



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

**CLAUDINA-6 REGULA LA ACTIVACIÓN DE MMP-2 EN CÉLULAS DE  
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO HUMANO (AGS)**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**TORRES MARTÍNEZ ANA CRISTINA**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA**  
**FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZA VALETA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ**  
**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

**MÉXICO CD. MX., JULIO, 2017**



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.



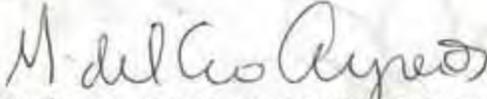
Lic. Ivonne Ramirez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 24 de abril de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **TORRES MARTÍNEZ ANA CRISTINA** con número de cuenta **402021915**, con la tesis titulada **"CLAUDINA-6 REGULA LA ACTIVACIÓN DE MMP-2 EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO HUMANO (AGS)"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA**:

Presidente: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS  
Vocal: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ  
Secretario: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA  
Suplente: DR. LUIS FELIPE MONTAÑO ESTRADA  
Suplente: DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 02 de junio de 2017

  
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## INDICE

<b>Índice de figuras</b> .....	i
<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	3
<b>1. Introducción</b> .....	5
1.1 Uniones Estrechas.....	5
1.2 Claudinas, estructura y función.....	9
1.3 Expresión y regulación de claudinas en cáncer gástrico.....	12
1.4 Matriz extracelular e invasión tumoral.....	15
1.5 Metaloproteasas de matriz extracelular.....	17
1.5.1 Gelatinasas (MMP-2 y MMP-9).....	19
1.6 Participación de las MMPs en la progresión del cáncer.....	21
<b>2. Planteamiento del problema</b> .....	23
<b>3. Hipótesis</b> .....	25
<b>4. Objetivo general</b> .....	26
4.1 Objetivos particulares.....	26
<b>5. Metodología</b> .....	27
5.1 Materiales y reactivos.....	27
5.2 Cultivos celulares.....	28
5.3 Fraccionamiento celular.....	28
5.4 Western blot.....	29
5.5 Inmunofluorescencias.....	29
5.6 Inmunoprecipitación.....	30
5.7 Citometría de flujo.....	31
5.8 Tratamientos con inhibidores de las vías MAPK, p38 y PKC.....	31
5.9 Silenciamiento de la expresión de claudina-1.....	32
5.10 Ensayo de regeneración de herida.....	32
5.11 Ensayo de invasión en matrigel.....	32
<b>6. Resultados</b> .....	34
6.1 Expresión de diferentes isoformas de las claudinas en las células AGS transfectadas.....	34
6.2 Expresión y localización de claudina.....	38
6.3 Interacción de claudina-1 con MMP-2 en las células AGS que sobreexpresan a claudina-6.....	41
6.4 Expresión de MMP-2 y MMP-14.....	43
6.5 Interacción de claudina-1 con MMP-14 en las células AGS que sobreexpresan a claudina-6.....	48

6.6 Silenciamiento de claudina-1 y su efecto en la actividad de MMP-2 así como en la migración e invasividad de las células AGS transfectadas.....	49
6.7 Inhibición de vías de señalización p38 MAPK, ERK 1/2, PKC y su efecto en la expresión de claudina-1 y MMP-2.....	55
<b>7. Discusión de resultados.....</b>	<b>59</b>
7.1 Parte 1. Expresión y localización de claudina-1 en las células AGS transfectadas.....	60
7.2 Parte 2. Expresión de MMP-2 y MMP-14 y su interacción con claudina-1 en las células AGS que sobreexpresan a claudina-6.....	61
7.3 Parte 3. Silenciamiento de Claudina-1 y su efecto en la migración e invasividad.....	63
7.4 Parte 4. Inhibición de las vías de señalización p38MAPK, ERK 1/2, PKC y su efecto en la expresión de Claudina-1 y MMP-2.....	64
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>66</b>
<b>9. Perspectivas.....</b>	<b>69</b>
<b>10. Literatura citada.....</b>	<b>70</b>
<b>11. ANEXO I (Artículo requisito).....</b>	<b>77</b>
<b>12. ANEXO II.....</b>	<b>88</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de las Uniones Estrechas.....	6
<b>Figura 2.</b> Modelo predicho de la estructura de las claudinas.....	8
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de las interacciones entre moléculas de claudinas.....	9
<b>Figura 4.</b> Proteínas de señalización asociadas a las Uniones Estrechas.....	11
<b>Figura 5.</b> Composición de la matriz extracelular y sus conexiones con las células.....	16
<b>Figura 6.</b> Clasificación y estructura de las metaloproteasas de matriz extracelular.....	19
<b>Figura 7.</b> Modelo actual de activación de MMP-2 por MT1MMP.....	21
<b>Figura 8.</b> Expresión de claudinas -1, -2, -3, -4, -5, -7, -10 en las células AGS control y AGSCLDN6.....	35
<b>Figura 9.</b> Expresión de claudinas -1, -2, -3, -4, -5, -7, -10 en las células AGS, AGSGFP, AGSCLDN6 por ensayos de citometría de flujo.....	37
<b>Figura 10.</b> Expresión de claudina-1 en fracciones subcelulares de AGSCLDN6 y AGSCLDN9.....	39
<b>Figura 11.</b> Expresión de claudina-1 en las células AGSCLDN6 y AGSCLDN9. La expresión de claudina-1 fue determinada por inmunofluorescencias.....	40
<b>Figura 12.</b> Expresión de marcadores específicos en las diferentes fracciones de células AGSCLDN6 y AGSCLDN9.....	41
<b>Figura 13.</b> Co-inmunoprecipitación de claudina-1 con MMP-2 en células AGSCLDN6.....	42
<b>Figura 14.</b> Expresión de MMP-2 en células AGSCLDN6 y AGSCLDN9.....	44
<b>Figura 15.</b> Expresión de MMP-14 en células AGS AGSCLDN6 y AGSCLDN9.....	45
<b>Figura 16.</b> Expresión de MMP-14 en fracciones subcelulares de AGSCLDN6 y AGSCLDN9.....	47
<b>Figura 17.</b> Co-inmunoprecipitación de claudina-1 con MMP-14 en células AGSCLDN6.....	48

<b>Figura 18.</b> Eficiencia de transfección de un siRNA comercial específico para claudina-1.....	50
<b>Figura 19.</b> Efecto del silenciamiento de claudina-1 en la actividad de MMP-2.....	51
<b>Figura 20.</b> Efecto del silenciamiento de claudina-1 sobre la invasividad.....	53
<b>Figura 21.</b> Efecto del silenciamiento de claudina-1 sobre la migración celular.....	54
<b>Figura 22.</b> Expresión de claudina-1 en células AGSCLDN6 y AGSCLDN9 tratadas con inhibidores específicos de las vías de señalización ERK 1/2, p38 MAPKs y PKC.....	56
<b>Figura 23.</b> Expresión de MMP-2 en células AGSCLDN6 y AGSCLDN9 tratadas con inhibidores específicos de las vías de señalización ERK 1/2, p38 MAPKs y PKC.....	57
<b>Figura 24.</b> Efecto de la sobreexpresión de claudina-6 en células AGS.....	67
<b>Figura 25.</b> Modelo propuesto para la activación de MMP-2 a través de claudina-1 en células AGS que sobreexpresan a claudina-6.....	68

## **AGRADECIMIENTOS**

***A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Posgrado en Ciencias Biológicas por darme la oportunidad de crecer tanto en lo profesional como en lo personal.***

***Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto.***

***Al Comité Tutoral asignado; Dra. Leticia Rocha Zavaleta y la Dra. Patricia García López por sus valiosas aportaciones a este proyecto.***

***A mi directora de Tesis la Dra. Erika Patricia Rendón Huerta por todo el apoyo, la confianza, el cariño, por creer en mí para el desarrollo de éste proyecto, por motivarme, por ser un gran ejemplo en todos los aspectos.***

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A mí familia:**

*Principalmente a mis padres por todas las enseñanzas, confianza, apoyo, amor y cariño incondicional que día a día me brindan y que me motiva siempre a seguir adelante en mi vida y en mi desarrollo profesional. Gracias por ser los principales pilares de mi vida.*

*A mi hermana, gracias por tus consejos, por tu paciencia y por estar cerca de mí siempre. Los amo muchísimo familia!!!!*

### **A Gabriel:**

*Infinitas gracias por tu apoyo, por caminar conmigo este camino, por creer en mí y ayudarme a superar cada obstáculo que se presentó y sobre todo por tu inmenso amor, eres una gran motivación que me ayuda a crecer y dar lo mejor de mí, has aportado tanto a mi vida. Te amo!!*

### **A mis tutores:**

A la Dra. Erika y al Dr. Montaña quienes fuera de ser mis tutores son mis amigos y mis segundos padres, son mi ejemplo a seguir, de quienes he aprendido muchísimo, me han enseñado a tener una visión diferente de la vida en muchos aspectos, quienes me brindaron su confianza desde el primer momento y sobre todo su invaluable amistad, hemos compartido tantas cosas que sin duda son uno de los pilares más grandes de mi formación personal y académica. Gracias infinitas, los quiero muchísimo!!

### **A mis amigos:**

*A mis colegas y amigos del laboratorio por ser parte de mi formación profesional y personal, por el apoyo, los consejos, los momentos divertidos, por su tiempo, por ser parte de este gran equipo a quien considero mi segunda familia y que siempre será mi segundo hogar, en donde viví inolvidables y maravillosos momentos. Gracias por hacer de mi pasión por la ciencia más divertida: Pris, Ceci, Marilu, Jazmin, Ashlin, Christian, Jahaziel, Ernesto, Jess, Eli, Pris Anhel, Paco. Los quiero montones!!*

*A mi adorada Pris quien me brindó su apoyo, sus consejos y sobre todo su amistad incondicional y se convirtió en mi segunda hermana, gracias por aguantarme, por enseñarme, por motivarme y por compartir tantas experiencias en este camino de la ciencia, has aportado muchísimo a mi vida personal y profesional y sabes que te adoro!*

## **RESUMEN**

Las Uniones Estrechas (UE) son las uniones intercelulares más apicales de las células epiteliales y endoteliales. Las claudinas forman parte de una familia de proteínas transmembranales, las cuales son consideradas como los componentes principales de las UE y se encargan de regular la polaridad y la permeabilidad paracelular celular en los epitelios. Los cambios en la expresión de estas proteínas se asocian con el desensamble de las uniones estrechas y la pérdida de adhesión célula-célula, procesos que juegan un papel muy importante en la invasividad y metástasis. La alteración en la expresión de claudinas en algunos tipos de cáncer incluyendo el adenocarcinoma gástrico se ha asociado con un incremento en la capacidad invasiva como resultado del aumento en la actividad de metaloproteasas. Se ha reportado que claudinas-1,-2,-3 y -4 reclutan y promueven la activación de MMP-2 y que claudina-5 interacciona directamente con MMP-2 induciendo su activación. El aumento de claudina-1 induce la expresión de MMP-2 y a su vez incrementa la invasión y migración celular a través de activación de c-Abl y PCK $\delta$  en carcinoma hepatocelular. Estudios previos mostraron que la sobreexpresión de claudinas-6 y -9 en células de adenocarcinoma gástrico (AGS) promueve la proliferación, migración e invasividad celular y aumentan la expresión de claudina-1 endógena. En este trabajo se evaluó si la claudina-6 y/o -9 estaban directa o indirectamente asociadas con la activación de la MMP-2 en las células AGS para promover su invasividad. Se realizaron análisis de citofluorometría, fraccionamiento celular, western blot, inmunoprecipitación, zimografía en gelatina, migración celular e invasividad. Los resultados mostraron una ( $p < 0,001$ ) sobreexpresión significativa de claudina-1 en la membrana de las células AGS que sobreexpresan a claudina-6 (AGSCLDN6). Claudina-1 co-localiza con MMP-2 y MMP-14; curiosamente se detectó un aumento significativo en la expresión de MMP-14 en la membrana celular y el citosol en células AGSCLDN6 ( $p < 0,05$ ). El silenciamiento de claudina-1 en células AGSCLDN6 mostró una disminución de 60% de la actividad de MMP-2 en sobrenadantes de cultivo y una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en la migración celular y la invasividad. Nuestros

resultados sugieren que claudina-6 induce la activación de MMP-2 a través de la expresión de claudina-1 en la membrana, y que a su vez promueve la migración celular y la invasividad. Los resultados utilizando inhibidores específicos de p38, ERK 1/2 y PKC disminuye la expresión de claudina-1 y de MMP-2 respectivamente en las células AGSCDLN6. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de claudina-6 induce la expresión de claudina-1 por la vía de PKC y de MMP-2 por la vía de p38.

## **ABSTRACT**

Tight Junctions (TJ) are the most apical intercellular junctions of epithelial and endothelial cells. The claudins are integral membrane proteins responsible for regulating cellular polarity and cellular permeability in the epithelia. Changes in the expression of these proteins are associated with disassembly of the TJ and loss of cell-cell adhesion, processes that play a very important role in invasion and metastasis. Alteration in the expression of claudins in some types of cancer including gastric adenocarcinoma has been associated with an increase in invasive capacity as a result of increased metalloprotease activity. Both claudins-1, -2, -3 and -4 have been reported to recruit and promote MMP-2 activation and that claudin-5 directly interacts with MMP-2 and induces its activation. The increase of claudin-1 induces the expression of MMP-2 and in turn increases cell invasion and migration through the activation of c-Abl and PCK $\delta$  in hepatocellular carcinoma. Previous studies showed that overexpression of claudins-6 and -9 in gastric adenocarcinoma cells (AGS) promotes cell proliferation, migration, and invasion and increases the expression of endogenous claudin-1. In this work we evaluated whether claudin-6 and / or -9 were directly or indirectly associated with the activation of MMP-2 in AGS cells to promote their invasiveness. Cytofluorometry, cell fractionation, western blot analysis, immunoprecipitation, gelatin zymography, cell migration and invasiveness were performed. The results showed a significant ( $p < 0.001$ ) overexpression of claudin-1 in the membrane of AGS cells overexpressing claudin-6 (AGSCLDN6). Claudin-1 co-localizes with MMP-2 and MMP-14; interestingly, a significant increase in the expression of MMP-14 in the cell membrane and the cytosol in AGSCLDN6 cells ( $p < 0.05$ ) was detected. Silencing of claudin-1 in AGSCLDN6 cells showed a 60% decrease in MMP-2 activity in culture supernatants and a significant ( $p < 0.05$ ) decrease in cell migration and invasion. Our results suggest that claudin-6 induces the activation of MMP-2 through the expression of claudin-1 in the membrane, and that it once promotes cell migration and invasion. The results using specific inhibitors of p38, ERK 1/2 and PKC decrease the expression of claudin-1 and MMP-2 respectively

in AGSCDLN6 cells. These results suggest that overexpression of claudin-6 induces the regulation of claudin-1 expression via the PKC pathway and that of MMP-2 via the p38 pathway.

## **1. INTRODUCCION**

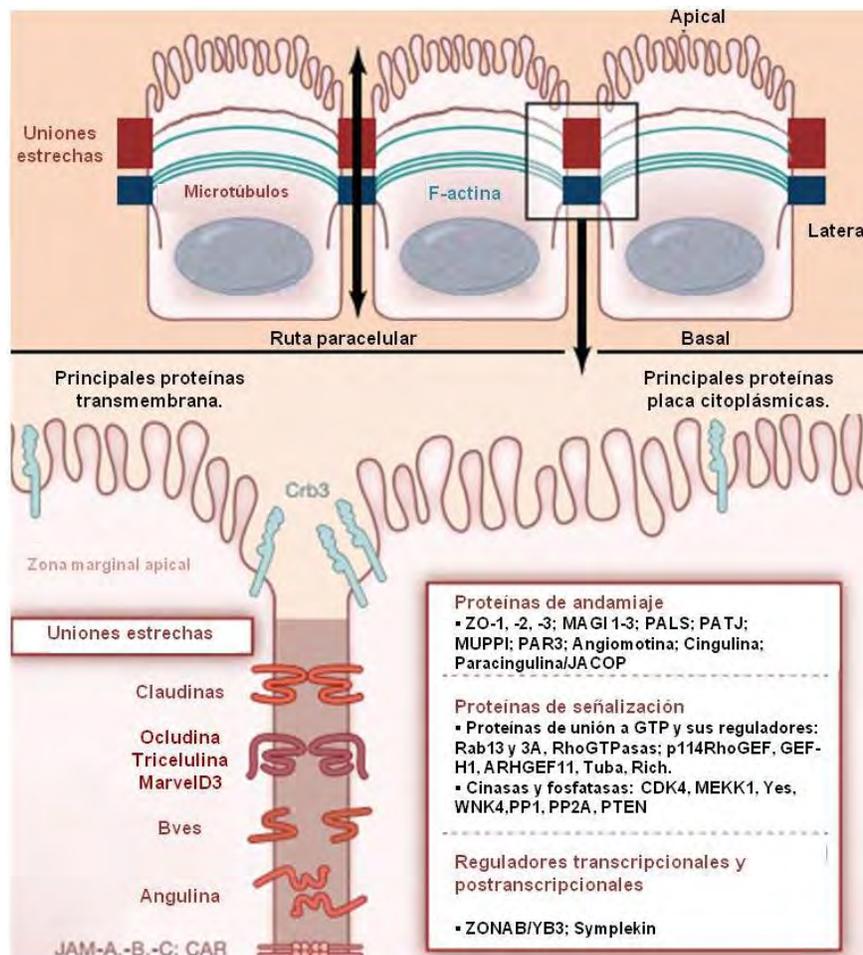
Una característica importante en el desarrollo de los organismos multicelulares es la formación de diferentes capas celulares las cuales separan diferentes compartimentos a través de la formación de órganos y tejidos. Las células epiteliales y endoteliales forman éstas barreras para mantener a los órganos en subcompartimentos funcionales y así regular el movimiento de agua, iones y otras proteínas a través de las monocapas, generando así la polaridad y función celular. La integridad del tejido y, el movimiento de iones y moléculas conocido como permeabilidad paracelular son regulados por los sitios de contactos célula-célula o uniones intercelulares que se construyen entre las células epiteliales y endoteliales.<sup>1,2</sup>

### **1.1 UNIONES ESTRECHAS**

Las Uniones Estrechas (UE) son las uniones intercelulares más apicales de las células epiteliales y endoteliales. Estos contactos establecen compartimentos separados en los organismos multicelulares y también son cruciales para el intercambio de sustancias entre el ambiente celular interno y externo. La importancia de las UE en el mantenimiento de la homeostasis dentro de los órganos radica en el hecho de que son una de las primeras barreras que enfrentan diferentes moléculas y algunos microorganismos, por lo que se les ha conferido tradicionalmente dos funciones principales que son: la regulación de la permeabilidad paracelular mediante la función de barrera, controlando la difusión de iones, agua y moléculas de tamaño mediano ( $< 15\text{Å}$ ); y el mantenimiento de la polaridad celular mediante la función de cerca, restringiendo el libre movimiento de proteínas y lípidos entre las superficies apical y basolateral<sup>3,4</sup>. Estas funciones se llevan a cabo específicamente por las claudinas, una familia de proteínas transmembranales que en su mayoría forman la columna vertebral de las UE<sup>1</sup>.

A la fecha se han identificado una gran cantidad de proteínas que componen a las UE. Estas pueden ser categorizadas dentro de tres grupos: 1) proteínas integrales de membrana JAM (junctional adhesion molecule) CAR (coxsackievirus and adenovirus

receptor)occludina y claudinas, principalmente); 2) proteínas citoplasmáticas asociadas a la periferia ( zonula ocludens (ZO-1/2/3,) proteína asociada a uniones estrechas (PATJ), etc.), que organizan a las proteínas integrales de membrana y las conectan a los filamentos de actina o a otras proteínas citoplasmáticas; y 3) proteínas de señalización ( $\beta$ -catenina, proteína de unión a ácidos nucleicos asociada a ZO1 (ZONAB), etc.), que pueden estar involucradas en el proceso de ensamble de las uniones, cuya función es activar ciertas vías de señalización en el interior de la célula y además regular la transcripción de diferentes genes asociados con el movimiento y la proliferación celular<sup>5,6,7,8</sup> (figura 1).



**Figura 1. Estructura de las Uniones Estrechas.** Las Uniones Estrechas se forman en la parte más apical de dos células vecinas. Sus componentes principales son los receptores CAR, las proteínas JAM, tricelulina, ocludina y claudinas. Todas estas proteínas interactúan con proteínas citoplasmáticas como los miembros de la familia de las ZO (ZO-1, -2, y -3), con proteínas de señalización como proteínas de unión a GTP, Rab 13, cinasas y fosfatasas, y con reguladores transcripcionales como ZONAB entre otras. (Modificado de Balda MS, Matter K., 2014)<sup>8</sup>

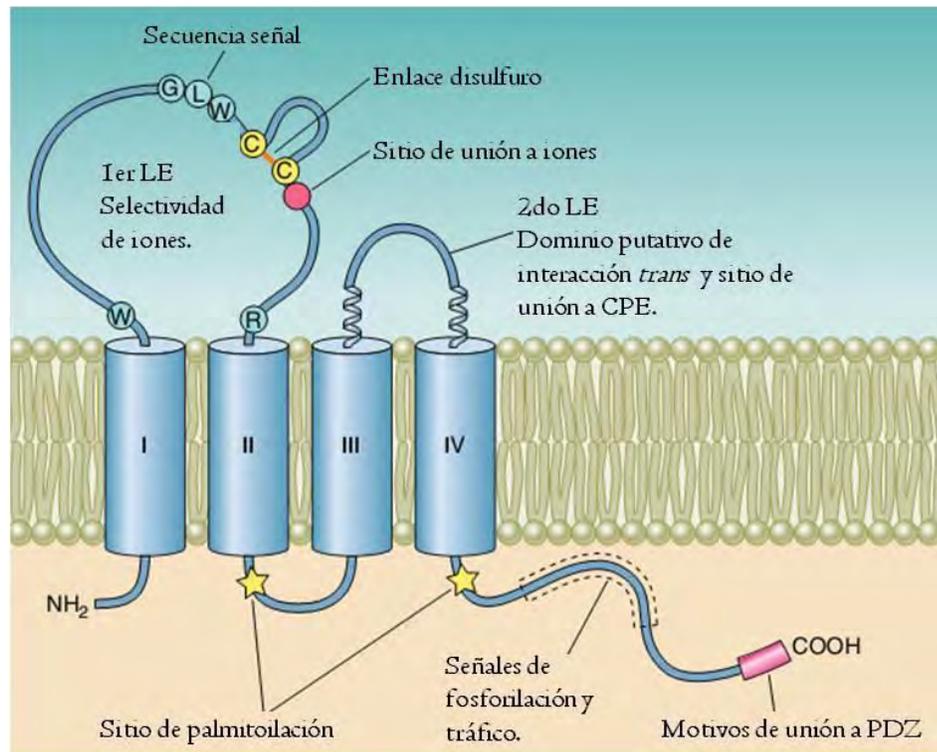
En este sentido, se ha reconocido desde hace mucho tiempo el papel clave de las uniones estrechas en la regulación de la comunicación celular y la señalización manteniendo la polaridad celular y la diferenciación. Por otra parte, las investigaciones recientes indican que miles de proteínas de señalización y las vías de transducción residen en la unión estrecha e interactúan con sus proteínas constituyentes. Además de regular las propiedades de barrera, las uniones estrechas también sirven como el centro de una multitud de proteínas de señalización que incluyen moléculas supresores de tumores conocidos como APC (Poliposis adenomatosa coli), PTEN (fosfatasa y homólogo de tensina), y las proteínas de polaridad como Par-3. El silenciamiento de la expresión y / o función de estas proteínas, ya sea debido a alteraciones genéticas o regulación epigenética, modulan la expresión de claudinas, e induce la pérdida de la polaridad y EMT. Curiosamente, la modulación genética de las claudinas en ratones o células cancerosas puede afectar de manera similar a estas cascadas de señalización, lo que sugiere una regulación de retroalimentación.

## **1.2 CLAUDINAS, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN**

Las claudinas son proteínas integrales de membrana, pertenecen a una familia multigénica constituida hasta la fecha de 26 isoformas en humano y 27 en ratón, son proteínas de 20 a 34 kDa, comparten la misma topología con la ocludina, sin embargo no tienen ninguna similitud en cuanto a su secuencia<sup>9</sup>.

Estas proteínas presentan cuatro dominios transmembranales, una secuencia amino terminal muy corta (de 2 a 6 residuos de aminoácidos) y una secuencia carboxilo terminal, ambas localizadas en el citosol, y dos asas extracelulares separadas por un dominio intracelular de ~15 aminoácidos. Las regiones citoplásmicas son las más diversas en secuencia y varían en longitud de 21 a 63 residuos de aminoácidos<sup>9,10</sup>. La primer asa extracelular, constituida de 49 a 52 residuos, contiene una secuencia altamente conservada (GLWxxC), la cual se ha reportado que influye fuertemente en la permeabilidad y selectividad de carga a cationes y aniones, a través de la vía

paracelular. Además, desempeña un papel importante en el correcto plegamiento de la misma y por lo tanto estabiliza las interacciones-*trans* las cuales se llevan a cabo entre claudinas que se encuentran en membranas opuestas<sup>2,11</sup> (figura 2).

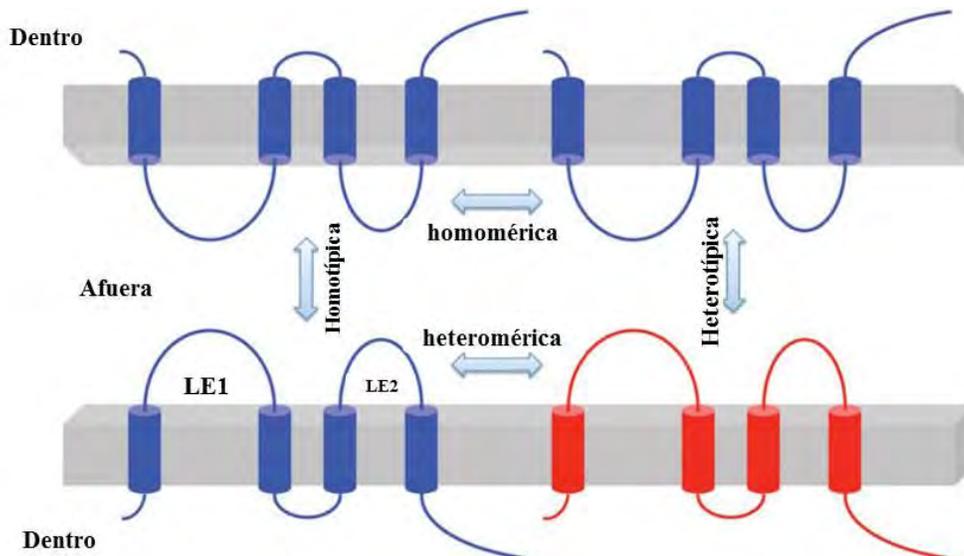


**Figura 2. Modelo predicho de la estructura de las claudinas.** Se muestra la topología prevista y la estructura secundaria, así como los dominios funcionales. Los números romanos indican los dominios transmembrana  $\alpha$ -hélice predichos. (Modificado de Günzel D. 2013)<sup>89</sup>

En cuanto a la segunda asa extracelular (ECL2), la cual es más corta (16-33 residuos), se pliega en una conformación hélice-giro-hélice, estas hélices son extensiones de los dominios transmembranales 3 y 4 y su región central está anclada a su vez por dos residuos de prolina. Tres de los residuos (F147, Y148, Y158) forman un núcleo aromático en una de las caras de la asa que potencialmente podrían someterse a interacciones hidrófobas y formar dímeros con otras claudinas, por lo cual se sugiere que el ECL2 participa en las interacciones claudina-claudina<sup>2,12,13,14</sup>. Diversos estudios han demostrado que la segunda asa extracelular (constituida por 16 a 33 residuos de aminoácidos) de las claudinas 3 y 4 funciona como receptor para la enterotoxina de *C.*

*perfringens*<sup>15</sup>. Por último, la secuencia carboxilo terminal funciona como anclaje para proteínas citoplásmicas tales como proteínas ZO-1, -2, -3, proteínas con dominios PDZ (MUPP) y PALS-1, proteína asociada a las uniones estrechas (PATJ)<sup>10, 12, 15</sup>

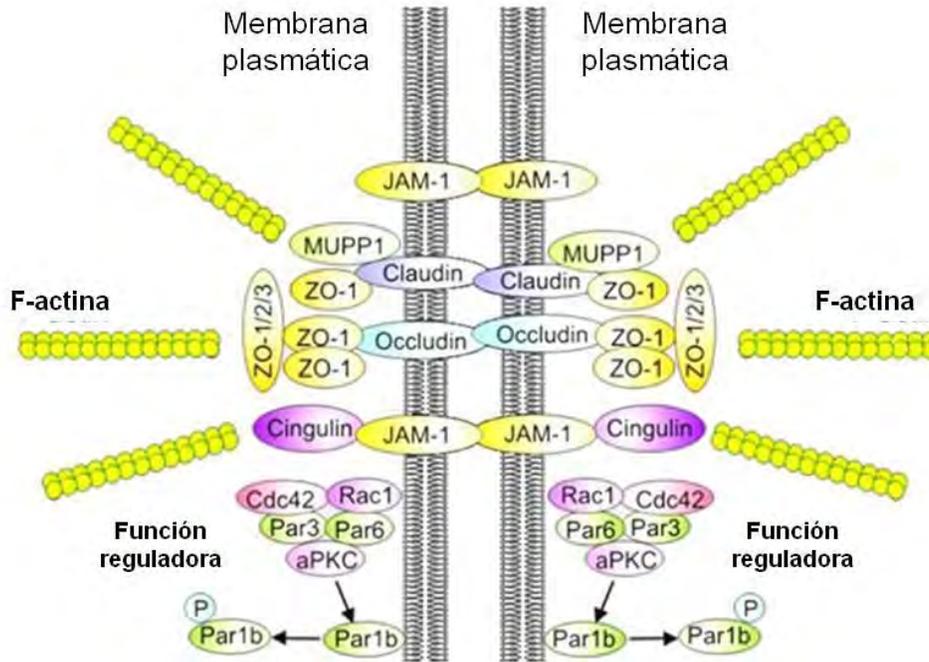
Las claudinas se encuentran en epitelios y endotelios constituyendo una parte muy importante de las UE, ya que son necesarias y suficientes para la formación y el ensamble de las UE<sup>16</sup>. Múltiples isoformas de claudinas se expresan de manera tejido-específica, lo que sugiere el potencial de éstas proteínas para entremezclarse e interactuar entre diferentes tipos de ellas y así controlar la permeabilidad celular a través de la formación de UE compuestas de diferentes claudinas. Teniendo en cuenta el número y variabilidad de estas proteínas, se genera una multitud de posibles combinaciones, las cuales pueden tener consecuencias específicas para la funcionalidad del tejido. Las claudinas por tanto, llevan a cabo interacciones de manera homo y heterotípica, es decir, entre dos claudinas del mismo tipo o entre claudinas de diferente tipo. Así mismo, pueden interactuar con proteínas de la misma familia en la membrana plasmática de la misma célula (interacción-*cis*) y en la membrana de dos células adyacentes (interacción-*trans*)<sup>17,19</sup> (Figura 3).



**Figura 3. Representación esquemática de las interacciones entre moléculas de claudinas.** La interacción *cis* incluye las interacciones homoméricas y heteroméricas, mientras que la interacción *trans* incluye las interacciones homotípicas y heterotípicas. (Modificado de Hou J. 2013)<sup>84</sup>

Por ejemplo, la claudina-3 y claudina-4 interactúan de manera *cis* cuando se expresan en la misma célula, sin embargo, no interactúan de manera *trans* a pesar de tener dominios en las asas extracelulares que están altamente conservados<sup>17</sup>. Por el contrario, claudina-3 interactúa de manera *trans* con otras claudinas, incluyendo claudina-1 y claudina-5<sup>18,19</sup>. También claudina-1 es capaz de trans-interactuar con claudina-1<sup>19</sup>, pero no con la claudina-2 o claudina-4<sup>17,20</sup>. Prácticamente se han encontrado a todas las claudinas interactuar homotípicamente<sup>21</sup>.

Las claudinas también llevan a cabo interacciones con proteínas de andamiaje, estas redes complejas y dinámicas, desempeñan papeles importantes en el control de la permeabilidad paracelular, la estabilidad del citoesqueleto, la proliferación y la polaridad. Esta red asociada a las UE se forma por múltiples proteínas adaptadoras y de andamiaje (por ejemplo, ZO-1/2/3, MAGI-1, -2, and -3; MUPP-1 PATJ, Pals1, PAR-3 y PAR-6)<sup>22,23</sup> (figura 4). Las interacciones de claudinas-ZOs son importantes para el ensamblaje de las UE, esto ha sido perfectamente demostrado en estudios con células epiteliales en donde se ha suprimido la expresión tanto de ZO-1 como de ZO-2 y se observa que las claudinas no pueden localizarse en las UE y las células tienen una pobre función de barrera. Sin embargo, al transfectarlas con cualquiera de ZO-1 o ZO-2 se restablece su localización y su función<sup>24,25</sup>. También se ha encontrado que claudina-1, -5, -8 interactúan con MUPP1, y claudina-1 puede unirse PATJ, lo que subraya la multiplicidad de proteínas de andamiaje capaces de interactuar con claudinas<sup>26</sup>. Las interacciones están determinadas principalmente por la presencia o ausencia de motivos de unión a dominios PDZ, presentes en la región C- terminal de la mayoría de las claudinas. La importancia fisiológica de la interacción con estos dominios se deduce por ejemplo, a través de estudios con pacientes que son portadores de una mutación en el motivo de unión al dominio PDZ de claudina-16 en donde la claudina es capaz de alcanzar la superficie celular pero es internalizada y transportada a los lisosomas rápidamente<sup>2,27</sup>.



**Figura 4. Proteínas de señalización asociadas a las Uniones Estrechas.** Los complejos implicados en la adhesión celular son centros de señalización que envían y reciben señales que guían el comportamiento, la función y la morfogénesis de las células. (Modificado de Backert S., 2013)<sup>85</sup>

La diversidad de las claudinas ha proporcionado una explicación molecular para la gran cantidad de datos fisiológicos y morfológicos que muestran que la permeabilidad de la barrera epitelial es heterogénea en cada tejido. Por lo cual, la variabilidad que presentan en sus diferentes isoformas y su patrón de expresión, el cual es específico de cada tejido, hace que respondan dinámicamente a las necesidades fisiológicas en un tejido en particular y que su regulación sea muy compleja<sup>21</sup>.

En condiciones fisiológicas las claudinas se encuentran localizadas en la membrana plasmática, en donde alternativamente pueden llevar a cabo funciones como la formación de contactos adhesivos no convencionales, por ejemplo, entre células dendríticas y la epidermis<sup>28</sup>, la interacción con receptores de superficie celular como integrinas<sup>29</sup>, tetraspaninas<sup>30</sup> y otras moléculas de adhesión<sup>31</sup>, y de señalización intracelular<sup>32</sup>. Sin embargo, muchos autores coinciden en que, bajo ciertas condiciones sobre todo ambientes patológicos como por ejemplo el cáncer, la expresión y

localización de las claudinas se encuentra alterada. Se ha observado deslocalización de la membrana al citoplasma y al núcleo<sup>33,34</sup>. Estas observaciones resultan interesantes sobre todo por el hecho de que estas proteínas adquieren otras funciones a las ya conocidas y se les atribuye un papel importante en otros procesos celulares como: migración, invasividad, metástasis, transición epitelio-mesénquima (TEM), inflamación entre otras.

### **1.3 EXPRESIÓN Y REGULACION DE CLAUDINAS EN CÁNCER GASTRICO**

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad reconocida a nivel mundial. Desde hace algunas décadas la investigación biomédica ha tratado de ampliar la información acerca de los mecanismos y las vías de señalización involucradas en la carcinogénesis así como las etapas iniciales de la progresión tumoral en relación a cada tipo de cáncer.

El cáncer gástrico (CG) por su parte ocupa el cuarto lugar entre los cánceres más comunes en los hombres y la quinta en las mujeres, a nivel mundial. Aproximadamente, se reportaron un millón de casos de cáncer gástrico en el año 2008, lo que representó casi el 8% de todos los incidentes cancerosos en todo el mundo. Las regiones de Asia, Europa del Este, América del Sur fueron los continentes más afectados según los informes<sup>35</sup>. El INEGI reportó 74,685 muertes por cáncer en 2010 (13% muertes en México) de las cuales 5,599 (8.6%) son por CG. Los estados de la República Mexicana con una tasa más alta de mortalidad son el DF, Oaxaca, Chiapas y Campeche.

Existen diferentes factores de riesgo que pueden ser determinantes para la adquisición de esta enfermedad, entre estos se encuentran la situación geográfica, la alimentación, malos hábitos, el medio ambiente, antecedentes familiares, la presencia de *Helicobacter pylori*, entre otros<sup>36</sup>.

De acuerdo a la "Clasificación de Lauren" existen dos subtipos histomorfológicos de CG, el tipo difuso (CGD) y el tipo intestinal (CGI). El CGD corresponde a los

carcinomas mal diferenciados, con células dispersas que invaden en forma individual o en pequeños grupos y en los que es posible observar células en anillo de sello y mucina dispersa por el estroma; su patrón de crecimiento es infiltrativo y se localiza preferentemente en el fondo. El CGI corresponde a los carcinomas gástricos bien o moderadamente diferenciados, presenta formaciones glandulares y células epiteliales de tipo intestinal, crece en forma de nódulos y se localiza en el antro estableciéndose en zonas donde previamente existía metaplasia intestinal<sup>35,36</sup>.

El epitelio gástrico exhibe una serie de cambios en la expresión de claudinas, desde la mucosa normal hasta metaplasia intestinal y adenocarcinoma. Durante la metaplasia intestinal, que es uno de los pasos tentativos hacia la carcinogénesis gástrica, los patrones de expresión de claudinas ya difieren de los epitelios gástricos normales. Por ejemplo, hay una pérdida de la claudina-18 expresada normalmente, con un aumento en la expresión de claudina-1, -3, -4 y -7<sup>37,39</sup>. Este cambio se ha demostrado que se correlaciona con la expresión de los marcadores de proliferación celular tales como Cdx2, así como con la expresión de mucina gástrica e intestinal<sup>37,38</sup>. Como el progreso de las lesiones es a través de la displasia y carcinoma gástrico temprano, la expresión claudinas tiende a permanecer significativamente más alta en comparación con la mucosa gástrica normal. Claudina-1, -3, -4, -6 y -7 se encuentran elevadas en cáncer gástrico tipo intestinal, mientras que claudina-18 se encuentra disminuida<sup>38,39</sup>. Cabe señalar que las claudinas reguladas positivamente, frecuentemente no se localizan en las UE, sino que se expresan en el citoplasma y en las membranas laterales, lo que indica que estas proteínas no participan en la formación de las UE. Curiosamente la expresión de algunas de estas claudinas se ha encontrado diferencialmente regulada entre los diferentes subtipos de cáncer gástrico (CG)<sup>37</sup>.

Cada vez es más evidente que las claudinas tienen una relevancia clínica importante y utilidad prometedora en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de tumores malignos humanos<sup>44</sup>. La expresión de ciertas claudinas se podría utilizar como biomarcadores de diagnóstico o pronóstico<sup>40</sup>. Por ejemplo, la expresión de claudina-3 y -4 y la pérdida de la expresión de claudina-18 en muestras de mucosa gástrica pueden

indicar la presencia de lesiones pre-malignas y cancerosas tempranas, especialmente cuando las claudinas se localizan principalmente en el citoplasma. La baja expresión de claudina-3, -4 y -18 en el cáncer gástrico se asocia con un aumento de la malignidad que incluye el tamaño del tumor, profundidad de la invasión, intravasación venosa y la propagación linfógena; en general resulta en etapas más avanzadas y un peor pronóstico<sup>41,42,43</sup>.

Por otro lado, durante las tres últimas décadas, se ha establecido que las claudinas se expresan anormalmente en una variedad de neoplasias malignas no solo en cáncer gástrico, si no también en otros tipos tales como, cáncer de mama, hígado, riñón, colon, carcinomas hepatocelulares y de vías biliares, y está relacionada con la progresión y prognosis de éstos cánceres<sup>37,38</sup>. La alteración en la expresión de claudinas podría conducir a una unión estrecha disfuncional como se observa en células neoplásicas que con frecuencia exhiben deficiencias estructurales y funcionales como alteraciones en la barrera epitelial y polaridad, permitiendo el paso de nutrientes y factores de crecimiento y afectando vías de señalización relacionadas con proliferación celular y por lo tanto, actuar como un evento que promueva la formación de un tumor y finalmente el cáncer<sup>37</sup>.

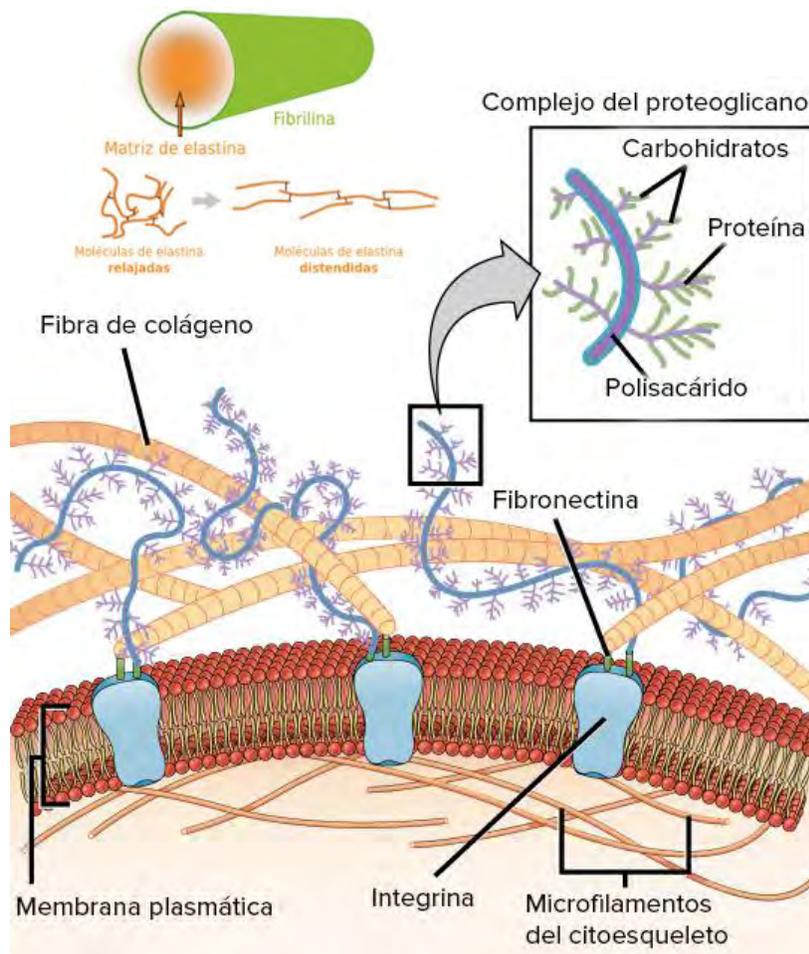
Así mismo, estas alteraciones como la disminución en la expresión de algunas claudinas también se ha asociado con diferentes tipos de tumores y concuerda con la idea de que este proceso se acompaña por el desensamble y/o pérdida de estas uniones y de la adhesión célula-célula. Por el contrario, un gran número de estudios han demostrado que el aumento en la expresión de claudinas también puede promover la progresión tumoral a través de su efecto positivo sobre la migración celular, invasión y metástasis. Aunado a esta expresión aberrante, la deslocalización de las claudinas también contribuye a la tumorigenesis<sup>21,44,45</sup>.

## **1.4 MATRIZ EXTRACELULAR E INVASION TUMORAL**

La matriz extracelular (MEC) es una entidad estructuralmente compleja que rodea y soporta a las células que se encuentran en los tejidos de los mamíferos, también comúnmente conocida como tejido conectivo. Está formada por un conjunto de macromoléculas que se localizan entre las células de un determinado tejido, o en el lado externo de la membrana plasmática de cualquier célula<sup>46</sup>. Estos componentes son en general producidos por las mismas células o los aporta el torrente sanguíneo. En ambos casos forman el medio donde las células sobreviven, se multiplican y desempeñan sus funciones.

El marco estructural de la MEC consta principalmente de colágena, pero también contiene otras proteínas de matriz incluyendo elastina y fibrilina. La fibronectina y la laminina son glicoproteínas de anclaje, y por último los proteoglicanos que son los componentes principales de la MEC<sup>47</sup>. La colágena y el sistema elástico constituyen la arquitectura de la matriz extracelular. Las glicoproteínas actúan como moléculas de adhesión del sustrato intercelular, importantes en las interacciones célula-célula y célula-matriz. Los glicosaminoglicanos y proteoglicanos tienen un papel fundamental en el equilibrio hidroelectrolítico y ácido básico<sup>48,49</sup> (figura 5).

La matriz extracelular requiere reorganizarse para satisfacer las necesidades fisiológicas de los tejidos, es por ello que se somete a una remodelación estrechamente regulada y coordinada durante procesos como cicatrización de heridas, desarrollo, organogénesis, regeneración e inflamación lo cual lleva a cabo mediante la degradación de algunos componentes y la producción de otros nuevos por parte de la célula<sup>47</sup>. Un paso esencial de este proceso de remodelación es la proteólisis, ésta ruptura es también vital pero se encuentra desregulada en los primeros pasos de la invasión local de las células malignas en el tejido adyacente<sup>47,50,51</sup>.



**Figura 5. Composición de la matriz extracelular y sus conexiones con la célula.** Una red de proteínas y polisacáridos que son secretadas a nivel local y ensamblados en una malla organizada en estrecha colaboración con la membrana celular. (Cooper G.M. 2000)<sup>86</sup>

El mantenimiento de la arquitectura normal del tejido es de suma importancia para el adecuado funcionamiento del mismo, sin embargo, en la invasión tumoral inicialmente se encuentran desregulados los mecanismos de adhesión celular y se llevan a cabo diversas alteraciones en éstos sistemas los cuales pueden jugar un papel dual y aparentemente contradictorio ya que, por una parte las células tumorales necesitan debilitar las uniones que estabilizan su localización normal (anclajes) pero al mismo tiempo necesitan mantener y/o desarrollar mecanismos de adhesión al sustrato que les garanticen los puntos de apoyo necesarios para avanzar a través del tejido circundante y

que les proporcionen señales de supervivencia y proliferación<sup>52,53</sup>.

A lo largo del proceso de invasión tumoral las células malignas pueden disociarse del tumor primario mediante la pérdida de su capacidad de adhesión célula-célula y así invadir el estroma circundante, además estas células son capaces de activar enzimas para degradar localmente la membrana basal y la matriz extracelular (MEC) de los epitelios las cuales representan una barrera física y continua que les impide invadir al tejido adyacente. También implica la expresión/supresión de proteínas involucradas en el control de la motilidad y la migración. De esta forma el potencial invasivo de las células tumorales depende de tres fenómenos: a) alteraciones en la adhesión celular b) degradación proteolítica de la matriz extracelular y c) movilidad de las células tumorales<sup>54,55,56</sup>.

Existen varios grupos de enzimas proteolíticas o proteasas implicadas en la degradación de la matriz, las cuales son muy importantes para crear el ambiente celular requerido durante el desarrollo y morfogénesis<sup>56</sup>. Las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP) son uno de estos grupos de enzimas muy importantes en el contexto de la invasión tumoral y la metástasis<sup>47</sup>.

## **1.5 METALOPROTEASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR**

Las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) son endopeptidasas dependientes de zinc. Son sintetizadas como precursores inactivos (pro-MMPs) que requieren la eliminación proteolítica de un propéptido para su activación. Su pH óptimo es neutro y son inhibibles por agentes quelantes, así como, por un grupo de proteínas denominadas TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteases*)<sup>57,58</sup>.

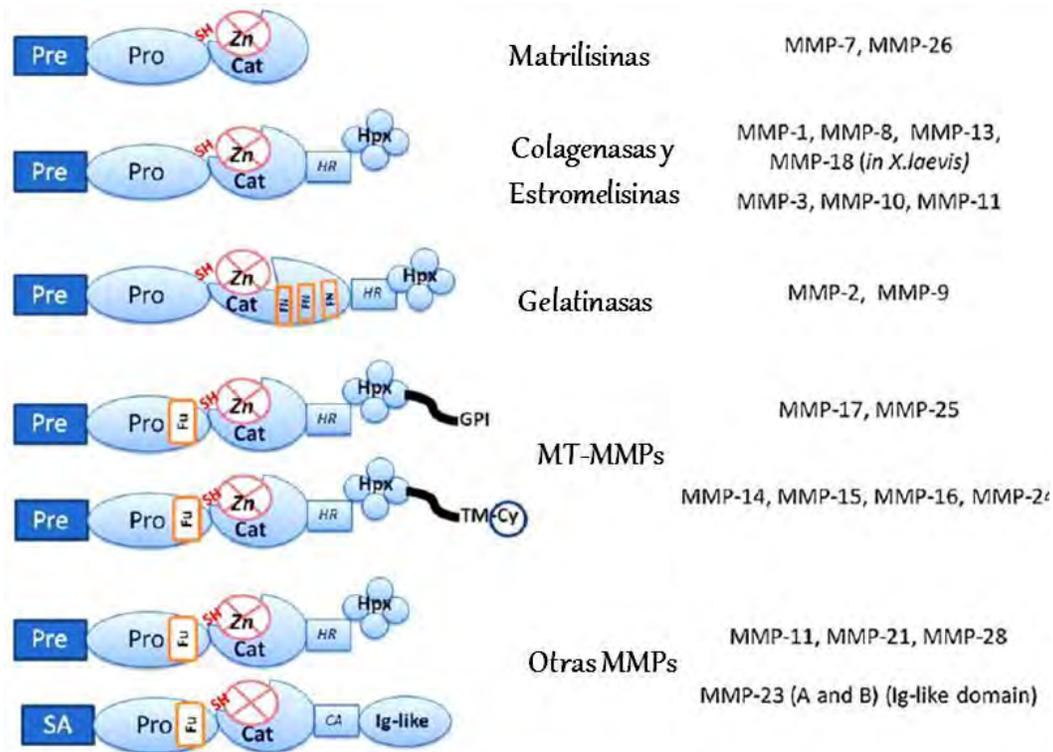
Las MMPs son secretadas por la célula o se anclan a la membrana plasmática. Estructuralmente están constituidas por un péptido señal, un propéptido de alrededor de 80 aminoácidos, un dominio catalítico de alrededor de 170 aminoácidos y un dominio hemopexina (Hpx) de alrededor de 200 aminoácidos. Algunas excepciones son la MMP-

7, MMP-26 y MMP-23, que carecen del dominio Hpx, y la MMP-23 que tiene un dominio único rico en cisteína y un dominio parecido a una inmunoglobulina después del dominio catalítico. Las MMPs de membrana tienen un dominio transmembranal y un dominio carboxilo terminal citoplasmático<sup>58</sup>.

Las MMPs se secretan inicialmente en un estado enzimáticamente inactivo el cual se mantiene gracias a la formación de un enlace entre un residuo de cisteína (Cys 73) en el propéptido y un ion  $Zn^{2+}$  en el dominio catalítico, este enlace le da estabilidad a la proteína para mantenerse en su forma inactiva. La activación de las MMPs involucra una ruptura del enlace  $Zn^{2+}$ -Cys<sup>73</sup>, mecanismo al que se le llama "cysteine switch", el cual es mediado por la remoción proteolítica del propéptido o modificación química del residuo de cisteína. Esta alteración causa una reducción en la masa molecular y genera una enzima completamente activa<sup>59</sup>.

La actividad y la expresión de las MMPs está regulada a diferentes niveles: transcripción de genes, activación de zimógenos, secreción de enzima, y por inhibidores endógenos llamados inhibidores tisulares de Metaloproteasas (TIMPs). Los TIMPs son una familia de cuatro proteínas de secreción que se unen al sitio catalítico de las MMPs en una relación estequiométrica de 1:1<sup>48</sup>. Los TIMPs inhiben la actividad de las MMPs solubles, asociadas a la membrana celular o que se encuentran unidas a la MEC. Además de su capacidad de inhibir la actividad de las MMPs, los TIMPs participan en la activación de estas enzimas al formar complejos con sus formas latentes. Tal es el caso del TIMP-2, que forma un complejo con pro-MMP-2 y MT1-MMP (MMP-14) para la activación de esta proenzima, y de TIMP-1, que participa en la activación de MMP-9 al formar el complejo de activación pro-MMP-9/MMP-3/TIMP-1 en el espacio extracelular<sup>60</sup>.

La familia de las MMPs se clasifica en 5 subfamilias atendiendo a sus características estructurales y a su especificidad de sustrato: colagenasas, gelatinasas, estromielisinas, matrilisinas y metaloproteasas de membrana o MT-MMP<sup>57,58,61</sup> (figura 6).



**Figura 6. Clasificación y estructura de las metaloproteasas de matriz extracelular.** Las metaloproteasas son compuestas por diferentes subdominios, sin embargo, presentan un dominio mínimo en común el cual contiene tres principales regiones: una secuencia señal amino-terminal (Pre) el cual es cortado por una peptidasa señal durante la entrada al retículo endoplásmico, un pro-dominio (Pro) que contiene un grupo tiol (-SH) y un sitio de corte para furina y el dominio catalítico con un sitio de unión a zinc (Zn<sup>2+</sup>). La interacción del grupo -SH del pro-dominio con el ion zinc del dominio catalítico mantiene la enzima como un zimógeno inactivo. Además del dominio mínimo, la mayoría de las MMP poseen una región similar a la hemopexina, un dominio compuesto por cuatro repeticiones que se asemejan a la hemopexina y contienen un enlace disulfuro (SS) entre el primer y el último subdominio, que está unido al dominio catalítico a través de una región bisagra flexible. (Modificado de Mannello F., Medda V. 2012)<sup>87</sup>

### 1.5.1 Gelatinasas (MMP-2 y MMP-9)

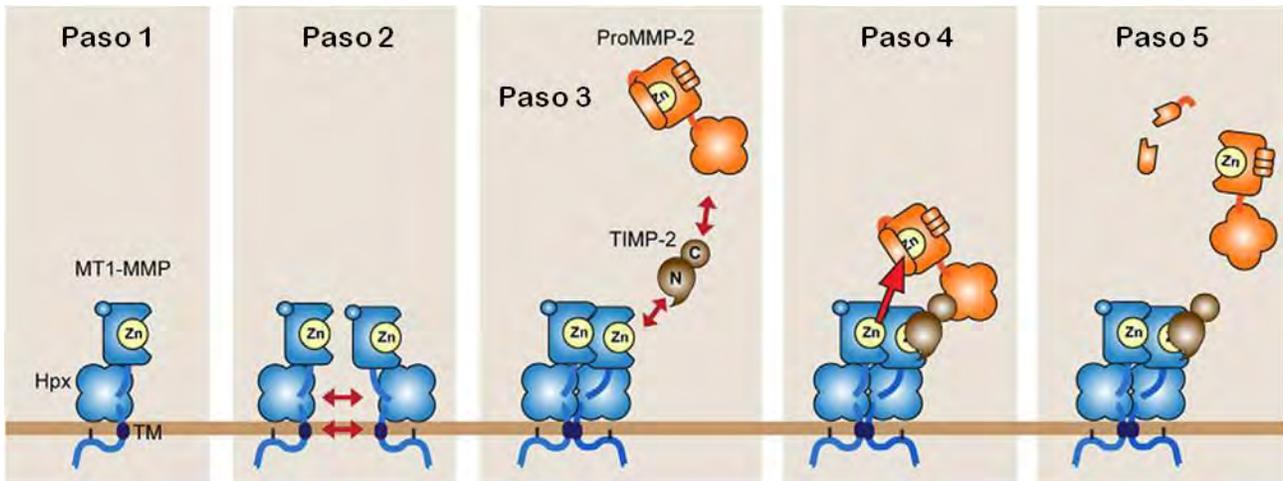
Las gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9), se caracterizan por digerir fácilmente colágena desnaturalizada y gelatina. Estas enzimas tienen tres secuencias peptídicas repetidas análogas a los motivos de la fibronectina tipo II, insertados en el dominio catalítico el cual se une a colágena, gelatina y laminina. MMP-2 pero no MMP-9 digiere colágeno tipo I, II y III. Así mismo son capaces de degradar el colágeno tipo IV que

forma parte de las membranas basales de los epitelios. Actualmente se sabe que las gelatinasas desempeñan un papel fundamental en la capacidad de las células tumorales de origen epitelial para atravesar dichas membranas basales e invadir el estroma de los tejidos circundantes<sup>58</sup>.

La MMP-2 o gelatinasa A es expresada ubicuamente como una proenzima de 72 kDa y está sujeta a glicosilación extensa. La activación de proMMP-2 se lleva a cabo en la superficie celular y está mediada por MT-MMPs. Se requiere la formación de un complejo entre proMMP-2 y TIMP-2 a través de su dominio C-terminal permitiendo al dominio inhibitorio N-terminal de TIMP-2 unirse a MT-MMP1 en la superficie celular, es así como, pro-MMP-2 unida en la superficie celular es activada por uno de los monómeros de MT-MMP1 que está libre de TIMP-2. Por otra parte, el monómero de MT-MMP1 inhibido por TIMP-2 puede actuar como un receptor de proMMP-2<sup>62</sup> (figura 7).

La agrupación de MT-MMP1 en la superficie celular a través de interacciones con el dominio hemopexina facilita el proceso de activación. Jo et. al reportaron que el máximo incremento en la activación de proMMP-2 se observa en un rango de TIMP-2/MT-MMP1 de 0.05 sugiriendo que un gran número de MT-MMP1 libres pueden rodear el complejo proMMP-2/TIMP-2/MT-MMP1 para una activación más eficaz<sup>63</sup>.

La MMP-9 o gelatinasa B se expresa como una proenzima de 92 kDa, la cual una vez activa se convierte en una enzima madura de 83 kDa. El gran tamaño de MMP-9 en relación con MMP-2 se puede atribuir a la inserción de una colágena tipo V que es fuertemente O-glicosilada y que enlaza al dominio de metaloproteasa con el dominio tipo hemopexina<sup>64</sup>. La activación de MMP-9 es mediada por la remoción del pro-dominio por una serinproteasa u otras MMPs o puede serlo por una respuesta directa al estrés oxidante que altera al “switch de cisteína”. Mientras exista un solapamiento considerable en los sustratos degradados por MMP-2 y MMP-9, MMP-9 es incapaz de dirigir la proteólisis de colágena<sup>65</sup>.



**Figura 7. Modelo actual de activación de MMP-2 por MT1-MMP.** Paso 1: secreción del monómero MT1-MMP a la superficie celular. Paso 2: dimerización de MT1-MMP a través de los dominios Hpx y TM. Paso 3: Formación del complejo (MT1-MMP)<sub>2</sub>-TIMP-2-proMMP-2. El dominio N-terminal de TIMP-2 tiene un sitio inhibitorio y el dominio C-terminal tiene afinidad por el dominio Hpx de MMP-2. Paso 4: Corte proteolítico del prodominio de proMMP-2 por MT1-MMP libre de TIMP-2 en el complejo. Paso 5: Activación de MMP-2 seguida por la liberación de MMP-2 activa en la superficie celular. Hpx, dominio de tipo hemopexina; TM, dominio transmembrana. (Modificado de Itoh Y. 2015)<sup>88</sup>

## 1.6 PARTICIPACION DE LAS MMPs EN LA PROGRESION DEL CÁNCER

Actualmente existe un gran interés en dilucidar cómo las metaloproteasas de matriz (MMPs) están vinculadas con la progresión del cáncer ya que existe gran evidencia sobre el papel de las MMPs en la invasión tumoral y la metástasis, lo cual se ha demostrado en modelos animales experimentales, en donde existe una mayor secreción de las MMPs por las células tumorales y/o células del estroma y además se ha encontrado que la expresión de MMPs específicas se asocia con un mal pronóstico en una gama de cánceres humanos<sup>35,47</sup>

Las MMPs pueden degradar esencialmente todos los componentes de la MEC como el colágeno, proteoglicanos, laminina, elastina y fibronectina, esta degradación se considera un requisito previo para la invasión tumoral y la metástasis. Además pueden

contribuir sustancialmente en procesos como angiogénesis, diferenciación, proliferación, apoptosis y autofagia mediante la activación de factores de crecimiento y sus receptores o liberando citoquinas de la ECM. Las MMP son importantes reguladores de crecimiento del tumor tanto en el sitio primario como en la metástasis a distancia; es por ello que éstas enzimas se consideran como blancos importantes para la terapia contra el cáncer<sup>66</sup>.

Algunos estudios realizados con muestras de biopsias de tumores sugiere la expresión de MMP-1 en 24% de los cánceres de esófago, mientras que MMP-2 y MMP-9 en 78% y 70% de las muestras, respectivamente. Del mismo modo, los estudios revelaron que la MMP-13 se localiza predominantemente en las células tumorales; y la presencia de MMP-13 junto con MT1-MMP está implicada en la determinación de la agresividad del tumor de carcinomas esofágicos humanos<sup>35</sup>.

Una de las características importantes del fenotipo maligno tanto en el cáncer colorrectal como en gástrico es la sobreexpresión de MMP-2 y -9, así como la activación de pro MMP-2. La expresión de MMP-2, -1 y -9 se encontró en 94%, 73% y 70%, respectivamente, en las muestras gástricas cuando se estudió en 74 pacientes<sup>35</sup>.

Por otro lado, diversos estudios han reportado que las claudinas pueden mediar la migración celular y la invasión a través de cambios en su expresión relacionados con la expresión y actividad de metaloproteasas de la matriz (MMPs)<sup>67</sup>. Por ejemplo, células epiteliales de ovario que sobreexpresan claudina-4 aumentan la actividad de MMP-2. Un aumento en la transcripción del ARNm y la expresión de la metaloproteasa de membrana de tipo 1 (MT1-MMP) también se ha observado en células que sobreexpresan a claudina-10<sup>68</sup>. Por otro lado, la disminución en la expresión de claudina-6 promueve la invasividad celular y la migración transendotelial, acompañado por un aumento en la actividad de metaloproteasas de matriz<sup>69</sup>. Cuando claudina-16 se sobreexpresa en células de cáncer de mama humano MDA-MB - 231, las células disminuyen su movilidad e invasividad pero aumentan su adhesión a la matriz y además muestran un aumento en la funcionalidad de las UE<sup>70</sup>.

## **2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Actualmente existe evidencia de que la estructura y función de las Uniones estrechas así como la expresión de diferentes proteínas pertenecientes a ellas, se encuentra frecuentemente alterada en diferentes tipos de carcinomas humanos, lo cual se asocia con la pérdida de adhesión celular, mecanismo que, junto con muchos otros representan un paso importante en la progresión del cáncer<sup>44</sup>.

Recientemente se ha sugerido que las claudinas tienen un papel importante en la invasividad y metástasis. Los estudios apuntan a que el aumento en la expresión de claudinas en algunos tipos de cáncer (como cáncer de colon, ovario, páncreas y adenocarcinoma gástrico) se asocia a un aumento en la capacidad invasiva de dichos carcinomas como resultado del aumento en la actividad de MMPs.

Existen reportes que señalan que las claudinas -1,-2,-3 y -4 reclutan y promueven la activación de MMP-2<sup>71-74</sup>. Así mismo se ha reportado que claudina-5 interacciona directamente con MMP-2 induciendo su activación<sup>75</sup>. La disminución de claudina-10, disminuye la invasividad celular a través de la inactivación de MMP-2 y MT1-MMP en carcinoma hepatocelular<sup>76</sup>. Otros estudios muestran que el aumento en la expresión de claudina-1 aumenta la invasividad de cáncer de lengua de células escamosas, induce la expresión de MMP-2 y a su vez incrementa la invasión y migración celular a través de activación de c-Abl y PCK $\delta$  en carcinoma hepatocelular<sup>77, 78</sup>. Así mismo, otros estudios reportan que la sobreexpresión de claudina-1 es regulada por PKC y contribuye a la invasividad de células de melanoma<sup>79</sup>. Por otro lado, otros estudios señalan que ERK, p38MAPK y PCK regulan la expresión y la activación de MMP-9 inducida por Heregulina-1 $\beta$  en células de cáncer de mama<sup>80</sup>.

Nuestro grupo reportó la expresión de claudinas-6, -7 y -9 en biopsias de pacientes con cáncer gástrico, expresión que no se observa en biopsias control. En este mismo estudio se observó que los pacientes con sobreexpresión de claudina-9 tuvieron mal pronóstico<sup>81</sup>. De la misma manera reportamos que la sobreexpresión de estas proteínas en células de adenocarcinoma gástrico (AGS) promueve la proliferación, migración e

invasividad celular y aumentan la expresión de claudina-1 endógena, la cual se ha reportado que tiene un papel importante en la activación de MMPs<sup>82</sup>. Así mismo mostramos, utilizando el mismo modelo de células AGS, que la sobreexpresión de claudina-6 y no de claudina-9 correlaciona con el aumento de MMP-2 activa.

Si bien se ha estudiado la asociación de la expresión de claudinas con el aumento en la invasividad de diferentes carcinomas y además la participación de vías de señalización que regulan procesos como sobrevivencia, proliferación y diferenciación no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual las claudinas regulan la invasividad celular a través de las MMPs.

Con base en lo anterior, el presente estudio pretende determinar si el mecanismo a través del cual las claudinas -6, y/o -9 activan a MMP-2 es a través de claudina-1 para promover la migración e invasividad celular en un modelo de adenocarcinoma gástrico humano, (AGS).

### **3.- HIPOTESIS**

Si la sobreexpresión de claudinas-6 y -9 aumenta la expresión de claudina-1 endógena y la migración e invasividad de las células AGS, entonces estos procesos podrían estar mediados por la activación de MMP-2 a través de Claudina-1.

Si la vía de MAPKs o PKC regula la expresión de claudinas-6 y -9, entonces la inhibición de las mismas bloqueará la activación de las MMP-2.

#### **4.- OBJETIVO GENERAL**

- ❖ Determinar el mecanismo a través del cual claudina-1, aumentada a través de claudina-6 y/o -9, regula la activación de MMP-2.

#### **4.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

- ❖ Evaluar la expresión de Claudina-1 endógena en células AGS que sobreexpresan claudina-6 y -9.
- ❖ Evaluar la participación de Claudina-1 endógena en la activación de MMP-2 en las células AGS que sobreexpresan a claudina-6 y -9.
- ❖ Determinar si el silenciamiento de Claudina-1 endógena disminuye la proliferación e invasividad de las células AGS que sobreexpresan a claudina-6 y -9.
- ❖ Determinar si las vías de ERK 1/2, p38 MAPK y PKC están involucradas en la regulación de la expresión de Claudina-1 y de MMP-2 en las células AGS que sobreexpresan a las claudinas -6 y -9.

## **5.- METODOLOGIA**

### **5.1 Materiales y Reactivos**

Se utilizó medio D-MEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), Suero Fetal Bovino (SFB), L-glutamina, Piruvato de Sodio, Penicilina-Streptomina, y Geneticina (G418) los cuales fueron proporcionados por Gibco. Los anticuerpos primarios utilizados fueron monoclonal mouse anti-claudina -1 y Mouse anti-MMP-2 (Invitrogene), policlonal rabbit anti-claudina-2 (1:200), anti-claudina-3 (1:100), anti-claudina-4 (1:800), anti-claudina-5 (1:400), anti claudina-7 (1:100), anti-claudina-10 (1:100), anti-MMP-14 (1:100-1:500). Además anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (HRP), burro anti-ratón IgG-HRP (1:500-1:1000) y cabra anti-conejo-IgG HRP (1:500-1:1000), así como anticuerpos acoplados a fluorocromos como Cy5 policlonal goat anti-rabbit (1:800), Alexa fluor 488 goat anti-mouse (1:400) que fueron proporcionados por Zymed-Life Technologies (Grand Island, NY, USA). Se empleó además un SiRNA para Claudina-1 (claudin-1 siRNA (h)) que es un pool de 3 secuencias específicas (19-25 nt) y el control positivo para el SiRNA acoplado a fluoresceína (fluoresceína- Conjugate-A) fueron proporcionados por Santa Cruz Biotech (CA, USA). Los anticuerpos rabbit anti-MMP-14 y rabbit anti-claudina-4 fueron adquiridos con GeneTex Inc. (Irvine, CA, USA). APC goat anti-mouse IgG1 (1:400) fue proporcionado por Cell Signalling Technology Inc. (Danvers, MA, USA). El anticuerpo anti-actina fue donado por el Dr. José Manuel Hernández, CINVESTAV-México. Se utilizó también Tween-20, Triton X-100, inhibidor de fosfatasa 1 y 2, inhibidor de tripsina, leupeptina, y aprotinina fueron proporcionados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Se utilizaron inhibidores de vías de señalización MAPKs (PD98059 #BML-EI360, inhibidor de MEK), (SB-202190 #BML-EI294, inhibidor de p38), (Gö6976 #BMLEI269, inhibidor de PCK) adquiridos en ENZO Life Sciences y (U0126 #9903, inhibidor de MEK 1/2) proporcionado por Cell Signaling Technology. El kit para cuantificación de proteínas Protein assay fue proporcionado por Bio-Rad (Hercules, CA, USA). El kit de quimioluminiscencia Super Signal West Dura que fue adquirido con Thermo Fisher VS scientific Inc. (Waltham, MA, USA). Se utilizaron cámaras de invasión

cubiertas con matrigel (BD Matrigel invasión chamber 24 well plate 8.0 Micron #cat. 354480°)

## **5.2 Cultivos celulares.**

Se utilizó la línea celular epitelial AGS derivada de adenocarcinoma gástrico humano la cual sobreexpresa a claudina-6 (AGSCLDN6), claudina-9 (AGSCLDN9) y al vector vacío acoplado a GFP como control (AGSGFP). Se sembraron estas células en cajas petri p-100 y se mantuvieron con medio de cultivo DMEM (caja de petri p-100 7-10 ml aprox.) suplementado con: 10 µg/ml o 0.1 U/ml de Insulina (10 mg/ml de SIGMA), 2mM de Piruvato de Sodio (GIBCO 100 mM), 2 mM de L-Glutamina (GIBCO 200 mM), 100 U/ml/100 µg/ml de Penicilina/Estreptomina (GIBCO 10,000U/ml/10,000 µg/ml), 8% de Suero Fetal Bovino (GIBCO), y se incubaron en condiciones de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las transfectantes estables fueron mantenidas con medio DMEM con 400 µg/ml de G-418.

## **5.3 Fraccionamiento celular**

Las células AGS, AGSGFP, AGSCLDN6 y AGSCLDN9 se sembraron en cajas p-100 a confluencia, se lavaron con PBS frio y se resuspendieron en 1 ml de buffer A (20 mM Tris base, 0.25 M Dextrosa anhidra, 10 mM EGTA, 2 mM EDTA) con inhibidores de proteasas y fosfatasas (aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 20 µg/ml, inhibidor de tripsina 1 mg/ml, coctel I y coctel II de inhibidores de fosfatasas 10 µl/ml) a 4°C. Las suspensiones celulares se sonicaron y se centrifugaron a 39,000 rpm (156,553 x g) 30 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se colocó en un tubo nuevo y se marcó como fracción citosolica. El precipitado se resuspendió con 150 µl de amortiguador A en presencia de 1% de Tritón X-100 con inhibidores de proteasas y fosfatasas como se describió anteriormente. Se incubó 1 h a 4°C con agitación suave, se centrifugó a 39,000 rpm, 30 min. a 4°C, y se colocó el sobrenadante (fracción membranal) en tubos eppendorf previamente marcados y colocados en hielo. El precipitado resultante se

resuspendió en 150 µl de amortiguador de lisis (150 mM NaCl, 50 mM tris base, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, IGEPAL 1%, Desoxicolato de sodio 0.1%, Dodecil sulfato de sodio 0.1% (SDS) con inhibidores de proteasas y fosfatasas a 4°C. Se incubó 1 h a 4°C con agitación suave y se centrifugó a 39,000 rpm, 30 min a 4°C. El sobrenadante resultante (fracción de citoesqueleto) se colocó en tubos eppendorf previamente marcados y colocados en hielo. Finalmente se tomaron alícuotas de cada fracción para la cuantificación de proteína empleando el kit de determinación de proteína de BioRad.

#### **5.4 Western Blot**

Se realizó la electroforesis cargando de 20-50 µg de proteína por cada muestra, en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes al 15% o en algunos casos al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con 5% de leche libre de grasas en TBS durante al menos 1 h y se incubaron con los anticuerpos primarios mouse anti- claudina-1 (1:500-1:1000), mouse anti-MMP-2 (1:1000), rabbit anti-MMP-9 (1:500), rabbit anti- MMP-14 (1:500) en TBS-Tween durante toda la noche a 4°C con agitación suave. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con TBS-Tween y se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario Goat anti-Mouse IgG (1:500- 1:2000) y Goat anti- Rabbit (1:500-1:1000) IgG durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación suave. La detección de las proteínas se llevó a cabo mediante el método de quimioluminiscencia con los reactivos del kit PIERCE (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate) como sustrato para la reacción.

#### **5.5 Inmunofluorescencias.**

Se sembraron células AGS, AGSGFP, AGSCLDN6 y AGSCLDN9 sobre cubreobjetos colocados en placas de 6 pozos a una confluencia del 90%, se retiró el medio de cultivo y se lavó 2 veces con PBS. Se fijaron las células adicionando paraformaldehído al 2% durante 15 min, se lavaron 5 veces por 5 min con PBS, se permeabilizaron con tritón X-100 (al 0.1% en PBS) por 10 min a temperatura ambiente,

se bloquearon incubando con BSA libre de IgG al 2% en PBS-Tween (0.05%) por 30 min y posteriormente se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario para Claudina-1. Posteriormente se lavaron 5 veces con PBS-Tween (0.05%) y se incubaron en un lugar oscuro con el anticuerpo secundario Goat anti-rabbit IgG (Rodamina) a una dilución de 1:200 y APC anti-mouse IgG en PBS con 1% de BSA por 1h a temperatura ambiente. Finalmente se lavaron 5 veces con PBS-Tween (0.05%) por 5 min y los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con DAPI, se sellaron con barniz y se observaron al microscopio confocal.

## **5.6 Inmunoprecipitación.**

Se cultivaron las células AGS, AGSGFP, AGSCLND6 y AGSCLDN9 en cajas petri p-100 hasta 90% de confluencia, se lavaron 2 veces con PBS frío y posteriormente se adiciono buffer de lisis para IP (50mM de Tris, 150mM de NaCl y 0.5% de Tritón X-100 con inhibidores de proteasas 1mg/ml de tripsina, 5mg/ml de leupeptina e inhibidores de fosfatasas 10µl/ml de inhibidores de fosfatasas coctel I y II). Posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm durante 10min y se recuperó el sobrenadante para realizar cuantificación de proteína ajustando la concentración a 1mg/ml. A continuación se realizó un pre-clareo incubando 1mg/ml de proteína + 10µl de suero pre-inmune + 10µl de proteína G Sefarosa por 1h con agitación suave, posteriormente se centrifugó para recuperar el sobrenadante y se incubó con 3 µg de anticuerpo primario (3 µg anti-cldn-1) toda la noche a 4°C con agitación suave. Al día siguiente se agregó 25 µl de proteína G Sefarosa y se incubó durante 2h máximo. Finalmente se centrifugó para obtener el Inmunoprecipitado (IP) y se realizaron 3 lavados, dos con buffer 600 mM de NaCl y otro con 150 mM de NaCl, ambos con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Finalmente se le adicionó 25µl de buffer de Laemli 4X y se sometió a Western Blot para revelar contra MMP-2 o MMP-14.

## **5.7 Citometría de flujo**

Una vez que las células se cultivaron a 90% de confluencia, se lavaron dos veces con PBS y se tripsinizaron para obtener el botón celular el cual fue resuspendido fuertemente en PBS para despegar perfectamente a las células y mantenerlas como células individuales, posteriormente fueron fijadas y permeabilizadas con Fix Buffer I y Perm Buffer III (BD Phosflow) respectivamente, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células fueron resuspendidas en buffer FACS (PBS con 0.09% de azida de sodio [p/v] suplementado con 2% de SFB) e incubadas a 4°C toda la noche con los anticuerpos primario en diluciones previamente determinadas por titulación. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces y se incubaron de 45 min-1 h con el anticuerpo secundario (dil 1:500- 1:800). El análisis de las muestras se realizó utilizando el citómetro de flujo Attune™ Blue/Red. Después de la medición en el citómetro, la estrategia de análisis se realizó sobre el “gating” de las células de acuerdo a las propiedades de dispersión frontal y lateral (FSCxSSC) seguido por un “gating” de células únicas o Single cell (FSC-A x FSC-H). Todos los análisis de citometría de flujo incluyen el control apropiado de anticuerpo secundario. Para cada muestra se colectaron 10,000 eventos de la región 2 (R2). Los datos fueron analizados en términos de intensidad de fluorescencia media (MFI) y con ayuda del software FlowJO V.10.0.7r2.

## **5.8 Tratamiento con inhibidores de las vías de MAPK, p38 y PKC.**

Se cultivaron las células AGS, AGSGFP, AGSCLND6 y AGSCLDN9 hasta alcanzar la confluencia. Se sustituyó el medio por medio fresco D-MEM libre de SFB por 24hr. Posteriormente a estas células se les trató con inhibidores de MAPKs (10µM U0126 para MEK 1/2, 5µM de SB202190 para p38 y 1µM de Gö6976 para PKC) y se incubaron por 1hr. Transcurrido este tiempo se añadió EGF (200ng/ml), PDBU (2X 10<sup>-7</sup> M) y se incubaron por 3h y 30 min respectivamente. Se lisaron las células y se realizó western blot.

## **5.9 Silenciamiento de la expresión de Claudina-1.**

Para silenciar la expresión de la proteína se sembraron  $3 \times 10^5$  células AGS, AGSGFP, AGSCLDN6 y AGSCLDN9 en placas de 6 pozos con medio D-MEM libre de antibiótico y suplementado con SFB al 20% a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> por 40 h hasta alcanzar una confluencia del 80%. Posteriormente, las células fueron transfectadas de forma transitoria con un siRNA (small interfering RNA) específico para CLDN-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez terminada la transfección, se dejaron a las células 24 h en medio de cultivo normal, para posteriormente extraer proteína total y realizar los ensayos correspondientes.

## **5.10 Ensayo de regeneración de herida**

Una vez transfectadas las células AGS, AGSGFP, AGSCLDN6 y AGSCLDN9 con el SiRNA para claudina-1 se sembraron  $1 \times 10^5$  células en placas de 6 pozos hasta alcanzar una confluencia del 80%. Una vez que alcanzaron la confluencia se procedió a realizar una herida con una punta de micropipeta y nuevamente se incubaron para observar la regeneración celular en la zona afectada. Las imágenes del estado de la herida fueron capturadas a los tiempos 0, 2, 6, 10 y 24 h.

## **5.11 Ensayo de invasión en matrigel (BD)**

Antes de iniciar el trabajo con las células los insertos de matrigel se rehidrataron con 0.5ml de medio de cultivo tibio (D-MEM sin SFB) dejando incubar por 2 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se agregaron 0.75ml de medio D-MEM suplementado con SFB al 5% en cada pozo contiguo, el cual sirve como quimioatrayente y posteriormente se colocó el inserto con matrigel una vez rehidratado. En cada inserto se sembraron  $5 \times 10^4$  células AGS, AGSGFP, AGSCLDN6, AGSCLDN9 no transfectadas y transfectadas con el SiRNA, por duplicado. La placa se incubo por 30 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> para permitir la migración de las células. Las células que no migraron y el matrigel

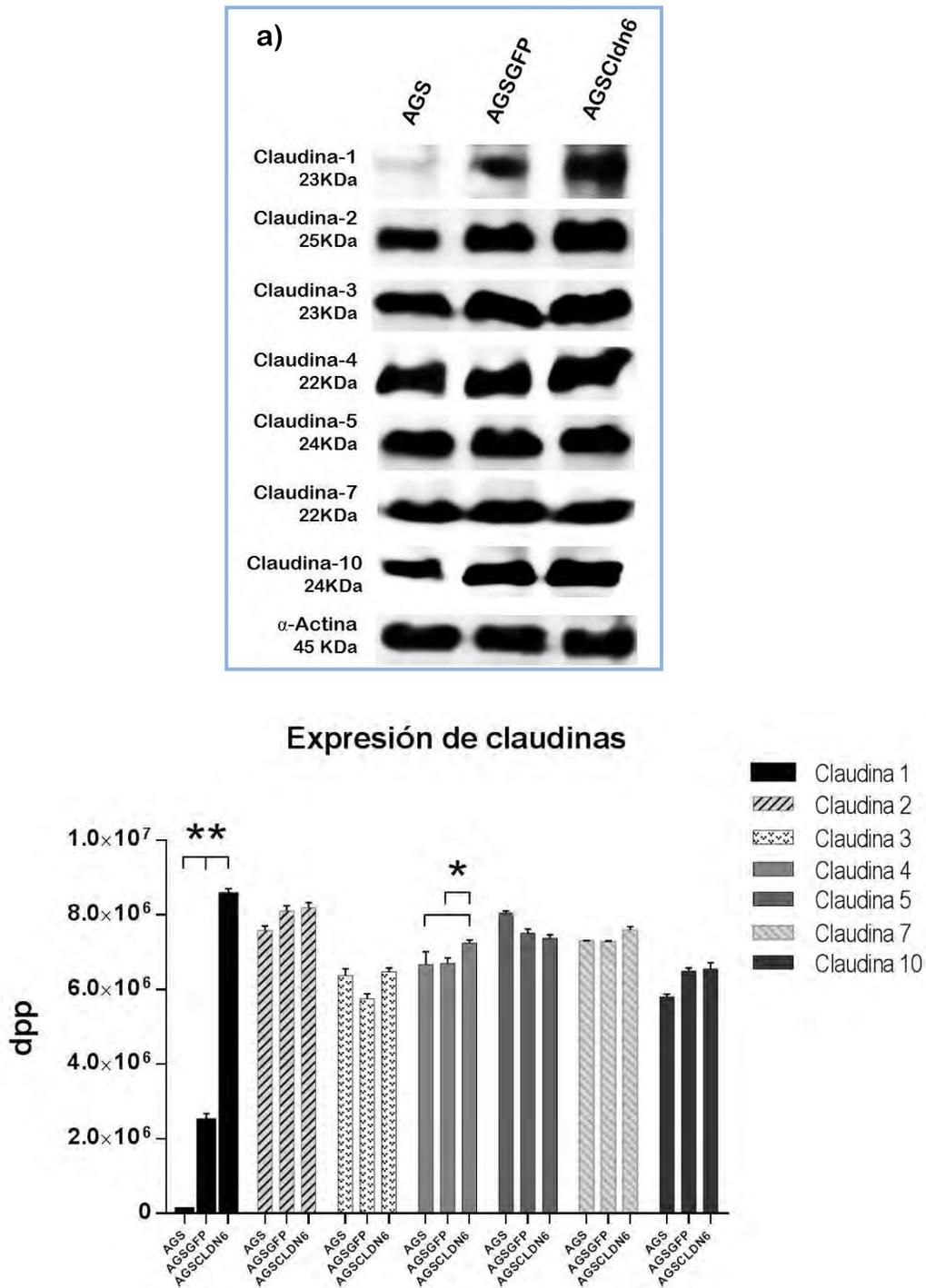
se retiraron suavemente con un hisopo y las que sí migraron se observaron en la membrana del inserto mediante la tinción con azul de toluidina al 1% una vez fijadas con metanol al 100% por 2 min. Se contaron las células de tres campos diferentes de cada inserto.

## **6.- RESULTADOS**

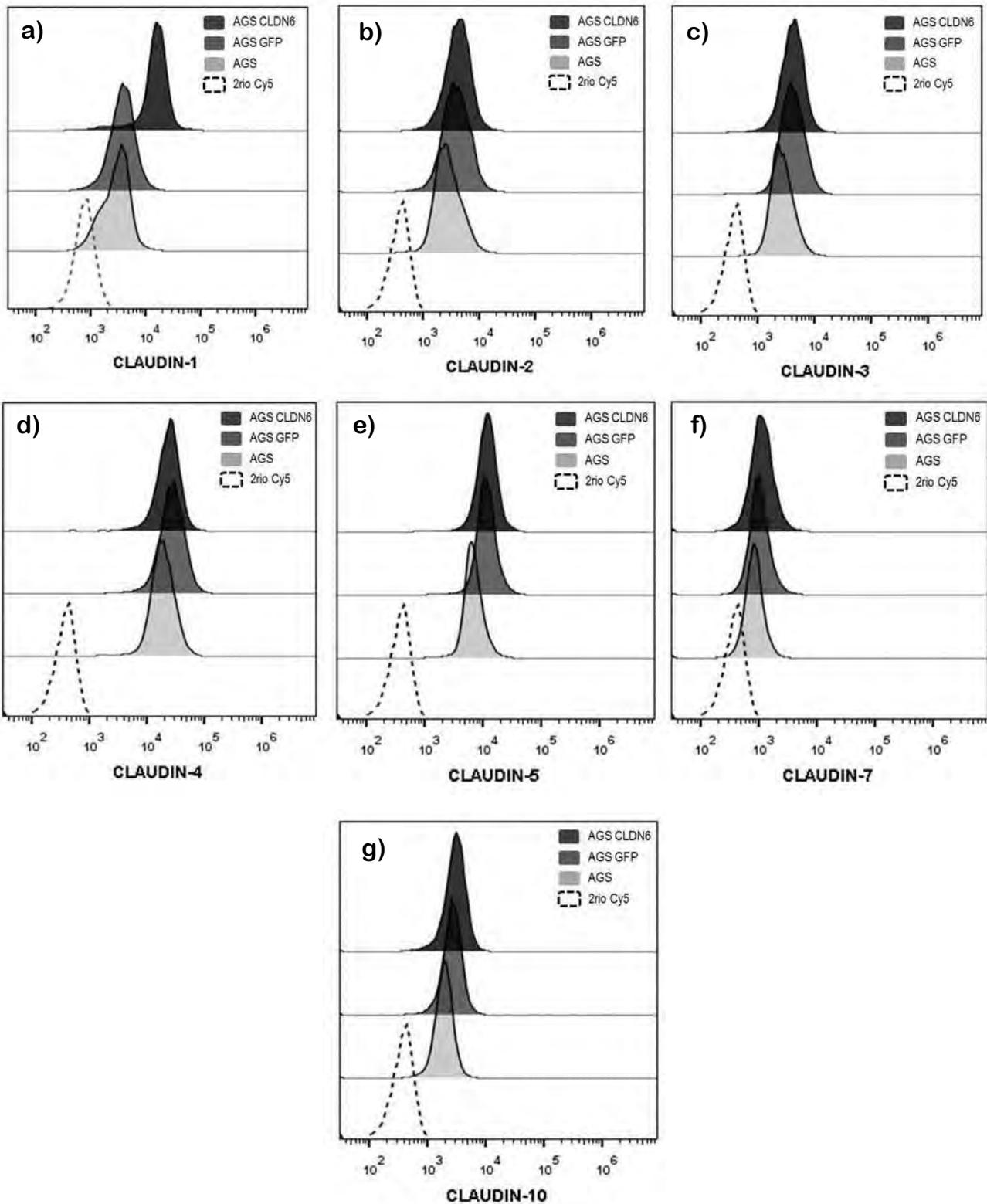
De acuerdo a los estudios previos en los cuales reportamos que: 1) la sobreexpresión de claudina-6 y -9 incrementan la expresión endógena de claudina-1<sup>82</sup> y ésta a su vez se ha reportado que puede promover la activación de MMP-2; 2) que la sobreexpresión de claudina-9 induce la co-inmunoprecipitación de ésta claudina con MMP-2, y 3) que la sobreexpresión de claudina-6 promueve un incremento en la actividad de MMP-2 sin mostrar una interacción con ésta. Con todo lo anterior, sugerimos la participación de claudina-1 endógena como posible intermediario en la activación de MMP-2 en células que sobreexpresan a claudina-6 y -9 para así regular los procesos de invasividad celular y activación de MMPs en nuestro modelo de estudio.

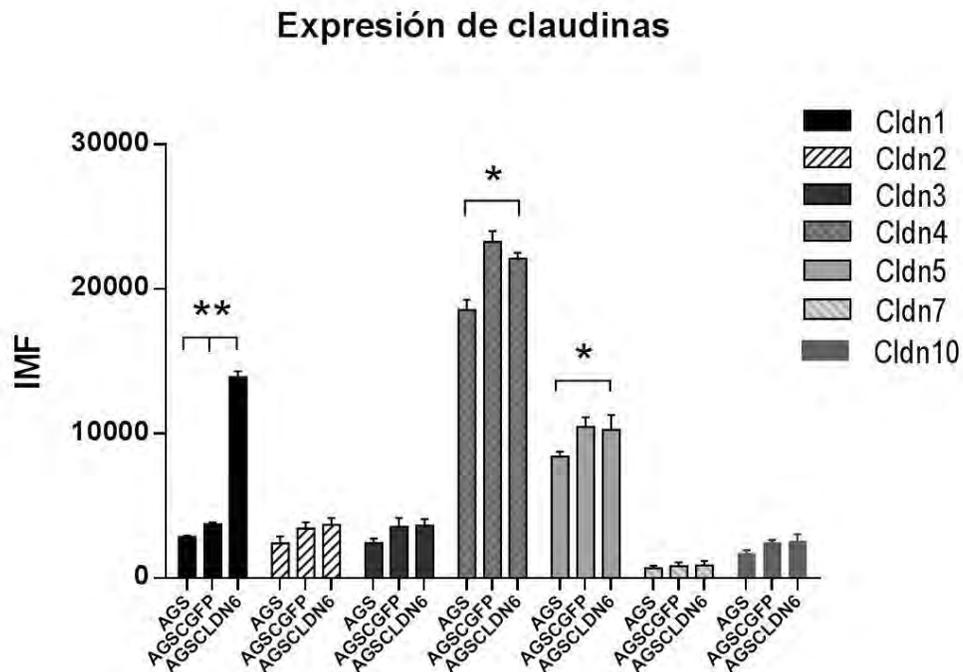
### **6.1 Expresión de diferentes isoformas de las claudinas en las células AGS transfectadas.**

En primera instancia y para determinar si la sobreexpresión de claudina-6 en las células AGS modifica la expresión endógena de otras claudinas se analizó la expresión de diferentes isoformas en las células AGS, AGSGFP y AGSCLDN6. En la figura 8, se muestran los resultados obtenidos por ensayos de Western blot de los lisados de las células AGS transfectadas. En el panel a) se observa que, de las claudinas analizadas, la claudina-1 aumenta considerablemente su expresión en las células que sobreexpresan a claudina-6, aunque existe un aumento en las células que expresan a la GFP, éste es mayor en las células que sobreexpresan a dicha claudina. Estos datos fueron confirmados con los obtenidos por citometría de flujo (Figura 9, paneles a) a g)) en donde se muestra la expresión de las claudinas representada por la intensidad media de fluorescencia obtenida por el citómetro. El aumento en la expresión de claudina-1 fue de 2865.5 IMF en las células AGS a 13916 IMF en las células AGSCLDN6.



**Figura 8. Expresión de claudinas -1, -2, -3, -4, -5, -7, -10 en las células AGS control y AGSCLDN6.** a) Western blot de lisados totales de células AGS, AGSGFP, AGSCLDN6 mostrando la expresión a nivel de proteína de las claudinas analizadas. Se utilizó  $\alpha$ -Actina como control de carga. b) Representación gráfica de los datos obtenidos por densitometría del western blot. Los valores se expresan como dpp (dots per point) y se representan por la media  $\pm$  desviación estándar (SD). \* $P < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ,  $n = 3$ .





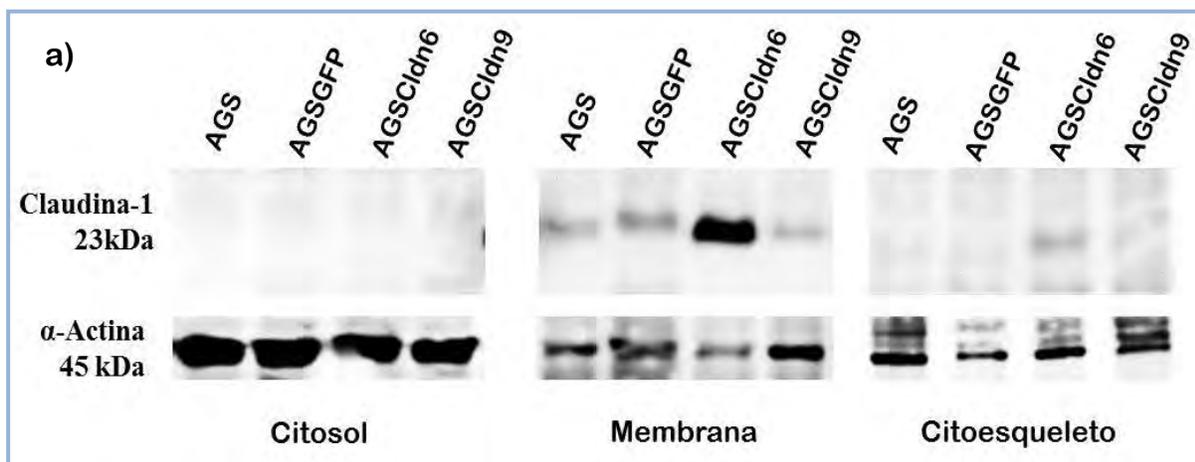
**Figura 9. Expresión de claudinas -1, -2, -3, -4, -5, -7, -10 en las células AGS, AGSGFP, AGSCLDN6 por ensayos de citometría de flujo.** (a-g) Los histogramas representan la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada claudina, los datos fueron normalizados de acuerdo al número de eventos y fueron analizados con el software FlowJO V.10.0.7r2. Como control de isotipo se utilizó el anticuerpo secundario Cy5. h) Representación gráfica de los datos obtenidos por densitometría del western blot. Los valores se expresan como dpp (dots per point) y se representan por la media  $\pm$  desviación estándar (SD). \*P <0.05, \*\*p<0.01, n=3.

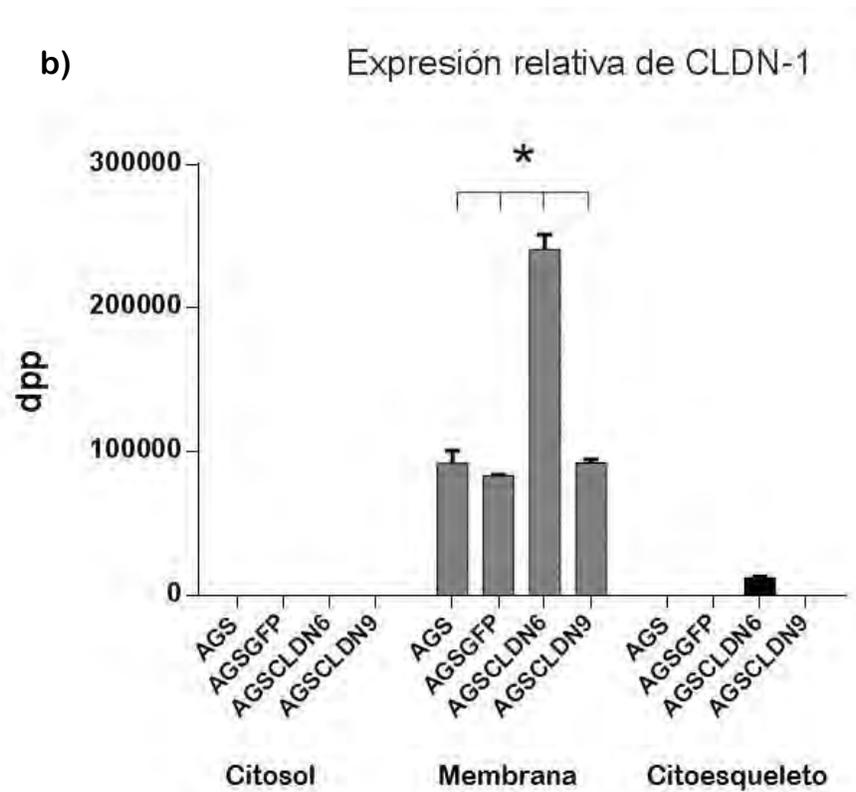
Los resultados anteriores muestran que únicamente claudina-1 aumenta significativamente en las células AGS que sobreexpresan a claudina-6 lo cual puede sugerir que los efectos observados en estudios previos sobre la capacidad invasiva de estas células pueden ser debidos a ésta claudina.

## 6.2 Expresión y localización de claudina-1.

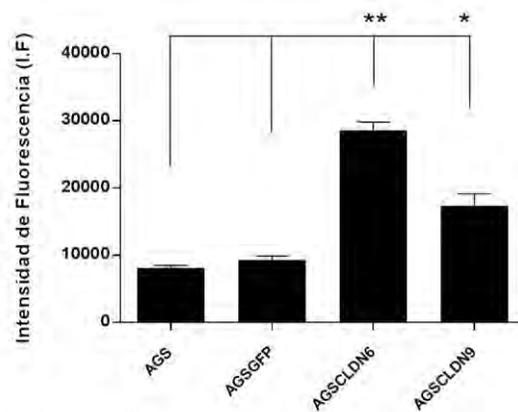
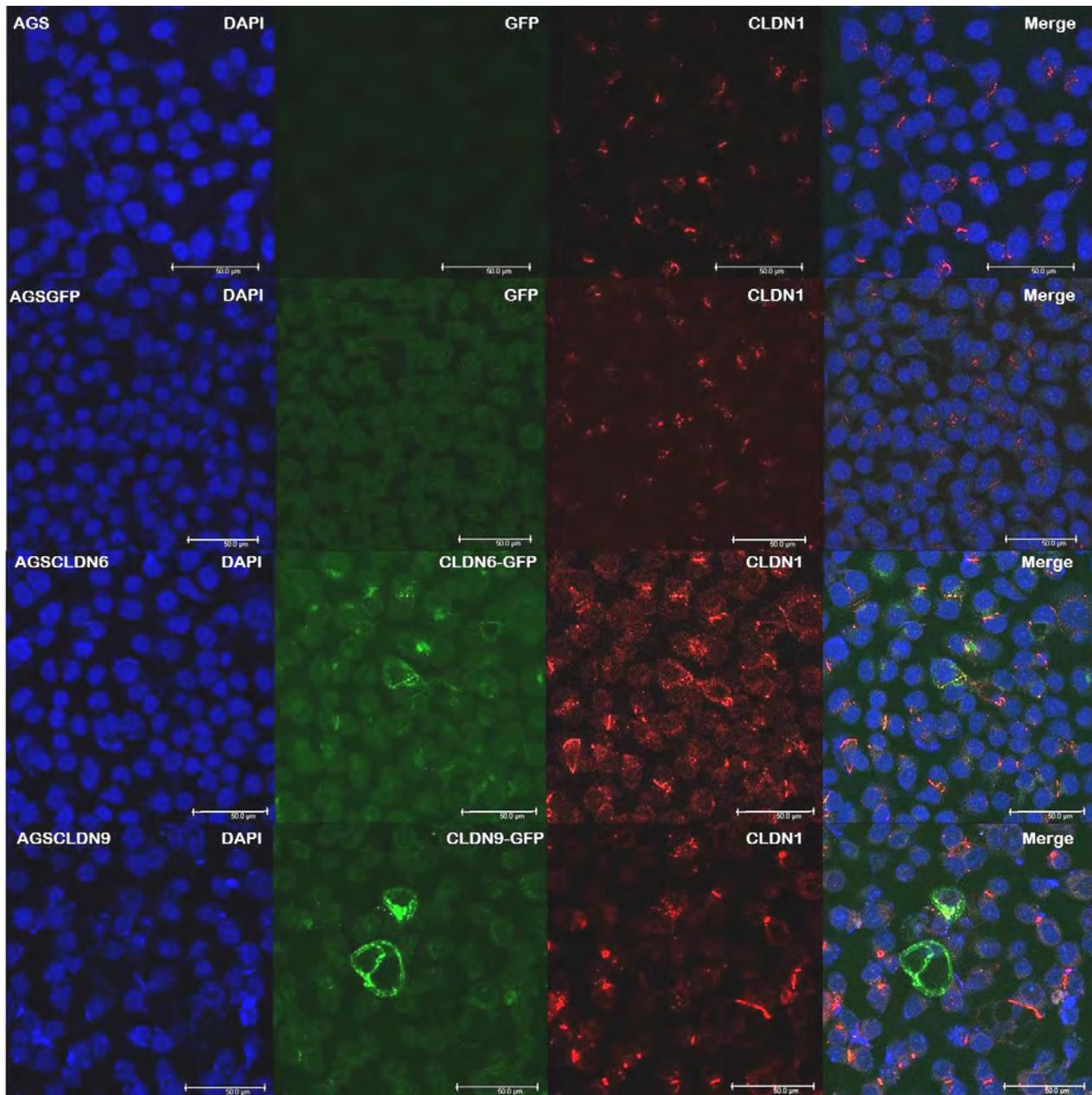
De acuerdo a lo que se ha reportado sobre la participación de claudina-1 en la activación de metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) en el presente trabajo se estudió el papel de claudina-1 endógena como posible intermediario en la activación de MMP-2.

Para ello, en primera instancia se determinó la localización subcelular de la misma, para lo cual se analizó su expresión por medio de ensayos de Western blot en fracciones de citosol, membrana y citoesqueleto y por ensayos de inmunofluorescencia, en células que sobreexpresan a las claudinas -6 y-9. Como se muestra en la figura 10, la claudina-1 endógena se localiza en la membrana de las células que sobreexpresan a claudina-6, y se observa claramente un aumento en su expresión. Las imágenes de microscopía confocal confirman la presencia de claudina-1 en ambas células, sin embargo, la expresión es mayor en las células AGSCLDN6 (figura 11) y su localización en la membrana celular corroborando lo observado anteriormente. Esto nos podría hablar de una probable participación de claudina-1 en la activación de MMP-2 ya que ésta se lleva a cabo en la superficie celular.



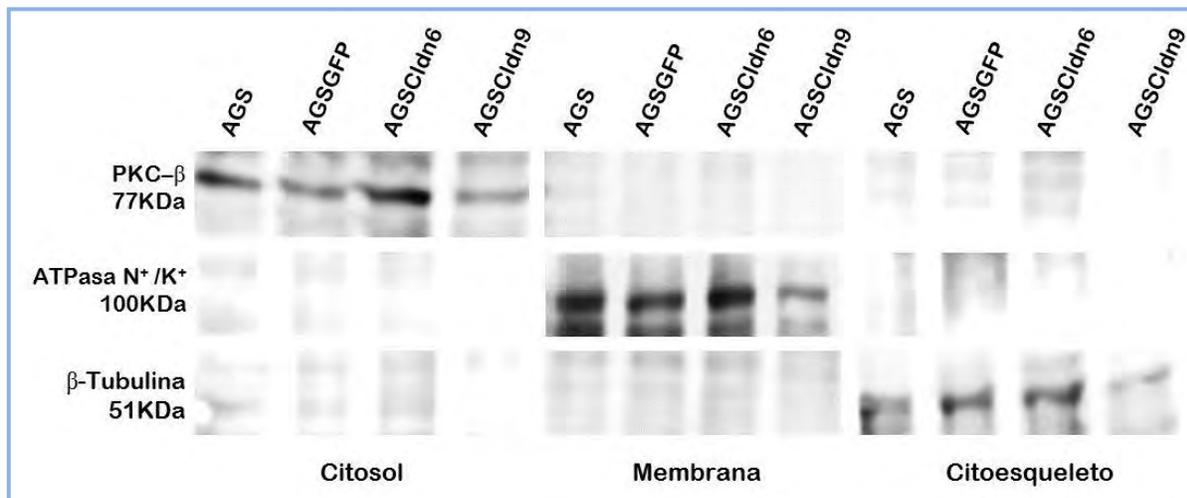


**Figura 10. Expresión de claudina-1 en fracciones subcelulares de AGSCLDN6 y AGSCLDN9.** a) Claudina-1 se localiza en la membrana celular y se observa un incremento en su expresión en comparación con el control, se utilizó como control de carga a  $\alpha$ -actina. b) Representación gráfica de los datos numéricos obtenidos por densitometría del Western blot. Los valores se expresan como dpp (dots per point) y se representan por la media  $\pm$  desviación estándar (SD). \*p < 0,01, n=3.



**Figura 11. Expresión de claudina-1 en las células AGSCLDN6 y AGSCLDN9. La expresión de claudina-1 fue determinada por inmunofluorescencias.** Se observa a claudina-1 en la membrana celular (rojo), GFP (verde), DAPI (azul). El histograma representa la IMF (Intensidad media de fluorescencia) de todos los experimentos. Los valores se representan por la media  $\pm$  desviación estándar (SD). \*P < 0.05, \*\*p < 0.01, n=3.

Para corroborar la pureza de cada fracción obtenida se realizaron ensayos de Western blot de cada fracción subcelular utilizando anticuerpos dirigidos contra proteínas específicas de citosol, membrana y citoesqueleto. En la figura 12 se muestra la expresión de PCK- $\beta$  en el citosol, ATPasa N<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> en la membrana y  $\beta$ -tubulina en el citoesqueleto lo cual indica que el fraccionamiento subcelular se realizó adecuadamente.



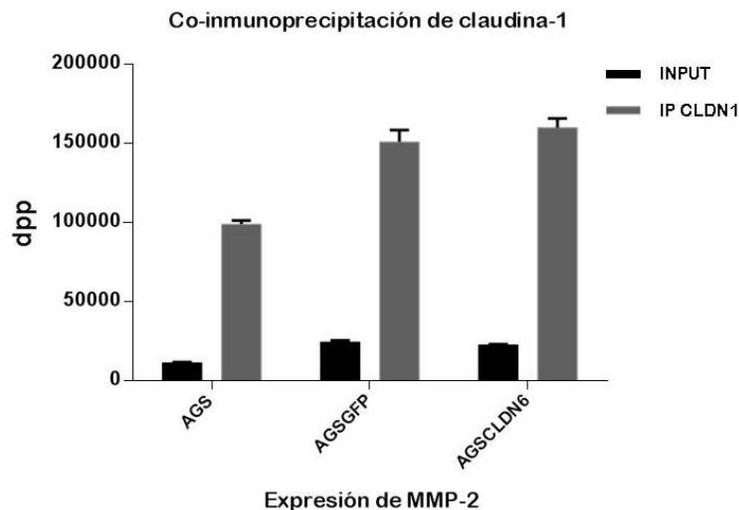
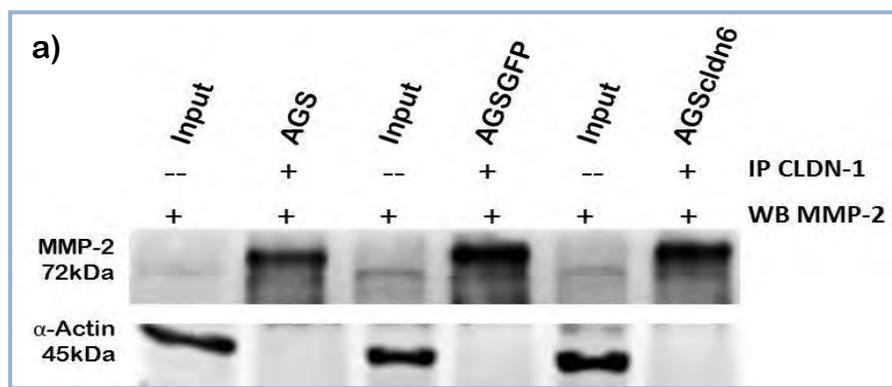
**Figura 12. Expresión de marcadores específicos en las diferentes fracciones de células AGSCLDN6 y AGSCLDN9.** Los western blots muestran la expresión de PCK- $\beta$  (citosol), ATPasa N<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (membrana) y  $\beta$ -tubulina (citoesqueleto).

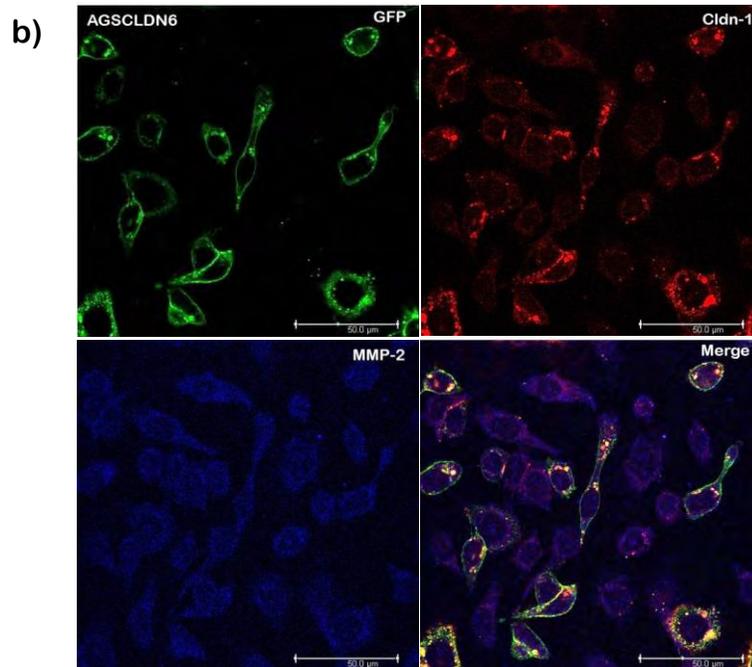
### 6.3 Interacción de claudina-1 con MMP-2 en las células AGS que sobreexpresan a claudina-6.

Posteriormente se realizaron co-inmunoprecipitaciones de claudina-1 en las células AGS que sobreexpresan a claudina-6 para determinar si co-localizaba con MMP-2. Los resultados obtenidos mostraron la co-inmunoprecipitación de claudina-1 con la MMP-2 en células AGSCLDN6 (figura 13a), así mismo se confirmó por ensayos de

Inmunofluorescencia la co-localización de claudina-1 con MMP-2 (figura 13b). Estos resultados nos indican una fuerte participación de claudina-1 en la activación de MMP-2, la cual probablemente está formando complejos con la MMP-2 favoreciendo su activación.

Hasta el momento los resultados nos sugieren que la sobreexpresión de claudina-6 en las células AGS induce un aumento en la expresión endógena de claudina-1 en la membrana celular en donde probablemente promueve la activación de MMP-2.

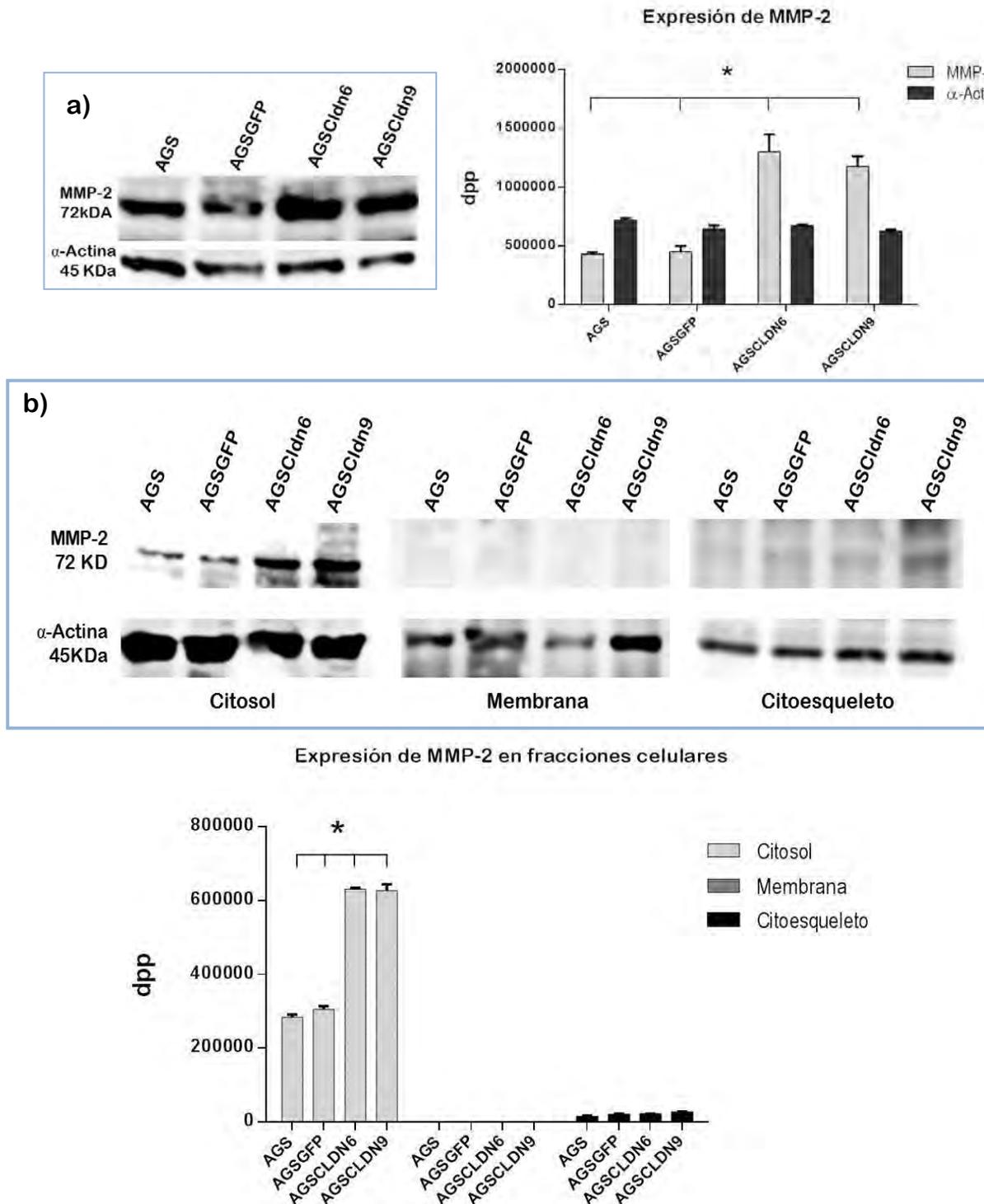




**Figura 13. Co-inmunoprecipitación de claudina-1 con MMP-2 en células AGSCLDN6.** a) El “input” representa el control positivo para cada Inmunoprecipitado y fue obtenido del lisado celular antes de haber añadido el anticuerpo primario anti-claudina-1,  $\alpha$ -actina fue utilizado como control de carga. b) Imágenes de Microscopia confocal que muestran la co-localización de claudina-1 con MMP-2 en las células AGS que sobreexpresan a claudina-6, (en rosa, merge), n=2.

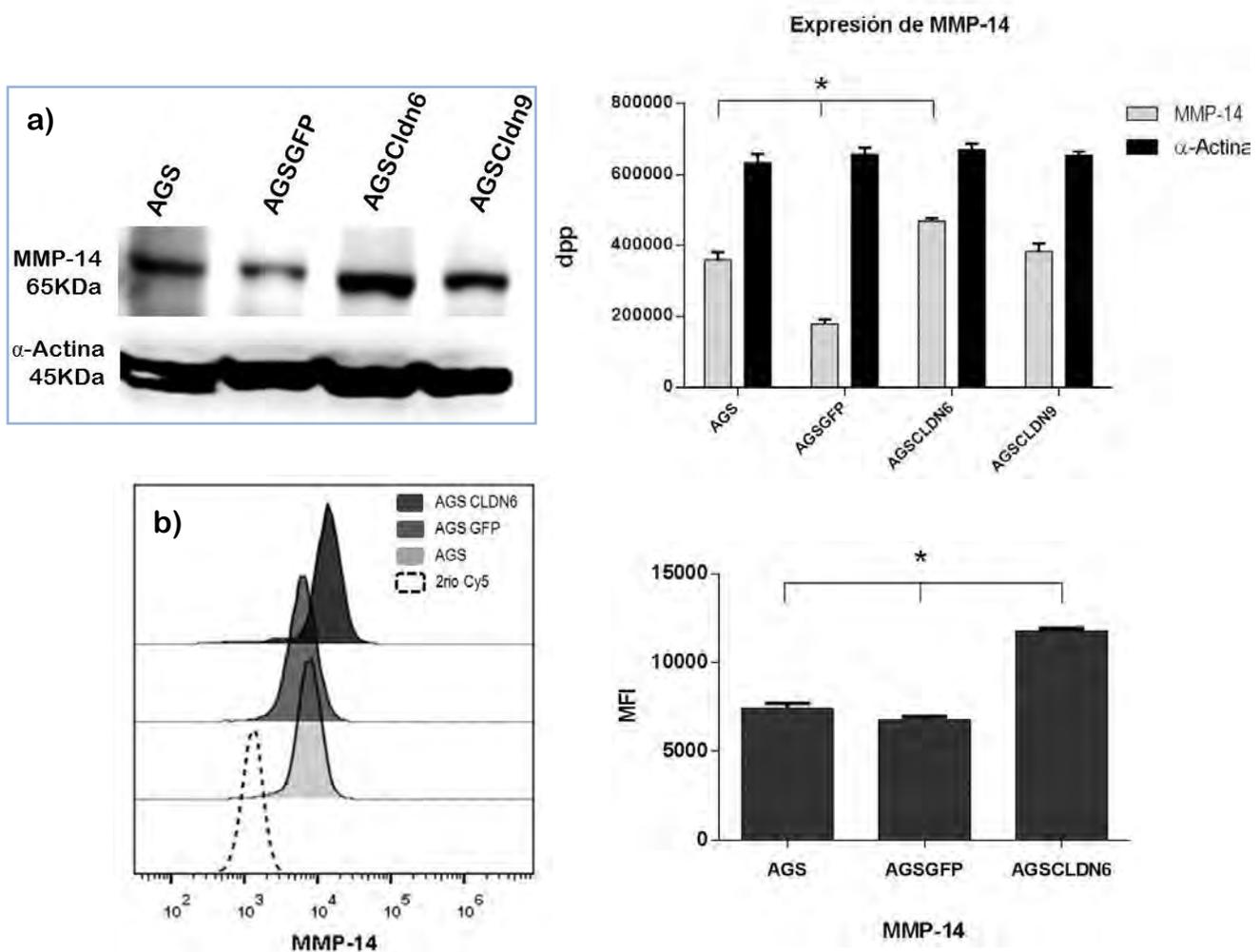
#### 6.4 Expresión de MMP-2 y MMP-14

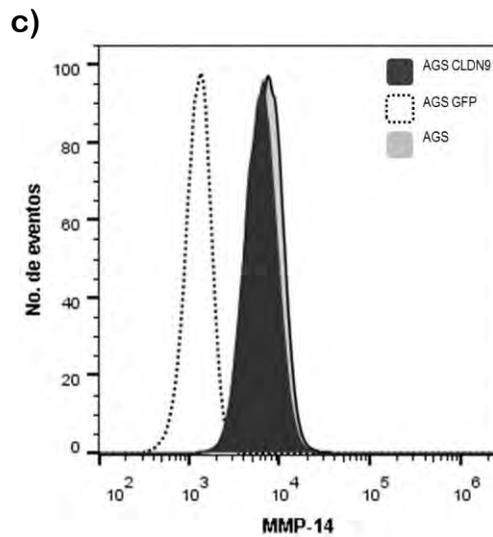
Se ha reportado en diversos estudios que el aumento en la expresión de algunas claudinas, entre ellas la claudina-1, induce un aumento en la expresión de MMP-2 en otros tipos de cáncer. Por lo tanto, para determinar si la sobreexpresión de claudina-6 y -9 regula la expresión de MMP-2 se realizaron ensayos de Western blot de extractos totales y fracciones celulares de las células AGS, AGSCLDN6 y AGSCLDN9. Los resultados obtenidos muestran un aumento en la expresión de MMP-2 en las células AGSCLDN6 y AGSCLDN9, sin embargo, el aumento es mayor en las células AGSCLDN6 (figura 14a). Así mismo, se observa que se encuentra mayoritariamente en el citosol (figura 14b). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de claudina-6 induce, por un mecanismo desconocido, la producción de MMP-2 en el citosol la cual será secretada y activada en el medio extracelular.



**Figura 14. Expresión de MMP-2 en células AGSCLDN6 y AGSCLDN9.** a) El western blot muestra un aumento de la expresión de MMP-2 en lisados totales de células AGSCLDN6 y AGSCLDN9. b) La expresión de MMP-2 se analizó en fracciones subcelulares obtenidas por centrifugación, se utilizó  $\alpha$ -actina como control de carga. La gráfica representa los datos numéricos obtenidos por densitometría del Western blot. Los valores se expresan como dpp (dots per point) y se representan por la media  $\pm$  desviación estándar (SD), \* $p < 0,01$ ,  $n=3$ .

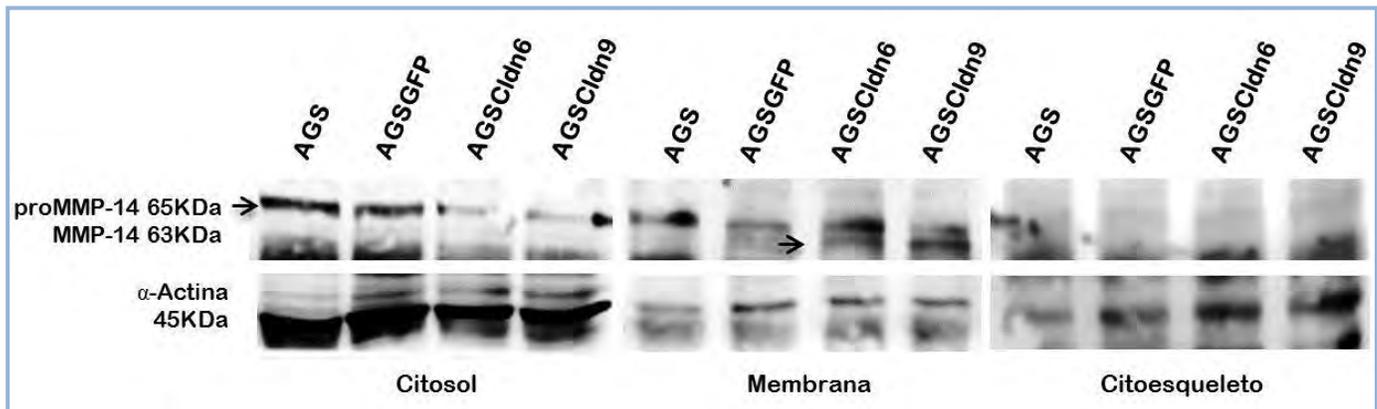
La activación de MMP-2 se lleva a cabo en la superficie celular por una metaloproteasa de membrana, la MMP-14, la cual es indispensable para realizar el corte proteolítico en el sitio activo. Para corroborar la participación de esta enzima en la activación de MMP-2 en las células AGSCLDN6 Y AGSCLDN9, se analizó su expresión mediante ensayos de Western blot en lisados totales y por ensayos de citometría de flujo y se determinó su localización por fraccionamiento subcelular. En la figura 15 se observa un incremento en la expresión de MMP-14 en las células AGSCLDN6 determinado por Western blot (panel a) y citometría de flujo (panel b). Los ensayos de citometría indicaron un aumento significativo en la IMF que va de 8085 en las células AGS a 14026 en AGSCLDN6. No se observaron cambios en la expresión de MMP-14 en las células AGSCLDN9 (panel a y c)



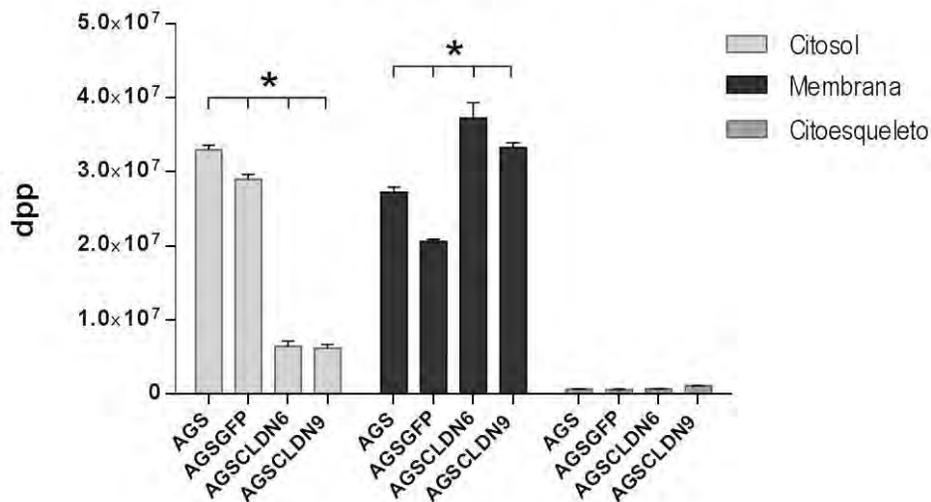


**Figura 15. Expresión de MMP-14 en células AGS AGSCLDN6 y AGSCLDN9.** a) La expresión de MMP-14 fue analizada por Western blot en lisados totales de células AGS que sobreexpresan a claudina-6 y -9, la  $\alpha$ -actina se utilizó como control de carga. b) y c) La expresión de MMP-14 fue determinada por citometría de flujo, los datos son expresados en intensidad media de fluorescencia (IMF), fueron normalizados de acuerdo al número de eventos y se analizaron utilizando el software FlowJO V.10.0.7r2. Se utilizó el anticuerpo secundario Cy5 como control de isotipo. Las gráficas representan los datos numéricos obtenidos por densitometría del wester blot y por IMF. Los valores se expresan como dpp (dots per point) y como IMF (intensidad media de fluorescencia) y se representan por la media  $\pm$  desviación estándar (SD). \* $p < 0,05$ ,  $n=3$ .

Al realizar el fraccionamiento subcelular se observó que la MMP-14 se localiza principalmente en el citosol y la membrana, importantemente se observa un aumento en la expresión de la forma activa en la fracción de membrana de las células AGSCLDN6 (figura 16). Este incremento, junto con el aumento en la expresión de claudina-1, sugiere que MMP-14 y claudina-1 podrían estar participando en la activación de MMP-2.



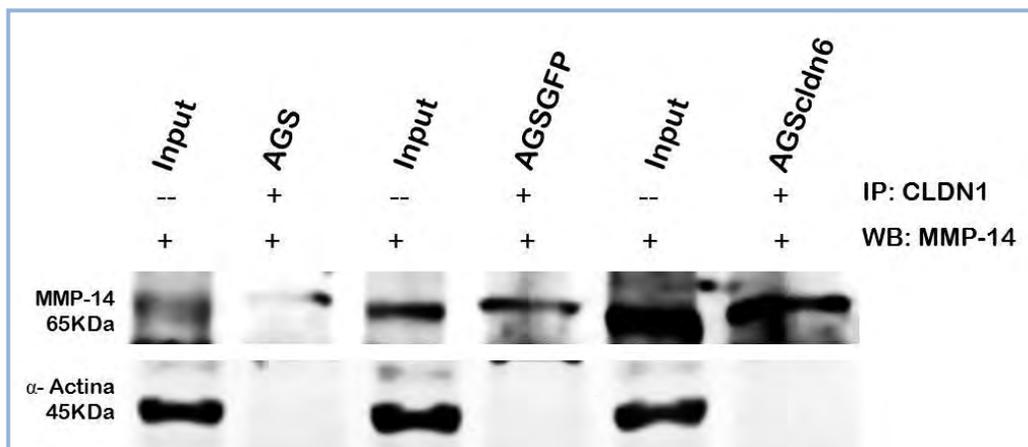
Expresión de MMP-14 en fracciones celulares



**Figura 16. Expresión de MMP-14 en fracciones subcelulares de AGSCLDN6 y AGSCLDN9.** El análisis por Western blot muestra la expresión de MMP-14 en la fracción de membrana, la  $\alpha$ -actina se utilizó como control de carga. El histograma representa los datos numéricos obtenidos por densitometría del wester blot, los valores son expresados en dpp (dots per point) y son representados por la media  $\pm$  desviación estándar (SD) \* $p < 0,05$ ,  $n=3$ .

### 6.5 Interacción de claudina-1 con MMP-14 en las células AGS que sobreexpresan a claudina-6.

Tomando en cuenta que la MMP-14 es indispensable para la activación de la MMP-2 en la superficie celular junto con otras moléculas que se encargan de reclutar a proMMP-2 como TIMP-2, nosotros proponemos que claudina-1 funciona como un reclutador de MMP-2 en la superficie celular y que, junto con MMP-14, promueve la activación de proMMP-2. Para comprobar nuestra hipótesis, se determinó si claudina-1 co-localiza con MMP-14. Como se muestra en la figura 17, claudina-1 y MMP-14 co-localizan en las células AGSCLDN6. Estos resultados sugieren que ambas proteínas están en suficiente cercanía para formar un complejo que active a la proMMP-2.

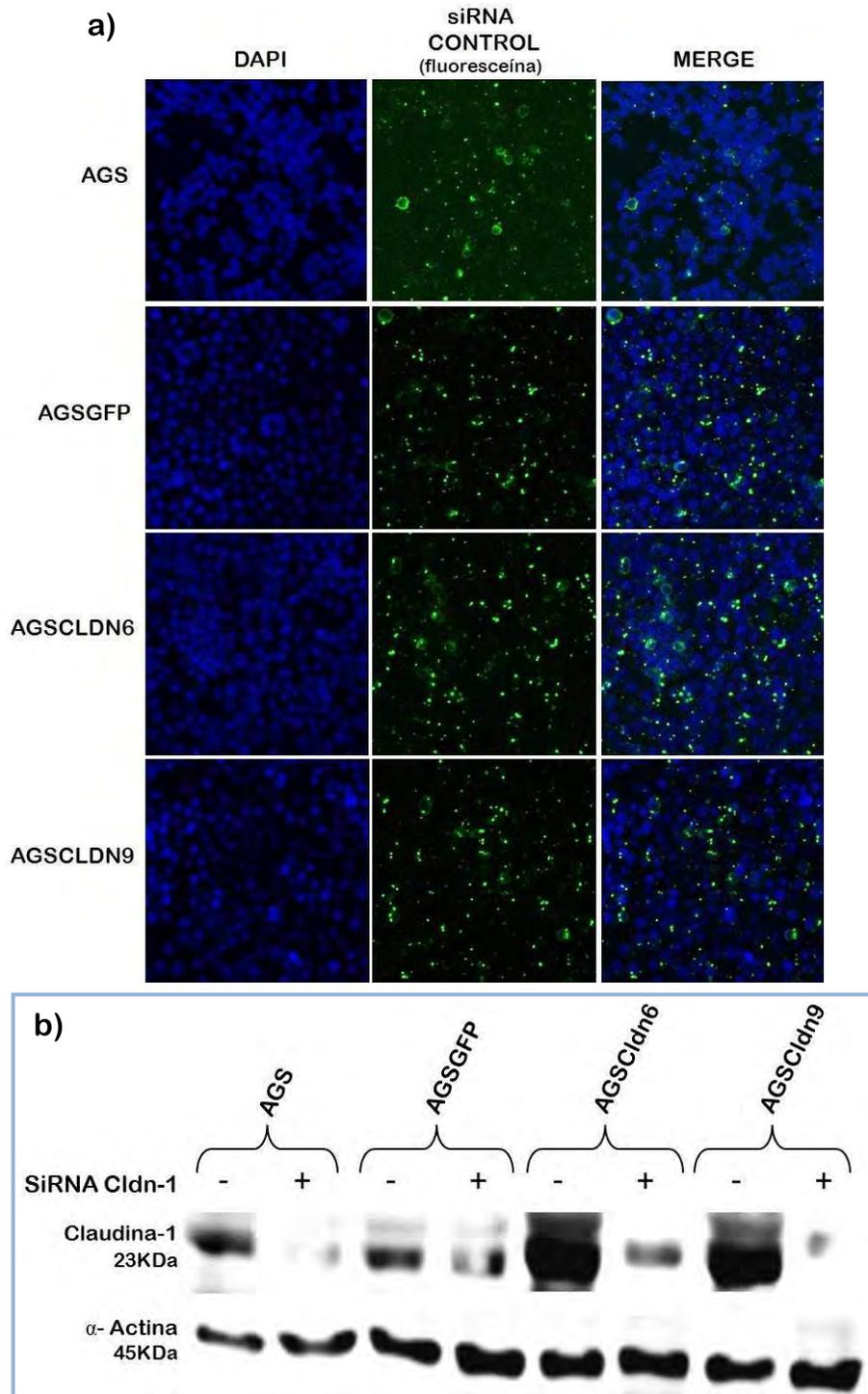


**Figura 17. Co-inmunoprecipitación de claudina-1 con MMP-14 en células AGSCLDN6.** El "input" representa el control positivo para cada inmunoprecipitado y fue obtenido del lisado celular antes de haber añadido el anticuerpo primario anti-claudina-1,  $\alpha$ -actina fue utilizado como control de carga.

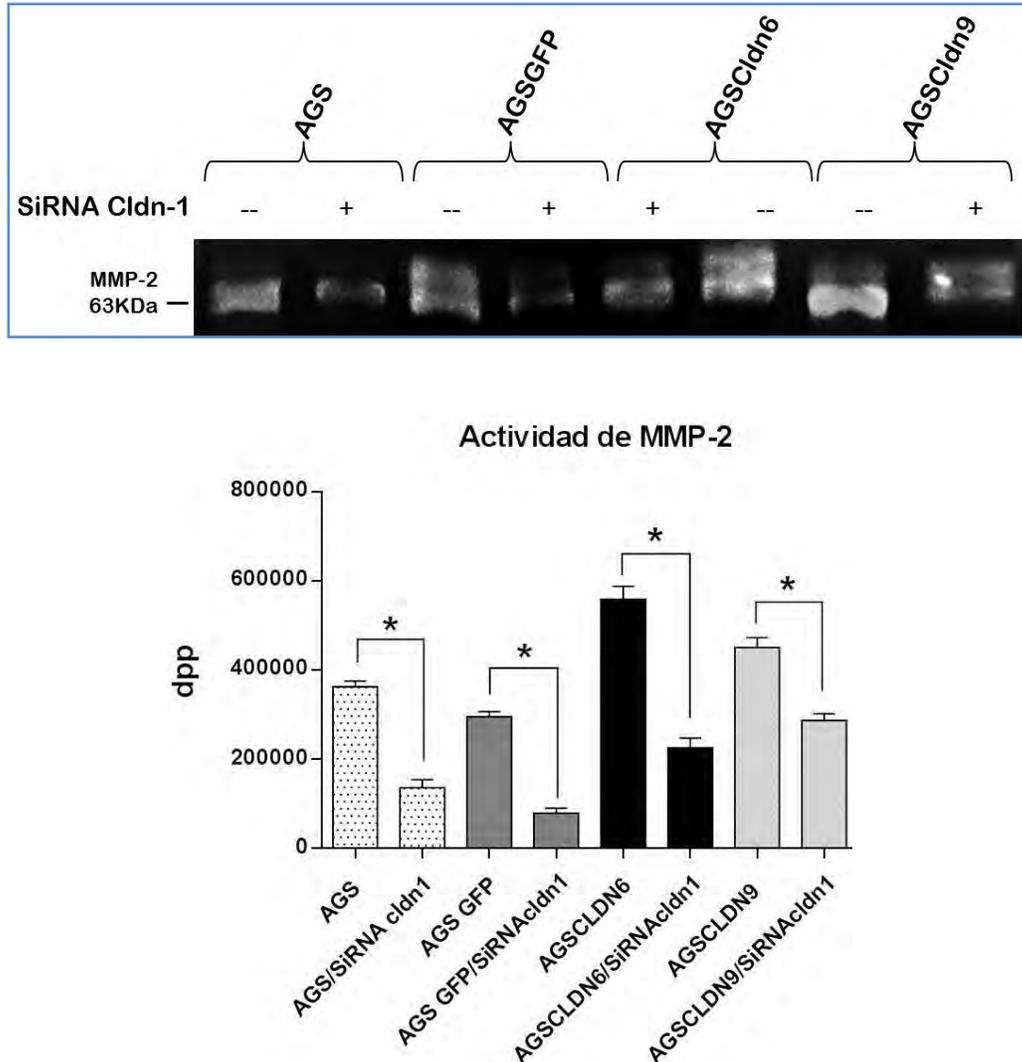
## **6.6 Silenciamiento de claudina-1 y su efecto en la actividad de MMP-2 así como en la migración e invasividad de las células AGS transfectadas.**

Para corroborar el papel de claudina-1 en la activación de MMP-2 se llevó a cabo el silenciamiento de claudina-1 a través de un siRNA específico. La eficiencia de transfección se comprobó mediante la observación por microscopia confocal de un siRNA control acoplado a fluoresceína (figura 18a) y por ensayos de western blot (figura 18b).

Para determinar el efecto del silenciamiento de claudina-1 en la actividad de MMP-2 se obtuvieron los medios condicionados de las células AGS que sobreexpresan a claudina-6 y -9. Los datos obtenidos por zimografía mostraron que el silenciamiento de claudina-1 disminuye la actividad de MMP-2 presente en los medios condicionados de las células que sobreexpresan a claudina-6 y -9 (figura 19).



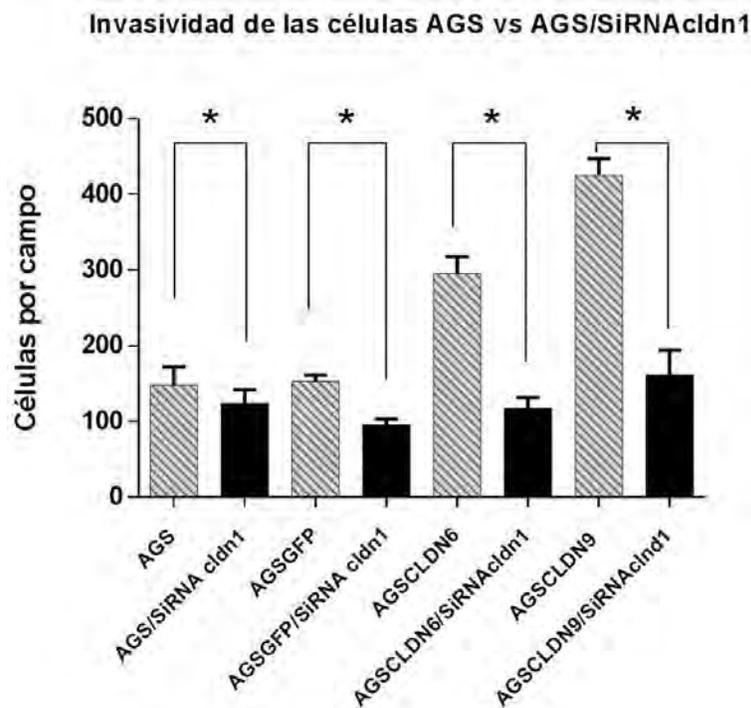
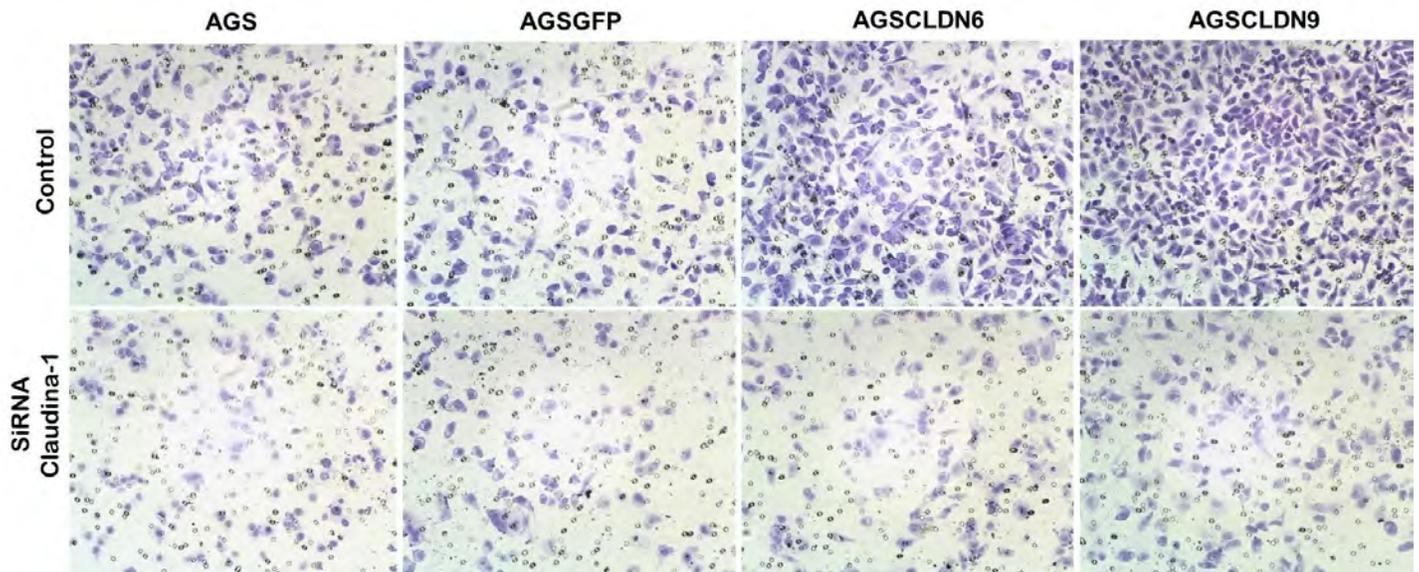
**Figura 18. Eficiencia de transfección de un siRNA comercial específico para claudina-1.** a) Imágenes obtenidas por microscopía confocal de las células AGSCLDN6 y AGSCLDN9transfectadas de forma transitoria con un siRNA control acoplado a fluoresceína en el cual se observa en el citoplasma de las células, se utilizó DAPI para teñir los núcleos. b) Análisis por ensayos de Western blot de la expresión de claudina-1 en las células AGS que se transfectaron con el SiRNA específico. Se utilizó  $\alpha$ -actina como control de carga.



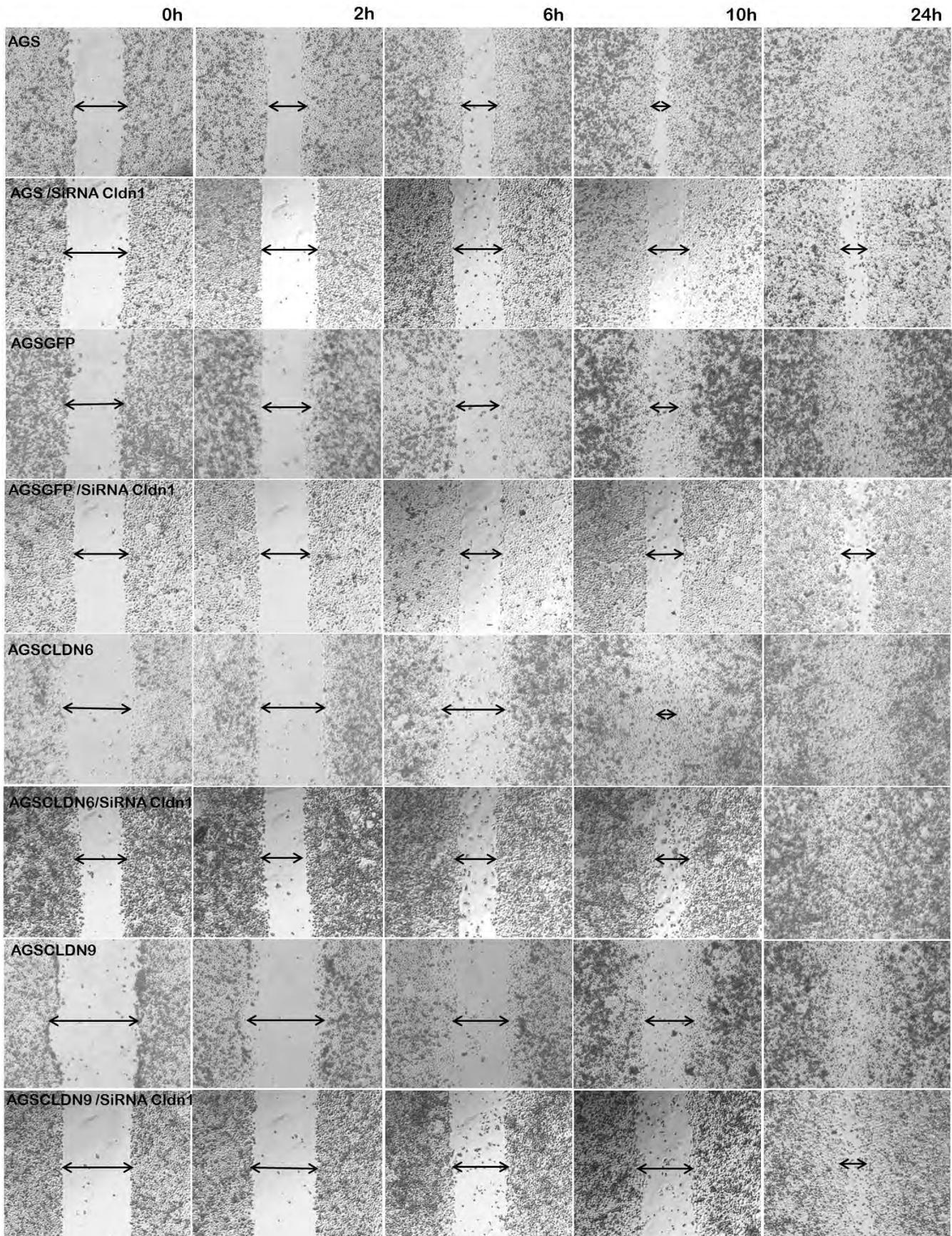
**Figura 19. Efecto del silenciamiento de claudina-1 en la actividad de MMP-2.** Los zimogramas fueron realizados con sobrenadantes de cultivo en ausencia de SFB por 24hrs, de las células AGS que sobreexpresan a claudina-6 y -9. El histograma muestra la actividad de MMP-2 en dpp (dots per point) \*p <0,05, n=3.

De acuerdo a lo anterior se evaluó el efecto del silenciamiento de claudina-1 en células AGSCLDN6 y AGSCLDN9 en procesos de migración e invasividad, para lo cual se realizaron ensayos con insertos cubiertos con matrigel y ensayos de regeneración de herida de las células AGS que sobreexpresan a claudina-6 y -9.

Como se puede observar en la figura 20 es muy claro que las células que sobreexpresan a claudina-6 y -9 muestran significativamente una alta invasividad en comparación con las células que no fueron transfectadas. Interesantemente al silenciar a claudina-1 en éstas células se observa una disminución en la invasividad celular, similar a lo que mostraron las células que no fueron transfectadas. El silenciamiento de claudina-1 indujo un efecto similar en la migración de las células AGSCLDN6 y AGSCLDN9 (figura 21), en donde se observa que la tasa de reparación fue claramente más lento después de las 10hrs en comparación con las células que no fueron transfectadas con el siRNA. Estos resultados sugieren claramente que claudina-1 está fuertemente involucrada en el aumento de la invasividad de las células AGSCLDN6 y AGSCLDN9, a través de la activación de MMP-2 probablemente junto con MMP-14.



**Figura 20. Efecto del silenciamiento de claudina-1 sobre la invasividad.** Las células AGSCLDN6 y AGSCLDN9 fueron transfectadas con el SiRNA para claudina-1, se sembraron en insertos cubiertos con matrigel por 30hr, las células que invadieron fueron contadas tomando 3 campos al azar. El histograma representa los datos numéricos de todos los experimentos, los valores son expresados como número de células por campo y son representados por la media  $\pm$  desviación estándar (SD) \* $p < 0.05$ ,  $n=3$ .

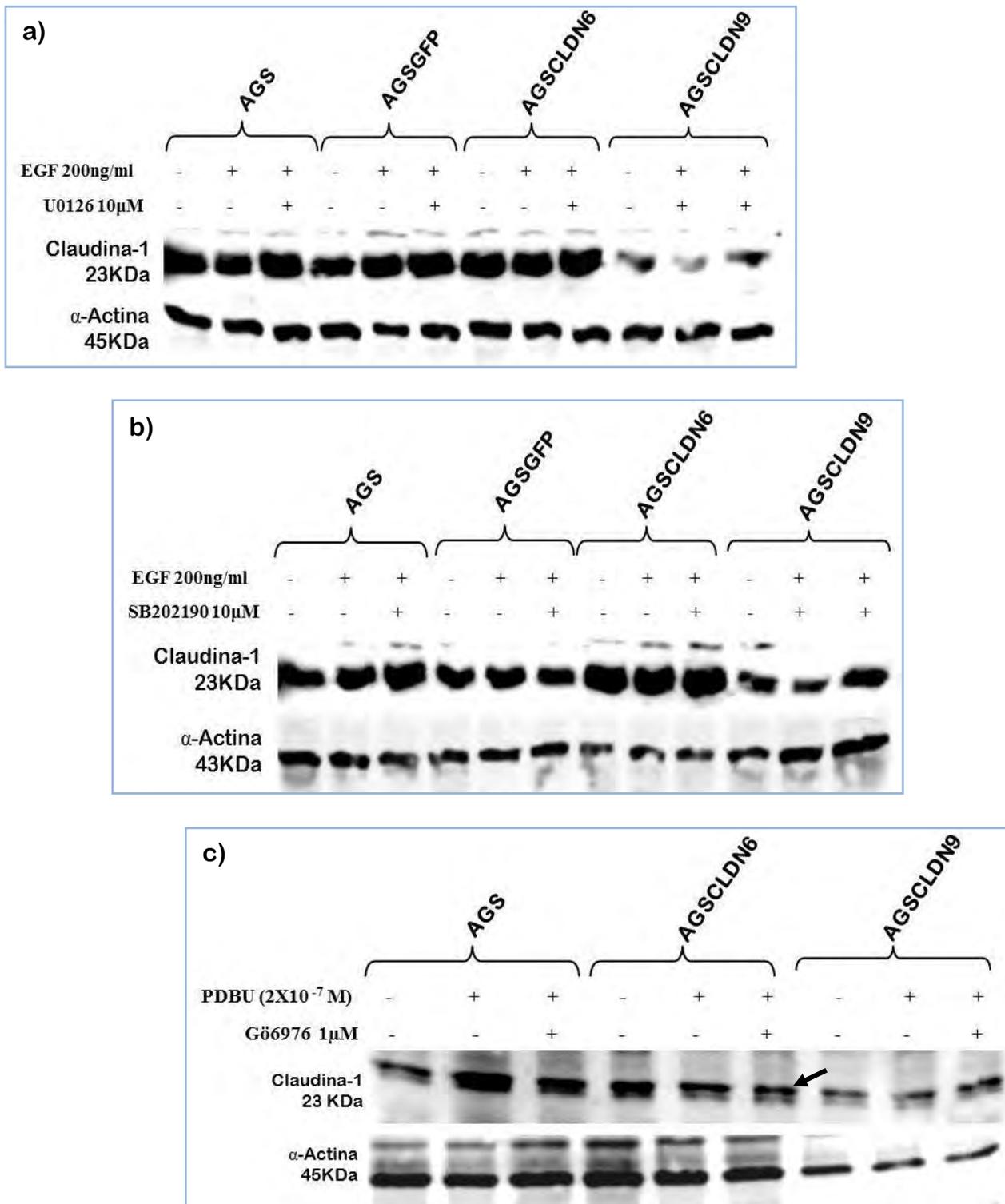


**Figura 21. Efecto del silenciamiento de claudina-1 sobre la migración celular.** Las células AGSCLDN6 y AGSCLDN9 fueron transfectadas con el SiRNA para claudina-1, se cultivaron en placas de 6 pozos y la herida se realizó utilizando una punta de 200µl. La migración celular fue observada a diferentes tiempos.

### **6.7 Inhibición de vías de señalización p38 MAPK, ERK 1/2, PKC y su efecto en la expresión de claudina-1 y MMP-2.**

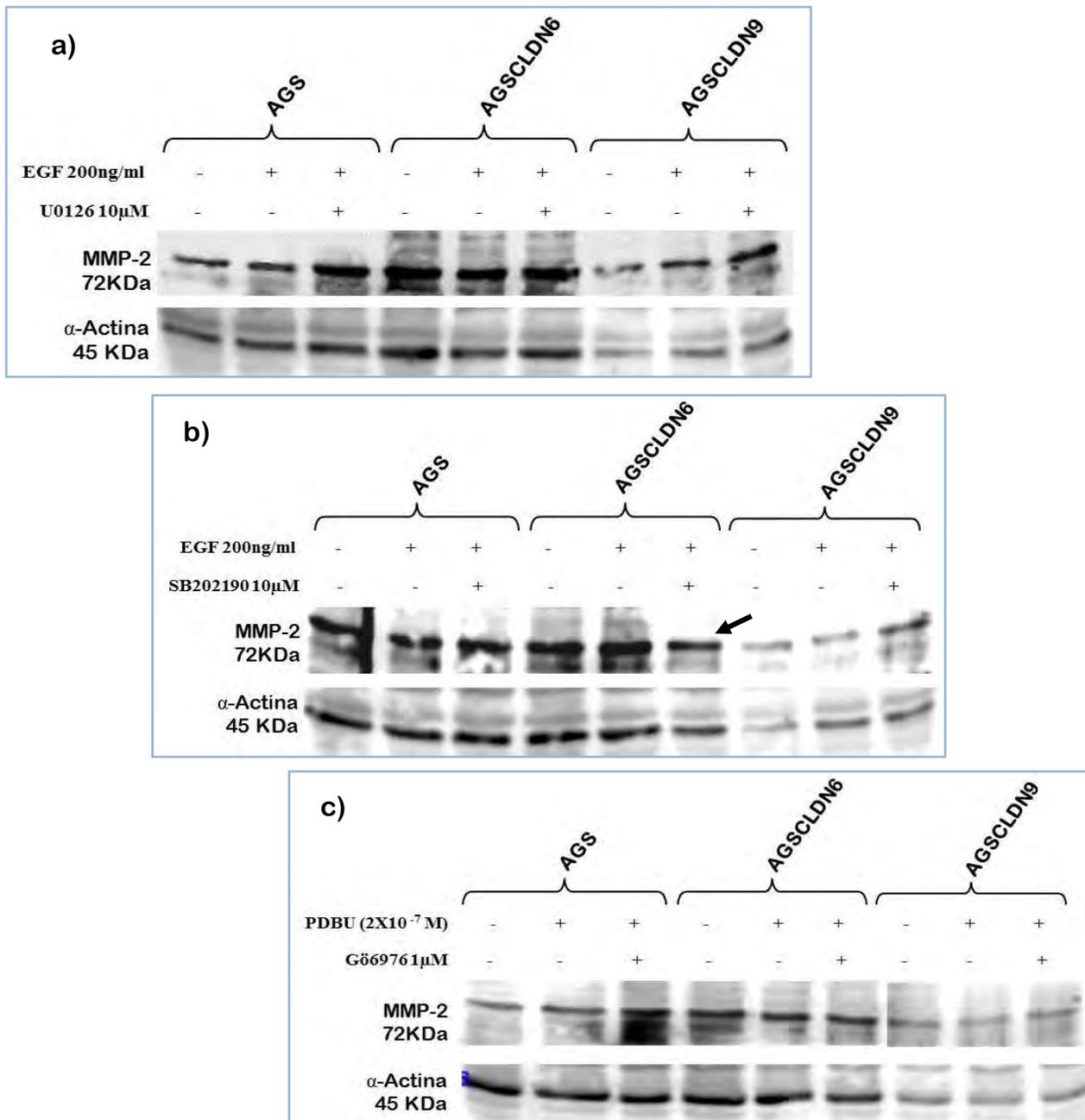
Previos estudios han reportado que la expresión de algunas claudinas así como la activación de algunas MMPs está regulada por vías de señalización como p38 MAPK, ERK 1/2 y PKC las cuales han sido involucradas en el mantenimiento, entre otros procesos, de la proliferación celular. Para investigar si las vías de ERK 1/2, p38 MAPK y/o PKC participan en la regulación de la expresión de claudina-1 y su relación con la activación de MMP-2 en las células AGSCLDN6 y AGSCLDN9, se realizaron ensayos utilizando inhibidores específicos contra éstas vías de señalización (U0126 inhibidor de MEK 1/2, SB202190 inhibidor de p38, Gö6976 inhibidor de PKC) y se analizó la expresión de claudina-1 y MMP-2 mediante ensayos de Western blot. Los resultados muestran que los inhibidores de MEK 1/2 y p38 no tienen efecto sobre la expresión de claudina-1 (figura 22a y b) ya que no se observa algún cambio significativo en los niveles de proteína en las células AGSCLDN6 y AGSCLDN9; por el contrario, al inhibir la vía de PKC (figura 22c) hubo una disminución en la expresión de ésta claudina en las células AGS que sobreexpresan a claudina-6 lo cual nos sugiere que esta vía podría estar regulando la expresión de claudina-1, lo que correlaciona con lo reportado en diversos estudios en los que se ha mostrado que la expresión de algunas claudinas puede regularse vía PKCs.

En la figura 23, los resultados muestran que el inhibidor de la vía de p38 disminuye la expresión de MMP-2 en las células que sobreexpresan a claudina-6, por el contrario, al inhibir las vías de ERK 1/2 y PKC no se observa cambio significativo en la expresión de ésta metaloproteasa, por lo cual podemos sugerir que la vía de señalización de p38 probablemente regule la expresión de MMP-2, similar a lo ya reportado para MMP-9 en



**Figura 22. Expresión de claudina-1 en células AGSCLDN6 y AGSCLDN9 tratadas con inhibidores específicos de las vías de señalización ERK 1/2, p38 MAPKs y PKC.** a) Las células fueron tratadas con inhibidores para MEK 1/2 (U012610μM), (b) para p38 (SB202190 10μM) y (c) para PKC (Go6976 1μM) por 1hr, posteriormente fueron tratadas con EGF 200ng/ml y PDBU (2X 10<sup>-7</sup> M) y se incubaron por

3h y 30 min respectivamente. Se realizó el análisis por western blot de la expresión de claudina-1. Se utilizó  $\alpha$ -actina como control de carga, n=2.



**Figura 23. Expresión de MMP-2 en células AGSCLDN6 y AGSCLDN9 tratadas con inhibidores específicos de las vías de señalización ERK 1/2, p38 MAPKs y PKC.** Las células fueron tratadas con inhibidores a) para MEK 1/2 (U0126 10 $\mu$ M), (b) para p38 (SB202190 10 $\mu$ M) y (c) para PKC (Go6976 1 $\mu$ M) por 1hr, posteriormente fueron tratadas con EGF 200ng/ml y PDBU (2X 10<sup>-7</sup> M) y se incubaron por 3h y 30 min respectivamente. Se realizó el análisis por western blot de la expresión de claudina-1. Se utilizó  $\alpha$ -actina como control de carga, n=2.

Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de claudina-6 induce una probable regulación de la expresión de claudina-1 a través de la vía de PKC y de MMP-2 a través de la vía de p38.

## **7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

Las Uniones Estrechas son importantes reguladoras de la polaridad y permeabilidad paracelular de los epitelios, además están involucradas en la regulación de las funciones celulares como proliferación, diferenciación y apoptosis a través de la capacidad de las proteínas de las UE para reclutar moléculas de señalización y de citoesqueleto que se encargan de modular estas funciones<sup>90</sup>. Las claudinas son consideradas como los componentes principales de las UE, y se expresan de manera tejido específico<sup>91</sup>.

Un creciente conjunto de datos indica que la expresión de claudinas se encuentra alterada (disminuye o aumenta) en numerosos cánceres epiteliales incluyendo adenocarcinoma gástrico<sup>37</sup>. En particular, la desregulación de la expresión de claudinas y/o la distribución celular tiene un potencial inherente de alterar la homeostasis celular comprometiendo la integridad de la barrera, selectividad de carga y polaridad del epitelio la cual está asociada con el desarrollo del cáncer. En este sentido, se ha reportado que la expresión incrementada de claudinas puede promover la progresión tumoral a través de un efecto positivo sobre la migración celular, invasión y metástasis. A pesar de ello no es claro el papel que ejercen las claudinas cuando están sobreexpresadas en diferentes tipos de cáncer<sup>90-92</sup>.

La invasión celular es un paso crucial en el inicio de la metástasis. Durante este proceso las células individuales se desprenden del tumor primario e invaden las células adyacentes sanas<sup>93</sup>. Esto se lleva a cabo mediante la degradación de la matriz extracelular y las membranas basales, lo cual es dirigido por la secreción de varias enzimas principalmente las metaloproteasas de matriz -2 y -9<sup>94,95</sup>, las cuales se encuentran sobreexpresadas en muchos tipos de cáncer. Diversos estudios han reportado a las claudinas como reguladores de las metaloproteasas de matriz de membrana y activadores de las proMMPs<sup>96-98</sup>. Por otro lado, la expresión incrementada de claudina-6 y -9 en biopsias de adenocarcinoma tipo difuso se han asociado con un mal pronóstico<sup>81</sup>. Estas observaciones se confirmaron en un estudio previo en donde se

mostró en las células AGS (adenocarcinoma gástrico humano) transfectadas con claudina-6 y -9 una mayor capacidad invasiva y tasa de proliferación<sup>82</sup>. Así mismo reportamos que la sobreexpresión de claudina-6 induce un incremento en la actividad de MMP-2. Del mismo modo mostramos que la expresión endógena de claudina-1 aumenta en las células AGS que sobreexpresan a claudina-6.

### **7.1 Parte 1. Expresión y localización de claudina-1 en las células AGS transfectadas.**

Dado lo anterior, una de las principales contribuciones de la primera parte del presente trabajo fue haber confirmado con nuestros resultados que la expresión de claudina-1 no solo incremento en las células AGS que sobreexpresan a claudina-6, sino que además el aumento es específico para ésta isoforma, y que la expresión de ésta claudina se observó principalmente a nivel de membrana celular. Estos datos concuerdan con lo reportado por algunos autores en donde muestran la sobreexpresión de claudina-1 en distintos tipos de cáncer como cáncer de colon, estomago, próstata, ovario entre otros<sup>99-101</sup>. Por su parte Huang et. al. 2014 demostraron que al suprimir la expresión de claudina-1 en diferentes líneas celulares de cáncer gástrico se inhibió la migración, invasión y formación de colonias en un modelo “*in vitro*” y la metástasis “*in vivo*”<sup>102</sup>. Así mismo Shiozaki et. al. 2014 reporto que la caída de claudina-1 inhibe significativamente la proliferación, migración, invasión de células de adenocarcinoma gástrico humano MKN28<sup>103</sup>. Sappayatosok K. 2015 encontró que claudina-1 se sobreexpresa en carcinoma escamoso oral y se asoció con la presencia de invasión perineural microscópica, invasión vascular, metástasis ganglionar y estadio clínico avanzado<sup>104</sup>.

Nuestros resultados demostraron que, en cáncer gástrico claudina-1 está fuertemente asociada con invasión celular y metástasis las cuales son etapas avanzadas en la progresión del cáncer, por lo que no se descarta la posibilidad de ser utilizada como biomarcador para el pronóstico o para la recurrencia predictiva de cáncer gástrico o incluso como una herramienta para distinguir y/o confirmar el diagnóstico patológico.

## **7.2 Parte 2. Expresión de MMP-2 y MMP-14 y su interacción con claudina-1 en las células AGS que sobreexpresan a claudina-6.**

Por otro lado, el hecho de que claudina-1 se localice en la membrana celular nos sugiere que probablemente se encuentra interaccionando con alguna molécula extracelular que esté involucrada en la invasividad como MMP-2, sin embargo, no se sabe nada acerca del mecanismo a través del cual esto se lleva a cabo. Es por ello que en este trabajo el principal objetivo fue dilucidar si claudina-1 participa en la invasión celular y migración a través de la activación de MMP-2 en la línea celular de adenocarcinoma gástrico humano (AGS). Por lo cual, una de las grandes contribuciones de la segunda parte del trabajo fue que mostramos claramente que claudina-1 y proMMP-2 co-precipitan en las células AGS que sobreexpresan a claudina-6 y que la expresión de proMMP2 se ve incrementada a nivel de citosol, esto nos hizo sugerir que más tarde será secretada y activada en el medio extracelular, para después formar complejos con claudina-1 la cual se encuentra en la membrana celular. Estos datos son similares a lo reportado por Miyamori et. al. 2001 en donde demostró que claudina-1 puede reclutar y promover la actividad de proMMP-2 en células de riñón embrionarias 293T<sup>75</sup>. Así mismo, Chang-Hwan 2009<sup>78</sup>, Dhawan et al. 2005<sup>71</sup> y Oku et al. 2006<sup>112</sup>, encontraron que al silenciar claudina-1 en células de carcinoma hepatocelular, carcinoma escamoso oral y adenocarcinoma colorectal, respectivamente, disminuyó la actividad de MMP-2.

La activación de MMP-2 está mediada por una gran variedad de moléculas incluyendo a TNF- $\alpha$ <sup>105</sup> y receptores AT1<sup>106</sup>, así como por MMP-14 unida a la membrana celular<sup>107,108</sup>. En este último modelo se sugiere la formación de un complejo ternario entre proMMP-2, TIMP-2 y MMP-14 (MT1-MMP) en donde subsecuentemente proMMP-2 en éste complejo es cortada por una molécula de MMP-14 libre para generar una forma intermediaria activa de MMP-2. De esta forma las concentraciones focales de MMP-14 son un factor regulatorio para la activación de MMP-2. Otra de las principales contribuciones de esta tesis fue que mostramos un aumento en la expresión de MMP-14 activa en la membrana de las células AGS favorecido por un mecanismo desconocido

por la sobreexpresión de claudina-6. Esto se ha observado en células cancerosas que expresan ADAM12 y la integrina  $\alpha V\beta 3$  en la superficie celular que reclutan a MMP14 endógena a la membrana celular y regulan la función enzimática<sup>109</sup>. También se ha reportado que MMP-14 regula la migración e invasión celular en carcinoma nasofaríngeo<sup>110</sup> y en cáncer de pulmón de células no pequeñas<sup>111</sup>. Así mismo nuestros resultados también mostraron la co-precipitación de claudina-1 con MMP-14 en las mismas células. Sabemos que la MMP-14 es indispensable para la activación de la MMP-2 en la superficie celular junto con otras moléculas que se encargan de reclutar a proMMP-2 como TIMP-2. De acuerdo a lo anterior, nuestra mayor contribución de este trabajo es haber propuesto dos eventos: 1) que claudina-1 podría funcionar como un reclutador de MMP-2 y que, junto con MMP-14 promuevan la activación de MMP-2 en la superficie celular, o 2) que claudina-1 funcione como una proteasa de membrana, tal como lo describieron Miyamori y colaboradores en 2001 en donde demostraron que claudina-5 funciona como una proteasa de membrana activadora de MMPs<sup>75</sup>.

El mecanismo exacto de como claudina-1 se une a estas enzimas y que función tiene en este complejo aún está por ser dilucidado, sin embargo, nuestros datos podrían dirigirse hacia ambas propuestas ya que, estudios previos de nuestro equipo de trabajo demostraron por análisis bioinformáticos de alineamientos de secuencias de claudina-1, MMP-2 y MMP-14 que un fragmento de la secuencia proteica del dominio extracelular 1 de claudina-1 es similar a una región del dominio carboxilo terminal de pro-MMP-2, región por la cual interactúa con TIMP-2 y quien es el reclutador de proMMP-2; mientras que una región del dominio extracelular 2 de claudina-1 es parecido a una parte del dominio catalítico de MMP -14, esto resulta interesante por el hecho de que el dominio catalítico de esta metaloproteasa de membrana y de otras de la misma familia tienen la capacidad de romper el enlace peptídico Asn37-Leu38 de proMMP-2 en solución en ausencia de TIMP-2 para así activar a MMP-2<sup>75</sup>. Estos datos nos podrían ayudar a detallar el mecanismo de activación de MMP-2 mediado por claudina-1.

### **7.3 Parte 3. Silenciamiento de Claudina-1 y su efecto en la migración e invasividad.**

Previamente se demostró que la actividad de MMP-2 se ve incrementada en las células que sobreexpresan a claudina-6. Ahora reportamos que este aumento está dado por claudina-1, por lo cual nuestro fin fue corroborar el papel de claudina-1 en procesos de migración e invasividad en éstas células utilizando un siRNA para silenciar la expresión de claudina-1. Por lo cual, la principal contribución de la tercera parte del trabajo fue demostrar que al inhibir la expresión de claudina-1 en las células AGS que sobreexpresan a claudina-6 la capacidad invasiva y la migración se ven disminuidas; estos datos concuerdan con lo reportado por Chang-Hwan Yoon et. al. 2010 en donde muestran que el silenciamiento de claudina-1 en células de hepatocarcinoma humano inhibe completamente la invasión celular mientras que la sobreexpresión de claudina-1 claramente induce un aumento en la expresión de MMP-2<sup>78</sup>. Así mismo en otro estudio se demostró que claudina-1 induce un comportamiento invasivo en células de cáncer de hígado y de mama a través de MMP-9<sup>113</sup>. Nuestros datos confirman que claudina-1 regula de manera positiva la invasividad y migración de las células a través de la activación de MMP-2.

Por otro lado, mostramos que en las células AGS que sobreexpresan a claudina-9 hay un incremento en la expresión de MMP-2 y de MMP-14 ésta última en la membrana celular y que al silenciar a claudina-1 disminuye la invasión y migración celular, sin embargo, no se observó co-precipitación de MMP-2 con claudina-1 ni de claudina-1 con MMP-14, y principalmente no se encontró aumento en la actividad de MMP-2 en estas células (dato obtenido en un estudio previo) por lo tanto, podemos sugerir que claudina-9 está induciendo la invasión y migración celular por un mecanismo diferente al de MMP-2 en donde probablemente están involucradas otras moléculas que están modificando la expresión de MMP-2 y MMP-14 pero no su activación.

Nuestros resultados sugieren fuertemente que el aumento de la expresión de claudina-1 promueve un aumento de la actividad de MMP-2 e incrementa la migración y la

invasividad celular. En conjunto, estos datos muestran una cascada de eventos iniciados por la expresión en la membrana celular de claudina-1 (mediada por claudin-6) que interactúa con la proMMP-2 promoviendo así su activación junto con MMP-14, que a su vez inducen la metástasis, proceso que requieren mayor migración celular e invasividad. Se requiere realizar estudios futuros en donde se establezca la función exacta de claudina-1 en este mecanismo de activación, de acuerdo a las dos propuestas antes mencionadas y analizando si existe interacción biológica entre los dominios encontrados en el análisis de alineamientos de secuencia.

#### **7.4 Parte 4. Inhibición de las vías de señalización p38MAPK, ERK 1/2, PKC y su efecto en la expresión de Claudina-1 y MMP-2.**

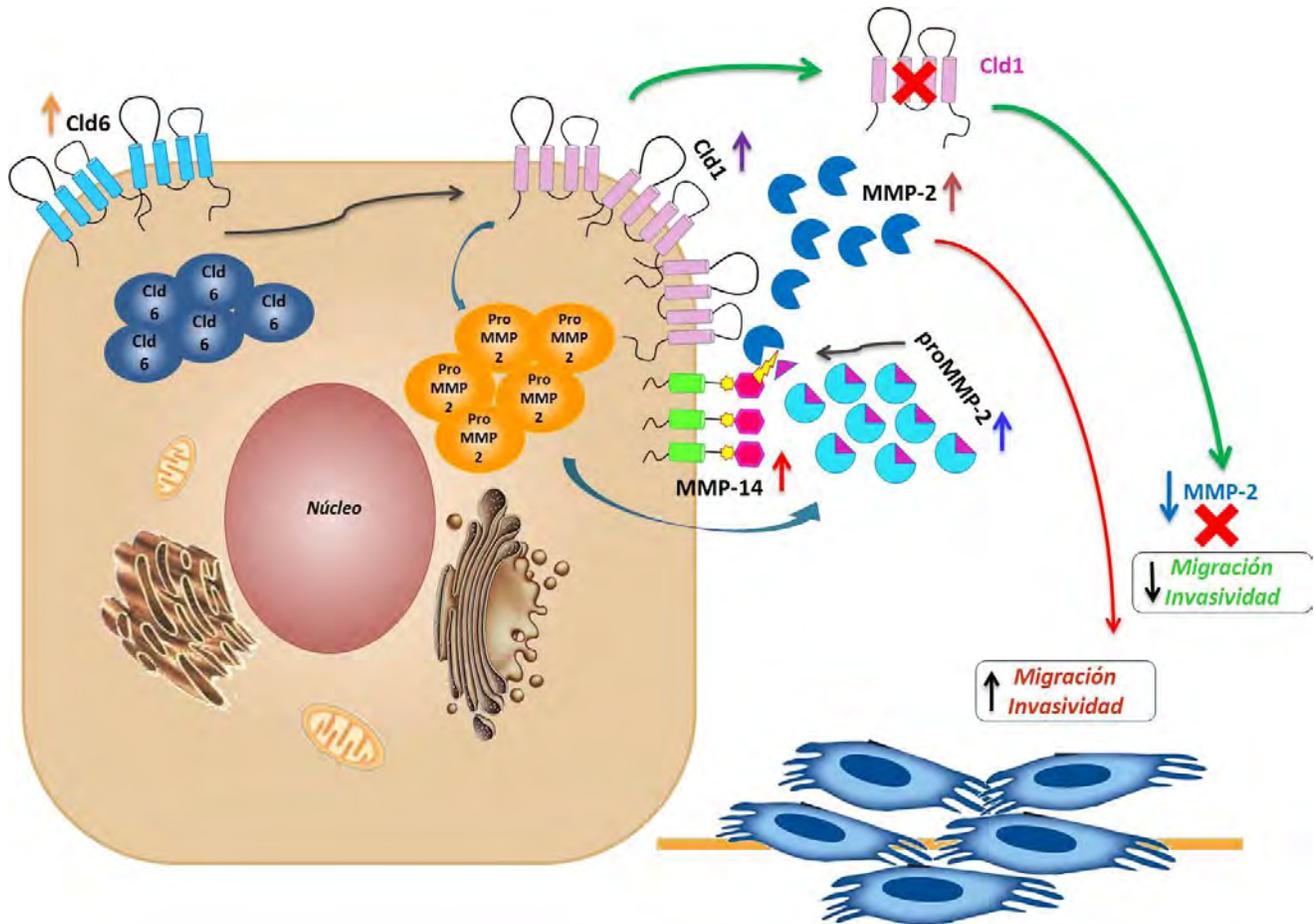
Durante la señalización celular los estímulos son transmitidos vía cascada de señalización a la molécula efectora para orquestar las respuestas celulares deseadas. Sin embargo, las vías de señalización celular a menudo están interconectadas para formar redes de señalización complejas y pueden ser iniciadas por diversos mecanismos, incluyendo la estimulación de los receptores de factores de crecimiento, las interacciones célula-matriz y/o los contactos célula-célula<sup>90</sup>. En este sentido se ha reconocido en investigaciones recientes que miles de proteínas de señalización y las vías de transducción residen en las uniones estrechas e interactúan con sus proteínas constituyentes<sup>90</sup>. Reportes previos han mostrado que la expresión de algunas claudinas así como la actividad de algunas MMPs está regulada por diferentes vías de señalización, teniendo efecto sobre procesos invasivos y metastásicos. Esto se ha observado en células de melanoma, en donde la activación de la vía de PKC incrementa la expresión de claudina-1 mientras que la sobreexpresión de esta claudina correlaciona con un incremento en la activación y secreción de MMP-2 así como en la migración e invasión de estas células<sup>114</sup>. Similarmente, se ha reportado que la sobreexpresión de claudina-1 en células de carcinoma hepatocelular induce TEM vía c-Abl/Raf/Ras/ERK promoviendo el cáncer<sup>115</sup>. También en células de cáncer pancreático se demostró que la activación de la vía p38 MAPK induce la expresión de MMP-2 y la invasión de estas células<sup>116</sup>. Nosotros investigamos si las vías de ERK 1/2, p38 MAPK y PKC participan en

la regulación de la expresión de claudina-1 y su relación con la activación de MMP-2 en las células AGS que sobreexpresan a claudina-6 y -9. La gran contribución de esta cuarta parte de ésta tesis fue que al inhibir la vía de PKC hubo una disminución en la expresión de claudina-1 mientras que al inhibir vía de p38 disminuyó la expresión de MMP-2, interesantemente en las células AGS que sobreexpresan a claudina-6. Por lo anterior sugerimos que la sobreexpresión de claudina-6 induce una probable regulación de la expresión de claudina-1 a través de la vía de PKC, y de MMP-2 a través de la vía de p38, y que éstas a su vez modifiquen procesos como proliferación celular e influyan en el aumento en la migración y capacidad invasiva de estas células.

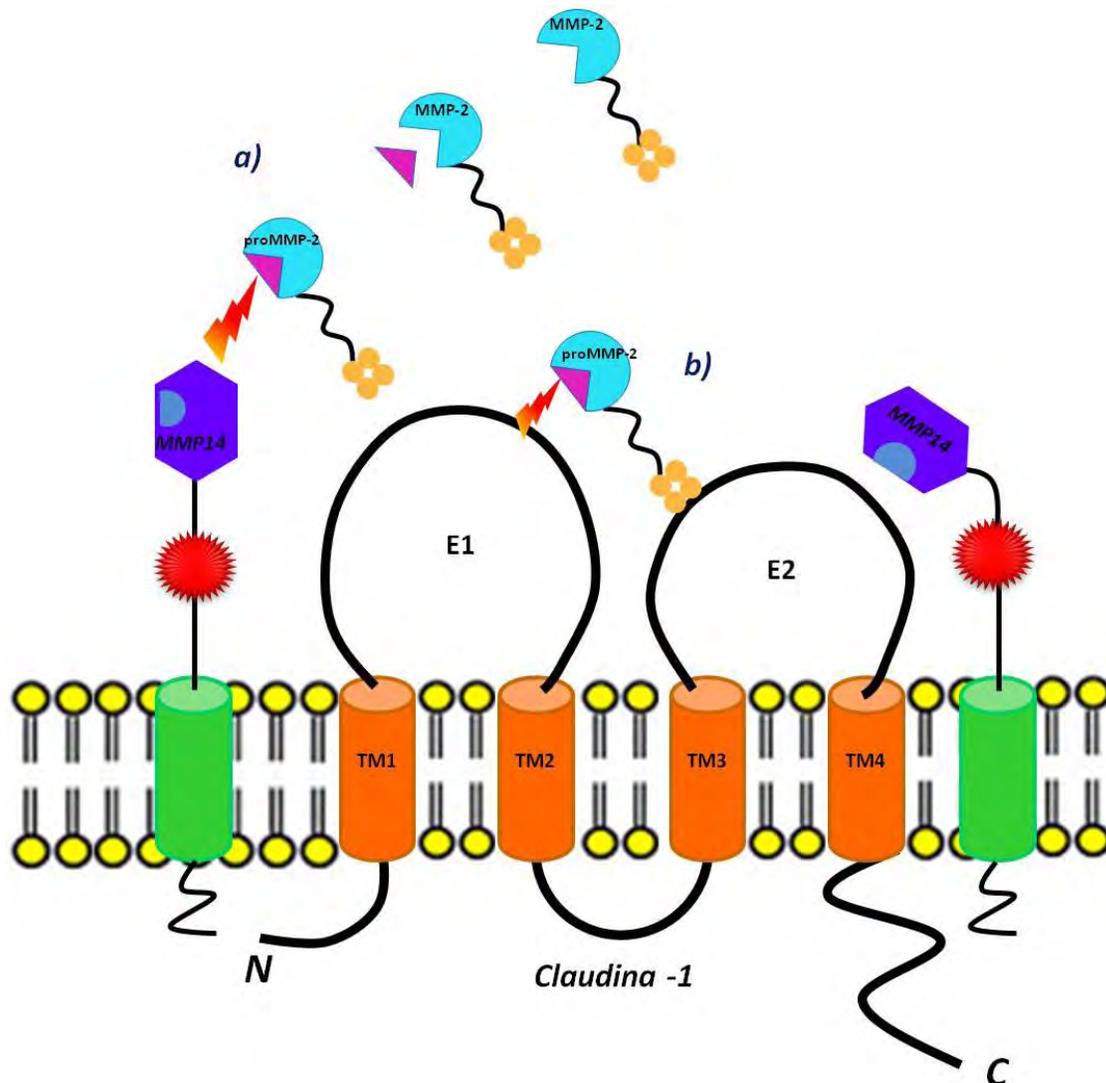
## **8. CONCLUSIONES**

En conjunto, los datos obtenidos en esta tesis demostraron que claudina-1 regula la activación de MMP-2 así como la invasividad y migración de las células AGS (adenocarcinoma gástrico humano) que sobreexpresan a claudina-6, dado que la expresión de claudina-1 endógena incrementó y se observó principalmente a nivel de membrana celular, además ésta claudina co-precipitó con MMP-2 y MMP-14 y co-localizó con MMP-2. Por otro lado, la expresión de MMP-2 así como de MMP-14 se vio incrementada a nivel de citosol y membrana celular, respectivamente. Así mismo, el silenciamiento de claudina-1 disminuyó la actividad de MMP-2 e inhibió la migración y la invasividad celular. Finalmente, la inhibición de las vías de PKC y p38 MAPK disminuyeron la expresión de claudina-1 y de MMP-2, respectivamente. La importancia de claudina-1 en la regulación de procesos invasivos en células de cáncer gástrico abre nuevas opciones para desarrollar nuevas terapias anticáncer, como generar biomarcadores que puedan ser utilizados para pronóstico, diagnóstico o como herramienta de detección temprana.

En la siguiente imagen se presenta el modelo propuesto para explicar cómo se lleva a cabo la activación de MMP-2 a través de claudina-1 mediado por claudina-6 de acuerdo a los resultados de este trabajo.



**Figura 24. Efecto de la sobreexpresión de claudina-6 en células AGS.** La sobreexpresión de claudina-6 induce el aumento de la expresión endógena de claudina-1 en la membrana celular, esta a su vez promueve un incremento en la expresión de MMP-2 y MMP-14 en el citosol y en la membrana respectivamente, ambas metaloproteasas co-inmunoprecipitan con claudina-1 y finalmente se induce un incremento en la actividad de MMP-2 así como en la migración e invasividad de las células AGS. El silenciamiento de claudina-1 disminuye la actividad de MMP-2 e inhibe la migración e invasividad de estas células.



**Figura 25. Modelo propuesto para la activación de MMP-2 a través de claudina-1 en células AGS que sobreexpresan a claudina-6.** a) Claudina -1 se une a través del dominio extracelular 2 al sitio activo de MMP-14, pro-MMP -2 es reclutada del espacio extracelular y se une vía su dominio c-terminal al dominio extracelular 1 de claudina -1, una molécula de MMP-14 libre que se encuentra en cercanía puede cortar el propéptido de pro-MMP-2 liberando la enzima activa al espacio extracelular. b) Claudina-1 se une a través del dominio extracelular 2 al sitio activo de MMP-14, proMMP-2 es reclutada del espacio extracelular y se une al dominio extracelular 1 de claudina-1, proMMP-2 puede ser activada mediante el dominio extracelular 2 de claudina-1 liberándola al espacio extracelular.

## **9. PERSPECTIVAS**

- \* Determinar si existe interacción directa entre claudina-1 y MMP-2 o MMP14.
- \* Determinar si esta interacción es a través de los sitios obtenidos por el análisis bioinformático de claudina-1.
- \* Analizar si estos sitios tienen actividad biológica y si son los que llevan a cabo la activación de MMP-2.
- \* Analizar los niveles de TIMP-2 en el medio extracelular.
- \* Analizar otras moléculas de las vías de señalización PKC y p38 MAPK tanto río arriba como río abajo.

## 10. LITERATURA CITADA

1. Findley MK, Koval M. 2009. Regulation and Roles for Claudin-family Tight Junction Proteins. *IUBMB Life*, 61: 431–437.
2. Dorothee Günzel and Alan S. L. Yu. 2013. Claudins and the modulation of tight Junction permeability. *Physiol Rev* 93: 525–569.
3. Tsukita, S., Furuse, M., Itoh, M. 2001. Multifunctional Strands in Tight Junction. *Nat Rev. / Mol Cell Biol.* 2:285-293.
4. Anderson, J. M. 2001. Molecular structure of Tight Junctions and their role in epithelial transport. *New Physiol. Sci.* 15: 126-130.
5. Itoh M, Bissell MJ. 2003. The Organization of Tight Junctions in Epithelia: Implications for Mammary Gland Biology and Breast Tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4:449-462.
6. Margolis, B., Shin, K., and Fogg, V. C., 2006. Tight Junctions and cell Polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22:207-35.
7. Mitic, L.L., Van Itallie, C. M. Anderson, J. M. 2000. Molecular Physiology and Pathophysiology of tight junctions. *J. Physiol. Liver.* 279: G250-G254.
8. Schneeberger, E. E., Lynch, R. D. 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *J. Cell Physiol.* 286: C1213-C 1228.
9. Furuse, M. 2010. Molecular Basis of the Core Structure of Tight Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a002907.
10. Franke, W. W. 2009. Discovering the Molecular Components of Intercellular Junctions, A Historical View. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1:a003061.
11. Van Itallie CM, Mitic LL, Anderson JM. 2011. Claudin-2 forms homodimers and is a component of a high molecular weight protein complex. *J Biol Chem* 286: 3442–3450.
12. Koval M. 2013. Claudin Heterogeneity and Control of Lung Tight Junctions. *Annu. Rev. Physiol.* 75:551–67.
13. Blasig IE, Winkler L, Lassowski B, Mueller S.L, Zuleger N, Krause E, Krause G, Gast K, Kolbe M, Piontek J. 2006. On the self-association potential of transmembrane tight junction proteins. *Cell Mol Life Sci* 63: 505–514.
14. Piehl C, Piontek J, Cording J, Wolburg H, Blasig IE. 2010. Participation of the second extracellular loop of claudin-5 in paracellular tightening against ions, small and large molecules. *Cell Mol Life Sci* 67: 2131–2140.
15. Krause G, Protze J, Piontek J. 2015. Assembly and function of claudins: Structure-function relationships based on homology models and crystal structures. *Semin Cell Dev Biol.* 42:3-12.
16. Carola Förster. 2008. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol.* 130:55-70.
17. Daugherty, B. L., Ward, C., Smith, T., Ritzenthaler, J. D., and Koval, M. 2007. Regulation of heterotypic claudin compatibility. *J. Biol. Chem.* 282: 30005–30013.
18. Coyne, C. B., Gambling, T. M., Boucher, R. C., Carson, J. L., and Johnson, L. G. 2003. Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 285: L1166–L1178.
19. Van Itallie C. M. and Anderson J. M. 2013. Claudin interactions in and out of the tight junction. *Tissue Barriers* 1:3, e25247.
20. Piontek J, Winkler L, Wolburg H, Müller SL, Zuleger N, Piehl C, Wiesner B, Krause G, Blasig IE. 2008. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J.* Jan;22:146-58.
21. Madhu Lal-Nag and Patrice J Morin 2009. The claudins. *Genome Biology*, 10:235.

22. Aijaz S, Balda MS, Matter K. 2006. Tight junctions: molecular architecture and function. *Int Rev Cytol* 248: 261–298.
23. Guillemot L, Paschoud S, Pulimeno P, Foglia A, Citi S. 2008. The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center. *Biochim Biophys Acta* 1778: 601–613.
24. Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., and Furuse, M. 2006. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 126: 741–754.
25. Poliak, S., Mattis, S., Ullmer, C., Scherer, S. S., and Peles, E. 2002. Distinct claudins and associated PDZ proteins form different autotypic tight junctions in myelinating Schwann cells. *J. Cell Biol.* 159: 361–372.
26. Zihni, C., Mills C., Matter K. and Balda M. S. 2016. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 17:564-80.
27. Kausalya P.J, Amasheh S, Günzel D, Wurps H, Muller D, Fromm M, Hunziker W. 2006. Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg<sup>2+</sup> transport function of Claudin-16. *J Clin Invest* 116: 878–891.
28. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M. 2009. External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J Exp Med* 206: 2937–2946.
29. Ding L, Lu Z, Foreman O, Tatum R, Lu Q, Renegar R, Cao J, Chen YH. 2012. Inflammation and disruption of the mucosal architecture in claudin-7-deficient mice. *Gastroenterology* 142: 305–315.
30. Harris HJ, Davis C, Mullins JG, Hu K, Goodall M, Farquhar MJ, Mee CJ, McCaffrey K, Young S, Drummer H, Balfe P, McKeating JA. 2010. Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J Biol Chem* 285: 21092–21102.
31. Kuhn S, Koch M, Nubel T, Ladwein M, Antolovic D, Klingbeil P, Hildebrand D, Moldenhauer G, Langbein L, Franke WW, Weitz J, Zoller M. 2007. A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. *Mol Cancer Res* 5: 553–567.
32. Linares GR, Brommage R, Powell DR, Xing W, Chen ST, Alshbool FZ, Lau KW, Wergedal JE, Mohan S. 2012. Claudin 18 is a novel negative regulator of bone resorption and osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res.*
33. French AD, Fiori JL, Camilli TC, Leotlela PD, O’Connell MP, Frank BP, Subaran S, Indig FE, Taub DD, Weeraratna AT. 2009. PKC and PKA phosphorylation affect the subcellular localization of claudin-1 in melanoma cells. *Int J Med Sci* 6: 93–101.
34. P. Dhawan, A. B. Singh, N. G. Deane et al. 2005. “Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 115: 1765–1776.
35. Sugreev Verma, Kousik Kesh, Nilanjan Ganguly, Sayantan Jana, Snehasikta Swarnakar. 2014. Matrix metalloproteinases and gastrointestinal cancers: Impacts of dietary antioxidants. *World Journal Biological Chemistry.* 5: 355-376.
36. Yves Dittmar, Utz Settmacher. 2015. Individualized treatment of gastric cancer: Impact of molecular biology and pathohistological features. *World Journal Gastrointestinal Oncology.* 7: 292-302.
37. Omid Iravani, Benjamin Wei-Rong Tay, Pei-Jou Chua, George Wai-Cheong Yip and Boon-Huat Bay. 2013. Claudins and gastric carcinogenesis. *Experimental Biology and Medicine*, 238: 344.
38. Tadayuki Oshima, Hiroto Miwa. 2016. Gastrointestinal mucosal barrier function and diseases. *J Gastroenterol* 51:768–778.
39. Tadayuki Oshima\*, Jing Shan, Takuya Okugawa, Xin Chen, Kazutoshi Hori, Toshihiko

- Tomita, Hirokazu Fukui, Jiro Watari, Hiroto Miwa. 2013. Down-Regulation of Claudin-18 Is Associated with the Proliferative and Invasive Potential of Gastric Cancer at the Invasive Front. . PLoS ONE 8: e74757.
40. Ouban A, Ahmed AA. 2010 Claudins in human cancer: a review. *Histopathol*2010;25:83–90.
  41. Matsuda Y, Semba S, Ueda J, Fuku T, Hasuo T, Chiba H, Sawada N, Kuroda Y, Yokozaki H. 2007. Gastric and intestinal claudin expression at the invasive front of gastric carcinoma. *Cancer Sci*; 98:1014–9.
  42. Ohtani S, Terashima M, Satoh J, Soeta N, Saze Z, Kashimura S, Ohsuka F, Hoshino Y, Kogure M, Gotoh M. 2009. Expression of tight-junction-associated proteins in human gastric cancer: downregulation of claudin-4 correlates with tumor aggressiveness and survival. *Gastric Cancer*;12:43–51.
  43. Jung H, Jun KH, Jung JH, Chin HM, Park WB. 2011. The expression of claudin-1, claudin-2, claudin-3, and claudin-4 in gastric cancer tissue. *J Surg Res* 167:e185–91 28.
  44. Morin, P.J. 2005. Claudin proteins in human cancer: Promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res*, 65, 9603–9606.
  45. Singh, A.B.; Sharma, A.; Dhawan, P. 2010 Claudin family of proteins and cancer: An overview. *J. Oncol.*, 2010, 541957.
  46. Silvera A. L, Barrios, C. de Z. 2002. La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. *Salud Uninorte. Barranquilla*, 16: 9-18.
  47. Gordon T Brown and Graeme I Murray. 2015. Current mechanistic insights into the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *Journal of Pathology*; 237:273–281.
  48. Álvaro N. T., Noguera-Salvá R, Fariñas G. F. 2009. La matriz extracelular: morfología, función y biotensegridad. *Rev Esp Patol.* 42, 4: 249-261.
  49. Soo-Hyun K., Turnbull J., and Guimond s. 2011. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *Journal of Endocrinology* 209, 139–151.
  50. Tracey M. A., Wen J. G. 2008. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1788: 872-891.
  51. Alexander J.S., and Elrod J. W. 2002. Extracellular matrix, junctional integrity and matrix metalloproteinase interactions in endothelial permeability regulation. *J. Anat.* 200, pp561–574.
  52. Cadiñanos J, López-Otín C, Freije JM. 2009. Invasión tumoral y metástasis. *Artículo de Revision*: 37-64.
  53. M. Guarino. 2007. Epithelial–mesenchymal transition and tumour invasion. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 2153–2160.
  54. Giepmans N. G. Ben, Sven C.D. van I Jzendoorns. 2008. Epithelial cell–cell junctions and plasma membrane domains . *Biochimica et Biophysica Acta.* No. of pages: 12; 4C: 2, 3.
  55. Simpson, L. C., Green, J. K. 2007. Desmosomes: New Perspectives on a classic. *J. Invest. Derm.* 127:2499-2515.
  56. Margolis, B., Shin, K., and Fogg, V. C., 2006. Tight Junctions and cell Polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22:207-35.
  57. Visse R., Nagase H. 2009. Matrix metalloproteases and tissue inhibitors of metalloproteases, structure, function and biochemistry. *Circ Res.*92: 827-839.
  58. Nigase H., Visse R., Murphy G. 2006. Structure and function of matrix metalloproteases and TIMPs. *Cardiovascular Research.* 69: 562-573.
  59. Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z. 2010. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 141: 52-65.

60. Swarnakar S., Paul S., Pradeepkumar S.L. and Reiter R.J. 2011. Matrix metalloproteinases in health and disease: regulation by melatonin. *J. Pineal Res.*; 50:8–20.
61. Lafleur M. A., M. M. Handsley, D. R. Edwards. 2003. Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis. *Exp Rev in Mol Med.* 5: 1-39.
62. Wang Z, Juttermann R, Soloway PD. 2000. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *J Biol Chem* 275:26411–26415.
63. Jo Y, Yeon J, Kim HJ, Lee ST. 2000. Analysis of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 effect on pro-matrix metalloproteinase-2 activation by membrane-type 1 matrix metalloproteinase using baculovirus/ insect-cell expression system. *Biochem J.* 345:511–519.
64. Mattu TS, Royle L, Langridge J, Wormald MR, Van den Steen PE, Van Damme J, Opdenakker G, Harvey DJ, Dwek RA, Rudd PM. 2000. O-glycan analysis of natural human neutrophil gelatinase B using a combination of normal phase-HPLC and online tandem mass spectrometry: implications for the domain organization of the enzyme *Biochemistry.* 26;39:15695-704.
65. Chakrabarti S, Patel KD. 2005. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res* 31:599–621.
66. Cadiñanos J, López-Otín C, Freije JM. 2009. Invasión tumoral y metástasis. *Artículo de Revision:* 37-64.
67. T. Bogenrieder and M. Herlyn, 2003. “Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis,” *Oncogene*, vol. 22, no. 43, pp. 6524–6536.
68. Y.C. Ip, S.T. Cheung, Y.T. Lee, J.C. Ho, S.T. Fan, 2007. Inhibition of hepatocellular carcinoma invasion by suppression of claudin-10 in HLE cells, *Mol. Cancer Ther.* 6: 2858–2867.
69. M. Osanai, M. Murata, H. Chiba, T. Kojima, N. Sawada. 2008. Epigenetic silencing of claudin-6 promotes anchorage-independent growth of breast carcinoma cells, *Cancer Sci.* 98: 1557–1562.
70. T.A. Martin, G.M. Harrison, G. Watkins, W.G. Jiang. 2008. Claudin-16 reduces the aggressive behavior of human breast cancer cells, *J. Cell. Biochem.* 105: 41–52.
71. Dhawan P., et al. 2005. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J. Clin. Invest.* 115:1765-76.
72. Agarwal R., D` Souza, Morin J. P. 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.
73. Lee L. Y., Wu C.M., Wang C.C., Yu J.S., Liang Y., Huang K.H., Lo C. H., Hwang T. L. 2008. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in gastric cancer and their relation to claudin-4 expression. *Histol Histopathol.* 23: 515-21.
74. Takehara M., Nishimura T., Mima S., Hoshino T., Mizushima T. 2009. Effect of claudin expression on paracellular permeability, migration and invasion of colonic cancer cells. *Biol Pharm. Buil.* 32: 825-831.
75. Miyamori, H., Takino T., Kobayashi Y., Tokai H., Ithon Y., Seik M., Sato H. 2001. Claudin promotes activation of pro-matrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-type matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 276: 28204-28211.
76. Ip Chi Y., Cheung S. T., Lee Y. T., Ho J. C., Tat fan S. 2007. Inhibition of hepatocellular carcinoma invasion by suppression of claudin-10 in HLE cells. *Mol Cancer Ther.* 6: 2858-2867.
77. ku N., Sasabe E., Ueta E., Yamamoto T., Osaki T. 2006. Tight junction protein claudin-1 enhances the invasive activity of oral squamous cell carcinoma cells by promoting

- cleavage on laminin-5  $\gamma$ 2 chain via metalloprotease MMP-2 and membrane- type MMP-1. *Cancer Research*. 66: 5251-5257.
78. Chang-Hwan Yoon et al. 2009. Claudin-1 Acts through c-Abl-Protein Kinase C (PKC) Signaling and Has a Causal Role in the Acquisition of Invasive Capacity in Human Liver Cells. *The journal of biological chemistry* vol. 285: 226–233.
  79. Leotlela PD., Wade MS., Duray PH., Rhode MJ., Brown HF., Rosenthal DT., Dissanayake SK., Earley R., Indig FE., Nickoloff BJ., Taub DD., Kallioniemi OP., Meltzer P., Morin PJ., and Weeraratna AT. 2007. Claudin-1 overexpression in melanoma is regulated by PKC and contributes to melanoma cell motility. *Oncogene*., 26, 3846–3856.
  80. Yao J, Xiong S, Klos K, Nguyen N, Grijalva R, Li P, Yu D. Multiple signaling pathways involved in activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by heregulin-beta1 in human breast cancer cells. *Oncogene* 20:8066-74.
  81. Rendón-Huerta Erika, Fortoul Teresa, Gorráez María Teresa, García-Samper Xochitl, Alvarez-Fernández Georgina, Zavala-Zendejas Veronica, Montañó Luis Felipe. 2010. Distribution and expression pattern of claudin 6, 7 and 9 in diffuse- and intestinal-type gastric adenocarcinomas. *J Gastrointest Cancer*. 41:52-9.
  82. Zavala-Zendejas VE, Torres-Martínes AC, Salas-Morales B, Fortoul T, Montañó LF, Rendón-Huerta E.P. 2011. Claudin-6, -7 or -9 overexpression in the human gastric adenocarcinoma cell line AGS increase its invasiveness, migration and proliferation rate. *Cancer Investigation*, 29:1-11.
  83. Balda MS, Matter K. 2014. SnapShot: Epithelial Tight Junctions. *Cell* 157 ©2014 Elsevier Inc.
  84. Hou J. 2013. A connected tale of claudins from the renal duct to the sensory system. *Tissue Barriers*. Landes Bioscience. 1:3, e24968;
  85. Backert S., Boehm M., Wessler S. and Tegtmeyer N. 2013. Transmigration route of *Campylobacter jejuni* across polarized intestinal epithelial cells: paracellular, transcellular or both? *Cell Communication and Signaling*, 11:72
  86. Cooper, G.M. (2000). Cell walls and the extracellular matrix (Paredes celulares y matriz extracelular). En *The cell: a molecular approach* (2nd ed.). Sunderland, MA: Sinauer Associates.
  87. Mannello F., Medda V. Nuclear localization of Matrix metalloproteinases. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 47:27–58.
  88. Itoh Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol*. *Matrix Biol* 44-46:207-23.
  89. Günzel D. and Yu A. S. L. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev* 93: 525–569.
  90. Amar B. Singh, Srijayaprakash B. Uppada, Punita Dhawan. 2017. Claudin proteins, outside-in signaling, and carcinogénesis. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 469:69–75.
  91. Makoto Osanai, Akira Takasawa, Masaki Murata, Norimasa Sawada. 2017. Claudins in cancer: bench to bedside. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*.
  92. Amar B. Singh, Punita Dhawan. 2015. Claudins and cancer: Fall of the soldiers entrusted to protect the gate and keep the barrier intact. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 42: 58–65.
  93. Mathias Felix Leber and Thomas Efferth. 2009. Molecular principles of cancer invasion and metastasis (Review). *International Journal of Oncology* 34: 881-895.
  94. H. Hua, M. Li, T. Luo, Y. Yin, Y. Jiang. 2011. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm, *Cell Mol. Life Sci*. 68: 3853–3868.
  95. O. Mendes, H.T. Kim, G. Lungu, G. Stoica. 2007. MMP2 role in breast cancer brain

- metastasis development and its regulation by TIMP2 and ERK1/2, *Clin. Exp. Metastas.* 24: 341–351.
96. K. Kessenbrock, C.Y. Wang, Z. Werb, 2015. Matrix metalloproteinases in stem cell regulation and cancer, *Matrix Biol.* 44–46:184–190.
  97. K.Yamamoto, G. Murphy. L. Troeberg. 2015. Extracellular regulation of metalloproteinases, *Matrix Biol.* 44–46: 255–263.
  98. S.H. Hong, G.Y. Kim, Y.C. Chang, S.K. Moon, W.J. Kim, Y.H. Choi. 2013. Bufalin prevents the migration and invasion of T24 bladder carcinoma cells through the inactivation of matrix metalloproteinases and modulation of tight junctions, *Int. J. Oncol.* 42:277–286.
  99. Kwon M. J. 2013. Emerging Roles of Claudins in Human Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 18148-18180.
  100. 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.
  101. 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.
  102. 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.
  103. Shiozaki A. et. al. 2014. Claudin 1 mediates tumor necrosis factor alpha-induced cell migration in human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2014 21; 20: 17863-17876.
  104. Sappayatosok K. 2015. Overexpression of Claudin-1 is Associated with Advanced Clinical Stage and Invasive Pathologic Characteristics of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Head and Neck Pathol* 9:173–180.
  105. Y.N. Yang, F. Wang, W. Zhou, Z.Q. Wu, Y.Q. Xing. 2012. TNF-alpha stimulates MMP-2 and MMP-9 activities in human corneal epithelial cells via the activation of FAK/ERK signaling, *Ophthalmic Res.* 48:165–170.
  106. M.M. Akhavan, M. Karimi, M. Ghodrati, H. Falahtpishe. 2011. AT1 receptors activation enhances the expression of MMP-2, MMP-13 and VEGF but not MMP-9 in B16F10 melanoma cells, *Pak. J. Biol. Sci.* 14: 821–830.
  107. D.K. Lund, V. Mouly, D.D. Cornelison. 2014. MMP-14 is necessary but not sufficient for invasion of three-dimensional collagen by human muscle satellite cells, *Am. J. Cell Physiol.* 307: C140–C149.
  108. J. Zhao, Z. Kong, F. Xu, W. Shen. 2015. A role of MMP-14 in the regulation of invasiveness of nasopharyngeal carcinoma, *Tumour Biol.* 36: 8609–8615.
  109. R. Albrechtsen, M. Kveiborg, D. Stautz, J. Vikesa, J.B. Noer, A. Kotzsh, et al. 2013. ADAM12 redistributes and activates MMP-14, resulting in gelatin degradation, reduced apoptosis and increased tumor growth, *J. Cell Sci.* 126: 4707–4720.
  110. T. Yan, Z. Lin, J. Jiang, S. Lu, M. Chen, H. Que, et al. 2015. MMP14 regulates cell migration and invasion through epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma, *Am. J. Transl. Res.* 7: 950–958.
  111. T. Li, J. Xie, C. Shen, D. Cheng, Y. Shi, Z. Wu, et al., miR-150-5p inhibits hepatoma cell migration and invasion by targeting MMP14, *PLoS One* 9: e115577.
  112. 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.
  113. Y.F. Liao, Y.M. Tzeng, H.C. Hung, G.Y. Liu. 2015. Dibenzoylmethane,

- hydroxydiben-zoylmethane and hydroxymethylidibenzoylmethane inhibit phorbol-12-myristate 13-acetate-induced breast carcinoma cell invasion, *Mol. Med. Rep.* 11: 4597–4604.
114. Leotlela, P. D., Wade, M. S., Duray, P. H., Rhode, M. J., Brown, H. F., Rosenthal, D. T., Dissanayake, S. K., Earley, R., Indig, F. E., Nickoloff, B. J., Taub, D. D., Kallioniemi, O. P., Meltzer, P., Morin, P. J., and Weeraratna, A. T. 2007. Claudin-1 overexpression in melanoma is regulated by PKC and contributes to melanoma cell motility. *Oncogene.* 26, 3846–3856.
115. Suh Y, Yoon CH, Kim RK, et al. 2013. Claudin-1 induces epithelial-mesenchymal transition through activation of the c-Abl–ERK signaling pathway in human liver cells. *Oncogene*; 32:4873–82.
116. Hua Liu, Xuan-fu Xu, Yan Zhao, Mao-Chun tang, Ying-Gun Zhou and Feng-Hou gao. 2016. NS-398 promotes pancreatic cancer cell invasion by CD147 and MMP-2 via the activation of P38. *Molecular Medicine Reports* 13: 2208-2214.

## **11. ANEXO I Artículo requisito**

La alumna Ana Cristina Torres Martínez presentó el siguiente artículo como requisito para obtener el grado de Doctora en Ciencias, en el programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM.

1. Torres-Martínez A.C., Gallardo-Vera J.F., Lara-Holguin A.N., Montaña L.F., Rendón-Huerta E.P. **2016**. Claudin-6 enhances cell invasiveness through claudin-1 in AGS human adenocarcinoma gastric cancer cells. *Experimental Cell Research*, 350: 226-235.



# Claudin-6 enhances cell invasiveness through claudin-1 in AGS human adenocarcinoma gastric cancer cells



A.C. Torres-Martínez, J.F. Gallardo-Vera, A.N. Lara-Holguin, L.F. Montaña, E.P. Rendón-Huerta\*

Laboratorio de Inmunobiología, Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM, Circuito Interior s/n, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, Mexico

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Claudin  
MMP-2  
Cldn-6  
Cldn-1  
MMP-14

## ABSTRACT

Claudins participate in tissue barrier function. The loss of this barrier is associated to metalloproteases-related extracellular matrix and basal membranes degradation. Claudin-1 is a pro-MMP-2 activator and claudin-6 transfected AGS (AGS-Cld6) cells are highly invasive. Our aim was to determine if claudin-6 was direct or indirectly associated with MMP-2 activation and cell invasiveness. Cytofluorometry, cell fractioning, immunoprecipitation, gelatin-zymography, cell migration and invasiveness assays were performed, claudin-2, -6, -7 and -9 transfected AGS cells, anti-MMP-2, -9 and -14, anti-claudins specific antibodies and claudin-1 small interfering RNA were used. The results showed a significant ( $p < 0.001$ ) overexpression of claudin-1 in AGS-Cld6 cell membranes. A strong MMP-2 activity was identified in culture supernatants of AGS-Cld6. Claudin-1 co-localized with MMP-2 and MMP-14; interestingly a significant increase in cell membrane and cytosol MMP-14 expression was detected in AGS-Cld6 cells ( $p < 0.05$ ). Silencing of claudin-1 in AGS-Cld6 cells showed a 60% MMP-2 activity decrease in culture supernatants and a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in cell migration and invasiveness. Our results suggest that claudin-6 induces MMP-2 activation through claudin-1 membrane expression, which in turn promotes cell migration and invasiveness.

## 1. Introduction

Epithelial barrier function requires normal expression of tight junction (TJ) proteins; when the TJ structure loses cohesion transformed cells can be invasive [1]. Claudins are a family of TJ proteins which participate in tissue barrier development [2]. Gastric adenocarcinoma, the second most common cause of death by cancer [3], exhibits changes in claudin expression during its progression to metastatic adenocarcinoma; altered expression of claudin-4, -6, -7 and -9 in human gastric cancer cells has been associated with higher cancer invasiveness [4,5] and poor survival rates [6]. Likewise, it has been clearly established that cancer cell invasion is subordinated to extracellular matrix and basal membrane degradation by matrix metalloproteinase (MMP) 2 and 9 [7,8]. Therefore the regulation of MMP activity is crucial to understand the cancer cells invasive mechanisms. There is ample evidence suggesting that claudins regulate MMPs activity [9,10]. Previous results in claudin-6 transfected AGS cells revealed that endogenous induction of claudin-1 expression [5] enhances activation of pro-MMP2 in human embryonic kidney cells [11].

The aim of this work was to determine if MMP2 activation detected

in the culture supernatants of claudin-6 transfected AGS cells, was induced by claudin-1 expression or if the latter serves as a mediator for an alternative molecule activator. Our results showed that the expression of claudin-1 correlates with a) the activation of the sheddase MMP14 in the cell membrane, b) the activation of MMP2, on AGS transfected cells, and c) an enhanced cellular invasiveness.

## 2. Material and methods

### 2.1. Reagents

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, sodium pyruvate, insulin, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS), streptomycin-penicillin, bovine albumin, mouse monoclonal anti-claudin-1 (1:100–1:1000) (#cat. 374900) and anti-MMP-2 (1:1000, #cat. 35-1300Z), polyclonal rabbit anti-claudin-2 (1:200, #cat. 516100), anti claudin-3 (1:100, #cat. GTX15102), anti claudin-4 (1:800, #cat. GTX15104), anti claudin-5 (1:400, #cat. GTX15106), anti claudin-7 (1:100, #cat. 349100), anti claudin-10 (1:100, #cat. 388400), anti MMP-14 (1:100–1:500 #cat. GTX73117),

\* Corresponding author.

E-mail address: [erendon@matm.unam.mx](mailto:erendon@matm.unam.mx) (E.P. Rendón-Huerta).

horseradish peroxidase labeled, donkey anti-mouse IgG (1:500–1:1000, #cat. Sc2314) and goat anti-rabbit IgG (H+L) HRP (1:500–1:1000, #cat. A10547), Cy5 labeled goat anti-rabbit polyclonal (1:800, #cat. A10523), Alexa fluor 488 labeled goat anti-mouse (1:400, #cat. A11029), as well as Super Script One-Step kit were from Invitrogen (Life Technologies Corp, Carlsbad, CA, USA). Geneticin (G418) was from GIBCO. Goat, rabbit or mouse IgG HRP- conjugated antibodies were from Zymed-Life Technologies (Grand Island, NY, USA). Mouse monoclonal anti Na/K-ATPase  $\alpha$ -1 (F-2)(1:300, #cat. SC-514614), anti PKC (1:200, #cat. 624302), anti  $\beta$ -tubulin (D-10)(1:200, #cat. SC-5274) and claudin-1 siRNA made of a pool of three specific sequences (19–25 nt)(claudin-1 siRNA (h) #cat. sc-43040) and a control fluorescence-conjugated siRNA were from Santa Cruz Biotech (CA, USA). Polyclonal rabbit anti-MMP-14 was from GeneTex Inc. (Irvine, CA, USA). APC goat anti-mouse IgG1 (1:400, #cat. 406610) was from Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, USA). Anti-actin antibody was a kind gift of Dr. José Manuel Hernández, CINVESTAV-México. Tween-20, Triton X-100, phosphatase inhibitor cocktail 1 and 2, trypsin inhibitor, leupeptin, and aprotinin were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Protein assay kit was from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). Santa Super Signal West Dura Chemiluminescent Substrate was from Thermo Fisher VScientific Inc. (Waltham, MA, USA). Point final RT-PCR (Super Script One-Step) was from Invitrogen. Petri dishes and 6 and 12 well culture plates were from Corning (NY, USA).

## 2.2. Cell culture

$1 \times 10^6$  human gastric adenocarcinoma cell line AGS cells (CRL-1739, ATCC, USA) were cultured in sterile P-100 Petri dishes with DMEM supplemented with 5% FBS, 0.1 U/ml insulin, 1% streptomycin-penicillin solution, 2 mmol/L L-glutamine, and 2 mmol sodium pyruvate solution at 37 °C in a humid environment containing 5%CO<sub>2</sub>, until reaching > 90% confluence. Afterwards  $8 \times 10^5$  cells/well were seeded in 6 well Tissue Culture Plates (Biocompare, San Francisco, CA, USA) for 48 h until they reached 95% confluence, that represent  $2 \times 10^6$  cells/well. All the experiments were immediately performed with this confluent AGS cell cultures in their third passage. Claudin-2, -6 (AGS-Cld6), -7 and -9 as well as GFP transfected AGS cells [5] were cultured with DMEM supplemented as mentioned plus 400  $\mu$ g/ml of G-418. AGS cells expressing the GFP-empty vector (AGS-GFP) were used as control. Western blot analysis was performed using confluent AGS cells. All the experiments were performed with AGS cells grown from 2nd passage frozen vials maintained in liquid nitrogen. Results are expressed as the mean of three different experiments.

## 2.3. Cell fractioning and immunoblot analysis

Cell fractioning was performed as already described [6]. Briefly, cells were scrapped from the plates with cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, pH 7.6) and suspended in 1 ml of a buffer A (20 mM Tris, 0.25 M Dextrose, 10 mM EGTA and 2 mM EDTA) supplemented with 0.5% of phosphatase inhibitor cocktail 1 and 2, 1 mg/ml trypsin inhibitor, 2  $\mu$ g/ml leupeptin and 2  $\mu$ g/ml aprotinin (Sigma-Aldrich, USA). Cells were sonicated for 1 min and ultra centrifuged for 30 min at 156,553g at 4 °C before collecting the supernatant. The precipitate was suspended in 150  $\mu$ l of buffer A supplemented with protease and phosphatase inhibitors plus 1% Triton X-100, incubated for 1 h at 4 °C with gentle agitation, and ultra centrifuged for 30 min at 156,553g. The supernatant (membrane fraction) was kept at 4 °C. The precipitate was suspended in 150  $\mu$ l of lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% IGEPAL, 0.1% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS) supplemented with protease and phosphatase inhibitors, incubated for 1 h at 4 °C with gentle agitation, and ultra centrifuged for 30 min at 156,553g. The supernatant (cytoskeleton fraction) was kept at 4 °C. Protein concen-

tration was determined for each fraction using Bio-Rad's kit. To corroborate that the isolated cell fraction was clean specific fraction markers (PKC for cytosol, Na/ATPase for membrane, and  $\beta$ -tubulin for cytoskeleton) were used.

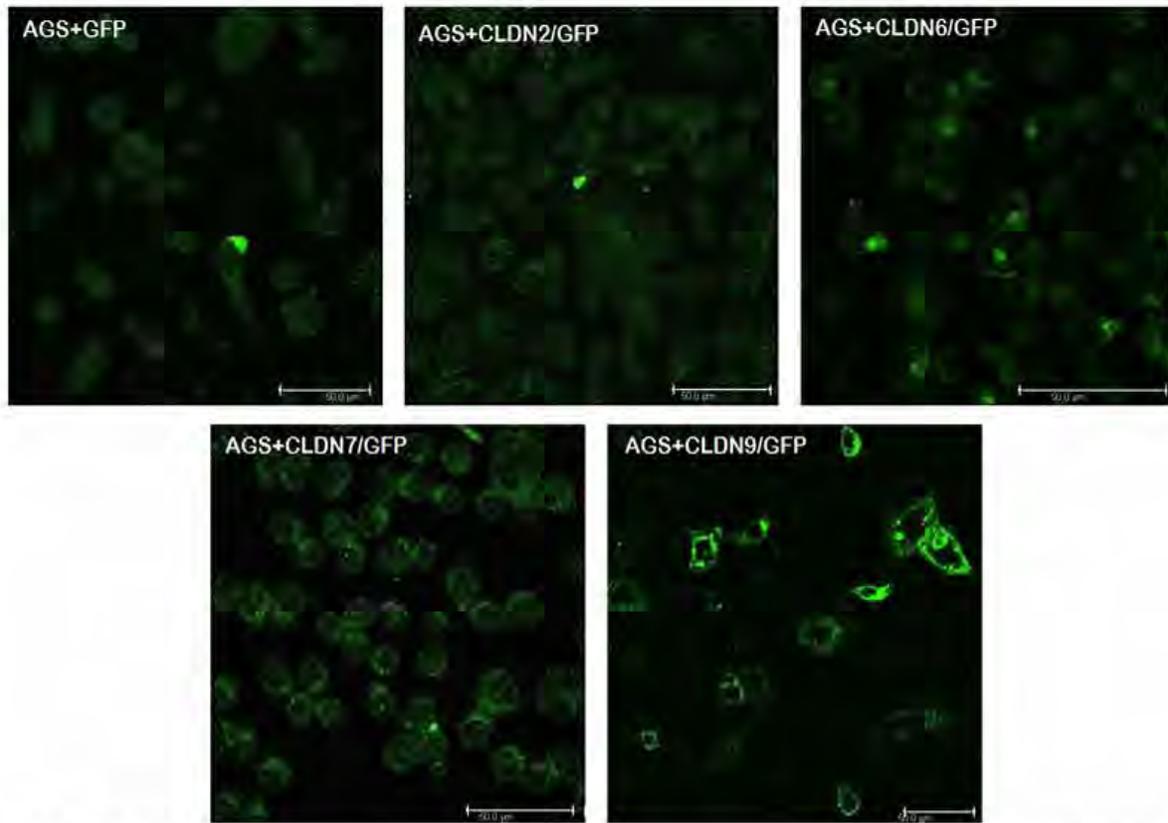
For Western blot analysis 20–50  $\mu$ g of protein was resolved on 10% or 15% SDS/PAGE and transferred to nitrocellulose membranes in a Bio-Rad semi-dry blotting system for 1 h at 120 mA. Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (TBS) for 1 h, washed twice with TBS and incubated with the relevant primary antibody diluted in Tween 20/TBS (TTBS) overnight at 4 °C (anti claudin-1 (1:500), anti-MMP-2 (1:1000), anti-MMP-9 (1:500), anti-MMP-14 (1:500), anti  $\alpha$ -actin (1:500)). Membranes were washed with TTBS, and incubated with horseradish peroxidase labeled secondary antibodies (goat anti-mouse IgG (1:2000), or goat anti-rabbit IgG (1:1000)) diluted in TBS for 1 h at room temperature. After these processes membranes were washed thrice with TTBS and once with TBS before antibody binding was detected by chemiluminescence using the Pierce kit (Supersignal West Dura Extended Duration Substrate) as substrate. Equal protein loading was confirmed in all the experiments by determining  $\beta$ -actin as loading control. All experiments were run in triplicate. The quantitative analysis of the Western blot bands was performed with images obtained from the chemiluminescence sheets using the MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging System, Jersulam, Israel) and analyzed using DNR GelQuant software that calculates the intensity of the gel band measuring the amount of pixels/sq.in. The values were determined for each band. The results are expressed as dots per point (DPP) and intensity.

## 2.4. Immunoprecipitation

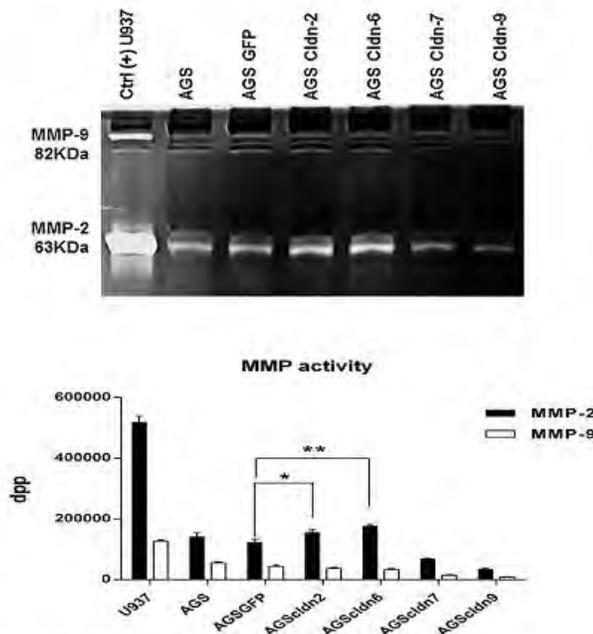
$1 \times 10^6$  AGS, Claudin-6 transfected, or AGS-GFP were seeded in culture plates with DMEM supplemented with 5% FBS, 1% streptomycin-penicillin solution, 1 mmol/L L-glutamine, insulin and sodium pyruvate solution at 37 °C in a humid environment containing 5%CO<sub>2</sub> until 90% confluence was reached. Cells were collected, washed three times in cold PBS, suspended in IP lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 1 mg/ml trypsin, 5 mg/ml leupeptin and 10  $\mu$ l/ml of phosphatase inhibitors cocktail) and centrifuged for 10 min at 13,000 rpm at 4 °C. Protein concentration was determined and adjusted to a 1 mg/ml final concentration. One mg of protein was incubated with 10  $\mu$ l of pre-immune serum and 10  $\mu$ l of Sepharose G at 4 °C for 1 h with mild agitation and centrifuged for 3 min at 9000 rpm. The supernatant was collected and incubated with 1  $\mu$ g of rabbit anti-claudin 1 antibody with mild agitation; overnight at 4 °C. Afterwards 25  $\mu$ l of Sepharose G were added and after 2 h of incubation at 4 °C the supernatant was centrifuged for 2 min at 9000 rpm. The precipitate was washed twice with 600 mM NaCl and once with 150 mM NaCl solution (both of them supplemented with 0.5% of phosphatase inhibitor cocktail 1 and 2, 1 mg/ml trypsin inhibitor, 2  $\mu$ g/ml leupeptin and 2  $\mu$ g/ml aprotinin). Finally 25  $\mu$ l of 4X Laemli buffer were added and the protein content was resolved on 15% SDS/PAGE and transferred to nitrocellulose membranes in a Bio-Rad semi-dry blotting system for 1 h at 120 mA. Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (TBS) for 1 h, washed twice with TBS and incubated with the primary anti-claudin-1, anti-MMP2 or anti-MMP-14 antibody diluted in Tween 20/TBS (TTBS) overnight at 4 °C. Membranes were washed with TTBS, and incubated with horseradish peroxidase labeled secondary antibodies diluted 1:500 in TBS for 2 h at room temperature. After these processes membranes were washed thrice with TTBS and once with TBS before antibody binding was detected by chemiluminescence using the Pierce kit (Supersignal West Dura Extended Duration Substrate) as substrate.

## 2.5. Flow cytometry

Once the AGS cells reached 90% confluence, they were washed



**Fig. 1.** Claudin-2, -6, -7 and -9 expression in AGS transfected cells. The images represent the immunofluorescence results with specific monoclonal and polyclonal antibodies (see Section 2). GFP = green fluorescence protein.



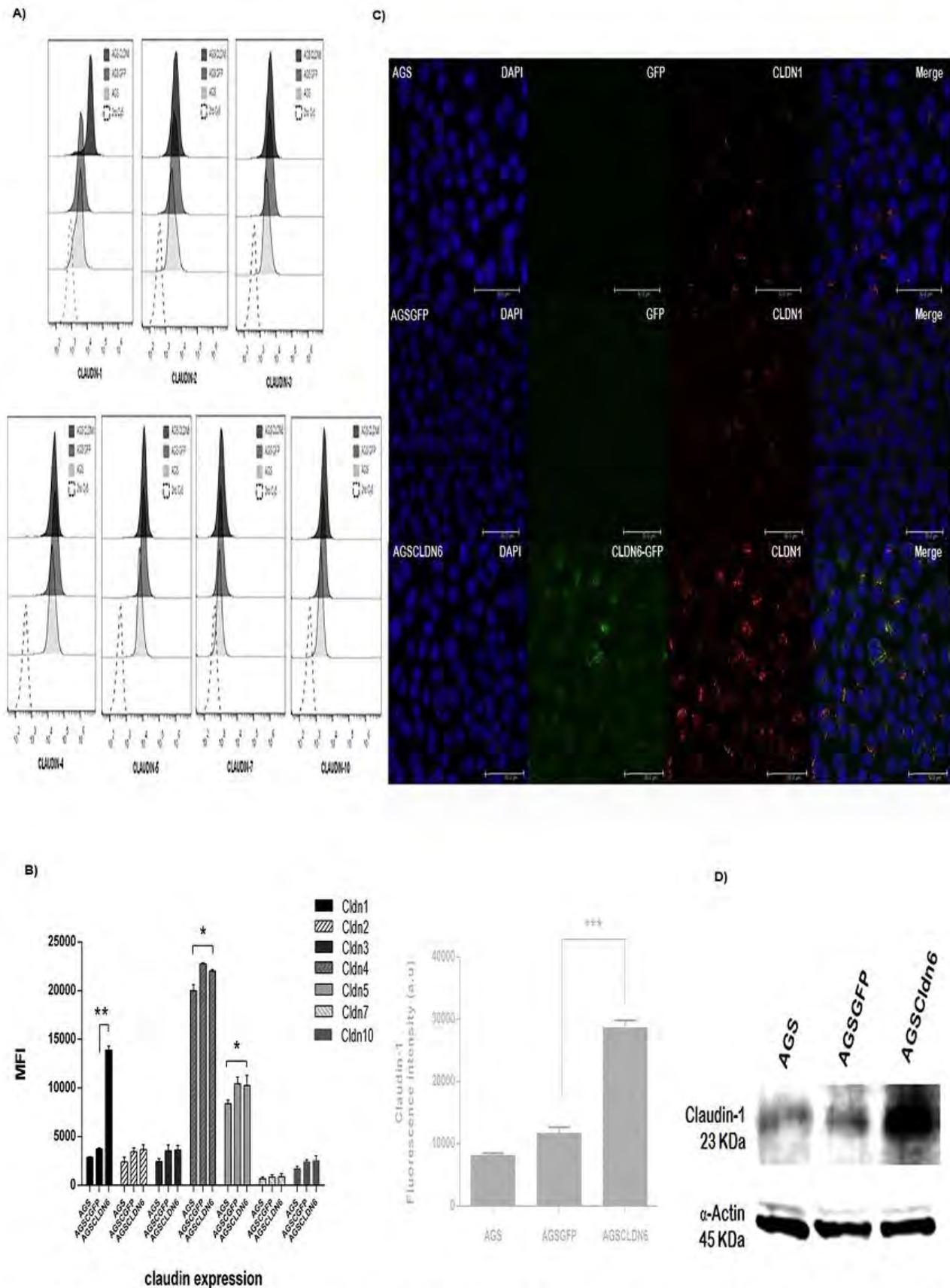
**Fig. 2.** MMP-2 and MMP-9 activity. The Zymograms were performed with 24 h non-SFB-supplemented culture supernatants of non-transfected AGS cells, AGS-GFP cells, and AGS cells transfected with claudin-2, -6, -7, -9. The histogram shows the MMP activity in dots per point (dpp) units. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ .

(5 min, 250×g) twice in FACS buffer (PBS containing 0.09% [12] sodium azide, supplemented with 1% FBS), fixed and then permeabilized with, respectively, Fix Buffer I and Perm Buffer III (BD Phosflow), according to manufacturer instructions. The cells were suspended in FACS buffer and incubated at 4 °C overnight with primary antibodies at dilutions previously determined by titration. For Claudin-1, -2, -3, -4,

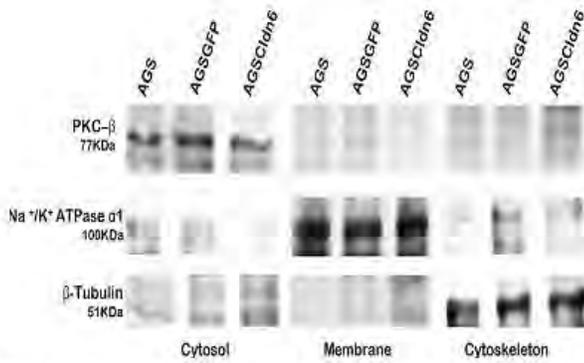
-5 -7- 10 determination, cells were first labeled with the specific primary antibody (mouse anti-claudin-1 (1:100), rabbit anti-claudin-2 (1:200), rabbit anti-claudin-3 (1:100), rabbit anti-claudin-4 (1:800), rabbit anti-claudin-5 (1:400), rabbit anti-claudin-7 (1:100) and rabbit anti-claudin-10 (1:100)). Cells were then washed twice with FACS buffer and incubated with secondary fluorochrome-conjugated antibodies (Alexa Fluor 488 goat-anti-mouse (1:400), Cy5 goat-anti-rabbit IgG (1:800) and APC anti-mouse-IgG (1:400)) for 1 h. Flow cytometry analysis was then performed using the Attune™ Acoustic Focusing Cytometer-Blue/Red. After staining, gating of the cells was performed on the basis of forward and side scatter properties followed by gating on FSC-A×FSC-H (single cell). All the cytofluorometry experiments included the proper antibody isotope control. Stained cells were collected on the FACS Calibur instrument using the Cell Quest Pro Version 6.0 software (BD Biosciences). For each sample, a minimum of 10,000 cells from the R2 region was acquired. Data was analyzed in terms of mean fluorescence intensity (MFI) values or in terms of percentage of positive cells using the FlowJO v.10.0.7r2.

### 2.6. Claudin-1 silencing

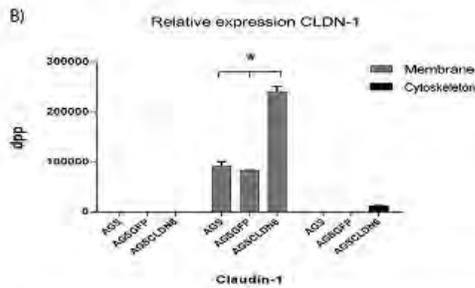
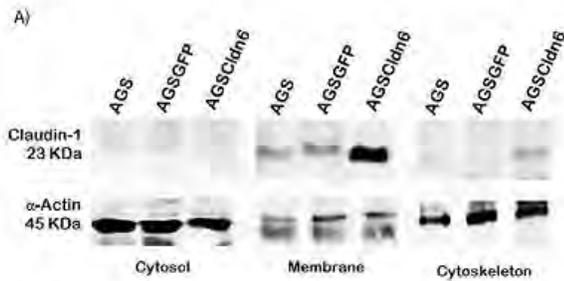
A specific claudin-1 small interfering RNA (Santa Cruz Biotechnology) was used to transfect AGS, AGS-Cld6 or AGS-GFP cells.  $3 \times 10^5$  cells were seeded in 6 well culture plates with 20% SFB supplemented antibiotic-free DMEM for 40 h at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere until an 80% confluence was reached. Cells were transfected with the claudin-1 siRNA following the manufacturer’s protocol [13] and cultured in transfection media for a 6.5 h period at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere followed by 20 h incubation in DMEM. At the end culture media was eliminated from the wells and 2 ml 1% streptomycin-penicillin solution and 10% FBS supplemented DMEM/well were added to the transfected cells and the cell cultures were incubated for 24 h at 37 °C in a humid 5% CO<sub>2</sub> atmosphere before extracting total



**Fig. 3.** Expression of claudins-1 -2, -3, -4, -5, -7, -10 in claudin-6 transfected AGS cells evaluated by flow cytometry. The expression of claudin-1 increased significantly in AGS cells overexpressing claudin-6. A) Graphs represent the mean fluorescence intensity of each claudin; data were normalized according to the number of events. Cy5 secondary antibody was used as isotype control. B) Graphic representation of the numerical data obtained. MFI = mean fluorescence intensity. C) Expression of claudin-1 in AGS-Cld-6transfected cells as determined by immunofluorescence; D) Western blot analysis and corroboration of claudin-1 expression in AGS-Cld6 transfected cells. The histogram represents mean fluorescence intensity of all the experiments. Values in the histogram represent the mean  $\pm$  standard deviation of the mean (SD). \* $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Fig. 4.** Subcellular fraction markers. Western blot analysis shows PKC-β (cytosol), ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (membrane), and β-tubulin (cytoskeleton) expression in claudin-6 transfected AGS cells.

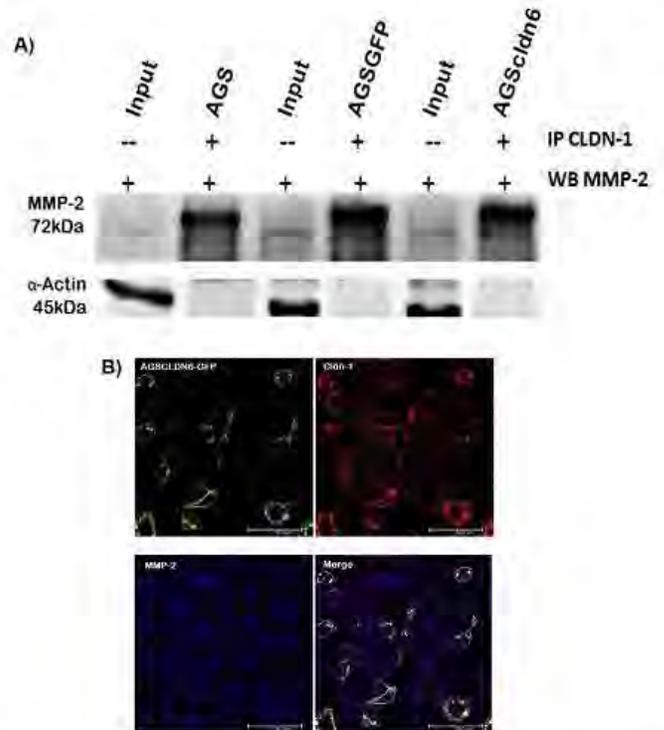


**Fig. 5.** Claudin-1 expression in subcellular fractions in claudin-6 transfected AGS cells. (A) Claudin-1 is localized in the cell membrane where an increase in expression is observed in comparison to control and non-transfected cells. We used α-actin as loading control. (B) Graphic representation of the numerical data obtained. Values are expressed as dots per point (dpp) and are represented as the mean ± standard deviation of the mean (SD). \*p < 0.01.

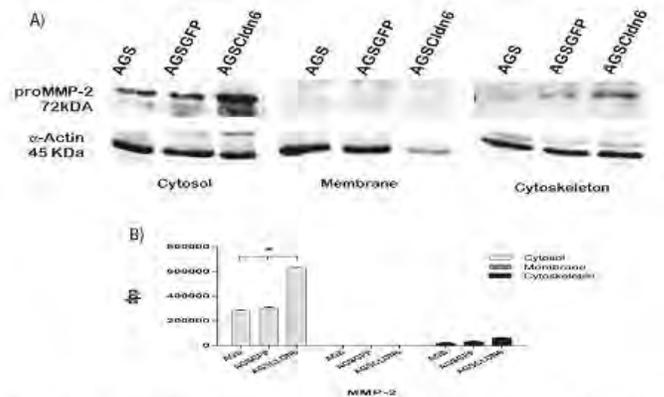
cell protein and RNA according to standard methods [5]. Some transfected cells were cultured for a further 24 h in non-FBS supplemented DMEM media in order to obtain conditioned media. A point final RT-PCR (Super Script One-Step) and Western blot analysis were performed to corroborate the silencing of claudin-1 at the mRNA and protein level, respectively. A fluorescein-conjugated siRNA was used as control. A Leica confocal microscope was used to analyze the images.

**2.7. Immunofluorescence and confocal microscopy**

3 × 10<sup>5</sup> cells claudin-6 and -9 transfected AGS were seeded in coverslips and incubated in 6 well culture plates with 20% SFB supplemented antibiotic-free DMEM for 40 h at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere until a 90% confluence was reached. Cells were washed with PBS and fixed with 2% paraformaldehyde 15 min. After extensive washing with PBS cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min and blocked with 2% IgG-free BSA in PBS/0.05% Tween-20 for 30 min. Cells were incubated overnight with anti-claudin-1 antibody (1:100 in PBS), washed with PBS/0.05% Tween 20 and incubated with rhodamine-labeled goat anti-mouse IgG (1:200) for 1 h at room temperature, washed with PBS/0.05% Tween 20, and counterstained with 20 μl of Vectashield/DAPI and mounted in glass-



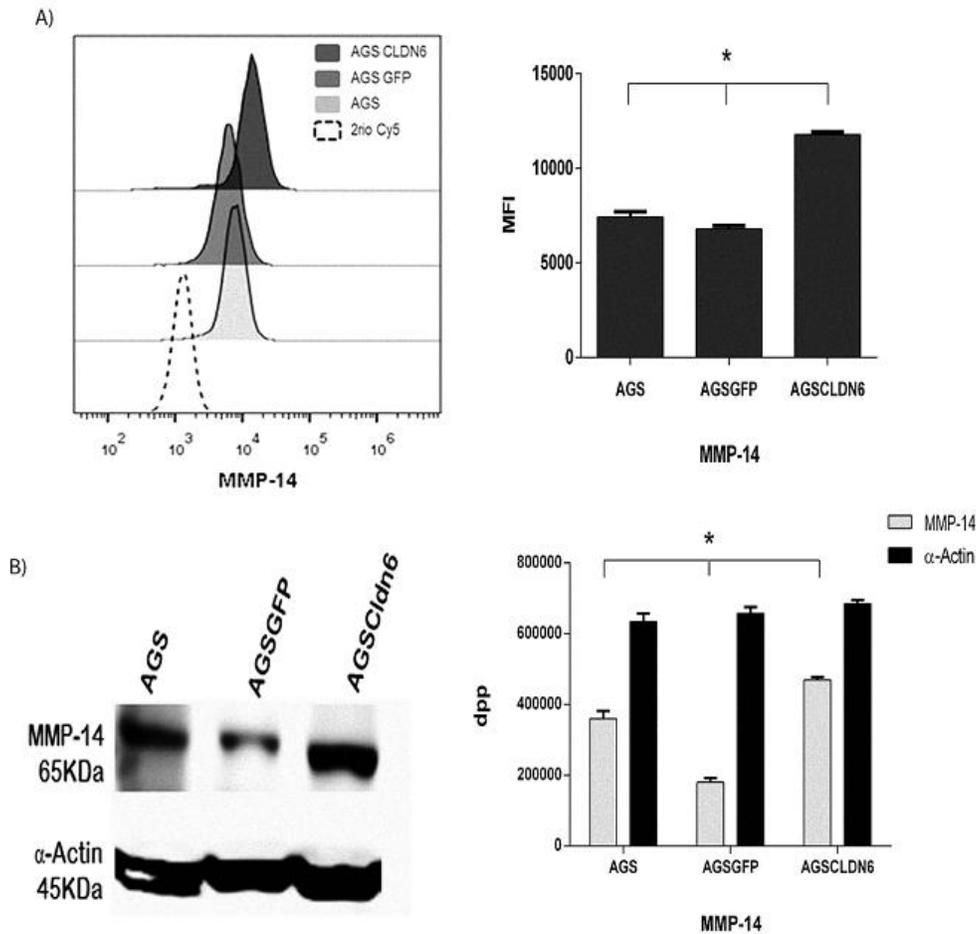
**Fig. 6.** Co-immunoprecipitation of claudin-1 with MMP-2 in AGS cells overexpressing claudin-6. A) Input represents a sample of the cell lysate before the specific anti-claudin-1 antibody was added; "input" served as positive control for each immunoprecipitate. α-actin was used as loading control. B) Confocal microscopy image that shows the co-localization of claudin-1 and MMP-2 on the cell membrane of AGS-Cld6 cells (pink dots in the merged image).



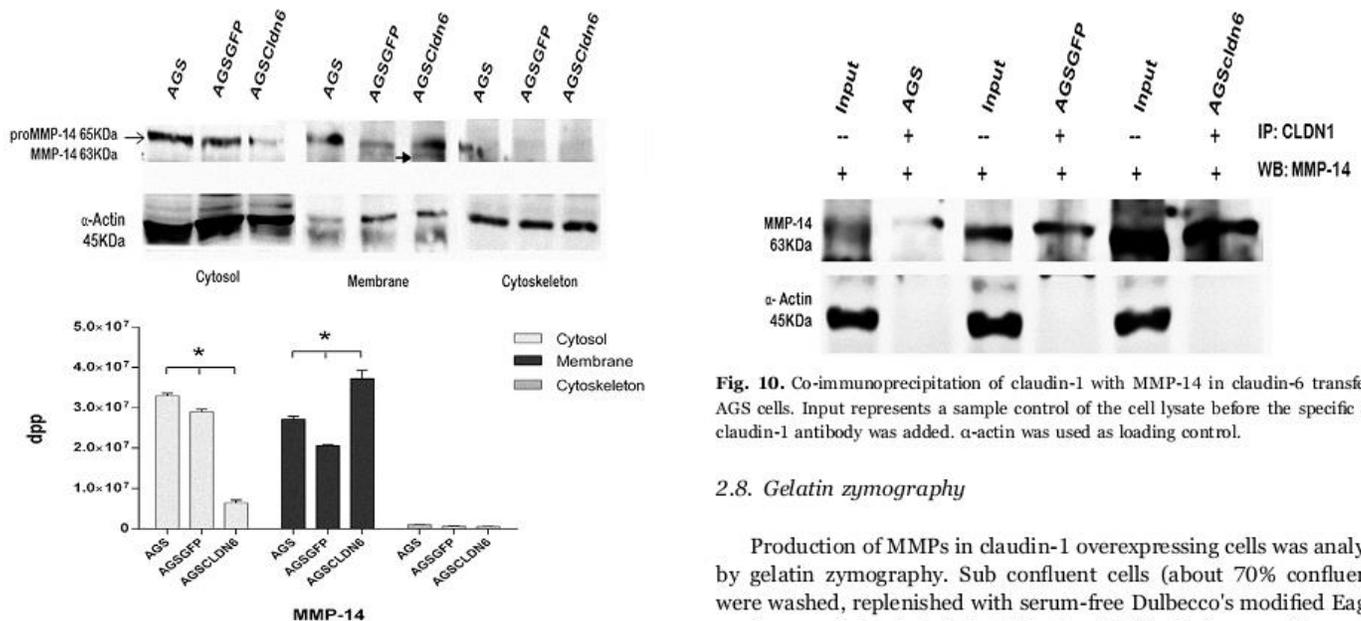
**Fig. 7.** MMP-2 expression in subcellular fractions of claudin-6 transfected AGS cells. A) Western blot analysis showed MMP-2 expression in the cytosol fraction; α-actin was used as loading control. B) Graphic representation of the numerical data obtained. Values are expressed as dots per point (dpp) and are represented as the mean ± standard deviation of the mean (SD). \*p < 0.001.

slides. Images were analyzed with a Leica System model TCSSP5 confocal microscope and the data was analyzed with the in-house microscope software.

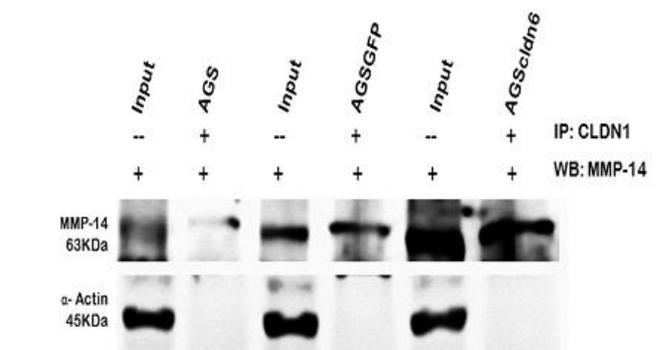
For confocal microscopy analysis of co-precipitation experiments AGS-Cld6 cells seeded in glass slides in 100 μl PBS were stained with the rabbit anti-claudin-1 monoclonal antibody and a secondary goat anti-rabbit rhodamine-labeled antibody and a mouse IgGk anti-MMP-2 antibody and a secondary rabbit anti-mouse APC-labeled antibody. Primary antibodies were incubated overnight, washed in PBS and incubated for 2 hs at room temperature with the specific secondary antibody.



**Fig. 8.** MMP-14 expression in AGS cells that overexpress claudin-6. A) The image is representative of a single experiment whereas the histogram represents the numerical data of all the experiments; results are expressed as the mean fluorescence intensity (MFI) values obtained by flow cytometry. Data were normalized according to the number of events. Cy5 secondary antibody was used as isotype control. B) The expression of MMP-14 was analyzed by western blot in claudin-6 transfected AGS cells total lysates; actin was used as loading control; the histogram represents the numerical data of all the experiments; results are expressed as dots per point (dpp). Cytofluorometry results were analyzed using FlowJO v.10.0.7r2. Values represent the mean  $\pm$  standard deviation of the mean (SD). \*  $p < 0.05$ .



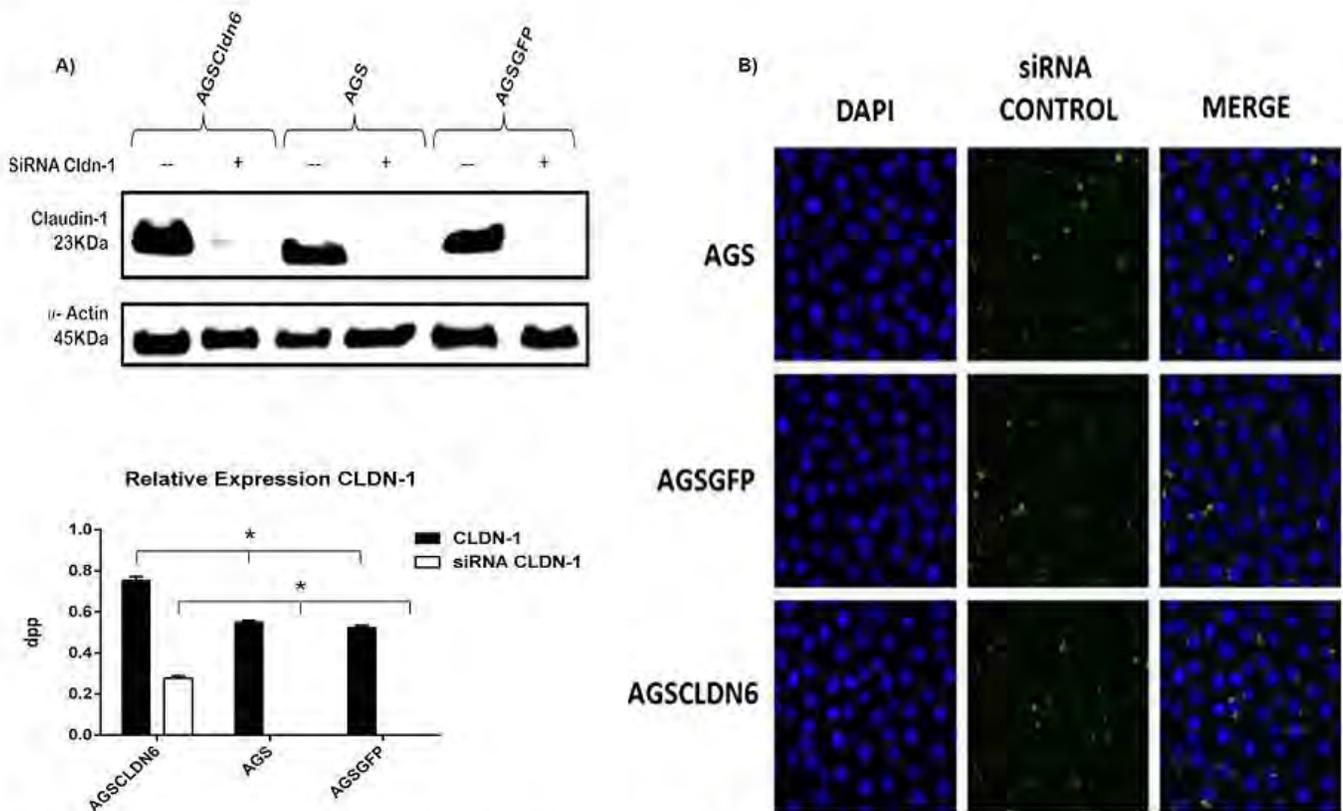
**Fig. 9.** MMP-14 expression in subcellular fractions of claudin-6 transfected AGS cells. The arrow on the western blot image shows MMP-14 expression in the membrane fraction;  $\alpha$ -actin was used as loading control. The histogram represents the numerical data of all the experiments. Values are expressed as dots per point (dpp) and are represented as the mean  $\pm$  standard deviation of the mean (SD). \*  $p < 0.05$ .



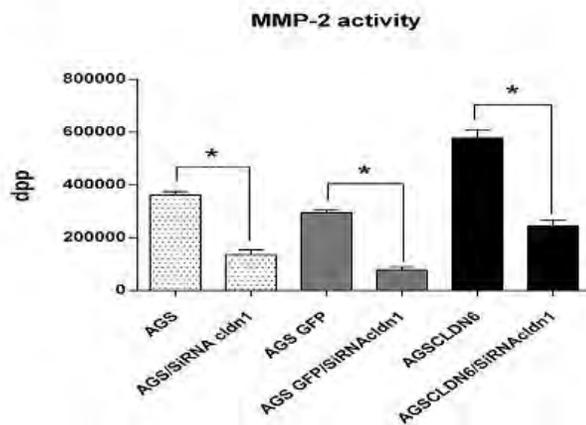
**Fig. 10.** Co-immunoprecipitation of claudin-1 with MMP-14 in claudin-6 transfected AGS cells. Input represents a sample control of the cell lysate before the specific anti-claudin-1 antibody was added.  $\alpha$ -actin was used as loading control.

### 2.8. Gelatin zymography

Production of MMPs in claudin-1 overexpressing cells was analyzed by gelatin zymography. Sub confluent cells (about 70% confluence) were washed, replenished with serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium, and incubated for 24 h. In all, 20 ml of serum-free conditioned medium were mixed with SDS sample buffer without reducing agents, and applied to 10% polyacrylamide gels copolymerized with 1 mg/ml gelatin. Gels were washed in 2.5% (v/v) Triton X-100 for 2 h at room temperature to remove SDS, rinsed twice with water, and then incubated in developing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 M NaCl,



**Fig. 11.** Transfection efficiency of a commercially available claudin-1 siRNA in claudin-6 transfected AGS cells as demonstrated by A) Western blot analysis;  $\alpha$ -actin was used as loading control. The histogram represents the numerical data of all the experiments. Values are expressed as dots per point (dpp) and are represented as the mean  $\pm$  standard deviation of the mean (SD), \* $p < 0.05$ , and B) Confocal microscopy; the siRNA control was coupled to fluorescein and was observed in the cytoplasm of cells. DAPI was used to stain nuclei. The photographs were obtained at 40 $\times$ .



**Fig. 12.** Effect of silencing claudin-1 on MMP-2 activity. The zymograms were performed with supernatants from both claudin-6 transfected AGS cells and control AGS and AGS-GFP cells transfected with claudin-1 siRNA. The histogram represents the numerical data of all the experiments. Values are expressed as dots per point (dpp) and are represented as the mean  $\pm$  standard deviation of the mean (SD), \* $p < 0.05$ .

5 mm CaCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100) for 36 h at 37 °C. Subsequently, gels were fixed and stained with 30% methanol and 10% acetic acid containing 0.5% Coomassie Blue R250. Gels were destained with 5% methanol and 8% acetic acid. Analysis of the gels by densitometry was inverted to reveal dark bands on white background [10] and the data was reported as DPP as already mentioned.

### 2.9. Cell migration assay (scratch-wound assay)

The transfected AGS cells were grown to confluence on 6-well plates and wounded by scraping with a pipette tip. The cells were incubated at 37 °C in a humid environment with 5% CO<sub>2</sub>, and wound closure was

observed and photographed for 24 h. The experiment was performed twice and assayed in triplicate.

### 2.10. In vitro invasiveness assay (transwell invasion assay)

The 24-well invasion chambers were prepared using matrigel basement membrane matrix (Becton Dickinson Labware) following the manufacturer's protocol. Cells were suspended in DMEM and added to the upper chamber at 1 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/transwell. The lower chamber was filled with 5% FBS supplemented DMEM as a chemoattractant. After 30hr of culture, the upper surfaces of the transwells were wiped with cotton swabs, and the inserts were stained with a 1% toluidine blue in 1% borax solution. The invading cells were counted under a light microscope in three fields per insert, and the mean for each chamber was determined. The experiment was performed twice with each sample in triplicate.

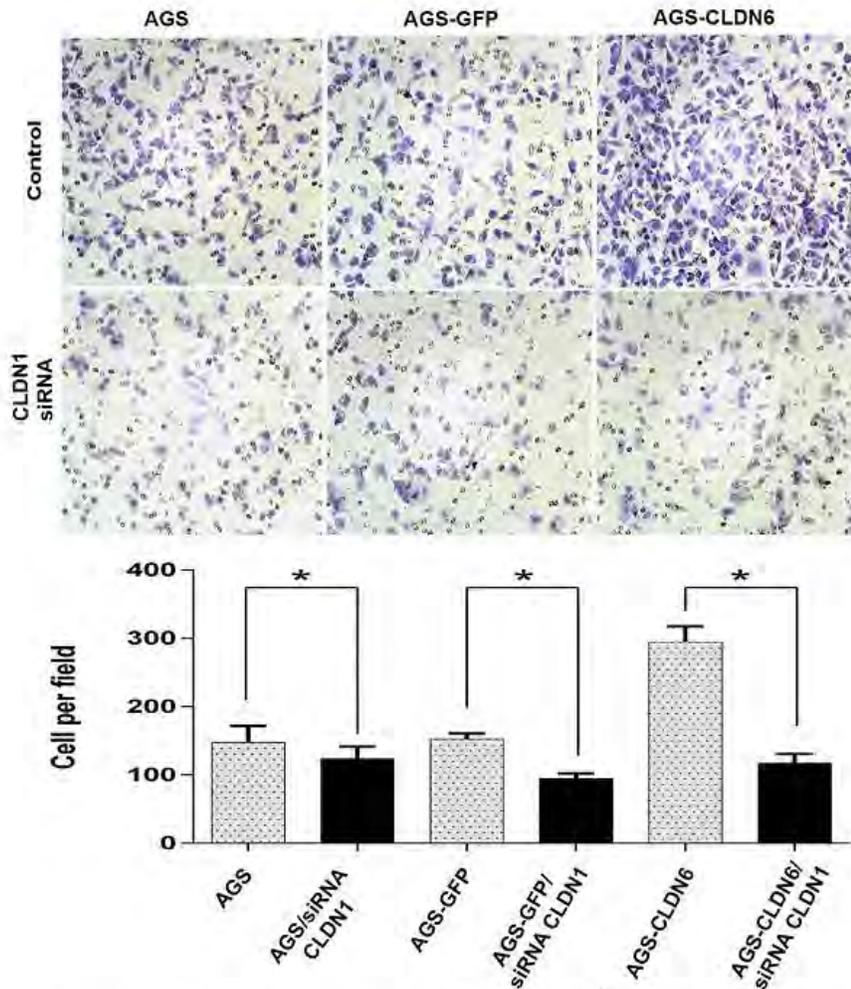
### 2.11. Statistical analysis

All experimental results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. Student's *t*-test analysis was used to evaluate differences between two groups using the Sigma Plot software, version 11. Differences were considered to be significant for values of  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. MMP-2 and -9 activity in claudin transfected AGS cells

We previously transfected AGS cells [5] with claudin-2, -6, -7 and -9 (Fig. 1). The enzymatic activity of metalloproteinase-2 and -9 was determined in the claudin transfected cells culture supernatants by gelatin zymography. Supernatants of claudin-2, -7, and -9 transfected



**Fig. 13.** Effect of silencing claudin-1 on cell invasiveness. AGS cells overexpressing claudin-6 were transfected with siRNA claudin-1 then were cultured on matrigel-coated transwells for 30 h and invading cells were counted. The histogram represents the numerical data of all the experiments. Values are expressed as cell per field and are represented as the mean  $\pm$  standard deviation of the mean (SD). \* $p < 0.05$ .

AGS cells showed MMP-2 enzymatic activity, but the strongest activity was found in the supernatant of claudin-6 transfected AGS cells (AGS-CLD6) (Fig. 2). The difference between claudin-2 and -6 culture supernatants, and that of green fluorescence protein-transfected AGS cells (AGS-GFP), was statistically significant (150,000 and 180,000 dpps vs. 102,000 dpps, respectively;  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively). MMP-9 gelatinase activity in the supernatants of all transfected AGS cells was negative. All remaining experiments were performed in claudin-6 transfected AGS cells.

### 3.2. Claudin and MMP-2 expression

Flow cytometry assays were performed to determine if claudin-6 overexpression modified endogenous claudin expression. Claudin-1 was strongly overexpressed in AGS-CLD6 cells but not in AGS or AGS-GFP cells (Fig. 3A). The difference in mean fluorescence intensity between AGS-CLD6 and AGS-GFP cells (14,500 vs. 4237) was highly significant ( $p < 0.001$ ) (Fig. 3B). The expression of claudin-2, -3, -4, -5, -7 and -10 was not modified in AGS-CLD6 cells.

Immunofluorescence assays in AGS-CLD6 cells corroborated the significant overexpression of claudin-1 in comparison to AGS-GFP cells (Fig. 3C). Western blot experiments corroborated the overexpression of claudin-1 in AGS-CLD6 cells in comparison to AGS-GFP and AGS cells ( $p < 0.001$ ) (Fig. 3D).

The results of experiments performed to avail the cleanness of the subcellular fractionation procedure where specific fraction markers

were used are shown in Fig. 4. The results clearly showed that claudin-1 overexpression was detected at the cell membrane of AGS-CLD6 cells (Fig. 5A) as the dpp histogram shows (Fig. 5B).

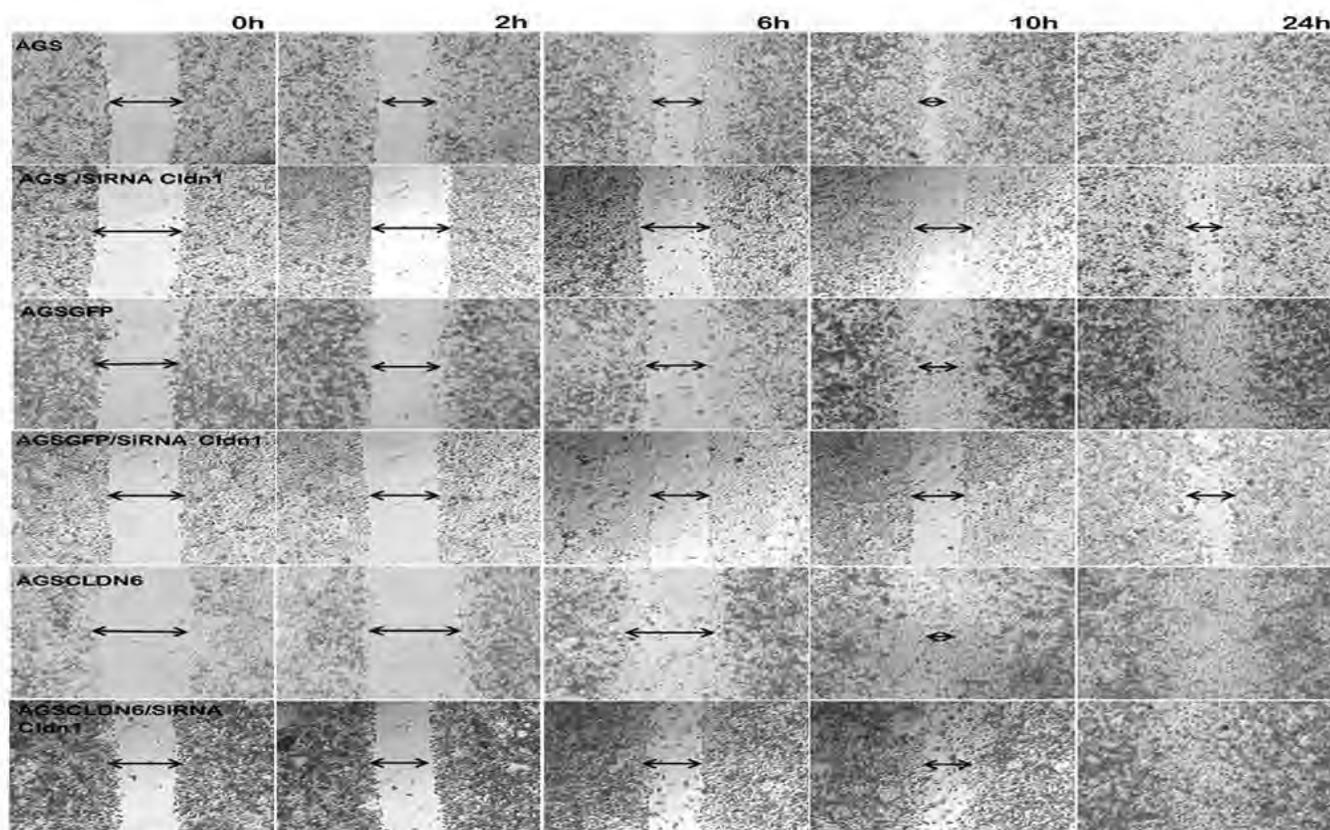
Also, the results of co-immunoprecipitation experiments substantiated that endogenous claudin-1 co-localize with MMP-2, either by western blot (Fig. 6A) or by confocal microscopy (Fig. 6B).

As expected, the expression of proMMP-2 was detected in control and AGS-CLD6 cells cytosol. Its expression, as determined by dpp unit analysis of western blot experiments, was significantly higher ( $p < 0.001$ ) in AGS-CLD6 cells in comparison to control AGS cells (Fig. 7A and B). ProMMP-2 was not detected in any, transfected or not, membranes. A small amount of proMMP-2 was found in the cytoskeleton fraction of AGS-CLD6 cells.

### 3.3. MMP-14 expression

MMP-2 activation is known to depend on MMP-14 activity. Cytofluorometry analysis of MMP-14 expression in AGS-CLD6 cells showed a significant MIF increase in claudin-6 transfected cells in comparison to AGS-GFP cells (11,780 vs. 6793 MFI,  $p < 0.05$ , Fig. 8A). The MMP-14 expression increase was corroborated by western blot analysis (Fig. 8B).

MMP-14 was preferentially expressed in the membrane of AGS-CLD6 cells (Fig. 9). The difference between AGS-CLD6 and control cells as determined by dpp analysis was statistically significant ( $p < 0.05$ ). The signal detected in the cytosol of AGS-CLD6 cells corresponds to



**Fig. 14.** Effect of silencing claudin-1 on cell migration. AGS cells overexpressing claudin-6 were transfected with siRNA claudin-1 then were cultured in 6-well plate and a wound was made using pipette tip. Cell migration was observed at different times.

proMMP-14; it's worth noticing that claudin-6 transfection favors the membrane expression of the enzyme in its active form. Co-immunoprecipitation experiments clearly showed that claudin-1 and MMP-14 co-localize in the claudin-6 transfected AGS cells (Fig. 10).

### 3.4. Claudin-1 silencing

A commercially available siRNA was used to silence transiently claudin-1 expression in AGS-Cld6 cells. The efficiency of the siRNA transfection process was corroborated by western blot and confocal microscopy (Fig. 11A and B). The results showed a significant 90% decrease of claudin-1 expression in siRNA-treated AGS-Cld6 cells in comparison to untreated cells ( $p < 0.05$ ) (Fig. 11). Also, the MMP-2 enzyme activity of claudin-1 siRNA-treated AGS, AGS-GFP and AGS-Cld6 culture cell supernatants showed a 60% decrease in AGS-Cld6 cells (520,000 dpp versus 211,000 dpp) (Fig. 12).

Claudin-1 siRNA-treated and non-treated AGS-Cld6 cells were used for invasiveness and migration assays. It was clear that AGS-Cld6 cells showed a significantly higher invasiveness capacity ( $p < 0.05$ ) than non-transfected cells, but interestingly, claudin-1 siRNA treated AGS-Cld6 cells showed a significant decrease in the number of migrating cells in the invasiveness experiments ( $p < 0.05$ ) that was similar to that of non-silenced AGS cells (Fig. 13). The silencing of claudin-1 caused a similar effect in the migration assays in AGS-Cld6 transfected cells; the rate of wound repair was clearly slower after 10 h. in siRNA treated cells compared to untreated and non-transfected AGS cells (Fig. 14).

## 4. Discussion

Cancer cell invasion is subordinated to extracellular degradation of matrix and basal membranes by matrix metalloproteinase-2 and -9 [7,8]. Claudins, a family of tissue specific proteins that contribute to the function and homeostasis of cell-cell tight junction proteins [14], have

been reported amongst the various regulators of membrane-type matrix metalloproteinase and activators of pro-MMPs [15–17]. The enhanced expression of claudin-6 in diffuse type gastric carcinoma biopsies has been associated with a poor prognosis and shorter life span [6]; this observation was confirmed in AGS cells transfected with claudin-6 which showed enhanced cell invasiveness and proliferation rate [5].

Our results showed that claudin-6 transfected AGS cells culture supernatants had a strong MMP-2 activity as opposed to those of claudin-2, -7, and -9 transfected AGS cells, which had none. Claudin-4 regulates MMP-2 activity and enhanced cell invasion of ovarian epithelial cells [9] whereas claudin-1 regulates MMP-2 activity in human hepatocellular carcinoma cells [10]. Therefore, it appears that claudin regulation of MMPs activity varies according to cell type.

We indirectly confirmed our previous invasiveness results with claudin-6 transfected AGS cells that revealed the endogenous induction of claudin-1 expression [5]. Claudin-1 expression was mainly observed at cell membrane level. Although claudin-1 has been shown to enhance the activation of pro-MMP2 in the SV40 large T antigen transformed human embryonic 293T kidney cells [11], the main issue was to determine if claudin-1 participates in cell invasiveness and migration through the activation of MMP-2 in the transfected AGS cells. Our results clearly showed that claudin-1 and proMMP-2 co-precipitated in claudin-6 transfected AGS cells, and that the overexpressed proMMP-2 was detected only at the cytosol level. The latter will then be secreted and activated in the extracellular milieu.

The activation of MMP-2 is mediated by a great variety of molecules including TNF- $\alpha$  [18], and AT1 receptors [12], as well as membrane-bound MMP-14 in cancer invasion situations [19,20]. MMP-14 regulates cell migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma [21], non-small cell lung cancer, hepatoma [22], amongst many others. MMP-14 and proMMP-14 have been reported in eukaryote cell membranes [23]. Our results showed that both enzyme forms were,

as expected, expressed in the cell membrane of AGS cells that overexpress claudin-6. Our results also showed that the location of MMP-14 on the cell membrane is favored by an unknown mechanism in claudin-6 expressing cells. It has been observed that cancer cells expressing ADAM12 and  $\alpha V\beta 3$  integrin at cell surface recruit endogenous MMP-14 to the cells membrane and regulate the enzyme function [24]. Once on the cell membrane, MMP-14 could act as a proteolysis enzyme of proMMP-2. MMP-14 has been considered a sheddase for surface molecules [25]. Claudin-1 induces invasive behavior in liver and breast cancer cells through MMP-9 [10,26]. Silencing of claudin-1 decreased MMP-2 activity in the supernatant of claudin-6 overexpressing AGS cells, but it also diminished AGS cell migration and invasiveness in claudin-6 transfected cells.

Our results strongly suggest that the increase in claudin-1 expression promotes an increase in MMP-2 activity and enhances cell migration and invasiveness. All in all, our results show a cascade of events initiated by the cell membrane expression of claudin-1 (mediated by claudin-6) that interacts with extracellular proMMP-2 thus promoting its activation together with MMP-14, which in turn promote metastatic processes that require increased cell migration and invasiveness. We propose a docking site phenomena, as it has been observed in TJ proteins [27], that would include the recruitment and adjoining of pro-MMP2 and MMP-14, mediated by claudin-1 extracellular loops.

## Funding

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México grant 177678-Conacyt, and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM, México grants IN-210813 and IN-211113. None of the authors has a potential financial or personal conflict of interest.

## Acknowledgements

The authors thank Ms. María José Gómara Herrera and Ms. Raquel Guerrero Alquicira for technical assistance. The manuscript acknowledges the academic formation received by Ms. Ana C. Torres-Martínez from the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM and constitutes an obligatory requirement for obtaining the PhD degree in Science. Ms. Ana C. Torres-Martínez also acknowledges the scholarship and financial support provided by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico.

## References

- [1] T.A. Martin, M.D. Mason, W.G. Jiang, Tight junctions in cancer metastasis, *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* 16 (2011) 898–936.
- [2] D. Gunzel, A.S. Yu, Claudins and the modulation of tight junction permeability, *Physiol. Rev.* 93 (2) (2013) 525–569.
- [3] S. Nagini, Carcinoma of the stomach: a review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention, *World J. Gastrointest. Oncol.* 4 (7) (2012) 156–169.
- [4] M.B. Resnick, M. Gavilanez, E. Newton, T. Konkin, B. Bhattacharya, D.E. Britt, et al., Claudin expression in gastric adenocarcinomas: a tissue microarray study with prognostic correlation, *Hum. Pathol.* 36 (8) (2005) 886–892.
- [5] V.E. Zavala-Zendejas, A.C. Torres-Martínez, B. Salas-Morales, T.I. Fortouil, L.F. Montano, E.P. Rendon-Huerta, Claudin-6, 7, or 9 overexpression in the human gastric adenocarcinoma cell line AGS increases its invasiveness, migration, and proliferation rate, *Cancer Investig.* 29 (1) (2011) 1–11.
- [6] E. Rendon-Huerta, F. Teresa, G.M. Teresa, G.S. Xochitl, A.F. Georgina, Z.Z. Veronica, et al., Distribution and expression pattern of claudins 6, 7, and 9 in diffuse- and intestinal-type gastric adenocarcinomas, *J. Gastrointest. Cancer* 41 (1) (2010) 52–59.
- [7] H. Hua, M. Li, T. Luo, Y. Yin, Y. Jiang, Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm, *Cell Mol. Life Sci.* 68 (23) (2011) 3853–3868.
- [8] O. Mendes, H.T. Kim, G. Lungu, G. Stoica, MMP2 role in breast cancer brain metastasis development and its regulation by TIMP2 and ERK1/2, *Clin. Exp. Metastasis* 24 (5) (2007) 341–351.
- [9] R. Agarwal, T. D'Souza, P.J. Morin, Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity, *Cancer Res.* 65 (16) (2005) 7378–7385.
- [10] C.H. Yoon, M.J. Kim, M.J. Park, I.C. Park, S.G. Hwang, S. An, et al., Claudin-1 acts through c-Abl-protein kinase Cdelta (PKCdelta) signaling and has a causal role in the acquisition of invasive capacity in human liver cells, *J. Biol. Chem.* 285 (1) (2010) 226–233.
- [11] H. Miyamori, T. Takino, Y. Kobayashi, H. Tokai, Y. Itoh, M. Seiki, et al., Claudin promotes activation of pro-matrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-type matrix metalloproteinases, *J. Biol. Chem.* 276 (30) (2001) 28204–28211.
- [12] M.M. Akhavan, M. Karimi, M. Ghodrati, H. Falahtpishe, AT1 receptors activation enhances the expression of MMP-2, MMP-13 and VEGF but not MMP-9 in B16F10 melanoma cells, *Pak. J. Biol. Sci.* 14 (17) (2011) 821–830.
- [13] H. Gan, G. Wang, Q. Hao, Q.J. Wang, H. Tang, Protein kinase D promotes airway epithelial barrier dysfunction and permeability through down-regulation of claudin-1, *J. Biol. Chem.* 288 (52) (2013) 37343–37354.
- [14] M. Lal-Nag, P.J. Morin, The claudins, *Genome Biol.* 10 (8) (2009) 235.
- [15] K. Kessenbrock, C.Y. Wang, Z. Werb, Matrix metalloproteinases in stem cell regulation and cancer, *Matrix Biol.* 44–46 (2015) 184–190.
- [16] K. Yamamoto, G. Murphy, L. Troeberg, Extracellular regulation of metalloproteinases, *Matrix Biol.* 44–46 (2015) 255–263.
- [17] S.H. Hong, G.Y. Kim, Y.C. Chang, S.K. Moon, W.J. Kim, Y.H. Choi, Bufalin prevents the migration and invasion of T24 bladder carcinoma cells through the inactivation of matrix metalloproteinases and modulation of tight junctions, *Int. J. Oncol.* 42 (1) (2013) 277–286.
- [18] Y.N. Yang, F. Wang, W. Zhou, Z.Q. Wu, Y.Q. Xing, TNF-alpha stimulates MMP-2 and MMP-9 activities in human corneal epithelial cells via the activation of FAK/ERK signaling, *Ophthalmic Res.* 48 (4) (2012) 165–170.
- [19] D.K. Lund, V. Mouly, D.D. Cornelison, MMP-14 is necessary but not sufficient for invasion of three-dimensional collagen by human muscle satellite cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 307 (2) (2014) C140–C149.
- [20] J. Zhao, Z. Kong, F. Xu, W. Shen, A role of MMP-14 in the regulation of invasiveness of nasopharyngeal carcinoma, *Tumour Biol.* 36 (11) (2015) 8609–8615.
- [21] T. Yan, Z. Lin, J. Jiang, S. Lu, M. Chen, H. Que, et al., MMP14 regulates cell migration and invasion through epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma, *Am. J. Transl. Res.* 7 (5) (2015) 950–958.
- [22] T. Li, J. Xie, C. Shen, D. Cheng, Y. Shi, Z. Wu, et al., miR-150-5p inhibits hepatoma cell migration and invasion by targeting MMP14, *PLoS One* 9 (12) (2014) e115577.
- [23] J. Mols, C. Peeters-Joris, R. Wattiez, S.N. Agathos, Y.J. Schneider, Recombinant interferon-gamma secreted by Chinese hamster ovary-320 cells cultivated in suspension in protein-free media is protected against extracellular proteolysis by the expression of natural protease inhibitors and by the addition of plant protein hydrolysates to the culture medium, *Vitr. Cell Dev. Biol. Anim.* 41 (3–4) (2005) 83–91.
- [24] R. Albrechtsen, M. Kveiborg, D. Stautz, J. Vikesa, J.B. Noer, A. Kotzsh, et al., ADAM12 redistributes and activates MMP-14, resulting in gelatin degradation, reduced apoptosis and increased tumor growth, *J. Cell Sci.* 126 (Pt 20) (2013) 4707–4720.
- [25] M. Kajita, Y. Itoh, T. Chiba, H. Mori, A. Okada, H. Kimoh, et al., Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration, *J. Cell Biol.* 153 (5) (2001) 893–904.
- [26] Y.F. Liao, Y.M. Tzeng, H.C. Hung, G.Y. Liu, Dibenzoylmethane, hydroxydibenzoylmethane and hydroxymethyldibenzoylmethane inhibit phorbol-12-myristate 13-acetate-induced breast carcinoma cell invasion, *Mol. Med. Rep.* 11 (6) (2015) 4597–4604.
- [27] C.A. Carraway, K.L. Carraway, Sequestration and segregation of receptor kinases in epithelial cells: implications for ErbB2 oncogenesis, *Sci. STKE* 2007 (381) (2007) re3.

## **12. ANEXO II Artículos publicados durante los estudios de Maestría y Doctorado en Ciencias Biológicas.**

La alumna Ana Cristina Torres Martínez contribuyó en los siguientes artículos durante su estancia en el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Biológicas:

1. Zavala-Zendejas VE, Torres-Martínez AC, Salas-Morales B, Fortoul T, Montaña LF, Rendón-Huerta E.P. **2011**. Claudin-6, -7 or -9 overexpression in the human gastric adenocarcinoma cell line AGS increase its invasiveness, migration and proliferation rate. *Cancer Investigation*, 29:1-11.
2. Rendon-Huerta EP, Torres-Martínez AC, Montaña L. CLDN6 (claudin 6). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. December **2012**. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/CLDN6ID50974ch16p13.html>
3. Rendon-Huerta EP, Torres-Martínez AC, Montaña L. CLDN9 (claudin 9). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. December **2012**. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/CLDN9ID51555ch16p13.html>
4. Rendón-Huerta EP, Torres-Martínez A, Charles-Niño C, Rivas-Estilla AM, Paez A, Fortoul TI, Montaña LF. **2013**. Pegylated interferon- $\alpha$ 2b and ribavirin decrease claudin-1 and E-cadherin expression in HepG2 and Huh-7.5 cells. *Ann Hepatol*.12(4):616-25.
5. Torres-Martinez A, Chavarria C, Gallardo-Vera F, Montaña LF and Rendon-Huerta E. **2016**. IL-8 Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition through pERK1/2 in AGS Cells. *J Gastroenterol Compl* 1(1): 104.