



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

CARRERA DE BIOLOGÍA

***EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE CLDN-1 EN LA
ACTIVACIÓN DE MMP-2 EN CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO HUMANO***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

PRESENTA

ASHLIN NINIBETH LARA HOLGUÍN

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ÉRIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA



México, DF., Octubre de 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El trabajo experimental del presente proyecto de tesis de licenciatura, fue realizado en el Laboratorio de Inmunobiología, perteneciente al Departamento de Biología Celular y Tisular, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, y fue parcialmente financiado por PAPIIT.

Agradecimientos

A mis padres

Gracias por siempre apoyarme en todo, tanto económica como personalmente, por sus consejos, enseñanzas y regaños, por siempre impulsarme a ser la mejor, a nunca rendirme y a seguir mis sueños, sin ustedes ni éste, ni ningún logro serían posibles, los amo papá y mamá.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al pueblo de México

A la UNAM por darme la oportunidad de aprender y formarme en sus aulas y laboratorios, y al pueblo de México, por contribuir a que personas de bajos recursos como yo, puedan estudiar de forma gratuita la carrera que les apasiona y les llena, y no sólo eso, sino por las becas y apoyos recibidos a lo largo de mis 4 años en la universidad, pero sobre todo, porque estar en la UNAM me permitió vivir la experiencia más maravillosa de mi vida, que fue mi intercambio académico de un semestre a la Universidad de Valencia en España.

A mi novio

El estar en la UNAM me permitió no sólo cumplir mi sueño de ser Bióloga, sino además conocer al hombre con quien quiero compartir mi vida. Gracias por tus consejos, tu apoyo académico y emocional, por estar a mi lado en mis mejores y peores momentos, por todas las experiencias maravillosas que me has regalado a lo largo de éstos 4 años que hemos compartido, y los que faltan mi amor!, te amo Arturo.

A mis amig@s

A Susana y Bianca por todas las sonrisas y momentos agradables que me han regalado desde hace casi 10 años que hemos compartido de amistad, su apoyo y amistad son invaluable, las amo hermanas. A mis amigos de la FESI Ricardo, Yesenia, Alejandro (el chino), Leonardo, Luis Miguel, Elena, Sara, Luis Islas, Andrea y Paty, por todos esos momentos geniales que compartimos en la escuela y en las fiestas, son los mejores!. Y finalmente a mis amigos que conocí en Europa durante mi intercambio académico: Alejandra, Maarten, Emily, Maykel, Mauro, Natalia, Juliana, Niko, Oona, Conrado, Vero, Rosita, Mariska, Dave, Merlijn, gracias por más que amigos, ser mi familia durante mi estancia. Les quiero mucho a tod@s.

A mis Asesores

Gracias Dra. Érika Rendón y Dr. Luis Montaña, por darme la oportunidad de ingresar a su laboratorio, por todas sus enseñanzas profesionales, por complementar mi formación como bióloga, y sobre todo, por ir más allá de las funciones de un tutor académico, y darme muchos consejos de vida, apoyarme a nivel personal, y convertirse en buenos amigos.

A mis sinodales

Por sus sugerencias para el mejoramiento de la presente Tesis de Licenciatura: Al Dr. Elías Piedra, al Dr. Felipe Vaca Paniagua, a la Dra. Irasema Chirino y a la Mtra. Teresa Ortiz.

A mis compañeros de laboratorio

Por sus enseñanzas para el trabajo en el laboratorio y teórico, pero sobre todo, por hacer mis días de trabajo en nuestro laboratorio más agradables con alguna plática, muchas risas, y juegos, no podría pedir mejores compañeros que ustedes: Anita, Pris, Cecy, Rosita, Paco, Marilú, Jahaziel, Ely, Pris chiquita y Cris.

ÍNDICE

1. RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN	10
2.1 Generalidades del cáncer.....	10
2.2 Cáncer gástrico.....	11
2.3 Las uniones estrechas.....	12
2.4 Las Claudinas.....	13
2.5 Claudinas y cáncer.....	14
2.6 Metástasis e invasión tumoral.....	17
2.7 Metaloproteasas.....	20
Metaloproteasa 2.....	21
3. ANTECEDENTES	23
4. JUSTIFICACIÓN	24
5. HIPÓTESIS	25
6. OBJETIVOS	26
6.1 Objetivo general.....	26
6.2 Objetivos particulares.....	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS	27
7.1 Cultivos celulares.....	27
7.2 Expresión endógena de CLDN-1 a nivel de RNAm.....	27
7.2.1 Extracción de RNA.....	27
7.2.2 Rt-PCR de punto final.....	27
7.3 Expresión endógena de CLDN-1 y MMP-2 a nivel de Proteína.....	28
7.3.1 Extracción de Proteína celular total.....	28
7.3.2 Western Blot.....	28
7.4 Silenciamiento de la expresión de CLDN -1.....	29
7.5 Actividad de MMP-2 presente en medio condicionado.....	29
7.6 Análisis de datos.....	30

8. RESULTADOS	31
8.1 <i>La expresión endógena de CLDN -1 y MMP -2 está incrementada en las células AGS/CLDN6 y AGS/CLDN9</i>	31
8.2 <i>Silenciamiento de CLDN -1 en células AGS</i>	33
8.3 <i>El silenciamiento de CLDN -1, disminuye la actividad de MMP -2 presente en los medios condicionados de todas las células</i>	37
8.4 <i>Un fragmento de la secuencia proteica del dominio extracelular 1 de CLDN -1, tiene una identidad del 21% con parte del dominio carboxilo terminal de pro-MMP -2, mientras que una región del dominio extracelular 2 de CLDN -1 tiene una identidad del 30% con una región del dominio catalítico de MMP -14</i>	38
9. DISCUSIÓN	40
10. CONCLUSIONES	47
11. PERSPECTIVAS	48
12. LITERATURA CITADA	49
13. ANEXOS	53

ÍNDICE DE FIGURAS

- ❖ **Figura 1.** Las características del cáncer.
- ❖ **Figura 2.** Modelo simplificado de las uniones estrechas encontradas en la barrera epitelial.
- ❖ **Figura 3.** Representación esquemática del monómero de Claudina.
- ❖ **Figura 4.** Cambios en la expresión de algunas CLDNs en diferentes carcinomas humanos.
- ❖ **Figura 5.** El papel de las CLDNs en cáncer.
- ❖ **Figura 6.** Cascada metastásica.
- ❖ **Figura 7.** Cambios que ocurren en las células tumorales, conducen a TEM y metástasis en un sitio secundario.
- ❖ **Figura 8.** Diversidad de MMPs humanas.
- ❖ **Figura 9.** Mecanismo para la activación de pro-MMP -2.
- ❖ **Figura 10.** Expresión endógena a nivel de proteína de CLDN -1.
- ❖ **Figura 11.** Expresión endógena a nivel de proteína de MMP -2.
- ❖ **Figura 12.** Control de transfección de siRNA.
- ❖ **Figura 13.** Silenciamiento de CLDN -1 a nivel de proteína.
- ❖ **Figura 14.** Integridad de RNA.
- ❖ **Figura 15.** Silenciamiento de CLDN -1 a nivel de RNAm.
- ❖ **Figura 16.** Actividad de MMP -2 presente en medios condicionados.
- ❖ **Figura 17.** Alineamiento de las secuencias protéicas de pro-MMP -2 y CLDN -1.
- ❖ **Figura 18.** Alineamiento de las secuencias protéicas de MMP -14 y CLDN -1.
- ❖ **Figura 19.** Ilustración del incremento en la expresión de CLDN -1 y MMP -2 en las células AGS que sobreexpresan a CLDNs -6 y -9.
- ❖ **Figura 20.** Modelo del probable mecanismo en el que participa CLDN -1 para la activación de MMP -2.

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido.
AGS	Células de adenocarcinoma gástrico humano.
AGS+siRNA	Células de adenocarcinoma gástrico humano, transfectadas con el RNA de interferencia de Claudina 1.
AGS/CLDN6	Células de adenocarcinoma gástrico humano, que sobreexpresan a Claudina 6.
AGS/CLDN6+siRNA	Células de adenocarcinoma gástrico humano, que sobreexpresan a Claudina 6, transfectadas con el RNA de interferencia de Claudina 1.
AGS/CLDN9	Células de adenocarcinoma gástrico humano, que sobreexpresan a Claudina 9.
AGS/CLDN9+siRNA	Células de adenocarcinoma gástrico humano, que sobreexpresan a Claudina 9, transfectadas con el RNA de interferencia de Claudina 1.
AGS/GFP	Células de adenocarcinoma gástrico humano, que expresan a GFP.
AGS/GFP+siRNA	Células de adenocarcinoma gástrico humano, que expresan a GFP, transfectadas con el RNA de interferencia de Claudina 1.
CAM	Moléculas de adhesión celular (Cell adhesion molecules).
c-DNA	Ácido desoxirribonucleico complementario (Complementary deoxyribonucleic acid).
CLDN	Claudina.
DMEM	Medio Eagle de Dubblecco modificado (Dulbecco's Modified Eagle Medium).
GFP	Proteína verde fluorescente (Green fluorescent protein).
INC	Instituto Nacional del Cáncer.
mA	Mili amperios.
MEC	Matriz extracelular.

mM	Mili molar.
MMP	Metaloproteasa.
NCBI	Centro nacional para información biotecnológica (National Center for Biotechnology Information).
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction).
Pro-MMP-2	Pro metaloproteasa 2.
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA (RNA-induced silencing complex).
RNA	Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid).
RNA_m	RNA Mensajero.
RNA_r	RNA Ribosomal.
RTE	Resistencia transepitelial.
rt-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (Reverse transcription polymerase chain reaction).
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis).
siRNA	RNA de interferencia pequeño (Small interfering RNA).
TBS	Amortiguador Tris-salino(Tris-buffered saline).
TEM	Transición epitelio mesénquima.
TIMP -2	Inhibidor de metaloproteasa 2 de tejido (Tissue inhibitor of metalloproteinase 2).
TME	Transición mesénquima epitelio.
UE	Uniones estrechas.
WHO	Organización mundial de la salud (World Health Organization).
ZO	Zonula Ocludens.



1. RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. El cáncer gástrico es considerado el cuarto más común, y la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo. Alrededor del 95% de cánceres gástricos son adenocarcinomas, los cuales exhiben, entre otros fenotipos, expresión aberrante de proteínas de las uniones estrechas (UE). Las UE son el elemento más apical del complejo de unión intercelular en las células epiteliales y endoteliales. Forman una barrera al movimiento paracelular de iones, solutos, agua y células inmunes, separando el flujo entre los compartimentos apical y basolateral. Las Claudinas (CLDNs) juegan un rol crucial en la formación, integridad y función de las uniones estrechas, y alteraciones en su expresión han sido fuertemente asociadas al desarrollo de cáncer y activación de metaloproteasas (MMPs). El objetivo de éste estudio fue evaluar el efecto del silenciamiento de CLDN -1 en la activación de MMP -2, en células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) que sobreexpresan a CLDNs -6 y -9. Se encontró que la expresión endógena de CLDN -1 y MMP -2 está incrementada en las células AGS/CLDN6 y AGS/CLDN9, asimismo, una vez silenciada la expresión de CLDN -1, se vio disminuida la actividad de MMP -2 presente en los medios condicionados de todas las células. Se realizaron alineamientos de secuencias protéicas, observando que un fragmento del dominio extracelular 1 de CLDN -1, tiene una identidad del 21% con parte del dominio carboxilo terminal de pro-MMP -2, mientras que una región del dominio extracelular 2 de CLDN -1 tiene una identidad del 30% con una región del dominio catalítico de MMP -14. El conjunto de ésta información ha permitido proponer que CLDN -1 es importante para la activación de MMP -2 en células AGS, y que el mecanismo de acción puede ser similar al de activación clásica de MMP -2 mediada por TIMP -2.

Palabras clave: Claudina 1, pro-MMP -2, MMP -2, cáncer gástrico, células AGS.



2. INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Corresponde a un conjunto de enfermedades relacionadas entre sí, que surgen como resultado de la acumulación de daños genéticos o epigenéticos en el genoma que alteran múltiples vías de señalización celular involucradas en el ciclo celular, la muerte celular programada, entre otros. En todos los tipos de cáncer, las células tumorales comienzan a dividirse sin control y se diseminan a otros tejidos (INC, 2015; WHO, 2015). En los últimos años, la revolución en la investigación oncológica ha mostrado que tras la gran variabilidad clínica y biológica de los tumores malignos, hay una serie de mecanismos bioquímicos comunes y un fenotipo crucial característico de las células tumorales (Fig. 1). Hoy en día se sabe que existen miles de mutaciones puntuales, translocaciones, amplificaciones y deleciones genéticas que pueden contribuir al desarrollo de cáncer (Cairns, *et al.*, 2011)



Figura 1. Las características del cáncer. Se muestra el fenotipo característico de las células cancerosas, como resistencia a la muerte celular, inestabilidad genómica, etc (Modificado de Hanahan y Weinberg, 2011).



Los distintos tipos de cáncer se pueden clasificar de dos formas: por el órgano de localización primaria donde se desarrolló el cáncer, por ejemplo, cáncer de mama, de hígado, etc., y por el tipo de tejido del cual se origina (histológica). Dentro de la clasificación histológica hay cientos de cánceres diferentes, agrupados en 6 categorías: carcinoma, sarcoma, mieloma, leucemia, linfoma y tipos mixtos (INC, 2015).

2.2 Cáncer gástrico

De la gran variedad de tipos de cáncer que afectan a la población, el gástrico es considerado el cuarto cáncer más común, y la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo. Cerca de un millón de nuevos casos de cáncer gástrico son diagnosticados anualmente en el mundo. Aunque en los últimos años la incidencia de cáncer gástrico ha declinado, la esperanza de los pacientes es baja, debido a que en estadios tempranos, éste tipo de cáncer es asintomático, además, existen pocos marcadores diagnósticos que puedan ayudar a la detección temprana, pronóstico y predicción de quimioresistencia (Lin, *et al.*, 2012)

Alrededor del 95% de cánceres gástricos son adenocarcinomas, el 5% restante incluye linfomas y leiomiomas (WHO, 2015). El carcinoma se refiere a una neoplasia maligna de origen epitelial, la cual exhibe funciones celulares alteradas, así como expresión aberrante de proteínas de las uniones estrechas (UE) (Kwon, 2013). Pese a que las UE son importantes en el desarrollo del adenocarcinoma, las proteínas que las constituyen, no son parte del set de biomarcadores diagnósticos y pronósticos que actualmente se pueden detectar en sangre, fluidos gástricos y biopsias, como son, los marcadores clásicos, entre los que se encuentran el antígeno carcinoembrionario y el antígeno de cáncer 19-9, mientras algunos factores de crecimiento, citocinas, microRNAs, e hipometilación del DNA, han sido propuestos como marcadores novedosos (Jin, *et al.*, 2015). Sin embargo, se ha reportado expresión aberrante de proteínas constituyentes de las UE como claudinas (CLDNs), ocludinas y zonula ocludens (ZO), en biopsias de pacientes y en modelos de cáncer gástrico (Martin y Jiang, 2009), lo cual habla de su posible potencial como biomarcadores.



2.3 Las uniones estrechas

Las superficies internas y externas de los órganos están cubiertas por epitelio. Se dice que las células que forman el tejido epitelial están polarizadas, porque sus membranas plasmáticas están organizadas en regiones separadas (apical, basal y lateral). Todas las células epiteliales en una lámina, están conectadas entre sí y con la matriz extracelular mediante uniones especializadas, formadas por acumulaciones densas de moléculas de adhesión celular (CAM). Las diferentes uniones intercelulares, como son, las uniones estrechas, las uniones adherentes, las uniones de hendidura, los desmosomas y hemidesmosomas, además de conferir fuerza y rigidez al tejido, permiten la comunicación de iones y moléculas entre los espacios extracelular e intracelular (Lodish, *et al.*, 2007).

Las UE (Fig. 2) son el elemento más apical del complejo de unión intercelular en las células epiteliales y endoteliales. Forman una barrera al movimiento paracelular de iones, solutos, agua y células inmunes, separando el flujo entre los compartimentos apical y basolateral en lados opuestos de la capa de células; por lo tanto, son las encargadas de mantener la polaridad celular apical-basal al restringir el libre movimiento de moléculas entre ambas superficies (Escudero-Esparza, *et al.*, 2011). Asimismo, su interacción con proteínas citoplasmáticas y de citoesqueleto, les permiten estar involucradas en vías de transducción de señales que regulan la polaridad celular, el crecimiento y la apoptosis. Las uniones estrechas están integradas por proteínas transmembranales, tales como claudinas (CLDNs), ocludinas y moléculas JAM (*junctional adhesion molecules*) (Iravani, *et al.*, 2013).

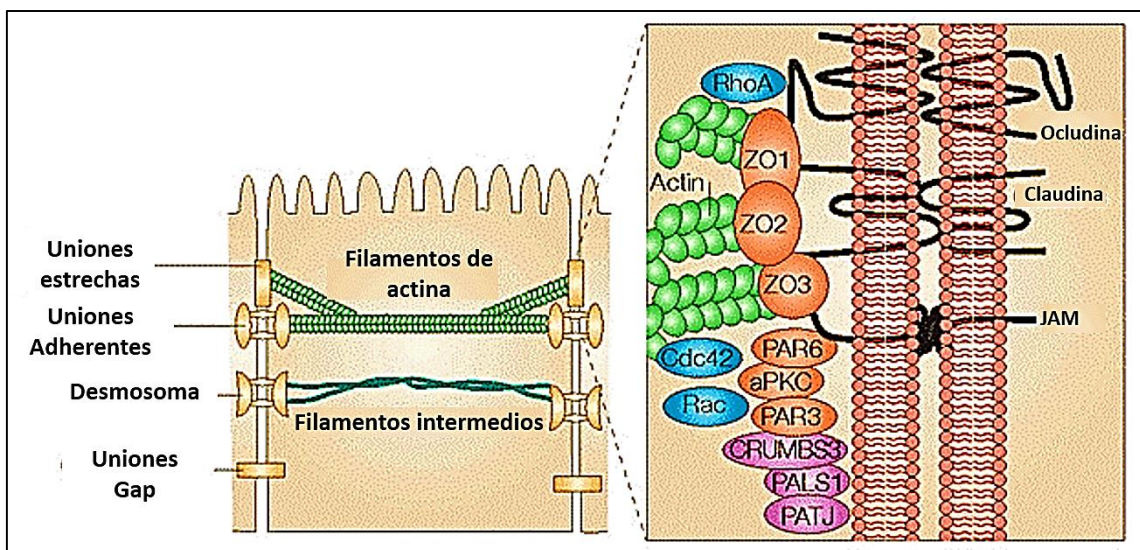


Figura 2. Modelo simplificado de las uniones estrechas encontradas en la barrera epitelial. La función de barrera de los epitelios, depende principalmente de las uniones estrechas, las cuales están conectadas con el citoesqueleto de actina (Figura de la izquierda). Tres tipos de proteínas transmembranales son parte de las uniones estrechas: Ocludinas, claudinas y JAMs. Éstas están conectadas a proteínas adaptadoras, tales como ZO1, ZO2, ZO3 (zonula ocludens 1, 2 y 3). Muchas proteínas adicionales son también esenciales, incluyendo PAR6 (*Partitioning defective protein 6*), aPKC (*Atypical Ca²⁺- and diacylglycerol-independent protein kinase C*), y PAR3. Éste complejo, que es importante para la polaridad celular, es regulado por Cdc42, como el complejo CRUMBS3-PALS1-PATJ, el cual es esencial para el ensamble de las uniones estrechas. El papel preciso de RhoA y Rac en la regulación de las uniones estrechas no se conoce; sin embargo, recientemente se ha sugerido que la fosforilación de ocludina dependiente de RhoA, es crucial para la función de las uniones estrechas (Modificado de Aktories y Barbieri, 2005).

2.4 Las Claudinas

La familia multigénica de las claudinas (CLDNs), codifica para proteínas de 20 a 27kDa, que poseen 4 dominios transmembranales (Fig. 3) y juegan un rol crucial en la formación, integridad y función de las uniones estrechas (Kursad y Tammy-Claire, 2011; Lal-Nag M. y Morin, 2009). Al menos 27 isoformas han sido descritas en humanos (Mineta, *et al.*, 2011). Poseen dos asas extracelulares, que regulan el transporte paracelular entre los espacios luminal y basolateral y permiten a las CLDNs formar homo y heterodímeros con CLDNs de membranas celulares adyacentes. Su región amino y carboxilo terminal son citoplásmicas, y a través de ésta última pueden interactuar con muchas proteínas intracelulares,



principalmente de citoesqueleto, a través de su dominio de unión a regiones PDZ, permitiéndoles estar involucradas en vías de transducción de señales que regulan la posición celular, el crecimiento y la apoptosis (Iravani, *et al.*, 2013; Lal-Nag y Morin, 2009).

En años recientes el rol de las CLDNs en la fisiología y fisiopatología humana, incluyendo el desarrollo de cáncer, está siendo revelado.

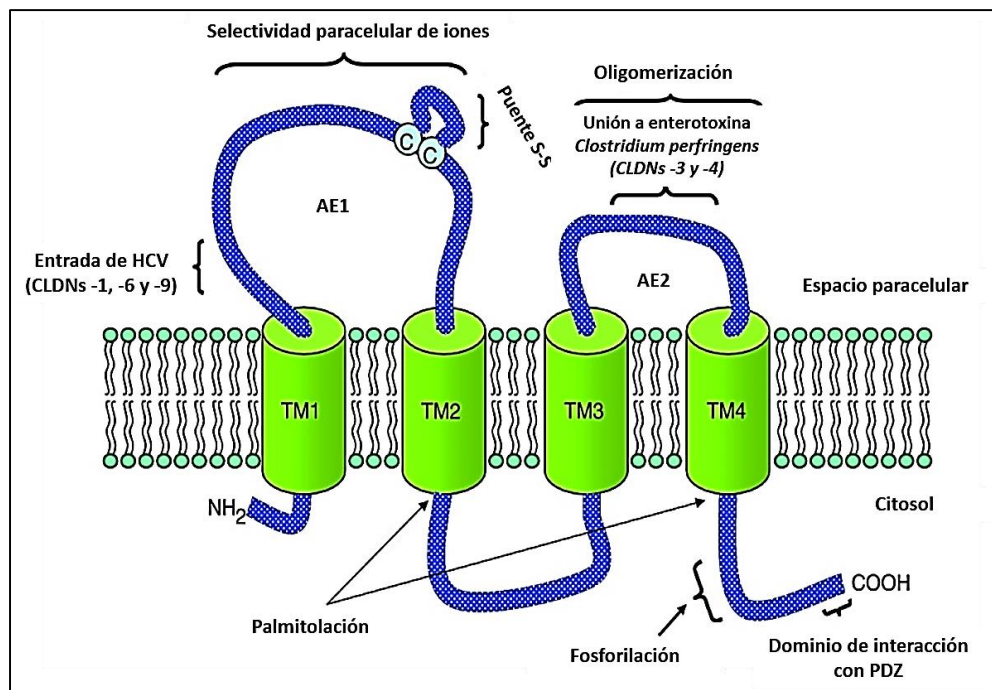


Figura 3. Representación esquemática del monómero de Claudina. El modelo representa las características estructurales conservadas de las claudinas, así como algunas de las interacciones conocidas y modificaciones. AE1 y AE2 representan las asas extracelulares, necesarias para la selectividad de iones y oligomerización, respectivamente. Asimismo, son representados los 4 dominios transmembranales (TM1 a TM4), las regiones importantes para la entrada del virus de la Hepatitis C (HCV), el dominio de unión a la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (CPE) y los dominios citoplasmáticos amino y carboxilo terminal, con sus posibles modificaciones postraduccionales y dominio de unión a PDZ (Modificado de Lal-Nag y Morin, 2009).

2.5 Claudinas y cáncer

La progresión de diversos tipos de cáncer se ha relacionado con alteraciones en la expresión de CLDNs, (González-Mariscal, *et al.*, Fig. 4). Es común observar una expresión baja de CLDNs en algunos tipos de cánceres; por ejemplo, se ha reportado expresión baja de las



CLDNs -1, -2, y -7, en carcinoma hepático, prostático y de mama. Ésta disminución en la expresión, es debida a que hay pérdida de las UE, y por tanto de los contactos célula-célula y de la polaridad celular, lo cual se ha asociado con incremento de la proliferación celular y la transición epitelio mesénquima (TEM); asimismo, la pérdida de las UE permite el flujo paracelular de nutrientes y factores oncogénicos (por ejemplo, la pérdida de CLDN-4 y 5 permite el paso de *Helicobacter pylori* a través del epitelio gástrico). El conjunto de éstos factores, hace posible la invasión y metástasis del cáncer (Iravani, *et al.* 2013).

Sin embargo, también se ha reportado que la expresión algunas CLDNs, como la -1, -3, -4 y -7, está incrementada en cáncer de colon, próstata, ovario, entre otros (Kwon, 2013; Escudero-Esparza, *et al.*, 2011). El aumento en la expresión de algunas CLDNs en adenocarcinoma gástrico, ha sido asociado con la expresión de marcadores de proliferación, tales como Cdx2, así como con un incremento de la expresión de mucina gástrica e intestinal (Iravani, *et al.*, 2013). Asimismo, estudios recientes han mostrado que participan en la TEM (Fig. 5), en la formación de *cancer stem cells* y en la quimioresistencia. Aunque la desregulación de las CLDNs en cáncer sugiere que juegan un rol en la tumorigénesis, el mecanismo involucrado en éste proceso permanece desconocido (Kwon, 2013; Stebbing, *et al.*, 2013).

Por otra parte, también se ha encontrado que las CLDNs sobre expresadas en las células tumorales sufren deslocalización, presentándose en el citoplasma (Fig. 5). Aunque se desconoce el papel que juegan las CLDNs en el citoplasma, se ha propuesto que puede estar relacionado con el tráfico vesicular o en la regulación de proteínas relacionadas con la matriz extracelular (MEC) (Lal-Nag y Morin, 2009).



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

Figura 4. Cambios en la expresión de algunas CLDNs en diferentes carcinomas humanos. Se describen distintos tipos de carcinomas donde se ha reportado alteración en la expresión de diversas CLDNs, tanto a la alza como a la baja (Tomado de Gonzalez-Mariscal, *et al.*, 2007).

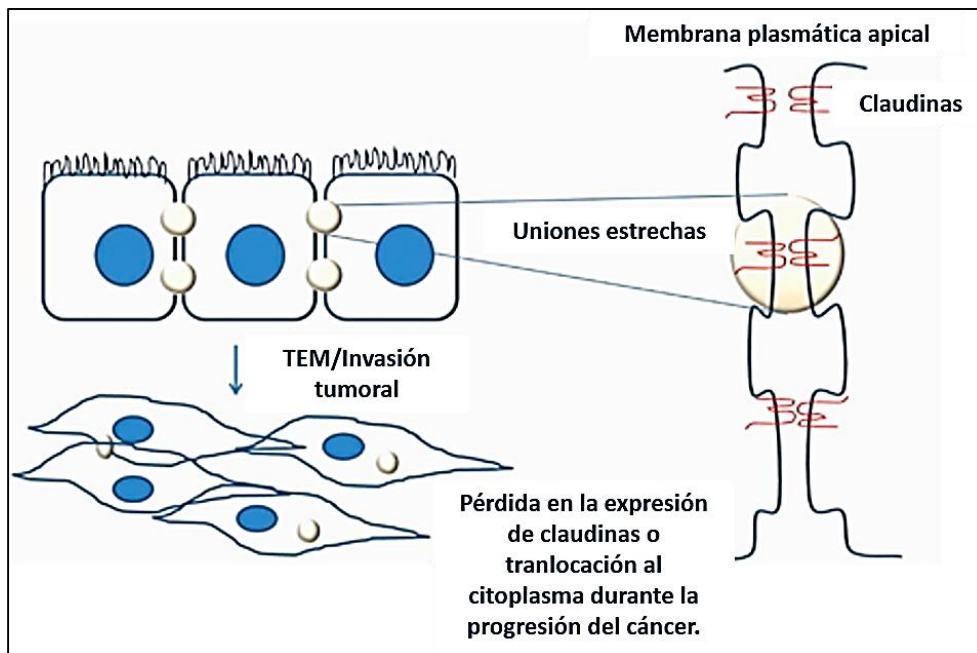


Figura 5. El papel de las CLDNs en cáncer. Las CLDNs son expresadas en las UE, localizadas en la parte apical de la membrana celular. Durante el desarrollo y progresión del cáncer, a menudo las UE se pierden, o las CLDNs se translocan a otros compartimentos celulares; esto facilita la transformación maligna y la TEM. (Modificado de Stebbing, *et al*, 2013).

2.6 Metástasis e invasión tumoral

Las células cancerosas pueden propagarse a órganos distantes a través de la metástasis (Figs. 6 y 7), lo que se traduce en mortalidad abrumadora en pacientes con cáncer. La cascada metastásica consiste de cuatro pasos: invasión, intravasación, supervivencia en circulación linfática o sanguínea, extravasación y colonización del órgano distante (Fig. 6).

La invasión se produce cuando las células tumorales, adquieren la habilidad para disociarse del tumor primario y penetrar los tejidos circundantes, a través de la degradación de la membrana basal y la matriz extracelular, debido principalmente, a la sobreexpresión y activación de metaloproteasas (Escudero-Esparza, *et al.*, 2011).

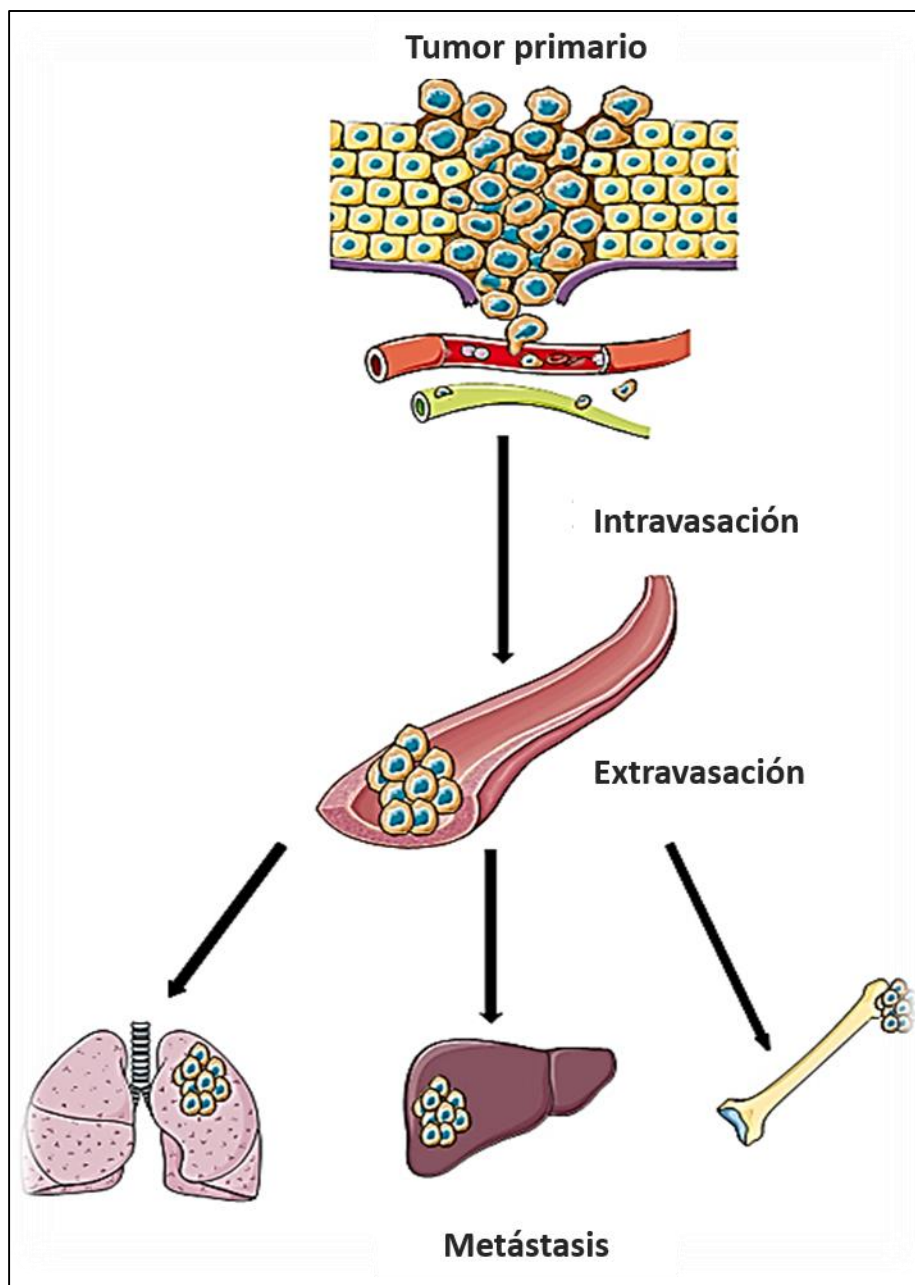


Figura 6. Cascada metastásica. El esquema muestra el proceso biológico de la metástasis, el cual comprende invasión, intravasación, extravasación y colonización (Tomado de Escudero-Esparza, *et al.*, 2011).

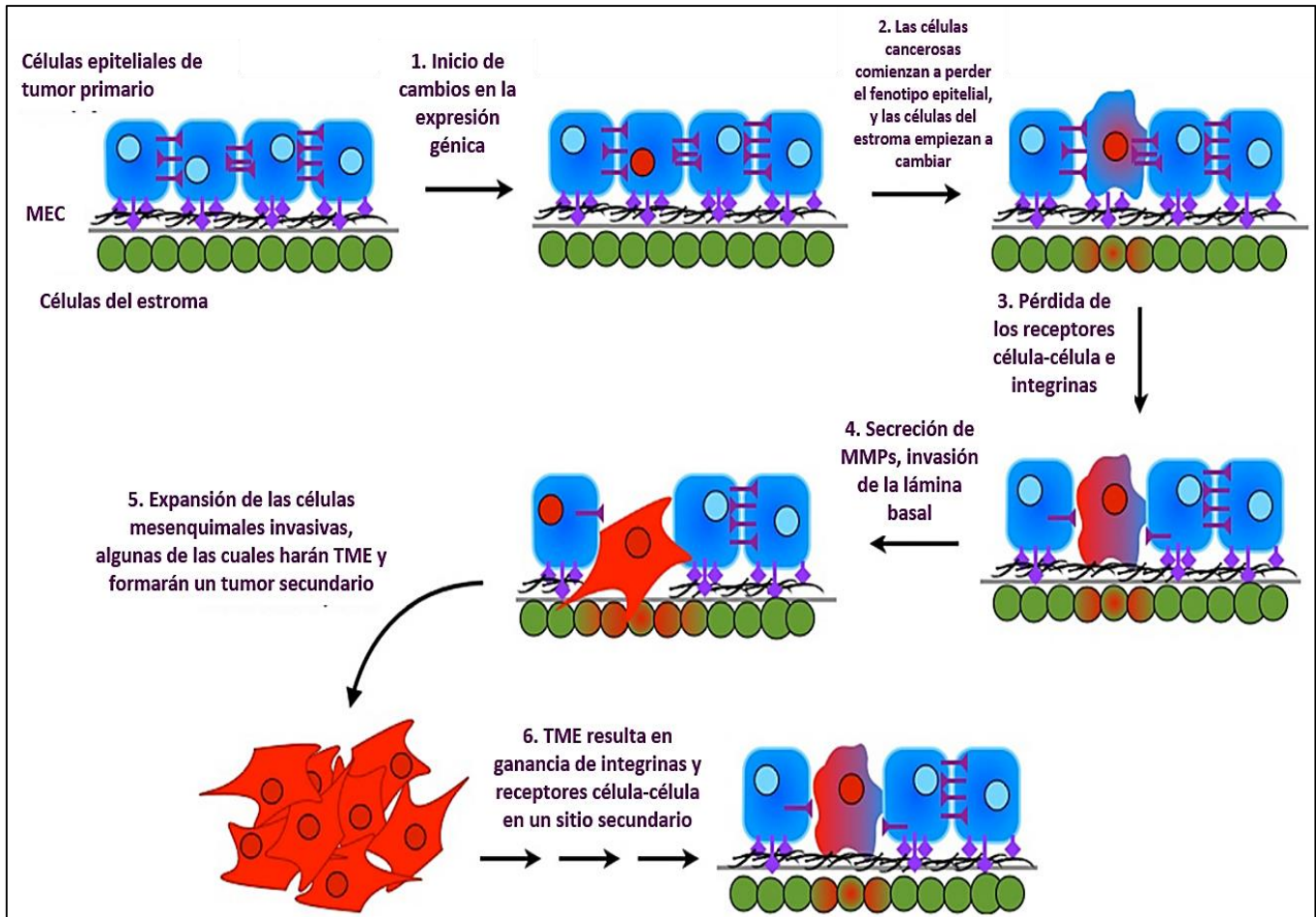


Figura 7. Cambios que ocurren en las células tumorales, conducen a TEM y metástasis en un sitio secundario. Las células epiteliales tumorales se muestran en azul, mientras que las células del estroma se muestran en verde. Para que una célula tumoral desencadene TEM, se comienza con pérdida de su fenotipo epitelial, como se muestra después del paso 2. Pérdida de los receptores de unión célula-célula e integrinas (mostradas en morado) también ocurren del paso 3 en adelante. Además, las células estromales cercanas a las células cancerosas (las cuales desencadenarán TEM) son afectadas y comienzan a presentar cambios (ilustrados como una progresión de células verdes a rojas). Una vez que una célula cancerosa ha desencadenado TEM y viaja a un nuevo sitio, múltiples pasos (no explícitamente descritos) incluyendo TME, deben ocurrir, para que la célula cancerosa metastásica se una en el sitio distante y forme un tumor secundario. Las células estromales de la nueva locación del tumor, también sufrirán cambios (Tomado de Heerboth, *et al.*, 2015)



2.7 Metaloproteasas

Las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs, por sus siglas en inglés, Fig. 8), pertenecen a una familia de endopeptidasas dependientes de cinc, implicadas en una variedad de procesos fisiológicos, incluyendo la curación de heridas, la involución uterina y la organogénesis; asimismo, están relacionadas a condiciones patológicas, tales como desórdenes inflamatorios, vasculares y autoinmunes; además, su expresión y activación está incrementada en todos los tipos de cáncer, por lo que han sido fuertemente asociadas con la invasión en células cancerosas y metástasis (Egeblad y Werb, 2002; Gialeli, *et al.*, 2010). Son sintetizadas como precursores inactivos (pro-MMPs) y requieren la eliminación proteolítica de un propéptido para su activación; actúan a pH neutro y son inhibibles por agentes quelantes, así como por un grupo de proteínas denominadas TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteases*) (Egeblad y Werb, 2002). Existen 24 genes distintos que codifican a los miembros de la familia de las MMPs; las cuales se clasifican en 6 grupos atendiendo a sus características estructurales y a su especificidad de sustrato (Folgueras, *et al.*, 2004):

1. Gelatinasas (MMP-2 y MMP-9).
2. Colagenasas (MMP-1, MMP-8, y MMP-13).
3. Estromielisinas (MMP-3 y MMP-10).
4. Matrilisinas (MMP-7 y MMP-26).
5. MT-MMPs (MMP-12, MMP-19, MMP-20, y MMP-27).
6. Unidas a la membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24).

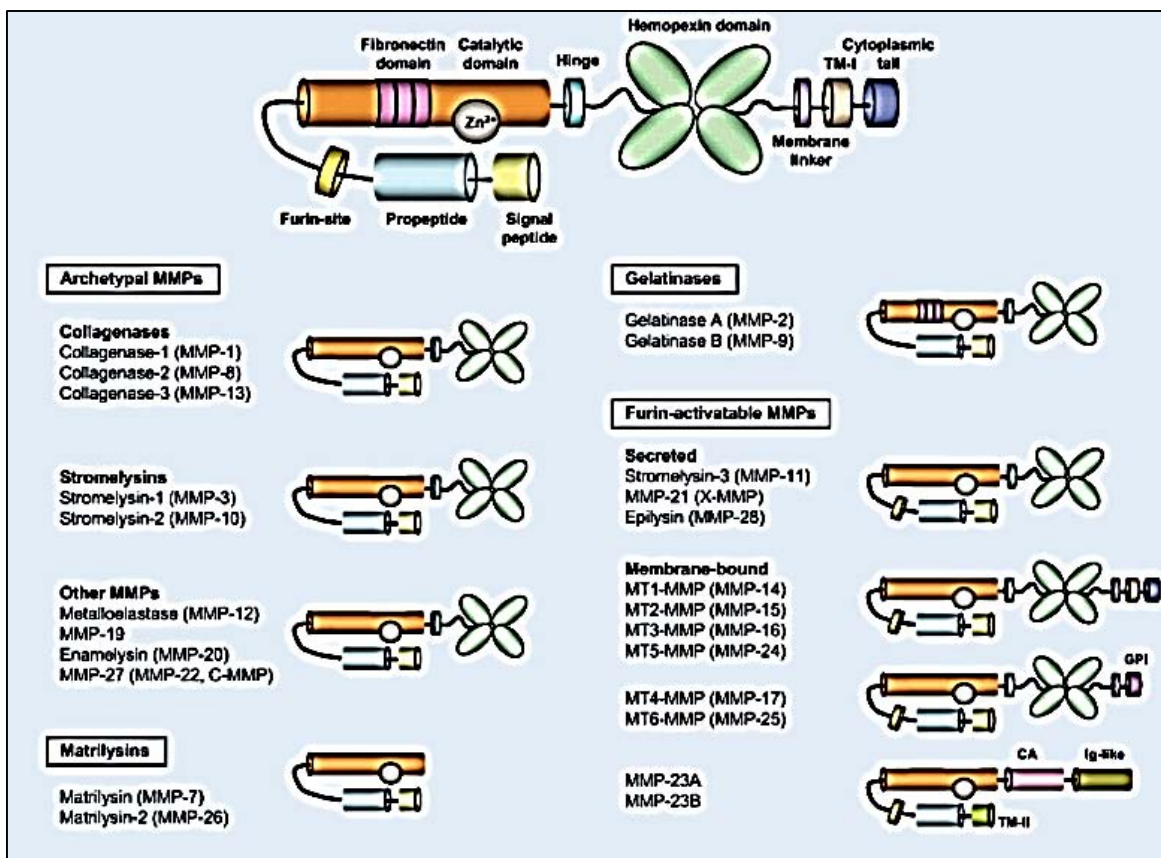


Figura 8. Diversidad de MMPs humanas. Clasificación estructural de las MMPs humanas basada en su organización de dominios (Tomado de Folgueras, *et al.*, 2004).

2.8 Metaloproteasa 2 (MMP -2)

Las gelatinasas (MMP -2 y -9) hidrolizan principalmente componentes de la lámina basal, gelatina, y colágeno tipo IV (Folgueras, *et al.*, 2004).

La MMP -2, también llamada gelatinasa A, es una proteasa de 72 kDa (NCBI, 2015), que ha demostrado ser un factor pronóstico en diferentes tipos de carcinoma, tales como ovario, gástrico y pulmón. Asimismo, se ha reportado que la expresión de MMP-2 incrementa la invasividad en distintos tipos celulares de cáncer, como linfoma (Klein, *et al.*, 2004). Por su parte, existen reportes que señalan que las CLDNs -1,-2,-3 y -4 pueden reclutar y promover la activación de MMP-2 (Agarwal, *et al.*, 2005; Chang-Hwan, *et al.*, 2009).

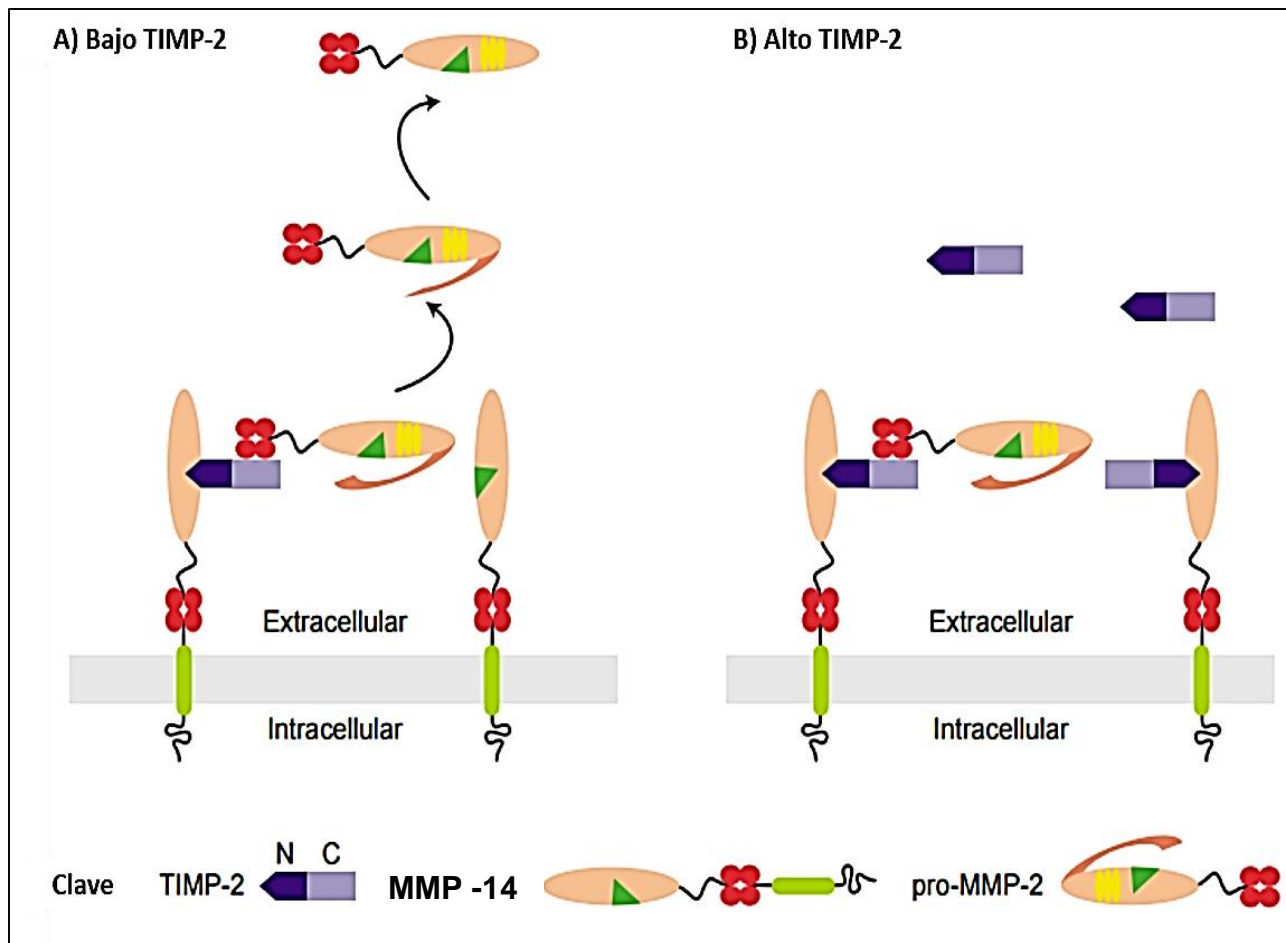


Figura 9. Mecanismo para la activación de pro-MMP -2. A) MMP -14 en la superficie celular actúa como un receptor para TIPM-2, el cual se une vía su dominio amino terminal al sitio activo de MMP -14. Éste complejo binario actúa como receptor para pro-MMP-2 (el dominio carboxilo terminal de TIMP-2 se une al dominio carboxilo terminal de pro-MMP-2). Una molécula libre de MMP -14 en cercana proximidad, puede entonces cortar el propéptido de pro-MMP-2, generando a la enzima activa. La activación de pro-MMP-2 en éste modelo sólo es posible si la concentración de TIMP-2 es baja, con suficiente TIMP-2 para generar el complejo tri molecular, pero no suficiente para saturar todos los MMP -14 requeridos para la proteólisis del propéptido. B) A altos niveles de TIMP-2, éste se unirá a MMP -14 e inhibirá su actividad, previniendo la activación de pro-MMP-2 (Modificado de Lafleur, *et al.*, 2003).



3. ANTECEDENTES

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, se reportó la sobreexpresión de CLDNs -6 y -9 en biopsias de pacientes con adenocarcinoma gástrico (Rendón-Huerta, *et al.*, 2010). A su vez, se encontró que la sobreexpresión de CLDNs -6 y -9 en el citoplasma de células de adenocarcinoma gástrico (AGS) promueve la proliferación, migración e invasividad celular, e incrementa la expresión de claudina-1 endógena (Zavala-Zendejas, *et al.*, 2011), la cual se ha reportado que tiene un papel importante en la activación de MMP-2 en otros tipos de cáncer (Chang-Hwan, *et al.*, 2009). Por otra parte, se determinó que no existe interacción entre las CLDNs-6 y -9 con MMP-2; sin embargo, hay interacción entre CLDN-1 y MMP-2 (Datos por publicar).

Con base en estos hallazgos, proponemos que CLDNs -6 y -9 regulan positivamente a MMP-2, a través del aumento de la expresión de CLDN -1, en células AGS.



4. JUSTIFICACIÓN

La desregulación a la baja de la expresión de CLDNs está relacionada con la pérdida de la polaridad celular y uniones intercelulares, lo que en cáncer puede conllevar a un incremento en la migración e invasividad de células tumorales, así como del flujo de factores pro oncogénicos, entre otros; sin embargo, es poco entendido el papel que ejercen las CLDNs cuando están sobreexpresadas en distintos tipos de cáncer, incluyendo el adenocarcinoma gástrico.

Como ya se mencionó, hay un aumento en la migración, invasividad y proliferación de células AGS que sobreexpresan a CLDNs -6 y -9, aunado a un incremento en la expresión endógena de CLDN -1. La CLDN -1 ha sido asociada con un aumento en la activación de MMP -2, en otros tipos de cáncer. Asimismo, dado que se determinó que no existe interacción entre CLDNs -6 y -9 con MMP -2, pero si entre CLDN -1 y MMP -2, es importante determinar si CLDN -1 es importante para la activación de MMP -2, en células AGS que sobreexpresan a las CLDNs -6 y -9. Esto permitiría dilucidar mecanismos no descritos relacionados con la activación de la MMP -2 y profundizar en el conocimiento sobre el potencial de éstas CLDNs como posibles marcadores en cáncer gástrico. Ésto podría conducir a generar alternativas para inhibir la activación de MMP -2, y así ayudar a detener parte del comienzo del proceso metastásico, que cobra la vida de millones de pacientes con cáncer alrededor del mundo.



5. HIPÓTESIS

Si la regulación positiva de MMP -2 está determinada por la sobreexpresión de CLDN -1 en células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) que sobreexpresan constitutivamente a CLDNs -6 y -9, entonces, el silenciar la expresión de CLDN -1 provocará una disminución en la activación de MMP -2 en dichas células.



6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del silenciamiento de CLDN -1 en la activación de MMP -2, en células AGS que sobreexpresan a CLDNs -6 y -9.

6.2 Objetivos particulares

- *Mantener cultivos de células AGS, así como de aquellas que sobreexpresan constitutivamente a CLDN -6, CLDN -9 y al vector de clonación acoplado a GFP (control).*
- *Determinar la expresión endógena a nivel de RNAm y proteína de CLDN -1 y a nivel de proteína de MMP -2 en cada una de las líneas celulares.*
- *Silenciar la expresión de CLDN -1 en las líneas celulares.*
- *Comprobar el silenciamiento de CLDN -1 a nivel de RNAm y proteína.*
- *Determinar la actividad de MMP -2 presente en los medios condicionados de las células en las que se silenció la expresión de CLDN -1.*
- *Comparar la secuencia protéica de CLDN -1, con las de pro-MMP -2 y MMP -14.*



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cultivos celulares (Anexo 1)

Las células derivadas de adenocarcinoma humano, AGS, fueron obtenidas de la compañía ATCC. Asimismo, stocks de las células AGS fueron previamente transfectadas de manera estable con CLDN -6, CLDN -9 y el vector de clonación acoplado a la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés). Las células fueron cultivadas en cajas petri p-100 y se mantuvieron con medio de cultivo DMEM (7-10 ml aprox.) suplementado con 10 µg/ml de insulina, 2 mM de piruvato de sodio, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml / 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina y 10 % de suero fetal bovino. Fueron incubadas a 37 °C, en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂. Las transfectantes estables fueron mantenidas bajo las mismas condiciones y seleccionadas con 400 µg/ml de geneticina.

7.2 Expresión endógena de CLDN-1 a nivel de RNAm

7.2.1 Extracción de RNA

Una vez que las células llegaron a una confluencia de 90 %, se realizó la extracción de RNA por el método de trizol (Anexo 2), y se cuantificó la concentración en el equipo Nanodrop 2000. Posteriormente se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % para comprobar la integridad del RNA, cargando 1 µg de RNA, y corriendo las muestras a 70 volts en buffer TBE, 1 hora. Finalmente el gel se tiñó con bromuro de etidio para visualizar las bandas.

7.2.2 rt-PCR de punto final

Una vez corroborada la integridad del RNA, se realizó un rt-PCR de punto final con primers específicos para CLDN -1 y como control β-Actina, utilizando el *Kit Super Script One-Step RT-PCR with Platinum Taq System* (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo 3). Una vez obtenido el c-DNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 %, cargando 10 µl de la reacción de rt-PCR, corriendo las muestras a 80 volts en buffer TBE, por 1 hora. Finalmente el gel se tiñó con bromuro de etidio para visualizar las bandas.



7.3 Expresión endógena de CLDN-1 y MMP-2 a nivel de proteína

7.3.1 Extracción de proteína celular total

Una vez que las células llegaron a una confluencia de 90 %, se realizó una extracción de proteína celular total (Anexo 4). Las células fueron lavadas 2 veces con buffer PBS, y se les añadió 1 ml de buffer de lisis adicionado con inhibidores de proteasas. Se rasparon las células de la superficie de las placas con ayuda de un scrapper; las muestras fueron vertidas en tubos de propileno especiales para rotor 70 Ti de ultracentrífuga, y fueron sonicadas en hielo, 1 min a 25 % de amplitud. Las muestras fueron centrifugadas a 30,000 rpm a 4 °C, por 30 min. El sobrenadante fue colocado en tubos eppendorf. Posteriormente se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford (Anexo 5), para finalmente diluirlas en buffer de Laemli. Las muestras fueron almacenadas en congelación a -20 °C.

7.3.2 Western Blot

Previo al ensayo de Western Blot (WB; reactivos y buffers Anexo 6), las muestras de proteína total fueron incubadas en un baño a ebullición durante 5 min y se les añadió 5 % de β -Mercaptoetanol.

Se llevó a cabo una electroforesis desnaturizante en gel SDS-PAGE al 15 %, cargando 40 μ g de proteína por pozo y corriendo las muestras a 50 mA por 1.5 horas en buffer de electroforesis. Después se realizó una transferencia semi húmeda de las proteínas a una membrana de Nitrocelulosa en una cámara Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Biorad), a 120 mA por 1 hora. Para los ensayos de Inmunoblot, la membrana fue bloqueada en una solución buffer TBS - leche baja en grasa 10 %, por una hora y después fue incubada con los anticuerpos primarios monoclonales Anti-CLDN -1 (1:500), Anti-MMP -2 (1:500), y como control de carga Anti- β Actina (1:500), diluidos en TBS/ 0.01% Tween - Leche baja en grasa 10 %, toda la noche en agitación suave a 4 °C (el anticuerpo anti-MMP -2, reconoce la forma activa e inactiva de la enzima). Al día siguiente se lavó la membrana 3 veces con buffer TBS/0.01 % Tween en agitación constante durante 30 min, para después incubarla con el anticuerpo secundario Anti - Mouse (1:1000), diluido en TBS/0.01 % Tween, en agitación



suave, a temperatura ambiente, por 1.5 horas. Posteriormente se realizaron 3 lavados con TBS/0.01 % Tween por 30 min, y uno más con TBS por 10 min. La membrana fue revelada con el kit SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Invitrogen) en el escáner C-DiGit (LI-COR), a sensibilidad estándar.

7.4 Silenciamiento de la expresión de CLDN-1

Para silenciar la expresión de la proteína, se transfectó a las células de forma transitoria con un siRNA (*small interfering RNA*) específico para CLDN -1, adquirido de la compañía Santa Cruz Biotechnology, Inc., siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo 7). Una vez terminada la transfección, se dejó a las células 24 horas en medio de cultivo normal, para posteriormente extraer proteína celular total y RNA; a su vez, otras células se dejaron 24 horas adicionales sin suero fetal bovino, para obtener el medio condicionado (Anexo 7). Posteriormente se realizó un rt-PCR de punto final y Western Blot para comprobar el silenciamiento de CLDN -1 a nivel de RNAm y proteína respectivamente.

7.5 Actividad de MMP-2 presente en medio condicionado

Para determinar la actividad de MMP -2, se realizaron zimografías (Anexo 8). Para esto fue previamente concentrada la proteína presente en los medios condicionados de las células con ayuda de Amicones de tamaño de poro de 30 kDa. Los medios fueron centrifugados a 4,000 rpm/20 min a 4 °C. Del concentrado obtenido, se realizó una cuantificación de proteína por el método de Bradford (Anexo 5), y las proteínas fueron diluidas en buffer de Laemli. Posteriormente se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida sin agentes reductores, polimerizados con gelatina de bovino (Sigma), la cual funciona como sustrato de la enzima. Se colocaron 20 µg de proteína por pozo, y se corrieron las muestras a 50 mA por 2 horas en buffer de electroforesis. Posteriormente se lavó el gel con Tritón X100 en agitación suave, por 30 min y fue colocado en buffer de incubación (que favorece la actividad de la enzima), a 37 °C toda la noche. Al día siguiente el gel fue teñido con azul de Commasie por 1 hora, y después fue desteñido en una solución de 10 % de metanol y 10 %



de ácido acético hasta visualizar bandas blancas. La membrana fue colocada en el equipo Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro para fotografiar las bandas.

7.6 *Análisis de datos*

Con el programa QuantityOne (Biorad) se realizaron densitometrías para cuantificar la intensidad de las bandas resultado de los ensayos de rt-PCR y WB. Los datos fueron graficados en el software Graphpad Prism 6.01 (2012).



8. RESULTADOS

Para realizar los experimentos que permitieron comprobar la hipótesis, primero se hicieron cultivos celulares de las células AGS que sobreexpresan a CLDNs -6 (AGS/CLDN-6) y -9 (AGS/CLDN -9) y como controles AGS y AGS que expresan a GFP (AGS/GFP), hasta la confluencia necesaria para cada ensayo. Los experimentos fueron realizados 2 veces y los resultados en las gráficas se presentan como el promedio.

8.1 La expresión endógena de CLDN -1 y MMP -2 está incrementada en las células AGS/CLDN6 y AGS/CLDN9

Antes de llevar a cabo el silenciamiento de CLDN -1, se procedió a determinar la expresión endógena de CLDN -1 y MMP -2 en las células. Para esto se llevó a cabo un WB de proteína total, con anticuerpos específicos para éstas proteínas, encontrando que la expresión de ambas está aumentada en las células AGS/CLDN6 y AGS/CLDN9 comparada con los controles (Figs. 10 y 11). En el caso de CLDN -1, el incremento fue aproximadamente de 58 % en las células AGS/CLDN6 y AGS/CLDN9 (Graf. 1), mientras que para la forma activa de MMP -2 el incremento de la expresión fue de más de 70% en las células AGS/CLDN6 y AGS/CLDN9 comparada con los controles (Graf. 2).

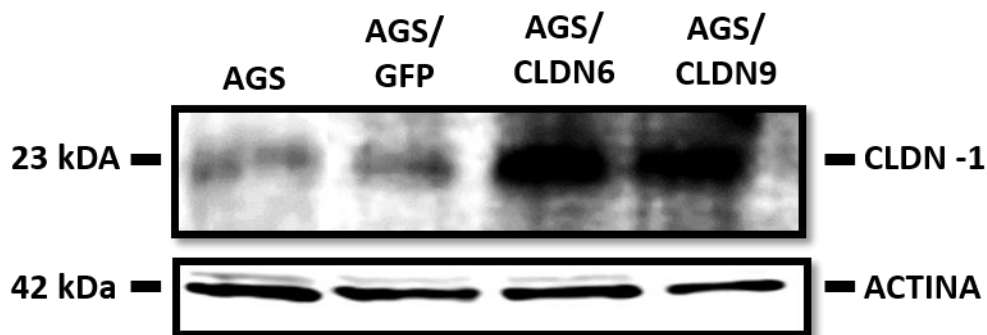
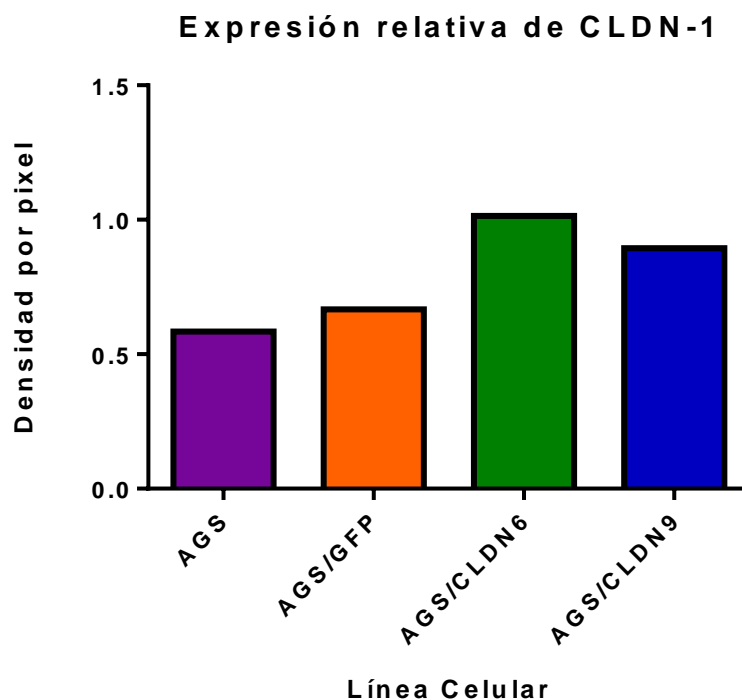


Figura 10. Expresión endógena a nivel de proteína de CLDN -1. Se observa mayor expresión en las células AGS transfectadas con CLDNs -6 y -9, que en los controles (AGS y AGS/GFP). Se utilizó actina como control de carga. n=2.



Gráfica 1. Cuantificación de la expresión endógena a nivel de proteína de CLDN -1. Determinación cuantitativa de la expresión a nivel de proteína de CLDN -1, a través de densitometría. En comparación con los controles, se observa un aumento en la expresión de CLDN -1 en las células AGS transfectadas con CLDNs -6 y -9. n=2.

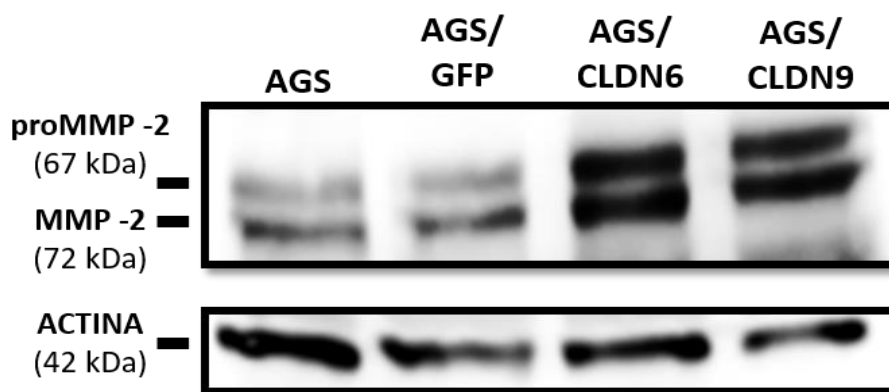
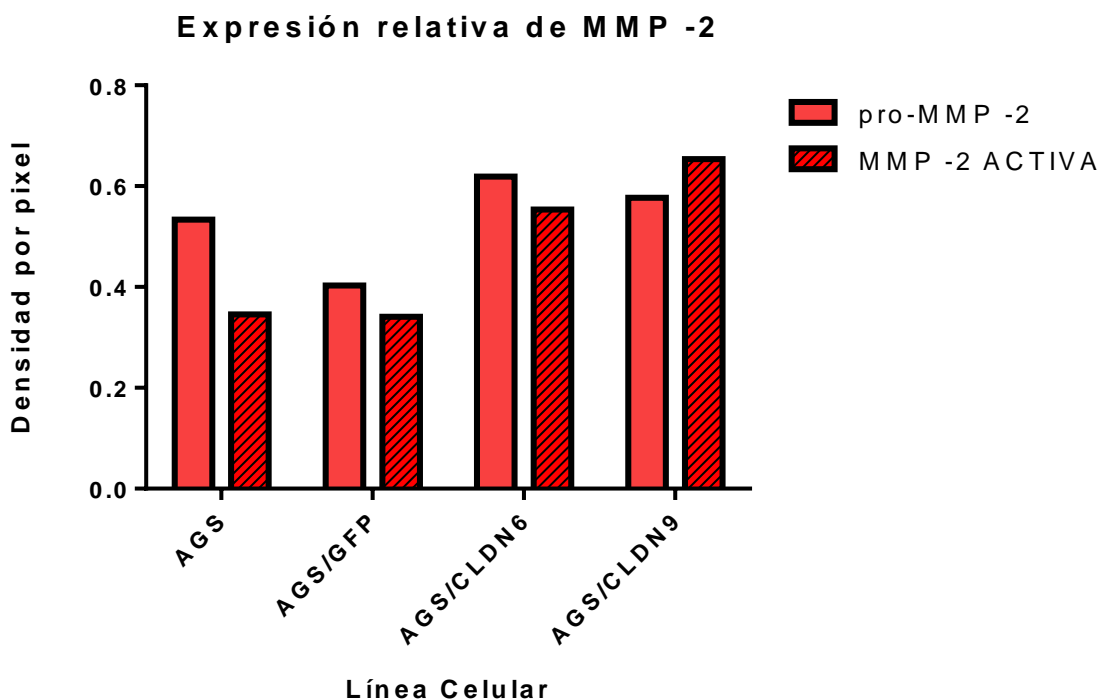


Figura 11. Expresión endógena a nivel de proteína de MMP -2 activa e inactiva. Se observa un incremento en la expresión de la forma inactiva (pro-MMP -2), así como de la forma activa (MMP -2) en las células AGS transfectadas con CLDNs -6 y -9. Se utilizó actina como control de carga. n=2.



Gráfica 2. Cuantificación de la expresión endógena a nivel de proteína de MMP -2 activa e inactiva. Determinación cuantitativa de la expresión a nivel de proteína de MMP -2, a través de densitometría. Se observa un incremento en la expresión de la forma inactiva (pro-MMP -2), pero principalmente de la forma activa (MMP -2) en las células AGS transfectadas con CLDNs -6 y -9. n=2.

8.2 Silenciamiento de CLDN -1 en células AGS

Con el objetivo de determinar si CLDN -1 está implicada en la activación de MMP -2 en las células AGS y AGS que sobreexpresan a CLDNs -6 y -9, se efectuó el silenciamiento de la expresión de CLDN -1 en dichas células, con ayuda de un siRNA específico. La transfección del siRNA se comprobó mediante la observación de un control acoplado a fluoresceína (Fig. 12), y el silenciamiento de la expresión fue corroborado a nivel de proteína (Fig. 13, Graf. 3) y de RNA (Fig. 15 y Graf. 4). El silenciamiento de la expresión de CLDN -1 fue más eficiente en las células control (Fig. 13 y Graf. 3), pues al cargar 40 μ g de proteína no se observa señal, comparado con las células AGS/CLN -6 y -9, donde el silenciamiento es significativo pues es de más del 50%, aunque no es total.

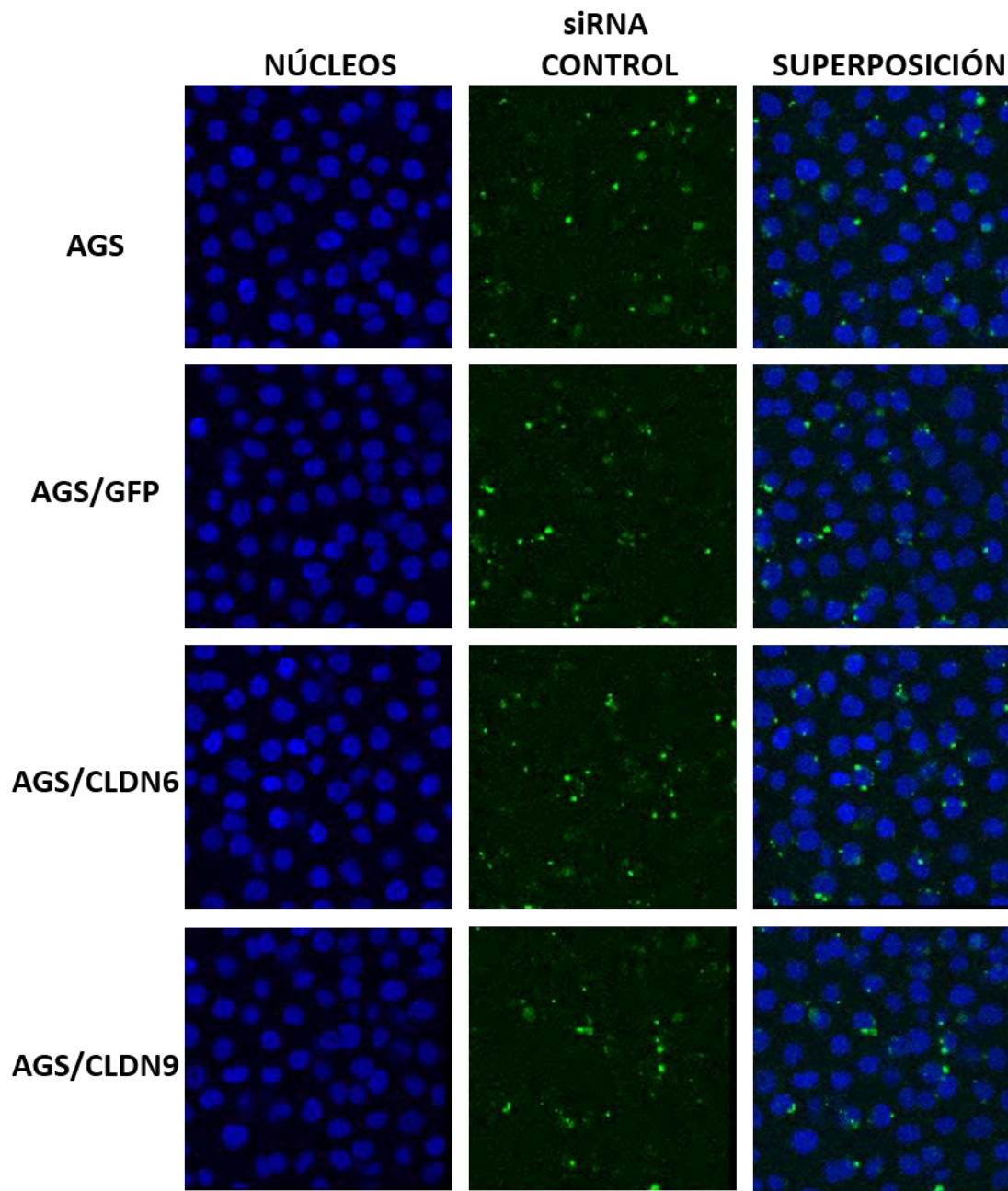


Figura 12. Control de transfección de siRNA. Se observa el siRNA control acoplado a fluoresceína en el citoplasma de AGS, AGS/GFP, AGS/CLDN -6 y AGS/CLDN -9, por lo que el protocolo de transfección fue eficiente para todas las células. Aumento 40x. n=3.

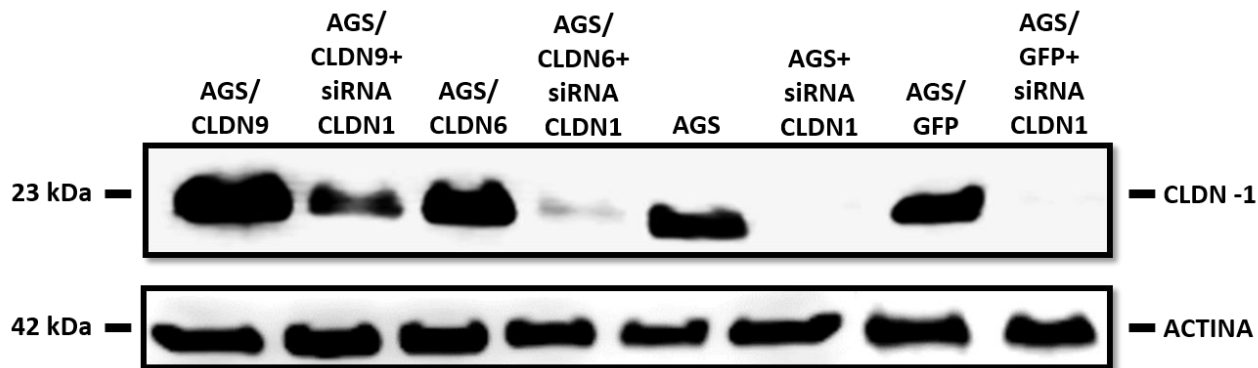
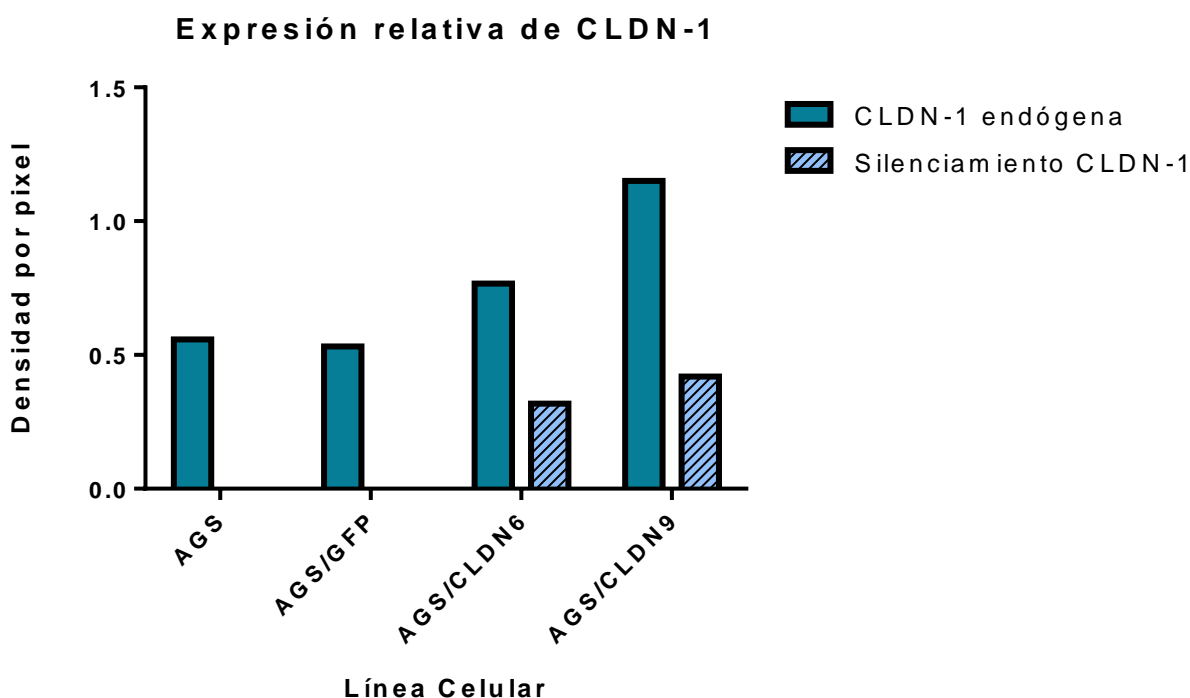


Figura 13. Silenciamiento de CLDN -1 a nivel de proteína. Se aprecia un incremento en la expresión endógena de CLDN -1 en las células AGS transfectadas con CLDNs -6 y -9, comparado con los controles. Asimismo, se observa un silenciamiento exitoso en todas las células, siendo más evidente en las células control (AGS y AGS/GFP). Se utilizó actina como control de carga. n=2.



Gráfica 3. Cuantificación de la expresión a nivel de proteína de CLDN-1 en las células después de la transfección del siRNA. Determinación cuantitativa de la expresión a nivel de proteína de CLDN -1, a través de densitometría, después de realizar el silenciamiento. Se observa un incremento en la expresión endógena de la proteína en las células AGS/CLDN6 y AGS/CLDN9, mientras que después de transfectar el siRNA, la expresión cayó a 0 en los controles y a menos del 50% en AGS/CLDN6 y AGS/CLDN9. n=2.



Por otra parte, para efectuar los ensayos de rt-PCR, fue necesario primero realizar un gel de integridad de RNA. Se observan los RNAr 28 y 18s de todas las células con una relación 2:1 respectivamente (Fig. 14), lo cual es consistente con un RNA viable.

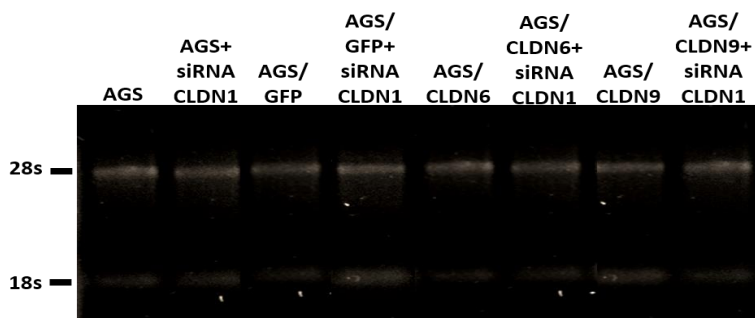


Figura 14. Integridad de RNA. Se observan las bandas correspondientes a los RNAr 28s y 18s. Asimismo, la banda del RNAr 28s es mayor a la de 18s en aproximadamente una relación 2:1. n=3.

Al realizar los ensayos de rt-PCR, se presentó un ligero aumento de la expresión endógena del RNAm de CLDN -1 en las células AGS/CLDN6 y AGS/CLDN -9, comparado con los controles (Fig. 15, Graf. 4). Por su parte, el silenciamiento del RNAm de CLDN -1 no es tan evidente, como a nivel de proteína (Fig. 13, Graf. 3) en todas las células.

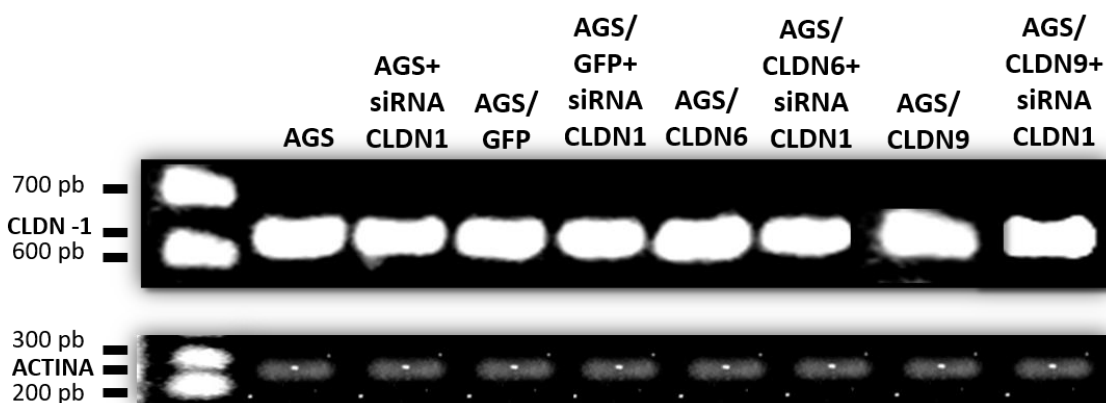
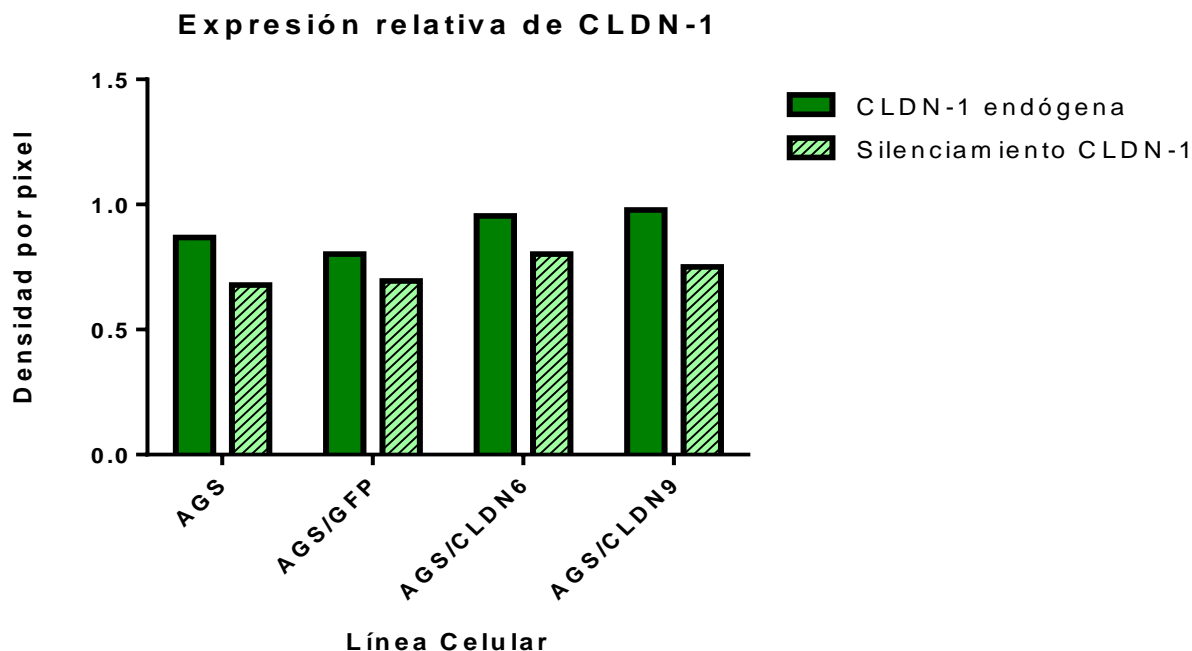


Figura 15. Silenciamiento de CLDN -1 a nivel de RNAm. Se observa un incremento en la expresión endógena del RNAm de CLDN -1 en las células AGS/ CLDN -6 y -9, comparado con los controles. Asimismo, se observa una pequeña disminución del RNAm de CLDN -1 en todas las células en las que se transfectó el siRNA de CLDN-1. Como control de carga se utilizaron primers específicos para actina. n=2.



Gráfica 4. Cuantificación de la expresión a nivel de RNAm de CLDN-1 en las células después de la transfección del siRNA. Determinación cuantitativa de la expresión a nivel de RNAm de CLDN -1, a través de densitometría, después de realizar el silenciamiento. Se observa un ligero incremento en la expresión endógena del RNAm en las células AGS/CLDN6 y AGS/CLDN9, mientras que después de transfectar el siRNA, la expresión bajó en todas las células, sin embargo fue menor al 50%. n=2.

8.3 El silenciamiento de CLDN -1, disminuye la actividad de MMP -2 presente en los medios condicionados de todas las células

Para determinar el efecto del silenciamiento de CLDN -1 en la activación de MMP -2, se obtuvieron los medios condicionados de las células (pues esta se lleva a cabo extracelularmente) para realizar zimografías. Éste ensayo permite visualizar la actividad de la enzima, a través de la degradación de un gel copolimerizado con su sustrato (gelatina), la cual se observa como bandas claras al teñir el gel con azul de commasie.

Se observa que la actividad de MMP -2 está incrementada en las células AGS/CLDN6 y AGS/CLDN9, comparada con los controles (Fig. 16) y que la actividad de la enzima disminuye en todas las células al silenciar la expresión de CLDN -1 (Fig. 16).

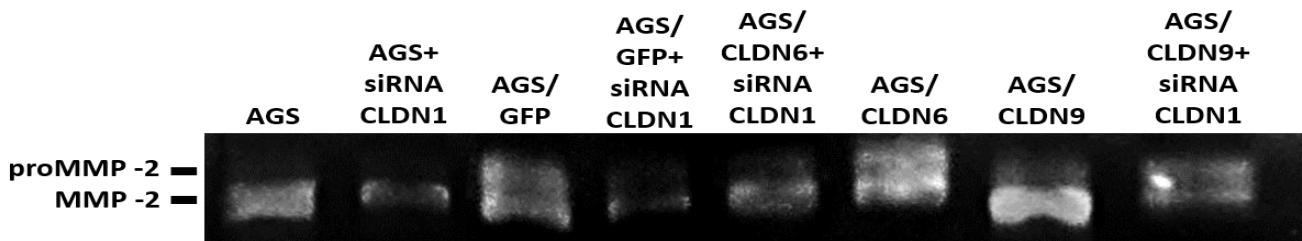


Figura 16. Actividad gelatinolítica de MMP -2 presente en medios condicionados. Se observa que la actividad de MMP -2 extracelular está incrementada en las células AGS/CLDN6 y AGS/CLDN9, comparada con los controles y que disminuye en todas las células al silenciar la expresión de CLDN -1. n=3.

8.4 Un fragmento de la secuencia proteica del dominio extracelular 1 de CLDN -1, tiene una identidad del 21 % con parte del dominio carboxilo terminal de pro-MMP -2, mientras que una región del dominio extracelular 2 de CLDN -1 tiene una identidad del 30 % con una región del dominio catalítico de MMP -14

Una vez que se determinó que CLDN -1 es importante para la activación de MMP -2 en células AGS y AGS que sobreexpresan a CLDNs -6 y -9, se realizaron alineamientos entre las secuencias protéicas de CLDN -1, pro-MMP -2 (Fig. 17) y su enzima activadora MMP -14 (Fig. 18), esto con el fin de proponer una hipótesis que pueda explicar el posible mecanismo mediante el cual CLDN -1 promueve la activación de MMP -2 en éstas células.

Al llevar a cabo el alineamiento entre la secuencia protéica de CLDN -1 y pro-MMP -2, se obtuvieron 4 posibles concordancias a lo largo de ambas secuencias. Se muestra un alineamiento con una identidad de 21 %, una positividad de 50 %, y 0% de Gaps (Fig. 17).



Secuencias	aa	Uniones	aa
proMMP -2	418	GALMAPIYTYTKNFRLSQDDIKGIQELY	445
		GA+++ + + + D+I Q +Y	
CLDN -1	20	GAIVSTALPQWRIYSYAGDNIVTAQAMY	47

Identities **Positives** **Gaps**
6/28 (21%) **14/28 (50%)** **0/28 (0%)**

Figura 17. Alineamiento de las secuencias protéicas de pro-MMP -2 y CLDN -1. Se muestra una identidad del 21 %, una positividad de 50 % y 0 % de Gaps entre las regiones que van del aa 418 al 445 en el caso de pro-MMP -2, y del 20 al 47 en el caso de CLDN -1, que corresponden a parte de los dominios extracelular 1 de CLDN -1 y carboxilo terminal de pro-MMP -2 respectivamente (Modificado de NCBI, 2015).

Por otra parte, al alinear la secuencia protéica de CLDN -1 y la enzima que realiza el corte proteolítico para activar a pro-MMP -2, es decir, MMP -14, se obtuvieron 2 posibles concordancias a lo largo de ambas secuencias. Se muestra un alineamiento con una identidad de 30 %, una positividad de 40 % y 5 % de GAPS entre las secuencias (Fig. 18).

Secuencias	aa	Uniones	aa
MMP -14	119	WQHNEITFCIQNYTPKVGEYATYEAIRKAFRVWESAT	155
		W N I + Y P A YE + F W +A+	
CLDN -1	139	WYGNRIVQ--EFYDPMPVNRARYEFGQALFTGWAAAS	173

Identities **Positives** **Gaps**
11/37 (30%) **15/37(40%)** **2/37 (5%)**

Figura 18. Alineamiento de las secuencias protéicas de MMP -14 y CLDN -1. Se muestra una identidad del 30 %, una positividad de 40 % y 5 % de Gaps entre las regiones que van del aa 119 al 155 en el caso de pro-MMP -2, y del 139 al 173 en el caso de CLDN -1, que corresponden a parte de los dominios extracelular 2 de CLDN -1 y al sitio activo de MMP -14 respectivamente (Modificado de NCBI, 2015).



9. DISCUSIÓN

La desregulación a la baja de la expresión de CLDNs está relacionada con la pérdida de la polaridad celular y de uniones intercelulares, lo que en cáncer puede conllevar al incremento en la migración e invasividad de células tumorales, incremento en el flujo de factores pro oncogénicos, entre otros (Kwon, 2013; Iravani, *et al.*, 2013), sin embargo, es poco entendido el papel que ejercen las CLDNs cuando están sobreexpresadas en distintos tipos de cáncer, incluyendo el adenocarcinoma gástrico. A su vez, es importante comprender todo lo relacionado con la invasión, que es el primer paso del proceso metastásico que cobra la vida de millones de pacientes con cáncer alrededor del mundo. La invasión se produce cuando las células tumorales, adquieren la habilidad para disociarse del tumor primario y penetrar los tejidos circundantes, a través de la degradación de la membrana basal y la matriz extracelular, debido principalmente, a la sobre expresión y activación de metaloproteasas (Escudero-Esparza, *et al.*, 2011).

De acuerdo a lo anterior, en el presente estudio se evaluó el efecto que tiene el silenciamiento de CLDN -1 en la activación de MMP -2, en células AGS y AGS que sobreexpresan constitutivamente a CLDNs -6 y -9.

CLDN -6 es una de las moléculas que se expresan más temprano durante la desdiferenciación del epitelio, y su expresión está confinada al desarrollo embrionario (Günzel y Yu, 2013). Por ejemplo, se ha reportado que es importante durante la formación de epitelio, endotelio y tejidos derivados de endodermo y además se ha propuesto como un nuevo marcador de superficie para caracterizar células pluripotentes (Turksen y Troy, 2001; Anderson, *et al.*, 2008; Wang, *et al.*, 2012). Asimismo, su expresión se ha correlacionado con desdiferenciación y proliferación maligna de células epiteliales. Todo esto lo relaciona con remodelación tisular y organogénesis, procesos durante los cuales hay incremento en la expresión y activación de MMPs (Gialeli, *et al.*, 2010).



Por su parte, CLDN -9 es selectivamente expresada en las uniones estrechas de la cóclea, donde separa la alta concentración de potasio de la endolinfa, de la baja concentración de la perilinfa (Gunzel y Yu, 2013). No obstante, su relación en condiciones patológicas como el cáncer no ha sido claramente dilucidada. Se ha reportado sobre expresión de ésta proteína en biopsias de pacientes con adenocarcinoma gástrico (Rendón-Huerta *et al.*, 2010), mientras que la sobreexpresión de CLDN -9 en células AGS es suficiente para incrementar la proliferación, migración e invasividad de éstas células (Zavala-Zendejas, *et al.*, 2011).

Cabe mencionar que en los estudios previos donde se ha reportado sobreexpresión de CLDNs -6 y -9, éstas se expresaron en el citoplasma de las células cancerosas. Se desconoce el papel que tienen las CLDNs en el citoplasma, sin embargo se ha visto que cuando son internalizadas, generan vesículas enriquecidas en CLDNs que tienen el potencial de regular la composición de las CLDNs presentes en las uniones estrechas, aunque el mecanismo por el cual ocurre éste fenómeno, sigue siendo un misterio (Findley y Koval, 2009); además se ha visto que las CLDNs en el citoplasma pueden estar implicadas en la regulación de proteínas relacionadas con la matriz extracelular (MEC), como pueden ser las MMPs (Lal-Nag y Morin, 2009). Puede ser por esto que al haber gran cantidad de CLDN -6 y CLDN -9 en el citoplasma, de alguna manera, se observa un incremento en la expresión endógena de CLDN -1 y MMP-2 (Figs. 10 y 11).

Se observó mayor expresión de MMP -2 en las células que sobreexpresan a CLDN -6 y -9 (Fig. 11, Graf. 2), lo que es consistente con lo reportado por Wang y colaboradores (2013), en cuyo trabajo se encontró una sobreexpresión de CLDN -6 en carcinoma de ovario, misma que correlacionó con sobreexpresión de MMP -2, no obstante, el mecanismo por el cual la sobreexpresión de CLDNs -6 y -9 incrementa la expresión de MMP -2 (Fig. 11), queda por ser dilucidado.

La sobreexpresión de CLDN -1 ha sido ampliamente reportada en distintos tipos de cáncer, como de colon, esófago, estómago, próstata, ovario, entre otros (Kwon, 2013; Escudero-



Esparza, *et al.*, 2011; Gonzalez-Mariscal, *et al.*, 2007). Además, se ha reportado que CLDN -1 tiene un papel importante en la activación de MMP-2 en otros tipos de cáncer (Chang-Hwan, *et al.*, 2009). Por su parte, Huang y colaboradores (2014), encontraron que al suprimir la expresión de CLDN -1 con un siRNA en diferentes líneas celulares de cáncer gástrico, se inhibió la migración, invasión y formación de colonias *in vitro*, y la metástasis *in vivo*; y a su vez, promovió resistencia al anoikis.

Para llevar a cabo el silenciamiento de la expresión de CLDN -1 se utilizó un siRNA específico. Hubo una disminución en la cantidad de proteína en todas las células (Fig. 13, Graf. 3), sin embargo fue mayor en las células control. Esto probablemente se debió a que es demasiada la expresión endógena de CLDN -1 en las células AGS/CLDN -6 y AGS/CLDN -9 (Fig. 10, Graf. 1), lo que dificulta disminuir más la expresión utilizando un siRNA, el cual no conduce a una inhibición total de la expresión. Asimismo, no se observa un silenciamiento evidente a nivel de RNAm (Fig. 15 y Graf. 4). Esto puede ser porque la técnica de rt-PCR de punto final no es la más adecuada para visualizar diferencias en niveles de expresión de RNAm, o a que la reacción estuvo saturada, ya sea por un exceso de RNA o de ciclos durante el PCR (Green y Sambrook, 2012). Sin embargo, cabe puntualizar que, aunque la ruta de silenciamiento clásica por parte de los siRNAs conlleva a la degradación de RNAm a través del complejo RISC, también funcionan como inhibidores de la traducción, interfiriendo con el ensamble del RNAm al ribosoma (Singh, *et al.*, 2011), por lo que podría ser consistente el ver una disminución de la expresión a nivel de proteína y no a nivel de RNAm.

Con el fin de determinar el efecto del silenciamiento de CLDN -1 en la activación de MMP -2, se realizaron zimografías. La inherente habilidad de las gelatinasas para hidrolizar colágeno desnaturalizado (gelatina), es la base para la detección de esas MMPs por zimografías, en las cuales se observa la actividad gelatinolítica de éstas enzimas, usando geles SDS poliacrilamida, copolimerizados con gelatina. El silenciar la expresión de CLDN



-1 provocó una disminución en la actividad de MMP -2 en todas las células (Fig. 16), lo que sugiere que CLDN -1 juega un papel importante en el mecanismo de activación de MMP -2.

En la zimografía paradójicamente se reveló la actividad gelatinolítica de la pro-MMP-2. Bajo condiciones fisiológicas y en solución, la pro-MMP-2 no exhibe actividad enzimática porque el pro-dominio amino terminal bloquea la unión del zinc catalítico; sin embargo, durante la zimografía, la presencia de SDS resulta en un desplegamiento de la estructura terciaria de la enzima, y una disociación irreversible del pro-dominio del sitio activo. Una vez que el sitio activo es expuesto, la enzima puede iniciar la degradación de la gelatina después de la renaturalización parcial (Toth, *et al.*, 2006; Bode, 2003; Murphy y Crabbe, 1995).

Estos resultados son similares a lo reportado por Dhawan *et al.* (2005), Leotlela *et al.* (2005), Oku *et al.* (2006), y Chang-Hwan (2009), quienes encontraron que al silenciar a CLDN -1 en células de carcinoma escamoso oral, melanoma, adenocarcinoma colorectal y carcinoma hepatocelular, respectivamente, disminuyó la actividad de MMP -2; sin embargo, éstos autores no proponen un mecanismo por el cual CLDN -1 permita la activación de MMP -2. Por otro lado, se ha reportado que algunas CLDNs, incluyendo a CLDN -1 pueden reclutar a pro-MMP -2, lo cual resulta en elevadas concentraciones focales de pro-MMP- 2 (Miyamori, *et al.*, 2001).

Para tratar de proponer un posible mecanismo que pueda explicar el cómo CLDN -1 promueve la activación de MMP -2, se realizaron alineamientos de secuencias protéicas. El alineamiento entre CLDN -1 y pro-MMP -2 (Fig. 17), fue interesante, ya que de acuerdo a UniProt Consortium (2015), éstas regiones de las secuencias son parte de los dominios extracelular 1 de CLDN -1 y carboxilo terminal de pro-MMP -2 respectivamente, que son las regiones mediante las cuales interactúan pro-MMP -2 y TIMP -2, en el espacio extracelular, durante el mecanismo de activación clásico de MMP -2 (Fig. 9, Lafleur, *et al.*, 2003). Por otra parte, al alinear la secuencia protéica de CLDN -1 y la enzima que realiza el corte proteolítico para activar a pro-MMP -2, es decir, MMP -14 (Fig. 18), se observa que las regiones que comparten similitudes, corresponden al dominio extracelular 2 de CLDN -1 y el sitio activo



de MMP -14 (UniProt Consortium, 2015). Lo cual es significativo, pues de forma extracelular es que se da la interacción entre TIMP -2 y MMP -14 a través del sitio activo de ésta última, durante el mecanismo de activación clásico de MMP -2. (Fig. 9, Lafleur, *et al.*, 2003).

Los alineamientos sugieren que probablemente el mecanismo mediante el cual CLDN -1 participa en la activación de MMP -2 podría ser similar al mecanismo de activación clásico de pro-MMP -2, en el que TIMP -2 y MMP -14 forman un complejo de manera extracelular a través del sitio activo de MMP -14, que recluta a pro-MMP -2 para que se lleve a cabo el corte proteolítico que activa a la enzima (Fig. 9, Lafleur, *et al.*, 2003). Sin embargo, existe la posibilidad de que el mecanismo sea distinto, ya que los alineamientos entre el sitio activo de MMP -14 y el dominio extracelular 2 de CLDN -1 (Fig. 18) pueden indicar un mecanismo en el cual CLDN -1 funcione como una proteasa de membrana, tal y como describieron Miyamori colaboradores en 2001, trabajo en el cual CLDN -5 funciona como proteasa de membrana activadora de MMPs. No obstante, éstas son sólo hipótesis a probar en futuros trabajos, en dónde se establezca si existe interacción biológica entre los dominios compartidos en éstos alineamientos.



Con base en los resultados del presente estudio, se proponen los siguientes modelos para ilustrar el aumento de CLDN -1 y MMP -2 en las células AGS que sobreexpresan a CLDNs - 6 y -9 (Fig. 19), así como el posible mecanismo mediante el cual CLDN -1 promovería la activación de MMP -2 (Fig. 20).

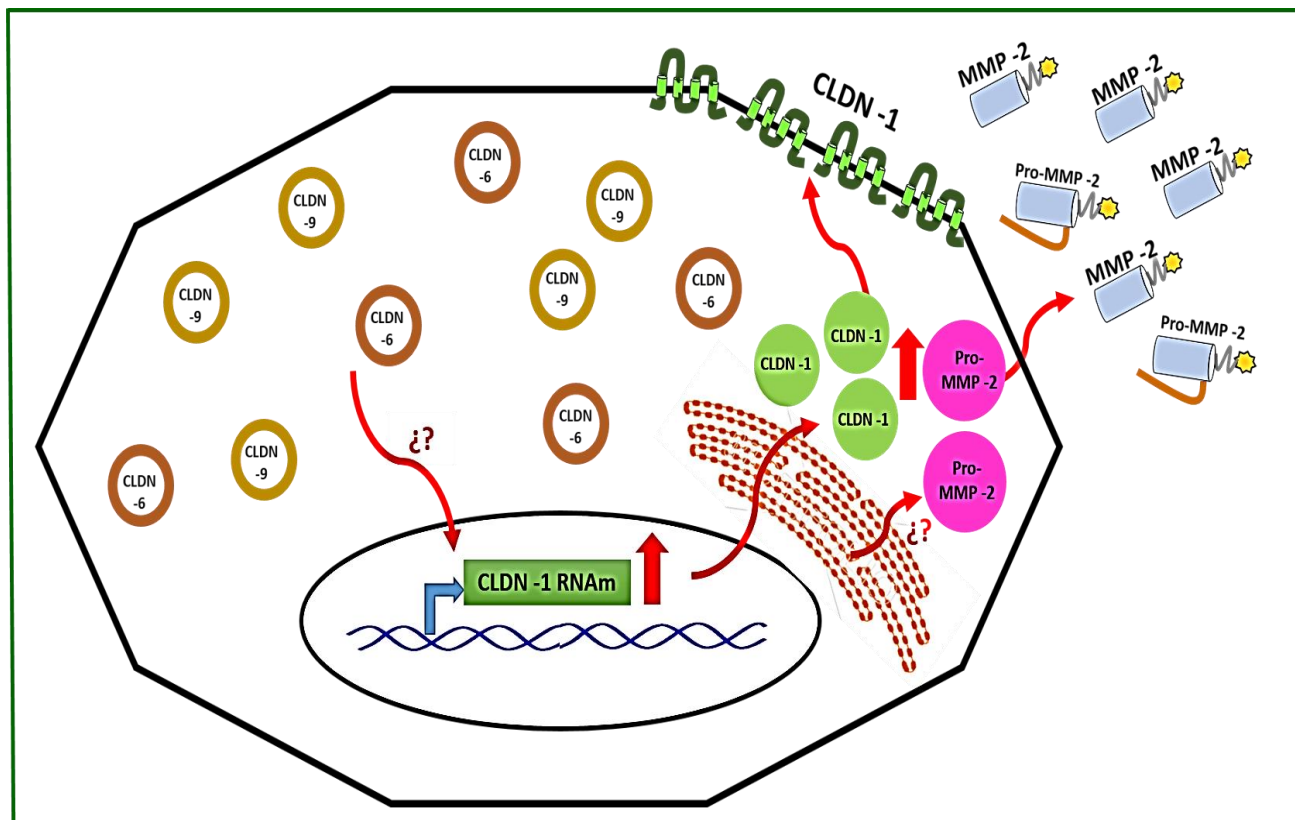


Figura 19. Ilustración del incremento en la expresión de CLDN -1 y MMP -2 en las células AGS que sobreexpresan a CLDNs -6 y -9. La expresión citoplasmática de CLDNs -6 y -9 de alguna manera incrementa el RNAm de CLDN -1 y su proteína, así como MMP -2 a nivel de proteína.

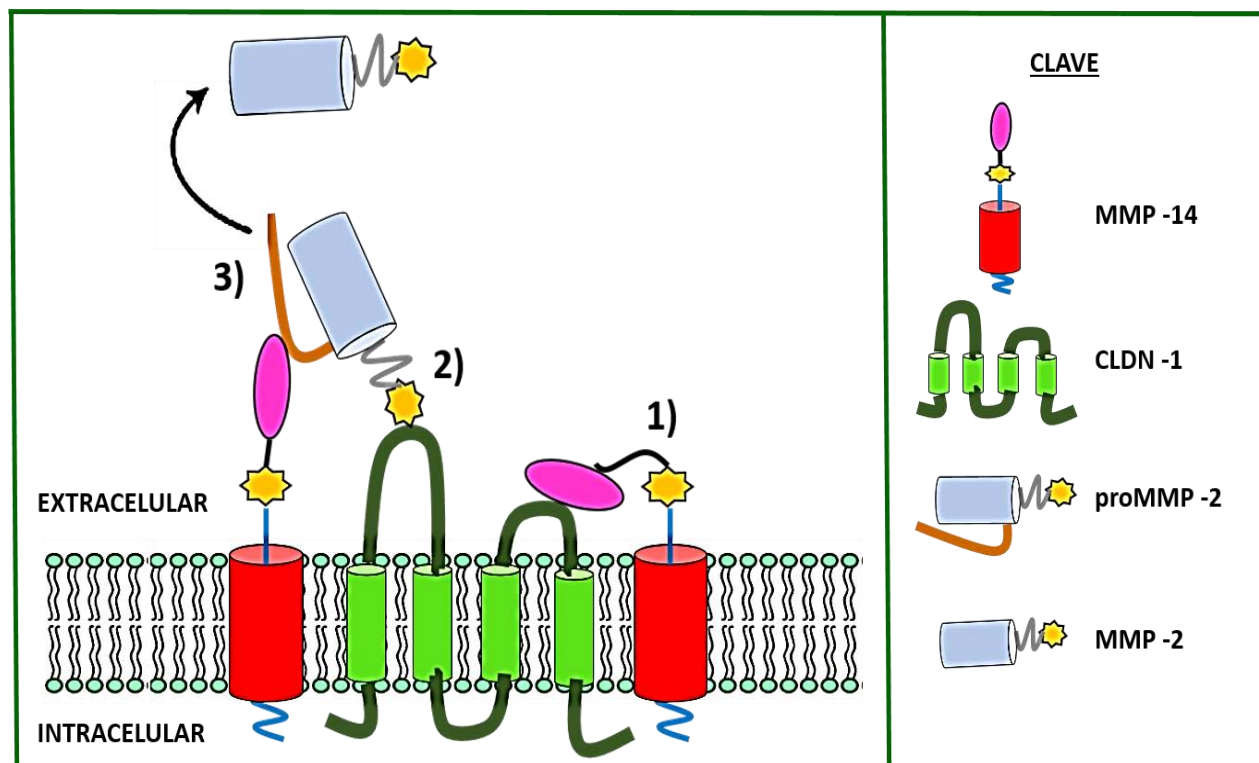


Figura 20. Modelo del posible mecanismo en el que participa CLDN -1 para la activación de MMP -2.

1) CLDN -1 y MMP -14 forman un complejo a través del dominio extracelular 2 de CLDN -1 y el sitio activo de MMP -14; 2) pro-MMP -2 es reclutada del espacio extracelular y se une vía su dominio c-terminal al dominio extracelular 1 de CLDN -1; 3) Una molécula libre de MMP -14 en cercana proximidad, puede entonces cortar el propéptido de pro-MMP-2, generando a la enzima activa, que es liberada al espacio extracelular.



10. CONCLUSIONES

1. La expresión endógena de CLDN -1 y MMP -2 está incrementada en las células AGS/CLDN6 y AGS/CLDN9, comparada con los controles.
2. Se logró un silenciamiento exitoso a nivel de proteína de CLDN -1 en todas las células.
3. El silenciamiento de CLDN -1, disminuye la actividad de MMP -2 presente en los medios condicionados de todas las células.
4. Un fragmento de la secuencia proteica del dominio extracelular 1 de CLDN -1, tiene una identidad del 21 % con parte del dominio carboxilo terminal de pro-MMP -2, mientras que una región del dominio extracelular 2 de CLDN -1 tiene una identidad del 30 % con una región del dominio catalítico de MMP -14.



11. PERSPECTIVAS

- ✓ *Realizar ensayos de proliferación, migración e invasividad de las líneas celulares en las que se silenció la expresión de CLDN -1.*
- ✓ *Determinar si existe interacción biológica entre los dominios extracelulares de CLDN -1, el dominio catalítico de MMP -14 y/o la región carboxilo terminal de pro-MMP -2.*
- ✓ *Determinar si CLDN -1 es suficiente para promover la activación de MMP -2 en ausencia de TIMP -2 en éstas líneas celulares.*
- ✓ *Determinar el proceso de transducción de señales en el que participan CLDNs -6 y -9 para incrementar la expresión endógena de MMP -2 y CLDN -1 en éstas líneas celulares.*



12. LITERATURA CITADA

- 1) Agarwal R., T. D'Souza, P. J. Morin. 2005. **Claudin-3 and Claudin-4 Expression in Ovarian Epithelial Cells Enhances Invasion and Is Associated with Increased Matrix Metalloproteinase-2 Activity.** *Cancer Res.* 65: 7378-7385.
- 2) Aktories K. y J. T. Barbieri. 2005. **Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches.** *Nat Rev Microbiol.* 3: 397-410.
- 3) Altschul S. F., T L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman. 1997. **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucl Ac Res.* 25:3389-3402.
- 4) Altschul S. F., J. C. Wootton, E. M. Gertz, R. Agarwala, A. Morgulis, A. A. Schäffer, Y. Yu. 2005. **Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices.** *FEBS J.* 272:5101-5109.
- 5) Anderson W. J., Q. Zhou, V. Alcalde. 2008. **Genetic targeting of the endoderm with claudin-6CreER.** *Dev Dyn.* 237: 504-512.
- 6) Bode W. 2003. **Structural basis of matrix metalloproteinase function.** *Biochem Soc Symp* 70:1-14.
- 7) Cairns R. A., I. S. Harris, T. W. Mak. **Regulation of cancer cell metabolism.** *Nat Rev Canc.* 11: 85-95.
- 8) Chang-Hwan Y., K. Min-Jung, P. Myung-Jin, P. In-Chul, H. Sang-Gu, A. Sungkwan, C. Yung-Hyun, Y. Gyesoon, L. Su-Jae. **Claudin-1 Acts through c-Abl-Protein Kinase C_α (PKC_α) Signaling and Has a Causal Role in the Acquisition of Invasive Capacity in Human Liver Cells.** *The Jou. of Biol. Chem.* 285: 226-233
- 9) Cheng Y., Y. Xiaoshuang, S. Wansheng, J. Wang, Z. Gong, G. Yang, C. Guo, Y. Zhou, X. Wang, Q. Zhou, F. Zeng. 2012. **Claudin 6: a novel surface marker for characterizing mouse pluripotent stem cells.** *Cell Research* 22:1082-1085.
- 10) Dhawan P., A. B. Singh, N. Deane, Y. No, S. Shiou, C. Schmidt, J. Neff, M. Washington, D. Beauchamp. 2005. **Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer.** *JCI.* 115: 1765-1776
- 11) Ding L., Z. Lu, Q. Lu, Y. H. Chen. 2013. **The claudin family of proteins in human malignancy: a clinical perspective.** *Can Manag and Res.* 2013;5 367-37.
- 12) Egeblad M. y Z. Werb. 2002. **New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression.** *Nat. rev.* 2: 161-174.



- 13) Escudero-Esparza A., W. G. Jiang, T. A. Martini. 2011. **The claudin family and its role in cáncer and metástasis.** *Fro. in Bio.* 16: 1069-1083.
- 14) Findley M. K. y Koval M. 2009. **Regulation and roles for Claudin-family Tight junctions proteins.** *Life.* 61: 431-437.
- 15) Folgueras A., A. M. Pendás, L. M. Sánchez, C. López-Otín. 2004. **Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies.** *Int. J. Dev. Biol.* 48: 411-424 (2004)
- 16) Gialeli, C., D. Achilleas, Theocharis, K. Nikos. 2010. **Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting.** *FEBS Journal.* 278: 16-27.
- 17) González-Mariscal L., S. Lechuga, E. Garay. 2007. **Role of tight junctions in cell proliferation and cáncer.** *Prog in Hist and Cytoch.* 42:1-57
- 18) Green M. R., J. Sambrook. 2012. **Molecular Cloning: A laboratory manual**, 4ta ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Estados Unidos. 2028 p.
- 19) Günzel D. y A. S. L. Yu. 2013. **Claudins and the modulation of tight junction permeability.** *Physiol Rev.* 93: 525-569.
- 20) Hanahan D., R. A. Weinberg. 2011. **Hallmarks of cáncer: The next generation.** *Cell.* 144: 646-674
- 21) Heerboth S., G.Housman, M. Leary, M. Longacre, S. Byler, K. Lapinska, A. Willbanks, S. Sarkar. 2015. **EMT and tumor metastasis.** *Clin and Trans Med.* 4: 1-13.
- 22) Huang J., L. Zhang, C. He, Y. Qu, J.Li, J. Zhang, T. Du, X. Chen, Y. Yu, B. Liu, Z. Zhu. 2014. **Claudin-1 enhances tumor proliferation and metastasis by regulating cell anoikis in gastric cáncer.** *Oncotarget.* 6: 1652- 1665.
- 23) **Instituto Nacional del Cáncer.** Estados Unidos. 2015. <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es> (Consultado el 25-27 de julio de 2015).
- 24) Iravani O., B. Wei-Rong, T. Pei-Jou, G. Wai-Cheong, B. Boon-Huat. 2013. **Claudins and gastric carcinogenesis.** *Exp Biol Med.* 238: 344-349.
- 25) Jin Z., W. Jiang, L. Wang. 2015. **Biomarkers for gastric cancer: Progression in early diagnosis and prognosis (Review).** *Oncol Let.* 9: 1502-1508.
- 26) Klein G., E. Vellenga, M.W. Fraaije, W.A. Kamps, E.S.J.M. de Bont. 2004. **The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia.** *Crit. Rev. in Onc./Hem.* 50: 87-100.



- 27) Kursad T., T. Tammy-Claire. 2011. **Junctions gone bad: Claudins and loss of the barrier in cáncer.** *Bioc. et Bioph. Acta.* 1816: 73-79.
- 28) Kwon M. J. 2013. **Emerging Roles of Claudins in Human Cancer.** *Int. J. Mol. Sci.* 14: 18148-18180.
- 29) Lafleur M. A., M. M. Handsley, D. R. Edwards. 2003. **Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis.** *Exp Rev in Mol Med.* 5: 1-39.
- 30) Lal-Nag M. y P. J. Morin. 2009. **The Claudins.** *Genome Biology.* 10:235
- 31) 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, A. T. Weeraratna. 2006. **Claudin-1 overexpression in melanoma is regulated by PKC and contributes to melanoma cell motility.** *Oncogene.* 26: 3846-3856
- 32) Lodish H., A. Berk, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, A. Bretscher, H. Ploegh, P. Matsudaria. 2007. **Molecular Cell Biology**, 6ta ed. Ed. W. H. Freeman. Estados Unidos. 973p.
- 33) Martin T. A. y W. G. Jiang. 2009. **Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metástasis.** *Bioch et Bioph Act.* 1788: 872-891.
- 34) Mineta K., Y. Yamamoto , Y. Yamazaki , H. Tanaka , Y. Tada , K. Saito , A. Tamura , M. Igarashi , T. Endo , K. Takeuchi , S. Tsukita . 2011. **Predicted expansion of the claudin multigene family.** *FEBS Lett.* 585(4):606-12.
- 35) Murphy G. y T. Crabbe. 1995. **Gelatinases A and B.** *Meth Enzymol* 248:470-484.
- 36) Miyamori H., T. Takino, Y. Kobayashi, H. Tokai, Y. Itoh, M. Seiki, H. Sato. 2001. **Claudin Promotes Activation of Pro-matrix Metalloproteinase-2 Mediated by Membrane-type Matrix Metalloproteinases.** *The Jour of Biol Chem.* 270: 28204-28211.
- 37) **National Center for Biotechnology Information.** 2015. Estados Unidos. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4313> (Consultado el 25 de abril de 2015).
- 38) Oku N., E. Sasabe, E. Ueta, T. Yamamoto, T. Osaki. 2006. **Tight Junction Protein Claudin-1 Enhances the Invasive Activity of Oral Squamous Cell Carcinoma Cells by Promoting Cleavage of Laminin-5 ;2 Chain via Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and Membrane-Type MMP-1.** *Cancer Res.* 66: 5251-5257
- 39) Rendón-Huerta E. P., C. O. Chavarria-Velazquez, L. F. Montaña. 2013. **Claudins, inflammation and Epithelial-Mesenchymal Transition in Gastric Tissue.** *J Gastroint Dig Syst.* 3: 149.



- 40) Rendón-Huerta E. P., T. Fortoul, M. T. Gorráez, X. Garcia-Samper, G. Alvarez-Fernández, V. Zavala-Zendejas, L. F. Montaña. 2010. **Distribution and Expression Pattern of Claudins 6, 7, and 9 in Diffuse- and Intestinal-Type Gastric Adenocarcinomas.** *Jour of Gastro Can.* 41: 52-59.
- 41) Singh S., A. Narang, R. Mahato. 2011. **Subcellular fate and off-target effects of siRNA, shRNA, and miRNA.** *Pharmac Res.* 28: 2996-3015.
- 42) Stebbing J., Filipovic A., Giamas G. 2013. **Claudin 1 as a promoter of EMT in Hepatocellular carcinoma.** *Oncogene.* 32, 4871-4872.
- 43) Toth M., A. Sohail, R. Fridman. 2006. **Assessment of Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by Gelatin Zymography.** *Met in Mol Med.* 57: 163-174.
- 44) Turksen K., T. C. Troy. 2001. **Claudin-6: a novel tight junction molecule is developmentally regulated in mouse embryonic epithelium.** *Dev Dyn.* 222:292-300.
- 45) **World Health Organization.** 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> (Consultado el 25 de abril de 2014).
- 46) Zavala-Zendejas V. E., A. C. Torres-Martinez, B. Salas-Morales, T. I. Fortoul, L. F. Montaña, E. P. Rendon-Huerta. 2011. **Claudin-6, 7, or 9 Overexpression in the Human Gastric Adenocarcinoma Cell Line AGS Increases Its Invasiveness, Migration, and Proliferation Rate.** *Can. Invest.* 29:1-11.



12. ANEXOS

Anexo 1. CULTIVO CELULAR

Medios y soluciones

D-MEM

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

Adicionar 2 g de NaHCO_3 y disolver

Ajustar a $\text{pH} = 7.4$ (puede quedar 0.1 o 0.2 abajo)

Levar a 1 L de volumen con agua

Esterilizar por filtración separando en botellas de 500 mL etiquetadas

DMEM + GLICEROL 10%

Para 10 mL de medio total:

1.25 mL de Glicerol al 80%

8.75 mL de DMEM suplementado.

PBS 1X $\text{pH} = 7.5$

Para 1L:

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

Disolver en 900 mL de agua

Ajustar el pH

Aforar con ddH_2O , esterilizar por filtración y guardar en refrigeración.

Descongelamiento

1. Descongelar un críovial y colocar su contenido en un tubo cónico
 2. Adicionar 3 mL del medio de cultivo respectivo
 3. Centrifugar a 1500 rpm por 5 min.
 4. Eliminar el medio
 5. Resuspender el botón celular con 1 mL de medio de cultivo
 6. Colocar la suspensión celular en la caja respectiva con el medio de cultivo adecuado
- Caja Petri p 100 (7-10 mL de medio de cultivo aprox.)

Propagación

1. Retirar el medio de cultivo
2. Lavar dos veces con 5 mL de PBS 1X
3. Retirar el PBS
4. Adicionar 0.5 mL de Tripsina-EDTA 1X



5. Incubar hasta desprendimiento total de las células
 6. Inactivar la tripsina con 3 mL de medio de cultivo
 7. Resuspender 10 veces
 8. Colocar la suspensión en tubos cónicos
 9. Centrifugar a 1500 rpm por 5 min.
 10. Eliminar el medio
 11. Adicionar 1 mL de medio y resuspender
 12. Tomar una alícuota para contar en cámara de New Bauer
 13. Colocar 7 ml de medio en la caja Petri p100.
 14. Contar las células de los 4 cuadrantes de los extremos, 2 veces
 15. Sacar el promedio y dividir entre 4 (Número de células $\times 10^4$ /mL de suspensión celular)
 16. Colocar aproximadamente 7×10^5 células por frasco a sembrar
- Caja Petri p 100 (aprox. 3.5×10^6 Células IEC-18)

Congelamiento

1. Retirar el medio de cultivo
2. Lavar dos veces con 5 mL de PBS 1X
3. Retirar el PBS
4. Adicionar 0.5 mL de Tripsina-EDTA 1X
5. Incubar hasta desprendimiento total de las células
6. Inactivar la tripsina con 3 mL de medio de cultivo
7. Resuspender y colocar en tubos cónicos
8. Centrifugar a 1500 rpm por 5 min.
9. Eliminar el medio
10. Adicionar el volumen necesario de DMEM + Glicerol al 10% para congelar aproximadamente 5×10^6 Células por vial o 1 caja de PETRI.
11. Resuspender y colocar 1 ml de esta suspensión en críoviales marcados y en hielo
12. Colocar en congelador y colocar en REVCO (-70°C) al día siguiente.



Anexo 2. EXTRACCIÓN DE RNA (TRIZOL)

Reactivos

- ✓ Trizol.
- ✓ Agua libre de RNAsas: Colocar agua didestilada en botellas estériles y adicionar DEPC a una concentración final de 0.01% (v/v). Dejar reposar toda la noche a temperatura ambiente y esterilizar en autoclave.
- ✓ Cloroformo.
- ✓ Isopropanol.
- ✓ Etanol grado biología molecular al 75 % (preparado con agua libre de RNAsas).

Protocolo

1. Adicionar 3 ml de Trizol a cada placa de cultivo p100 (1 ml a las placas de 6 pozos).
2. Resuspender hasta despegar por completo las células y pasarlo por la punta de micropipeta 10 veces.
3. Colocar los lisados en tubos cónicos de 15 ml.
4. Incubar por 5 min a temperatura ambiente.
5. Adicionar 0.2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol usado.
6. Agitar manualmente durante 15 seg.
7. Incubar 2 min a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 4°C por 20 min a 4000 rpm.
9. Colocar la fase acuosa superior (transparente) en tubos cónicos nuevos, teniendo cuidado de no tomar parte de la fase media (blanca), que corresponde al DNA.
10. Adicionar 0.5 ml de Isopropanol por cada ml de Trizol empleado.
11. Agitar manualmente durante 15 seg.
12. Incubar a temperatura ambiente por 10 min.
13. Centrifugar a 4°C por 15 min a 4000 rpm.
14. Decantar el sobrenadante.
15. Lavar el precipitado (RNA) con 1 ml de etanol grado biología molecular al 75 %, por cada ml de Trizol empleado.
16. Agitar 5 seg, y centrifugar a 4°C por 10 min a 4000 rpm.
17. Decantar el sobrenadante y dejar secar el precipitado (RNA) a temperatura ambiente.
18. Disolver el precipitado (RNA) en 100 ul de agua libre de RNAsas, para placas p100, y 30 µl para placas de 6 pozos.
19. Colocar el RNA en tubos eppendorf, debidamente rotulados.
20. Almacenar a -70°C.



Anexo 3. RT-PCR CON KIT SUPER SCRIPT ONE-STEP (INVITROGEN)

Reactivos

- ✓ *Primers específicos.*
- ✓ *Kit Super Script One-Step (Invitrogen) 100 reacciones:*
 - RT/ Platinum® Taq Mix: 100 µL
 - 2X Reaction Mix (a buffer containing 0.4 mM of each dNTP, 2.4 mM MgSO₄): 3 × 1 mL
 - 5 mM Magnesium Sulfate: 500 µL
 - 50 mM Magnesium Sulfate: 1 mL

Protocolo

1. *Programar el termo ciclador (la síntesis de cDNA es seguida por la amplificación por PCR automáticamente):*

A. Síntesis de cDNA y predesnaturalización	B. Amplificación por PCR	C. Extensión final
1 ciclo de 55° C por 30 min	40 ciclos de: -Desnaturalización: 94° C por 20 segs -Alineamiento: 54° C por 30 segs -Extensión: 72° C por 40 segs	1 ciclo de 72° C por 7 min

2. *Añadir los siguientes componentes a tubos para PCR puestos en hielo:*

Componente	Volumen
<i>Reaction mix</i>	10 ul
<i>Primer forward 10 uM</i>	0.5 ul
<i>Primer reverse 10 uM</i>	0.5 ul
<i>RNA 0.1 µg/µl</i>	2.5 ul
<i>RT/Platinum Taq mix</i>	0.4 ul
<i>Agua destilada estéril</i>	6.1 ul

3. *Mezclar suavemente y asegurarse de que los componentes están en el fondo del tubo (centrifugar un poco si es necesario).*
4. *Poner las muestras en el termociclador.*
5. *Analizar el producto.*



Anexo 4. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA CELULAR TOTAL

Buffers:

Buffer de lisis pH = 7.5

Para preparar 100 mL:

0.8766 g de NaCl (150 mM)

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

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

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

1.0 mL de IGEPAL (1%)

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

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

Disolver los compuestos y ajustar el pH

Aforar a 100 mL con agua

Almacenar en Refrigeración

Antes de usar, adicionar los siguientes inhibidores, por cada mL de Buffer:

4 uL de Leupeptina 5 mg/mL (20 µg/mL)

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

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

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

Buffer de Laemli 4X

Para 50 mL:

20 mL de SDS al 10% (4%)

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

10 mL de Glicerol (20%)

0.02 g de Azul de Bromofenol (0.04%)

Disolver y aforar a 50 mL

Alicuotar en tubos de 15 mL

Almacenar en congelación

Protocolo

1. Una vez que las células lleguen a una confluencia del 90%, lavarlas 2 veces con PBS y congelarlas a -70° C, hasta el momento de la extracción.
2. Descongelar las cajas con los cultivos celulares en hielo.
3. Adicionar 1 mL de Buffer de lisis con Inhibidores.
4. Raspar la caja con un Scraper
5. Recuperar la suspensión de células y colocarla en un tubo de polipropileno previamente marcado
6. Sonicar por 1 min a un 25% de amplitud
7. Centrifugar en ultracentrífuga con rotor 70 T por 30 min a 39,000 rpm a 4°C



8. Colocar 900 μ l del sobrenadante en tubos eppendorf previamente marcados y colocados en hielo, y guardar el resto en otros tubos eppendorf para cuantificación de proteína.
9. Añadir 450 μ l de buffer de Laemli 4X y guardar en congelación.
10. Antes de emplear la muestra para corrimiento electroforético adicionar B-Mercaptoetanol para tener una concentración del 5%.

Anexo 5. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA, MÉTODO BRADFORD

Para poder realizar la cuantificación de proteína se procede a preparar diluciones 1:50 (para 10 μ l de muestra se añadieron 490 μ l de agua didestilada). Todas las diluciones se colocan en tubos limpios marcados y en hielo.

Para una cuantificación de proteína adecuada es necesario elaborar una curva patrón, para la cual se utiliza una solución stock de albúmina de 100 μ g/ml. Esta dilución se preparó a partir de una solución de albumina de 1 mg/ml, esto es, se colocaron 500 μ l de la solución de albúmina de 1 mg/ml y se colocó en un tubo cónico nuevo, y se adicionan 4500 μ l de agua desionizada o buffer A para obtener una concentración final de 100 μ g/ml.

Curva patrón de Albúmina (BSA)

Concentración (μ g/ml)	Volumen de Albúmina (μ l) (100 μ g/ml) (μ l)	Volumen de amortiguador A
0.0	0	1000
1	10	990
2	20	980
3	30	970
4	40	960
5	50	950
6	60	940
7	70	930
8	80	920
9	90	910
10	100	900
20	200	800
30	300	700
40	400	600
50	500	500
60	600	400



Determinación

Posteriormente se colocan 80 µl de cada muestra problema y de las muestras de albúmina en una placa de 96 pozos por duplicado y a continuación se colocan 20 µl del reactivo de BIO-RAD. Se mezcla y se incuba la placa a temperatura ambiente 15 min a máximo 1 h, y se registran las lecturas en el equipo Victor² 1420 Multilabel Counter de Wallac a 560 nm. Finalmente se calculan las concentraciones de proteína específica para cada muestra tomando en cuenta los factores de dilución realizados.

Anexo 6. WESTERN BLOT

1. Reactivos y Soluciones

Acrilamida 30.8%

Para 100 mL:

30 g de Acrilamida (BIO-RAD) (30%)

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

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

Llevar a 100 mL con ddH₂O y guardar en refrigeración

Gel Separador al 12.5%

12.5 mL de Acrilamida 30.8%

7.5 mL de Tris 1.5 M pH = 8.8

9.55 mL de ddH₂O

150 µL de SDS al 20%

15 µL de TEMED

150 µL de Persulfato de Amonio al 10%

Gel Concentrador

2.5 mL de Acrilamida 30.8%

3.75 mL de Tris 0.5 M pH = 6.8

8.55 mL de ddH₂O

75 µl de SDS al 20%

15 µl de TEMED

150 µl de Persulfato de Amonio al 10%



Buffer de Electroforesis

Para 4L:
12.13 g de Tris (25 mM)
57.65 g de Glicina (192 mM)
4 g de SDS (0.1%)
pH = 8.3
Aforar con ddH₂O

Buffer de Transferencia

Para 1 L:
3.03 g de Tris (25 mM)
14.4 g de Glicina (192 mM)
200 mL de Metanol (20%)
pH = 8.3
Nota: No ajustar pH con ácidos o bases, el pH de 8.3 se obtiene si se pesan correctamente los ingredientes.
Aforar con ddH₂O y guardar en refrigeración.

TBS 1X (Para lavados de membrana)

Para 1L:
2.423 g de Tris (20 mM)
8 g de NaCl (136 mM)
pH = 7.6
Aforar con ddH₂O y guardar en refrigeración.

TTBS 1X (Para lavados e incubaciones con anticuerpos)

Para 1L:
2.423 g de Tris (20 mM)
8 g de NaCl (136 mM)
pH = 7.6
1 mL de Tween 20 (0.1%)
Aforar con ddH₂O y guardar en refrigeración.

2. Protocolo

1. Preparar el gel separador, dejando polimerizar por 20 min, colocando 1 mL de isopropanol en la parte superior para permitir la formación de un gel recto.
2. Eliminar el agua, secar con papel filtro y colocar el gel concentrador y el peine, dejando polimerizar por 20 min.
3. Colocar aproximadamente 1.8 L de buffer de electroforesis en la cámara y buffer nuevo en la cámara superior.
4. A las muestras de proteína total se les adicionan 10 μ L de β -Mercaptoetanol (para tener una concentración de 5% de este compuesto).



5. Se colocan las muestras en ebullición por 5 min.
6. Se cargan las muestras en el gel para poner aproximadamente 40 µg de proteína.
7. Realizar una electroforesis a 50 mA por cada gel, durante aproximadamente 1.5 hrs.
8. Lavar el gel con buffer de transferencia con agitación suave por 10 min a temperatura ambiente.
9. Mojar los cojines y la membrana de nitrocelulosa con el buffer de transferencia.
10. Colocar un cojín, luego la membrana y posteriormente el gel, cuidando no dejar burbujas entre el gel y la membrana y tapar con el segundo cojín.
11. Transferir en una cámara Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Biorad), a 120 mA por 1 hora.
12. Teñir la membrana con Rojo de Ponceau para corroborar la transferencia.
13. Lavar con TBS 1X hasta desteñir completamente.
14. Bloquear por 1 h a temperatura ambiente con agitación suave usando 10 mL TBS 1X con 10% de leche descremada.
15. Colocar cada pedazo de membrana en un recipiente con 10 mL del buffer TTBS 1X con el primer anticuerpo incubando toda la noche con agitación suave a 4°C.
16. Realizar tres lavados con 10 mL de TTBS 1X de 10 min cada uno con agitación suave.
17. Incubar por 2 h con el amortiguador TTBS 1X con el segundo anticuerpo agitando suavemente y a temperatura ambiente.
18. Lavar tres veces con 10 mL de TTBS 1X de 10 min cada lavado con agitación suave a temperatura ambiente.
19. Lavar con 10 mL de TBS 1X por 10 min con agitación suave a temperatura ambiente.4

3. Revelado

1. Se utiliza el kit SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Invitrogen). Se toman 800 ul de buffer de peróxido y se mezclan con 800 ul de enhancer solution, e inmediatamente se vierten sobre la membrana, en la cual permanece 5 min.
2. Después de incubar con el kit, la membrana es puesta en el escáner C-DiGit (LI-COR)
3. Se hace el escaneo a sensibilidad estándar.
4. Finalmente se cuantifica la intensidad de las bandas por densitometría.



Anexo 7. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA siRNA DE CLDN₁ Y siRNA CONTROL CONJUGADO A FLUORESCÉINA, Santa Cruz Bio biotechnology)

A) Previamente:

El siRNA (Santa Cruz Biotechnology) viene liofilizado, resuspenderlo en 330 µl de buffer de dilución, y el control acoplado a fluoresceína (Santa Cruz) en 66 µl. Almacenarlo a -20°C, y alicuarlo, para evitar ciclos de congelación-descongelación.

- ✓ Preparar medio DMEM 2x (2 veces la concentración normal de L-glu, piruvato y antibiótico, y 20% de SFB).
- ✓ Se siembran en placas de 6 pozos 300,000 células/pozo (Viabiles. Corroborar viabilidad antes de sembrar) durante 40hrs en medio **libre de Antibiótico**, hasta confluencia de 70-80% (2 pozos por ensayo):

Línea celular	Número de Pozos por ensayo				TOTAL
	EXTRACCIÓN PROTEÍNA (Western Blot)	EXTRACCIÓN RNA (RT-PCR)	MEDIO CONDICIONADO (Zimograma)	CONTROL (siRNA conjugado a fluoresceína)	
AGS	2	2	2	1 (al pozo se le colocó un cubreobjetos estéril)	28 pozos
AGS/GFP	2	2	2	1 (al pozo se le colocó un cubreobjetos estéril)	
AGS/CLDN6	2	2	2	1 (al pozo se le colocó un cubreobjetos estéril)	
AGS/CLDN9	2	2	2	1 (al pozo se le colocó un cubreobjetos estéril)	

- ✓ Se rotulan 56 tubos eppendorf: 28 como “Sol. A”, y 28 como “Sol. B”.

B) Protocolo (Comenzar a las 9am):

1. Solución A:

- ❖ Añadir 100 µl de medio de transfección a los 14 tubos A.
- ❖ Diluir 8 µl de siRNA CLDN₁ en 12 de los tubos A.
- ❖ Diluir 8 µl de siRNA Control conjugado a fluoresceína en los 2 tubos A restantes (Marcarlos).

2. Solución B:

- ❖ Añadir 100 µl de medio de transfección a los 14 tubos B.
- ❖ Diluir 6 µl de reactivo de Transfección en cada uno de los tubos B.



3. Añadir con una pipeta cada tubo con la solución A, en su tubo correspondiente con la solución B. Nota: Tener cuidado de marcar los 2 tubos B que contendrán el control fluorescente.
 - ❖ Mezclar suavemente con la pipeta e incubar por 25min.
4. Aspirar el medio a los pozos que contienen las células y lavarlas con 500ul de PBS.
 - ❖ Aspirar el PBS.
 - ❖ Añadir 500ul de medio de transfección a cada pozo para lavarlos.
5. Añadir 800ul de medio de transfección a los 14 tubos B que contienen la solución A+B, mezclar suavemente con la pipeta.
6. Aspirar el medio de transfección de los pozos y añadirles el contenido del tubo B, a su pozo correspondiente; es decir, los 2 tubos B que contienen el control, añadirlos en su respectivo pozo con cubreobjetos (10:00 am).
7. Incubar las células por 6.5 horas a 37° 5 % de CO₂ (Hasta las 4:30pm).
8. Una vez transcurrido el tiempo de incubación:
 - ❖ A los pozos con el siRNA de CLDN₁: Sin retirar la mezcla de transfección, añadir a cada pozo 1ml de medio DMEM 2x. Incubar las células por 20hrs (12:30 pm del día siguiente)
 - ❖ A los pozos con el siRNA Control conjugado a fluoresceína: Quitar la mezcla de transfección, lavar las células con PBS y fijar las células en los cubreobjetos para visualizarlas en microscopio fluorescente.
9. A las 12:30 pm del día siguiente (20hrs), aspirar la mezcla de transfección y reemplazarlo con 2ml de medio de cultivo DMEM 1x fresco (10% de SFB, con antibiótico normal) e incubar a 37° 5 % de CO₂.
10. Al día siguiente: Lavar las células 2 veces con PBS.
 - ❖ Congelar a -70°C las células que van para extracción de PROTEÍNA.
 - ❖ Añadir 1ml de Trizol a Cada pozo de las células que son para extracción de RNA, y congelarlo a -70 °C en tubos.
 - ❖ Añadir 2ml de Medio de cultivo suplementado con Antibiótico, L-Glu y Piruvato, pero sin SFB, a las células que van para medio condicionado, e incubar 24hrs.
 - Transcurrido el tiempo, coleccionar el medio condicionado de las células en tubos y congelarlo a -70 °C.



Anexo 8. ZIMOGRAFÍAS

A) Reactivos

✓ **Buffer de electrophoresis:**

Tris 50 Mm	3 g
SDS al 10 %	10 ml
Glicina	14.4 g
Aforar a 1 L, ajustar pH 8.3	

✓ **Buffer de incubación:**

Tris 50 Mm	6.057 g
CaCl ₂ 0.1 M	4.41 g
NaCl 0.15 M	8.76 g
NaN ₃	0.2 g
Aforar a 1 L, ajustar pH 7.4	

✓ **Buffer de Laemly:**

Tris 0.5 M pH 6.8	1.75 ml
Glicerol	1 ml
SDS 10 %	1 ml
Azul de bromofenol	10 mg
Agua desionizada	5.75 ml

✓ **Acrilamida/bisacrilamida (38/2):**

Acrilamida	38 g
Bisacrilamida	2 g
Disolver en agua didestilada y aforar a 100 ml	

✓ **Gelatina:**

250 mg en 50 ml de agua didestilada, calentar y filtrar.

✓ **Tris 1.5 M pH 8.8:**

Tris	18.17 g
SDS al 10 %	4 ml
Disolver en 100 ml de agua didestilada y ajustar pH	

✓ **Tris 0.5 M pH 6.8:**

Tris	6.05 g
SDS al 10 %	4 ml
Disolver en 100 ml de agua didestilada y ajustar pH	



✓ **Gel concentrador:**

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

✓ **Gel separador:**

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

✓ **Solución teñidora:**

Metanol	10%
Ácido acético	10%
Glicerol	10%
Azul de coomasie al 1%	10%

✓ **Solución desteñidora:**

Metanol	10%
Ácido acético	10%
Glicerol	10%

B) Protocolo

Obtención de proteína de medio condicionado:

1. Dejar crecer las células de estudio en placas p100, hasta una confluencia de 80%.
2. Quitar el medio de cultivo y lavar son PBS.
3. Crecer las células 24 hrs adicionales en 6 ml de medio de cultivo sin suero fetal bovino.
4. Una vez transcurrido el tiempo, tomar el medio de cultivo y colocarlo en tubos cónicos de 15 ml.
5. Almacenar el medio a -70°C hasta su uso.
6. Descongelar los medios a temperatura ambiente.
7. Centrifugar el medio a 1000 rpm durante 3 min.



8. Colocar 4 ml del sobrenadante (medio condicionado) en amicones ultra de 30 Kda de tamaño de poro.
9. Centrifugar a temperatura ambiente por 20 min, a 4000 rpm.
10. Colocar la fase acuosa que quedó dentro del filtro en un tubo eppendorf y desechar el medio restante. Registrar el volumen obtenido durante la filtración.
11. Hacer una cuantificación de proteína del medio condicionado (protocolo previamente descrito, dilución 1:20).
12. Añadir buffer de Laemly a la muestra (El 50% del volumen total del filtrado).
13. Almacenar las muestras de proteína de medio condicionado a -20°C .

Zimograma

1. Preparar y montar los geles correspondientes.
2. Cargar 20 μg de la muestra de proteína de medio condicionado. Cargar 5 μl de MPM (peso molecular).
3. Hacer una electroforesis a 40 mA (amperaje constante).
4. Lavar el gel con Tritón X-100 al 2%, en agitación suave por 20 min (3 veces, 1 h en total).
5. Incubar el gel toda la noche a 37°C , en buffer de incubación.
6. Colocar el gel 1 h en solución teñidora en agitación suave.
7. Colocar el gel en solución desteñidora en agitación suave hasta observar bandas claras.
8. Visualizar las bandas presentes en el gel, con el equipo Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro.