



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLETENICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Estudio de las proteínas involucradas en la  
formación de uniones intercelulares en la  
línea celular SKOV-3”**

**T E S I S**

**Que presenta**

**Q.F.B. María Elena Sánchez Bello**

**Para obtener el grado de**

**Maestra en Ciencias en Infectómica y Patogénesis Molecular**

**Directores de tesis:**

Dra. Patricia Talamás Rohana

Dra. Bibiana Chávez Munguía

Ciudad de México,

Julio del 2018

## DEDICATORIAS

### A Dios

Por permitirme llegar a esta etapa de mi vida, por darme salud y fuerza para seguir adelante y ayudándome a aprender de mis errores, demostrándome que todo lo que me proponga lo puedo lograr.

### A mis padres **María Elena y José Luis**

Por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida para seguir adelante y cumplir mis metas, sin su apoyo esto no sería posible. Gracias por confiar en mi y ser los mejores padres del mundo.

### A mis hermanos **José Luis y Miguel Ángel**

Por siempre estar cuando más los necesito, guiarme y ayudarme en las decisiones que he tomado. Gracias por todo su apoyo.

### A mi esposo **Irving Ulises**

Por su apoyo desde que lo conocí, por estar a mi lado en momentos buenos y malos, siempre ayudándome. Eres el hombre más comprensivo y amoroso. Gracias por alentarme siempre a ser mejor persona y darme la fuerza cuando estoy vencida. Te amo con toda mi alma.

### A mis sobrinas **Nayeli, Fernanda y Yoali**

Por darle alegría a mi vida y ser las niñas más amorosas. A pesar de la distancia nunca se han olvidado de su tía consentida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis tutoras, la Dra. Patricia Talamás Rohana y la Dra. Bibiana Chávez Munguía, por darme la oportunidad de desarrollar mi proyecto de maestría en sus laboratorios y por todo su apoyo.

A mis asesores, la Dra. Abigail Betanzos Fernández y el Dr. José Luis Rosales Encina por ayudarme en el desarrollo de mi proyecto, haciendo comentarios y recomendaciones siempre oportunos.

A Carlos Osorio, Verónica Hernández, Lizbeth Salazar y Anel Lagunes por su valioso conocimiento y guía para la realización y planeación de los experimentos.

Al señor Ranferi Andrés y Daniel Morales por su apoyo técnico durante mi estancia en ambos laboratorios.

A mis compañeros del laboratorio 9 y laboratorio 1 por compartir sus conocimientos y amistad.

A mis compañeros de generación por dos años de convivencia y esfuerzos vividos durante la maestría.

A mis mejores amigos Arely, Noé, Felipe y Herminia por el apoyo que nos han brindado, por haberlos conocido en la mejor etapa de mi vida y compartir momentos que jamás olvidare.

Al Dr. Donaciano Flores Robles por todo lo que nos enseñó para poder estar en el cinvestav y motivarnos a ser mejores.

Al CONACYT por estimular el desarrollo de la ciencia en México, brindándome el apoyo económico con la beca No. 451422, la cual fue indispensable durante la maestría.

A la Fundación Miguel Alemán A.C. por el financiamiento proporcionado para el desarrollo de este proyecto a través del estímulo a la investigación médica "Miguel Alemán Valdés".

## ABREVIATURAS

AF594	alexa fluor 594
ATCC	American Type Culture Collection
BRCA 1	breast cancer 1 (cáncer de mama 1)
BSA	albúmina sérica bovina
Caco-2	Línea celular de adenocarcinoma colorrectal (ATCC-HTB-37)
CaOv	Cáncer de ovario
CDH1	cadherina 1 gen (E-cadherina)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
cels	células
CLDN	claudina
COE	cáncer de ovario epitelial
CTNNB1	gen beta catenina
DEPC	policarbonato de di-etilo
DSG 2	desmogleína 2
Dsm	desmosomas
DSP	desmoplaquina
E-cad	E-cadherina
EGF	factor de crecimiento epidermal
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
h	horas
IF	inmunofluorescencia
IgG	inmunoglobulina G
IL-6, 8	interleucina 6,8
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
JAMs	junctional adhesion molecules
kDa	kilodaltones
LA	líquido ascítico
M	molar
MAGUK	membrane-associated guanylate kinase homologs

MET	Microscopía electrónica de transmisión
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitros
MMP-2	metaloproteinasa de matriz 2
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NK	células natural killer
nm	nanómetros
OCLDN	occludina
PAR 3, 6	proteinase-activated receptor 3, 6
pb	pares de bases
PBS	amortiguador salino de fosfatos
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	reacción en cadena de polimerasa- retrotranscripasa
seg	segundos
SKOV-3	Línea celular de carcinoma ovárico (ATCC-HTB-77)
TA	temperatura ambiente
TEM	Transición epitelio mesénquima
TGF- $\beta$	factor de crecimiento transformante beta
TRITC	Tetrametilrodamina
UAs	uniones adherentes
UEs	uniones estrechas
UIs	uniones intercelulares
VEGF	factor de crecimiento de endotelio vascular
ZO	zonula occludens
$\beta$ -cat	beta catenina
$\mu$ g	microgramos
$\mu$ l	microlitros

## I. RESUMEN

El cáncer de ovario (CaOv) es el sexto cáncer ginecológico más frecuente y ocupa cerca del 5% del total de nuevos casos de cáncer en mujeres. En el CaOv, alrededor del 35% de las pacientes en etapas avanzadas (etapa III o etapa IV), pueden presentar ascitis. El líquido ascítico (LA) funciona como un microambiente tumoral debido a la presencia de células malignas, células NK, fibroblastos, adipocitos, células mesoteliales, macrófagos y células T; las cuales liberan ciertas citocinas y factores de crecimiento que inducen la Transición Epitelio-Mesénquima (TEM) de las células. En este proceso, el comportamiento metastásico se asocia con una pérdida de fenotipo epitelial y uniones epiteliales disminuidas o ausentes, que resultan en cambios en la polaridad y reducción de las adhesiones celulares.

En nuestro grupo de investigación, se analizó la línea celular tumoral SKOV-3 en presencia de LA, observando cambios morfológicos que sugieren que la TEM está ocurriendo en estas células; por esta razón, se evaluaron algunas proteínas de las uniones intercelulares (UIs) como marcadores de esta transición. Sin embargo, a la fecha no se ha caracterizado que tipos de UIs presentan estas células y como se ven afectadas en presencia de LA de pacientes con cáncer de ovario epitelial. Por lo anterior, se decidió evaluar la expresión de mRNA y proteínas que conforman las UEs, UAs y Dsm en células SKOV-3, en presencia y ausencia de LA. Además, se observó por microscopía electrónica de transmisión con tinción de rojo rutenio, el tipo de UIs que forman. Se encontró que las células SKOV-3 expresaron todos los mRNA analizados en condición control y de inducción con LA, a diferentes tiempos. Mediante microscopía electrónica y microscopía confocal se observó que en condiciones confluentes de cultivo estas células forman uniones estrechas y desmosomas. Sin embargo, sólo una proporción mínima de estas células en medio y LA, presentan la expresión de proteínas de las UAs con una distribución irregular. Finalmente, se confirmó la capacidad de las células SKOV-3 para formar UEs y Dsm por la expresión y localización membranal de las proteínas ocludina, ZO-1 y Dsg 2.

## II. ABSTRACT

Ovarian cancer (CaOv) is the sixth most common gynecological cancer and occupies about 5% of all new cases of cancer in women. In CaOv, about 35% of patients in advanced stages (stage III or stage IV), may produce ascites. The ascitic fluid (AF) functions as a tumor microenvironment due to the presence of malignant cells, NK cells, fibroblasts, adipocytes, mesothelial cells, macrophages and T cells, which release certain cytokines and growth factors that induce the Epithelium-Mesenchymal Transition (EMT) of the cells. In this process, metastatic behavior is associated with a loss of epithelial phenotype and diminished or absent epithelial junctions that result in changes in polarity and reduction of cell adhesions.

In our research group, the tumor cell line SKOV-3 was analyzed in the presence of AF, observing morphological changes that suggest that EMT is occurring in these cells. For this reason, some proteins of the intercellular junctions (IJs) were evaluated as markers of this transition. However, the types of IJs present in these cells, as well as how they are affected in the presence of AF from patients with epithelial ovarian cancer have not been characterized to date. Therefore, we decided to evaluate the expression of some mRNA and proteins that comprise TJs, AJs and Dsm in SKOV-3 cells, in the presence and absence of AF. By transmission electron microscopy with red ruthenium stain, the type of IJs that these cells form was also observed. SKOV-3 cells expressed all the mRNA analyzed in the control condition and under induction with AF, at different times. Moreover, it was found by electron and confocal microscopy, that these cells form TJs and Dsm in confluent cultures conditions. However, only a minimal proportion of these cells, both in medium and AF condition, had the expression of proteins of the AJs with an irregular distribution. Finally, the ability of SKOV-3 cells to form TJs and Dsm is confirmed by the expression and membrane localization of the proteins occludin, ZO-1 y Dsg 2.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

I.	Resumen.....	vi
II.	Abstract.....	vii
III.	Introducción.....	1
	3.1 Generalidades de Cáncer de ovario.....	1
	3.2 Microambiente tumoral .....	2
	3.3 Transición Epitelio-Mesénquima (TEM).....	3
	3.4 Adhesión celular y metástasis.....	4
	3.5 Uniones intercelulares (UIs).....	4
	3.5.1 Uniones estrechas (UEs).....	5
	3.5.2 Uniones adherentes (UAs).....	7
	3.5.3 Desmosomas (Dsm).....	9
IV.	Antecedentes.....	11
V.	Justificación.....	14
VI.	Hipótesis.....	15
VII.	Objetivos.....	15
VIII.	Estrategia metodológica.....	16
IX.	Metodología.....	17
X.	Resultados.....	22
	10.1 Análisis bioinformático de transcritos y proteínas que conforman las UIs.....	22
	10.2 Las células SKOV-3 en cultivo confluyente pueden llegar a formar uniones estrechas y desmosomas.....	23
	10.3 Las células SKOV-3 en cultivo confluyente y disperso, en medio de cultivo y en LA, expresan todos los mRNA analizados para UEs, UAs y Dsm.....	26
	10.4 Localización subcelular de las proteínas que conforman las UIs.....	29
XI.	Discusión.....	33
XII.	Conclusión.....	38
XIII.	Perspectivas.....	39
XIV.	Referencias.....	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Representación esquemática de los componentes de la estructura básica de las UEs.
- Figura 2. Representación esquemática de los componentes estructurales básicos de las UAs.
- Figura 3. Representación esquemática de los componentes que conforman los Dsm.
- Figura 4. TEM inducida por LA.
- Figura 5. Dsm en células SKOV-3 en cultivo normal.
- Figura 6. Multicapas de células SKOV-3.
- Figura 7. Análisis bioinformático de la expresión de transcritos y proteínas de UIs en tejido ovárico y cáncer de ovario.
- Figura 8. Células SKOV-3 en condición de cultivo confluyente.
- Figura 9. Células SKOV-3 en condición de cultivo confluyente forman UEs y Dsm.
- Figura 10. Células SKOV-3 en inducción con LA durante 72 h.
- Figura 11. Expresión de mRNA de proteínas implicadas en la formación de UIs en cultivo confluyente de células SKOV-3 control y LA.
- Figura 12. Expresión de mRNA de proteínas implicadas en la formación de UIs en cultivo subconfluyente de células SKOV-3 control y LA.
- Figura 13. Localización subcelular de proteínas que forman las UEs en células SKOV-3 en medio control y LA.
- Figura 14. Localización subcelular de proteínas que forman las UAs y Dsm en células SKOV-3 en medio control y LA.

## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para RT-PCR.
- Tabla 2. Número de transcritos encontrados para cada uno de los genes analizados.

### III. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 Generalidades de Cáncer de ovario

En México, el cáncer de ovario (CaOv) ocupa el tercer lugar de incidencia entre los tumores ginecológicos con 2315 casos al año, después del cáncer cervicouterino. Aunque es menos frecuente que el cáncer de mama y el cáncer cervicouterino, en proporción el CaOv presenta una alta tasa de mortalidad (GLOBOCAN, 2012).

Alrededor de 65% de las mujeres mueren dentro de los primeros 5 años de diagnóstico, debido a que el diagnóstico se da en etapas avanzadas (III y IV) de la enfermedad. La mayoría de los casos se diagnostican en mujeres de entre los 40 y 59 años de edad. No obstante, hay un número significativo de casos desde los 30 años (Gallardo-Rincón, D., 2016).

La edad es considerada el factor de riesgo más importante para desarrollar CaOv, con una incidencia del 80% en mujeres post-menopáusicas. Otros factores de riesgo de tipo hormonal incluyen la menarca temprana, la menopausia tardía, la nuliparidad, el uso de terapia de remplazo hormonal, la infertilidad, síndrome de ovario poliquístico y endometriosis. Por otro lado, el tabaquismo, una alimentación basada en ingesta de grasas y sobrepeso son importantes factores de riesgo (La Vecchia, C., 2017; Gallardo-Rincón, D., 2016).

Además, cuando existe un patrón hereditario consistente en que haya dos miembros en la familia en línea directa con cáncer de mama u ovario, y en donde además se demuestre la mutación del gen *BRCA 1* ó *2*, el riesgo se incrementa entre 35 a 45% en el caso del gen *BRCA 1*, y en 15 a 25% en el gen *BRCA 2* (Gallardo-Rincón, D., 2016).

Existen diversos tipos de CaOv de acuerdo al tipo celular de origen: de células epiteliales, que representan de 85 a 95% de los casos en mujeres mayores de 50 años; de células estromales, de 5 a 8% en mujeres de cualquier edad; y de células germinales, de 3 a 5% en mujeres jóvenes de 15 a 19 años (Roett *et al.*, 2009).

### 3.2 Microambiente tumoral

El microambiente tumoral juega un papel muy importante en los cambios de expresión de las Uls y la ganancia de movilidad. Dicho microambiente es proporcionado por diferentes tipos celulares adyacentes al tumor que liberan citocinas o factores de crecimiento que promueven la progresión del tumor, diseminación del cáncer y evasión de la respuesta inmune (Worzfeld *et al.*, 2017).

Particularmente, el líquido de ascitis puede funcionar como un microambiente en diferentes patologías. La ascitis es la acumulación excesiva de líquido en la cavidad peritoneal y es causada por varias patologías, como son: cirrosis hepática (81% de los casos), fallo cardíaco (3%), tuberculosis (2%) y malignidades (10%). Sin embargo, la composición del líquido ascítico depende de la enfermedad al que está asociado.

El principal tipo de cáncer que se asocia con la producción de ascitis es el CaOv, en el 38% de los casos (Kipps *et al.*, 2013).

La presencia de ascitis es un signo de enfermedad avanzada y mal pronóstico, con solo el 11% de los pacientes que sobreviven más de 6 meses. En el cáncer de ovario epitelial (COE) la mayoría de las pacientes con etapas avanzadas (etapa III o etapa IV) pueden presentar ascitis, sin embargo se considera un factor pronóstico independiente del tiempo de recaída, sugiriendo que la presencia de ascitis no se limita a ningún subtipo histológico específico (López *et al.*, 1996). La presencia de ascitis provoca la acumulación de líquido, causando dolor, saciedad temprana, afecciones del sistema respiratorio, gastrointestinal y urinario (Kipps *et al.*, 2013).

En el COE, se sabe que el LA funciona como un microambiente tumoral debido a la presencia de células malignas, células NK, fibroblastos, adipocitos, células mesoteliales, macrófagos y células T, las cuales liberan ciertas citocinas como son la IL-6, TGF- $\beta$  involucrados en proliferación celular, invasión y metástasis, IL-8, EGF y VEGF involucrados en angiogénesis y acumulación de ascitis. En consecuencia, estas moléculas al ser liberadas pueden llegar a ser importantes factores de inducción de la

TEM de las células tumorales y tener un efecto sobre las proteínas de las UIs (Worzfeld *et al.*, 2017).

### **3.3 Transición Epitelio-Mesénquima (TEM)**

Algunas de las proteínas de las UIs son consideradas marcadores de la Transición Epitelio Mesénquima (TEM) (Kalluri & Weinberg, 2009). Cambios en la expresión de la proteína cadherina son indicativos de la plasticidad fenotípica que ocurre en dicho proceso, durante el desarrollo embrionario, específicamente la gastrulación (Hudson *et al.*, 2008). En este sentido, la TEM se da por la transformación de células epiteliales inmóviles a células móviles e invasivas, la cual se acompaña de pérdida de contactos intercelulares, mediado principalmente por E-cadherina y  $\beta$ -catenina y la expresión de los factores de transcripción Snail, Slug, Twist, Zeb, etc., que regulan negativamente la expresión de proteínas de las UIs y, positivamente la expresión de proteínas enriquecidas en células mesenquimales como N-cadherina y vimentina. Sin embargo, un proceso similar es común en cáncer, donde el comportamiento metastásico se asocia con una pérdida del fenotipo epitelial y uniones epiteliales disminuidas o ausentes, que resultan en la pérdida de polaridad y reducción de las adhesiones celulares (Kalluri & Weinberg, 2009).

Así mismo, se ha reportado que la expresión de varias claudinas se ve alterada en varios tipos de cáncer, en comparación con tejidos normales. Además su baja expresión está relacionada al daño de las uniones estrechas (UEs) durante la tumorigénesis (Osanai *et al.*, 2017).

Los mecanismos moleculares responsables de la regulación negativa de éstas proteínas pueden darse a nivel de genes, transcripcional (metilación de promotores) o post-transcripcionalmente (microRNAs), siendo más frecuentes las alteraciones por mutaciones genéticas (Boggetti & Niessen, 2012; Hudson *et al.*, 2008; Osanai *et al.*, 2017).

### **3.4 Adhesión celular y metástasis**

La capacidad metastásica de las células tumorales depende de la invasión al mesotelio, el cual está formado por capas de células mesoteliales adyacentes a la membrana basal, que representan la primera línea de defensa contra el CaOv y otros tipos de cáncer metastásicos abdominales.

Las células tumorales se unen directamente a las células mesoteliales a través de la integrina  $\beta 1$  y de CD44, dándose una sobrerregulación de genes mesenquimales (*TWIST1* y *ZEB1*) y una desregulación de genes epiteliales (*CDH1* que codifica para E-cadherina).

Esta desregulación de E-cadherina induce una sobrerregulación de la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , que a su vez regula la unión de las células tumorales a la membrana basal.

Una vez que las células tumorales interactúan con el mesotelio, sobreexpresan MMP-2 para degradar la membrana basal y ejercer fuerzas mecánicas dependientes de miosina sobre las células mesoteliales, alterando sus UIs para poder invadir al tejido conectivo subyacente (Worzfeld *et al.*, 2017).

### **3.5 Uniones intercelulares (UIs)**

Las UIs son estructuras que ayudan a la formación y mantenimiento de las barreras epiteliales y endoteliales, permitiendo una comunicación y cohesión entre células (Niessen, 2007). Dichas estructuras, ayudan a la integridad de las capas de células epiteliales que protegen a los organismos multicelulares del ambiente externo y comprenden a las UEs, uniones adherentes (UAs) y desmosomas (Dsm) (Schneeberger & Lynch, 2004). Las UEs y UAs delimitan la membrana apical de la basolateral, están implicadas en la función de barrera e intercambio de iones en los epitelios y se asocian al cinturón de actina continuo y circunferencial. Ambos complejos son altamente dinámicos, incluso en epitelios completamente polarizados (Niessen, 2007). Mientras que los Dsm son uniones que regulan la cohesión intercelular, mediante el

acoplamiento de interacciones entre cadherinas desmosomales y la red de filamentos intermedios del citoesqueleto (Kowalczyk & Green, 2013).

### 3.5.1 Uniones estrechas (UEs)

Las UEs (Figura 1) tienen dos funciones principales: la primera es la función de puerta o barrera que regula el flujo de iones, moléculas y agua a través del espacio paracelular, y la segunda es la función de defensa que ayuda a mantener y establecer la polaridad celular mediante la redistribución de lípidos en la membrana plasmática. Dichas uniones están compuestas de proteínas transmembranales como son las claudinas, ocludinas y JAMs (por sus siglas en inglés, junctional adhesion molecules) y de proteínas citoplásmicas de unión a actina como son las proteínas ZO (*zonula occludens*) (Campbell *et al.*, 2017).

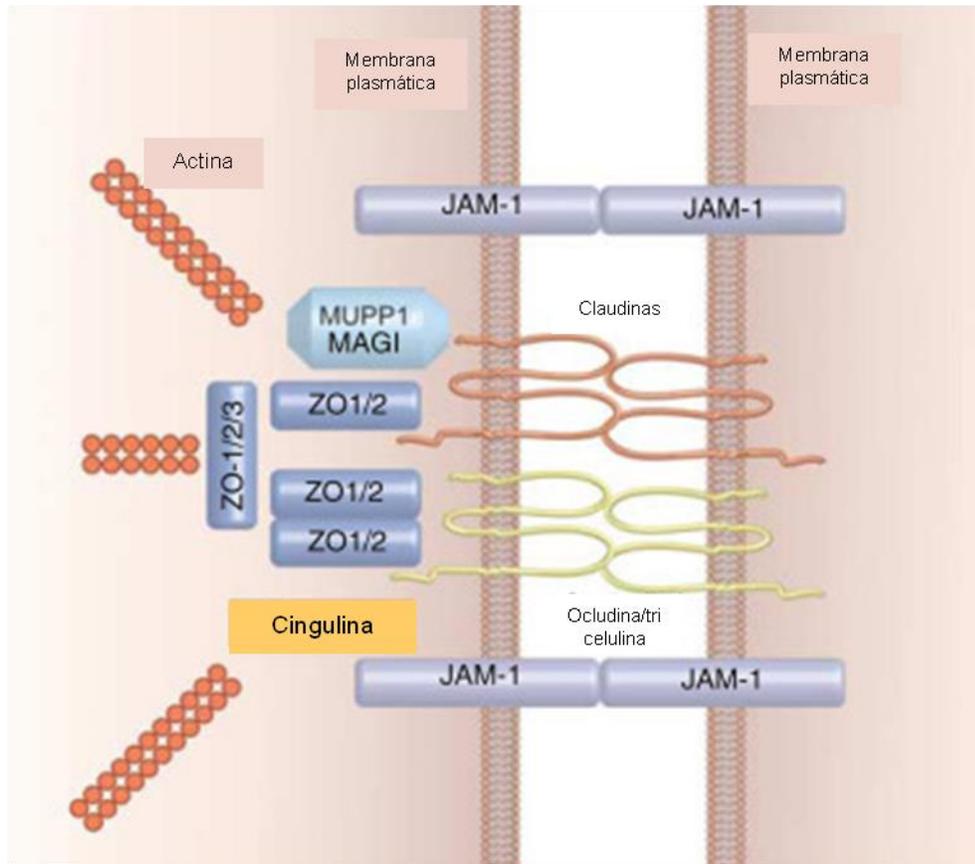
Las claudinas son proteínas de 22 kDa esenciales para la formación de las UEs, que tienen 4 dominios transmembranales, 2 loops extracelulares y extremos N- y C- terminal citoplásmicos que son diferentes en secuencia y tamaño entre claudinas (Osanai *et al.*, 2017). El primer loop extracelular incluye varios aminoácidos cargados que regulan la selectividad de carga paracelular (Colegio *et al.*, 2002). El segundo loop regula la dimerización de claudinas entre células para sellar de manera eficiente las uniones y coordinar el transporte paracelular (Piontek *et al.*, 2008). El extremo C-terminal contiene un motivo PDZ que permite que las claudinas interactúen con ZO-1; además dicho extremo interactúa con varias vías de señalización debido a que es rico en serina, treonina, y tirosina, presentando varios sitios de fosforilación (Itoh *et al.*, 1999; Osanai *et al.*, 2017; Roh *et al.*, 2002).

La ocludina es una proteína de alrededor de 60 kDa, indispensable en el ensamble de las UEs, la cual se conforma de 4 dominios transmembranales, 2 loops extracelulares y un extremo citoplásmico corto N-terminal y un C-terminal largo. El primer loop regula la interacción de ocludinas entre células y contiene un alto contenido (~61%) de residuos de tirosina y glicina en su secuencia; mientras que el segundo loop es necesario para la localización de

ésta proteína en las UEs y contiene varios residuos de tirosina (~18%) (Furuse *et al.*, 1993; Schneeberger & Lynch, 2004). Los extremos N- y C-terminal son esenciales en la interacción con otras proteínas, como ZO-1 para la función de barrera (Campbell *et al.*, 2017).

Por otro lado, las proteínas de adhesión JAMs pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y están compuestas de un dominio extracelular con 2 loops tipo IgG, una región de un solo paso transmembranal y un extremo corto citoplásmico. El dominio extracelular regula la interacción homofílica y dimerización de las JAMs entre células, para estabilizar las UEs (Bazzoni *et al.*, 2000). Asimismo, se ha demostrado que la presencia de las JAMs en las UEs incrementa la resistencia transepitelial y reduce la permeabilidad celular, siendo importantes en la regulación del ensamble de las uniones por su interacción directa o indirecta con ocludinas (Liu *et al.*, 2000). También se ha visto, que para mantener la función de barrera, las proteínas JAM reclutan complejos de proteínas de polaridad celular (PAR-3 y PAR-6) y a ZO-1 para establecer la polaridad apical y basolateral de las UIs (Ebnet *et al.*, 2003).

Por otra parte, las proteínas de andamiaje zonula occludens (ZO) pertenecen a la familia de proteínas MAGUK (por sus siglas en inglés, membrane-associated guanylate kinase homologs) y son ZO-1, -2 y -3, contienen motivos únicos que no son compartidos con otros miembros de la familia y presentan dominios PDZ y SH3 que regulan la interacción con proteínas específicas de las UEs (claudinas y JAMs) y UAs (afadina y  $\alpha$ -catenina) (Campbell *et al.*, 2017).



**Figura 1. Representación esquemática de los componentes transmembrales de la estructura básica de las UEs.** ZO-1 y ZO-2 son importantes para el agrupamiento de claudinas y ocludina, resultando en la formación de las UEs. Las proteínas ZO y cingulina proveen una interacción directa con el citoesqueleto de actina (modificado de Niessen, C. M. 2007).

### 3.5.2 Uniones adherentes (UAs)

Las UAs (Figura 2) son importantes para el inicio y mantenimiento de la adhesión intercelular en una amplia variedad de tejidos y poblaciones celulares. Estas estructuras altamente complejas contienen 2 subcomplejos: el complejo nectina-afadina y el complejo cadherina-catenina, los cuales determinan la fuerza y especificidad de las UAs (Niessen, 2007).

#### *Complejo nectina-afadina*

La proteína nectina pertenece a la familia de receptores de adhesión tipo IgG que consiste en 4 miembros: nectina-1 a -4, las cuales forman homodímeros

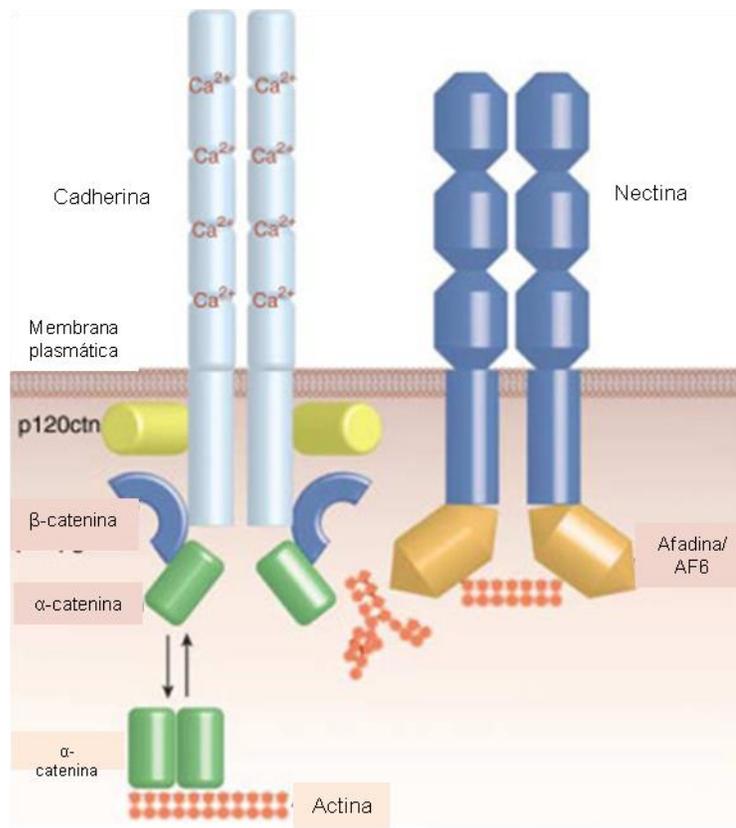
laterales que pueden formar interacciones homofílicas con otros miembros de la familia o formar interacciones heterofílicas con proteínas relacionadas. Consisten en un dominio extracelular con 3 loops tipo IgG, una región transmembranal y un dominio citoplásmico que contiene motivos PDZ que se unen a afadina. Estas proteínas regulan la adhesión celular y facilitan el establecimiento de la polaridad apical-basolateral (Campbell *et al.*, 2017).

Afadina es una proteína de unión a actina que une a nectina con el citoesqueleto de actina, lo cual es esencial para la maduración de las UAs. Así mismo, la interacción de nectina con proteínas de polaridad celular (PAR-3) asegura el establecimiento de la polaridad apico-basolateral (Campbell *et al.*, 2017).

#### *Complejo cadherina-catenina*

La superfamilia de cadherinas clásicas presenta alrededor de 20 miembros, las cuales regulan la adhesión celular por su dimerización en *cis* con otras cadherinas de la misma célula; y después del contacto con la célula vecina se da la formación de *trans* de dímeros con cadherinas de la otra célula, a través del espacio paracelular, dando lugar a una fuerte adhesión célula-célula (Campbell *et al.*, 2017).

Las cadherinas forman un complejo con las cateninas ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y p120 catenina) por repetidos armadillos que estas últimas presentan en su secuencia. Además, la interacción de cadherina con p120 catenina es crucial para la estabilidad de la superficie celular, por la regulación del proceso de endocitosis. Por otro lado, se sabe que la regulación de la polimerización de actina ocurre dentro o cerca de las UAs, siendo un proceso dependiente de  $\alpha$ -catenina o afadina (Campbell *et al.*, 2017; Niessen, 2007).



**Figura 2. Representación esquemática de los componentes estructurales básicos de las UAs.** Las UAs se componen del complejo cadherina-catenina y el complejo nectina-afadina que interactúan con los filamentos de actina (Modificado de Niessen, C. M. 2007).

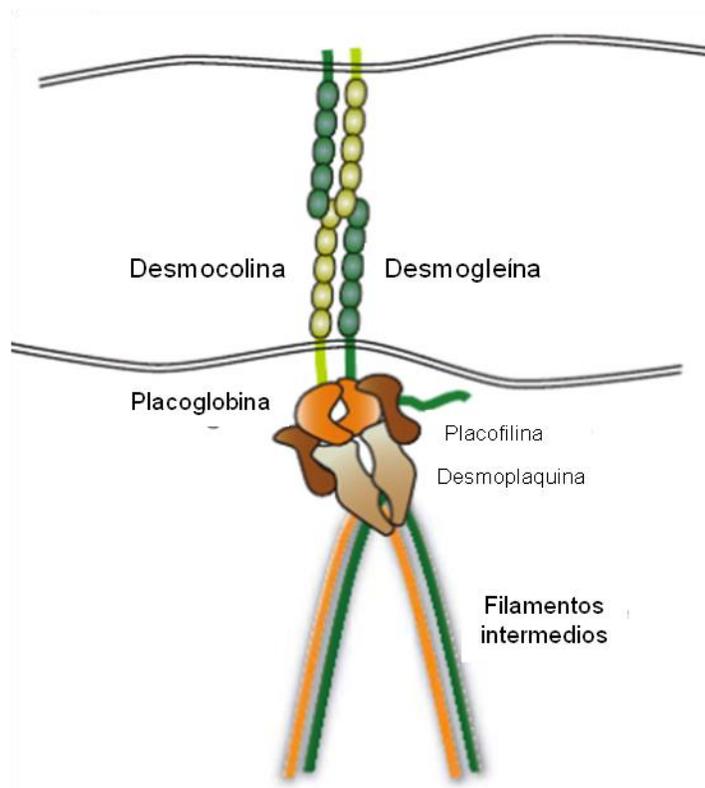
### 3.5.3 Desmosomas (Dsm)

Los Dsm (Figura 3) refuerzan por medio de contactos puntuales la adhesión intercelular, por ello son importantes en tejidos que experimentan estrés mecánico, como son el miocardio, vejiga, mucosa gastrointestinal y piel (Nelson & Elaine, 2010).

Los Dsm, se componen de glicoproteínas transmembranales (desmogleina y desmocolina), pertenecientes a la superfamilia de cadherinas. Los dominios extracelulares de las desmogleinas y desmocolinas regulan la interacción con la célula adyacente, mientras que su dominio citoplásmico interacciona

con las proteínas de la placa desmosomal que pertenecen a la familia de proteínas armadillo y plaquina (Nelson & Elaine, 2010).

La proteína placoglobina, perteneciente a la familia de proteínas armadillo, se une directamente a los dominios citoplásmicos de desmogleína y desmocolina. Por otro lado, la proteína desmoplaquina que pertenece a la familia de proteínas plaquina, interactúa con placoglobina y otro subgrupo de la familia de proteínas armadillo, la placofilina. Finalmente, la interacción entre desmoplaquina y los filamentos de queratina forman una placa densa interna, uniendo la red del citoesqueleto al complejo de adhesión (Nelson & Elaine, 2010).



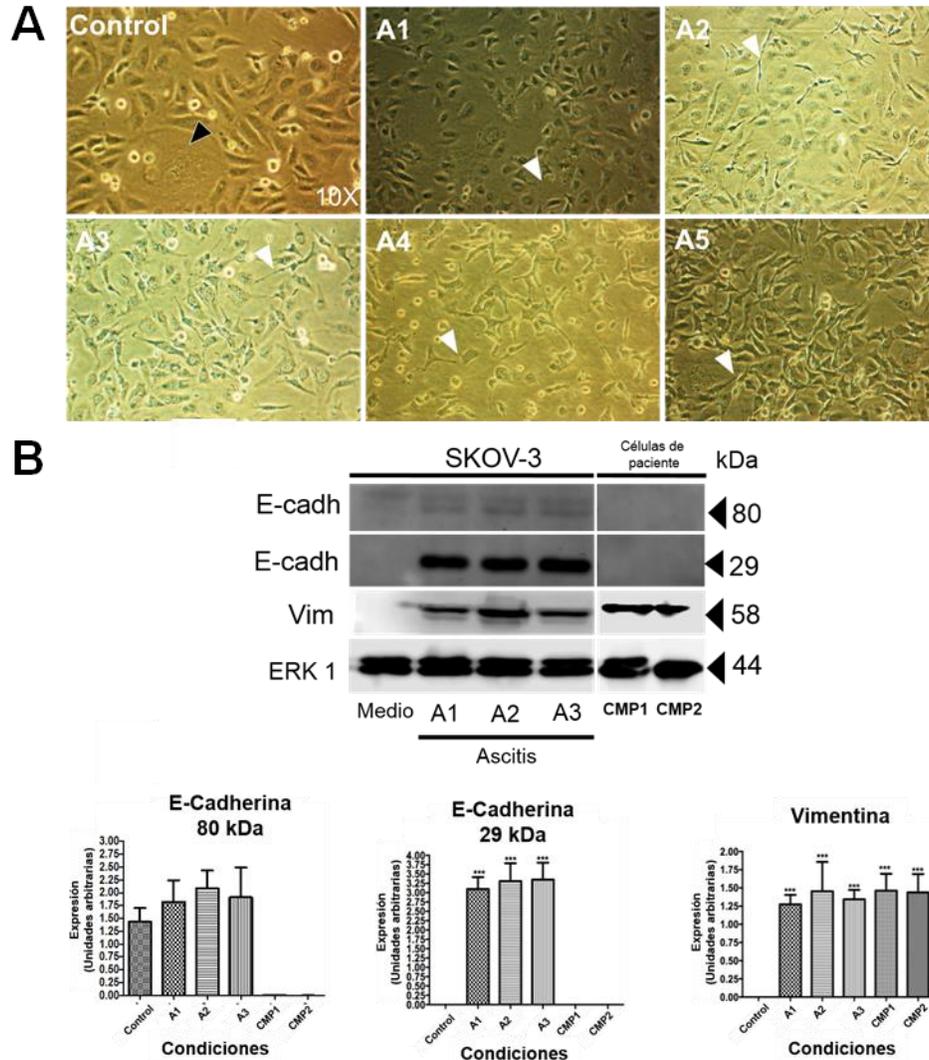
**Figura 3. Representación esquemática de los componentes que conforman los Dsm.** Los Dsm se componen de complejos multiproteicos basados en cadherinas que unen la adhesión celular al sistema de filamentos intermedios (Modificado de Rüksam *et al.*, 2017).

## IV. ANTECEDENTES

Se sabe que la línea celular SKOV-3 de adenocarcinoma ovárico humano (ATCC® HTB-77™) presenta una morfología de tipo epitelial, sin embargo, en un análisis de 43 líneas celulares de CaOv, clasificaron a las células SKOV-3 con un fenotipo intermedio mesenquimal por su alta expresión de N-cadherina y *ZEB1*, y una baja expresión de E-cadherina y ERBB3/HER3. Además son células con una elevada capacidad esferoidogénica y de resistencia a anoikis (Huang *et al*, 2013).

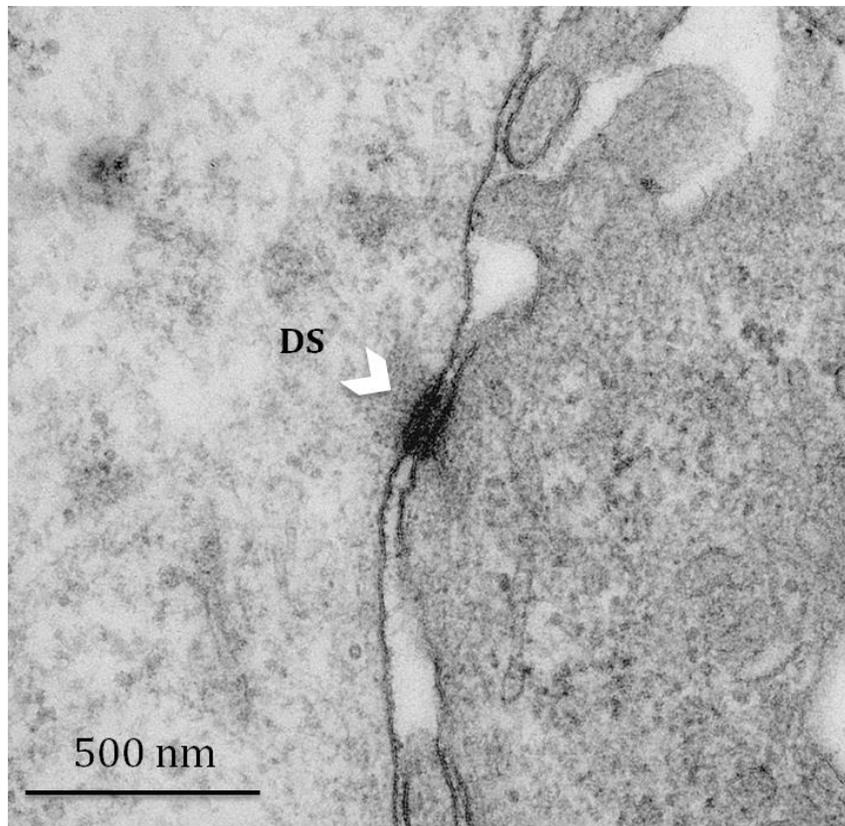
En nuestro grupo de investigación se ha utilizado como modelo de estudio de CaOv a las células SKOV-3 y al LA proveniente de pacientes con CaOv.

Toledo-Leyva *et al* (2017) en su tesis de doctorado analizó el efecto de varios LA sobre la línea celular SKOV-3 y observó cambios morfológicos hacia un fenotipo alargado tipo fibroblasto, con abundantes prolongaciones, sugiriendo que estas células sufren un proceso de TEM (Figura 4A). Para confirmarlo, analizó por WB la expresión de E-cadherina como marcador epitelial y, vimentina como marcador mesenquimal, observando que las células SKOV-3 en presencia de LA presentan la expresión de ambos marcadores, lo que sugiere un fenotipo intermedio; mientras que las células malignas de pacientes expresan solo vimentina, lo que sugiere un fenotipo mesenquimal (Figura 4B). Además, se observó que el anticuerpo anti-E cadherina (DECMA) detectó una proteína a 29 kDa (Figura 4B), la cual puede corresponder a un pequeño fragmento resultante de la digestión de E-cadherina por metaloproteinasas (Steinhusen *et al*. 2000).

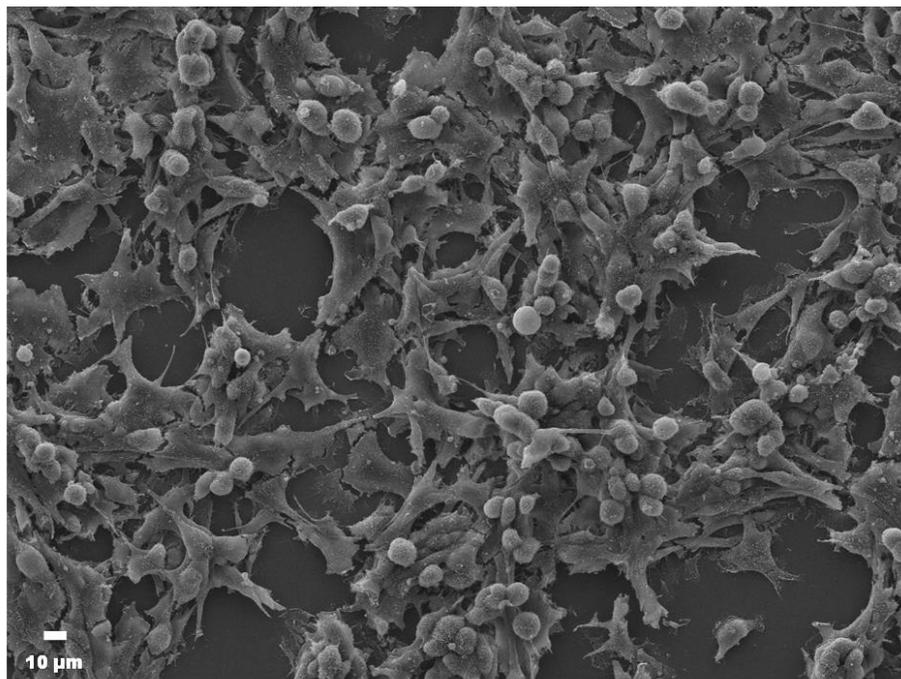


**Figura 4. TEM inducida por LA.** A) Cambios morfológicos mostrando protrusiones de membrana (flechas blancas) de células SKOV-3 inducidos por varios LA . B) Análisis por WB de E-cadherina y vimentina en células SKOV-3 inducidas con LA y células malignas de pacientes (CMP1, CMP2) con COE. (Modificado de Toledo-Leyva, Tesis de doctorado, 2017)

En ensayos preliminares realizados por microscopía electrónica de transmisión (MET) con tinción de rojo rutenio de células SKOV-3 en cultivo normal, pudimos observar que estas células solo presentan uniones de tipo Dsm (Figura 5). Además, al analizar estas células por microscopía electrónica de barrido (MEB) observamos que crecen como multicapas (Figura 6) (Sánchez M.E. & Chávez B 2017, imágenes no publicadas).



**Figura 5. Dsm en células SKOV-3 en cultivo normal.** Formación de Dsm en células SKOV-3 en cultivo normal observadas por MET con tinción de rojo rutenio. DS: desmosoma. Escala 500 nm.



**Figura 6. Multicapas de células SKOV-3.** Formación de multicapas de células SKOV-3 en cultivo normal observadas por MEB. Escala 10 μm.

## V. JUSTIFICACIÓN

Las UIs sufren alteraciones en diferentes tipos de cáncer, por un microambiente tumoral que proporciona estímulos que modifican la expresión de proteínas de las UIs lo que incrementa la capacidad invasiva de las células malignas.

En cuanto al CaOv, el LA constituye parte del microambiente tumoral donde diferentes tipos celulares liberan moléculas inductoras. Estudios anteriores se centran en estudiar algunas de estas proteínas como marcadores de la TEM en COE, sin caracterizar que tipos de UIs presentan estas células y como se ven afectadas en presencia del LA de pacientes con COE.

Por lo anterior, resulta necesario analizar los componentes de las UIs en la línea celular SKOV-3 y el efecto del LA sobre la expresión de transcritos y proteínas que conforman estas estructuras, para entender mejor su papel en el proceso de la TEM.

## **VI. HIPÓTESIS**

Las células malignas de CaOv presentan alteraciones en la expresión de proteínas que forman las uniones intercelulares lo que contribuye a la transición epitelio-mesénquima.

## **VII. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

- Analizar la presencia de transcritos y proteínas que conforman las UIs en la línea celular SKOV-3, en ausencia y presencia de LA.

### **Objetivos específicos**

- Realizar un análisis bioinformático comparativo de los transcritos y proteínas que conforman las UIs en células normales y cancerosas.
- Comparar por MET el tipo de UIs presentes en la línea celular SKOV-3, en presencia y ausencia de LA.
- Analizar la expresión de algunos de los transcritos de los componentes de las UIs en la línea celular SKOV-3, en presencia y ausencia de LA.
- Determinar la localización celular de algunas de las proteínas que conforman las UIs en la línea celular SKOV-3, en presencia y ausencia de LA.

## VIII. ESTRATEGIA METODOLÓGICA



## **IX. METODOLOGÍA**

### **Cultivo de líneas celulares**

La línea celular de carcinoma ovárico humano SKOV-3 (ATCC® HTB-77™) y la línea celular de adenocarcinoma colorrectal Caco-2 (ATCC® HTB-37™), la cual se utilizó como control, se cultivaron en medio de cultivo McCoy 5A modificado (Gibco, No. Cat.: 16600-082) y en medio DMEM (Gibco, No. Cat.: 31600-083) respectivamente, suplementados con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina/estreptomicina a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

### **Obtención y procesamiento de ascitis de pacientes con COE**

El LA se recuperó de pacientes diagnosticadas con CaOv en el Instituto Nacional de Cancerología de México (INCan), bajo la aprobación de los comités científicos y de bioética (No. de protocolos INCAN/CC/134/09 y CB/549/09) y cartas de consentimiento informado firmadas por las pacientes antes de la toma de muestra. El LA se extrajo por paracentesis bajo condiciones de esterilidad y se colocó en cajas de cultivo para ser transportado al laboratorio en un recipiente con refrigerante y procesarlo inmediatamente. El LA se centrifugó a 4,000 rpm por 10 min a 4°C para recuperar el sobrenadante libre de células. Las muestras de LA fueron etiquetadas y almacenadas a -70 °C para su uso posterior.

### **Microscopía electrónica de transmisión (MET)**

Para observar la ultraestructura y analizar si hubo alteración en la permeabilidad paracelular, las células SKOV-3 se cultivaron en cajas de cultivo T-25 con un inóculo inicial de  $5 \times 10^5$  células durante 5 días (cultivo confluyente). Posteriormente, las células se incubaron con LA durante 24 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las muestras se procesaron para ensayos de permeabilidad paracelular por MET con tinción de Rojo rutenio, se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en cacodilato de sodio durante 1 h a TA, se lavaron tres veces con cacodilato de sodio 0.1 M y

se dejaron en una solución 0.5 mg de Rojo rutenio / ml de tetróxido de osmio al 1% durante 1 h a TA. Posteriormente, se lavaron las muestras con cacodilato de sodio 0.1 M, con agua bidestilada y etanol al 25%. Después, se deshidrataron con alcoholes graduales: 50, 70, 90 y 100% y se les agregó óxido de propileno (No. Cat. 20401, EMS) para transferir la capa de células a un tubo Eppendorf. Se dejaron en una solución de preinclusión 1:1 de resina Polybed 812 y óxido de propileno durante toda la noche (ON) a TA, la solución se retiró y se agregó una solución de inclusión 2:1 de resina Polybed 812 y óxido de propileno durante 1 h 30 min. Finalmente, las muestras se incluyeron haciendo tres cambios de resina pura de 1 h cada uno para transferir las células a moldes de inclusión y dejar polimerizar a 60 °C durante 24 h. Se obtuvieron cortes finos de 60 nm mediante el uso de un Ultramicrotomo (Reichert-Jung, Leica microsystems, Germany) y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo para después ser analizados mediante un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011.

### **Análisis bioinformático y diseño de primers**

Con la finalidad de elegir las proteínas a estudiar y algunas que estuvieran relacionadas con cáncer de ovario, se realizó un análisis bioinformático de transcritos y proteínas que conforman las UEs, UAs y Dsm en bases de datos como son UniProtKB, GeneCards y Ensembl para conocer su estructura, función o mutaciones reportadas en ciertas enfermedades con la finalidad de elegir las proteínas a estudiar y algunas que estuvieran relacionadas con cáncer de ovario. De los transcritos seleccionados con base en la secuencia de *Homo sapiens*, se diseñaron primers usando los softwares PRIMER3 (<http://primer3.ut.ee/>) y Primer BLAST-NCBI (Tabla 1).

	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Producto (pb)	
UEs	Claudina 1	GGAAGACGATGAGGTGCAGA	GCAGCCCAGCCAGTGAAGAG	189
	Claudina 4	GCCTTCATCGGCAGCAACAT	GCAGTTGGTACACTTGCCCC	222
	ZO-1	GTCTGCCATTACACGGTCCT	CTTAAAGAATCAGCTTGTGG	312
	ZO-2	CGTCTAGTCCTGAAGATGA	CCACAAGCCAGGATGTCTCT	317
UAs	Ocludina	CGCCTGTGGATGACTTCAGG	TCAGCAGCAGCCATGTACTC	364
	E-cadherina	GGTTCAAGCTGCTGACCTTC	AGGCACAAAGATGGGGGC	433
Dsm	$\beta$ -catenina	CCTCCCAAGTCCTGTATGAG	CTTCAGCACTCTGCTTGTGG	860
	Desmogleína 2	GCCACAGAGCCTTATTGTGA	GCTGCACACCTGAGCTGG	221
	Desmoplaquina	GAGAGGATGGATCACCTGCG	GCTGGATGCTGATTGAGGAC	239

**Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para RT-PCR.** Diseño de oligonucleótidos empleados para la amplificación de los mRNA de UEs (claudina 1, claudina 4, ZO-1, ZO-2), UAs (E-cadherina y  $\beta$ -catenina) y Dsm (desmogleína 2 y desmoplaquina), diseñados con base en la secuencia canónica de *Homo sapiens*, empleando los softwares PRIMER3 y Primer BLAST-NCBI.

### **Aislamiento de RNA total por el método de “TRizol”**

Para analizar la expresión de los transcritos antes mencionados, se utilizaron células SKOV-3 cultivadas en cajas T-25 en cultivo confluyente (inóculo inicial  $5 \times 10^5$  células) y cultivo disperso (inóculo inicial  $2 \times 10^5$  células), incubadas en presencia de LA a 24, 48 y 72 h a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Las células fueron lisadas directamente en las cajas con 2 ml de TRizol (Invitrogen, No Cat.: 15596018) y se recuperaron en tubos eppendorf nuevos. Para permitir la disociación completa de los complejos nucleoprotéicos se dejaron reposar las muestras durante 5 min a TA. Posteriormente, se adicionaron 200  $\mu$ l de cloroformo por cada ml de TRizol y se realizó un ciclo de vortex/reposo (15 seg/15seg) por 5 min. Las muestras se centrifugaron a 6,000 rpm por 15 min a 4 °C y se procedió a transferir la fase acuosa (fase superior más clara) a otro tubo nuevo. Después el RNA de la fase acuosa se precipitó con 500  $\mu$ l de isopropanol por cada ml de TRizol utilizado para la homogeneización inicial. Se mezclaron las muestras, se incubaron 10 min a TA y se centrifugaron a 6,000 rpm por 10 min a 4 °C, formándose un precipitado en el fondo del tubo. Se retiró el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 75% por cada ml de TRizol. Después, se centrifugaron a 3,500 rpm por 5 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla, la cual

después se resuspendió en 20 µl de agua DEPC (pirocarbonato de dietilo). Finalmente, las muestras se incubaron en baño de agua a 55-60 °C por 15 min y se almacenaron a -20 °C. La concentración de RNA total se calculó por la absorbancia a 260 nm de la muestra en una dilución 1:500 en agua DEPC con la siguiente fórmula:

$$[RNA] = \frac{Abs\ 260\ nm \times factor\ de\ dilucion \times 40}{1000} = [\mu g/\mu l]$$

### **RT-PCR**

Para la síntesis de cDNA se utilizó el First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo scientific, #K1612), de acuerdo a lo indicado por el fabricante. Se realizó una mezcla (volumen final 12 µl) con 5 µg de RNA total por condición, 1 µl de oligo dT y agua DEPC, que fue incubada 5 min a 65 °C. Posteriormente, se agregaron 4 µl de buffer de reacción 5X, 1 µl del inhibidor de ribonucleasas RiboLock™ (20u/µl), 2 µl del dNTP mix 10 mM y 1 µl de M-MuLV transcriptasa reversa (20u/µl), y las muestras se incubaron 60 min a 37 °C y 5 min a 70 °C en un termociclador iCycler (BIO-RAD).

El cDNA se procesó durante 30 ciclos de amplificación usando el termociclador iCycler (BIO-RAD). La reacción de PCR se realizó en una mezcla de reacción (volumen final 20 µl) con 10 µl de PCR Master Mix (2x) (Thermo scientific, #K0171), 3 µl de oligos sentido, 3 µl de oligos anti-sentido, 3 µl de cDNA y 1 µl de agua DEPC. Los productos de amplificación se procesaron en un gel de agarosa al 2% con 0.02% de bromuro de etidio.

Como control de carga se amplificó de la enzima constitutiva gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

### **Inmunofluorescencia**

Cultivos confluentes de células SKOV-3 y Caco-2 crecidos sobre cubreobjetos en caja Petri, se mantuvieron en condiciones de medio de

cultivo y en inducción con LA durante 24 h a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se les retiró el medio y LA, se lavaron tres veces con PBS, se fijaron con etanol al 95% durante 30 min a -20 °C y se lavaron tres veces con PBS. Las muestras se bloquearon con 0.5% de albúmina sérica bovina (BSA) en PBS durante 1 h a TA. Cada muestra se incubó ON a 4 °C más 1 h a TA, con los siguientes anticuerpos primarios diluidos en PBS dirigidos contra proteínas de las UEs: anticuerpo monoclonal de ratón anti-Claudina 4 (dilución 1:100, Invitrogen, No. Cat. 32-9400), anticuerpo policlonal de conejo anti-Ocludina (dilución 1:100, Invitrogen, No. Cat. 71-1500) y anticuerpo policlonal de conejo anti-ZO1 (dilución 1:100, Invitrogen, No. Cat. 40-2200); proteínas de las UAs: anticuerpo monoclonal de rata anti-E cadherina (dilución 1:100, Santa Cruz, No. Cat. sc-59778) y anticuerpo monoclonal de ratón anti- $\beta$  catenina (Santa Cruz); y proteínas de Dsm: anticuerpo monoclonal de ratón anti-desmogleína 2 (Santa Cruz, No. Cat. sc-365856). Después las muestras se lavaron tres veces con PBS y se incubaron por 1 h a TA con los siguientes anticuerpos secundarios: FITC de cabra anti-ratón (Invitrogen, No. Cat.: 819511), FITC de burro anti-ratón (Jackson Immuno Research, No. Cat.: 715096150), AF594 de burro anti-ratón (Invitrogen, No. Cat.: A21203), TRITC de pollo anti-ratón (Invitrogen, No. Cat.: A15986) y FITC de burro anti-conejo (Jackson Immuno Research, No. Cat.: 711095152). Los núcleos se tiñeron con Hoechst (dilución 1:1000. Thermo Fisher Scientific, No. Cat.: 62249) durante 20 min a TA y finalmente la muestras se montaron con medio de montaje VectaShield (No. Cat. H-1000, Vector Laboratories). Como control negativo las células se incubaron sólo con el anticuerpo secundario. Finalmente, las muestras se observaron en un microscopio confocal Carl Zeiss (Carl Zeiss LMS 700) y los resultados de inmunofluorescencia se analizaron con el software del microscopio (ZEN 2011, Carl Zeiss Microscopy).

## X. RESULTADOS

### 10.1 Análisis bioinformático de transcritos y proteínas que conforman las UIs

Para la búsqueda de transcritos y proteínas que conforman las UEs, UAs y Dsm, se realizó una búsqueda bioinformática en bases de datos como UniProt, NCBI, The Human Protein Atlas, Ensembl, GeneCards y Expression Atlas.

Al analizar la expresión de transcritos y proteínas reportados en tejido de ovario sano (Figura 7A) y tejido tumoral de pacientes con CaOv (Figura 7B), pudimos observar que hay una expresión diferencial tanto en la expresión de mRNA como en la expresión proteica de las moléculas que componen las UIs en ambas condiciones.

Por otro lado, se hizo la búsqueda de expresión de transcritos para los genes analizados en el genoma humano (Tabla 2) y observamos que la mayoría de genes codifican para varios transcritos y que no todos codifican para proteína. Los transcritos que no codifican proteína pueden ser transcritos con intrones retenidos que son modificados por splicing alternativo y que contienen secuencias intrónicas relativas a otras variantes codificantes; o transcritos procesados que no contienen un marco de lectura abierta.

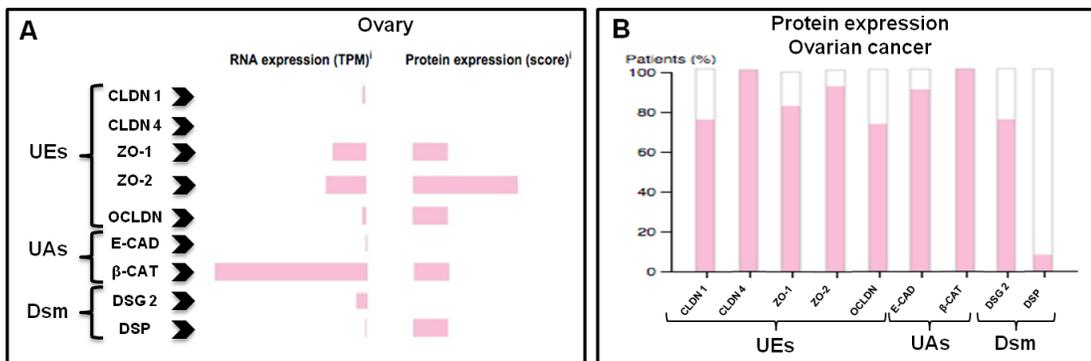


Figura 7. Análisis bioinformático de la expresión de transcritos y proteínas de UIs en tejido ovárico y cáncer de ovario. A) Expresión diferencial de RNA y proteínas de las UIs en tejido ovárico sano. B) Expresión proteica en pacientes con CaOv. Base de datos utilizada "The Human Protein Atlas" (<https://www.proteinatlas.org/>).

	Gen	No. de transcritos	Transcritos que codifican proteína
UEs	Claudina 1	2	1
	Claudina 4	5	3
	ZO-1	12	8
	ZO-2	12	8
	Ocludina	5	3
UAs	E-cadherina	14	5
	$\beta$ -catenina	15	10
Dsm	Desmogleína 2	2	2
	Desmoplaquina	3	2

**Tabla 2. Número de transcritos encontrados para cada uno de los genes analizados.** Búsqueda bioinformática de transcritos encontrados en el genoma humano para cada y cuales de ellos codifican para proteína. Base de datos utilizadas The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>), Ensembl (<https://mar2017.archive.ensembl.org/>) y GeneCards (<https://www.genecards.org/>).

## 10.2 Las células SKOV-3 en cultivo confluyente pueden llegar a formar UEs y Dsm

Con base a los estudios preliminares, donde se observó la formación de uniones de tipo Dsm en células SKOV-3 en cultivo normal, se decidió evaluar si las condiciones de confluencia podrían llevar a la formación de UEs y UAs. Por consiguiente, las células SKOV-3 se cultivaron en condiciones confluentes con el doble del inóculo inicial y se procesaron hasta alcanzar un 90-100% de confluencia, para posteriormente inducir a las células con LA durante 24 h a 37 °C (Figura 8).

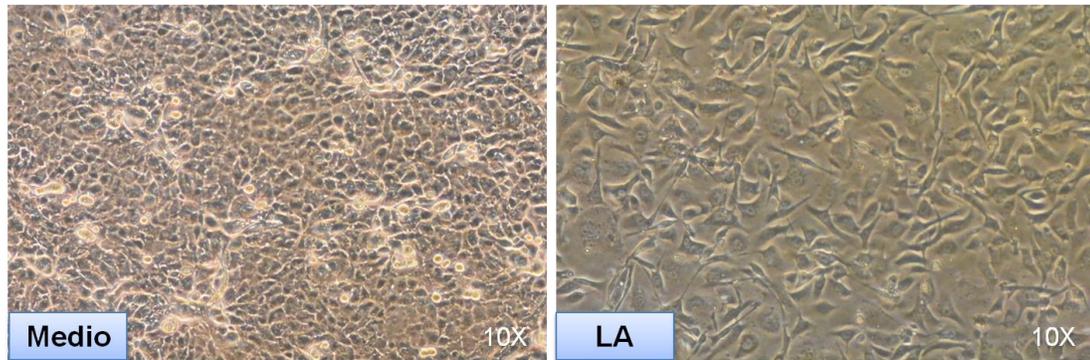
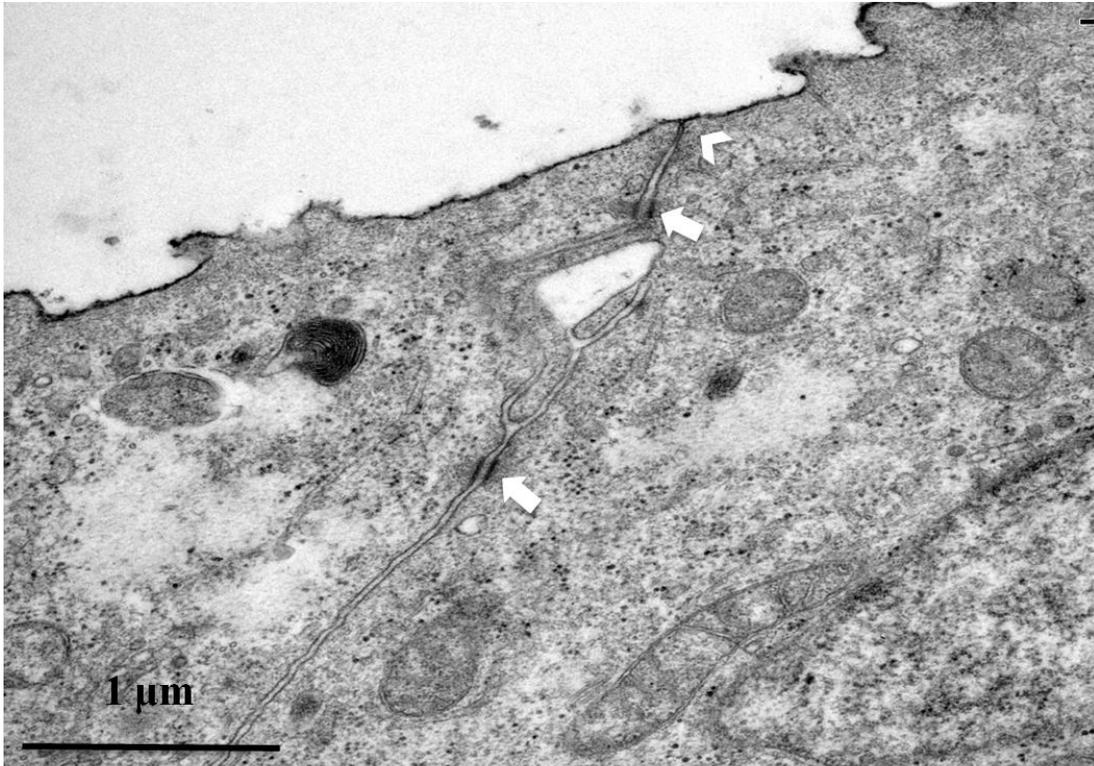


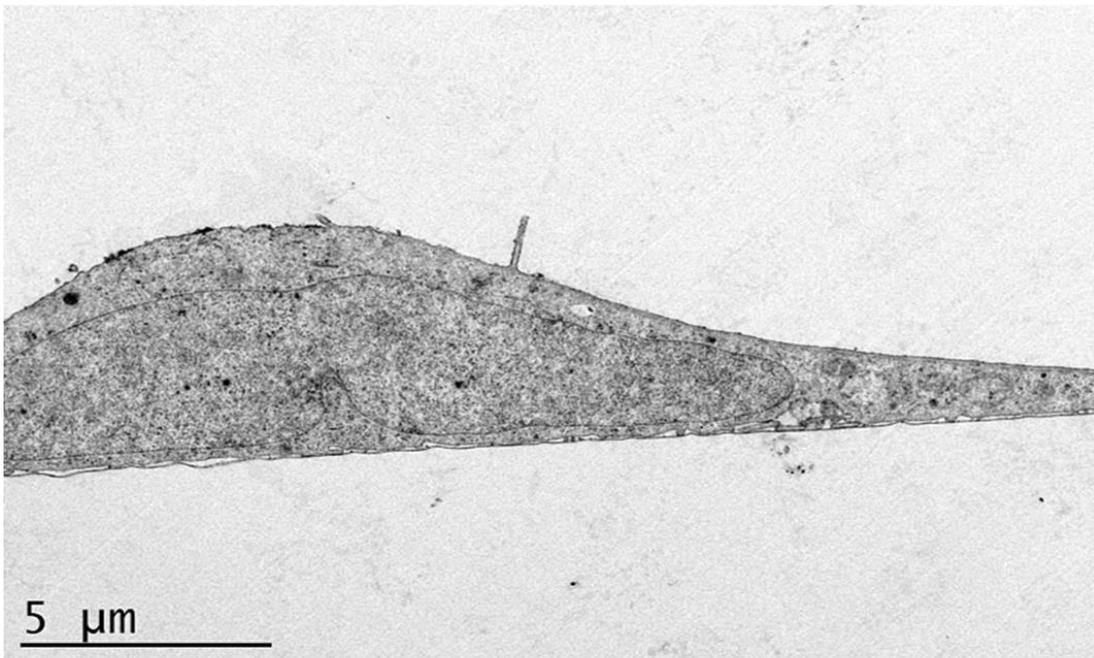
Figura 8. Células SKOV-3 en condición de cultivo confluyente. Fotomicrografías por microscopía óptica por la técnica de contraste de fases (objetivo 10X). Células SKOV-3 en medio con un inóculo inicial de  $5 \times 10^5$  células durante 5 días e inducción con LA durante 72 h.

Las muestras se procesaron para la técnica convencional de MET con tinción de rojo rutenio, el cual es un colorante que reconoce polisacáridos en la superficie celular y que en combinación con tetróxido de osmio forma un material electrodensito (Dierichs R., 1979). Dicha molécula electrodensa difunde a lo largo del espacio paracelular pero se detiene a nivel de la UE, indicando que hay una barrera por la ruta paracelular (Günzel, D., & Yu, A. S. L. 2013).

Se observó que las células SKOV-3 en cultivo confluyente si pueden formar UEs y Dsm (Figura 9), ya que no hay paso del rojo rutenio por el espacio paracelular a nivel de la UE. Además, los Dsm se aprecian claramente a lo largo de la membrana lateral de las células. Por su parte, las células inducidas con LA presentan una morfología alargada, confirmando lo que se observó por microscopía óptica y que sugiere que los cambios observados se deben a la inducción del proceso de TEM, en el cual pierden las UIs para ganar capacidad migratoria e invasiva (Figura 10).



**Figura 9.** Células SKOV-3 en condición de cultivo confluyente forman UEs y Dsm. MET con tinción de rojo rutenio de células SKOV-3 en cultivo confluyente que forman UEs (cabeza de flecha) y Dsm (flecha blanca). Escala 1 μm.



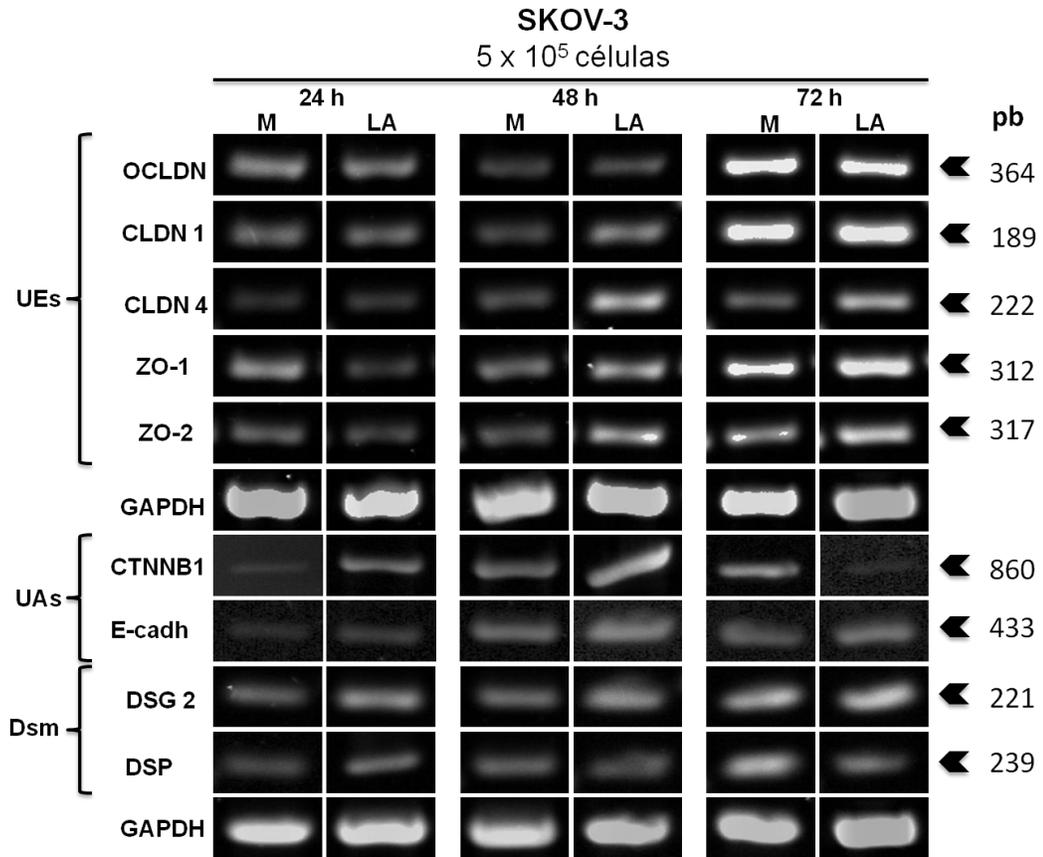
**Figura 10.** Células SKOV-3 en inducción con LA durante 72 h. MET de células SKOV-3 en LA durante 72 h que muestra la morfología alargada de las células. Escala 5 μm.

### **10.3 Las células SKOV-3 en cultivo confluyente y subconfluyente control e inducidas con LA, expresan todos los mRNA analizados para UEs, UAs y Dsm**

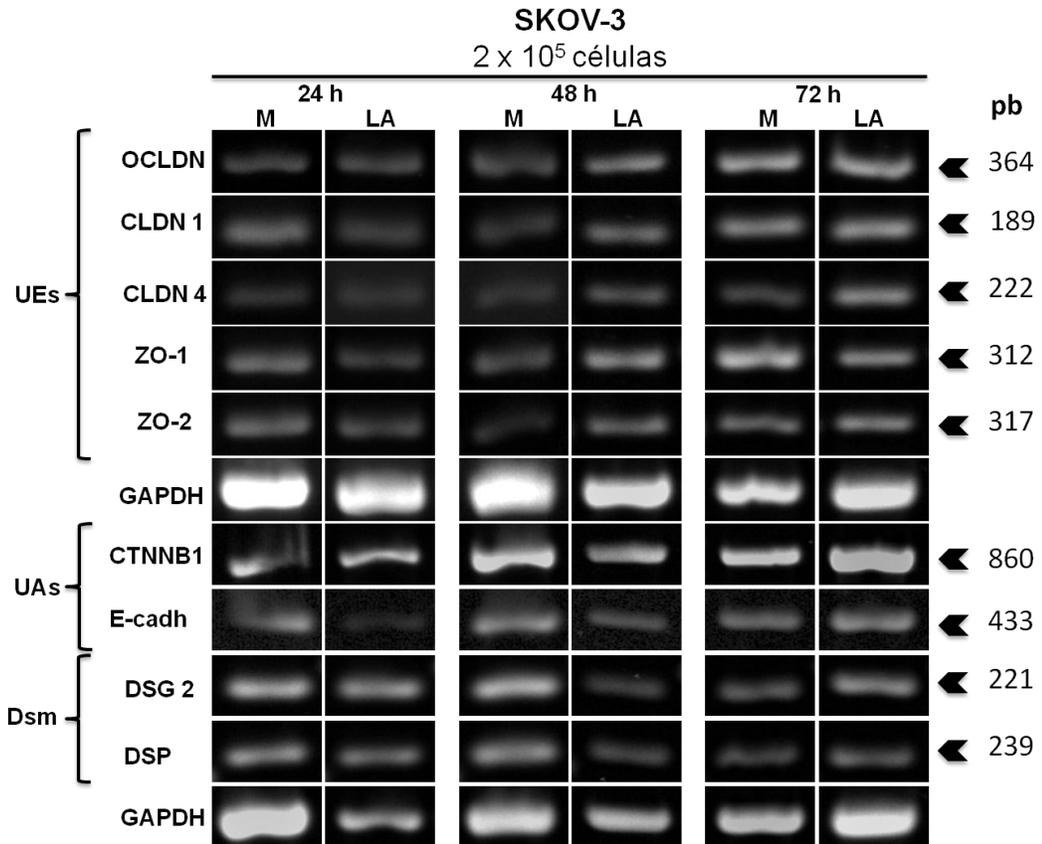
Para evaluar la expresión de transcritos de genes involucrados en las UEs, UAs y Dsm, se hicieron ensayos de RT-PCR con los oligos diseñados y a partir de células SKOV-3 en cultivo confluyente (inóculo inicial  $5 \times 10^5$  células) y subconfluyente (inóculo inicial  $2 \times 10^5$  células), control e inducidas con LA durante 24, 48 y 72 h a 37 °C.

En la Figura 11 se muestra el perfil de expresión de transcritos a partir de células SKOV-3 confluentes control e inducidas con LA, encontrando que se amplificaron todos los mensajeros analizados en los tamaños esperados: *OCLDN* (364 pb), *CLDN 1* (189 pb), *CLDN 4* (222 pb), *ZO-1* (312 pb), *ZO-2* (317 pb), *CTNNB1* (860 pb), *E-cadh* (860 pb), *DSG 2* (221 pb) y *DSP* (239 pb). Lo anterior permite concluir que las células en ambas condiciones de cultivo expresan los mensajeros correspondientes para las proteínas de interés de las diferentes UIs.

Así mismo, en la Figura 12 se muestra la expresión de todos los transcritos a partir de células SKOV-3 en cultivo subconfluyente control e inducidas con LA. Estos resultados indican que no importa el grado de confluencia o si las células SKOV-3 son inducidas con LA, ya que en estas condiciones expresan todos los mRNA de las proteínas que conforman las UIs.



**Figura 11.** Expresión de mRNA de proteínas implicadas en la formación de UIs en cultivo confluyente de células SKOV-3 control y LA. Expresión de mRNA de las proteínas que forman las UEs (occludina, claudina 1, claudina 4, ZO-1, ZO-2), UAs ( $\beta$ -catenina y E-cadherina) y Dsm (desmogleina 2 y desmoplaquina) por RT-PCR en células SKOV-3 en cultivo confluyente control e inducidas con LA durante 24, 48 y 72 h.



**Figura 12. Expresión de mRNA de proteínas implicadas en la formación de UIs en cultivo subconfluente de células SKOV-3 control y LA.** Expresión de mRNA de las proteínas que forman las UEs (occludina, claudina 1, claudina 4, ZO-1, ZO-2), UAs ( $\beta$ -catenina y E-cadherina) y Dsm (desmogleína 2 y desmoplaquina) por RT-PCR en células SKOV-3 en cultivo subconfluente control e inducidas con LA durante 24, 48 y 72 h.

#### **10.4 Localización subcelular de las proteínas que conforman las UIs**

Para determinar si las proteínas se encuentran localizadas en la membrana plasmática, se analizó la localización subcelular de las proteínas de UEs (claudina 4, ocludina, ZO-1), UAs (E-cadherina,  $\beta$ -catenina) y Dsm (desmogleína 2), mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta por microscopía confocal de células SKOV-3 en medio control e inducidas con LA durante 24 h. Como un control de la localización y expresión de las proteínas analizadas, se utilizó la línea celular de adenocarcinoma colorrectal Caco-2, la cual forma un epitelio resistente que desarrolla resistencia transepitelial (Datta & Weis, 2015).

En el caso de las proteínas de UEs, se observó que claudina 4 (Figura 13A) tiene una expresión mínima en células SKOV-3 en medio control, mientras que en condición de LA, la proteína incrementa y se localiza en citoplasma. El patrón es muy diferente al observado en las células epiteliales Caco-2, las cuales presentan predominantemente a la claudina 4 en la membrana plasmática y un poco en citoplasma.

Por otro lado, la proteína ocludina (Figura 13B) en células SKOV-3 crecidas en medio control presenta una expresión mínima en membrana y una localización nuclear/nucleolar; mientras que en la condición de LA se observó predominantemente en el núcleo/nucléolo. Por su parte, las células Caco-2 control, ocludina se expresa principalmente en membrana, y un poco en núcleo.

Así mismo, la proteína ZO-1 (Figura 13C) en células SKOV-3 en medio control se observó localizada en membrana y citoplasma, mientras que en células tratadas con LA se localiza solo en el citoplasma, aparentemente en estructuras tipo vesículas. Esta proteína presenta una localización membranal en la línea celular control.

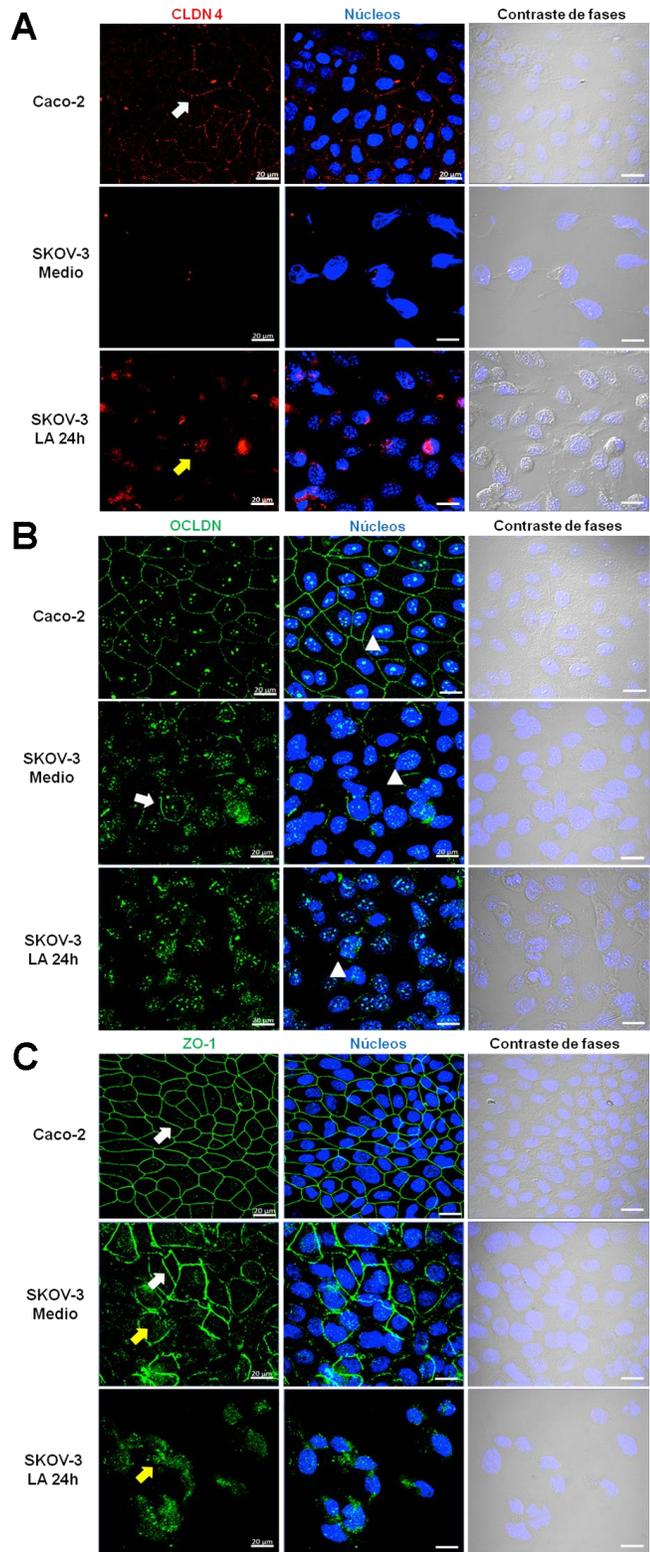


Figura 13. Localización subcelular de proteínas que forman las UEs en células SKOV-3 en medio control y LA. Inmunofluorescencia indirecta de la expresión y localización subcelular de las proteínas A) claudina 4, B) occludina y C) ZO-1 en células SKOV-3 en medio y en inducción de LA durante 24 h. Como control positivo de localización de estas proteínas se usarón células Caco-2. Flecha blanca: localización membranal. Cabeza de flecha: localización nuclear. Flecha amarilla. Localización citoplásmica.

En cuanto a las proteínas de UAs, se observó que E-cadherina (Figura 14A) tuvo una ligera expresión citoplásmica en células SKOV-3 en medio control, no obstante las células en LA no expresaron la proteína. En cambio, en células control Caco-2, la E-cadherina se localiza claramente en la membrana.

Algo similar sucedió con la proteína  $\beta$ -catenina (Figura 14B) en células SKOV-3 control y en condición de LA donde incremento su expresión y se localizó en el citoplasma y en algunos puntos del núcleo. A diferencia de las células control, donde  $\beta$ -catenina se observa localizada en la membrana.

Finalmente, la proteína desmogleína 2 (Figura 14C) que pertenece a las uniones de tipo Dsm se encuentra localizada en la membrana y citoplasma de células SKOV-3 en medio control. En tanto que en condición de LA se localiza solo en citoplasma. Por su parte, las células Caco-2 presentan a la desmogleína 2 en la membrana plasmática.

Con lo anterior, se concluye que las células SKOV-3 control forman UEs y Dsm. Sin embargo, estas células al ser inducidas con LA pierden las UIs y relocalizan estas proteínas.

Proteína	SKOV-3 Medio		SKOV-3 LA	
	Expresión	Localización	Expresión	Localización
Claudina 4	-	-	+	Citoplasma
Ocludina	+	Membrana Núcleo	+	Núcleo
ZO-1	+	Membrana Citoplasma	+	Citoplasma Vesículas
E-cadherina	+	Citoplasma	-	-
$\beta$ -catenina	-	-	+	Citoplasma Núcleo
Desmogleína 2	+	Membrana Citoplasma	+	Citoplasma

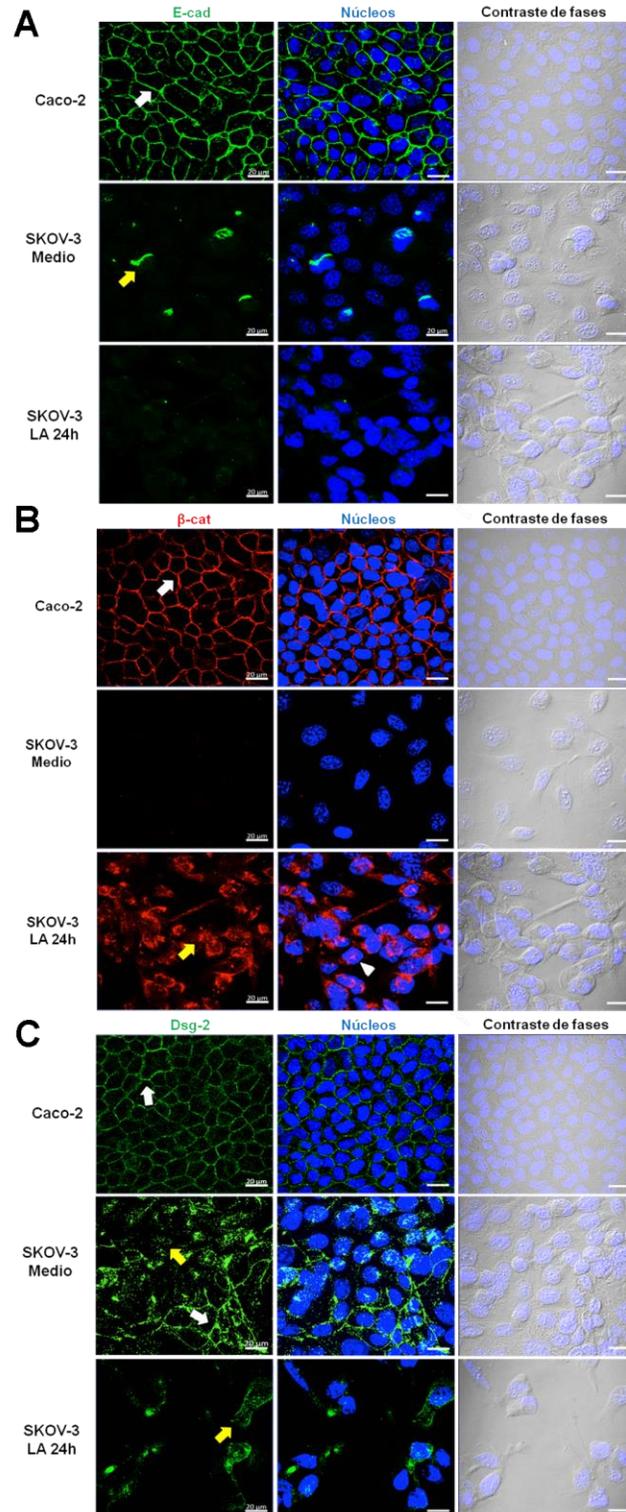


Figura 14. Localización subcelular de proteínas que forman las UAs y Dsm en células SKOV-3 en medio control y LA. Inmunofluorescencia indirecta de la expresión y localización subcelular de las proteínas de uniones adherentes A) E-cadherina, B)  $\beta$ -catenina y de desmosomas C) desmogleína 2 en células SKOV-3 en medio y en inducción de LA durante 24 h. Como control positivo de localización de estas proteínas se usarán células Caco-2. Flecha blanca: localización membranal. Cabeza de flecha: localización nuclear. Flecha amarilla. Localización citoplásmica.

## XI. DISCUSIÓN

Las UIs determinan la polaridad celular, participan en la diferenciación celular y en el establecimiento y mantenimiento de la homeostasis de tejidos. Durante la carcinogénesis, las adhesiones celulares son afectadas por cambios genéticos y epigenéticos, resultando en la alteración de la señalización, pérdida de la inhibición por contacto y una migración celular alterada (Nelson & Elaine, 2010).

La desregulación de los complejos de adhesión está implicada en el proceso de la TEM en cáncer, llevando a las células a una transformación oncogénica y metastásica. Además, se sabe que la expresión ectópica de los principales factores de transcripción relacionados a la TEM (Snail, Slug, Twist), conlleva a una desregulación de los genes de las UEs, UAs y Dsm, generando células altamente móviles e invasivas (Knights *et al.*, 2012).

La desregulación de las proteínas que conforman las UIs se puede dar en diferentes niveles, como son alteraciones epigenéticas, represión transcripcional, a nivel post- transcripcional (Knights *et al.*, 2012) o a nivel proteico por su internalización para ser recicladas o degradadas (Stamatovic *et al.*, 2017).

Sin embargo, los trabajos anteriores solo se centran en estudiar algunas de estas proteínas como marcadores de la TEM en CaOv, sin caracterizar que tipos de UIs presentan estas células (Kurrey *et al.*, 2005; Huang *et al.* 2013).

En nuestro grupo de investigación, se desarrolló un modelo para el estudio de CaOv basado en la utilización de LA de pacientes con cáncer de ovario simulando el microambiente tumoral y el uso de la línea celular SKOV-3, aislada de ascitis de una paciente caucásica de 64 años con adenocarcinoma ovárico (American Type Culture Collection, ATCC®).

Dicho modelo se utilizó para analizar los componentes de las UIs en células SKOV-3 y el efecto del LA sobre la expresión de transcritos y proteínas que conforman estas estructuras.

Por lo anterior, se realizaron ensayos preliminares para conocer qué tipos de uniones presentaban estas células mediante MET con tinción de rojo rutenio,

encontrando que forman uniones de tipo Dsm; sin embargo este ensayo se realizó en células cultivadas en medio control con alrededor de un 80% de confluencia. Además, mediante MEB fue posible apreciar que bajo estas condiciones las células formaron multicapas (Sánchez M.E. & Chávez B 2017, imágenes no publicadas).

Debido a que estas células están clasificadas como epiteliales por la ATCC, surgió la pregunta de si eran capaces de formar UEs y UAs, en condiciones de cultivo confluyente y con un inóculo inicial mayor a la condición anterior. Por lo anterior, se procesaron cultivos con un inóculo inicial de 500 mil células hasta que alcanzaron de un 90 a 100% de confluencia y observamos que la mayoría de las células formaron UEs y Dsm. Sin embargo, la presencia de UAs no fue clara. La posible ausencia de UAs, probablemente se deba al origen de las células SKOV-3, las cuales fueron aisladas de LA donde las células se mantienen en suspensión y presentan un fenotipo intermedio mesenquimal; la adhesión de estas células induce la formación de UEs y Dsm. Sin embargo, hace falta realizar ensayos adicionales, debido a que por MET no es posible confirmar la presencia de UAs.

Al realizar una búsqueda bioinformática de las proteínas que conforman las UIs en bases de datos como "The Human Protein Atlas", se encontró que los niveles de RNA y proteína expresados en tejido ovárico normal y en CaOv eran variables, por lo tanto se decidió evaluar algunos de estos genes por RT-PCR, para lo que en primer lugar se diseñaron oligonucleótidos con base en las secuencias nucleotídicas en humano. Para este ensayo se usaron cultivos confluentes y cultivos subconfluentes de SKOV-3 en condición de medio control y en inducción con LA a 24, 48 y 72 h. Se usarón cultivos subconfluentes y diferentes tiempos de inducción con LA, debido a que no se observaron abundantes cambios morfológicos de protusiones de membrana en las células crecidas en cultivo confluyente, inducidas con LA. Los resultados revelaron la expresión de todos los mRNA analizados en condición de medio y LA, tanto en cultivo confluyente como subconfluyente. Además, se hizo evidente algunos cambios en la expresión de los transcritos,

sin embargo esto deberá ser confirmado con ensayos adicionales de PCR cuantitativa. De acuerdo a estos resultados, es posible concluir que las células SKOV-3 expresan mRNA de las proteínas que forman las UIs.

Finalmente, para analizar la localización de las proteínas, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta de las proteínas claudina 4, ocludina y ZO-1 de UEs, E-cadherina y  $\beta$ -catenina de UAs, y desmogleína 2 de uniones de tipo Dsm.

Se sabe que en cánceres tejido específico, la desregulación en la expresión de claudinas, proteínas transmembranales de las UEs, sugiere su participación durante la carcinogénesis y de hecho son consideradas como potenciales biomarcadores pronósticos (Osanai *et al.*, 2017). Específicamente en CaOv, se ha visto una desregulación de las claudinas 1 y 3; y una sobreexpresión de las claudinas 4, 5, 7 y 16 (Osanai *et al.*, 2017). En concordancia, en este estudio se observó una expresión mínima de claudina 4 en células SKOV-3 control y un incremento de su expresión en el citoplasma de células tratadas con LA. Sin embargo, para que las claudinas contribuyan a la función de barrera epitelial es necesario que se localicen en la membrana plasmática y no es el caso para la claudina 4. Por otra parte, nuestros resultados de MET con rojo de rutenio, sugieren la formación de UEs funcionales, por lo que es posible que otras proteínas transmembranales cubran esta función de barrera, como otras claudinas. Esto será confirmado con ensayos adicionales.

Por otro lado, la proteína ocludina se localizó en membrana y núcleo en células SKOV-3 en medio control y solo en núcleo en la condición de LA. La localización nuclear no se ha reportado en CaOv; sin embargo, en estudios recientes con células neuroepiteliales (astrocitos de humano), las cuales no poseen UEs, se encontró que ocludina se localiza en citoplasma y núcleo y mediante estudios proteómicos se determinó que interactúa con proteínas relacionadas con el metabolismo del RNA, la iniciación de la traducción y el ensamble funcional de los ribosomas 80S; además interactúa con

ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas que contienen señales de transporte nuclear que pudieran traslocarla al núcleo (Morgan *et al.*, 2018).

Así mismo, se observó que la proteína ZO-1 presenta una localización membranal y citoplásmica en la condición de medio control y una localización citoplásmica en condición de LA. Aparentemente, en esta última condición se encuentra localizada en estructuras tipo vesículas, lo que sugiere que esta proteína se esté regulando por vía endosomal; será necesario realizar ensayos adicionales para confirmar esta hipótesis. Además, estudios previos con células Caco-2 mostraron que el reciclaje de esta proteína se puede dar por endosomas dependientes de clatrina y de flotilina, y que en células del endotelio cerebral se reciclan por endosomas dependientes de caveola (Stamatovic *et al.*, 2017).

En cuanto a las proteínas de UAs, la proteína E-cadherina tiene una mínima localización citoplásmica en células SKOV-3 en medio control y está ausente en la condición de LA. Por su parte, la proteína  $\beta$ -catenina se observó con localización citoplásmica y nuclear en la condición de LA.

Este resultado es muy interesante, ya que se ha observado que en ausencia de ligandos Wnt,  $\beta$ -catenina se une a E-cadherina para formar complejos de adhesión en la membrana celular. La  $\beta$ -catenina libre que queda en el citoplasma es reclutada por un complejo de degradación constituido por la proteína APC (complejo promotor de anafase), axina, GSK3 $\beta$  (cinasa de glucógeno sintetasa 3 $\beta$ ) y CK1 (cinasa de caseína 1). GSK3 $\beta$  y CK1 fosforilan a  $\beta$ -catenina, la cual es ubiquitinada y degradada en el proteosoma. Sin embargo, cuando Wnt-1 se une a los receptores FZD/LRP5/6 se da la inactivación del complejo de degradación y la  $\beta$ -catenina que no es fosforilada se transporta al núcleo, donde se une a los factores TCF/LEF y activa la expresión de genes de proteínas responsables del ciclo celular, proliferación y sobrevivencia. Por lo cual, la desregulación de la vía Wnt-  $\beta$ -catenina o la expresión alterada de E-cadherina se ha visto en varios tipos de cáncer, inclusive el COE (Bodnar *et al.*, 2014). En nuestro caso, la presencia

de  $\beta$ -catenina en el núcleo de células SKOV-3 tratadas con LA, podría sugerir cambios en la expresión de genes involucrados en la TEM.

Así mismo, la pérdida funcional de E-cadherina se ha identificado como un paso clave hacia la adquisición de invasividad en la transición epitelio mesénquima, que resulta en la pérdida total de la polaridad celular epitelial. Esta desregulación de E-cadherina se da por varios mecanismos como son mutaciones, modulación epigenética y regulación transcripcional (Kurrey *et al.*, 2005). Serán necesarios experimentos adicionales para determinar cuál de estos puntos de afectación se presenta en el modelo de células SKOV-3.

En el caso de los Dsm, la proteína desmogleína 2 se encuentra localizada en membrana y citoplasma en células SKOV-3 en medio control, mientras que en condición de LA se relocaliza al citoplasma.

En estudios anteriores se ha visto que la alteración en los patrones de expresión de cadherinas desmosomales en cáncer, podría resultar en la liberación de placoglobina de los desmosomas, el desplazamiento de  $\beta$ -catenina de las UAs y un incremento en la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina (Chidgey & Dawson, 2007). Por lo tanto, existe la posibilidad de que la modulación en la expresión de cadherinas desmosomales en cáncer pueda contribuir con la estimulación de la transcripción de genes blancos de  $\beta$ -catenina y además tener un efecto sobre el comportamiento celular y la proliferación (Chidgey & Dawson, 2007).

Finalmente, las proteínas de las UIs se relocalizan durante la estimulación con LA y en algunos casos estas proteínas pueden moverse al núcleo tales como ocludina y  $\beta$ -catenina, las cuales podrían funcionar como cofactores de transcripción regulando otros procesos celulares. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para conocer su función en núcleo.

## **XII. CONCLUSIÓN**

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye que las células SKOV-3 en condiciones de cultivo confluyente observadas por MET, pueden formar uniones estrechas y desmosomas. Además, estas células en condición control y en inducción con LA a diferentes tiempos expresan todos los mRNA analizados de los componentes de las UEs, UAs y Dsm.

Así mismo, se confirmó la capacidad de estas células para formar las UEs y Dsm por la localización membranal de las proteínas ocludina, ZO-1 y Dsg 2, y presentan proteínas de UAs, en células SKOV-3 en medio y su relocalización en inducción con LA.

### **XIII. PERSPECTIVAS**

- Confirmar por WB la expresión de estas proteínas en células SKOV-3 en medio control y LA.
- Estudiar que tipos de regulación post-transcripcional sufren estas proteínas.
- Analizar la participación de proteínas de transporte vesicular (Rab GTPasas) que ayuden a la movilización de estas proteínas hacia la membrana plasmática.
- Búsqueda de mutaciones en la secuencia de las proteínas en estudio, que pudieran afectar su localización en membrana y su función.
- Explorar con mayor detalle la función de la ocludina en su localización nuclear/nucleolar.
- Búsqueda de biomarcadores de la TEM.

#### XIV. REFERENCIAS

- Bazzoni, G., Martínez-Estrada, O. M., Mueller, F., Nelboeck, P., Schmid, G., Bartfai, T., *et al.* (2000). Homophilic interaction of junctional adhesion molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 30970-30976.
- Bodnar, L., Stanczak, A., Cierniak, S., Smoter, M., Cichowicz, M., Kozlowski, W., & Lamparska-Przybysz, M. (2014). Wnt/ $\beta$ -catenin pathway as a potential prognostic and predictive marker in patients with advanced ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*, 7(1), 16.
- Boggetti, B., & Niessen, C. M. (2012). Adherens junctions in mammalian development, homeostasis and disease: lessons from mice. In *Adherens Junctions: from Molecular Mechanisms to Tissue Development and Disease* (pp. 321-355): Springer Netherlands.
- Campbell, H. K., Maiers, J. L., & DeMali, K. A. (2017). Interplay Between Tight Junctions & Adherens Junctions. *Experimental Cell Research*, 358, 39-44.
- Chidgey, M., & Dawson, C. (2007). Desmosomes: a role in cancer?. *British Journal of Cancer*, 96(12), 1783-1787.
- Colegio, O. R., Van Itallie, C. M., McCrea, H. J., Rahner, C., & Anderson, J. M. (2002). Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 283(1), C142-C147.
- Datta, P., & Weis, M. T. (2015). Calcium glycerophosphate preserves transepithelial integrity in the Caco-2 model of intestinal transport. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 21(30), 9055-9066.
- Dierichs, R. (1979). Ruthenium red as a stain for electron microscopy. Some new aspects of its application and mode of action. *Histochemistry*, 64(2), 171-187.
- Ebnet, K., Aurrand-Lions, M., Kuhn, A., Kiefer, F., Butz, S., Zander, K., *et al.* (2003). The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible

- role for JAMs in endothelial cell polarity. *Journal of Cell Science*, 116(19), 3879-3891.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., & Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of Cell Biology*, 123(6), 1777-1788.
- Gallardo-Rincón, D. (2016). COI: Cáncer de ovario epitelial (primera ed.). Servicio de Oncología Médica Responsable del Programa de Cáncer de Ovario Instituto Nacional de Cancerología (INCan). PyDESA. México, D.F
- GLOBOCAN (2012). Estimated cancer incidence and prevalence worldwide in 2012. (<http://globocan.iarc.fr>)
- Günzel, D., & Yu, A. S. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiological reviews*, 93(2), 525-569.
- Huang, R. Y., Wong, M. K., Tan, T. Z., Kuay, K. T., Ng, A. H. C., Chung, V. Y. & Sim, W. J. (2013). An EMT spectrum defines an anoikis-resistant and spheroidogenic intermediate mesenchymal state that is sensitive to e-cadherin restoration by a src-kinase inhibitor, saracatinib (AZD0530). *Cell Death & Disease*, 4(11), e915.
- Hudson, L. G., Zeineldin, R., & Stack, M. S. (2008). Phenotypic plasticity of neoplastic ovarian epithelium: unique cadherin profiles in tumor progression. *Clinical & Experimental Metastasis*, 25(6), 643-655.
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., & Tsukita, S. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *The Journal of Cell Biology*, 147(6), 1351-1363.
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420-1428.
- Kipps, E., Tan, D. S. P., & Kaye, S. B. (2013). Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nature Reviews. Cancer*, 13(4), 273-282.

- Knights, A. J., Funnell, A. P., Crossley, M., & Pearson, R. C. (2012). Holding tight: cell junctions and cancer spread. *Trends in Cancer Research*, 8, 61.
- Kowalczyk, A. P., & Green, K. J. (2013). Structure, function, and regulation of desmosomes. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 116, 95-118.
- Kurrey, N. K., Amit, K., & Bapat, S. A. (2005). Snail and Slug are major determinants of ovarian cancer invasiveness at the transcription level. *Gynecologic Oncology*, 97(1), 155-165.
- La Vecchia, C. (2017). Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. *European Journal of Cancer Prevention*, 26(1), 55-62.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Liu, Y., Nusrat, A., Schnell, F. J., Reaves, T. A., Walsh, S., Pochet, M., *et al.* (2000). Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *Journal of Cell Science*, 113(13), 2363-2374.
- Lopez, R. I., Paul, J., Atkinson, R., Soukop, M., Kitchener, H., Fullerton, W., *et al.* (1996). Prognostic factor analysis, for patients with no evidence of disease after initial chemotherapy for advanced epithelial ovarian carcinoma. *International Journal of Gynecological Cancer*, 6(1), 8-14.
- Morgan, S. V., Garwood, C. J., Jennings, L., Simpson, J. E., Castelli, L. M., Heath, P. R., ... & Dickman, M. J. (2018). Proteomic and cellular localisation studies suggest non-tight junction cytoplasmic and nuclear roles for occludin in astrocytes. *European Journal of Neuroscience*. 2018;00:1–13.
- Nelson, W. James, & Elaine, Fuchs. (2010). Cell-Cell junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. New York, USA. Pag. 35-123.
- Niessen, C. M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(11), 2525-2532.

- Osanai, M., Takasawa, A., Murata, M., & Sawada, N. (2017). Claudins in cancer: bench to bedside. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 469(1), 55-67.
- Piontek, J., Winkler, L., Wolburg, H., Müller, S. L., Zuleger, N., Piehl, C., *et al.* (2008). Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *The FASEB Journal*, 22(1), 146-158.
- Roett M *et al.*, (2009) Ovarian cancer: An overview. *American Family Physician*; 80(6):609-616.
- Roh, M. H., Liu, C.-J., Laurinec, S., & Margolis, B. (2002). The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight junctions. *Journal of Biological Chemistry*, 277(30), 27501-27509.
- Rübsam, M., Broussard, J. A., Wickström, S. A., Nekrasova, O., Green, K. J., & Niessen, C. M. (2017). Adherens junctions and desmosomes coordinate mechanics and signaling to orchestrate tissue morphogenesis and function: An evolutionary perspective. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, a029207.
- Schneeberger, E. E., & Lynch, R. D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 286(6), C1213-C1228.
- Stamatovic, S. M., Johnson, A. M., Sladojevic, N., Keep, R. F., & Andjelkovic, A. V. (2017). Endocytosis of tight junction proteins and the regulation of degradation and recycling. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1397: 54-65.
- Steinhusen, U., Weiske, J., Badock, V., Tauber, R., Bommert, K., & Huber, O. (2000). Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 276, 4972-4980.
- Toledo-Leyva, A. (2017). Identificación de nuevas proteínas implicadas en el fenotipo agresivo del cáncer de ovario epitelial durante la induccion de la transición epitelio-mesénquima por la ascitis. Tesis de doctorado.

*Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV-IPN, México. 1-115.*

Worzfeld, T., Pogge von Strandmann, E., Huber, M., Adhikary, T., Wagner, U., Reinartz, S., & Müller, R. (2017). The unique molecular and cellular microenvironment of ovarian cancer. *Frontiers in Oncology*, 7:24.