modificaciones en el patrón de expresión de las claudinas y el grado de sellado de las UEs.

Abstract

We have studied the role of HPV16 E7 oncoprotein on the sealing of tight junctions (TJs) and the expression of claudins in mouse cervix and in epithelial MDCK cells. In invasive cancer of the cervix present in 7 month-old transgenic K14E7 mice treated with 17β -estradiol (E_2), we observed a reduced expression of claudins -1 and -10. In addition, we also found a transient increase in claudin-1 expression in two month-old K14E7 mice cervix, and an earlier accumulation of claudin-10 at the border of cells in the upper layer of the cervix in FvB mice treated with E_2 , and in K14E7 mice treated or not with E_2 . These changes were accompanied by an augmented paracellular permeability of the cervix in 2 and 7 month-old FvB mice treated with E_2 , which became more pronounced in K14E7 mice treated or not with E_2 . In MDCK cells the stable expression of E7 widens the space between adjacent cells and alters the architecture of the monolayers, induces the development of an acute peak of transepithelial electrical resistance accompanied by a diminished expression of claudins -1, -2 and -10 and an increase in claudin-4. Moreover, E7 enhances the ability of MDCK cells to migrate through a 3D matrix and induces cell stiffening and stress fiber formation. These observations reveal that cell transformation induced by HPV16 E7 oncoprotein is accompanied by changes in the pattern of expression of claudins and the degree of sealing of epithelial TJs.

I. Introducción

1. Epidemiología del cáncer cervical

El carcinoma cervical ocupa el cuarto lugar de frecuencia y de mortalidad por cáncer en las mujeres, con unas tasas de incidencia y mortalidad de 6.6 y 7.5 % respectivamente, considerando a los diez cánceres más comunes en las mujeres en 2018. En ese año, en el mundo, se estimaron 570,000 nuevos casos de cáncer cervical y 311,000 muertes por este padecimiento. Además, en regiones del mundo con un índice de desarrollo humano bajo a medio, el cáncer cervical ocupa el segundo lugar de incidencia (18.2 %) y mortalidad (12 %), después del cáncer de mama (Bray et al., 2018). En los Estados Unidos de America (E.U.A.) se estimaron para el 2020, 13,800 casos nuevos y 4,290 muertes por cáncer cervical. Asimismo, la probabilidad de desarrollar cáncer cervical invasivo desde el nacimiento hasta la muerte en E.U.A. de 2014 a 2016 fue de 0.6 % (Siegel et al., 2020). Llama la atención que desde mediados de los años 1970s, la supervivencia para todos los cánceres aumentó en los E.U.A., con excepción de los de cérvix y cuerpo uterino (Jemal et al., 2017). En el cáncer cervical, la tasa de supervivencia relativa a 5 años, es de 92 %, 56 % y 17 % para lesiones focales, regionales y distantes, respectivamente.

El cáncer cervical continua siendo la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres de 20 a 39 años de edad (Siegel et al., 2020). Este hallazgo, subraya la necesidad de incrementar la vacunación contra el virus del papiloma humano (VPH) y la prueba de Papanicolaou/VPH (ADN). Al respecto, en el 2015 en E.U.A. aproximadamente, la mitad de las adolescentes no recibieron la vacuna contra el VPH, y solo el 43 % de las mujeres de 30 años se realizaron las pruebas de Papanicolaou/VPH (ADN) (Siegel et al., 2020).

Las vacunas profilácticas contra el VPH, estuvieron disponibles en los países de ingresos altos desde el 2006. La primera generación de estas vacunas protege

contra los VPH -16 y -18, responsables del 70 % de los cánceres cervicales invasores (Group, 2007; Paavonen et al., 2009), mientras que la vacuna de segunda generación (vacuna 9-valente) ofrece una protección más amplia que abarca a los VPH responsables de hasta el 90 % de los cánceres cervicales (Joura et al., 2015; Kavanagh et al., 2017). Sin embargo, ya que las vacunas se dirigen a pre-adolescentes o adolescentes jóvenes, no será sino hasta después de varias décadas cuando se podrán observar sus beneficios.

En los países de ingresos bajo y medio, las vacunas anti VPH tienen aún poca penetración. Así, en el 2016, solamente el 14 % de estos países establecieron programas de vacunación (Gallagher et al., 2018), y tan solo el 3 % de la población adolescente en las regiones menos desarrolladas tuvo acceso a las vacunas (Bruni et al., 2016).

En 2019 la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso la estrategia global 90-70-90 para la eliminación del cáncer cervical. Esta consiste en una triple intervención: 1) vacunación del 90 % de las mujeres contra múltiples tipos de VPH; 2) tamizaje a realizarse dos veces en la vida en el 70 % de las mujeres entre 35 y 45 años de edad, y 3) acceso a tratamientos de pre-cáncer, cáncer y cuidados paliativos en el 90 % de las mujeres diagnosticadas con cáncer cervical (Canfell et al., 2020). Esta estrategia busca reducir la incidencia de cáncer cervical, estandarizada por edad a 0.7 casos por cada 100,000 mujeres y la tasa de mortalidad a 0.2 por cada 100,000 mujeres, en 78 países de ingresos bajos. De esta manera se piensa evitar la aparición de 74 millones de casos nuevos de cáncer cervical y de 62 millones de muertes por este padecimiento en el siguiente siglo (Brisson et al., 2020; Canfell et al., 2020).

2. El virus del papiloma humano

Los papilomavirus infectan epitelios escamosos en todo el reino animal (Mittal and Banks, 2017; Munger et al., 2004), y en humanos, producen infecciones en epitelios multi-estratificados como la piel, el esófago, la vagina y el cérvix (Stanley et

al., 2007; Wang et al., 2018). Los papilomavirus han cohabitado con la especie humana por miles de años, sufriendo pocos cambios en su composición genómica.

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae* (McLaughlin-Drubin et al., 2012; Munger et al., 2004; Wang et al., 2018). Es un virus pequeño de 52-55 nm de diámetro, sin envoltura y con una cápside icosaédrica. Contiene un genoma de ADN de doble cadena de 8,000 pares de bases aproximadamente. El análisis de su secuencia revela más de 200 genotipos que causan diversas lesiones epiteliales (Gunasekharan et al., 2016). Los papilomavirus se distribuyen en 16 géneros y los humanos se agrupan en 5 de ellos (de Villiers et al., 2004). Los géneros más importantes que comprenden al 90 % de los papilomavirus humanos son los α y el β (de Villiers et al., 2004; Doorbar, 2006), mientras que el 10 % restante se clasifica en los géneros γ , μ y η (Doorbar, 2006).

Los VPHs β se conocen como asociados a epidermodisplasia verruciformes (VPH-EV) ya que infectan a las células epiteliales cutáneas (McLaughlin-Drubin et al., 2012). Los VPH de los géneros γ , μ y η causan papilomas cutáneos y verrugas que no progresan a cáncer (Doorbar, 2006).

El género VPH α es el más grande y en él se encuentran los virus que infectan a los epitelios genitales, aunque también en este género está presente un grupo menor de virus que infectan a la piel y causan verrugas que raramente llegan a cáncer (Doorbar, 2006; McLaughlin-Drubin et al., 2012). Los virus del género α , se clasifican de acuerdo a su grado de malignidad en bajo y alto riesgo. Los últimos producen lesiones que pueden progresar a cáncer, por lo que se les conoce como VPHs-asociados a cáncer (Doorbar, 2006). Estos virus inducen cáncer cervical, pero también pueden inducir carcinoma orofaríngeo o generar carcinomas del tracto anogenital, es decir del ano, vulva, vagina o pene. (McLaughlin-Drubin et al., 2012; zur Hausen, 2002) (Tabla 1).

Tabla 1. VPH de bajo y alto riesgo

VPH de alto riesgo	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
VPH de bajo riesgo	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

Los VPHs 16 y 18 son responsables del 70 % del cáncer cervical y del 50 % de las neoplasias intraepiteliales cervicales de grado III (NIC III). En cambio, los VPHs -6 y -11 son responsables del 90 % de las verrugas genitales (Smith et al., 2007).

3. El genoma del VPH

Los genomas de los distintos VPHs presentan entre sí una estructura básica muy similar, con un rango de homología del 45 % al 85 % (Doorbar, 2006). Su ADN es de cadena doble circular con 8,000 pb aproximadamente y presentan 8 marcos abiertos de lectura unidireccional (ORF) (Figura 1). Sólo una de las cadenas de ADN sirve de molde para la transcripción de tres regiones: 1) La región larga de control regulatorio no codificante que contiene un origen de replicación y elementos de control transcripcional (URR o LCR, ~1 kb). 2) La región de genes tempranos (E, del inglés early, ~4 kb) que codifica a proteínas relacionadas con la replicación (E1), la transcripción (E2), la amplificación del genoma viral (E4 y E5), y la transformación celular (E6 y E7). 3) La región que codifica a los genes tardíos L1 y L2 (L, del inglés late, ~3 kb) para las proteínas principal y minoritaria de la cápside (Ganguly and Parihar, 2009; Stanley et al., 2007), así, como a los mediadores E1^E4 y E5 de las funciones virales tardías, (Hummel et al., 1992). Los viriones se ensamblan en las células diferenciadas y posteriormente se liberan al ambiente extracelular (Woodman et al., 2007). Estas nuevas partículas virales infectan a otras células, y de esta manera continúa el desarrollo de la carcinogénesis cervical (Figura 2).

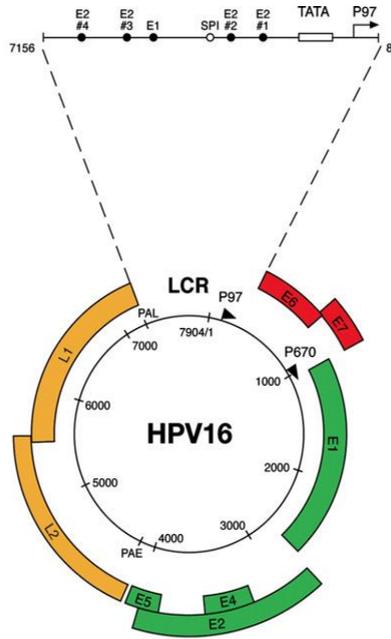


Figura 1. Representación esquemática del genoma del VPH. El genoma del VPH consta de aproximadamente 8,000 pb de cadena doble de ADN circular. Presenta 8 marcos abiertos de lectura y una región reguladora. Los genes del VPH se designan como E o L, en referencia a su expresión temprana o tardía en el epitelio. E1, E2, E5, E6 y E7 se expresan durante la diferenciación temprana del epitelio, E4 se expresa en todo el proceso de la diferenciación epitelial, y L1 y L2 se expresan durante las etapas finales de la diferenciación. Imagen tomada de (Doorbar, 2006).

3.1 El ciclo de vida del papilomavirus humano depende de la diferenciación de las células epiteliales del cérvix

El ciclo de vida productivo del VPH se vincula al grado de diferenciación de las células del tejido hospedero (C. Lee, 2007). La replicación del genoma del VPH durante el ciclo de vida productivo, se divide en tres fases: establecimiento, mantenimiento y amplificación del genoma. El blanco de la infección inicial son las células epiteliales basales del cérvix que quedan expuestas al virus como resultado de microlesiones en el epitelio estratificado (Woodman et al., 2007). La fase de establecimiento es posterior a la infección. Después de la entrada de los viriones a través de los endosomas, el ADN viral unido a la proteína L2 entra al núcleo (Doorbar et al., 2006). El ADN viral inicia varios ciclos de replicación, generando de 10 a 100 copias por célula basal en plásmidos extracromosomales (Stubenrauch and Laimins, 1999).

La replicación del genoma viral ocurre en la fase S del ciclo celular, con el mantenimiento de un número constante de copias que pueden permanecer así por décadas gracias a la expresión de las proteínas E1 y E2 (Steger and Corbach, 1997; Stubenrauch et al., 1998). El nivel de la proteína E2, regula la transcripción temprana del VPH. Así, un número bajo de copias de E2 activa la expresión de E1, mientras que un nivel alto de E2, reprime la transcripción de E1 y E2 (Stubenrauch et al., 1998). De este modo, la expresión de las proteínas de replicación y el número de copias virales, se mantienen estables y en un nivel óptimo en las células indiferenciadas.

En el cérvix, después de la división de las células en la capa basal, una de las células hijas migra a la capa suprabasal empezando así el proceso de diferenciación. Las células normales no infectadas, salen del ciclo celular después de migrar a la capa suprabasal. Por el contrario, las células infectadas aunque se diferencian, permanecen en el ciclo celular (Stubenrauch and Laimins, 1999). Esto les permite entrar de nuevo a la fase S y mantener la replicación productiva del ADN viral. La habilidad de las células infectadas y diferenciadas para progresar en el ciclo celular, se debe a la acción de la oncoproteína E7 (Cheng et al., 1995; Flores et al., 1999). Después de la diferenciación, la transcripción de E1 pasa de ser regulada por el promotor temprano P97 a ser controlada por el promotor tardío P742 (Klumpp and Laimins, 1999). A lo largo del ciclo de vida viral el nivel de ARN de E2 permanece constante mientras que el nivel de ARN de E1 aumenta durante el período de máxima amplificación del genoma. Esto sugiere que E1 es el principal regulador de la amplificación del genoma viral, en preparación para el empaquetamiento del ADN y la morfogénesis del virión (Ozbun and Meyers, 1998).

En síntesis se dice que hay 3 modos de replicación del VPH durante su ciclo de vida. Cuando entra a la célula, en la fase de establecimiento, el genoma viral se amplifica generando un bajo número de copias. En la segunda fase denominada de mantenimiento, el genoma se replica con un número constante de copias en sincronía con el ADN celular de las células en división. Finalmente, en la fase productiva también conocida como vegetativa, el ADN viral se amplifica para generar un gran

número de copias en las células diferenciadas y su destino es el empaquetamiento en cápsides virales (McBride, 2017).

3.1.1 Replicación del ADN del papilomavirus por círculo rodante

La replicación en círculo rodante es un proceso de replicación unidireccional de ácido nucleico que puede sintetizar rápidamente múltiples copias de las moléculas circulares de ADN a ARN tales como plásmidos, genomas de ciertos bacteriófagos, virus de ADN monocatenario y viroides. Algunos virus de células eucarióticas también replican su ADN mediante este mecanismo.

En el papilomavirus, a medida que dos horquillas de replicación que contienen el hexámero E1 progresan en direcciones opuestas del origen viral, la replicación bidireccional ha sido considerada como un modo básico de replicación del ADN del VPH. La replicación bidireccional se demostró claramente con un plásmido que contiene el origen del VPH, en un extracto crudo de las células 293 de riñón embrionario humano (HEK293), que no son células huésped naturales para el VPH. Sin embargo, un estudio previo en células W12, las cuáles, se aislaron de una lesión intraepitelial cervical y conservan los genomas del VPH16 como episomas, reportó que la replicación del genoma del VPH16 cambia de modo bidireccional a unidireccional en la diferenciación celular, que implica un modo de replicación en círculo rodante del VPH que depende de la presencia de E1 y E2 (Kusumoto-Matsuo et al., 2011).

3.2 Carcinogénesis cervical

El desarrollo del cáncer cervical transcurre por cuatro etapas (Schiffman et al., 2007):

- 1) Transmisión del VPH. Las infecciones anogenitales se transmiten principalmente a través del contacto piel con piel y mucosa con mucosa. La mayoría de las mujeres en el mundo se infectan de VPH durante su vida

sexual y aproximadamente el 10 % desarrollan una infección duradera de VPH que las pone en riesgo de desarrollar cáncer cervical.

- 2) Persistencia del virus. La mayoría de las infecciones por VPH con anormalidades citológicas o no, se eliminan o suprimen por la inmunidad celular dentro de los 2 primeros años de la exposición al virus. Con la persistencia prolongada del VPH, la probabilidad de eliminación del virus disminuye y el riesgo de desarrollar pre-cáncer aumenta. Aún así, sólo el 10 % de las infecciones por VPH que persisten por varios años, se vinculan al riesgo de desarrollar pre-cáncer (Schiffman et al., 2007).
- 3) Progresión a pre-cáncer. En términos de histopatología la etapa de pre-cáncer se alcanza cuando el tejido presenta displasia severa, o se clasifica como una NIC III ó carcinoma *in situ*. En esta etapa, las células con anormalidades genéticas reemplazan casi todo el grosor del epitelio cervical. La edad promedio del diagnóstico de pre-cánceres entre los 25 a 35 años y se presenta aproximadamente 10 años después de la infección. El tipo de VPH determina el riesgo de la persistencia viral y la progresión a pre-cáncer.
- 4) Invasión de las células cancerosas. Cerca del 20 al 30 % de los pre-cánceres, tienen el riesgo de progresar a cáncer invasor en un período de 5 a 10 años, y por ello, el período de mayor riesgo para el desarrollo del cáncer cervical invasor es entre los 35 y 55 años de edad.

La integración del genoma del VPH al de la célula hospedera, es un evento selectivo. Cuando ocurre río abajo de los genes temprano E6 y E7 en la región E1 ó E2 con la pérdida o disrupción de E2, favorece el desarrollo del cáncer, ya que se pierde la inhibición de la expresión de los oncogenes E6 y E7 por E2.

El ADN viral que se integra al genoma de la célula hospedera es más estable que la forma episomal y en consecuencia aumenta la expresión de los oncogenes E6 y E7 y la progresión del cáncer cervical (Schiffman et al., 2007) (Figura 2).

En la carcinogénesis cervical también puede presentarse una etapa de regresión o aclaramiento donde se elimina la infección por VPH, y se pasa del pre-cáncer a la normalidad.

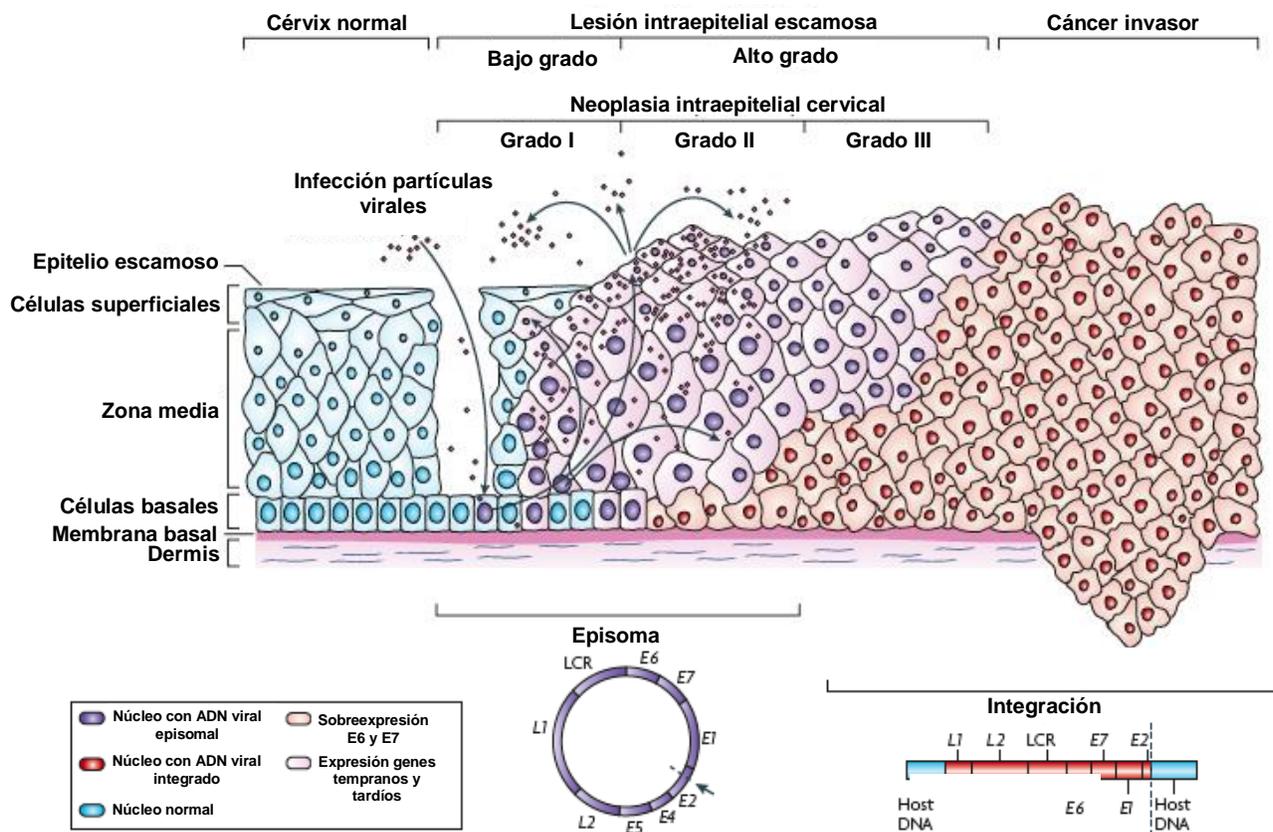


Figura 2. Progresión del cáncer cervical por VPH. El virus del papiloma humano tiene acceso a las células basales a través de microlesiones del epitelio cervical. Después de la infección viral, los genes tempranos E1, E2, E4, E5, E6 y E7 se expresan y el ADN viral se replica a partir del ADN episomal (núcleos morados). En las células de la zona media y superficial el genoma viral se replica aún más, y los genes tardíos L1 y L2 y E4 se expresan. L1 y L2 forman una cápside para los nuevos viriones en el núcleo. La liberación de estos nuevos viriones, puede re-infectar al epitelio. Las lesiones intraepiteliales de bajo grado mantienen la replicación viral productiva. La progresión de las lesiones a cáncer invasor, se asocia con la integración del genoma del VPH al genoma de las células hospedadoras (núcleos rojos). Esto produce la disrupción o pérdida de E2 y aumenta la expresión de los oncogenes E6 y E7. Imagen tomada de (Woodman et al., 2007).

3.3 La oncoproteína E6 del VPH

El gen E6 del papilomavirus codifica a un transcrito que se traduce en la proteína E6 de 158 aminoácidos (aa), cuyas funciones se han estudiado en los VPH de alto riesgo y en el virus del papiloma de bovino tipo 1 (BPV1). Las proteínas E6 y E7 del VPH están relacionadas estructuralmente. Por ejemplo, contienen motivos Cys-X-X-Cys (CXXC) espaciados de forma similar, cuatro de ellos en E6 y dos en E7 (Figura 3 y 5). Estos motivos que se encuentran en varias proteínas de unión a ácidos nucleicos, son característicos de las proteínas de unión a zinc (Barbosa et al., 1989; Grossman and Laimins, 1989).



Figura 3. Esquema de la oncoproteína E6 del VPH-16. Las regiones involucradas en la transformación celular se indican en gris, y algunas de las proteínas blanco de E6 se indican junto a los residuos de aminoácidos de la zona a la que se asocian. Se indica también la ubicación de los 4 motivos CXXC. Imagen tomada de (McLaughlin-Drubin and Munger, 2009).

La proteína E6 se requiere para el ciclo de vida productivo de los papilomavirus, así como para el mantenimiento del ADN viral en los cultivos de queratinocitos (Park and Androphy, 2002; Thomas et al., 1999; Wu et al., 1994). En estos cultivos, E6 en colaboración con la proteína E7, induce la inmortalización celular (Hawley-Nelson et al., 1989; Hudson et al., 1990; Munger et al., 1989a). E6 de los VPH de alto riesgo forma un complejo con la proteína supresora tumoral p53 (Werness et al., 1990), y la enzima de ubiquitinización E6-AP que promueve la degradación de p53 (Scheffner et al., 1995; Yim and Park, 2005). De esta manera, E6

bloquea la actividad transcripcional de p53 que activa genes que paran al ciclo celular y reparan al ADN cuando hay daño moderado al ADN, e inducen apoptosis cuando el daño es severo (Mietz et al., 1992; Scheffner et al., 1995). El complejo E6/E6-AP también se une al represor transcripcional NFX1 de la transcriptasa reversa de la telomerasa humana hTERT. Cuando este represor se degrada, se incrementa la actividad de la telomerasa, promoviendo así la transformación celular (Gewin et al., 2004; Katzenellenbogen et al., 2007) (Figura 4).

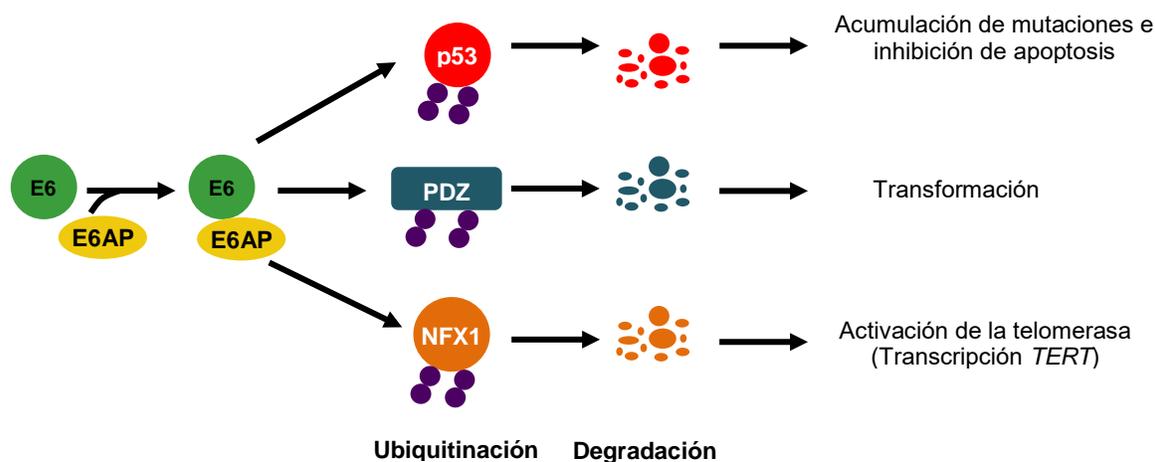


Figura 4. La unión de la proteína E6 del VPH de alto riesgo a la ubiquitin ligasa E6-AP promueve la transformación celular. E6 se une a la ubiquitin ligasa celular E6-AP y forma un complejo ternario con p53, que inicia su ubiquitinación. La ubiquitin ligasa E6-AP participa no solo en la degradación de p53, sino también en la inactivación del represor transcripcional NFX1, lo que da como resultado la activación de la telomerasa y la transformación celular. E6-AP también se une y degrada a proteínas con dominios PDZ, causando la pérdida del contacto célula-célula y de la polaridad celular, lo que promueve la transformación. Imagen tomada de (Narisawa-Saito and Kiyono, 2007).

E6 también se une a proteínas con dominios PDZ (acrónimo de las proteínas densidad postsináptica 95 (PSD95), disco largo (Dlg) y zonulaoccludens 1 (ZO-1)). Los dominios PDZ son regiones de interacción proteína-proteína de 80 a 90

aminoácidos, que se asocian a secuencias específicas de 3 a 5 aminoácidos que se localizan generalmente en la región carboxilo terminal (COOH) de las proteínas blanco. Las proteínas con dominios PDZ, son proteínas plataforma. Es decir, que son proteínas que funcionan como un andamio al que se pegan diversas proteínas, lo que permite concentrar en un lugar a diversos participantes involucrados en una cadena de señalización. Las proteínas PDZ están presentes en la porción citoplásmica de los complejos de adhesión celular constituidos por las uniones septadas de los insectos y las uniones estrechas (UEs) de los epitelios de los vertebrados (Simonson et al., 2005).

En los ratones transgénicos K14E6, que expresan al transgen pK14HPV16E6 en el epitelio basal estratificado bajo el control del promotor de la queratina 14 humana, la proteína VPH-E6 de alto riesgo produce hiperplasia y tumores en la piel, pero no en el cérvix. Por ello, en esta tesis, al ser nuestro interés el cáncer de cérvix, trabajamos con el modelo de ratón transgénico K14E7 y no con el ratón K14E6.

VPH-E6 interactúa con los dominios PDZ de las proteínas de adhesión Dlg, Scribble, MUPP1, MAGI-1, -2, y -3 y PATJ y esto hace que las proteínas se degraden y se debilite la adhesión célula-célula en los epitelios (Simonson et al., 2005; Song et al., 2000; Song et al., 1999). Así mismo, en la piel de estos animales E6 se une a ZO-2, pero a diferencia de lo que ocurre con las otras proteínas blanco de E6, ZO-2 no se degrada y al contrario se acumula (Hernandez-Monge et al., 2013). Esta observación se confirmó en las células epiteliales MDCK, donde E6 aumentó la vida media de ZO-2 pero la deslocalizó de las UEs y provocó su concentración en el núcleo (Hernandez-Monge et al., 2013). ZO-2 es blanco de E6, pues esta proteína en los VPH de alto riesgo tiene un motivo de unión a dominio PDZ en su extremo carboxilo terminal con el que se asocia a ZO-2 (Thomas et al., 2016) (Tabla 2).

Tabla 2. Proteínas blanco de E6.

Blancos de E6	Tipo de proteína
E6AP	Ubiquitin ligasa
p53	Supresores tumorales que reparan el daño al ADN
BRCA1	Supresora tumoral relacionada con autofagia
TSC2 (Tuberina)	
ZO-2	
MUPP1	
MAGI-1, -2, y -3	Con dominios PDZ presentes en la unión estrecha
PATJ	
DLG	Con dominios PDZ presente en la unión septada
PSD95	Con dominios PDZ presente en la unión sináptica
CAL	Proteína con dominios PDZ asociada al Golgi
NFX1-91	Represor transcripcional de la transcriptasa reversa de la telomerasa humana hTERT
CBP/p300	Coactivador transcripcional
Paxillin	Presente en las adhesiones focales
IRF3	Factor regulador del interferón
Bak	
FADD	Pro-apoptóticas
Pro-caspase 8	
GADD34/PP1	Complejo de laholofosfatasa que regula a genes pro-apoptóticos
Tyk2	Cinasa de tirosina no-receptora
MCM7	Complejo de pre-replicación

3.4 La proteína E7 del VPH tiene una función transactivadora y transformante similar a la proteína E1A del adenovirus

Es necesario que se exprese E7 para mantener el ciclo de vida del VPH y a los episomas en las células epiteliales (Thomas et al., 1999). Así mismo, la proteína E7 es suficiente para transformar a los fibroblastos 3Y1 de rata inmortalizados, ya que en los cultivos en monocapa forman focos compuestos de células redondas densamente empaquetadas, similares a las células transformadas por todo el genoma del VPH, además presentaron un crecimiento independiente de anclaje y formaron colonias en un medio de agar suave (Bedell et al., 1989; Kanda et al., 1988; Phelps et al., 1988; Tanaka et al., 1989; Vousden et al., 1988; Watanabe and Yoshiike, 1988; Yasumoto

et al., 1986), y en el caso de los cultivos primarios de células epiteliales de riñón de rata, E7 coopera con el oncogen *ras* para su transformación (Phelps et al., 1988).

Los genes E6 y E7 del VPH son transcritos del mismo promotor P97, en forma de un ARNm bicistrónico con un espacio característico de 3 a 6 pb entre el codón de terminación de E6 y el codón de iniciación del E7, por ello, la proteína E7 se codifica por un marco abierto de lectura ubicado inmediatamente después del gen E6 (Tan et al., 1994). E7 es un polipéptido pequeño de alrededor de 100 residuos muy ácidos. El tercio amino terminal de E7 es homólogo a las porciones conservadas 1 (CR1) y 2 (CR2) de la proteína E1A del adenovirus y a secuencias relacionadas presentes en los antígenos tumorales del poliomavirus, como el antígeno T del SV40 (Figge et al., 1988; Phelps et al., 1992; Vousden et al., 1988) (Figura 5). El dominio de homología a CR1 de las proteínas VPH-E7 de bajo y alto riesgo, tiene un sitio de unión a p600 (Huh et al., 2005), una proteína que regula la apoptosis (Nakatani et al., 2005). El dominio homólogo a CR2 incluye a un motivo Leu-X-Cys-X-Glu (LXCXE), que constituye el núcleo del sitio de unión al supresor tumoral retinoblastoma (pRb) (Munger et al., 1989b) y a las proteínas semejantes a pRb, p107 y p130 (Dyson et al., 1992). Inmediatamente adyacente al motivo LXCXE, hay un motivo consenso de fosforilación por la caseína cinasa II (CK II) (Barbosa et al., 1989; Firzlaff et al., 1991). La región carboxilo terminal de E7 tiene un dominio de unión a zinc o dedo de zinc que consta de dos secuencias CXXC (Barbosa et al., 1989). La región carboxilo terminal de E7 es vital para la integridad estructural de la proteína y funciona como dominio de dimerización/multimerización (Liu et al., 2006). E7 transactiva al promotor AdE2, es decir, aumenta la transcripción a partir de dicho promotor. Así mismo, se ha sugerido que E7 podría aumentar el nivel proteico de E2F o bien aumentar su afección por el promotor AdE2 (Phelps et al., 1988) (Tabla 3).

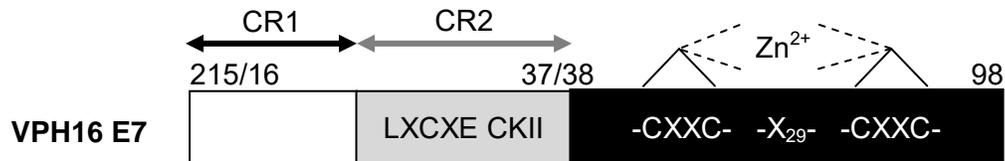


Figura 5. Esquema de la proteína E7 del VPH-16. La región amino terminal de E7 contiene una porción homóloga de las regiones conservadas 1 (CR1) (blanco) y CR2 (gris) de la oncoproteína E1A del adenovirus. La secuencia homóloga CR2 de VPH-16 E7, contiene al núcleo del sitio de unión (LXCXE) para el supresor tumoral retinoblastoma (pRb) y las proteínas relacionadas p107 y p130, así como un sitio consenso de fosforilación por la caseína cinasa II (CK II). La secuencia carboxilo terminal de E7 (negro) contiene un motivo de unión a zinc, rico en cisteínas. Imagen tomada de (McLaughlin-Drubin and Munger, 2009).

Tabla 3. Proteínas blanco de E7.

Blancos de E7	Tipo de proteína
pRb	Supresora tumoral
Ciclina A Ciclina E	Regulación del ciclo celular
p27 p21	Inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina
AP1 TBP	Factores de transcripción
IRF1	Factor de transcripción regulatorio del interferón
Mi2	Componente del complejo de desacetilasas de histonas
MMP2	Metaloproteinasa
hTid 1	Chaperona
p48	Proteína de unión al ADN del complejo ISGF3
M2	Piruvato cinasa
p600	Proteína de unión a calmodulina e interacción con pRb

3.4.1 Asociación de E7 con el supresor de tumores retinoblastoma (pRb)

La proteína pRb regula la progresión del ciclo celular, la diferenciación, la senescencia y la muerte celular (Thomas et al., 2003). El complejo pRb/p107/p130 regula la progresión del ciclo celular al bloquear la actividad de la familia de los factores de transcripción E2F. Estos factores se unen a sitios promotores e inducen la transcripción de factores limitantes para la síntesis del ADN, como la ADN polimerasa α , las enzimas involucradas en la biosíntesis de nucleótidos, la ciclina E y la cinasa

dependiente de ciclina 2 (CDK) que controla la progresión de la fase S (Dyson, 1998). Los factores de transcripción E2F también inducen la expresión de genes que promueven la mitosis.

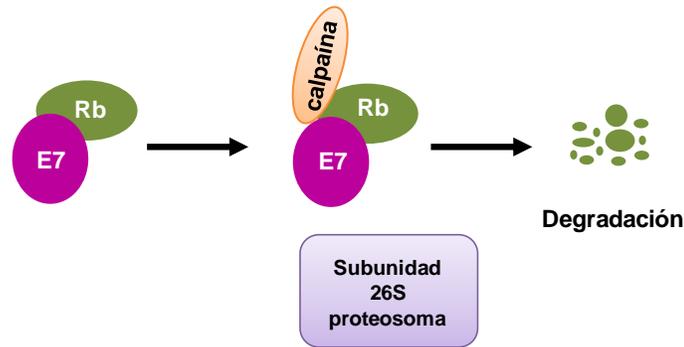


Figura 6. La proteína E7 del VPH de alto riesgo inactiva a la proteína retinoblastoma (pRb). La proteína E7 promueve el corte de la región C-terminal de pRb por la calpaína, una proteasa de cisteínas activada por calcio. Con este corte pRb se degrada en el proteosoma. Imagen tomada de (Narisawa-Saito and Kiyono, 2007).

La proteína pRb hipofosforilada se une a E2F, mientras que la fosforilación de pRb por las cinasas dependiente de ciclina libera a pRb de E2F. Esto permite a E2F inducir la entrada de la célula a la fase S del ciclo celular. E7 inactiva pRb (Dyson et al., 1989) porque promueve el corte del C-terminal de pRb por la calpaína, una proteasa de cisteínas activada por calcio. Esto rompe al complejo pRb-E2F y libera a E2F (Cheng et al., 1995; Dyson et al., 1989; Munger et al., 1989a) (Figura 6).

4. El modelo del ratón transgénico K14E7

El ADN de los VPHs contiene dos genes de expresión temprana, E6 y E7 que codifican a proteínas que promueven la carcinogénesis cervical. Para probar el papel de E7 en este proceso, se desarrolló al ratón transgénico K14HPV16E7. Este animal contiene al transgen hK14HPV16E7, donde la expresión de la oncoproteína E7 del VPH16 se regula por el promotor de la citoqueratina 14 humana (hK14) (Riley et al., 2003). Este promotor se activa en las células basales de los epitelios multi-

estratificados, y de esta manera garantiza que la expresión de E7 ocurra en las células blanco del VPH.

El ratón transgénico K14E7 presenta varias características fenotípicas, como piel arrugada, engrosamiento de las orejas, pérdida del pelo en los adultos y desarrollo de tumores tardíos en la piel. Además, estos animales exhiben un retraso en el crecimiento y mortalidad temprana, debido a su dificultad para alimentarse ocasionada por la hiperplasia del esófago que padecen (Riley et al., 2003).

La expresión de la proteína E7 *per se* parece ser insuficiente para la carcinogénesis y se requiere la presencia de otros cofactores para el inicio de la neoplasia. Así, cuando el ratón transgénico K14HPV16E7 se trató con estrógenos exógenos, desarrolló de manera progresiva un carcinoma escamoso de cérvix en un período de seis meses (Riley et al., 2003). La expresión de E7 en los ratones transgénicos no tratados con estrógenos solamente se detecta durante el estro. En cambio, en el animal transgénico tratado con estrógenos, el transgen se expresa de manera constante (Arbeit et al., 1996). Así mismo, si al ratón transgénico K14HPV16E7 se le trata por 6 meses con estrógenos y después permanece por 3 meses sin ellos, desarrolla menos tumores y más pequeños que los animales tratados de forma continua con estrógenos por 9 meses, lo que sugiere que el estrógeno tiene un papel crítico no sólo para la carcinogénesis del cáncer cervical, sino para su persistencia y continuo desarrollo en el ratón transgénico K14E7 (Brake and Lambert, 2005). El papel de los estrógenos en el desarrollo y progresión del cáncer cervical en el ratón transgénico, asemeja la evidencia epidemiológica que muestra que el consumo prolongado de esta hormona en las mujeres incrementa el riesgo de cáncer cervical (Moreno et al., 2002).

La progresión histopatológica de la enfermedad en el animal transgénico también resultó ser muy similar a la carcinogénesis cervical de las mujeres. Así, primero se indujo una hiperplasia que después originó una neoplasia intraepitelial cervical de bajo grado (NIC I), que a su vez avanzó a una NIC III y finalmente a cáncer (Riley et al., 2003). Este modelo animal también asemeja el patrón de expresión del biomarcador del cáncer cervical humano, MCM7 51.

5. Los epitelios: definición, características y función

En los organismos multicelulares, los fluidos de diferente composición molecular como la orina, la leche, el jugo gástrico, la sangre, etc., se encuentran contenidos en compartimentos delimitados por epitelios y endotelios [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2003)].

Los epitelios están formados por capas de células que recubren a la superficie externa del cuerpo (e.g. la piel), y las cavidades (e.g., estómago, útero, vejiga) y los ductos (e.g., túbulos renales, intestino) del organismo. Los epitelios constituyen la frontera entre el individuo y el medio externo, ya que actúan como una barrera física [Para revisiones ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2012; Gonzalez-Mariscal et al., 2007; Gunzel and Yu, 2013)] que protege al cuerpo de microorganismos, toxinas, trauma, radiación y evaporación del agua. Así mismo, los epitelios regulan el intercambio de iones, solutos y agua entre el interior del organismo y el medio ambiente ó el contenido de las cavidades y ductos [Para revisiones ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2012; Gunzel and Yu, 2013)].

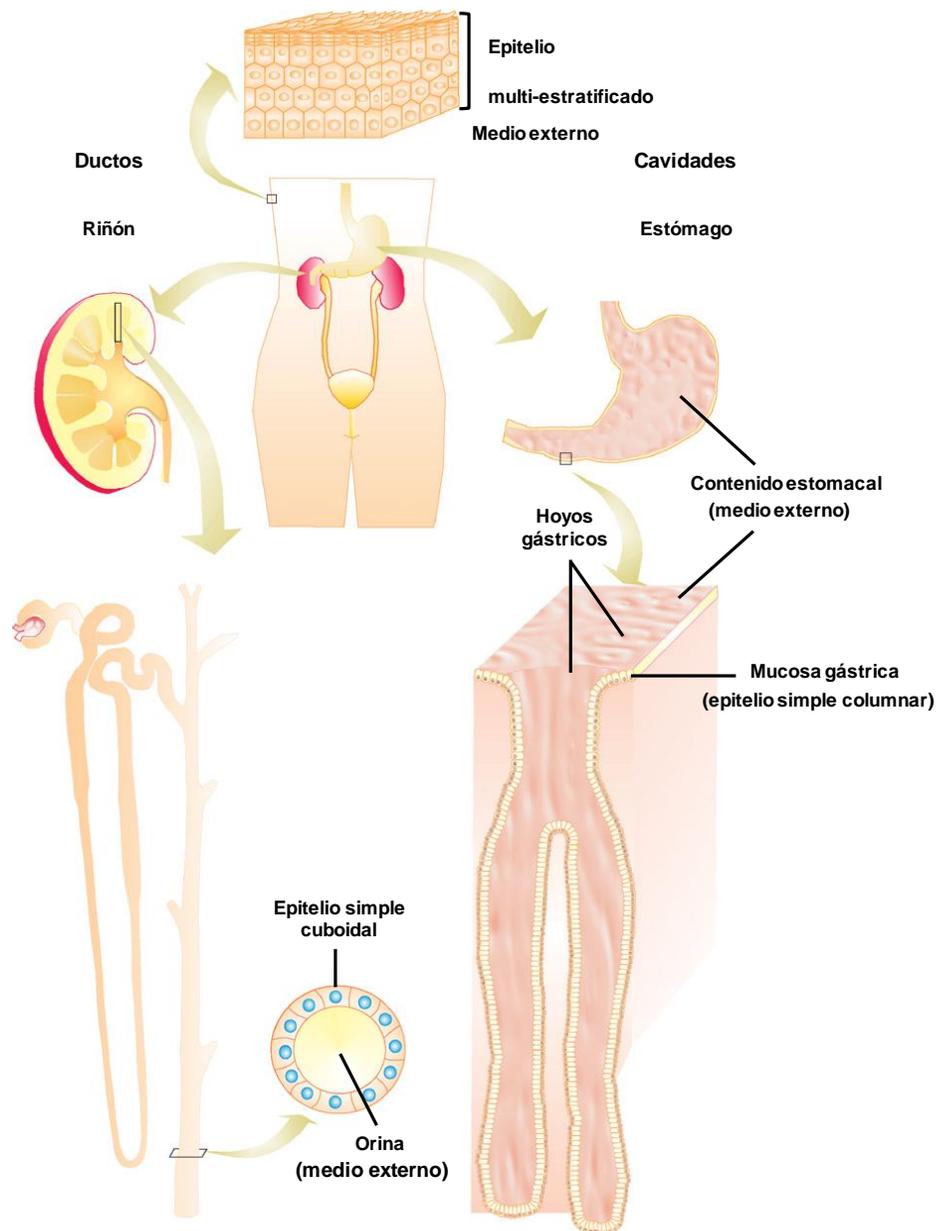


Figura 7. Esquema que ilustra la presencia de los epitelios en la frontera entre el interior del cuerpo y el medio externo que rodea al organismo o el contenido de las cavidades y ductos del cuerpo. El ambiente externo comprende al medio que rodea al cuerpo y al contenido de gases, líquidos y sólido que se encuentra dentro de las cavidades y ductos del organismo. Se ejemplifican los epitelios del estómago y los túbulos renales. Imagen tomada de (Gonzalez-Mariscal et al., 2007).

En los tejidos sometidos a una fuerte presión mecánica como la piel, el esófago, la córnea o la vagina, los epitelios son multi-estratificados, mientras que en el resto del cuerpo se organizan en monocapas. La forma de las células también varía en los tejidos, así, pueden ser columnares, tubulares o escamosas como en el intestino, los túbulos renales o el pulmón, respectivamente [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2012)] (Figura 7).

Las células epiteliales tienen dos características básicas: poseen una membrana plasmática polarizada y UEs. La primera se refiere a que su membrana tiene dos dominios morfológica y bioquímicamente diferentes: apical y basolateral [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2007)]. El primero, está en contacto con el exterior o la luz de las cavidades o ductos, y se encarga de regular el intercambio de sustancias con el medio externo. El dominio basolateral en cambio, está en contacto con el interior del organismo y mantiene la unión con las células vecinas y la matriz extracelular.

Las UEs tienen como función mantener la polaridad de la membrana y regular el paso de sustancias por la ruta paracelular (Tsukita et al., 2001; van Meer and Simons, 1986). En los epitelios, hay dos rutas de transporte: la transcelular y la paracelular. La primera se ocupa del tránsito de sustancias a través de la célula, cruzando las membranas apical y basolateral. Para ello, es necesario que el elemento que se transporta sea lipofílico para que pueda atravesar la membrana plasmática o que emplee un mecanismo específico de transporte, como un transportador, una bomba o un canal.

La segunda ruta de transporte a través de un epitelio, es la paracelular. Ésta se localiza en el espacio intercelular entre las células adyacentes y se regula por las UEs que se ubican en la región más apical de la membrana lateral [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2007)] (Figura 8).

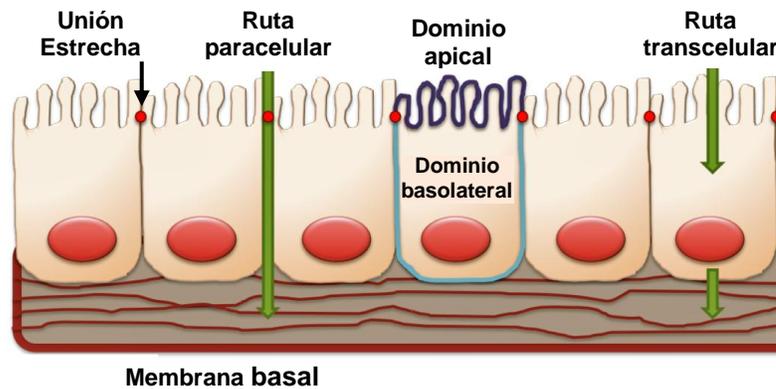


Figura 8. Representación esquemática de un epitelio y de las rutas de transporte asu través. El transporte a través de las células epiteliales ocurre mediante las rutas transcelular y paracelular, y requiere que las células epiteliales tengan dos características básicas: una membrana plasmática polarizada y uniones estrechas. Imagen tomada de (Gonzalez-Mariscal et al., 2012).

6. Las uniones estrechas

6.1 Localización y estructura

Farquhar y Palade describieron por primera vez en 1963 la ultra-estructura del complejo de unión entre las células epiteliales. Lo dividieron en 3 estructuras: la *zonula occludens* o unión estrecha, la *zonula adhaerens* o unión adherente que se encuentra justo por debajo de la UE, y la *macula adhaerens* o desmosomas que forma contactos puntuales a lo largo de la membrana lateral (Farquhar and Palade, 1963) (Figura 9A).

La UE es una estructura de adhesión célula-célula, que se localiza en el límite entre las membranas apical y lateral [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2012; Tsukita et al., 2001)] (Figura 9C). Por microscopía electrónica de transmisión (MET) en cortes finos, la UE aparece como puntos de aparente fusión de las caras externas de las membranas de las células epiteliales adyacentes. Estos puntos de contacto intercelular o besos de las membranas ocluyen el espacio intercelular (Farquhar and Palade, 1963) (Figura 9B y C). Mediante la técnica de criofractura, al romper el interior de la membrana, la UE se observa como una red de filamentos entrecruzados que rodea a las células epiteliales, a manera de cinturón por debajo de

las microvellosidades apicales [Para revisión ver (González-Mariscal L et al., 2012)] (Brennan et al., 2010; Tsukita et al., 2001). Por inmunofluorescencia, al observarse desde arriba o en fase, las proteínas de la UE muestran un patrón de distribución en el borde celular que asemeja al de una malla de gallinero. Mientras que en una vista lateral, por inmunofluorescencia, la UE se observa como puntos en la parte superior de la membrana lateral [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2012)] (Figura 10).

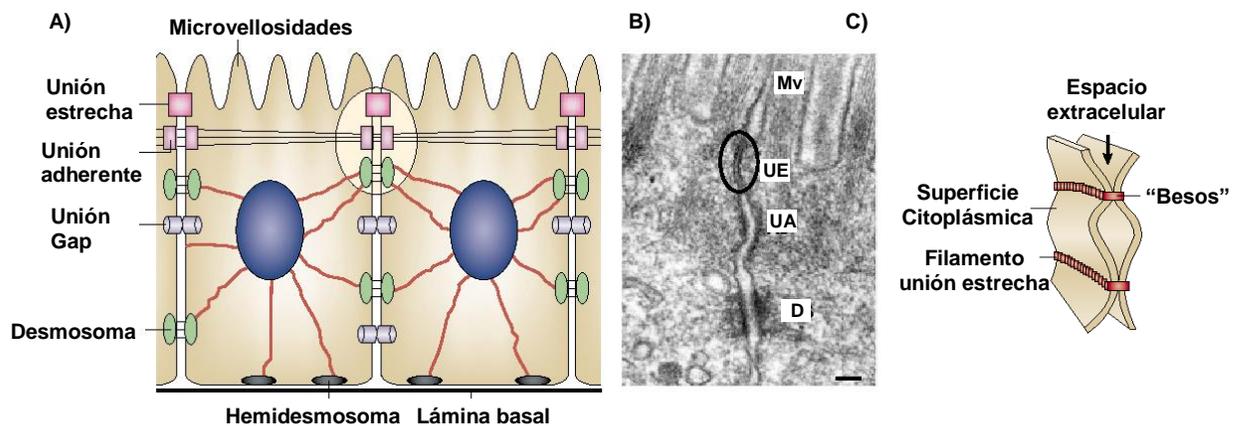


Figura 9. Vista y esquema del complejo de unión apical y de la UE. **A)** Representación esquemática de las estructuras de adhesión presentes en la membrana lateral de las células epiteliales. **B)** Imagen de microscopía electrónica de transmisión (MET) del complejo de unión apical, en las células epiteliales del intestino de ratón. La unión estrecha se señala en un círculo. (Mv, microvellosidades; UE unión estrecha, UA, unión adherente; D, desmosoma). **C)** Esquema tridimensional de la estructura de la UE. Cada hoja externa de la membrana plasmática se asocia lateralmente con la otra hoja externa de la membrana de la célula adyacente, con lo que se forma un cinturón continuo de adhesión que oblitera el espacio intercelular. Imagen tomada de (Tsukita et al., 2001).

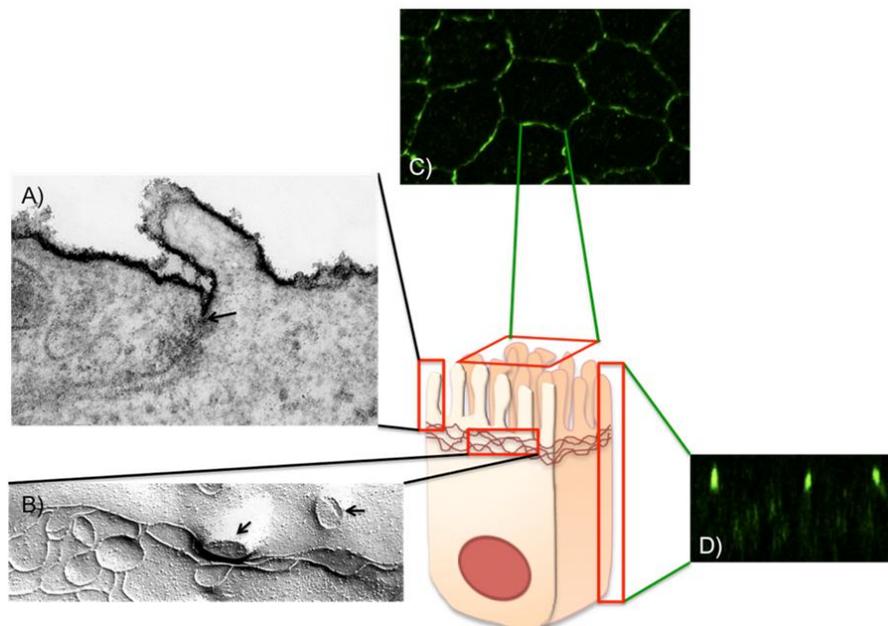


Figura 10. Estructura de la unión estrecha vista por microscopía electrónica e inmunofluorescencia. A) Por microscopía electrónica de transmisión, en cortes finos, la UE se observa como puntos de contacto célula-célula donde las membranas de las células adyacentes parecen fusionarse (flecha). Se observa como el marcador electrodenso rojo de rutenio, que se adiciona a la superficie apical, no tiñe la ruta paracelular por debajo de la UE. **B)** Por criofractura, la UE se observa como una red de filamentos entrecruzados por debajo de las microvellosidades apicales (flechas). **C)** Por inmunofluorescencia, las proteínas de la UE vistas en fase forman un patrón de malla de gallinero, **D)** Mediante una vista lateral, las proteínas de la UE se observan como puntos que delimitan la membrana apical de la basolateral. Imagen tomada de (Gonzalez-Mariscal et al., 2012).

6.2 Función de la UE

Las UEs tienen 2 funciones canónicas: de compuerta y cerca (Mandel et al., 1993). La primera regula el paso de iones, moléculas y agua a través de la ruta paracelular. La función de compuerta de la UE no se rompe durante la citocinesis y se mantiene por una expresión sostenida de las UEs en el borde celular (Baker and Garrod, 1993). En este proceso se genera un anillo contráctil de actomiosina entre las dos células en división, asociado a las UA que se refuerzan por el reclutamiento de vinculina (Higashi et al., 2016) (Figura 11 y 12).

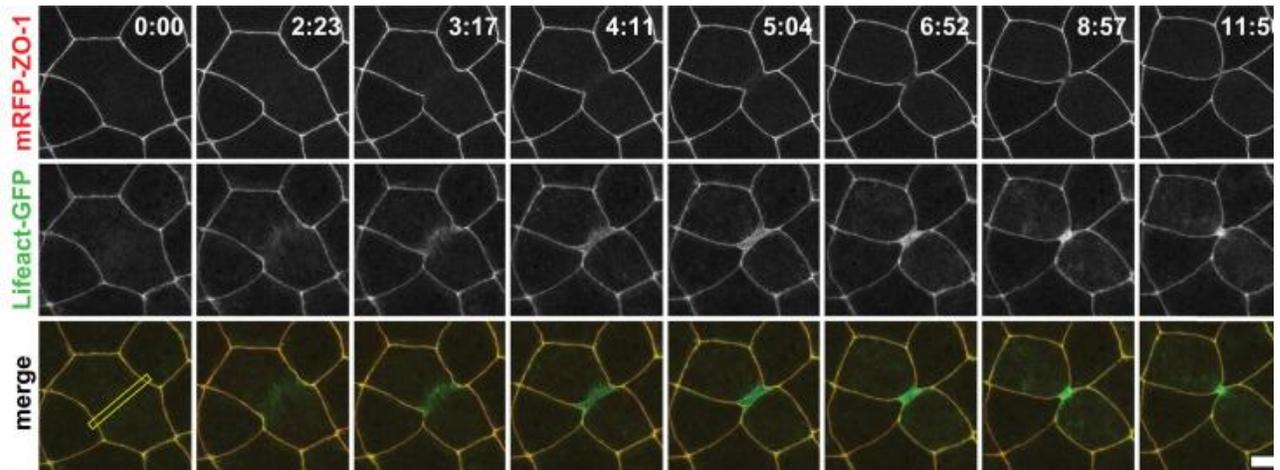


Figura 11. Expresión de la proteína ZO-1 durante la formación del anillo contráctil de actomiosina durante la citocinesis. Imágenes en vivo de la UE y del anillo contráctil de actomiosina en embriones de *Xenopus*. mRFP-ZO1 (rojo, UE) y Lifeact-GFP (verde, F-actina) (Higashi et al., 2016).

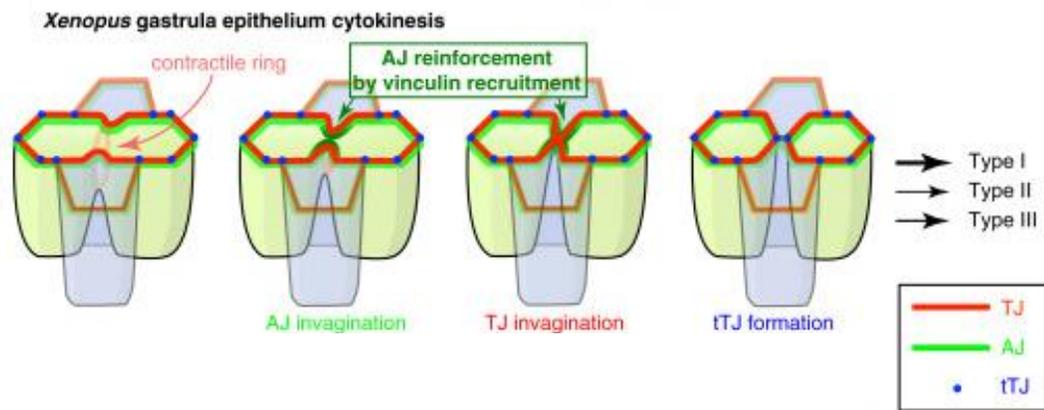


Figura 12. Esquema de la formación del anillo contráctil de actomiosina y del reclutamiento de la vinculina a las UAs para producir la invaginación de las UEs durante la citocinesis. Modelo de citocinesis epitelial en embriones de *Xenopus*. Durante la citocinesis, las UEs y UAs se mantienen en el borde celular y se conectan a un anillo contráctil de actomiosina que se forma en la zona donde se hará la citocinesis. El reclutamiento de la vinculina, refuerza a la UA para la formación de este anillo (Higashi et al., 2016).

La función de compuerta se puede detectar mediante la medición de la resistencia eléctrica transepitelial (RET) (Tavares et al., 2017). El circuito eléctrico en la figura 13, muestra como la RET es el resultado de dos resistencias en paralelo: la transcelular y la paracelular. La resistencia transcelular se debe a la resistencia en serie de las membranas apical y basolateral. Sin embargo, la resistencia eléctrica a través de la membrana plasmática es tan alta ($2 \text{ G}\Omega$) que la corriente fluye a través de la ruta paracelular, cuya resistencia depende del grado de sellado de la UE. Por lo tanto, el valor de RET refleja la resistencia de la UE [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2012)].

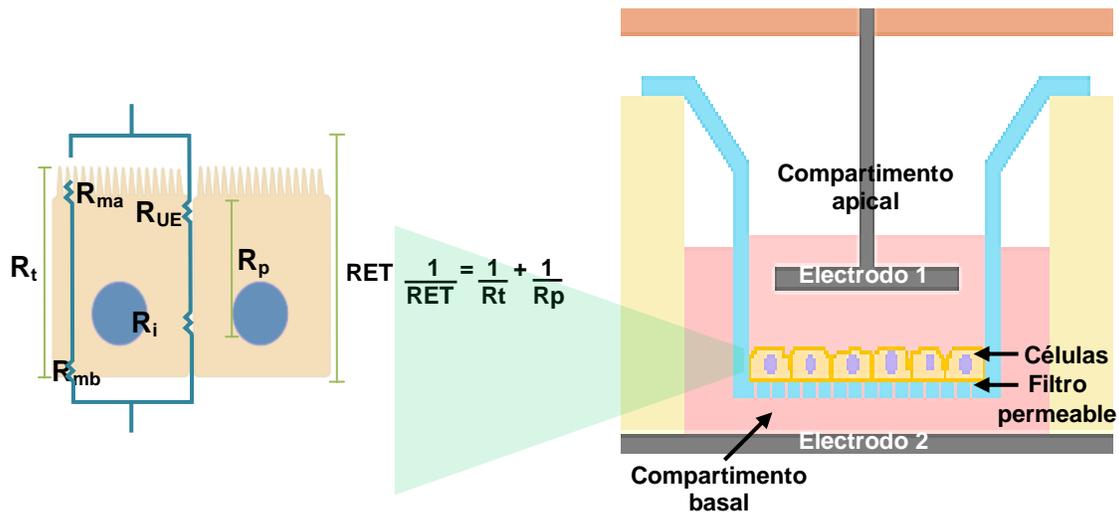


Figura 13. Esquema de una monocapa epitelial sembrada sobre un inserto con el circuito eléctrico y la ecuación para determinar la resistencia eléctrica transepitelial. La RET es el resultado de dos resistencias en paralelo: la transcelular y la paracelular. Sin embargo, la resistencia transcelular es tan alta, que la corriente fluye por la ruta paracelular. La resistencia de esta ruta depende del grado de sellado de la UE. Las células epiteliales se siembran sobre un filtro permeable, donde forman una monocapa que limita el tránsito por la vía paracelular con las UEs. Para medir la RET se coloca un electrodo en el compartimento apical y otro en el basolateral y se aplica una corriente eléctrica. La RET se calcula mediante la ley de Ohm. RET, resistencia eléctrica transepitelial; R_t , resistencia transcelular; R_{ma} , resistencia de la membrana apical; R_{mb} , resistencia de la membrana basolateral; R_p , resistencia paracelular; R_{UE} , resistencia de la unión estrecha; R_i , resistencia del espacio intercelular.

La función de compuerta, también se puede analizar observando el tránsito paracelular de iones y moléculas. Así, se puede estudiar por MET el paso de moléculas electrodenudas como el rojo de rutenio y el lantano. Mediante fluorimetría o mediciones de radioactividad también se puede cuantificar el tránsito paracelular de moléculas que no atraviesan la membrana biológica y para las cuales no hay transportadores específicos tales como el FITC-dextrán fluorescente o el ^3H -manitol. Este movimiento se evalúa en monocapas que se siembran sobre insertos, donde en el compartimento apical se añade la molécula a estudiar, y en el compartimento basal se mide su concentración [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2012)].

La función de cerca de la UE se refiere a la habilidad de esta estructura para restringir el movimiento de lípidos y proteínas en el plano de la membrana entre los dominios apical y basolateral (Mandel et al., 1993; van Meer and Simons, 1986). Esta función mantiene la distribución asimétrica de lípidos y proteínas de la membrana plasmática y por ello, permite el transporte vectorial de las moléculas a través del epitelio [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2012)]. La función de cerca se evalúa en monocapas cultivados sobre insertos, donde por ejemplo un lípido fluorescente como la esfingomielina se añade a la cara apical y posteriormente se detecta si llega a la membrana basolateral (Nava et al., 2004). Esta función también se puede evaluar biotinilando a las proteínas de la membrana apical, y posteriormente analizando por inmunoprecipitación la distribución de una proteína particular originalmente presente en la membrana apical. A la proteína inmunoprecipitada luego se le detecta por Western blot con estreptavidina, una molécula con alta afinidad por la biotina [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2012) (Figura 14)].

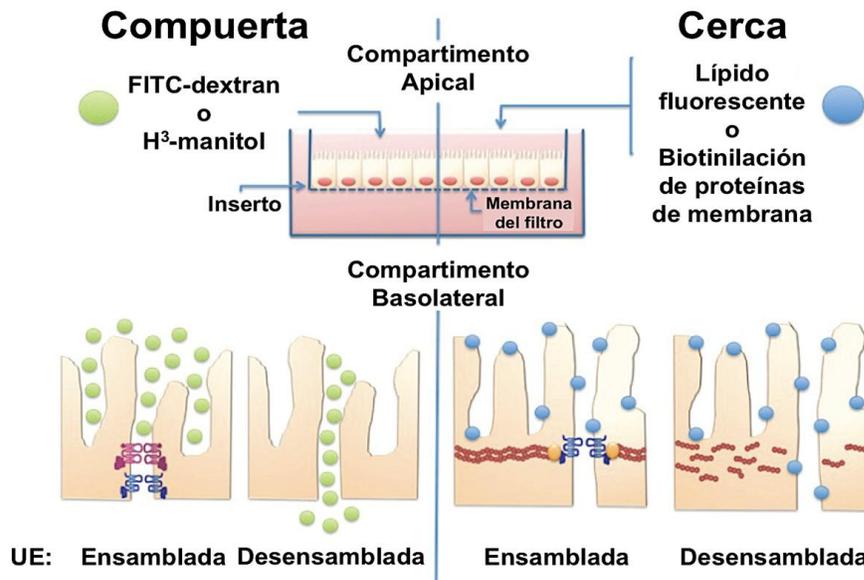


Figura 14. La UE funciona como una compuerta paracelular y una cerca membranaral. La función de compuerta se evalúa al medir el tránsito de moléculas por la ruta paracelular, del compartimento apical hacia la basolateral o viceversa. La función de cerca se evalúa mediante el movimiento de lípidos o proteínas en el plano de la membrana de la superficie apical a la basolateral y viceversa. Imagen tomada de (Gonzalez-Mariscal et al., 2012).

6.3 Composición molecular

Los componentes moleculares de la UE se dividen en 2 grupos: 1) proteínas integrales de membrana responsables de establecer el contacto célula-célula en el espacio intercelular, y 2) proteínas periféricas o adaptadoras, que forman un puente entre las proteínas integrales y el citoesqueleto de actina y sirven de plataforma para unir a múltiples proteínas de señalización [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2012)] (Figura 15).

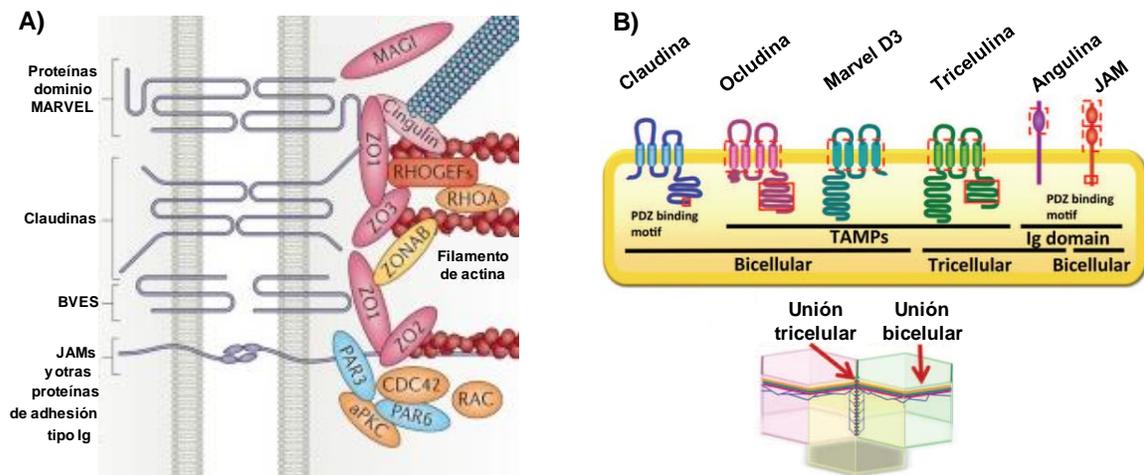


Figura 15. A) Esquema del complejo molecular de la UE. Las proteínas transmembranales de la UE (morado), incluyen a proteínas tetraspan con el dominio MARVEL tales como ocludina, tricelulina y MARVELD3; a las claudinas, y a las moléculas de adhesión con dominios de inmunoglobulinas (Ig) como las JAMs y las angulinas. Recientemente se identificó a la proteína BVES que atraviesa 3 veces la membrana en la región de la UE. Las proteínas periféricas que se unen al citoesqueleto (óvalos rosas), incluyen a las proteínas zonula ocludens (ZO), ZO-1, ZO-2 y ZO-3, cingulina y MAGI. Entre los componentes de señalización asociados a las UEs (óvalos naranjas) están la proteína cinasa C atípica (aPKC), las pequeñas RhoGTPasas CDC42, RAC y RHOA, y sus reguladores, los factores intercambiadores del nucleótido guanina para las GTPasas Rho (RhoGEFs, rectángulo rojo). Se observa también, la interacción de ZO-1 con el factor de transcripción ZONAB (óvalo amarillo). Imagen tomada de (Zihni et al., 2016). **B)** Distribución de las proteínas integrales de la UE en las uniones bicelulares y tricelulares. Panel superior, las claudinas y las proteínas TAMPs: Ocludina, MARVELD3 y tricelulina son proteínas de la UE que atraviesan 4 veces la membrana. Los dominios MARVEL se muestran en el recuadro con línea discontinua roja. Ocludina y tricelulina comparten una región de alta homología en su cola carboxilo terminal (recuadro de línea continua roja). Angulina y JAM son proteínas que atraviesan una sola vez la membrana y pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas (los dominios Ig se muestra en el recuadro con línea roja discontinua). Panel inferior, representación esquemática de la organización bicelular y tricelular de las UEs. La tricelulina y la angulina se concentran en las uniones tricelulares de la UE, presentes en la esquina donde tres células se encuentran, mientras que las restantes proteínas integrales de la UE están presentes en los bordes bicelulares. Imagen tomada de (Gonzalez-Mariscal et al., 2012).

6.3.1 Proteínas periféricas de la UE

Muchas proteínas citoplasmáticas de la UE poseen uno o múltiples dominios PDZs. Algunas proteínas de la UE como PAR6 contienen un solo dominio PDZ, mientras que otras como PATJ y MUPP1 contienen 10 o más dominios PDZs [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2012)].

6.3.1.1 Proteínas MAGUK de la UE

Las proteínas homólogas a la guanilato cinasa asociadas a membrana (MAGUK, por sus siglas en inglés), constituyen una familia de moléculas plataforma con dominios PDZs, un módulo SH3 y un dominio homólogo a la guanilato cinasa enzimáticamente inactivo (GUK) [Para revisión ver (Anderson, 1996; Gonzalez-Mariscal et al., 2000)]. Entre las proteínas MAGUK de la UE se encuentran las proteínas ZO-1, ZO-2 y ZO-3 que unen a las proteínas transmembranales de la unión con el citoesqueleto de actomiosina. Además ZO-1 y ZO-2 forman una plataforma para la polimerización de las claudinas en filamentos de la UE (Umeda et al., 2006). Las proteínas ZO se caracterizan por poseer 3 dominios PDZ. PALS1 es otro miembro de la familia MAGUK presente en las UEs pero solo tiene un dominio PDZ (Heinemann and Schuetz, 2019).

En la región citoplasmática de la UE, también se localizan las proteínas MAGUKs invertidas o MAGIs, que reciben este nombre porque en ellas la mayoría de sus dominios PDZ se localizan hacia el extremo carboxilo de la molécula. Las MAGI contienen 6 dominios PDZ, un módulo GK y dos dominios WW en lugar del dominio SH3. Los dominios SH3 y WW se parecen ya que ambos interactúan con motivos ricos en prolina [Para revisión ver (Gonzalez-Mariscal et al., 2012) (Figura 16)].

6.3.2 Proteínas integrales de la UE

Hay dos tipos de proteínas transmembranales en la UE: las que atraviesan una o cuatro veces la membrana. En las primeras están las JAMs y las angulinas que

pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), porque contienen dominios de Ig. Estos dominios son regiones de 55 a 75 aminoácidos separados por dos residuos de cisteína que funcionan como módulos de interacción proteína-proteína.

Las JAMs poseen 2 dominios de Ig (Martin-Padura et al., 1998) y las angulinas uno solo (Higashi et al., 2013; Masuda et al., 2011). Las JAMs además, contienen un motivo de unión a dominios PDZ en su extremo carboxilo terminal. Las JAMs y las angulinas no forman los filamentos de la UE, sino que actúan como puntos de referencia. Así, las angulinas definen las esquinas celulares para la formación de las UEs tricelulares (Furuse et al., 2012; Higashi et al., 2013), mientras que las JAMs son las primeras proteínas en aparecer en los sitios donde se ensamblarán las UEs bicelulares (Martin-Padura et al., 1998).

Las proteínas de la UE que atraviesan cuatro veces la membrana, son las claudinas y las TAMPs (Tight junction associated MARVEL proteins, por sus siglas en inglés). En este último grupo se encuentran la ocludina, la tricelulina y MarvelD3 [Para revisiones ver (Heinemann and Schuetz, 2019)]. Las TAMPs se caracterizan porque contienen un dominio Marvel que consta de 4 regiones transmembranales conservadas, que está presente en proteínas ubicadas en microdominios ricos en colesterol e involucradas en eventos de fusión y aposición de membranas (Sanchez-Pulido et al., 2002).

La ocludina, fue la primera proteína integral de la UE que se identificó y caracterizó (Furuse et al., 1993). Tiene 4 dominios transmembranales, dos asas extracelulares y tres dominios citoplásmicos constituidos por un asa intracelular corta, un dominio amino terminal corto y un dominio carboxilo terminal largo. El grado de fosforilación de la ocludina afecta el ensamble de la UE, la RET y la localización de la ocludina en la UE (Andreeva et al., 2001; Chen et al., 2002). Así, por ejemplo se ha visto que el ensamble de la UE inducido por el cambio de las células de un medio con bajo calcio a otro con 1.8 mM de Ca^{2+} , se acompaña de la fosforilación de la ocludina y su incorporación a la UE, mientras que la ocludina menos fosforilada se localiza en el citoplasma (Sakakibara et al., 1997).

La tricelulina se encuentra únicamente en las uniones tricelulares, y se requiere para reforzar la función de compuerta de las células epiteliales (Ikenouchi et al., 2005). La tricelulina tiene 4 dominios transmembranales y un dominio amino terminal más largo que el carboxilo terminal, ambos orientados hacia el citoplasma. MarvelD3 tiene un dominio amino largo similar al de tricelulina, pero a diferencia de esta posee un segmento carboxilo terminal corto. MarvelD3 se encuentra en las uniones bicelulares, pero no es capaz de formar UEs por sí misma, pero si puede compensar parcialmente la pérdida de ocludina o tricelulina. El silenciamiento de MarvelD3 no afecta la formación de las UEs, y en cambio, incrementa la RET (Raleigh et al., 2010; Steed et al., 2009).

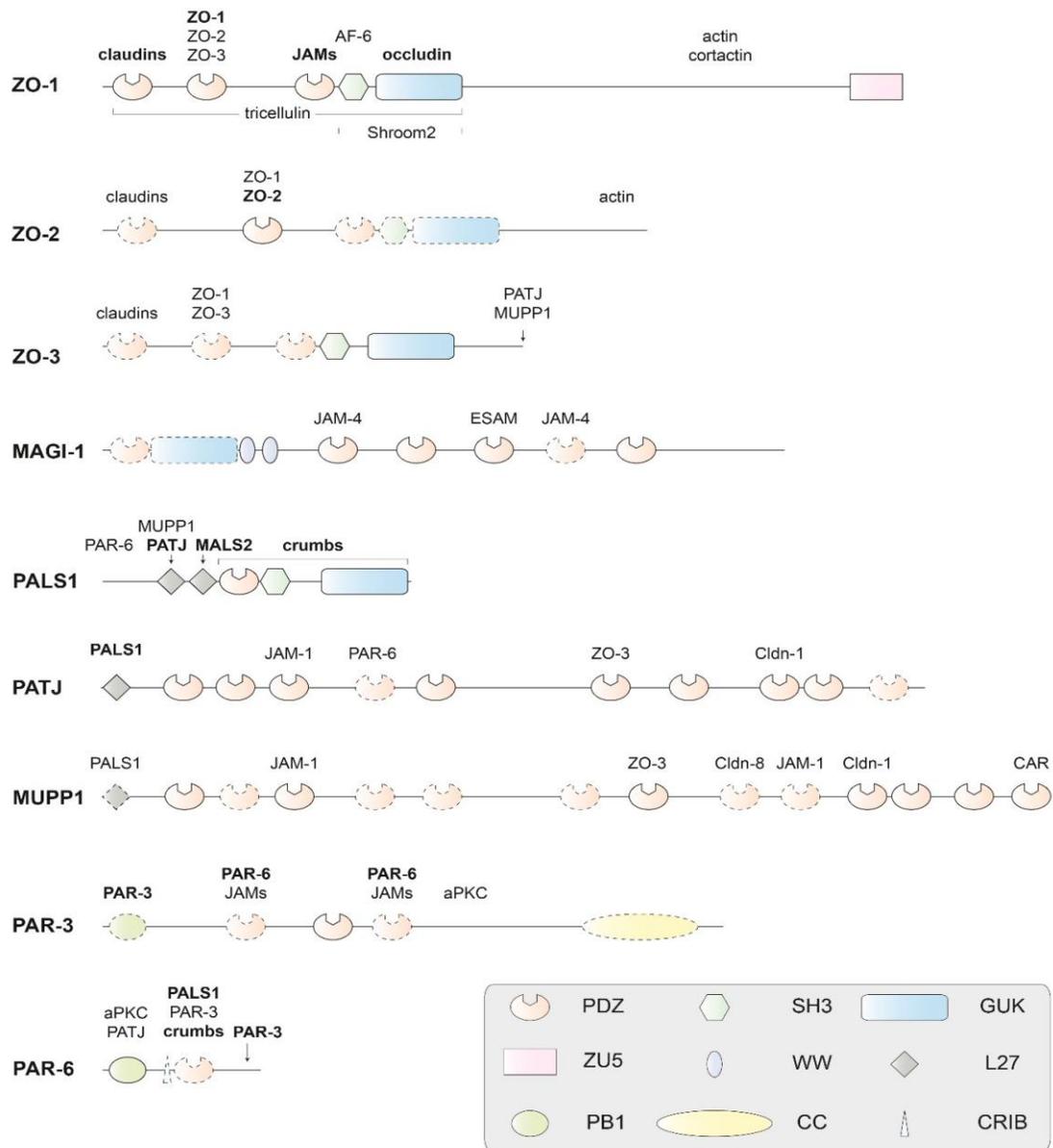


Figura 16. Proteínas periféricas de la UE con dominios de PDZ. En el esquema se indica también el nombre de algunas proteínas que interaccionan con distintos dominios de las proteínas de la UE con dominios PDZ. Imagen tomada de (Heinemann and Schuetz, 2019).

En la UE también está presente una proteína con 3 dominios transmembranales denominada BVES. Esta proteína pertenece a una familia cuyos

miembros contienen al dominio popeye. BVES bloquea la activación de RhoA y la actividad transcripcional de ZONAB/DbpA (Russ et al., 2011) (Figura 15).

7. Las claudinas

Las claudinas son proteínas integrales de las UEs con una estructura general de cuatro hélices transmembranales (TM1-4); una región amino-terminal corta, una porción carboxilo terminal intracelular larga, dos asas extracelulares (ECL1 y ECL2) y una asa intracelular corta. En los mamíferos se han caracterizado 27 claudinas con un peso molecular entre 21 a 34 kDa [Para revisión ver (Gunzel and Yu, 2013)]. Las claudinas se dividen en dos grupos [Para revisión ver (Krause et al., 2009)]: 1) Las clásicas, con secuencias muy conservadas como las claudinas 1-10, -14, -15, -17 y -19. 2) Las no clásicas con secuencias no conservadas como las claudinas 11-13, -16, -18 y 20-24 (Figura 17).

Las claudinas se expresan en todos los tejidos epiteliales. Algunas son ubicuas y aparecen en casi todos los epitelios, como las claudinas -1 y -3. Otras en cambio son específicas de ciertos tejidos, como la claudina-11 presente en las células basales de la estría vascular del oído (Gow et al., 2004), las células de Sertoli (Gow and Devaux, 2008; Gow et al., 1999) y en los oligodendrocitos (Morita et al., 1999a), o la claudina-5 presente en los endotelios y la barrera hemato-encefálica (Morita et al., 1999b; Nitta et al., 2003).

7.1.1 La primer asa extracelular de las claudinas determina la permeabilidad paracelular

La ECL1 contiene 42-56 residuos y es más larga que la ECL2 [Para revisión ver (Gunzel and Yu, 2013)]. Posee el motivo G-LW-CC que se conserva en la mayoría de las claudinas y con cuyas cisteínas se forma un puente disulfuro que estabiliza la conformación de la proteína (Angelow et al., 2008; Gunzel and Yu, 2013; Krause et al., 2015). En la segunda mitad de ECL1, se encuentran residuos cargados que permiten a las claudinas actuar como barreras o poros paracelulares y son

responsables de la selectividad iónica de las UEs (Colegio et al., 2002). La ECL1 también define el tamaño del poro paracelular (Li et al., 2013) (Figura 18).

7.1.2 La segunda asa extracelular de las claudinas participa en la interacción molecular entre claudinas y a ella se une la toxina CPE

La ECL2 tiene 25 aminoácidos (Krause et al., 2015) y no regula la permeabilidad paracelular [Para revisión ver(Gunzel and Yu, 2013)]. Esta asa interacciona en *trans* con las claudinas de la membrana celular opuesta (Piontek et al., 2008), y en *cis* con otras claudinas dentro de la misma membrana permitiendo su oligomerización (Suzuki et al., 2014).

La enterotoxina del *Clostridium perfringens* (CPE) que causa problemas gastrointestinales, se une a la ECL2 de las claudinas 1-4, 6-9 y -14 (Kimura et al., 2010; Winkler et al., 2009) y forma un complejo insoluble que permeabiliza a la membrana plasmática y lisa a la célula (McClane, 1994). La unión de CPE a las claudinas tiene un potencial terapéutico en el cáncer, ya que provoca la lisis de las células cancerosas de mama (Kominsky et al., 2004), próstata (Maeda et al., 2012) y ovario (Gao et al., 2011) que sobre-expresan a las claudinas -3 y -4 (Figura 18).

7.1.3 Cola citoplásmica carboxilo terminal de las claudinas

La región COOH- terminal de las claudinas es larga y diverge en secuencia entre las diferentes claudinas. Esta región es importante para la salida de la proteína del retículo endoplásmico y el tráfico a la UE (Arabzadeh et al., 2006). El extremo carboxilo terminal de todas las claudinas, con excepción de las claudinas -12, -22, -25 y -27, contiene un motivo de unión a dominios PDZ que permite a las claudinas interaccionar con diversas proteínas plataforma como ZO-1, ZO-2, ZO-3 (Itoh et al., 1999), MUPP1 (Hamazaki et al., 2002) y PATJ (Poliak et al., 2002).

La cola citoplasmática de las claudinas justo después del cuarto dominio transmembranal, contiene cisteínas que se pueden palmitoilar. Lo mismo sucede con la región del asa intracelular inmediatamente después del segundo dominio

transmembranal (Van Itallie et al., 2005). La cola citoplásmica de la mayoría de las claudinas contiene un gran número de sitios de fosforilación [Para revisiones ver (González-Mariscal L, 2010; Gunzel and Yu, 2013)]. La fosforilación en residuos de serina promueve la localización de las claudinas -1, -7 y -16 en la UE (Ikari et al., 2006; Simard et al., 2006; Tatum et al., 2007), mientras que la fosforilación en residuos de treonina en las claudinas 3-5, las remueve de la UE (D'Souza et al., 2005; D'Souza et al., 2007; Soma et al., 2004).

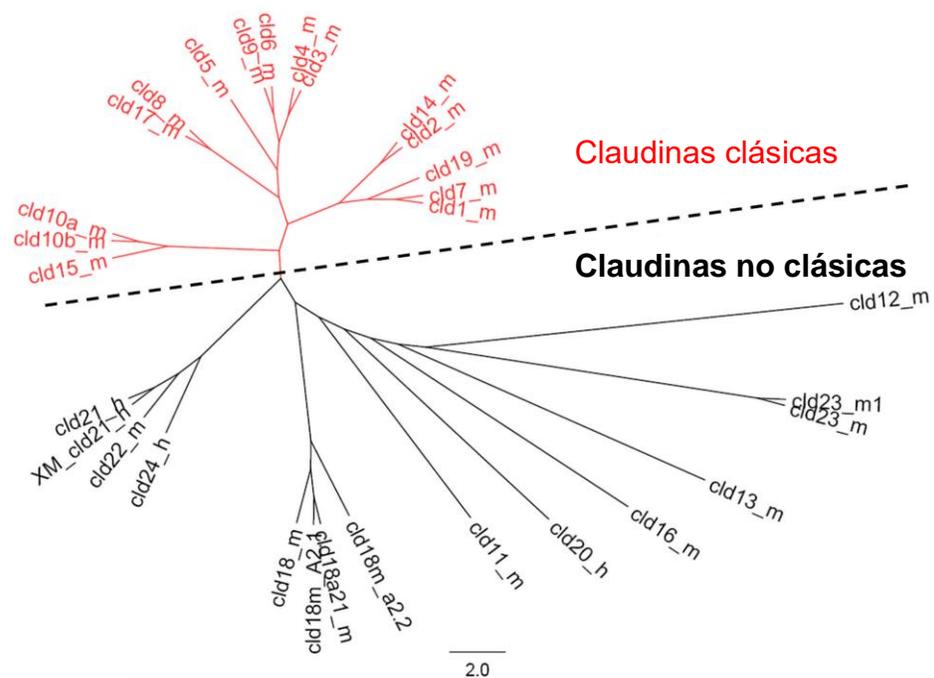


Figura 17. Árbol filogenético de las claudinas. Las claudinas clásicas 1-10, -14, -15, -17 y -19 que exhiben una alta similitud en su secuencia, se observan en color rojo. Las claudinas no clásicas 11-13, -16, -18 y 20-24, se indican en negro. Las claudinas -20, -21 y -24 solo se han descrito en humanos. Imagen tomada de (Krause et al., 2009).

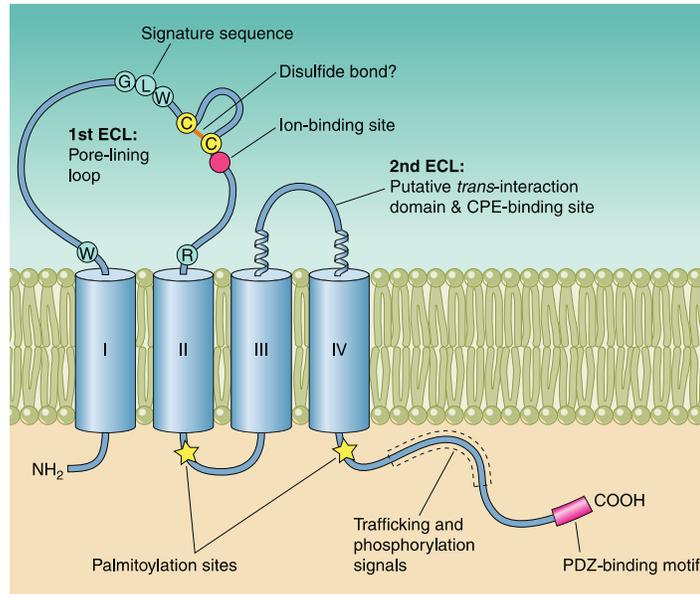


Figura 18. Modelo estructural de las claudinas. Se muestra la topología y estructura secundaria, así como los dominios funcionales de las claudinas. Los números romanos indican los dominios α -hélices transmembranales. Imagen tomada de (Gunzel and Yu, 2013).

7.2 Función de las claudinas

Se sabe que las claudinas son el componente principal de la UE porque su expresión en los fibroblastos L, los cuáles carecen de UE, induce la formación de los filamentos de UE que se observan por crio-fractura (Furuse et al., 1998a; Furuse et al., 1998b).

La palabra claudina, proviene del latín “*claudere*” que significa “cerrar” (Furuse et al., 1998a). Sin embargo, las claudinas también pueden actuar como poros o canales que disminuyen la RET y aumentan la permeabilidad paracelular (Angelow et al., 2008; Gunzel and Yu, 2013; Koval, 2013; Tsukita et al., 2019). La clasificación del efecto de una claudina sin embargo es algo arbitraria, pues depende también de las propiedades de las células. Así, la claudina-15 actúa como una barrera a Cl^- en las células MDCK II, pero como un canal de Na^+ en las células LLC-PK1, MDCK I y en el intestino de ratón. Otro ejemplo se observa con las claudinas -4, -8 y -11 que actúan como una barrera de Na^+ en las células MDCK II, pero como un poro de Cl^- en las células LLC-PK1 y en las células del ducto colector. Aún con estas circunstancias, en

general se puede decir que las claudinas -2, -10b, -15 y -16 actúan como canales catiónicos, mientras que las claudinas -7, -10a y -17 funcionan como canales aniónicos (Gunzel and Fromm, 2012). Además, la claudina-2 forma un poro paracelular de agua (Rosenthal et al., 2010). Así mismo, las claudinas -7 y -19 forman barreras aniónicas (Alexandre et al., 2005; Gunzel and Yu, 2013) mientras que las claudinas -1, -3, -4, -5, -6, -8, -9, -11 y -18 forman barreras catiónicas (Gunzel and Yu, 2013).

A continuación presento una descripción más profunda de las claudinas -1 y -10, ya que estas son motivo de estudio en esta tesis.

7.3 La claudina-1

La claudina-1 (Cl-1) se expresa en la mayoría de los tejidos del cuerpo (Furuse et al., 1998a) y actúa como una barrera que incrementa la RET (Grosse et al., 2012; Inai et al., 1999; McCarthy et al., 2000).

La piel es una barrera que protege al cuerpo de la pérdida excesiva de agua y la invasión de sustancias dañinas, como químicos y microorganismos. Está compuesta de tres capas: la epidermis, la dermis y el tejido subcutáneo. La capa más superficial es la epidermis que tiene la función de protección o barrera de la piel, ya que está formado de un epitelio escamoso multi-estratificado constituido a su vez por cuatro capas: basal, estrato espinoso, granular y córneo (Brandner, 2016). En la piel del ratón, la Cl-1 se localiza desde las células basales hasta las del estrato granuloso y es esencial para formar una barrera que evita la evaporación del agua. Por ello, los ratones KO de claudina-1 mueren por deshidratación a través de la piel en el periodo neonatal (Furuse et al., 2002).

En humanos la expresión de la Cl-1 disminuye en enfermedades de la piel, como la dermatitis atópica y la psoriasis (De Benedetto et al., 2011; Watson et al., 2007). Sin embargo, parece que en humanos la función de la claudina-1 en la piel puede ser parcialmente sustituida por otra claudina, pues los infantes con mutaciones que ocasionan la pérdida de función de la Cl-1, no mueren por deshidratación, sino por colangitis neonatal esclerosante asociada con ictiosis (Hadj-Rabia et al., 2004).

Esto indica que en humanos, la Cl-1 actúa también como una barrera en los ductos biliares intra-hepáticos que evita la fuga de las sales biliares al plasma (Grosse et al., 2012).

7.3.1 La claudina-1 en el cáncer

La expresión de las claudinas se altera en el cáncer y puede disminuir o aumentar dependiendo de la claudina en cuestión y del tejido [Para revisiones ver (González-Mariscal L, 2013; Gonzalez-Mariscal et al., 2007)]. Con respecto a la Cl-1, en el cérvix humano su expresión aumenta en las neoplasias intraepiteliales de grado I, II y III, y en los carcinomas *in situ* (Chen et al., 2003; Sobel et al., 2005b; Zinner et al., 2013), pero en cambio disminuye cuando la enfermedad progresa hacia un fenotipo invasivo (Sobel et al., 2005a).

La expresión de la Cl-1 disminuye también en el carcinoma colorectal agresivo (Ersoz et al., 2011; Suren et al., 2014) y en el cáncer gástrico (Jung et al., 2011; Wang and Yang, 2015). En este último (Tokuhara et al., 2015), así como en el carcinoma oral de células escamosas (Lourenco et al., 2010) y en el cáncer de tiroides (Tzelepi et al., 2008), la falta de la Cl-1 se asocia con tumores poco diferenciados. En los neoplasmas uroteliales papilares de bajo potencial maligno (PUNLMP, por sus siglas en inglés) y en el carcinoma de células uroteliales de bajo grado, disminuye la expresión de la Cl-1 en comparación a los neoplasmas uroteliales invertidos que tienen un comportamiento benigno (Szekely et al., 2011). La disminución en la expresión de la Cl-1 se emplea como predictor de recurrencia y menor supervivencia en los pacientes con cáncer colorectal (Jiang et al., 2017; Resnick et al., 2005; Shibutani et al., 2013), carcinoma hepatocelular (Bouchagier et al., 2014; Higashi et al., 2007), de tiroides (Tzelepi et al., 2008), y de próstata (Sheehan et al., 2007), en adenocarcinoma de pulmón (Chao et al., 2009), en cáncer de pulmón de células no pequeñas (Moldvay et al., 2017) y en PUNLMPs (Szekely et al., 2011). En el caso del cáncer de mama, la expresión de la Cl-1 se asoció inicialmente al tipo del cáncer basal que tiene el peor pronóstico (Blanchard et al., 2009; Kulka et al., 2009). Sin embargo, los estudios más recientes demostraron que

un fenotipo negativo de CI-1, implica un alto riesgo de recurrencia y muerte en el cáncer de mama triple negativo (Ma et al., 2014). En otros tipos de cáncer de mama, la pérdida total o parcial de la CI-1 también correlaciona con un incremento en el potencial maligno y la recurrencia de la enfermedad (Morohashi et al., 2007; Szasz et al., 2011).

También existen reportes en los que la CI-1 se sobre-expresa en ciertos tejidos cancerosos, incluyendo la neoplasia intraepitelial cervical de alto grado (Steinau et al., 2007) y el cáncer cervical invasivo (Vazquez-Ortiz et al., 2005), donde incluso se considera a la CI-1 como un biomarcador de la enfermedad (Benczik et al., 2016) con potencial pronóstico (Hoellen et al., 2017). La CI-1 también se sobre-expresa en los tumores colorectales (Grone et al., 2007; Kinugasa et al., 2010), el carcinoma mucoepidermoide de la glándula salival (Aro et al., 2011), el carcinoma papilar de tiroides, los microcarcinomas papilares y en las metástasis de nódulos linfoides (Nemeth et al., 2010), en el cáncer esofágico (Gyorffy, 2009; Montgomery et al., 2006), hipofaríngeo (Li et al., 2016; Li et al., 2015), y de lengua (Bello et al., 2008) y en el carcinoma oral de células escamosas (Babkair et al., 2016), donde la CI-1 contribuye a la invasión celular y a la recurrencia de la enfermedad (Sappayatosok and Phattarataratip, 2015). La expresión de la CI-1 en las células de los melanomas, promueve la secreción y activación de la metaloproteinasa 2 que aumenta la motilidad celular (Leotlela et al., 2007; Weeraratna et al., 2004) y regula la migración en el cáncer gástrico inducido por el factor de necrosis tumoral α (Shiozaki et al., 2014). La CI-1 pronostica una menor supervivencia de los pacientes con carcinoma de riñón (Fritzsche et al., 2008), cáncer gástrico de tipo intestinal (Huang et al., 2014), adenocarcinoma de pulmón (Sun et al., 2016) y cáncer de células de pulmón no pequeñas en etapa N2 (Zhang et al., 2013a).

La localización de la CI-1 también se altera en las células cancerosas. Así, en el cáncer colorectal, la señal de la CI-1 en la membrana disminuye, en comparación con los tejidos sanos adyacentes, mientras que en los tejidos cancerosos aumenta la marca de la CI-1 en el citoplasma (Hahn-Stromberg et al., 2017). De forma similar, en el carcinoma folicular de tiroides, la marca de la CI-1 se pierde en la membrana, y en

cambio aumenta en el núcleo, lo que se acompaña de un incremento en la migración celular y la invasión (Zwanziger et al., 2015). Con estas observaciones podemos concluir que en la mayoría de los cánceres humanos, la expresión y localización de la Cl-1 se altera en comparación con el tejido normal.

7.4 La claudina-10

La claudina-10 (Cl-10) se expresa en los túbulos terminales de la glándula submandibular (Hashizume et al., 2004), en el epidídimo (Guan et al., 2005) y en el intestino delgado a lo largo del eje vellos-cripta (Inai et al., 2005). En el riñón, la distribución de la Cl-10 varía entre las especies. En las vacas, se expresa en el túbulo proximal y en la porción gruesa del asa ascendente de Henle (Ohta et al., 2006), mientras que en el ratón, se observa en el asa de Henle en la porción delgada descendente y en la porción gruesa ascendente (Kiuchi-Saishin et al., 2002). En cambio en el ratón, la Cl-10 se expresa a lo largo de toda la nefrona, con excepción del glomérulo (Van Itallie et al., 2006).

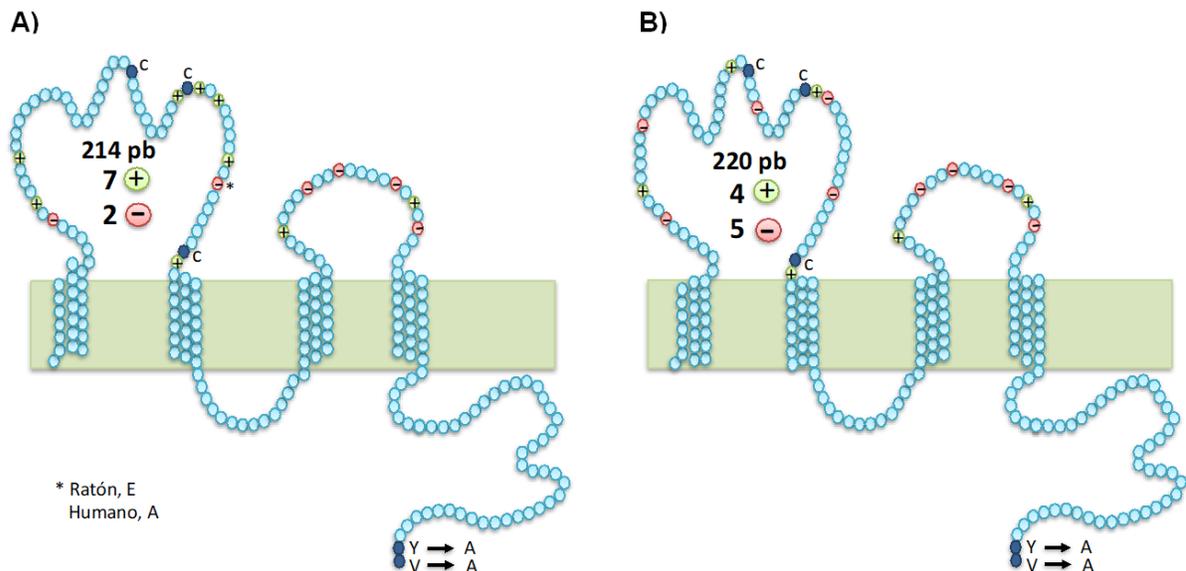


Figura 19. Predicción de la topología de membrana de la claudina-10. Topología de membrana de las claudinas -10a (A) y -10b (B) predicha por la base de datos UniProt. Se indican los residuos de cisteína de la primer asa extracelular (círculos negros) y los aminoácidos con carga de las dos aspas extracelulares (+, -). Imagen modificada de (Gunzel et al., 2009).

Aunque existen 6 isoformas de Cl-10 (Gunzel et al., 2009), las principales son las claudinas -10a y -10b. La isoforma -10a actúa como un canal aniónico, mientras que la -10b forma un canal catiónico. Las dos isoformas difieren en su primer exón. En ratones y humanos el exón 1a de la Cl-10 codifica a una secuencia de 214 pb, mientras que el exón 1b consta de 220 pb, por lo que la Cl-10b tiene dos aminoácidos más que la Cl-10a. A pesar de ser muy similares, las dos isoformas difieren con respecto a la carga eléctrica de su ECL1. La Cl-10a contiene 7 aminoácidos con cargas positivas y dos (ratón) o uno (humano) con carga negativa en su ECL1 lo que resulta en una carga neta positiva que permite el transporte de aniones. En cambio, la Cl-10b tiene cuatro aminoácidos con carga positiva y cinco aminoácidos con carga negativa en su ECL1, por lo que tiene una carga neta negativa que permite el transporte de cationes (Van Itallie et al., 2006) (Figura 19).

7.4.1 La claudina-10 en el cáncer

En el cáncer de mama (Tokes et al., 2012) y en el carcinoma del tracto biliar (Nemeth et al., 2009), la expresión de la Cl-10 disminuye en comparación con el tejido normal. Además, la expresión de la Cl-10 se correlaciona con la supervivencia de los pacientes con adenocarcinoma de pulmón. Así, su expresión es menor en el adenocarcinoma lepidico invasor en comparación con el adenocarcinoma de pulmón *in situ* (Zhang et al., 2013b).

Por lo contrario, el nivel de expresión del ARNm de la claudina-10 analizado por RT-PCR, se asocia con la recurrencia del carcinoma hepatocelular primario después de una hepatectomía curativa (Cheung et al., 2005). Así mismo, los tumores hepáticos de tipo III con un gran potencial maligno, exhiben un marcaje citoplásmico de la Cl-10 alrededor del núcleo (Sanada et al., 2007). En la tiroides, la Cl-10 no se expresa en el carcinoma folicular de tiroides, pero se sobre-expresa en el carcinoma papilar de tiroides (Aldred et al., 2004), donde la presencia de esta proteína sirve para discriminar a los tumores de las lesiones benignas tiroideas (Barros-Filho et al., 2015).

7.5 UEs en los epitelios multi-estratificados de la piel y cérvix

En los epitelios multi-estratificados, las UEs se forman en la capa superficial. Sin embargo, las distintas proteínas de la UE se localizan en diferentes capas a través de todo el epitelio multi-estratificado.

7.5.1 Distribución de proteínas de la UE en el epitelio multi-estratificado de la piel

En la epidermis, las UEs se forman en la penúltima capa de células del estrato granuloso y restringen el flujo de iones y moléculas de diferentes tamaños por la ruta paracelular (Basler and Brandner, 2017). En la piel humana, se expresa una amplia variedad de proteínas de la UE, incluyendo a las claudinas -1, -3, -4, -5, -7, -8, -10, -11, -12, -16 y -17, ocludina, ZO-1, cingulina, JAM-A, JAM-B, MUPP-1 y simplekina. Las claudinas -1 y -7, JAM-A y MUPP1 se expresan desde el estrato basal hasta el granuloso, sin embargo, la expresión de claudina -1 aumenta del sustrato basal al granuloso. La expresión de ocludina y la cingulina se restringe a las células del estrato granuloso, mientras que ZO-1, claudina -4 y simplekina, se localizan en los estratos espinoso y granuloso, pero su expresión aumenta en las capas más superficiales del estrato granuloso (Figura 20) (Basler and Brandner, 2017).

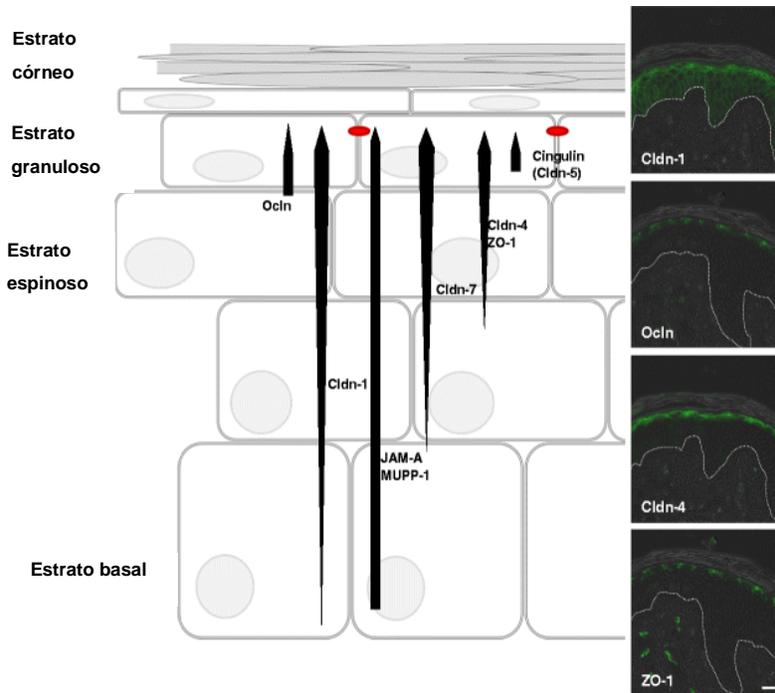


Figura 20. Distribución de las proteínas de la UE en el epitelio multi-estratificado de la piel humana. Imagen ilustrativa y cortes de tejido de piel humana vistos por inmunofluorescencia (Bäsler and Brandner 2017).

7.5.2 Distribución de proteínas de la UE en el epitelio multi-estratificado del cérvix humano

En el cérvix humano, las UEs se forman entre las células de la capa intermedia. Esto se demostró empleando como marcador paracelular a la IgG acoplada a Cy3. Además, se observó que JAM-A y -C, claudina-1, ZO-1 y E-cadherina, se localizan en el borde celular de las capas basales y suprabasales. En cambio, la expresión de ocludina es difusa en las capas basales y se intensifica en el borde celular del epitelio suprabasal (Figura 21) (Blaskewicz et al., 2011).

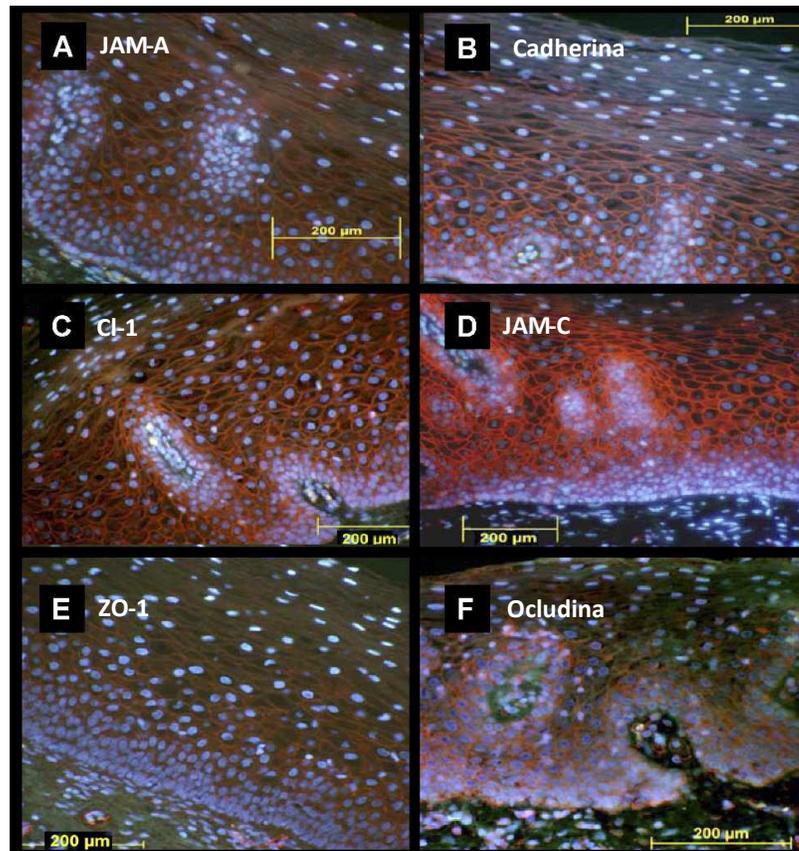


Figura 21. Distribución de las proteínas de la UE en el cérvix humano. Cortes de cérvix humano, vistos por inmunofluorescencia (Blaskewicz et al., 2011).

II. Objetivo de la tesis

Analizar en el cérvix del ratón transgénico K14E7 tratado o no con 17β -estradiol, posibles cambios en la expresión y localización de las claudinas -1 y -10 y la permeabilidad paracelular, y estudiar en un modelo epitelial *in vitro*, si la expresión de la oncoproteína E7 del VPH-16 altera la citoarquitectura, la capacidad invasiva, el grado de sellado de las uniones estrechas y la expresión de las claudinas -1 y -10.

III. Hipótesis

La oncoproteína E7 del VPH-16 y el 17β -estradiol, cambiarán la expresión de las claudinas -1 y -10 en el cérvix afectando la permeabilidad paracelular, y en el modelo epitelial *in vitro*, E7 provocará un cambio en la citoarquitectura, promoverá la capacidad invasiva de las células y modificará la expresión de las claudinas -1 y -10, así como la RET.

IV. Material y Métodos

1. Modelo murino y tratamiento hormonal

El ratón transgénico K14E7 fue donado generosamente por el Dr. Paul F. Lambert (Laboratorio McArdle para investigación del cáncer, Departamento de Oncología, Universidad de Wisconsin, Madison, E. U. A.). Los ratones K14E7 se retrocruzaron con ratones FvB, y se mantuvieron y usaron como heterocigotos en los experimentos. Se emplearon los ratones FvB cuyo nombre deriva de su susceptibilidad al virus B de la leucemia Friend, porque desarrollan con facilidad carcinomas de células escamosas. Además, tienen una capacidad reproductiva vigorosa y producen camadas de gran tamaño. Presentan también pronúcleos de gran tamaño en los ovocitos, lo que facilita la inyección de ADN. Por todas estas razones, son ideales para los estudios de murinos transgénicos (Taketo et al., 1991). Los ratones FvB se obtuvieron del Cinvestav. Las hembras FvB y K14E7 transgénicas, se alojaron en jaulas con filtro y se mantuvieron bajo ciclos de 12 hrs. de oscuridad-luz, con comida y agua a placer. Todos los animales empleados estaban en etapa de estro, lo que se verificó mediante frotis vaginal antes de que fueran sacrificados por dislocación cervical a los 2, 4 y 7 meses de edad. El tratamiento hormonal se realizó con tabletas de liberación continua que suministraron 0.05 mg de E₂ durante 60 días (Cat. SE-121, Innovative Research of America, Sarasota, FL). Las tabletas se implantaron sobre la piel dorsal de ratones hembras transgénicos y no-transgénicos de un mes de edad. Los ratones que se sacrificaron a los 4 meses de edad, recibieron dos tabletas de E₂, uno al primer mes de vida y el segundo al tercer mes de edad. Mientras que los ratones que se sacrificaron a los 7 meses de edad, recibieron una tableta adicional al quinto mes de vida.

2. Cultivo celular

Las células epiteliales MDCK se obtuvieron de la colección Americana de cultivos (ATCC, por sus siglas en inglés), (Cat. CCL-34, ATCC, Manassas, VA). Las células entre los pasajes 60 y 90 se cultivaron en botellas de plástico desechables, en una

incubadora a 36.5 °C con una atmósfera de 95 % de aire y 5 % de CO₂. Las células crecieron en medio basal Dulbecco modificado por Eagle (Cat. 12800-082, DMEM; GIBCO, Waltham, MA), con 100 U/ml de la mezcla penicilina-estreptomicina (Cat. A-01, In Vitro, Ciudad de México, México) y 10 % de suero fetal bovino (Cat. S1650-500, Biowest, Nuaille, France). Las células se cosecharon con tripsina-EDTA (Cat. EN-005, In Vitro, Cd. México, México). Las pruebas para micoplasma se hicieron con un estuche de detección por PCR convencional (Cat. 11-8005, Vector® Gem OneStep, Minerva Biolabs, Berlín, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3. Inmunofluorescencia

Se removió el tracto reproductor de los ratones hembras que contiene a la vagina, al cérvix y a ambos cuernos uterinos. El tejido se embebió en medio de montaje para tejidos congelados (Cat. 14020108926, Tissue Tek, Leica, Wetzlar, Alemania) y se almacenó a -70 °C por 24 hrs. Posteriormente, se realizaron cortes de tejido de 5-7µm de grosor en el criostato Leica MC1510 (Wetzlar, Alemania). Estos se montaron sobre portaobjetos cubiertos de gelatina, pre-congelados a -20 °C. Los portaobjetos con los cortes, se almacenaron a -70 °C por 24 hrs. Enseguida, los cortes se fijaron con etanol al 100% a -20 °C por 20 minutos, y el ensayo de inmunofluorescencia se hizo enseguida de acuerdo al protocolo previamente descrito por nosotros (Gonzalez-Mariscal et al., 2011). La inmunofluorescencia de las claudinas -1, -2, -4 y -10 en las células MDCK y MDCK-E7, se realizó siguiendo el protocolo previamente descrito (Gonzalez-Mariscal et al., 2011).

Para los experimentos de inmunofluorescencia en el cérvix de ratón y las células MDCK, se emplearon los siguientes anticuerpos primarios: de conejo contra claudina -1 (Cat. 51-9000, Invitrogen, Camarillo, CA; dilución 1:100) y claudina-10 (Cat. 38-8400, Invitrogen, Camarillo, CA; dilución 1:100). Además, en las células MDCK se usaron anticuerpos monoclonales de ratón contra la proteína E7 del papilomavirus humano 16 (Cat. Ab30731, Abcam, Cambridge, Reino Unido; dilución 1:100), anti claudina-2 (Cat. sc-293233, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, dilución 1:100) y anti claudina-4 (Cat. 32-9400, Invitrogen, Camarillo, CA; dilución 1:100). Como anticuerpos secundarios

empleamos de burro contra IgG de conejo acoplados a Alexa-Flúor 488 (Cat. A21206, Invitrogen, Camarillo, CA; dilución 1:500), contra IgG de ratón acoplados a Alexa-Flúor 594 (Cat. A21203, Invitrogen, Carlsbad, Santa Cruz, CA; dilución 1:1000), y contra IgG de conejo acoplados a Alexa-Flúor 594 (Cat. A21207, Invitrogen, Carlsbad, CA; dilución 1:1000). En las células parentales MDCK y MDCK-E7, la actina se detectó con faloidina rodaminada (Cat. P1951, Sigma Aldrich, San Louis, MO). Los portaobjetos se montaron con Vectashield con DAPI (Cat. H1200, Vector, Burlingame, CA).

Todos los anticuerpos empleados reaccionan con tejidos de ratón y perro de acuerdo a la información técnica de los fabricantes. Las dos excepciones son el anticuerpo monoclonal anti claudina-2 y el policlonal anti claudina-10, en los que los fabricantes no dan información sobre la reactividad en tejidos de perro. Sin embargo, el anticuerpo monoclonal anti claudina-2 se une a la región de los aminoácidos 29-80 de la claudina-2 humana y el análisis blast de la secuencia de esta región, reveló una identidad del 96 % y un 98 % de similaridad entre la claudina-2 humana y la de perro (dato no mostrado). Con respecto al anticuerpo policlonal anti claudina-10, previamente se usó exitosamente en las células MDCK (Gunzel et al., 2009).

4. Medición de la intensidad media relativa de la inmunofluorescencia

La medición de la intensidad media relativa de la inmunofluorescencia de las claudinas -1 y -10 en el cérvix de los ratones, y de las claudinas -1, -2, -4 y -10 en las células MDCK se obtuvo con el software ImageJ (ImageJ 1.52n, NIH, Bethesda, MD, USA, 2019) usando la función manual. Se utilizó la función de densidad integrada de ImageJ, para registrar la intensidad de los pixeles por área. Los datos se obtuvieron a partir de tres imágenes por condición.

5. Microscopía electrónica de transmisión

El tracto reproductor de las hembras FvB y transgénicas con la vagina, el cérvix y ambos cuernos uterinos, se removió de los animales de 2 y 7 meses de edad tratados o no con estrógenos. Posteriormente se cortaron discos de 1 mm de ancho,

de la región media del exocérvix. Las muestras se fijaron con 2.5 % (v/v) de glutaraldehído en 0.1 M de solución amortiguadora de cacodilato de sodio, pH 7.2, por 1 hr. Posteriormente, las muestras se incubaron por 60 minutos con 1 % (p/v) de tetróxido de osmio en la misma solución amortiguadora que además contenía 0.5 mg/ml de rojo de rutenio. En seguida, el tejido se deshidrató con concentraciones crecientes de etanol y óxido de propileno. Las muestras se embebieron en resina epoxy Polybed y se polimerizaron a 60 °C por 24 hrs. Los cortes finos (60 nm) se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron en el microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011.

6. Transfección estable de las células MDCK con la oncoproteína E7

Las células MDCK se transfectaron con 3 µg del plásmido pcDNA3E7 previamente descrito (Gutierrez et al., 2015), empleando lipofectamina 2000 (Cat. 11668019, Invitrogen, Camarillo, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para generar las clonas MDCK-E7 estables, después de 48 horas de la transfección, las células se tripsinaron, recolectaron y re-sembraron en placas de cultivo de 100 mm con DMEM que contenía G418 (800 µg/ml) (Cat. 11811-031, GibcoLife Technologies, Grand Island, NY). Después de 2-3 semanas, se seleccionaron las clonas resistentes y se re-clonaron manualmente con la técnica del anillo de clonación (McFarland, 2000). Las colonias estables se mantuvieron en presencia de 200 µg/ml de G418.

7. Amplificación de E7 por PCR

El ARN total se aisló de las células MDCK parentales y E7 con Trizol (Cat. 15596026, Invitrogen, Camarillo, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La pureza y concentración del ARN se midieron en el espectrofotómetro NANODROPTM ND-8000 (Cat. ND-8000-GL, Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, DE). La integridad del ARN se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %. El ADNc se sintetizó a partir del ARN con el estuche Super Script One-Step RT-PCR

y la ADN polimerasa platinum Taq (Cat. 10928042, Invitrogen, Camarillo, CA), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, en el termociclador Biometra GmbH Professional Basic Gradient (Cat. 070-601, Analytik, Jena, Germany). Las reacciones de PCR para VPH16 E7 se realizaron en un volumen final de 25 μ l que contenía: 1 μ g del templado de ARN, 0.2 μ M de los oligonucleótidos para VPH16 E7 diseñados de acuerdo a la secuencia del gen E7 en el GenBank (Número de acceso AF125673) (Adelante: 5'-CTCAGAGGAGGAGGATGAAATAG-3', reverso: 5'-CTGAGAACAGATGGGGCACAC-3'), 1 U RT/PlatinumTaq, 1.2 mM MgCl₂ y 200 μ M de dNTPs. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1.5 % y las imágenes se obtuvieron en geles con tinción de bromuro de etidio.

8. Western blot

La inmunodetección mediante Western blot de proteínas en los lisados de cérvix y las células MDCK, se hizo de acuerdo a un protocolo convencional previamente descrito (Gonzalez-Mariscal et al., 2011). En ambos tejidos, se emplearon como anticuerpos primarios policlonales de conejo anti claudina-1 (Cat. 51-900, Invitrogen, Camarillo, CA; dilución 1:500), claudina-10 (Cat. 38-8400, Invitrogen, Camarillo, CA; dilución 1:500) y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Cat. RPCA-GAPDH, Encor Biotechnology Inc., Gainesville, FL; dilución 1:40,000). Además en las células MDCK, se usaron anticuerpos primarios policlonales de conejo anti claudina-2 (Cat. 51-6100, Invitrogen, Camarillo, CA; dilución 1:1000) y claudina-4 (Cat. 36-4800, Invitrogen, Camarillo, CA; dilución 1:500), y un anticuerpo monoclonal de ratón anti actina (donado generosamente por el Dr. Manuel Hernández, Departamento de Biología Celular, Cinvestav, México). Como anticuerpos secundarios empleamos policlonales hechos en cabra contra IgG de conejo acoplados a peroxidasa (Cat. 6111620, Invitrogen, Camarillo, CA; dilución 1:20,000), o contra IgG de ratón acoplados a peroxidasa (Cat. 626520, Invitrogen, Camarillo, CA; dilución 1:10,000). La detección quimioluminiscente se hizo con el estuche Immobilon (Cat. WVKLS500, Millipore Corp., Billerica, MA).

Todos los anticuerpos empleados para Western blot, reaccionan con tejidos de ratón y perro de acuerdo a la información técnica de los fabricantes. La excepción fue el anticuerpo policlonal anti claudina-10, ya que el fabricante no otorga información sobre la reactividad en tejido de perro. Sin embargo, este anticuerpo previamente se usó exitosamente en las células MDCK (Gunzel et al., 2009).

9. Resistencia eléctrica transepitelial

Las células parentales y MDCK-E7 se cultivaron sobre insertos transparentes Transwell con membranas de poliéster y con un área de crecimiento de 1.12 cm² (Cat. 3460, Corning Inc., tamaño de poro 0.4 μ m, Kennebunk, ME). La RET de cada inserto se midió continuamente mediante el sistema de monitoreo celular automatizado CellZscope (nanoAnalyticsGmbH, Munster, Alemania). Los valores de RET se obtuvieron utilizando el software CellZscope, versión 1.5.0.

10. Ensayo de migración celular en matriz 3D

Las células MDCK y MDCK-E7 se cultivaron en multiplacas de 12 pocillos sobre insertos con una matriz de poliestireno (Cat. AVP005-12, Reinnervate, Sedgefield County, Durham, UK), recubierta con la matriz de membrana basal MatrigelTM (Cat. 356230, BD, San José, CA) a una concentración de 0.8 mg/ml como lo indica el fabricante. El medio de cultivo se cambió cada segundo día en los compartimentos superior e inferior de cada pozo. La migración de las células MDCK y MDCK-E7 se evaluó por inmunofluorescencia después de 10 días de cultivo. Las células se tiñeron con faloidina rodaminada (Cat. P1951, Sigma Aldrich, San Louis, MO) y los núcleos con DAPI. Las imágenes se tomaron en el plano z con el software Leica LAS AF versión 3.x. Se generó un código de profundidad en z de las series de imágenes.

11. Microscopía de fuerza atómica

La rigidez de la superficie apical de las células parentales y MDCK-E7, cultivadas en forma aislada o como islas, se analizó por microscopía de fuerza atómica (MFA) en el microscopio Solver Next (NT-MDT, Rusia). Para ello, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 %. El módulo elástico se midió con base en la desviación de la fuerza lateral (DFL, por sus siglas en inglés) como el desplazamiento de la viga volada vs la distancia. Se utilizó una viga volada de contacto CSG10, con un radio de curvatura de 10 nm. Las condiciones de escaneo para las células fueron: un tamaño de rampa de 80 μm para las islas y 50 μm para las células aisladas, con una ganancia de 0.18 y una velocidad de 0.3 Hz con 256 puntos. Los datos experimentales se analizaron con el software Image Analysis 3.5 de NT-MDT para determinar el módulo de Young's en kPa. El análisis teórico de las mediciones se basa en interacciones punta-muestra, al aplicar la ecuación de Euler-Bernoulli y las soluciones asintóticas del comportamiento de una punta oscilatoria cuando interacciona con una muestra.

V. Resultados

La expresión de la claudina-1 disminuye en el cáncer invasivo de cérvix del ratón transgénico K14E7 tratado con E_2

Exploramos por inmunofluorescencia la expresión de la Cl-1 en el epitelio multi-estratificado del cérvix de los ratones control FvB (Figura 22) y transgénicos K14E7 tratados o no con E_2 (Figura 23A). En el cérvix del ratón control FvB, la Cl-1 se localiza en el borde de las células y está presente desde la región suprabasal hasta la capa más superficial orientada hacia el lumen del cérvix. En esta zona la Cl-1 se expresa con mayor intensidad, mientras que en las células basales no se detecta. En los ratones de 4 y 7 meses de edad, aumenta la expresión de la Cl-1 en la capa basal. El tratamiento del ratón FvB con E_2 o la expresión de E7 en el ratón transgénico, no modifica este patrón de expresión. El análisis cuantitativo reveló que no hay modificación de la intensidad de inmunofluorescencia de la Cl-1 en el cérvix en

los ratones FvB de 2, 4 y 7 meses de edad con o sin tratamiento con E₂. En cambio, en los ratones transgénicos K14E7 de 2 meses de edad, se detectó un incremento en la expresión de la Cl-1 en comparación con el ratón FvB, FvB con E₂ y K14E7 con E₂ (Figura 23B). El análisis por Western blot de la Cl-1 en el cérvix de estos animales, confirmó un incremento en la expresión de la Cl-1 en los ratones K14E7 de 2 meses de edad en comparación a los ratones, K14E7 de 4 y 7 meses de edad, los ratones FvB de 2, 4 y 7 meses de edad sin E₂ y con los ratones K14E7 con E₂ de 2, 4 y 7 meses de edad (Figura 23C).

El tratamiento del ratón transgénico K14E7 con E₂ indujo el desarrollo progresivo de papilomas. En los ratones de 7 meses de edad, estos carcinomas se extienden hacia el estroma y en ellos la expresión de la Cl-1 disminuye en comparación con el resto del cérvix (Figura 24A y B).

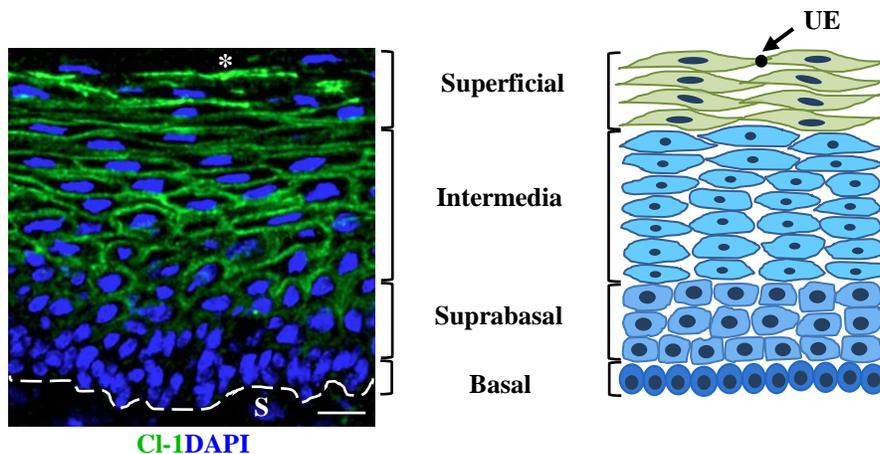
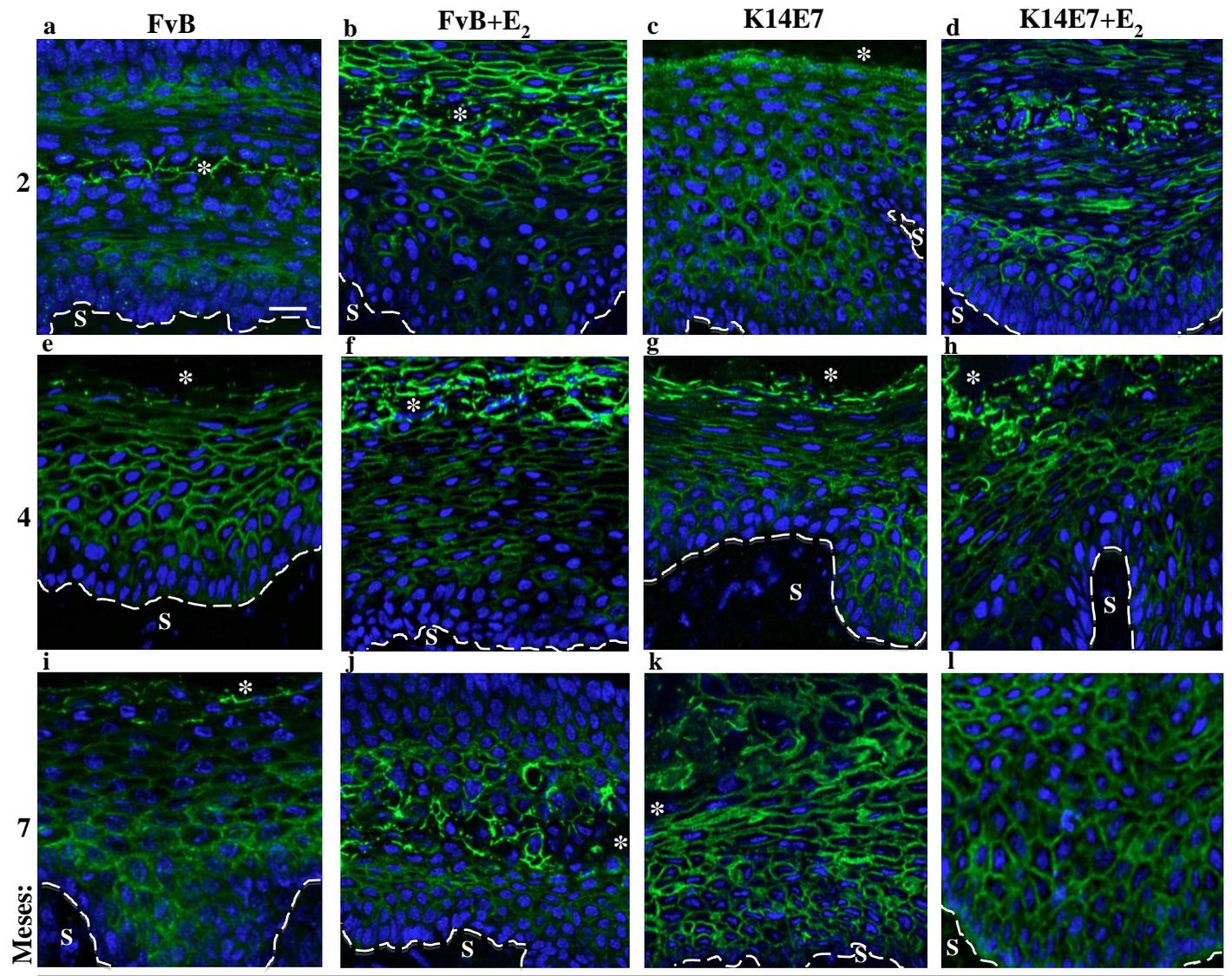


Figura 22. Inmunofluorescencia de la claudina-1 en el cérvix y esquema que ilustra las diferentes capas del tejido multi-estratificado del cérvix. Izquierda, tinción de claudina-1 en un corte congelado de cérvix de un ratón FvB de 2 meses de edad. Núcleo con marca de DAPI. La línea discontinua, delimita el borde entre las células basales y el estroma (S); *, lumen; barra, 15 μ m. Derecha, representación esquemática del cérvix multi-estratificado. UE, unión estrecha.

A



CI-1/DAPI

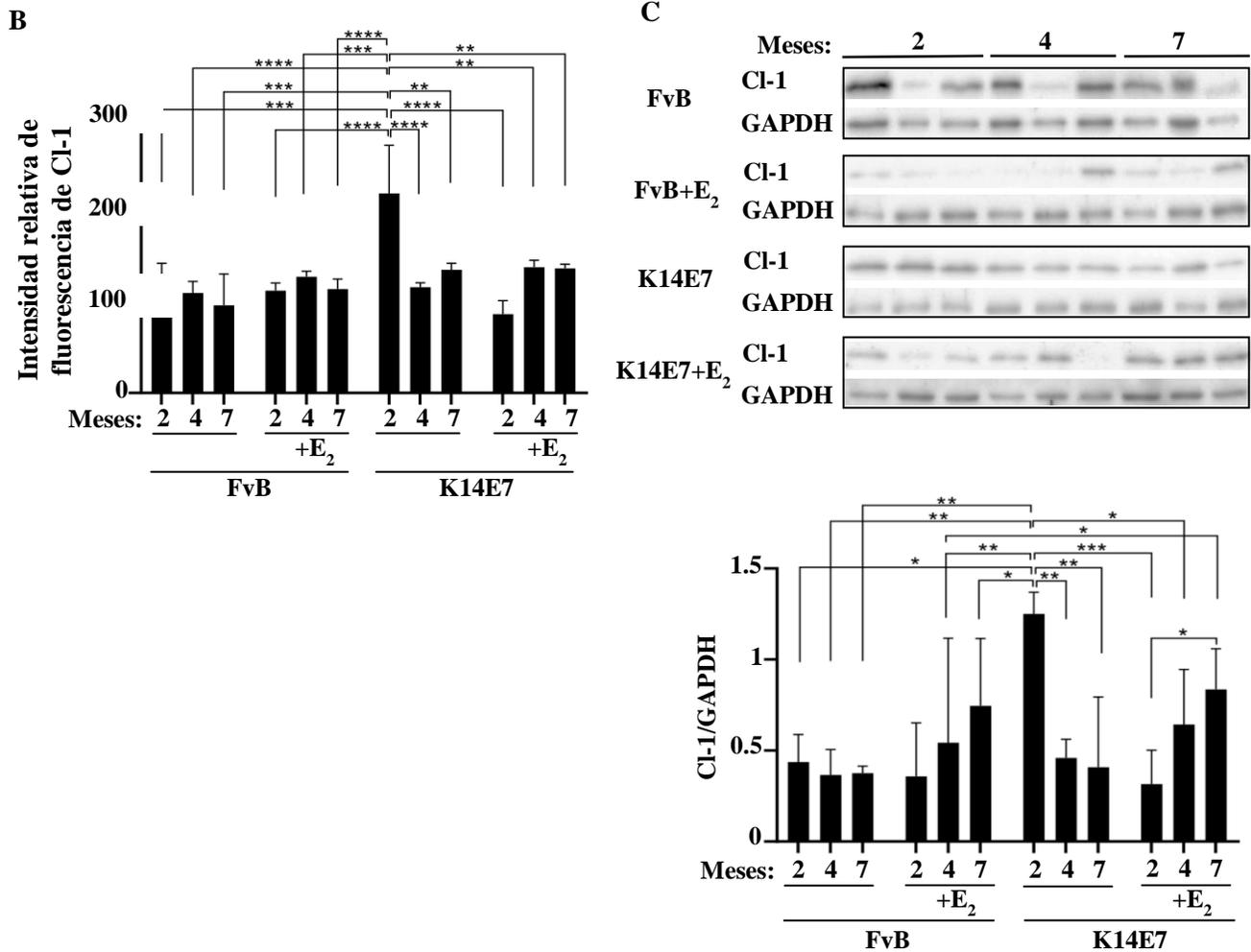
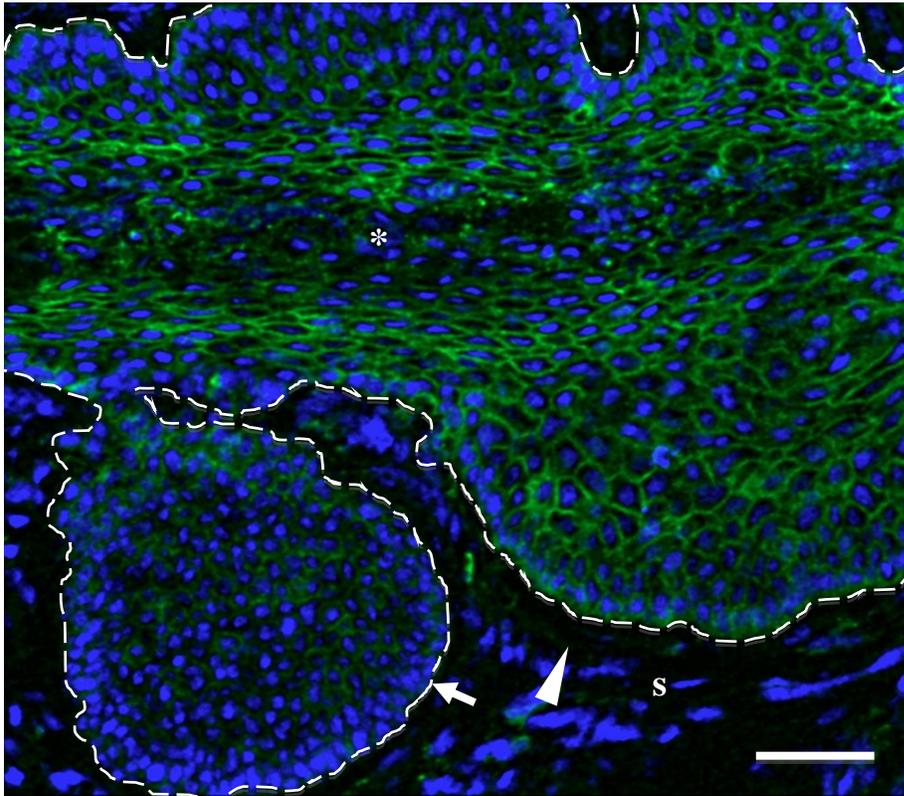


Figura 23. La proteína E7 aumenta la expresión de la claudina-1 en el cérvix de 2 meses de edad, mientras que el tratamiento con E₂ suprime este efecto. A) Los cortes congelados de cérvix de ratones control FvB y transgénicos K14E7, con o sin tratamiento con E₂ de 2, 4 y 7 meses de edad, se procesaron por inmunofluorescencia con un anticuerpo específico contra claudina-1 (Cl-1). Los núcleos se marcaron con DAPI. La línea discontinua delimita el borde entre las células basales y el estroma (S). *, lumen. Barra, 20 μ m. **B)** Medición de la intensidad media de la inmunofluorescencia de la claudina-1, obtenida de tres imágenes independientes por cada condición experimental. El análisis estadístico se realizó mediante Anova de 3 vías acompañada por la prueba multi comparativa de Tukey. Los resultados se muestran como la media \pm la desviación estándar. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. **C)** Panel superior, Western blot representativo de 3 experimentos independientes. La gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se empleó como control de carga. Panel inferior, análisis densitométrico de las inmunodetecciones. El análisis estadístico se hizo con la prueba de Anova de 3 vías acompañada de la prueba multi comparativa de Tukey. Los resultados se muestran como la media \pm la desviación estándar. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

A



CI-1DAPI

B

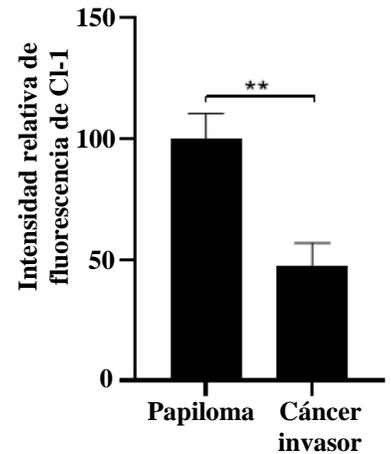
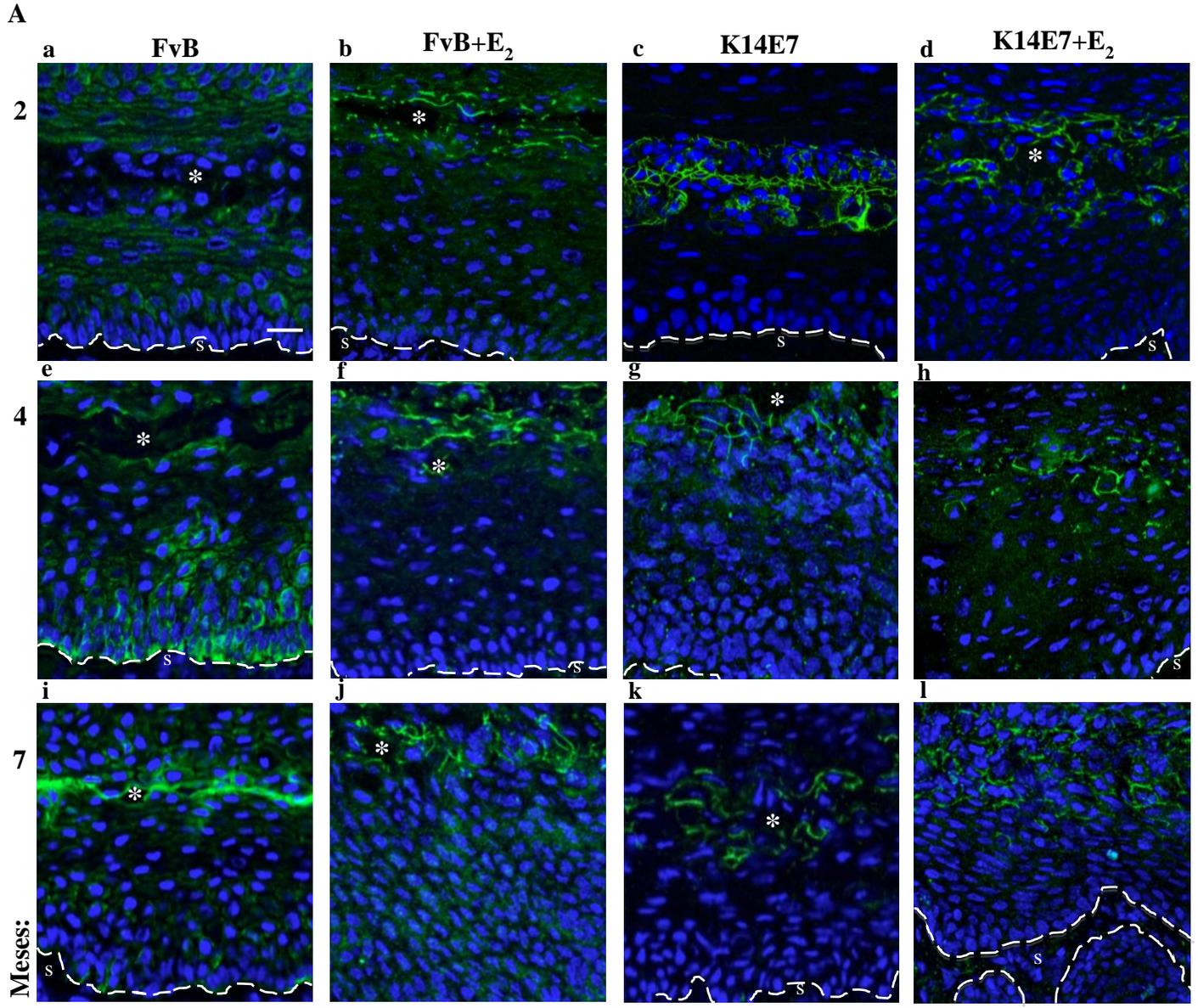


Figura 24. En el cáncer invasor la expresión de la claudina-1 se reduce en comparación al resto del cérvix. A) Cortes congelados de cérvix de ratones transgénicos K14E7 de 7 meses de edad tratados con E₂, procesados por inmunofluorescencia con un anticuerpo específico contra la claudina-1 (Cl-1). Los núcleos se marcaron con DAPI. La línea discontinua delimita el borde entre las células basales y el estroma (S). *, lumen del cérvix. Barra, 50 μm. Flecha, cáncer invasor, cabeza de flecha, papiloma. **B)** comparación de la intensidad media de la inmunofluorescencia de la claudina-1 en los papilomas invasores *versus* el resto del cérvix. Los datos se obtuvieron de 3 imágenes independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student. Los resultados se muestran como la media ± la desviación estándar. ***p*<0.01.

En los ratones FvB con E₂, y K14E7 tratados o no con E₂, la claudina-10 se concentra más tempranamente en el borde de las células superficiales del cérvix que en el ratón FvB

A continuación, analizamos la expresión de la Cl-10 en el cérvix de los ratones control FvB y transgénicos K14E7 tratados o no con E₂ (Fig. 25A). En el cérvix del ratón FvB de 2 y 4 meses de edad, por inmunofluorescencia la Cl-10 exhibe una distribución citoplásmica difusa desde las células basales hasta las superficiales. En cambio en el ratón de siete meses de edad, la Cl-10 se concentra en el borde de las células de la capa superficial. El tratamiento del ratón FvB con E₂, o la expresión de la oncoproteína E7 con o sin el tratamiento de E₂, concentra a la Cl-10 en el borde de las células superficiales, desde el segundo mes de vida. El análisis cuantitativo de la intensidad de inmunofluorescencia de la Cl-10, reveló una disminución en su expresión en el cérvix del ratón FvB tratado con E₂, de los 2 a los 7 meses de edad. La intensidad a la que disminuye la fluorescencia de la Cl-2 es similar a la que presenta el ratón K14E7 con o sin E₂ desde el segundo mes de vida (Figura 25B). El análisis por Western blot de la Cl-10 en el cérvix de estos animales, mostró que en los ratones FvB con o sin E₂ y en los ratones K14E7, disminuyó la cantidad de Cl-10 de los 2, a los 4 o a los 7 meses de edad, mientras que en los animales K14E7 tratados con E₂ la cantidad de la Cl-10 a los 4 y 7 meses de edad, disminuye en comparación a los ratones K14E7 de 2 meses de edad (Figura 25C).

En el ratón transgénico K14E7 de 7 meses de edad tratado con E₂, los papilomas que invaden al estroma, muestra una débil expresión de la Cl-10, similar a la que se observa en las capas inferiores del resto del cérvix (Figura 26A y B).



Cl-10DAPI

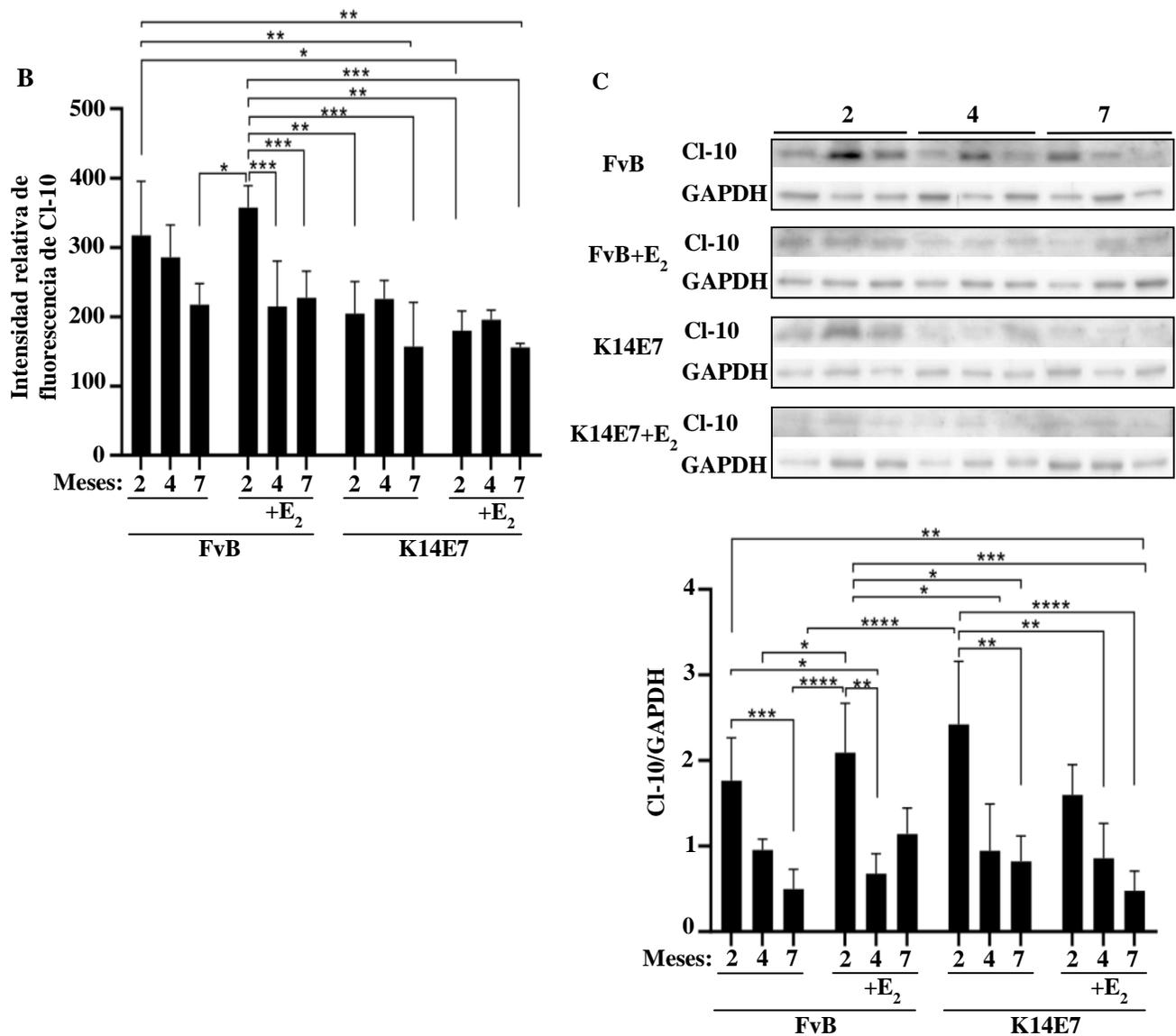


Figura 25. El tratamiento de los ratones control con E₂ o la expresión de E7 induce la concentración de la claudina-10 en el borde de las células superficiales del cérvix. **A)** Los cortes congelados de cérvix de los ratones control FvB y transgénicos K14E7, con o sin tratamiento con E₂, de 2, 4 y 7 meses de edad, se procesaron por inmunofluorescencia con un anticuerpo específico contra la claudina-10 (CI-10). Los núcleos se marcaron con DAPI. La línea discontinua delimita el borde entre las células basales y el estroma (S). Barra, 20 μm. *, lumen del cérvix. **B)** Medición de la intensidad media de la inmunofluorescencia de la claudina-10 obtenida de 3 imágenes independientes por cada condición experimental. El análisis estadístico se realizó mediante Anova de 3 vías acompañada por la prueba multi comparativa de Tukey. Los resultados se muestran como la media ± la desviación estándar. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. **C)** Panel superior, Western blot representativo de 3 experimentos independientes. La gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se empleó como control de carga. Panel inferior, análisis densitométrico de las inmunodetecciones. El análisis estadístico se hizo con la prueba de Anova de 3 vías acompañada de la prueba multi comparativa de Tukey. Los resultados se muestran como la media ± la desviación estándar. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

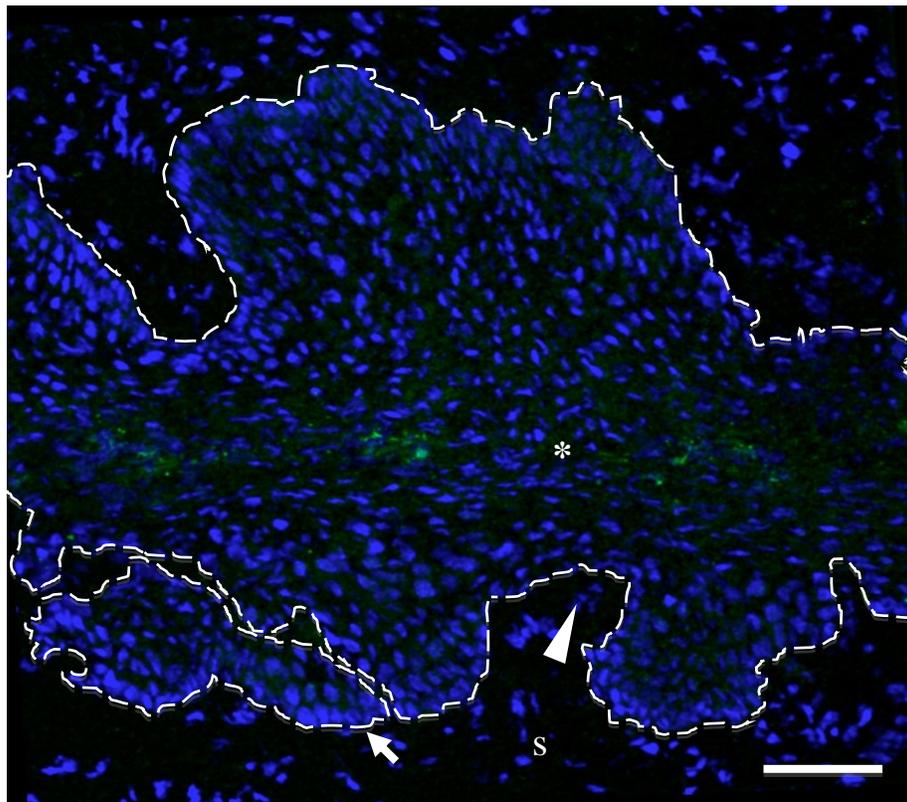
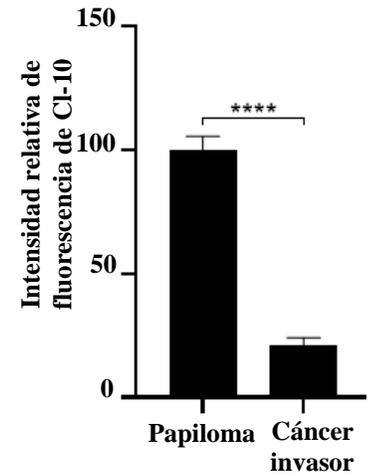
A**CI-10DAPI****B**

Figura 26. En el cáncer invasor la expresión de la claudina-10 es débil y similar a la que se presenta en las capas inferiores del cérvix. **A)** Cortes congelados de cérvix de ratones transgénicos K14E7 de 7 meses de edad tratados con E₂, procesados por inmunofluorescencia con un anticuerpo específico contra claudina-10 (CI-10). Los núcleos se marcaron con DAPI. La línea discontinua delimita el borde entre las células basales y el estroma (S). *, lumen del cérvix. Barra, 50 μ m. Flecha, cáncer invasor, cabeza de flecha, papiloma. **B)** comparación de la intensidad media de la inmunofluorescencia de la claudina-10 en los papilomas invasores *versus* el resto del cérvix. Los datos se obtuvieron de 3 imágenes independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student. Los resultados se muestran como la media \pm la desviación estándar. **** $p < 0.0001$.

La apertura de las UEs en las células superficiales del cérvix se induce por E₂, o de una manera más significativa por la expresión de E7

Enseguida analizamos si los cambios en la expresión de las claudinas -1 y -10, se acompañan de un incremento en la permeabilidad paracelular del cérvix. La figura 27A muestra un corte semi-fino del cérvix de un ratón de 2 meses de edad, donde el rojo de rutenio se encuentra en el lumen en contacto con la superficie apical de las células superficiales del epitelio escamoso multi-estratificado. Posteriormente, por microscopía electrónica de transmisión observamos en los cortes finos, que el cérvix de los ratones FvB de 2 meses de edad es impermeable al marcador electrodenso rojo de rutenio, y que esta condición se mantiene a los 7 meses de edad (Figura 27Ba y e). Contrario a ello, en los ratones FvB de 2 y 7 meses de edad tratados con E₂, el 29 y 36 % de las UEs son permeables al rojo de rutenio, respectivamente (Figura 27Bb y f). Estos porcentajes se incrementaron en los ratones transgénicos K14E7 de 2 y 7 meses de edad a un 67 y 55 %, respectivamente (Figura 27Bd y h).

Por lo tanto, concluimos que el incremento en la permeabilidad de la UE en el cérvix, correlaciona con la concentración de la claudina-10, que funciona como un canal o poro paracelular en las capas más superficiales del cérvix, que se detectó desde el segundo mes de edad en los ratones FvB tratados con E₂ y en los K14E7 con y sin E₂.

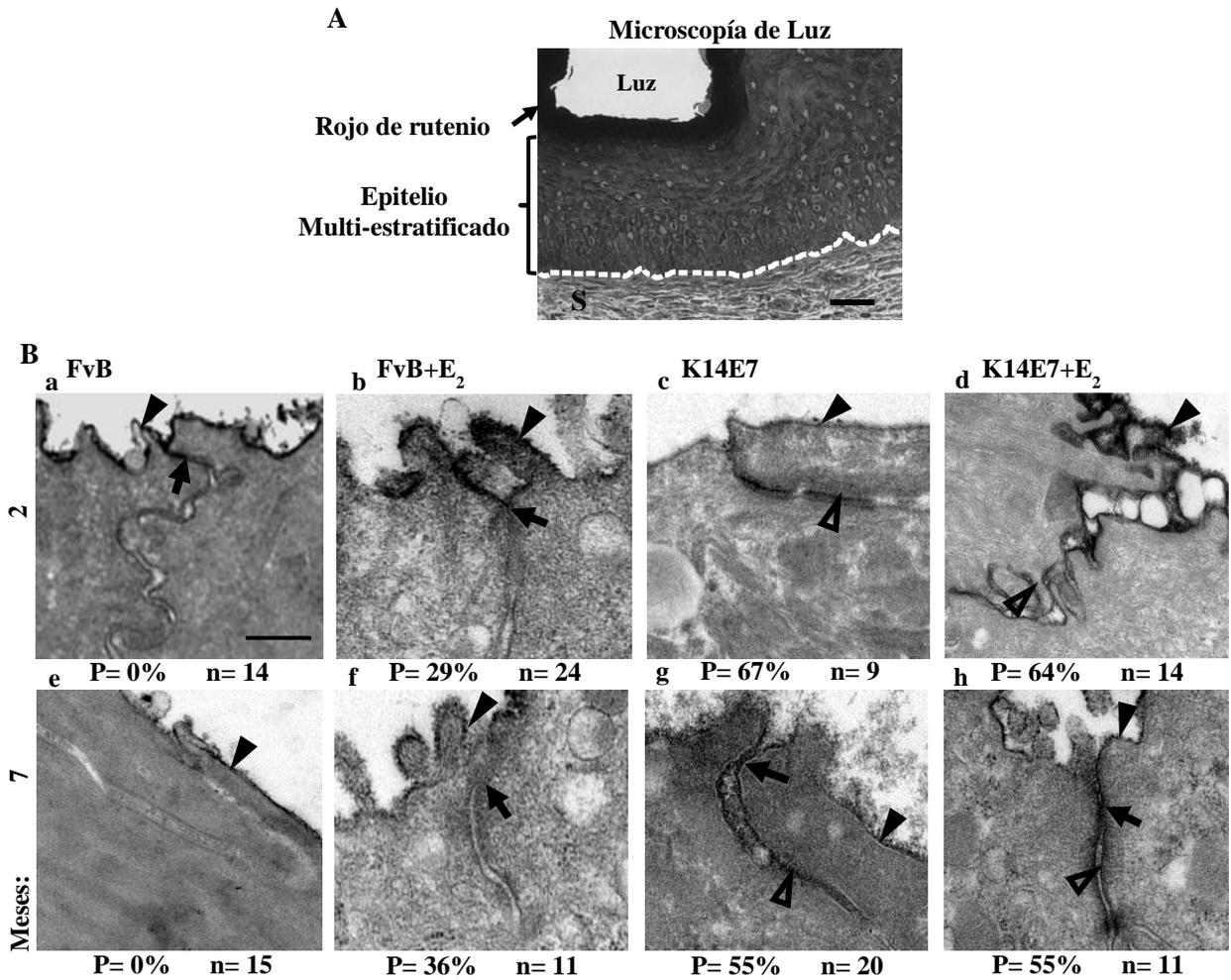


Figura 27. El tratamiento con E₂ y más aún la expresión de E7, inducen la apertura de las UEs en el cérvix. A) Corte semi-fino del cérvix de un ratón FvB de 2 meses de edad, que se trató con rojo de rutenio. La línea discontinua delimita el borde entre las células basales y el estroma (S). Barra, 25 μ m. **B)** Microscopía electrónica de transmisión de cortes finos del cérvix teñidos con rojo de rutenio, de ratones FvB y transgénicos K14E7 de 2 y 7 meses de edad, tratados o no con E₂. En los ratones FvB de 2 y 7 meses de edad, el rojo de rutenio marca la superficie apical de las células de la capa superficial del epitelio multi-estratificado del cérvix. La tinción de rojo de rutenio no aparece en la ruta paracelular, por debajo de la UE. En el ratón FvB tratado con E₂ y en el ratón K14E7 con o sin el tratamiento con E₂, un cierto porcentaje de células de la capa superficial del cérvix tiene tinción de rojo de rutenio a lo largo de la ruta paracelular. Barra, 250 nm; cabezas de flechas rellenas, tinción de rojo de rutenio en la superficie apical; flechas, UEs; cabezas de flecha vacías, tinción de rojo de rutenio en la ruta paracelular entre las células adyacentes. P, UEs permeables, n, número de observaciones.

La expresión estable de E7 altera la arquitectura de las monocapas epiteliales de células MDCK

Para entender mejor la importancia de la oncoproteína E7 del VPH-16 en la transformación epitelial, transfectamos una construcción de E7 en las células epiteliales MDCK. Esta línea celular se caracteriza por presentar UEs bien desarrolladas (Gonzalez-Mariscal et al., 1985), y se ha empleado con frecuencia para ver el efecto de diversos virus y proteínas virales en las UEs (Hernandez-Monge et al., 2013; Nava et al., 2004; Ramirez et al., 2018).

La figura 28A revela mediante RT-PCR, la expresión de E7 en las clonas 1 y 5 de las células MDCK-E7, pero no en las células parentales MDCK. Como ambas clonas de MDCK-E7 mostraron un mismo nivel de expresión de E7, en los experimentos posteriores solamente trabajamos con la clona 5. La figura 28B, muestra por inmunofluorescencia que las células MDCK-E7 exhiben una tinción difusa de E7 y que esta señal no se presenta en las células parentales MDCK. En las imágenes de microscopía de luz de los cortes semi-finos, se observa que las células MDCK-E7 crecen de forma anormal ya que algunas células están encima de otras y el espacio paracelular se ensancha (Figura 28C).

Estas observaciones se confirmaron por microscopía electrónica de transmisión (Figura 28D).

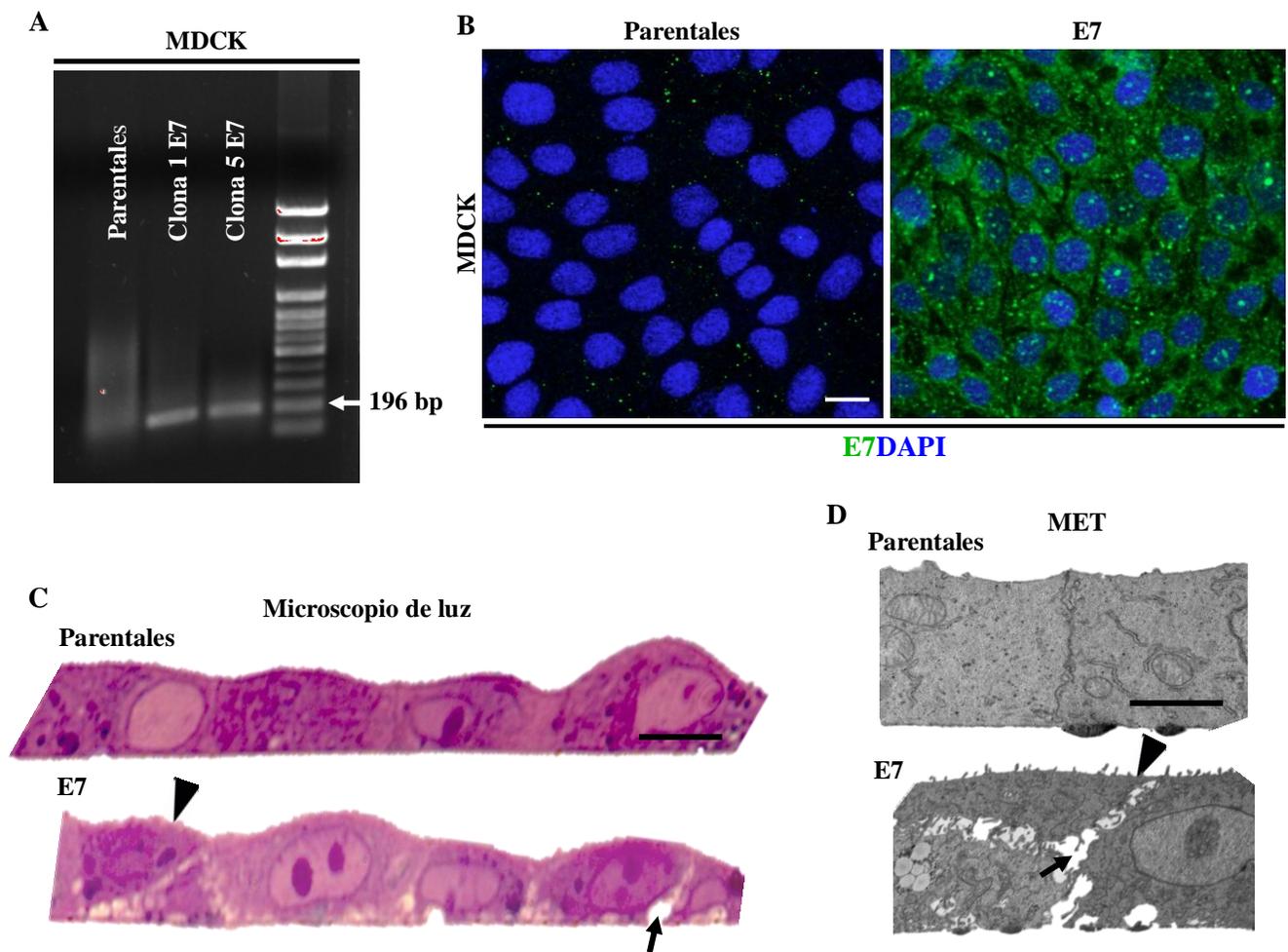


Figura 28. La oncoproteína E7 del VPH16 altera la citoarquitectura epitelial. **A)** E7 se detectó mediante RT-PCR en las clonas de las células MDCK donde se transfectó a E7 del VPH16 de manera estable (MDCK-E7), pero no en las células MDCK parentales. **B)** La proteína E7 da una tinción moteada en el citoplasma de las células MDCK-E7. Las células MDCK-E7 y las parentales se procesaron por inmunofluorescencia con un anticuerpo específico contra E7. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra, 10 μm . **C)** Imágenes de microscopía de luz de cortes semi-finos de las células MDCK-E7 y parentales. Cabeza de flecha, células que crecen encima de otras; flecha, amplio espacio paracelular. Barra, 10 μm . **D)** Microscopía electrónica de transmisión de cortes finos de las células MDCK-E7 y parentales. Cabeza de flecha, célula que crece encima de otras; flecha, amplio espacio paracelular. Barra superior, 500 μm ; barra inferior 2.5 μm .

En las células MDCK, E7 induce el desarrollo de un pico más alto de RET y modifica el patrón de expresión de las claudinas

Enseguida analizamos si la expresión de E7 en las células MDCK, modifica el desarrollo de la RET. Para ello, las monocapas confluentes de las células parentales y MDCK-E7 se transfirieron de un medio con calcio normal (NC, 1.8 mM Ca^{2+}) a otro con bajo calcio (LC, 1-5 μM Ca^{2+}) por 22 hrs. Posteriormente, estas monocapas sin RET (tiempo 0) se incubaron en un medio con calcio normal, para promover la formación *de novo* de las UEs y el desarrollo de la RET. La figura 29A muestra que las células MDCK-E7 alcanzaron un pico más alto de RET en comparación a las células parentales. Sin embargo, 40 hrs. después del cambio a calcio, cuando la RET se estabilizó, ambas líneas celulares mostraron valores similares de RET. A continuación, examinamos la expresión de las claudinas -1 y -10 en el pico de la RET obtenida después del cambio a calcio (18 hrs.). Además, exploramos la expresión de las claudinas -2 y -4, ya que la primera forma un poro catiónico paracelular (Amasheh et al., 2002; Van Itallie et al., 2003) que incrementa la permeabilidad de la UE (Van Itallie et al., 2003) y disminuye la RET (Furuse et al., 2001), y la Cl-4 ejerce un efecto opuesto, ya que funciona como una barrera en las células MDCK (Van Itallie et al., 2001). Mediante inmunofluorescencia observamos que en el pico de RET en las células MDCK-E7 en comparación con las células parentales, la expresión de las claudinas -1, -2 y -10 disminuye. Además, la claudina-2 desaparece del borde de las células y adquiere una distribución difusa en el citoplasma. En contraste, la expresión de la Cl-4 aumenta (Figura 29B y C). Estos resultados se confirmaron por Western blot (Figura 29D).

En conjunto, nuestros resultados sugieren que el pico más alto de RET observado en las células MDCK-E7, se debe a que se alteró la expresión de las claudinas.

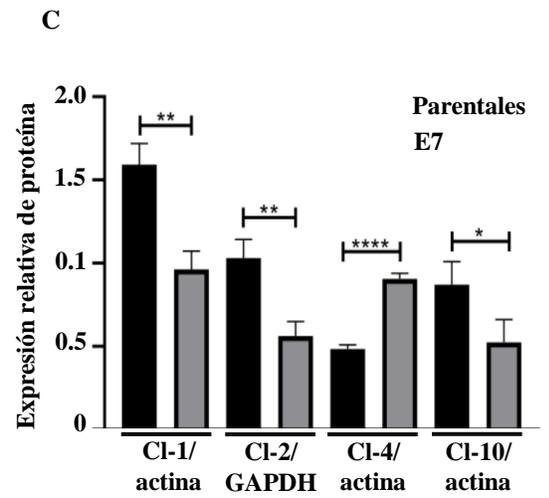
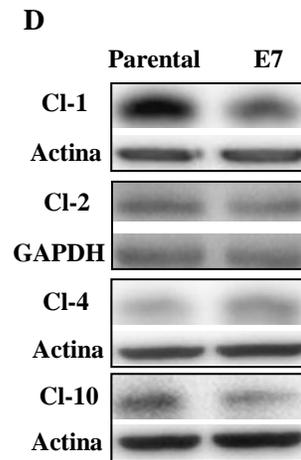
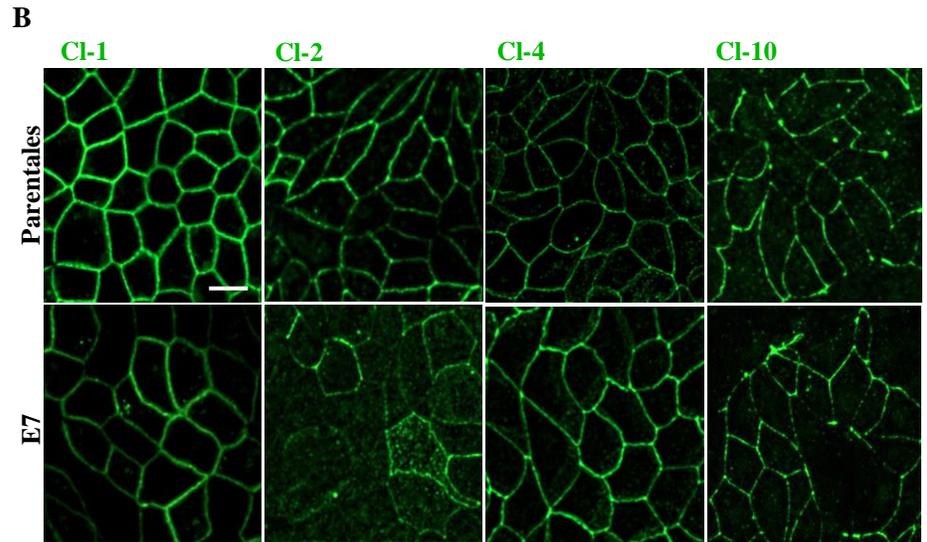
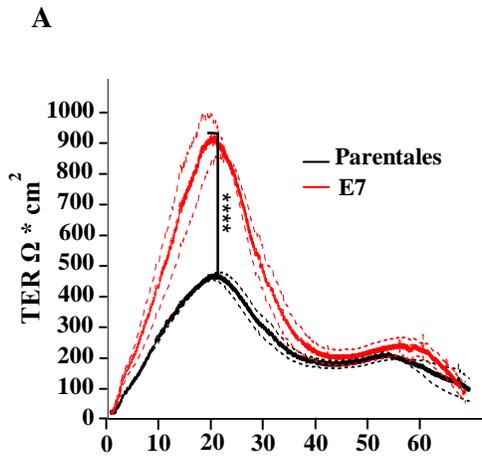


Figura 29. La expresión estable de E7 en las monocapas de células MDCK induce el desarrollo de un valor más alto de RET y produce cambios en la expresión de las claudinas. **A)** Las monocapas de células MDCK y MDCK-E7, se sembraron sobre insertos Transwell y se sometieron a un cambio a calcio. El desarrollo de la RET se midió con el sistema de monitoreo automatizado CellZscope. La gráfica presenta la media \pm la desviación estándar de 3 monocapas analizadas por condición. El análisis estadístico se realizó a las 18 hrs. con la prueba *t* de Student. **** $p < 0.0001$. **B)** Detección por inmunofluorescencia de las claudinas -1, -2, -4 y -10 en el pico de la RET (18 hrs.) en las células parentales y MDCK-E7. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Barra, 10 μm . **C)** Medición de la intensidad media de la inmunofluorescencia de las claudinas -1, -2, -4 y -10 en el pico de la RET (18 hrs.) en las células parentales y MDCK-E7. Los datos se obtuvieron de 3 imágenes de cada condición derivadas de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student. Los resultados muestran la media \pm la desviación estándar. **** $p < 0.0001$. **D)** Inmunodetección de las claudinas -1, -2, -4 y -10 en el pico de RET (18 hrs.) en las monocapas parentales y MDCK-E7. Panel izquierdo, inmunodetección representativa de al menos 3 experimentos independientes. La actina y el gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se emplearon como control de carga. Panel derecho, análisis densitométrico de las inmunodetecciones. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student. Los resultados muestran la media \pm la desviación estándar. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

La oncoproteína E7 promueve en las células MDCK la migración a través de una matriz 3D, endurece la superficie apical y promueve la formación de fibras de estrés

Posteriormente, analizamos si la presencia de E7 induce la migración de las células MDCK, ya que esta característica es necesaria para que las células cancerosas invadan el estroma subyacente y generen una metástasis. Al respecto, previamente se reportó que la expresión de la proteína E7 del VPH16 incrementa la migración celular, y que esto se acompaña por la sobre-expresión de las metaloproteinasas -1, -2 y -9 en las células cervicales (Zhu et al, 2015), y la inhibición de Rho y ROCK y la concentración de p27 en el citoplasma de los queratinocitos (Charette et al, 2007).

Empleamos un modelo *in vitro* en 3D, ya que este asemeja más la organización *in vivo* de los tejidos que los modelos 2D. Para este objetivo, las células MDCK y MDCK-E7 se sembraron sobre la plataforma Alvetex® cubierta con

Matrigel®. Ésta es un plataforma porosa e inerte de poliestireno con huecos que recrean los espacios en 3D y sobre la cual las células pueden crecer. La figura 30A muestra que las células MDCK migran a través de esta plataforma entre 20 y 30 μm , mientras que las células MDCK-E7 alcanzaron una profundidad de 50 μm , por lo que se concluye que E7 estimula la habilidad migratoria de las células MDCK.

Se ha visto que las células antes de que adquieran propiedades malignas, se vuelven más rígidas (Tavares et al., 2017). Por ello, medimos la rigidez de la superficie apical de las células parentales y MDCK-E7 mediante microscopía de fuerza atómica de nanoindentación estándar. La figura 30B muestra que la rigidez de la superficie apical de las células MDCK-E7 se incrementa en comparación a las células parentales. Sube 5.64 y 1.99 veces en las células individuales y en las islas celulares, respectivamente.

Ya que la rigidez de las células suele estar acompañada por la acumulación de fibras de estrés (Tavares et al., 2017), en seguida analizamos si E7 promueve la expresión de éstas. La figura 30C muestra la proliferación de fibras de estrés en las células MDCK-E7 en comparación con las células parentales MDCK.

En conjunto, estos resultados indican que la oncoproteína E7 promueve cambios en la célula característicos de la transformación celular.

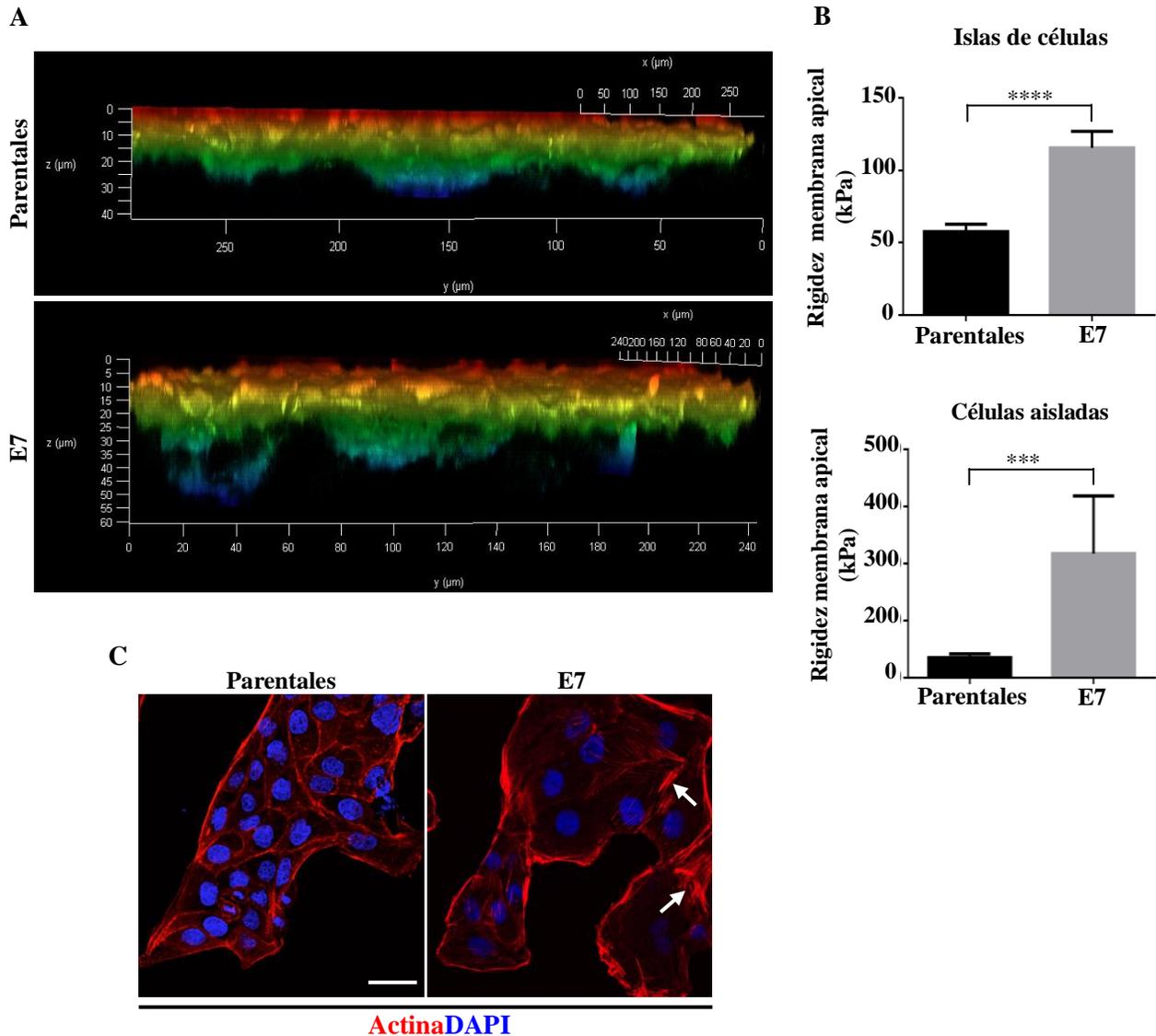


Figura 30. En comparación con las células MDCK parentales, las células MDCK-E7 migran más cuando se siembran sobre una plataforma en 3D, su superficie apical es más rígida y presentan más fibras de estrés. **A)** Las células MDCK parentales y E7 se sembraron en la parte superior de los insertos Alvetex®Scaffold, precubiertos con Matrigel™. Después de 10 días de cultivo, las células se tiñeron con faloidina rodaminada. Las imágenes se obtuvieron por microscopía confocal. Con el programa Leica LAS AF versión 3.x, se obtuvieron las series de imágenes en z, con un código de profundidad de rojo a azul. **B)** La medición de la rigidez apical, se hizo con el microscopio de fuerza atómica en células parentales y E7 cultivadas como células individuales o agrupadas en islas. El análisis estadístico se hizo con la prueba *t* de Student. Los resultados presentan la media \pm la desviación estándar. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. **C)** La expresión de las fibras de estrés (flechas) es mayor en las células MDCK-E7 que en las células parentales. Las células MDCK-E7 se tiñeron con faloidina rodaminada y DAPI, para el marcaje de las fibras de estrés y los núcleos, respectivamente. Barra, 30 μm .

VI. Discusión

En esta tesis observamos que en el cérvix del ratón FvB, la expresión de la Cl-1 es mayor en las células superficiales que se orientan hacia la luz. En cambio, la expresión de esta claudina aumenta en las células basales conforme la edad de los animales avanza de dos a siete meses. El tratamiento de los ratones FvB con E₂ o la expresión de E7 en el ratón transgénico no modificó este patrón de expresión. Sin embargo, en el cérvix de los ratones K14E7 de dos meses de edad se observó un incremento transitorio en la cantidad de Cl-1. En cambio, en los papilomas invasivos que se desarrollaron en los ratones K14E7 tratados con E₂ de siete meses de edad, la expresión de la Cl-1 disminuyó en comparación con el cérvix restante. Este resultado concuerda con observaciones hechas en otros cánceres, en los que la Cl-1 también disminuye (Ersoz et al., 2011; Lourenco et al., 2010; Sobel et al., 2005a; Suren et al., 2014; Tokuhara et al., 2015; Wang and Yang, 2015).

Con respecto a la Cl-10 en el cérvix de los ratones FvB, se observó que la expresión de esta proteína disminuye después de los dos meses de edad y que el tratamiento con E₂ o la expresión de la oncoproteína E7 con o sin el tratamiento de E₂, acelera su acumulación en el borde de las células superficiales desde el segundo mes de vida. El análisis cuantitativo de la fluorescencia muestra una disminución de la Cl-10 en los ratones K14E7 con o sin tratamiento de E₂ a los 2 meses de vida, sin embargo, este efecto no se confirmó por inmunodetección. También se observó que en los ratones transgénicos K14E7 tratados con E₂, la expresión de la Cl-10 es muy pobre en los papilomas que invaden al estroma.

Por otra parte, también observamos que el tratamiento de los ratones FvB con E₂, aumenta la permeabilidad de las UEs al rojo de rutenio. Sin embargo, este efecto es mayor en los ratones K14E7 tratados o no con E₂. Esto sugiere que tanto los E₂ y como la proteína oncogénica E7 abren las UEs. Al respecto, previamente demostramos que en la piel de los ratones FvB ovariectomizados y tratados con E₂, disminuye la expresión de las proteínas de la UE ocludina y ZO-2 (Hernandez-Monge et al., 2013). Cabe destacar, que en el cérvix de los ratones, el bloqueo paracelular al rojo de rutenio ocurrió en las células más superficiales, mientras que en el cérvix

humano las UEs que restringen la difusión de marcadores paracelulares, se localizan en la tercera o cuarta capa de células por debajo de la luz de la cavidad (Blaskewicz et al., 2011).

Después de realizar los experimentos en el cérvix del ratón transgénico, procedimos a analizar si la expresión de E7 altera las UEs e induce la transformación de las células epiteliales normales. Para ello, decidimos transfectar a E7 en una línea celular epitelial. No empleamos una línea celular de cérvix no-cancerosa de ratón, o de otro animal o de origen humano, ya que no hay alguna disponible. Empleamos en cambio a las células MDCK, porque esta línea celular es muy fácil de transfectar y es un excelente modelo *in vitro* para el estudio de las UEs, ya que las células están polarizadas, exhiben abundantes filamentos de UE y valores estables de RET. Comenzando con los estudios pioneros de Cereijido en 1978 (Cereijido et al., 1978), esta línea celular se ha empleado extensamente para analizar las propiedades eléctricas de las UEs y la permeabilidad paracelular (Martinez-Palomo et al., 1980; Meza et al., 1980), los cambios en la ultraestructura de la UE por la técnica de criofractura (Gonzalez-Mariscal et al., 1985), la composición molecular de las UEs (Van Itallie et al., 2003), así como la respuesta de las UEs a una amplia variedad de factores como la temperatura (Gonzalez-Mariscal et al., 1984), cationes (Gonzalez-Mariscal et al., 1990), la activación de rutas de señalización (Balda et al., 1991), toxinas (Sonoda et al., 1999) y factores de crecimiento (Garcia-Hernandez et al., 2015). Además, la función de las claudinas y en particular de las claudinas -1 (Inai et al., 1999), -2 (Van Itallie et al., 2011), -4 (Colegio et al., 2002) y -10 (Gunzel et al., 2009) han sido estudiadas extensamente en las células MDCK. Así mismo, el efecto de numerosos virus y proteínas virales sobre las UEs se han estudiado en estas células. Tal es el caso de la proteína E6 del papilomavirus (Hernandez-Monge et al., 2013), la proteína E4-ORF1 del adenovirus (Latorre et al., 2005), la proteína NS1 del virus de la influenza (Golebiewski et al., 2011), el virus dengue (Ramirez et al., 2018) el virus de la oveja Jaagsiekte (Johnson et al., 2010), la proteína v-Src (Toyli et al., 2010), el virus de fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (Connolly-Andersen et al., 2007), la proteína tumoral pequeña SV40 (Nunbhakdi-Craig et al., 2003), el rotavirus

(Svensson et al., 1991), y las proteínas NSP4 (Tafazoli et al., 2001) y VP8 (Nava et al., 2004) del rotavirus, la glicoproteína E del virus de la varicela zóster (Mo et al., 2000), el virus del sarcoma de Moloney (Rajasekaran et al., 1996), la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (Gottlieb et al., 1993), el oncogen ras del virus Kirsten (Schoenenberger et al., 1991), la hemaglutinina (Gravotta et al., 1990; Stephens et al., 1986; van Meer and Simons, 1986) y glicoproteínas del virus de la influenza (Roth and Compans, 1981), la proteínas gp70/p15E del virus de la leucemia murina (Stephens et al., 1986), el virus del simio 5 (Rindler et al., 1984), el virus del moquillo canino (Noyce et al., 2013) y el virus de la estomatitis vesicular (Rindler et al., 1984; Roth and Compans, 1981). Toda esta información contribuye a que la línea celular MDCK sea considerada un modelo ideal para el estudio del efecto de proteínas virales sobre las UEs.

Nosotros generamos una clona de células MDCK que expresa a E7 de manera estable. Observamos que en estas monocapas, el espacio intercelular entre las células adyacentes se ensanchó y aparecieron áreas de la monocapa donde unas células crecían por encima de las otras. Un fenotipo similar se observó en las monocapas de células MDCK que no expresan a la proteína de la UE ZO-2 (Hernandez et al., 2007; Raya-Sandino et al., 2017). Aunque nuestros resultados sugieren que la oncoproteína E7 daña a las UEs, cuando analizamos el desarrollo de la RET en las monocapas MDCK-E7, observamos que alcanzan una RET al pico más alta que las células parentales. Este resultado inesperado, nos llevó a explorar el patrón de expresión de las claudinas en el momento en que la RET alcanza su valor máximo. Así, encontramos que en este punto en las células MDCK-E7, la expresión de las claudinas-1, -2 y -10 disminuye, mientras que la Cl-4 aumenta. La alteración de un solo tipo de claudina puede modificar de manera significativa la permeabilidad y la RET de un tejido [para revisión ver, (Gunzel and Yu, 2013)]. Es particularmente importante el incremento en la expresión de la Cl-4 en las células MDCK-E7, ya que esta proteína funciona como una barrera catiónica y su transfección en las células MDCK, disminuye la permeabilidad e incrementa la RET (Van Itallie et al., 2003). La disminución en la expresión de la Cl-2 en las células MDCK-E7, también se espera

que tenga un efecto significativo sobre la RET, ya que esta claudina se expresa en los epitelios más permeables, como el túbulo proximal del riñón (Enck et al., 2001) y las criptas intestinales (Rahner et al., 2001), donde funciona como un poro de alta conductancia permeable a cationes (Amasheh et al., 2002; Furuse et al., 2001). La Cl-1 se expresa ubicuamente en los epitelios y forma una barrera que incrementa la RET (Inai et al., 1999; McCarthy et al., 2000). Por ello, la disminución de la Cl-1 en las células MDCK-E7, no se espera que contribuya al aumento de la RET observado. La Cl-10 también se expresa en muchos tejidos y mientras la Cl-10a actúa como poro aniónico (Van Itallie et al., 2006), la Cl-10b funciona como poro de cationes. La Cl-10a se restringe al riñón (Gunzel et al., 2009), mientras que en el resto de los tejidos, se expresa la Cl-10b. Sin embargo, con los anticuerpos empleados en este estudio, no se puede saber cuál de estas isoformas se expresa en el cérvix murino o en las células MDCK.

En las células MDCK encontramos que la expresión de E7 induce la migración celular a través de una matriz en 3D, endurece la membrana apical, promueve la aparición de fibras de estrés y cambia el patrón de expresión de las claudinas -1, -2, -4 y -10. Estos cambios en conjunto, sugieren que las células han desarrollado un fenotipo transformado. Con respecto al incremento en la migración celular y la alteración en la expresión de las claudinas, estudios previos muestran que en las células cancerosas, la migración celular aumenta tras la sobreexpresión de las claudinas -2 (Ikari et al., 2011), -4 (Hicks et al., 2016), -7 (Dahiya et al., 2011), -8 (Ashikari et al., 2017), -10 (Zhou et al., 2018), -11 (Li et al., 2018; Lin et al., 2013)-17 (Sun et al., 2018); ó al silenciar a la claudinas -3, -4 (Shang et al., 2012), -6 (Ren et al., 2013), -7 (Li et al., 2018) y a la -10 (Ip et al., 2007). Así mismo, se ha visto que en las células no transformadas, la migración celular aumenta tras el silenciamiento de la Cl-2 (Ikari et al., 2011) o el bloqueo de la segunda asa extracelular de la Cl-4 con un péptido homólogo (Webb et al., 2013).

Con respecto a la dureza de las células, se sabe que los tumores son más rígidos que el tejido sano circundante, y que la rigidez del estroma es un factor que favorece la tumorigénesis [para revisión ver (Handorf et al., 2015; Indra and Beningo,

2011). Nosotros encontramos que las células MDCK transfectadas con E7 adquieren una mayor rigidez en su membrana apical, y lo mismo se observó cuando las proteínas de la UE, ZO-1 y ZO-2 se noquearon (Cartagena-Rivera et al., 2017). Por otro lado, es frecuente encontrar que un aumento en la dureza de las células se acompaña de la aparición de fibras de estrés. Éstas son un factor esencial que promueve el crecimiento de los tumores mamarios durante la etapa pre-maligna (Tavares et al., 2017). Por ello pensamos que el incremento en la tensión de la superficie apical y la proliferación de las fibras de estrés en las células MDCK-E7, son señales que indican un avance en el proceso de transformación de epitelio a mesénquima.

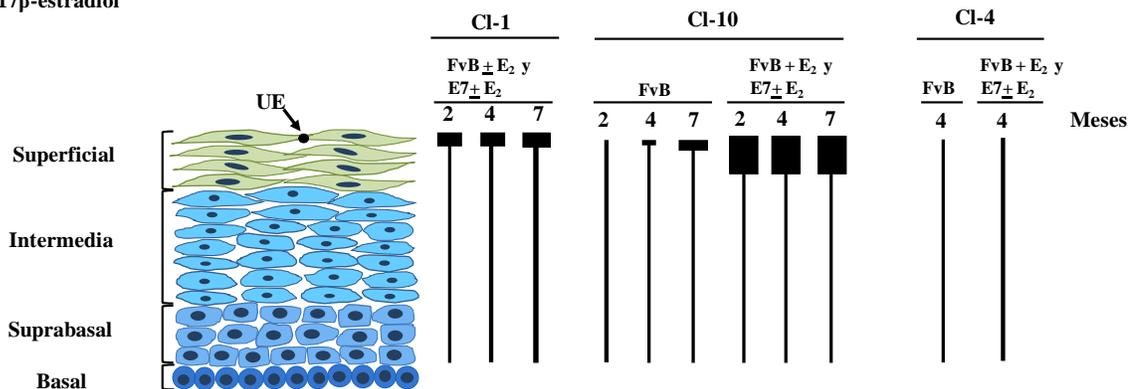
En resumen, nuestros resultados en las células MDCK indican que la proteína oncogénica E7 del VPH16, induce cambios en la expresión de las claudinas y el sellado de las UEs, que se acompañan por un incremento en la dureza de la superficie apical, una mayor motilidad celular y alteraciones en la citoarquitectura celular, que podrían favorecer el desarrollo de la tumorigénesis.

VII. Resumen de resultados

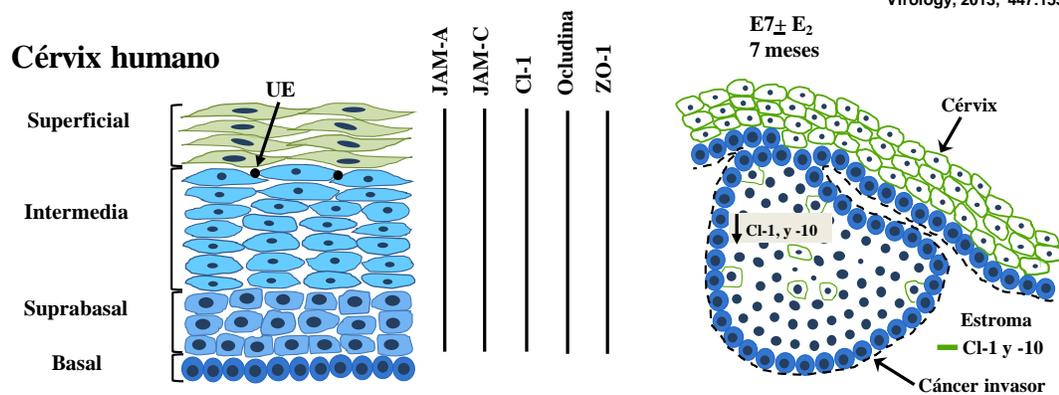
El patrón de expresión de la claudina-1 en el cérvix del ratón de 2 a 7 meses de edad, no cambia con la expresión de E7 ó E₂. En cambio, la claudina-10 se concentra en la capa más superficial del cérvix desde los 2 meses de edad en los ratones tratados con E₂ o que expresan a E7 en presencia o ausencia de E₂.

En el cérvix del ratón el bloqueo al tránsito paracelular se establece en la capa más superficial del epitelio multi-estratificado donde se concentran las claudinas -1 y -10. A diferencia del cérvix humano donde este bloqueo con la unión estrecha aparece hasta las células superficiales de la capa intermedia.

FvB = ratón control
 E7= ratón transgénico K14E7
 E₂ = 17β-estradiol

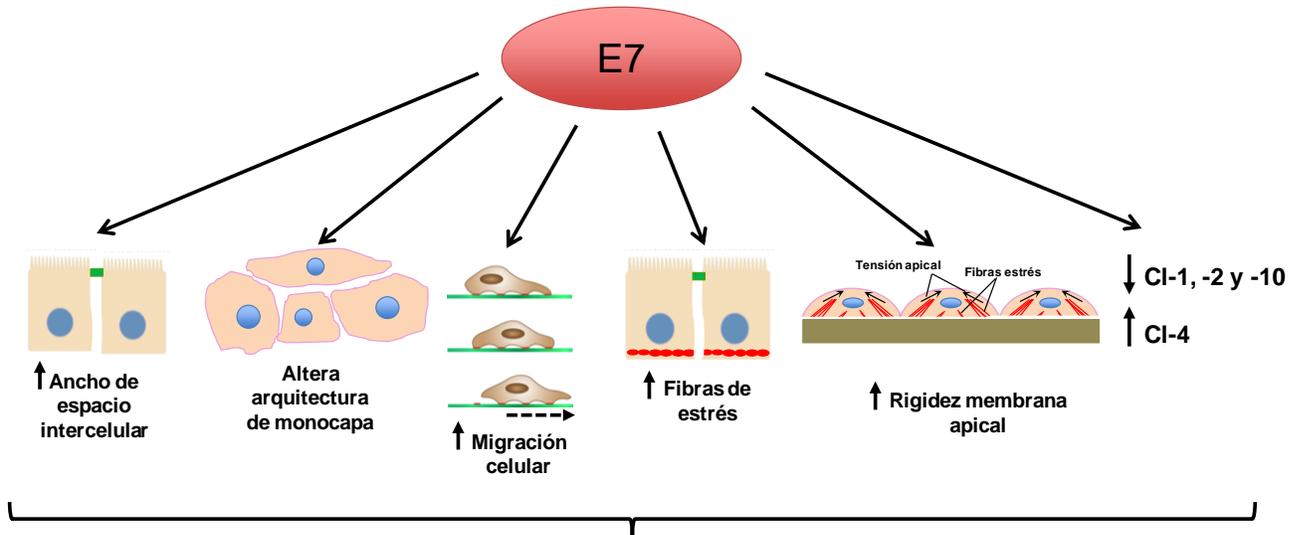


Cortés-Malagón E. et. al.
 Virology, 2013, 447:155

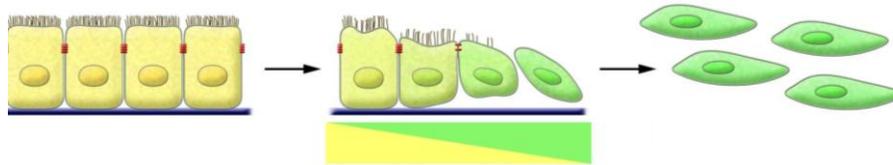


En el cáncer cervical invasor inducido por E₂ y E7, disminuye la expresión de las Cl-1 y -10.

La oncoproteína E7 en las células epiteliales MDCK induce cambios característicos de la transición epitelio mesénquima: altera la citoarquitectura, promueve la migración, aumenta la rigidez celular, la formación de fibras de estrés y la expresión de las claudinas.



Transición epitelio mesénquima



VIII. Conclusión

- La concentración de la claudina-10, que constituye un canal o poro paracelular, en la capa más superficial del cérvix, desde los 2 meses de edad en los ratones tratados con E_2 o que expresan a E7 en presencia o ausencia de E_2 podría explicar el aumento en la permeabilidad paracelular del cérvix.
- En el cáncer invasor se silencian las claudinas -1 y -10, lo que coincide con lo observado en diversos carcinomas.
- E7 en las monocapas de células epiteliales MDCK induce una transición epitelio-mesénquima, ya que cambia la citoarquitectura, aumenta las fibras de estrés y altera la expresión de claudinas. Esto sugiere que E7 impacta a diversas rutas de señalización, y no únicamente actúa promoviendo la entrada al ciclo celular por su efecto sobre retinoblastoma.

IX. Perspectivas

- Analizar el efecto de E₂ + E7 en las células MDCK.
- La ausencia de ZO-2 en las células MDCK generó cambios similares a los observados en las células MDCK-E7: el espacio paracelular se ensanchó, las células crecieron unas encima de otras, migraron más y formaron más fibras de estrés. Por ello, se podría analizar en el cérvix del ratón transgénico K14E7 con y sin estrógenos y en las células MDCK-E7, la expresión de ZO-2.
- Ya que RhoA induce la formación de las fibras de estrés, se propone analizar el efecto de E7 sobre la actividad de RhoA/ROCK en las células MDCK.

Referencias

- Aldred, M.A., Y. Huang, S. Liyanarachchi, N.S. Pellegata, O. Gimm, S. Jhiang, R.V. Davuluri, A. de la Chapelle, and C. Eng. 2004. Papillary and follicular thyroid carcinomas show distinctly different microarray expression profiles and can be distinguished by a minimum of five genes. *J Clin Oncol.* 22:3531-3539.
- Alexandre, M.D., Q. Lu, and Y.H. Chen. 2005. Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl⁻ conductance and increases the paracellular Na⁺ conductance in LLC-PK1 cells. *J Cell Sci.* 118:2683-2693.
- Amasheh, S., N. Meiri, A.H. Gitter, T. Schoneberg, J. Mankertz, J.D. Schulzke, and M. Fromm. 2002. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci.* 115:4969-4976.
- Anderson, J.M. 1996. Cell signalling: MAGUK magic. *Curr Biol.* 6:382-384.
- Andreeva, A.Y., E. Krause, E.C. Muller, I.E. Blasig, and D.I. Utepbergenov. 2001. Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin. *J Biol Chem.* 276:38480-38486.
- Angelow, S., R. Ahlstrom, and A.S. Yu. 2008. Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol.* 295:F867-876.
- Arabzadeh, A., T.C. Troy, and K. Turksen. 2006. Role of the Cldn6 cytoplasmic tail domain in membrane targeting and epidermal differentiation in vivo. *Mol Cell Biol.* 26:5876-5887.
- Arbeit, J.M., P.M. Howley, and D. Hanahan. 1996. Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 93:2930-2935.
- Aro, K., L.E. Rosa, I.O. Bello, Y. Soini, A.A. Makitie, T. Salo, and I. Leivo. 2011. Expression pattern of claudins 1 and 3-an auxiliary tool in predicting behavior of mucoepidermoid carcinoma of salivary gland origin. *Virchows Arch.* 458:341-348.
- Ashikari, D., K.I. Takayama, D. Obinata, S. Takahashi, and S. Inoue. 2017. CLDN8, an androgen-regulated gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. *Cancer Sci.* 108:1386-1393.
- Babkair, H., M. Yamazaki, M.S. Uddin, S. Maruyama, T. Abe, A. Essa, Y. Sumita, M.S. Ahsan, W. Swelam, J. Cheng, and T. Saku. 2016. Aberrant expression of the tight junction molecules claudin-1 and zonula occludens-1 mediates cell growth and invasion in oral squamous cell carcinoma. *Hum Pathol.* 57:51-60.
- Baker, J., and D. Garrod. 1993. Epithelial cells retain junctions during mitosis. *Journal of cell science.* 104 (Pt 2):415-425.
- Balda, M.S., L. Gonzalez-Mariscal, R.G. Contreras, M. Macias-Silva, M.E. Torres-Marquez, J.A. Garcia-Sainz, and M. Cerejido. 1991. Assembly and sealing of tight junctions: possible participation of G-proteins, phospholipase C, protein kinase C and calmodulin. *J Membr Biol.* 122:193-202.
- Barbosa, M.S., D.R. Lowy, and J.T. Schiller. 1989. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol.* 63:1404-1407.

- Barros-Filho, M.C., F.A. Marchi, C.A. Pinto, S.R. Rogatto, and L.P. Kowalski. 2015. High Diagnostic Accuracy Based on CLDN10, HMGA2, and LAMB3 Transcripts in Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 100:E890-899.
- Basler, K., and J.M. Brandner. 2017. Tight junctions in skin inflammation. *Pflugers Archiv : European journal of physiology.* 469:3-14.
- Bedell, M.A., K.H. Jones, S.R. Grossman, and L.A. Laimins. 1989. Identification of human papillomavirus type 18 transforming genes in immortalized and primary cells. *J Virol.* 63:1247-1255.
- Bello, I.O., S.T. Vilen, A. Niinimaa, S. Kantola, Y. Soini, and T. Salo. 2008. Expression of claudins 1, 4, 5, and 7 and occludin, and relationship with prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Hum Pathol.* 39:1212-1220.
- Benczik, M., A. Galamb, R. Koiss, A. Kovacs, B. Jaray, T. Szekely, T. Szekerczes, Z. Schaff, G. Sobel, and C. Jeney. 2016. Claudin-1 as a Biomarker of Cervical Cytology and Histology. *Pathol Oncol Res.* 22:179-188.
- Blanchard, A.A., G.P. Skliris, P.H. Watson, L.C. Murphy, C. Penner, L. Tomes, T.L. Young, E. Leygue, and Y. Myal. 2009. Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype. *Virchows Arch.* 454:647-656.
- Blaskewicz, C.D., J. Pudney, and D.J. Anderson. 2011. Structure and function of intercellular junctions in human cervical and vaginal mucosal epithelia. *Biol Reprod.* 85:97-104.
- Bouchagier, K.A., S.F. Assimakopoulos, D.D. Karavias, I. Maroulis, V. Tzelepi, H. Kalofonos, D.D. Karavias, D. Kardamakis, C.D. Scopa, and A.C. Tsamandas. 2014. Expression of claudins-1, -4, -5, -7 and occludin in hepatocellular carcinoma and their relation with classic clinicopathological features and patients' survival. *In Vivo.* 28:315-326.
- Brake, T., and P.F. Lambert. 2005. Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 102:2490-2495.
- Brandner, J.M. 2016. Importance of Tight Junctions in Relation to Skin Barrier Function. *Current problems in dermatology.* 49:27-37.
- Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, and A. Jemal. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 68:394-424.
- Brennan, K., G. Offiah, E.A. McSherry, and A.M. Hopkins. 2010. Tight junctions: a barrier to the initiation and progression of breast cancer? *J Biomed Biotechnol.* 2010:460607.
- Brisson, M., J.J. Kim, K. Canfell, M. Drolet, G. Gingras, E.A. Burger, D. Martin, K.T. Simms, E. Benard, M.C. Boily, S. Sy, C. Regan, A. Keane, M. Caruana, D.T.N. Nguyen, M.A. Smith, J.F. Laprise, M. Jit, M. Alary, F. Bray, E. Fidarova, F. Elsheikh, P.J.N. Bloem, N. Broutet, and R. Hutubessy. 2020. Impact of HPV vaccination and cervical screening on cervical cancer elimination: a comparative modelling analysis in 78 low-income and lower-middle-income countries. *Lancet.*

- Bruni, L., M. Diaz, L. Barrionuevo-Rosas, R. Herrero, F. Bray, F.X. Bosch, S. de Sanjose, and X. Castellsague. 2016. Global estimates of human papillomavirus vaccination coverage by region and income level: a pooled analysis. *Lancet Glob Health*. 4:e453-463.
- C. Lee, L.A.L. 2007. The Differentiation-dependent life cycle of human papillomaviruses in keratinocytes. *In* The papillomaviruses. S. US, editor. 45-47.
- Canfell, K., J.J. Kim, M. Brisson, A. Keane, K.T. Simms, M. Caruana, E.A. Burger, D. Martin, D.T.N. Nguyen, E. Benard, S. Sy, C. Regan, M. Drolet, G. Gingras, J.F. Laprise, J. Torode, M.A. Smith, E. Fidarova, D. Trapani, F. Bray, A. Ilbawi, N. Broutet, and R. Hutubessy. 2020. Mortality impact of achieving WHO cervical cancer elimination targets: a comparative modelling analysis in 78 low-income and lower-middle-income countries. *Lancet*.
- Cartagena-Rivera, A.X., C.M. Van Itallie, J.M. Anderson, and R.S. Chadwick. 2017. Apical surface supracellular mechanical properties in polarized epithelium using noninvasive acoustic force spectroscopy. *Nat Commun*. 8:1030.
- Cereijido, M., E.S. Robbins, W.J. Dolan, C.A. Rotunno, and D.D. Sabatini. 1978. Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J Cell Biol*. 77:853-880.
- Colegio, O.R., C.M. Van Itallie, H.J. McCrea, C. Rahner, and J.M. Anderson. 2002. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 283:C142-147.
- Connolly-Andersen, A.M., K.E. Magnusson, and A. Mirazimi. 2007. Basolateral entry and release of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in polarized MDCK-1 cells. *J Virol*. 81:2158-2164.
- Chao, Y.C., S.H. Pan, S.C. Yang, S.L. Yu, T.F. Che, C.W. Lin, M.S. Tsai, G.C. Chang, C.H. Wu, Y.Y. Wu, Y.C. Lee, T.M. Hong, and P.C. Yang. 2009. Claudin-1 is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma. *Am J Respir Crit Care Med*. 179:123-133.
- Chen, Y., C. Miller, R. Mosher, X. Zhao, J. Deeds, M. Morrissey, B. Bryant, D. Yang, R. Meyer, F. Cronin, B.S. Gostout, K. Smith-McCune, and R. Schlegel. 2003. Identification of cervical cancer markers by cDNA and tissue microarrays. *Cancer Res*. 63:1927-1935.
- Chen, Y.H., Q. Lu, D.A. Goodenough, and B. Jeansonne. 2002. Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell*. 13:1227-1237.
- Cheng, S., D.C. Schmidt-Grimminger, T. Murant, T.R. Broker, and L.T. Chow. 1995. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev*. 9:2335-2349.
- Cheung, S.T., K.L. Leung, Y.C. Ip, X. Chen, D.Y. Fong, I.O. Ng, S.T. Fan, and S. So. 2005. Claudin-10 expression level is associated with recurrence of primary hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 11:551-556.

- D'Souza, T., R. Agarwal, and P.J. Morin. 2005. Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *J Biol Chem.* 280:26233-26240.
- D'Souza, T., F.E. Indig, and P.J. Morin. 2007. Phosphorylation of claudin-4 by PKCepsilon regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *Exp Cell Res.* 313:3364-3375.
- Dahiya, N., K.G. Becker, W.H. Wood, 3rd, Y. Zhang, and P.J. Morin. 2011. Claudin-7 is frequently overexpressed in ovarian cancer and promotes invasion. *PLoS One.* 6:e22119.
- De Benedetto, A., N.M. Rafaels, L.Y. McGirt, A.I. Ivanov, S.N. Georas, C. Cheadle, A.E. Berger, K. Zhang, S. Vidyasagar, T. Yoshida, M. Boguniewicz, T. Hata, L.C. Schneider, J.M. Hanifin, R.L. Gallo, N. Novak, S. Weidinger, T.H. Beaty, D.Y. Leung, K.C. Barnes, and L.A. Beck. 2011. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 127:773-786 e771-777.
- de Villiers, E.M., C. Fauquet, T.R. Broker, H.U. Bernard, and H. zur Hausen. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 324:17-27.
- Doorbar, J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond).* 110:525-541.
- Dyson, N. 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12:2245-2262.
- Dyson, N., P. Guida, K. Munger, and E. Harlow. 1992. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol.* 66:6893-6902.
- Dyson, N., P.M. Howley, K. Munger, and E. Harlow. 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 243:934-937.
- Enck, A.H., U.V. Berger, and A.S. Yu. 2001. Claudin-2 is selectively expressed in proximal nephron in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 281:F966-974.
- Ersoz, S., S. Mungan, U. Cobanoglu, H. Turgutalp, and Y. Ozoran. 2011. Prognostic importance of Claudin-1 and Claudin-4 expression in colon carcinomas. *Pathol Res Pract.* 207:285-289.
- Farquhar, M.G., and G.E. Palade. 1963. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol.* 17:375-412.
- Figge, J., T. Webster, T.F. Smith, and E. Paucha. 1988. Prediction of similar transforming regions in simian virus 40 large T, adenovirus E1A, and myc oncoproteins. *J Virol.* 62:1814-1818.
- Firzlaff, J.M., B. Luscher, and R.N. Eisenman. 1991. Negative charge at the casein kinase II phosphorylation site is important for transformation but not for Rb protein binding by the E7 protein of human papillomavirus type 16. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:5187-5191.
- Flores, E.R., B.L. Allen-Hoffmann, D. Lee, C.A. Sattler, and P.F. Lambert. 1999. Establishment of the human papillomavirus type 16 (HPV-16) life cycle in an immortalized human foreskin keratinocyte cell line. *Virology.* 262:344-354.

- Fritzsche, F.R., B. Oelrich, M. Johannsen, I. Kristiansen, H. Moch, K. Jung, and G. Kristiansen. 2008. Claudin-1 protein expression is a prognostic marker of patient survival in renal cell carcinomas. *Clin Cancer Res.* 14:7035-7042.
- Furuse, M., K. Fujita, T. Hiragi, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1998a. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol.* 141:1539-1550.
- Furuse, M., K. Furuse, H. Sasaki, and S. Tsukita. 2001. Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol.* 153:263-272.
- Furuse, M., M. Hata, K. Furuse, Y. Yoshida, A. Haratake, Y. Sugitani, T. Noda, A. Kubo, and S. Tsukita. 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.* 156:1099-1111.
- Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita, and S. Tsukita. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol.* 123:1777-1788.
- Furuse, M., Y. Oda, T. Higashi, N. Iwamoto, and S. Masuda. 2012. Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor: a novel membrane protein of tricellular tight junctions. *Ann N Y Acad Sci.* 1257:54-58.
- Furuse, M., H. Sasaki, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1998b. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol.* 143:391-401.
- Gallagher, K.E., D.S. LaMontagne, and D. Watson-Jones. 2018. Status of HPV vaccine introduction and barriers to country uptake. *Vaccine.* 36:4761-4767.
- Ganguly, N., and S.P. Parihar. 2009. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci.* 34:113-123.
- Gao, Z., X. Xu, B. McClane, Q. Zeng, B. Litkouhi, W.R. Welch, R.S. Berkowitz, S.C. Mok, and E.I. Garner. 2011. C terminus of *Clostridium perfringens* enterotoxin downregulates CLDN4 and sensitizes ovarian cancer cells to Taxol and Carboplatin. *Clin Cancer Res.* 17:1065-1074.
- Garcia-Hernandez, V., C. Flores-Maldonado, R. Rincon-Heredia, O. Verdejo-Torres, J. Bonilla-Delgado, I. Meneses-Morales, P. Gariglio, and R.G. Contreras. 2015. EGF regulates claudin-2 and -4 expression through Src and STAT3 in MDCK cells. *J Cell Physiol.* 230:105-115.
- Gewin, L., H. Myers, T. Kiyono, and D.A. Galloway. 2004. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev.* 18:2269-2282.
- Golebiewski, L., H. Liu, R.T. Javier, and A.P. Rice. 2011. The avian influenza virus NS1 ESEV PDZ binding motif associates with Dlg1 and Scribble to disrupt cellular tight junctions. *J Virol.* 85:10639-10648.
- Gonzalez-Mariscal et al., L., Quirós, M., Díaz-Coránguez, M., and Bautista, P. . 2012. Tight Junctions. *Current frontiers and perspectives in cell biology.*
- González-Mariscal L, Quirós Miguel, Díaz-Coránguez M, and B. Pablo. 2012. Tight Junctions. *In Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology.*

- Gonzalez-Mariscal, L., A. Betanzos, and A. Avila-Flores. 2000. MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol.* 11:315-324.
- Gonzalez-Mariscal, L., A. Betanzos, P. Nava, and B.E. Jaramillo. 2003. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 81:1-44.
- Gonzalez-Mariscal, L., R.G. Contreras, J.J. Bolivar, A. Ponce, B. Chavez De Ramirez, and M. Cereijido. 1990. Role of calcium in tight junction formation between epithelial cells. *Am J Physiol.* 259:C978-986.
- Gonzalez-Mariscal, L., B. Chavez de Ramirez, and M. Cereijido. 1984. Effect of temperature on the occluding junctions of monolayers of epithelioid cells (MDCK). *J Membr Biol.* 79:175-184.
- Gonzalez-Mariscal, L., B. Chavez de Ramirez, and M. Cereijido. 1985. Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *J Membr Biol.* 86:113-125.
- Gonzalez-Mariscal, L., E. Garay, and M. Quiros. 2011. Identification of claudins by western blot and immunofluorescence in different cell lines and tissues. *Methods Mol Biol.* 762:213-231.
- González-Mariscal L, G.E., Quirós Miguel. 2010. Regulation of claudins by posttranslational modifications and cell-signaling cascades. *In Curr Topics Membr.* Vol. 65. 113-150.
- González-Mariscal L, G.E., Quirós Miguel. 2013. Regulation of Tight Junctions for Therapeutic Advanges. *In Cancer Metastasis-Biology and Treatment.* Vol. 19. 197-246.
- Gonzalez-Mariscal, L., S. Lechuga, and E. Garay. 2007. Role of tight junctions in cell proliferation and cancer. *Prog Histochem Cytochem.* 42:1-57.
- Gottlieb, T.A., I.E. Ivanov, M. Adesnik, and D.D. Sabatini. 1993. Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells. *J Cell Biol.* 120:695-710.
- Gow, A., C. Davies, C.M. Southwood, G. Frolenkov, M. Chrustowski, L. Ng, D. Yamauchi, D.C. Marcus, and B. Kachar. 2004. Deafness in Claudin 11-null mice reveals the critical contribution of basal cell tight junctions to stria vascularis function. *J Neurosci.* 24:7051-7062.
- Gow, A., and J. Devaux. 2008. A model of tight junction function in central nervous system myelinated axons. *Neuron Glia Biol.* 4:307-317.
- Gow, A., C.M. Southwood, J.S. Li, M. Pariali, G.P. Riordan, S.E. Brodie, J. Danias, J.M. Bronstein, B. Kachar, and R.A. Lazzarini. 1999. CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in *Osp/claudin-11* null mice. *Cell.* 99:649-659.
- Gravotta, D., M. Adesnik, and D.D. Sabatini. 1990. Transport of influenza HA from the trans-Golgi network to the apical surface of MDCK cells permeabilized in their basolateral plasma membranes: energy dependence and involvement of GTP-binding proteins. *J Cell Biol.* 111:2893-2908.
- Grone, J., B. Weber, E. Staub, M. Heinze, I. Klamann, C. Pilarsky, K. Hermann, E. Castanos-Velez, S. Ropcke, B. Mann, A. Rosenthal, and H.J. Buhr. 2007. Differential expression of genes encoding tight junction proteins in colorectal cancer: frequent dysregulation of claudin-1, -8 and -12. *Int J Colorectal Dis.* 22:651-659.

- Grosse, B., D. Cassio, N. Yousef, C. Bernardo, E. Jacquemin, and E. Gonzales. 2012. Claudin-1 involved in neonatal ichthyosis sclerosing cholangitis syndrome regulates hepatic paracellular permeability. *Hepatology*. 55:1249-1259.
- Grossman, S.R., and L.A. Laimins. 1989. E6 protein of human papillomavirus type 18 binds zinc. *Oncogene*. 4:1089-1093.
- Group, F.I.S. 2007. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *N Engl J Med*. 356:1915-1927.
- Guan, X., T. Inai, and Y. Shibata. 2005. Segment-specific expression of tight junction proteins, claudin-2 and -10, in the rat epididymal epithelium. *Arch Histol Cytol*. 68:213-225.
- Gunasekharan, V.K., Y. Li, J. Andrade, and L.A. Laimins. 2016. Post-Transcriptional Regulation of KLF4 by High-Risk Human Papillomaviruses Is Necessary for the Differentiation-Dependent Viral Life Cycle. *PLoS pathogens*. 12:e1005747.
- Gunzel, D., and M. Fromm. 2012. Claudins and other tight junction proteins. *Compr Physiol*. 2:1819-1852.
- Gunzel, D., M. Stuiver, P.J. Kausalya, L. Haisch, S.M. Krug, R. Rosenthal, I.C. Meij, W. Hunziker, M. Fromm, and D. Muller. 2009. Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function. *J Cell Sci*. 122:1507-1517.
- Gunzel, D., and A.S. Yu. 2013. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*. 93:525-569.
- Gutierrez, J., E. Garcia-Villa, R. Ocadiz-Delgado, E.M. Cortes-Malagon, J. Vazquez, A. Roman-Rosales, E. Alvarez-Rios, H. Celik, M.C. Romano, A. Uren, P.F. Lambert, and P. Gariglio. 2015. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein upregulates the retinoic acid receptor-beta expression in cervical cancer cell lines and K14E7 transgenic mice. *Mol Cell Biochem*. 408:261-272.
- Gyorffy, H. 2009. [Study of claudins and prognostic factors in some gastrointestinal diseases]. *Magy Onkol*. 53:377-383.
- Hadj-Rabia, S., L. Baala, P. Vabres, D. Hamel-Teillac, E. Jacquemin, M. Fabre, S. Lyonnet, Y. De Prost, A. Munnich, M. Hadchouel, and A. Smahi. 2004. Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology*. 127:1386-1390.
- Hahn-Stromberg, V., S. Askari, A. Ahmad, R. Befekadu, and T.K. Nilsson. 2017. Expression of claudin 1, claudin 4, and claudin 7 in colorectal cancer and its relation with CLDN DNA methylation patterns. *Tumour Biol*. 39:1010428317697569.
- Hamazaki, Y., M. Itoh, H. Sasaki, M. Furuse, and S. Tsukita. 2002. Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J Biol Chem*. 277:455-461.
- Handorf, A.M., Y. Zhou, M.A. Halanski, and W.J. Li. 2015. Tissue stiffness dictates development, homeostasis, and disease progression. *Organogenesis*. 11:1-15.
- Hashizume, A., T. Ueno, M. Furuse, S. Tsukita, Y. Nakanishi, and Y. Hieda. 2004. Expression patterns of claudin family of tight junction membrane proteins in developing mouse submandibular gland. *Dev Dyn*. 231:425-431.

- Hawley-Nelson, P., K.H. Vousden, N.L. Hubbert, D.R. Lowy, and J.T. Schiller. 1989. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* 8:3905-3910.
- Heinemann, U., and A. Schuetz. 2019. Structural Features of Tight-Junction Proteins. *Int J Mol Sci.* 20.
- Hernandez-Monge, J., E. Garay, A. Raya-Sandino, O. Vargas-Sierra, J. Diaz-Chavez, M. Popoca-Cuaya, P.F. Lambert, L. Gonzalez-Mariscal, and P. Gariglio. 2013. Papillomavirus E6 oncoprotein up-regulates occludin and ZO-2 expression in ovariectomized mice epidermis. *Experimental cell research.* 319:2588-2603.
- Hernandez, S., B. Chavez Munguia, and L. Gonzalez-Mariscal. 2007. ZO-2 silencing in epithelial cells perturbs the gate and fence function of tight junctions and leads to an atypical monolayer architecture. *Exp Cell Res.* 313:1533-1547.
- Hicks, D.A., C.E. Galimanis, P.G. Webb, M.A. Spillman, K. Behbakht, M.C. Neville, and H.K. Baumgartner. 2016. Claudin-4 activity in ovarian tumor cell apoptosis resistance and migration. *BMC Cancer.* 16:788.
- Higashi, T., T.R. Arnold, R.E. Stephenson, K.M. Dinshaw, and A.L. Miller. 2016. Maintenance of the Epithelial Barrier and Remodeling of Cell-Cell Junctions during Cytokinesis. *Current biology : CB.* 26:1829-1842.
- Higashi, T., S. Tokuda, S. Kitajiri, S. Masuda, H. Nakamura, Y. Oda, and M. Furuse. 2013. Analysis of the 'angulin' proteins LSR, ILDR1 and ILDR2--tricellulin recruitment, epithelial barrier function and implication in deafness pathogenesis. *J Cell Sci.* 126:966-977.
- Higashi, Y., S. Suzuki, T. Sakaguchi, T. Nakamura, S. Baba, H.C. Reinecker, S. Nakamura, and H. Konno. 2007. Loss of claudin-1 expression correlates with malignancy of hepatocellular carcinoma. *J Surg Res.* 139:68-76.
- Hoellen, F., A. Waldmann, C. Banz-Jansen, U. Holtrich, T. Karn, M. Oberlander, J.K. Habermann, M. Hormann, F. Koster, J. Ribbat-Idel, M. Thill, A. Rody, A. El-Balat, and L. Hanker. 2017. Claudin-1 expression in cervical cancer. *Mol Clin Oncol.* 7:880-884.
- Huang, J., J. Li, Y. Qu, J. Zhang, L. Zhang, X. Chen, B. Liu, and Z. Zhu. 2014. The expression of claudin 1 correlates with beta-catenin and is a prognostic factor of poor outcome in gastric cancer. *Int J Oncol.* 44:1293-1301.
- Hudson, J.B., M.A. Bedell, D.J. McCance, and L.A. Laiminis. 1990. Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes in vitro by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18. *J Virol.* 64:519-526.
- Huh, K.W., J. DeMasi, H. Ogawa, Y. Nakatani, P.M. Howley, and K. Munger. 2005. Association of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein with the 600-kDa retinoblastoma protein-associated factor, p600. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:11492-11497.
- Hummel, M., J.B. Hudson, and L.A. Laimins. 1992. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J Virol.* 66:6070-6080.
- Ikari, A., S. Matsumoto, H. Harada, K. Takagi, H. Hayashi, Y. Suzuki, M. Degawa, and M. Miwa. 2006. Phosphorylation of paracellin-1 at Ser217 by protein kinase A is essential for localization in tight junctions. *J Cell Sci.* 119:1781-1789.

- Ikari, A., T. Sato, A. Takiguchi, K. Atomi, Y. Yamazaki, and J. Sugatani. 2011. Claudin-2 knockdown decreases matrix metalloproteinase-9 activity and cell migration via suppression of nuclear Sp1 in A549 cells. *Life Sci.* 88:628-633.
- Ikenouchi, J., M. Furuse, K. Furuse, H. Sasaki, S. Tsukita, and S. Tsukita. 2005. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol.* 171:939-945.
- Inai, T., J. Kobayashi, and Y. Shibata. 1999. Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *Eur J Cell Biol.* 78:849-855.
- Inai, T., A. Sengoku, X. Guan, E. Hirose, H. Iida, and Y. Shibata. 2005. Heterogeneity in expression and subcellular localization of tight junction proteins, claudin-10 and -15, examined by RT-PCR and immunofluorescence microscopy. *Arch Histol Cytol.* 68:349-360.
- Indra, I., and K.A. Beningo. 2011. An in vitro correlation of metastatic capacity, substrate rigidity, and ECM composition. *J Cell Biochem.* 112:3151-3158.
- Ip, Y.C., S.T. Cheung, Y.T. Lee, J.C. Ho, and S.T. Fan. 2007. Inhibition of hepatocellular carcinoma invasion by suppression of claudin-10 in HLE cells. *Mol Cancer Ther.* 6:2858-2867.
- Itoh, M., M. Furuse, K. Morita, K. Kubota, M. Saitou, and S. Tsukita. 1999. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol.* 147:1351-1363.
- Jemal, A., E.M. Ward, C.J. Johnson, K.A. Cronin, J. Ma, B. Ryerson, A. Mariotto, A.J. Lake, R. Wilson, R.L. Sherman, R.N. Anderson, S.J. Henley, B.A. Kohler, L. Penberthy, E.J. Feuer, and H.K. Weir. 2017. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2014, Featuring Survival. *J Natl Cancer Inst.* 109.
- Jiang, L., L. Yang, H. Huang, B.Y. Liu, and G. Zu. 2017. Prognostic and clinical significance of claudin-1 in colorectal cancer: A systemic review and meta-analysis. *Int J Surg.* 39:214-220.
- Johnson, C., K. Sanders, and H. Fan. 2010. Jaagsiekte sheep retrovirus transformation in Madin-Darby canine kidney epithelial cell three-dimensional culture. *J Virol.* 84:5379-5390.
- Joura, E.A., A.R. Giuliano, O.E. Iversen, C. Bouchard, C. Mao, J. Mehlsen, E.D. Moreira, Jr., Y. Ngan, L.K. Petersen, E. Lazcano-Ponce, P. Pitisuttithum, J.A. Restrepo, G. Stuart, L. Woelber, Y.C. Yang, J. Cuzick, S.M. Garland, W. Huh, S.K. Kjaer, O.M. Bautista, I.S. Chan, J. Chen, R. Gesser, E. Moeller, M. Ritter, S. Vuocolo, A. Luxembourg, and H.P.V.V.S. Broad Spectrum. 2015. A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women. *N Engl J Med.* 372:711-723.
- Jung, H., K.H. Jun, J.H. Jung, H.M. Chin, and W.B. Park. 2011. The expression of claudin-1, claudin-2, claudin-3, and claudin-4 in gastric cancer tissue. *J Surg Res.* 167:e185-191.
- Kanda, T., A. Furuno, and K. Yoshiike. 1988. Human papillomavirus type 16 open reading frame E7 encodes a transforming gene for rat 3Y1 cells. *Journal of virology.* 62:610-613.
- Katzenellenbogen, R.A., E.M. Egelkrout, P. Vliet-Gregg, L.C. Gewin, P.R. Gafken, and D.A. Galloway. 2007. NFX1-123 and poly(A) binding proteins synergistically

- augment activation of telomerase in human papillomavirus type 16 E6-expressing cells. *J Virol.* 81:3786-3796.
- Kavanagh, K., K.G. Pollock, K. Cuschieri, T. Palmer, R.L. Cameron, C. Watt, R. Bhatia, C. Moore, H. Cubie, M. Cruickshank, and C. Robertson. 2017. Changes in the prevalence of human papillomavirus following a national bivalent human papillomavirus vaccination programme in Scotland: a 7-year cross-sectional study. *Lancet Infect Dis.* 17:1293-1302.
- Kimura, J., H. Abe, S. Kamitani, H. Toshima, A. Fukui, M. Miyake, Y. Kamata, Y. Sugita-Konishi, S. Yamamoto, and Y. Horiguchi. 2010. Clostridium perfringens enterotoxin interacts with claudins via electrostatic attraction. *J Biol Chem.* 285:401-408.
- Kinugasa, T., Y. Akagi, T. Yoshida, Y. Ryu, I. Shiratuchi, N. Ishibashi, and K. Shirouzu. 2010. Increased claudin-1 protein expression contributes to tumorigenesis in ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *Anticancer Res.* 30:3181-3186.
- Kiuchi-Saishin, Y., S. Gotoh, M. Furuse, A. Takasuga, Y. Tano, and S. Tsukita. 2002. Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol.* 13:875-886.
- Klumpp, D.J., and L.A. Laimins. 1999. Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1. *Virology.* 257:239-246.
- Kominsky, S.L., M. Vali, D. Korz, T.G. Gabig, S.A. Weitzman, P. Argani, and S. Sukumar. 2004. Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol.* 164:1627-1633.
- Koval, M. 2013. Differential pathways of claudin oligomerization and integration into tight junctions. *Tissue Barriers.* 1:e24518.
- Krause, G., J. Protze, and J. Piontek. 2015. Assembly and function of claudins: Structure-function relationships based on homology models and crystal structures. *Semin Cell Dev Biol.* 42:3-12.
- Krause, G., L. Winkler, C. Piehl, I. Blasig, J. Piontek, and S.L. Muller. 2009. Structure and function of extracellular claudin domains. *Ann N Y Acad Sci.* 1165:34-43.
- Kulka, J., A.M. Szasz, Z. Nemeth, L. Madaras, Z. Schaff, I.A. Molnar, and A.M. Tokes. 2009. Expression of tight junction protein claudin-4 in basal-like breast carcinomas. *Pathol Oncol Res.* 15:59-64.
- Kusumoto-Matsuo, R., T. Kanda, and I. Kukimoto. 2011. Rolling circle replication of human papillomavirus type 16 DNA in epithelial cell extracts. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms.* 16:23-33.
- Latorre, I.J., M.H. Roh, K.K. Frese, R.S. Weiss, B. Margolis, and R.T. Javier. 2005. Viral oncoprotein-induced mislocalization of select PDZ proteins disrupts tight junctions and causes polarity defects in epithelial cells. *J Cell Sci.* 118:4283-4293.
- Leotlela, P.D., M.S. Wade, P.H. Duray, M.J. Rhode, H.F. Brown, D.T. Rosenthal, S.K. Dissanayake, R. Earley, F.E. Indig, B.J. Nickoloff, D.D. Taub, O.P. Kallioniemi, P. Meltzer, P.J. Morin, and A.T. Weeraratna. 2007. Claudin-1 overexpression in

- melanoma is regulated by PKC and contributes to melanoma cell motility. *Oncogene*. 26:3846-3856.
- Li, J., M. Zhuo, L. Pei, and A.S. Yu. 2013. Conserved aromatic residue confers cation selectivity in claudin-2 and claudin-10b. *J Biol Chem*. 288:22790-22797.
- Li, W., Q. Dong, L. Li, Z. Zhang, X. Cai, and X. Pan. 2016. Prognostic significance of claudin-1 and cyclin B1 protein expression in patients with hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 11:2995-3002.
- Li, W.J., Z.L. Zhang, X.M. Yu, X.L. Cai, X.L. Pan, and X.Y. Yang. 2015. Expression of claudin-1 and its relationship with lymphatic microvessel generation in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Genet Mol Res*. 14:11814-11826.
- Li, Y., Y. Gong, X. Ning, D. Peng, L. Liu, S. He, K. Gong, C. Zhang, X. Li, and L. Zhou. 2018. Downregulation of CLDN7 due to promoter hypermethylation is associated with human clear cell renal cell carcinoma progression and poor prognosis. *J Exp Clin Cancer Res*. 37:276.
- Lin, Z., X. Zhang, Z. Liu, Q. Liu, L. Wang, Y. Lu, Y. Liu, M. Wang, M. Yang, X. Jin, and C. Quan. 2013. The distinct expression patterns of claudin-2, -6, and -11 between human gastric neoplasms and adjacent non-neoplastic tissues. *Diagn Pathol*. 8:133.
- Liu, X., A. Clements, K. Zhao, and R. Marmorstein. 2006. Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Biol Chem*. 281:578-586.
- Lourenco, S.V., C.M. Coutinho-Camillo, M.E. Buim, C.M. Pereira, A.L. Carvalho, L.P. Kowalski, and F.A. Soares. 2010. Oral squamous cell carcinoma: status of tight junction claudins in the different histopathological patterns and relationship with clinical parameters. A tissue-microarray-based study of 136 cases. *J Clin Pathol*. 63:609-614.
- Ma, F., X. Ding, Y. Fan, J. Ying, S. Zheng, N. Lu, and B. Xu. 2014. A CLDN1-negative phenotype predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer. *PLoS One*. 9:e112765.
- Maeda, T., M. Murata, H. Chiba, A. Takasawa, S. Tanaka, T. Kojima, N. Masumori, T. Tsukamoto, and N. Sawada. 2012. Claudin-4-targeted therapy using *Clostridium perfringens* enterotoxin for prostate cancer. *Prostate*. 72:351-360.
- Mandel, L.J., R. Bacallao, and G. Zampighi. 1993. Uncoupling of the molecular 'fence' and paracellular 'gate' functions in epithelial tight junctions. *Nature*. 361:552-555.
- Martin-Padura, I., S. Lostaglio, M. Schneemann, L. Williams, M. Romano, P. Fruscella, C. Panzeri, A. Stoppacciaro, L. Ruco, A. Villa, D. Simmons, and E. Dejana. 1998. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol*. 142:117-127.
- Martinez-Palomo, A., I. Meza, G. Beaty, and M. Cerejido. 1980. Experimental modulation of occluding junctions in a cultured transporting epithelium. *J Cell Biol*. 87:736-745.

- Masuda, S., Y. Oda, H. Sasaki, J. Ikenouchi, T. Higashi, M. Akashi, E. Nishi, and M. Furuse. 2011. LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. *J Cell Sci.* 124:548-555.
- McBride, A.A. 2017. Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. *Biological chemistry.* 398:919-927.
- McCarthy, K.M., S.A. Francis, J.M. McCormack, J. Lai, R.A. Rogers, I.B. Skare, R.D. Lynch, and E.E. Schneeberger. 2000. Inducible expression of claudin-1-myc but not occludin-VSV-G results in aberrant tight junction strand formation in MDCK cells. *J Cell Sci.* 113 Pt 19:3387-3398.
- McClane, B.A. 1994. Clostridium perfringens enterotoxin acts by producing small molecule permeability alterations in plasma membranes. *Toxicology.* 87:43-67.
- McFarland, D.C. 2000. Preparation of pure cell cultures by cloning. *Methods Cell Sci.* 22:63-66.
- McLaughlin-Drubin, M.E., J. Meyers, and K. Munger. 2012. Cancer associated human papillomaviruses. *Curr Opin Virol.* 2:459-466.
- McLaughlin-Drubin, M.E., and K. Munger. 2009. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res.* 143:195-208.
- Meza, I., G. Ibarra, M. Sabanero, A. Martinez-Palomo, and M. Cereijido. 1980. Occluding junctions and cytoskeletal components in a cultured transporting epithelium. *J Cell Biol.* 87:746-754.
- Mietz, J.A., T. Unger, J.M. Huibregtse, and P.M. Howley. 1992. The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *EMBO J.* 11:5013-5020.
- Mittal, S., and L. Banks. 2017. Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 772:23-35.
- Mo, C., E.E. Schneeberger, and A.M. Arvin. 2000. Glycoprotein E of varicella-zoster virus enhances cell-cell contact in polarized epithelial cells. *J Virol.* 74:11377-11387.
- Moldvay, J., K. Fabian, M. Jackel, Z. Nemeth, K. Bogos, J. Furak, L. Tiszlavicz, J. Fillinger, B. Dome, and Z. Schaff. 2017. Claudin-1 Protein Expression Is a Good Prognostic Factor in Non-Small Cell Lung Cancer, but only in Squamous Cell Carcinoma Cases. *Pathol Oncol Res.* 23:151-156.
- Montgomery, E., A.J. Mamelak, M. Gibson, A. Maitra, S. Sheikh, S.S. Amr, S. Yang, M. Brock, A. Forastiere, S. Zhang, K.M. Murphy, and K.D. Berg. 2006. Overexpression of claudin proteins in esophageal adenocarcinoma and its precursor lesions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 14:24-30.
- Moreno, V., F.X. Bosch, N. Munoz, C.J. Meijer, K.V. Shah, J.M. Walboomers, R. Herrero, S. Franceschi, and G. International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study. 2002. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet.* 359:1085-1092.
- Morita, K., H. Sasaki, K. Fujimoto, M. Furuse, and S. Tsukita. 1999a. Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. *J Cell Biol.* 145:579-588.

- Morita, K., H. Sasaki, M. Furuse, and S. Tsukita. 1999b. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol.* 147:185-194.
- Morohashi, S., T. Kusumi, F. Sato, H. Odagiri, H. Chiba, S. Yoshihara, K. Hakamada, M. Sasaki, and H. Kijima. 2007. Decreased expression of claudin-1 correlates with recurrence status in breast cancer. *Int J Mol Med.* 20:139-143.
- Munger, K., A. Baldwin, K.M. Edwards, H. Hayakawa, C.L. Nguyen, M. Owens, M. Grace, and K. Huh. 2004. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* 78:11451-11460.
- Munger, K., W.C. Phelps, V. Bubba, P.M. Howley, and R. Schlegel. 1989a. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol.* 63:4417-4421.
- Munger, K., B.A. Werness, N. Dyson, W.C. Phelps, E. Harlow, and P.M. Howley. 1989b. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 8:4099-4105.
- Nakatani, Y., H. Konishi, A. Vassilev, H. Kurooka, K. Ishiguro, J. Sawada, T. Ikura, S.J. Korsmeyer, J. Qin, and A.M. Herlitz. 2005. p600, a unique protein required for membrane morphogenesis and cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:15093-15098.
- Narisawa-Saito, M., and T. Kiyono. 2007. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci.* 98:1505-1511.
- Nava, P., S. Lopez, C.F. Arias, S. Islas, and L. Gonzalez-Mariscal. 2004. The rotavirus surface protein VP8 modulates the gate and fence function of tight junctions in epithelial cells. *J Cell Sci.* 117:5509-5519.
- Nemeth, J., Z. Nemeth, P. Tatrai, I. Peter, A. Somoracz, A.M. Szasz, A. Kiss, and Z. Schaff. 2010. High expression of claudin-1 protein in papillary thyroid tumor and its regional lymph node metastasis. *Pathol Oncol Res.* 16:19-27.
- Nemeth, Z., A.M. Szasz, P. Tatrai, J. Nemeth, H. Gyorffy, A. Somoracz, A. Szijarto, P. Kupcsulik, A. Kiss, and Z. Schaff. 2009. Claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, and -10 protein expression in biliary tract cancers. *J Histochem Cytochem.* 57:113-121.
- Nitta, T., M. Hata, S. Gotoh, Y. Seo, H. Sasaki, N. Hashimoto, M. Furuse, and S. Tsukita. 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol.* 161:653-660.
- Noyce, R.S., S. Delpeut, and C.D. Richardson. 2013. Dog nectin-4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus that facilitates virus entry and syncytia formation. *Virology.* 436:210-220.
- Nunbhakdi-Craig, V., L. Craig, T. Machleidt, and E. Sontag. 2003. Simian virus 40 small tumor antigen induces deregulation of the actin cytoskeleton and tight junctions in kidney epithelial cells. *J Virol.* 77:2807-2818.
- Ohta, H., H. Adachi, M. Takiguchi, and M. Inaba. 2006. Restricted localization of claudin-16 at the tight junction in the thick ascending limb of Henle's loop together with claudins 3, 4, and 10 in bovine nephrons. *J Vet Med Sci.* 68:453-463.

- Ozbun, M.A., and C. Meyers. 1998. Human papillomavirus type 31b E1 and E2 transcript expression correlates with vegetative viral genome amplification. *Virology*. 248:218-230.
- Paavonen, J., P. Naud, J. Salmeron, C.M. Wheeler, S.N. Chow, D. Apter, H. Kitchener, X. Castellsague, J.C. Teixeira, S.R. Skinner, J. Hedrick, U. Jaisamrarn, G. Limson, S. Garland, A. Szarewski, B. Romanowski, F.Y. Aoki, T.F. Schwarz, W.A. Poppe, F.X. Bosch, D. Jenkins, K. Hardt, T. Zahaf, D. Descamps, F. Struyf, M. Lehtinen, G. Dubin, and H.P.S. Group. 2009. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet*. 374:301-314.
- Park, R.B., and E.J. Androphy. 2002. Genetic analysis of high-risk e6 in episomal maintenance of human papillomavirus genomes in primary human keratinocytes. *J Virol*. 76:11359-11364.
- Phelps, W.C., K. Munger, C.L. Yee, J.A. Barnes, and P.M. Howley. 1992. Structure-function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol*. 66:2418-2427.
- Phelps, W.C., C.L. Yee, K. Munger, and P.M. Howley. 1988. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell*. 53:539-547.
- Piontek, J., L. Winkler, H. Wolburg, S.L. Muller, N. Zuleger, C. Piehl, B. Wiesner, G. Krause, and I.E. Blasig. 2008. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J*. 22:146-158.
- Poliak, S., S. Matlis, C. Ullmer, S.S. Scherer, and E. Peles. 2002. Distinct claudins and associated PDZ proteins form different autotypic tight junctions in myelinating Schwann cells. *J Cell Biol*. 159:361-372.
- Rahner, C., L.L. Mitic, and J.M. Anderson. 2001. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology*. 120:411-422.
- Rajasekaran, A.K., M. Hojo, T. Huima, and E. Rodriguez-Boulan. 1996. Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. *J Cell Biol*. 132:451-463.
- Raleigh, D.R., A.M. Marchiando, Y. Zhang, L. Shen, H. Sasaki, Y. Wang, M. Long, and J.R. Turner. 2010. Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Mol Biol Cell*. 21:1200-1213.
- Ramirez, L., A. Betanzos, A. Raya-Sandino, L. Gonzalez-Mariscal, and R.M. Del Angel. 2018. Dengue virus enters and exits epithelial cells through both apical and basolateral surfaces and perturbs the apical junctional complex. *Virus Res*. 258:39-49.
- Raya-Sandino, A., A. Castillo-Kauil, A. Dominguez-Calderon, L. Alarcon, D. Flores-Benitez, F. Cuellar-Perez, B. Lopez-Bayghen, B. Chavez-Munguia, J. Vazquez-Prado, and L. Gonzalez-Mariscal. 2017. Zonula occludens-2 regulates Rho

- proteins activity and the development of epithelial cytoarchitecture and barrier function. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 1864:1714-1733.
- Ren, Y., Q. Wu, Y. Liu, X. Xu, and C. Quan. 2013. Gene silencing of claudin6 enhances cell proliferation and migration accompanied with increased MMP2 activity via p38 MAPK signaling pathway in human breast epithelium cell line HBL100. *Mol Med Rep.* 8:1505-1510.
- Resnick, M.B., T. Konkin, J. Routhier, E. Sabo, and V.E. Pricolo. 2005. Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Mod Pathol.* 18:511-518.
- Riley, R.R., S. Duensing, T. Brake, K. Munger, P.F. Lambert, and J.M. Arbeit. 2003. Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer Res.* 63:4862-4871.
- Rindler, M.J., I.E. Ivanov, H. Plesken, E. Rodriguez-Boulan, and D.D. Sabatini. 1984. Viral glycoproteins destined for apical or basolateral plasma membrane domains traverse the same Golgi apparatus during their intracellular transport in doubly infected Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol.* 98:1304-1319.
- Rosenthal, R., S. Milatz, S.M. Krug, B. Oelrich, J.D. Schulzke, S. Amasheh, D. Gunzel, and M. Fromm. 2010. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J Cell Sci.* 123:1913-1921.
- Roth, M.G., and R.W. Compans. 1981. Delayed appearance of pseudotypes between vesicular stomatitis virus influenza virus during mixed infection of MDCK cells. *J Virol.* 40:848-860.
- Russ, P.K., C.J. Pino, C.S. Williams, D.M. Bader, F.R. Haselton, and M.S. Chang. 2011. Bves modulates tight junction associated signaling. *PLoS One.* 6:e14563.
- Sakakibara, A., M. Furuse, M. Saitou, Y. Ando-Akatsuka, and S. Tsukita. 1997. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol.* 137:1393-1401.
- Sanada, Y., K. Yoshida, and H. Itoh. 2007. Comparison of CT enhancement patterns and histologic features in hepatocellular carcinoma up to 2 cm: assessment of malignant potential with claudin-10 immunohistochemistry. *Oncol Rep.* 17:1177-1182.
- Sanchez-Pulido, L., F. Martin-Belmonte, A. Valencia, and M.A. Alonso. 2002. MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends Biochem Sci.* 27:599-601.
- Sappayatosok, K., and E. Phattarataratip. 2015. Overexpression of Claudin-1 is Associated with Advanced Clinical Stage and Invasive Pathologic Characteristics of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Head Neck Pathol.* 9:173-180.
- Scheffner, M., U. Nuber, and J.M. Huibregtse. 1995. Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature.* 373:81-83.
- Schiffman, M., P.E. Castle, J. Jeronimo, A.C. Rodriguez, and S. Wacholder. 2007. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 370:890-907.
- Schoenenberger, C.A., A. Zuk, D. Kendall, and K.S. Matlin. 1991. Multilayering and loss of apical polarity in MDCK cells transformed with viral K-ras. *J Cell Biol.* 112:873-889.

- Shang, X., X. Lin, E. Alvarez, G. Manorek, and S.B. Howell. 2012. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 control tumor growth and metastases. *Neoplasia*. 14:974-985.
- Sheehan, G.M., B.V. Kallakury, C.E. Sheehan, H.A. Fisher, R.P. Kaufman, Jr., and J.S. Ross. 2007. 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.
- Shibutani, M., E. Noda, K. Maeda, H. Nagahara, H. Ohtani, and K. Hirakawa. 2013. Low expression of claudin-1 and presence of poorly-differentiated tumor clusters correlate with poor prognosis in colorectal cancer. *Anticancer Res*. 33:3301-3306.
- Shiozaki, A., H. Shimizu, D. Ichikawa, H. Konishi, S. Komatsu, T. Kubota, H. Fujiwara, K. Okamoto, D. Itaka, S. Nakashima, Y. Nako, M. Liu, and E. Otsuji. 2014. Claudin 1 mediates tumor necrosis factor alpha-induced cell migration in human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol*. 20:17863-17876.
- Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal. 2020. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 70:7-30.
- Simard, A., E. Di Pietro, C.R. Young, S. Plaza, and A.K. Ryan. 2006. Alterations in heart looping induced by overexpression of the tight junction protein Claudin-1 are dependent on its C-terminal cytoplasmic tail. *Mech Dev*. 123:210-227.
- Simonson, S.J., M.J. Difilippantonio, and P.F. Lambert. 2005. Two distinct activities contribute to human papillomavirus 16 E6's oncogenic potential. *Cancer Res*. 65:8266-8273.
- Smith, J.S., L. Lindsay, B. Hoots, J. Keys, S. Franceschi, R. Winer, and G.M. Clifford. 2007. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*. 121:621-632.
- Sobel, G., C. Paska, I. Szabo, A. Kiss, A. Kadar, and Z. Schaff. 2005a. Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Hum Pathol*. 36:162-169.
- Sobel, G., I. Szabo, C. Paska, A. Kiss, I. Kovalszky, A. Kadar, F. Paulin, and Z. Schaff. 2005b. Changes of cell adhesion and extracellular matrix (ECM) components in cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Oncol Res*. 11:26-31.
- Soma, T., H. Chiba, Y. Kato-Mori, T. Wada, T. Yamashita, T. Kojima, and N. Sawada. 2004. Thr(207) of claudin-5 is involved in size-selective loosening of the endothelial barrier by cyclic AMP. *Exp Cell Res*. 300:202-212.
- Song, S., A. Liem, J.A. Miller, and P.F. Lambert. 2000. Human papillomavirus types 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis. *Virology*. 267:141-150.
- Song, S., H.C. Pitot, and P.F. Lambert. 1999. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *J Virol*. 73:5887-5893.
- Sonoda, N., M. Furuse, H. Sasaki, S. Yonemura, J. Katahira, Y. Horiguchi, and S. Tsukita. 1999. Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol*. 147:195-204.

- Stanley, M.A., M.R. Pett, and N. Coleman. 2007. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans.* 35:1456-1460.
- Steed, E., N.T. Rodrigues, M.S. Balda, and K. Matter. 2009. Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *BMC Cell Biol.* 10:95.
- Steger, G., and S. Corbach. 1997. Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J Virol.* 71:50-58.
- Steinau, M., M.S. Rajeevan, D.R. Lee, M.T. Ruffin, I.R. Horowitz, L.C. Flowers, T. Tadros, G. Birdsong, M. Husain, D.C. Kmak, G.M. Longton, S.D. Vernon, and E.R. Unger. 2007. Evaluation of RNA markers for early detection of cervical neoplasia in exfoliated cervical cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16:295-301.
- Stephens, E.B., R.W. Compans, P. Earl, and B. Moss. 1986. Surface expression of viral glycoproteins is polarized in epithelial cells infected with recombinant vaccinia viral vectors. *EMBO J.* 5:237-245.
- Stubenrauch, F., and L.A. Laimins. 1999. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol.* 9:379-386.
- Stubenrauch, F., H.B. Lim, and L.A. Laimins. 1998. Differential requirements for conserved E2 binding sites in the life cycle of oncogenic human papillomavirus type 31. *J Virol.* 72:1071-1077.
- Sun, B.S., Y.Q. Yao, B.X. Pei, Z.F. Zhang, and C.L. Wang. 2016. Claudin-1 correlates with poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Thorac Cancer.* 7:556-563.
- Sun, L., L. Feng, and J. Cui. 2018. Increased expression of claudin-17 promotes a malignant phenotype in hepatocyte via Tyk2/Stat3 signaling and is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Diagn Pathol.* 13:72.
- Suren, D., M. Yildirim, V. Kaya, A.S. Alikanoglu, N. Bulbuller, M. Yildiz, and C. Sezer. 2014. Loss of tight junction proteins (Claudin 1, 4, and 7) correlates with aggressive behavior in colorectal carcinoma. *Med Sci Monit.* 20:1255-1262.
- Suzuki, H., T. Nishizawa, K. Tani, Y. Yamazaki, A. Tamura, R. Ishitani, N. Dohmae, S. Tsukita, O. Nureki, and Y. Fujiyoshi. 2014. Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science.* 344:304-307.
- Svensson, L., B.B. Finlay, D. Bass, C.H. von Bonsdorff, and H.B. Greenberg. 1991. Symmetric infection of rotavirus on polarized human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Virol.* 65:4190-4197.
- Szasz, A.M., A.M. Tokes, M. Micsinai, T. Krenacs, C. Jakab, L. Lukacs, Z. Nemeth, Z. Baranyai, K. Dede, L. Madaras, and J. Kulka. 2011. Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 28:55-63.
- Szekely, E., P. Torzsok, P. Riesz, A. Korompay, A. Fintha, T. Szekely, G. Lotz, P. Nyirady, I. Romics, J. Timar, Z. Schaff, and A. Kiss. 2011. Expression of claudins and their prognostic significance in noninvasive urothelial neoplasms of the human urinary bladder. *J Histochem Cytochem.* 59:932-941.

- Tafazoli, F., C.Q. Zeng, M.K. Estes, K.E. Magnusson, and L. Svensson. 2001. NSP4 enterotoxin of rotavirus induces paracellular leakage in polarized epithelial cells. *J Virol.* 75:1540-1546.
- Taketo, M., A.C. Schroeder, L.E. Mobraaten, K.B. Gunning, G. Hanten, R.R. Fox, T.H. Roderick, C.L. Stewart, F. Lilly, C.T. Hansen, and et al. 1991. FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 88:2065-2069.
- Tan, T.M., B. Gloss, H.U. Bernard, and R.C. Ting. 1994. Mechanism of translation of the bicistronic mRNA encoding human papillomavirus type 16 E6-E7 genes. *The Journal of general virology.* 75 (Pt 10):2663-2670.
- Tanaka, A., T. Noda, H. Yajima, M. Hatanaka, and Y. Ito. 1989. Identification of a transforming gene of human papillomavirus type 16. *Journal of virology.* 63:1465-1469.
- Tatum, R., Y. Zhang, Q. Lu, K. Kim, B.G. Jeansonne, and Y.H. Chen. 2007. WNK4 phosphorylates ser(206) of claudin-7 and promotes paracellular Cl(-) permeability. *FEBS Lett.* 581:3887-3891.
- Tavares, S., A.F. Vieira, A.V. Taubenberger, M. Araújo, N.P. Martins, C. Brás-Pereira, A. Polónia, M. Herbig, C. Barreto, O. Otto, J. Cardoso, J.B. Pereira-Leal, J. Guck, J. Paredes, and F. Janody. 2017. Actin stress fiber organization promotes cell stiffening and proliferation of pre-invasive breast cancer cells. *Nature Communications.* 8:15237.
- Thomas, D.M., H.S. Yang, K. Alexander, and P.W. Hinds. 2003. Role of the retinoblastoma protein in differentiation and senescence. *Cancer Biol Ther.* 2:124-130.
- Thomas, J.T., W.G. Hubert, M.N. Ruesch, and L.A. Laimins. 1999. Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:8449-8454.
- Thomas, M., M.P. Myers, P. Massimi, C. Guarnaccia, and L. Banks. 2016. Analysis of Multiple HPV E6 PDZ Interactions Defines Type-Specific PDZ Fingerprints That Predict Oncogenic Potential. *PLoS pathogens.* 12:e1005766.
- Tokes, A.M., A.M. Szasz, E. Juhasz, Z. Schaff, L. Harsanyi, I.A. Molnar, Z. Baranyai, I. Besznyak, Jr., A. Zarand, F. Salamon, and J. Kulka. 2012. Expression of tight junction molecules in breast carcinomas analysed by array PCR and immunohistochemistry. *Pathol Oncol Res.* 18:593-606.
- Tokuhara, Y., T. Morinishi, T. Matsunaga, H. Ohsaki, Y. Kushida, R. Haba, and E. Hirakawa. 2015. Claudin-1, but not claudin-4, exhibits differential expression patterns between well- to moderately-differentiated and poorly-differentiated gastric adenocarcinoma. *Oncol Lett.* 10:93-98.
- Toyli, M., L. Rosberg-Kulha, J. Capra, J. Vuoristo, and S. Eskelinen. 2010. Different responses in transformation of MDCK cells in 2D and 3D culture by v-Src as revealed by microarray techniques, RT-PCR and functional assays. *Lab Invest.* 90:915-928.
- Tsukita, S., M. Furuse, and M. Itoh. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:285-293.

- Tsukita, S., H. Tanaka, and A. Tamura. 2019. The Claudins: From Tight Junctions to Biological Systems. *Trends Biochem Sci.* 44:141-152.
- Tzelepi, V.N., A.C. Tsamandas, H.D. Vlotinou, C.E. Vagianos, and C.D. Scopa. 2008. Tight junctions in thyroid carcinogenesis: diverse expression of claudin-1, claudin-4, claudin-7 and occludin in thyroid neoplasms. *Mod Pathol.* 21:22-30.
- Umeda, K., J. Ikenouchi, S. Katahira-Tayama, K. Furuse, H. Sasaki, M. Nakayama, T. Matsui, S. Tsukita, M. Furuse, and S. Tsukita. 2006. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell.* 126:741-754.
- Van Itallie, C., C. Rahner, and J.M. Anderson. 2001. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest.* 107:1319-1327.
- Van Itallie, C.M., A.S. Fanning, and J.M. Anderson. 2003. Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am J Physiol Renal Physiol.* 285:F1078-1084.
- Van Itallie, C.M., T.M. Gambling, J.L. Carson, and J.M. Anderson. 2005. Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization. *J Cell Sci.* 118:1427-1436.
- Van Itallie, C.M., L.L. Mitic, and J.M. Anderson. 2011. Claudin-2 forms homodimers and is a component of a high molecular weight protein complex. *J Biol Chem.* 286:3442-3450.
- Van Itallie, C.M., S. Rogan, A. Yu, L.S. Vidal, J. Holmes, and J.M. Anderson. 2006. Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *Am J Physiol Renal Physiol.* 291:F1288-1299.
- van Meer, G., and K. Simons. 1986. The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *EMBO J.* 5:1455-1464.
- Vazquez-Ortiz, G., C.J. Ciudad, P. Pina, K. Vazquez, A. Hidalgo, B. Alatorre, J.A. Garcia, F. Salamanca, R. Peralta-Rodriguez, A. Rangel, and M. Salcedo. 2005. Gene identification by cDNA arrays in HPV-positive cervical cancer. *Arch Med Res.* 36:448-458.
- Vousden, K.H., J. Doniger, J.A. DiPaolo, and D.R. Lowy. 1988. The E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 encodes a transforming gene. *Oncogene Res.* 3:167-175.
- Wang, H., and X. Yang. 2015. The expression patterns of tight junction protein claudin-1, -3, and -4 in human gastric neoplasms and adjacent non-neoplastic tissues. *Int J Clin Exp Pathol.* 8:881-887.
- Wang, X., X. Huang, and Y. Zhang. 2018. Involvement of Human Papillomaviruses in Cervical Cancer. *Front Microbiol.* 9:2896.
- Watanabe, S., and K. Yoshiike. 1988. Transformation of rat 3Y1 cells by human papillomavirus type-18 DNA. *International journal of cancer.* 41:896-900.
- Watson, R.E., R. Poddar, J.M. Walker, I. McGuill, L.M. Hoare, C.E. Griffiths, and A. O'Neill C. 2007. Altered claudin expression is a feature of chronic plaque psoriasis. *J Pathol.* 212:450-458.

- Webb, P.G., M.A. Spillman, and H.K. Baumgartner. 2013. Claudins play a role in normal and tumor cell motility. *BMC Cell Biol.* 14:19.
- Weeraratna, A.T., D. Becker, K.M. Carr, P.H. Duray, K.P. Rosenblatt, S. Yang, Y. Chen, M. Bittner, R.L. Strausberg, G.J. Riggins, U. Wagner, O.P. Kallioniemi, J.M. Trent, P.J. Morin, and P.S. Meltzer. 2004. Generation and analysis of melanoma SAGE libraries: SAGE advice on the melanoma transcriptome. *Oncogene.* 23:2264-2274.
- Werness, B.A., A.J. Levine, and P.M. Howley. 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* 248:76-79.
- Winkler, L., C. Gehring, A. Wenzel, S.L. Muller, C. Piehl, G. Krause, I.E. Blasig, and J. Piontek. 2009. Molecular determinants of the interaction between *Clostridium perfringens* enterotoxin fragments and claudin-3. *J Biol Chem.* 284:18863-18872.
- Woodman, C.B., S.I. Collins, and L.S. Young. 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer.* 7:11-22.
- Wu, X., W. Xiao, and J.L. Brandsma. 1994. Papilloma formation by cottontail rabbit papillomavirus requires E1 and E2 regulatory genes in addition to E6 and E7 transforming genes. *J Virol.* 68:6097-6102.
- Yasumoto, S., A.L. Burkhardt, J. Doniger, and J.A. DiPaolo. 1986. Human papillomavirus type 16 DNA-induced malignant transformation of NIH 3T3 cells. *J Virol.* 57:572-577.
- Yim, E.K., and J.S. Park. 2005. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer Res Treat.* 37:319-324.
- Zhang, Z., A. Wang, B. Sun, Z. Zhan, K. Chen, and C. Wang. 2013a. Expression of CLDN1 and CLDN10 in lung adenocarcinoma in situ and invasive lepidic predominant adenocarcinoma. *J Cardiothorac Surg.* 8:95.
- Zhang, Z.F., B.X. Pei, A.L. Wang, L.M. Zhang, B.S. Sun, R.C. Jiang, and C.L. Wang. 2013b. Expressions of CLDN1 and insulin-like growth factor 2 are associated with poor prognosis in stage N2 non-small cell lung cancer. *Chin Med J (Engl).* 126:3668-3674.
- Zhou, Y., J. Xiang, A. Bhandari, Y. Guan, E. Xia, X. Zhou, Y. Wang, and O. Wang. 2018. CLDN10 is Associated with Papillary Thyroid Cancer Progression. *J Cancer.* 9:4712-4717.
- Zihni, C., C. Mills, K. Matter, and M.S. Balda. 2016. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 17:564-580.
- Zinner, B., B. Gyongyosi, E. Babarczy, A. Kiss, and G. Sobel. 2013. Claudin 1 expression characterizes human uterine cervical reserve cells. *J Histochem Cytochem.* 61:880-888.
- zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2:342-350.
- Zwanziger, D., J. Badziong, S. Ting, L.C. Moeller, K.W. Schmid, U. Siebolts, C. Wickenhauser, H. Dralle, and D. Fuehrer. 2015. The impact of CLAUDIN-1 on follicular thyroid carcinoma aggressiveness. *Endocr Relat Cancer.* 22:819-830.