



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Departamento de Química Biológica

Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas

Prof. Dr. "Alejandro C. Paladini"

Relevancia de galectina-1 en el carcinoma hepatocelular.

Su contribución a la diseminación tumoral

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
mención en Biología celular.

Lic. María Lorena Bacigalupo

Directora de tesis: Dra. María Fernanda Troncoso

2014

Relevancia de galectina-1 en el carcinoma hepatocelular.

Su contribución a la diseminación tumoral

El carcinoma hepatocelular (CHC) es la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo. Su incidencia todavía se equipara con el índice de mortalidad, lo que refleja su mal pronóstico. El desarrollo de metástasis y la recurrencia tumoral son las principales causas de mortalidad en los pacientes con CHC. Un evento crucial en la diseminación de las células tumorales es la transición epitelio-mesénquima (TEM), donde se alteran algunas características celulares como la adhesión célula-célula y célula-matriz, y las células epiteliales tumorales adquieren la capacidad de migrar e invadir otros tejidos. Galectina-1 (Gal-1) es una proteína con afinidad por β -galactósidos, cuyos niveles de expresión se encuentran drásticamente incrementados en los hepatocitos tumorales y se asocian a la agresividad tumoral en pacientes de CHC. Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que Gal-1 favorece el crecimiento tumoral y la presencia de metástasis *in vivo*. El objetivo general de este trabajo de Tesis fue *evaluar la contribución de Gal-1 a la diseminación de los hepatocitos tumorales, en particular en la TEM.*

En este trabajo, se demostró que la sobre-expresión de Gal-1 está asociada con la inducción de la TEM utilizando como modelo a las células de CHC diferenciadas HepG2. En primer lugar, se observó que Gal-1 favorece la adhesión de las células de CHC a laminina, una proteína de la matriz extracelular. Además, elevados niveles de expresión de Gal-1 en las células HepG2 indujeron la disminución de la expresión de la proteína de las uniones adherentes E-cadherina y de la proteína de las uniones estrechas ZO-1, y condujeron a una pérdida en la polaridad apico-basal. Además, la

sobre-expresión de Gal-1 se asoció con el aumento de la expresión del factor de transcripción SNAIL1, uno de los principales inductores de la TEM en el CHC, y de la proteína vimentina, un marcador del fenotipo mesenquimal; también, favoreció la transición de una morfología epitelial hacia un fenotipo fibroblastoide y promovió el crecimiento independiente de anclaje. Asimismo, el aumento en la expresión de Gal-1 promovió la activación constitutiva de AKT, la fosforilación de β -catenina^{Ser552}, y su translocación al núcleo, una mayor actividad transcripcional de TCF/LEF y una mayor expresión de las proteínas blanco de la vía, ciclina D1 y c-MYC; sugiriendo la hiperactivación de la vía WNT/ β -catenina. Además, se logró identificar un ligando novedoso de Gal-1 en células de CHC, prohibitina-1.

En conclusión, estos resultados demuestran que la sobre-expresión de Gal-1 induce la TEM en las células de CHC HepG2 con la participación del eje de señalización PI3K/AKT/WNT/ β -catenina. Estos hallazgos sugieren que Gal-1 tendría implicancias críticas en la metástasis del tumor, aportan conocimientos hacia el entendimiento de las bases moleculares de su diseminación, y permiten posicionar a Gal-1 como un posible blanco terapéutico para restringir la progresión del CHC.

PALABRAS CLAVE: Galectina-1, carcinoma hepatocelular, transición epitelio-mesénquima, WNT/ β -catenina.

Galectin-1 relevance and contribution to hepatocellular carcinoma cell dissemination

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third cause of cancer-related death annually. Recurrence and metastasis are the most common causes of mortality among HCC patients. The HCC incidence nearly matches its mortality, reflecting its poor prognosis. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) represents a key step during cancer progression, which involves changes in cell-cell and cell-matrix interactions, cell motility and anchorage allowing tissue epithelial cancers to invade and metastasize. Galectin-1 (Gal-1), a β -galactoside-binding protein abundantly expressed in tumor microenvironments, is associated with HCC aggressiveness. Our group has previously shown that Gal-1 promote tumor growth and metastasis *in vivo*. The main objective of this Thesis consisted in *evaluating Gal-1 contribution to HCC cell dissemination, particularly on EMT*.

In this work, we found that Gal-1 overexpression is associated with EMT induction in well differentiated HCC HepG2 cells. Gal-1 significantly enhanced HCC cell adhesion to laminin, a polygalactosamine-enriched ECM glycoprotein. Besides, Gal-1 up-regulation induced the down-regulation of the adherens junction protein E-cadherin and the tight junction protein ZO-1, and promoted the loss of apico-basal polarity. Also, enhanced Gal-1 expression was associated with increased levels of the transcription factor SNAIL1, one of the main inducers of EMT in HCC, and the mesenchymal marker vimentin, facilitated the transition from epithelial cell morphology toward a fibroblastoid phenotype, and anchorage-independent growth. Remarkably, Gal-1 promoted AKT activation, β -catenin^{Ser552} phosphorylation and nuclear translocation, TCF/LEF transcriptional activity and increased cyclin D1 and c-

MYC expression, suggesting the hyperactivation of the WNT pathway. We also succeeded to identify a novel ligand of Gal-1 in HCC cells, prohibitin-1.

In conclusion, our results indicate that Gal-1 overexpression induces EMT in HepG2 HCC cells involving the PI3K/AKT/WNT/ β -catenin signaling axis. This would have critical implications in HCC metastasis, and highlight the possibility to target Gal-1 in order to restrict HCC progression.

KEY WORDS: Galectin-1, hepatocellular carcinoma, epithelial-mesenchymal transition, WNT/ β -catenin.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Fernanda Troncoso, mi directora de tesis: por compartir sus conocimientos y por guiar mi formación como científica con gran paciencia y dedicación; por su constante apoyo y estímulo a seguir adelante; por su sincero interés y generosidad en lo laboral y en lo personal.

A la Dra. Carlota Wolfenstein: por permitirme realizar mi tesis doctoral en su laboratorio; por su valiosa orientación y guía a lo largo de todos estos años.

A la Dra. María Victoria Espelt: por su imprescindible contribución a este trabajo; por su contagioso buen humor, por su sinceridad y su excelente predisposición.

A la Dra. María Teresa Elola: por su colaboración, por estar siempre dispuesta a brindar su ayuda y compartir su experiencia.

A todos los amigos y compañeros del Instituto y en particular del laboratorio con los que he compartido estos años, por su indispensable ayuda y compañía, especialmente a Male y Pablo, Lore N, Fati, Cande, Víctor, Máxi y Lucila.

A todas las personas del Departamento de Química biológica y del Instituto de Química y Físico-química biológicas que han colaborado de una u otra forma en este trabajo. En particular al Dr. Pablo Schwarzbaum por su generosidad.

A las Instituciones que hicieron posible que este trabajo de tesis se llevara a cabo, la Universidad de Buenos Aires, el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

Finalmente, a todas aquellas personas que me acompañan, por su incondicionalidad y apoyo. A todos mis amigos y amigas, a toda mi familia, tíos y tías, primos y primas, y un agradecimiento especial a mis abuelos. A mis hermanos, Mariela y Martín. A mi papá y a mi mamá, por la libertad y ejemplo que me dieron, por su esfuerzo en mi formación. A Nico, por todo, y en estos últimos meses, por tu apoyo e inquebrantable paciencia.

ÍNDICE



ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN.....	9
Sección I Carcinoma hepatocelular (CHC).....	10
I.1 El hígado	10
I.1.1 Polaridad hepática	11
I.1.2 Sistemas de transporte de los hepatocitos.....	12
I.2 Carcinoma hepatocelular	15
Sección II Galectina-1.....	19
II.1 Las galectinas	19
II.2 Galectina-1	24
II.3 Galectina-1 en tumores.....	28
II.4 Galectina-1 en la fisiopatología del hígado	31
Sección III Transición epitelio-mesénquima.....	35
III.1 Características generales	35
III.2 Alteraciones celulares durante la TEM	36
III.2.1 Polaridad y motilidad	37
III.2.2 Interacciones intercelulares.....	38
III.2.3 Interacción célula-MEC.....	40
III.2.4 Expresión de marcadores mesénquimales	40
III.2.5 Resistencia a anoikis.....	41
III.3 El sistema de adhesión mediado por E-cadherina	44
III.3.1 Pérdida de función de E-cadherina.....	45
III.4 Factores de transcripción involucrados en la TEM	47
III.5 Vías de señalización asociadas a la TEM	50
III.6 Vía de señalización WNT/ β -catenina	52
III.6.1 β -catenina: estructura y función	54
III.6.2 Regulación por fosforilación.....	56
III.6.3 Vía de señalización WNT/ β -catenina en la TEM.....	56
III.7 TEM en el carcinoma hepatocelular.....	57
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	59
MATERIALES Y MÉTODOS	63

1.	Cultivo celular.....	64
1.2.	<i>Mantenimiento y subcultivo de las células.....</i>	<i>64</i>
2.	Obtención de plásmidos.....	65
2.1.	<i>Preparación de bacterias competentes.....</i>	<i>66</i>
2.2.	<i>Transformación de bacterias competentes.....</i>	<i>67</i>
2.3.	<i>Aislamiento del ADN plasmídico.....</i>	<i>67</i>
3.	Preparación de Gal-1 recombinante (rGal-1).....	68
3.1	<i>Expresión de rGal-1.....</i>	<i>68</i>
3.2	<i>Purificación de rGal-1.....</i>	<i>69</i>
3.3	<i>Eliminación de endotoxinas.....</i>	<i>69</i>
4.	Análisis de la expresión de proteínas.....	70
4.1.	<i>Extracción de proteínas.....</i>	<i>70</i>
4.2.	<i>Obtención de medios condicionados.....</i>	<i>70</i>
4.3.	<i>Determinación de la concentración de proteínas.....</i>	<i>71</i>
4.4.	<i>Preparación de muestras para SDS-PAGE.....</i>	<i>71</i>
4.5.	<i>SDS-PAGE.....</i>	<i>72</i>
4.6.	<i>Técnica de Western blot.....</i>	<i>73</i>
5.	Técnica de inmunofluorescencia.....	75
6.	Sobre-expresión de Gal-1 en células de CHC.....	77
7.	Disminución de la expresión de Gal-1 en células de CHC.....	78
8.	Ensayos de adhesión de células de CHC.....	78
9.	Ensayos de polarización de células de CHC.....	80
10.	Análisis de morfología.....	82
11.	Anoikis: Ensayo de formación de colonias en agar blando.....	82
12.	Ensayo de genes reporteros.....	83
13.	Identificación de ligandos de Gal-1 en células de CHC.....	84
13.1.	<i>Obtención de proteínas celulares.....</i>	<i>84</i>
13.2.	<i>Preparación de la matriz de afinidad rGal-1-agarosa.....</i>	<i>84</i>
13.3.	<i>Purificación de ligandos de Gal-1 por cromatografía de afinidad.....</i>	<i>85</i>
13.4.	<i>Identificación de los ligandos de Gal-1 por digestión proteolítica en gel y espectrometría de masa.....</i>	<i>86</i>
14.	Análisis estadístico de los resultados experimentales.....	87
RESULTADOS.....		88
Capítulo 1. Expresión de Gal-1 en células HepG2.....		89
1.1	Sobre-expresión de Gal-1 en las células HepG2.....	90
1.2	Disminución de la expresión de Gal-1 en las células HepG2.....	91
1.3	Cambios en los niveles de Gal-1 no afectan la expresión de β -actina.....	92

Capítulo 2.	<i>Gal-1 modula la adhesión de células de CHC</i>	94
2.1	Efecto de Gal-1 recombinante (rGal-1) sobre la adhesión de células de CHC	95
2.2	Efecto de Gal-1 endógena sobre la adhesión de células HepG2.....	99
2.3	Efecto Gal-3 recombinante (rGal-3) sobre la adhesión de células HepG2.....	101
2.4	rGal-1 promueve la adhesión de las células HepG2 activando las vías de señalización mediadas por MAPK y PI3K	102
Capítulo 3.	<i>Gal-1 modula el proceso de polarización de células de CHC</i>	104
3.1	Efecto de rGal-1 sobre el proceso de polarización de células de CHC.....	104
3.2	Efecto de rGal-3 sobre la polarización de las células HepG2	109
3.3	Efecto de cambios en los niveles de expresión de Gal-1 en la polarización de las células HepG2.....	110
3.4	rGal-1 acelera el proceso de polarización involucrando las vías de señalización PI3K, MAPK/ERK1/2 y PKA.	114
3.5	Adhesión y polarización de células HepG2 inducidas por Gal-1: ¿son dos procesos independientes?.....	115
3.6	rGal-1 induce la fosforilación de ERK1/2 pero no la de AKT	117
Capítulo 4.	<i>La expresión de Gal-1 altera la expresión de marcadores epiteliales, mesenquimales y la resistencia a anoikis</i>	119
4.1	Expresión de marcadores epiteliales	119
4.2	Expresión de marcadores de fenotipo mesenquimal	124
4.3	La sobre-expresión de Gal-1 induce la disminución de la expresión de E-cadherina en las células HepG2 a través de un mecanismo dependiente de PI3K/AKT.....	127
4.4	Resistencia a anoikis.....	130
Capítulo 5.	<i>Gal-1 participa en la activación de la vía WNT</i>	132
5.1	La sobre-expresión de Gal-1 en las células HepG2 promueve la translocación nuclear de β -catenina	132
5.2	El incremento de la expresión de Gal-1 en las células HepG2 induce la actividad transcripcional de la vía WNT/ β -catenina.....	135
5.3	La sobre-expresión de Gal-1 en las células HepG2 incrementa los niveles de proteínas blanco de la vía WNT/ β -catenina.....	136
Capítulo 6.	<i>Prohibitina-1: un novedoso ligando de Gal-1 en el CHC</i>	138
DISCUSIÓN		142
CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS		159
REFERENCIAS		164

ABREVIATURAS

ABC	Transportadores de unión a ATP
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
AFP	Alfa fetoproteína
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Sero-albúmina bovina
BSEP	Bomba exportadora de sales biliares
CB	Canalículos biliares
CHC	Carcinoma hepatocelular
CK1	Caseína-quinasa 1
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
DAPI	4',6'diamidino-2-fenilindol
DMEM	Medio esencial Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRC	Dominio de reconocimiento a carbohidratos
DTT	Ditiotreitol
E-cadherina	Cadherina epitelial
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor de factor de crecimiento epidérmico
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
FAK	Quinasas de adhesión focal
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Gal-1	Galectina-1

Gal-3	Galectina-3
GSK3β	Glucógeno sintasa quinasa 3 β
HFN-4α	Factor nuclear hepático 4 α
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HIF-1	Factor inducible por hipoxia 1
HNSCC	Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
ID	Inhibidoras de diferenciación
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IGF	Factor de crecimiento tipo insulina
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LEF	Factor potenciador linfoide
MAPK	Quinasa activada por mitógenos
MDCK	Células epiteliales de riñón canino de Madin-Darby
MDR	Proteína de resistencia a multidrogas
MEC	Matriz extracelular
MEK	Quinasa activada por mitógenos quinasa
MMP	Metaloproteinasa de la matriz
MRP	Proteína asociada a la resistencia a multidrogas
mTOR	Blanco de rapamicina en células de mamífero
N-cadherina	Cadherina neural
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NRP-1	Neuropilina-1
NTCP	Polipéptido de co-transporte Na ⁺ /taurocolato
OATP	Transportadores de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos
PBS	<i>Buffer</i> de fosfatos salino
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PHB1	Prohibitina-1

PI3K	Fosfoinositol-3 quinasa
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetil-sulfonilo
PSA	Persulfato de amonio
PTEN	Fosfatasa y homólogo de tensina
rGal-1	Galectina-1 recombinante
rGal-1	Galectina-3 recombinante
RTK	Receptor tirosin-quinasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SFB	Suero fetal bovino
TBS	<i>Buffer</i> Tris salino
TCF	Factor de células T
TDG	Tiodigalactósido
TEM	Transición epitelio-mesénquima
TGF-β	Factor de crecimiento tumoral β
TLE	<i>Transducin-like enhancer of split</i>
TME	Transición mesénquima-epitelio
Tregs	Linfocitos T regulatorios
TRITC	tetrametilrodamina
UA	Uniones adherentes
UE	Uniones estrechas
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VEGFR	Receptor de VEGF
WNT	<i>Wingless</i>
ZEB	<i>Zinc-finger E-box binding</i>
ZO	<i>Zonula occludens</i>

A continuación se detalla el **código de aminoácidos** utilizado en esta Tesis:

Aminoácido	Código de tres letras
Alanina	Ala
Arginina	Arg
Asparagina	Asn
Ácido aspártico	Asp
Cisteína	Cys
Glutamina	Gln
Ácido glutámico	Glu
Glicina	Gly
Histidina	His
Isoleucina	Ile
Leucina	Leu
Lisina	Lys
Metionina	Met
Fenilalanina	Phe
Prolina	Pro
Serina	Ser
Treonina	Thr
Triptófano	Trp
Tirosina	Tyr
Valina	Val

INTRODUCCIÓN



Sección I Carcinoma hepatocelular (CHC)

I.1 El hígado

El hígado es el centro metabólico del organismo. Este órgano es el responsable del metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos, de la producción y secreción de ácidos biliares, de la eliminación de compuestos tóxicos y del procesamiento de una gran variedad de hormonas y citoquinas. La composición celular del hígado incluye a los hepatocitos, que representan aproximadamente el 80-90 % de la masa celular total, y a las células no parenquimatosas, como células endoteliales sinusoidales, células de *Kupffer*, y células estrelladas [1]. El sistema circulatorio del hígado está formado por dos vasos aferentes, la vena porta y la arteria hepática, y una vía eferente conformada por la vena hepática que desemboca en la vena cava inferior [2]. El sistema excretor del hígado está constituido por los conductos biliares, que se inician en los canalículos biliares, formados entre hepatocitos vecinos; a través de los canalículos se secretan componentes biliares. A su vez, los mismos se combinan en conductos intermedios y conductillos para confluir en conductos mayores y formar finalmente el ducto biliar común [1, 2] (**Figura 1**). La bilis contiene componentes inorgánicos y orgánicos, incluyendo a la bilirrubina, lecitina y colesterol, y a los ácidos biliares que favorecen la digestión y absorción de grasas en el intestino [2].

La unidad estructural y funcional del hígado es el lobulillo hepático. Estas estructuras son unidades hexagonales en cuyas esquinas se encuentra la tríada portal, compuesta por una ramificación de la arteria hepática, la vena porta y el sistema de vías biliares. Los lobulillos están compuestos por cordones de hepatocitos separados

por vasos sanguíneos fenestrados llamados sinusoides, donde converge el flujo arterial y el flujo portal [1](Figura 1).

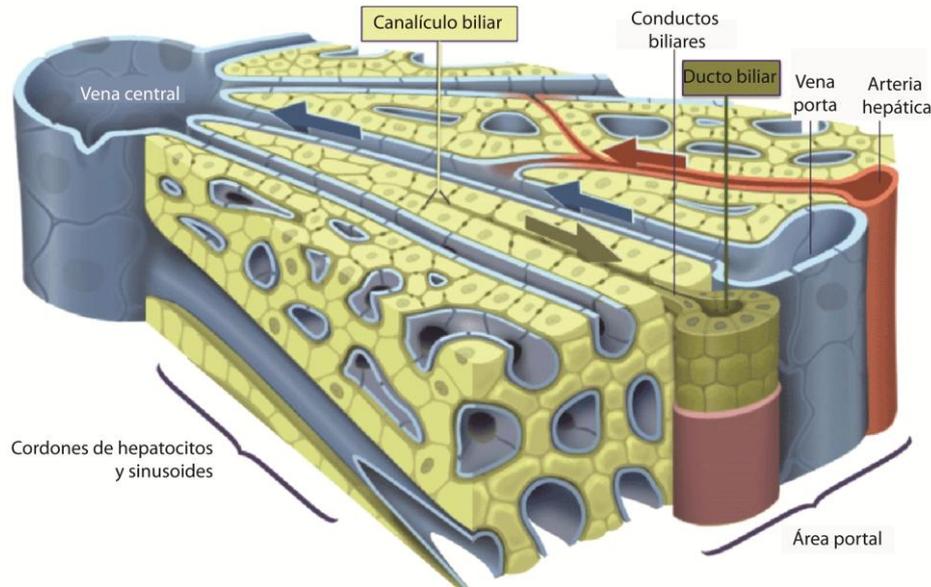


Figura 1. El lóbulo hepático. Los hepatocitos se ordenan en cordones y forman los canalículos biliares. La red de canalículos se conecta con los ductos biliares localizados en la triada portal, que también comprende a la vena porta y arteria hepática. En los sinusoides hepáticos converge el flujo arterial y el flujo portal. Tomado y adaptado de [1].

1.1.1 Polaridad hepática

Los hepatocitos son células epiteliales polarizadas, es decir, que su membrana plasmática está dividida en regiones especializadas expuestas a distintos microambientes y que poseen una composición característica de proteínas y lípidos. Dicha polaridad es vital para que los mismos puedan ser funcionales. La superficie basal o sinusoidal de los hepatocitos está rodeada por los espacios sinusoidales o espacios de Disse que permiten el acceso de los mismos al flujo sanguíneo. Carecen de una lámina basal densa, pero sí se encuentra una deposición difusa de colágeno, fibronectina y proteoglicanos alrededor de los hepatocitos [3, 4]. La función del

dominio sinusoidal es la secreción de varios componentes a la circulación y también, la captación de sales biliares recicladas.

El dominio apical o canalicular está en contacto con el medio externo, y se desarrolla en el perímetro de las células en los sitios de contacto lateral célula-célula, formando el canalículo biliar. Puede ser compartido por más de dos células, posee extensas microvellosidades [5], y su función es la excreción de la bilis [1].

1.1.2 Sistemas de transporte de los hepatocitos

La re-captación sinusoidal y la excreción canalicular están mediadas por sistemas de transporte expresados en ambas superficies de la célula. La formación de bilis es un proceso osmótico en el cual ocurre un transporte vectorial de solutos desde el espacio sinusoidal al lumen canalicular; sucede en contra del gradiente de concentración, por lo que requiere un transporte activo a través de la acción de proteínas transportadoras sinusoidales y canaliculares [6, 7].

Los sinusoides hepáticos permiten el paso de compuestos orgánicos unidos a albúmina desde la circulación portal a través del endotelio fenestrado al espacio de Disse, donde pueden ser captados por los sistemas de transporte de los hepatocitos [8]. Los transportadores basolaterales pueden dividirse en los sistemas *dependientes* e *independientes de Na⁺*. Aquellos *dependientes de Na⁺* involucran el co-transporte de solutos con Na⁺, el cual es llevado a cabo por el gradiente de Na⁺ generado y mantenido por la ATPasa de Na⁺/K⁺. Incluye al polipéptido de co-transporte Na⁺/taurocolato (NTCP) considerado el principal mecanismo de captación de sales biliares [9]. Por otro lado, el sistema *independiente de Na⁺* es llevado a cabo principalmente por intercambio de aniones, incluye a la familia de transportadores de

polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP), que captan una fracción remanente de sales biliares y otros compuestos, como bilirrubina, leucotrienos, hormonas, micotoxinas y numerosos xenobióticos, entre otros [9, 10] (**Figura 2**).

El transporte canalicular es llevado a cabo principalmente por bombas dependientes de ATP pertenecientes a la familia de transportadores de unión a ATP (ABC), en particular a aquellas pertenecientes a la familia de proteínas de resistencia a multidrogas (MDR) o a la de las proteínas asociadas a la resistencia a multidrogas (MRP) [11]. Dentro de la familia MDR, la proteína MDR1 funciona como una bomba de eflujo para una gran variedad de drogas catiónicas y compuestos hidrofóbicos, como metabolitos y toxinas endógenos y exógenos, hormonas esteroideas, entre otros [10]; mientras que la proteína MDR3 funciona como una flipasa, que transloca fosfatidilcolina desde la cara interna a la externa de la membrana canalicular y su posterior liberación en la bilis [12]. Las sales biliares mono-aniónicas son secretadas al polo canalicular por la bomba exportadora de sales biliares (BSEP, otro miembro de la familia MDR). Por otro lado, el eflujo de sales biliares divalentes, dipolares sulfatadas o glucuronidadas es mediado por la proteína MRP2 [13] (**Figura 2**).

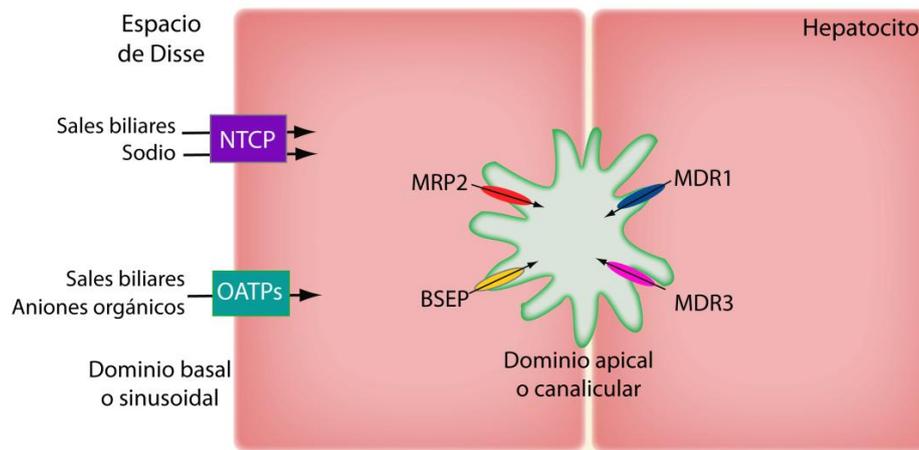


Figura 2. Transportadores hepáticos. Los hepatocitos son células polarizadas con un dominio basal o sinusoidal y uno apical o canalicular. Los ácidos biliares llegan al espacio de Disse y en la membrana basolateral son transportados por el NTCP. Los OATPs también transportan sales biliares y aniones orgánicos. La secreción de ácidos biliares en el canalículo ocurre a través de los transportadores ABC: BSEP, que transporta sales monovalentes y MRP2, que transporta ácidos biliares divalentes sulfatados o glucuronidados.

La inserción de los transportadores en el dominio de membrana correspondiente involucra un aumento en los niveles intracelulares de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). Esto conduce a la activación de la proteína quinasa A (PKA, por sus siglas en el idioma inglés) y fosfoinositol-3 quinasa (PI3K, por sus siglas en el idioma inglés), y a un aumento en los niveles de calcio citosólico. La formación del complejo calcio-calmodulina, que promueve la inserción de las proteínas en la membrana, es contrarrestado por la proteína quinasa C (PKC, por sus siglas en el idioma inglés) clásica. PI3K estimula la inserción de NTCP en la membrana basolateral con la participación de PKC- δ , PKC- ζ y/o AKT. En el caso de los transportadores ABC, PI3K promueve su inserción en la membrana apical a través de las vías PKC- δ , y RAS/RAF/quinasa activada por mitógenos (MAPK, por sus siglas en el idioma inglés) quinasa (MEK)/quinasa regulada por señales extracelulares (ERK, por sus siglas en el idioma inglés) y p38 (revisado en [11]).

I.2 Carcinoma hepatocelular

El cáncer primario de hígado o carcinoma hepatocelular (CHC) representa un problema de salud mundial. Es el séptimo tipo de cáncer más común y la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo [14]. El CHC es más frecuente en Asia del este y África, mientras que la incidencia en Europa y Norte América es considerablemente menor [15-17]. En Argentina, la incidencia afecta entre 5 a 10 hombres y 2 a 5 mujeres cada 100.000 habitantes [14].

Durante los últimos años, el manejo y tratamiento del CHC ha mejorado significativamente [18]. Nuevos avances en el campo condujeron a un mejor entendimiento y a la detección más temprana de la enfermedad, mediante el análisis a través de ultrasonografía y de los niveles de alfa fetoproteína (AFP) sérica. Las terapias más efectivas consisten en la resección quirúrgica y trasplante. Sin embargo, menos del 40 % de los pacientes son diagnosticados en etapas tempranas y por lo tanto, no pueden acceder al tratamiento por cirugía. Incluso luego de la resección o del trasplante, el pronóstico no es satisfactorio debido a la alta incidencia de recurrencia y metástasis [19, 20]. Para los estadios intermedios de la enfermedad existen las terapias de ablación (por ejemplo, por radiofrecuencia) y embolización de la arteria hepática, que suele realizarse en combinación con la quimioterapia, conocido como quimioembolización transarterial. Sin embargo, el CHC es un tumor naturalmente resistente a la quimioterapia, posiblemente por la abundante expresión de proteínas de resistencia a multidroga. En estadios muy avanzados de la enfermedad, la tasa de supervivencia a 1 año es menor al 10 %, y las terapias mencionadas no presentan ningún beneficio.

El progreso reciente hacia un mejor entendimiento de la biología molecular del CHC ha permitido el desarrollo de nuevas terapias moleculares dirigidas. El tratamiento por vía oral con *Sorafenib*, un inhibidor de múltiples quinasas que actúa en las vías de señalización del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por sus siglas en el idioma inglés), del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en el idioma inglés) y de RAS, demostró reducir el riesgo de muerte y mejorar la supervivencia global en pacientes con CHC inoperable en un 37 % (equivalente a 2-3 meses de sobrevida) [18, 21-23]. A pesar de que dichos efectos sobre la sobrevida parecen ser modestos, y de la presencia de efectos adversos en los pacientes, la aprobación de la administración por vía oral del *Sorafenib* resalta la importancia de dilucidar los mecanismos moleculares que dirigen la progresión del CHC para el desarrollo de nuevas terapias más efectivas. Actualmente, ensayos clínicos están evaluando el uso potencial de inhibidores de las vías de señalización RAS/RAF/MAPK/ERK, fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN, por sus siglas en el idioma inglés)/PI3K/AKT/blanco de rapamicina en células de mamífero (mTOR, por sus siglas en el idioma inglés), del factor de crecimiento tumoral β (TGF- β , por sus siglas en el idioma inglés), *Wingless* (WNT)/ β -catenina y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en el idioma inglés), entre otros [22, 24, 25]. Además, se están desarrollando nuevas estrategias de inmunoterapia para el tratamiento del CHC, que pueden aplicarse en combinación con las terapias convencionales de manera de obtener resultados más favorables [26].

La etiología del CHC incluye varios factores de riesgo como la infección con el virus de la Hepatitis B o C [24], el consumo excesivo de alcohol o la exposición a la aflatoxina, una micotoxina presente en los granos de maíz [27, 28]. Además, la

esteatohepatitis no alcohólica, un desorden metabólico que resulta del síndrome de resistencia a insulina, está emergiendo como otro factor de riesgo importante del CHC [29, 30]. Sin embargo, independientemente del factor desencadenante, el CHC usualmente se desarrolla en pacientes con cirrosis debido a la inflamación crónica y a la fibrosis avanzada [31].

La hepatocarcinogenesis es entonces un proceso complejo que presenta una gran heterogeneidad en su perfil molecular, probablemente debido a la acumulación de rearrreglos cromosómicos resultantes de décadas de hepatitis viral crónica y cirrosis [32]. Las principales mutaciones se encuentran en el gen supresor de tumores *TP53* (presentes en el 25-40 % de los tumores) y en el gen *CTNNB1* codificante para la proteína β -catenina (presentes en aproximadamente el 25 % de los tumores). También se han descrito alteraciones como deleciones y amplificaciones cromosómicas, alteraciones epigenéticas y expresión desregulada de ARN pequeños no codificantes o microARNs [33]. Existen varias vías de señalización involucradas en la proliferación, supervivencia, diferenciación, invasión y metástasis que se encuentran desreguladas en el CHC. Las principales vías implicadas en la patogénesis del CHC incluyen a aquellas mediadas por EGF/EGFR, VEGF/receptor de VEGF (VEGFR), PDGF /receptor de PDGF, el factor de crecimiento tipo insulina (IGF, por sus siglas en el idioma inglés)/receptor de IGF, las vías RAS/Raf/MEK/ERK, PTEN/PI3K/AKT/mTOR y la vía WNT/ β -catenina [34].

Hoshida y col. lograron clasificar al CHC en tres subclases (S1, S2 y S3) a través de un meta-análisis de perfiles de expresión génica en un total de 603 pacientes provenientes de distintos lugares del mundo, representando las principales etiologías del CHC [32]. Las características de estas subclases se resumen en la **Tabla 1**. Las subclases S1 y S2 representan los tumores más agresivos y se asocian con un mayor

tamaño tumoral y una menor diferenciación histológica. Presentan distintas aberraciones moleculares aunque comparten características comunes, como la activación del factor de transcripción *E2F1* y la inactivación de *TP53*. La subclase S1 se caracterizó por la activación de las vías del TGF- β y WNT/ β -catenina; mientras que la subclase S2 por la activación de las vías de MYC y AKT, la sobre-expresión de IGF2 y AFP, y la disminución de la expresión de los genes regulados por interferón (IFN). Los tumores de la clase S3 son los menos agresivos, se encuentran bien diferenciados histológicamente, y mantienen algunas funciones normales del hígado. Las mutaciones en el gen que codifica para β -catenina (*CTNNB1*) fueron preferencialmente encontradas en esta subclase [32]. Esto resalta la gran complejidad que presentan las distintas subclases de CHC en sus perfiles moleculares.

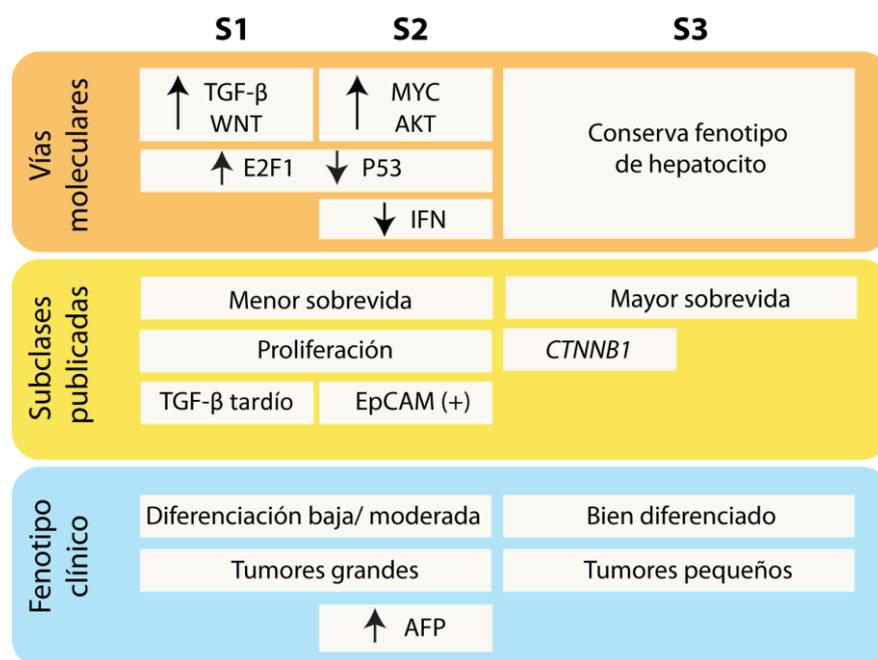


Tabla 1. Resumen esquemático de las subclases del CHC. Tomado y adaptado de [32].

Sección II Galectina-1

II.1 Las galectinas

Los carbohidratos complejos están abundantemente expresados en las células de los mamíferos como parte de glicoproteínas o glicolípidos, formando el “glicoma”. La información codificada por el glicoma es descifrada por las proteínas de unión a glicanos o lectinas. En el año 1988, Drickamer propuso la primera clasificación de las lectinas animales en dos grupos según las propiedades de unión a carbohidratos [35]. El primer grupo corresponde a las lectinas de tipo C, dependientes de calcio para su actividad, y el segundo grupo, lo conforman las lectinas de tipo S, que requieren de grupos tioles libres (condiciones reductoras) para mantener su estabilidad. Sin embargo, con el transcurso del tiempo, se observó que algunas lectinas de tipo S no presentaban esta condición, por lo que la nomenclatura se reemplazó por el término de “galectinas” en el año 1994 [36]. Los miembros de esta familia son proteínas solubles definidas por dos propiedades: 1) la presencia de secuencias conservadas en el sitio de reconocimiento a carbohidratos y 2) la especificidad de unión por β -galactósidos, específicamente, dicho sitio reconoce la estructura básica de *N*-acetil lactosamina (Gal β 1,4GlcNAc) [37].

Cada molécula de galectina contiene en su estructura al menos un dominio de alrededor de 135 aminoácidos, responsable de la propiedad de unión de carbohidratos, y por lo tanto, es designado como el dominio de reconocimiento a carbohidratos (DRC). Hasta el momento, se han caracterizado 15 galectinas en los mamíferos, numeradas según la cronología del descubrimiento (galectina-1 a galectina-15). Mediante estudios de la estructura primaria utilizando alineamiento

múltiple de secuencias, se encontró un 29 % de identidad de secuencia entre los DRCs de las galectinas humanas [38]. Por otro lado, la identidad de secuencia entre la misma galectina en distintas especies de mamíferos asciende a un 80-90 %, demostrando que estas proteínas se encuentran altamente conservadas [37]. Además, mediante estudios de cristalografía de rayos-X y experimentos de espectroscopía de resonancia magnética nuclear se ha descrito la estructura de algunos miembros de esta familia, como por ejemplo, de las galectinas -1, -3, -8 y -9. Mediante una comparación exhaustiva de las estructuras de las galectinas humanas, se llegó a la conclusión que la estructura global del DRC se encuentra conservada [38].

De acuerdo a sus características estructurales, las galectinas se clasifican en tres grupos [36, 37, 39, 40] (**Figura 3**):

- 1) *Prototipo*: Estas galectinas contienen un único DRC. Son capaces de asociarse formando homodímeros mediante interacciones no covalentes. A este grupo pertenecen las galectinas -1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 y -15.
- 2) *Quiméricas*: Galectina-3 es la única galectina descrita perteneciente a este grupo. Posee un único DRC en el C-terminal y un dominio N-terminal atípico. El dominio amino-terminal está involucrado en la oligomerización de la lectina, formando trímeros o pentámeros [41].
- 3) *Repetición en tándem*: Estas proteínas poseen dos DRC distintos en tándem, unidos por un péptido. Son naturalmente bivalentes aunque cada DRC pueda reconocer estructuras sacarídicas sutilmente diferentes [42]. Las galectinas de repetición en tándem son las -4, -6, -8, -9 y -12.

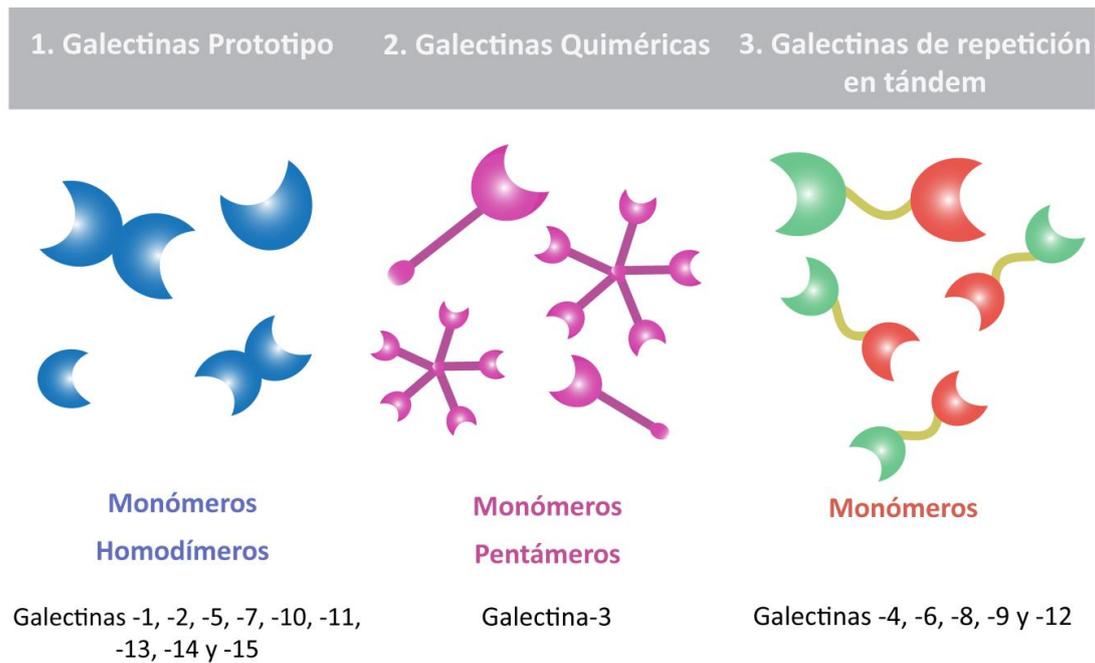


Figura 3. Clasificación de las galectinas. Según su estructura las galectinas se clasifican en prototipo, quiméricas o de repetición en tándem.

La interacción entre las galectinas y los glicanos es compleja y varios factores contribuyen a una unión de alta afinidad, incluyendo la multivalencia natural y estado de oligomerización de la lectina, la multivalencia de sus ligandos, y el modo de presentación de los glicanos. En líneas generales, la unión de un β -galactósido al DRC de una galectina involucra al menos dos interacciones: hidrofílicas, a través de una red de puentes de hidrógeno; e hidrofóbicas, en las que están implicadas las cadenas laterales de aminoácidos aromáticos del DRC [43]. Cada miembro de la familia de las galectinas reconoce distintos tipos de glicanos y muestra mayor afinidad de unión a distintas estructuras. En general, la afección de las galectinas hacia los β -galactósidos simples, como disacáridos o trisacáridos es relativamente baja (con constantes de disociación en el rango de micromolar alto y milimolar bajo). Sin embargo, dicha

afinidad se ve dramáticamente incrementada cuando se trata de la unión de las galectinas a glicanos complejos (en el rango de micromolar o submicromolar) [39, 41].

Las galectinas poseen características estructurales de proteínas citosólicas, no son glicosiladas y carecen de dominios de membrana. Existen evidencias que indican que son sintetizadas en ribosomas libres en el citoplasma, y luego existiría una distribución selectiva de determinadas galectinas a organelas subcelulares, a la membrana plasmática y a vesículas asociadas a la misma [44]. A pesar de ser sintetizadas como proteínas citosólicas, se ha detectado la presencia de distintos miembros de la familia en el núcleo y también asociados a la membrana plasmática. Además, las galectinas pueden ser secretadas hacia el espacio extracelular. El mecanismo por el cual se externalizan aún no ha sido completamente dilucidado, ocurre a través de una vía “no clásica” independiente del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi, e involucra la formación de exovesículas generadas en la membrana [45, 46].

Dado que las galectinas son secretadas por distintos tipos celulares, sus funciones extracelulares se han estudiado a través de experimentos *in vitro*, principalmente mediante la adición exógena de proteínas recombinantes. Una vez en el medio extracelular, las galectinas pueden unirse a β -galactósidos presentes en proteínas y lípidos de la superficie celular y de la matriz extracelular. La propiedad de oligomerización que poseen las galectinas les provee la capacidad de formar redes o entramados de galectinas y glicanos en la superficie celular, y de esta manera, enviar señales al interior de la célula [47]. Por otro lado, las funciones intracelulares de las galectinas se han ido descubriendo a través del control de la expresión de genes en distintos tipos de células, mediante el aumento, disminución o la supresión de su

expresión [48]. Las funciones intracelulares no dependen de la unión de las galectinas a los carbohidratos, sino que se llevan a cabo gracias a interacciones del tipo proteína-proteína.

Las galectinas son reconocidas como reguladoras de la fisiología celular. Se han descrito múltiples funciones para dichas proteínas, las cuales parecen depender del estadio de desarrollo del organismo, de la localización tisular y subcelular, y del estado de oligomerización de estas lectinas. Sus funciones incluyen la participación en la adhesión y migración de las células, en la regulación de la proliferación y apoptosis, en la progresión del ciclo celular, en el proceso de empalme del ARN mensajero (ARNm) y también en la síntesis de citoquinas [44, 49, 50]. De hecho, se ha demostrado que distintos miembros de la familia de las galectinas ejercen un rol crítico como mediadores de la activación plaquetaria y la inflamación aguda y crónica [51-53].

Con respecto a la localización de las galectinas, algunos miembros de esta familia (galectina-1, -3 y -9) están distribuidos en una amplia variedad de tejidos, incluyendo células del sistema inmune, células epiteliales y endoteliales, y neuronas sensoriales (revisado en [54-56]). En cambio, otras galectinas poseen una localización tisular más restringida, por ejemplo, galectina-7 se encuentra principalmente en la piel, galectina-12 está abundantemente expresada en el tejido adiposo, la expresión de galectina-5 está restringida a los reticulocitos de rata y galectina-10 se expresa en eosinófilos humanos y no en los de ratón [56].

Es importante mencionar que las galectinas cumplen un papel fundamental en la biología del cáncer. Estas proteínas frecuentemente se expresan de manera aberrante en varios tipos tumorales [56-58], y esta expresión alterada se correlaciona con la transformación maligna, el crecimiento y la agresividad del tumor, la

angiogénesis tumoral, la adquisición del fenómeno metastásico, y con el escape del tumor al sistema inmune [49, 59-61].

II.2 Galectina-1

Galectina-1 (Gal-1) fue el primer miembro de la familia de las galectinas descubierto. Pertenece a las galectinas *prototipo*, tiene un único DRC y puede formar homodímeros a través de interacciones no covalentes, lo que le confiere la habilidad de formar complejos multivalentes con glicoconjugados específicos [40, 59].

El gen *LGALS1* (*lectin galactoside binding soluble 1*) localizado en el cromosoma 22q12 codifica para la proteína de 135 aminoácidos Gal-1, con un peso molecular aproximado de 14 kDa [54]. El estado de metilación del promotor es un mecanismo clave en la regulación de la expresión génica de Gal-1 [56, 62]. Además, varios factores de transcripción están implicados en la expresión de Gal-1, como el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) en células de cáncer colorectal [63], el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκB) en células T [64] y en sarcoma de Kaposi [65], la proteína activadora 1 en células Reed-Stenberg de linfoma de Hodgkin [66] y la proteína α de unión a la secuencia reguladora CAAT en leucemia mieloide aguda [67].

La estructura del DRC de Gal-1 se encuentra altamente conservada en los vertebrados a lo largo de la evolución. Estudios de cristalografía permitieron revelar la estructura de Gal-1, un sándwich β que consiste en dos hojas β antiparalelas [54, 68]. El bolsillo de unión a carbohidratos está formado por varias hojas β contiguas (S3, S4, S5 y S6) [42]. Gal-1 existe como un homodímero en solución y la integridad del mismo se mantiene principalmente por interacciones que ocurren en la interfase entre los

monómeros y a través del núcleo o centro hidrofóbico [69] (**Figura 4**). Una de las principales características del homodímero es su espontánea disociación a bajas concentraciones ($K_d \sim 7 \mu\text{M}$) hacia la forma monomérica, que también es capaz de unirse a carbohidratos, pero con menor afinidad [70, 71]. Cada monómero de Gal-1 posee seis residuos de cisteína, lo que le confiere una fuerte sensibilidad a la oxidación [39, 70]. Los residuos de cisteína deben estar en estado reducido para mantener la estructura molecular con actividad de lectina, dado que en estado oxidado carece de dicha actividad [72]. Durante la oxidación se forman tres puentes disulfuro en la estructura de Gal-1, produciéndose un cambio conformacional que impide la dimerización y el reconocimiento de glicanos [72, 73]. La presencia de ligandos de Gal-1 desplaza el equilibrio monómero-dímero favoreciendo la dimerización y protegiendo a Gal-1 de la oxidación [74].

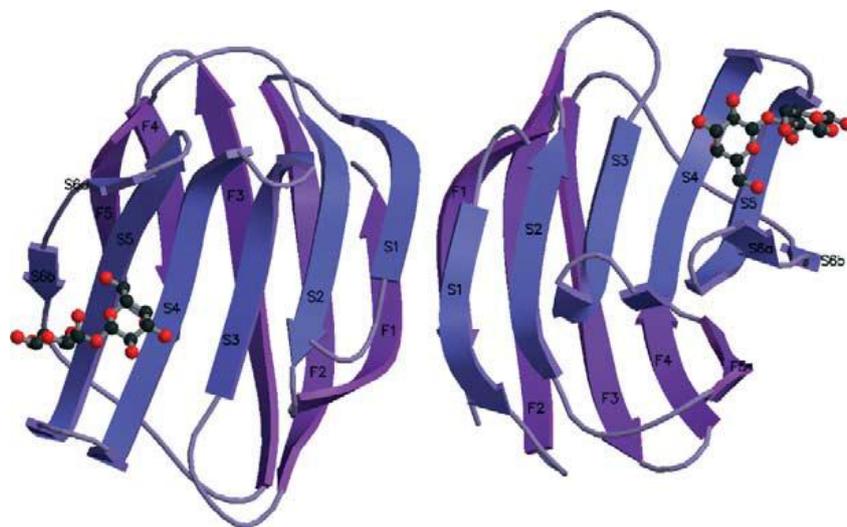


Figura 4. Estructura de Gal-1. Diagrama de cintas de Gal-1 homodimérica. Cada monómero de Gal-1 posee una estructura de β -sandwich: dos hojas β antiparalelas de cinco (F1-F5) y seis (S1-S6) hebras, respectivamente. Los extremos carboxilo y amino de cada monómero están posicionados en la interfase del dímero, los DRCs se localizan los extremos opuestos. Una molécula de lactosa (Gal β 1-4Glc) es ilustrada en cada DRC. Tomado de [54, 69].

Gal-1 posee características de una proteína citoplasmática, posee el extremo amino acetilado y carece de glicosilaciones [75]. Sin embargo, su expresión se describió en el núcleo y citoplasma, y también en la cara intracelular de la membrana plasmática. Aunque Gal-1 carece de una secuencia señal de secreción y no atraviesa la vía clásica del retículo endoplásmico y aparato de Golgi [46], es secretada y se la puede encontrar en la cara extracelular de las membranas plasmáticas, así como en la matriz extracelular (MEC) de varios tejidos normales y neoplásicos (revisado en [54]). La primera vez que se describió la secreción de Gal-1 fue en el año 1990, en células de músculo esquelético [76], pero los mecanismos subyacentes permanecieron desconocidos. Más tarde, el grupo de Nickel demostró que la secreción de Gal-1 de células de mamíferos involucra una translocación directa a través de la membrana plasmática, que requiere de proteínas integrales de membrana y factores citosólicos no identificados [45]. El sitio de unión a glicanos podría ser el primer motivo que dirija la exportación utilizando moléculas de superficie que contengan β -galactósidos como receptores de exportación para Gal-1 intracelular [45].

Gal-1 está involucrada en numerosos procesos fisiológicos incluyendo el crecimiento de células madre neurales, la diferenciación de células del linaje hematopoyético y del músculo esquelético [40, 54] y en la regeneración axonal [77]. Mientras que el rol de Gal-1 en el interior celular suele ser independiente de su actividad de lectina, sus funciones extracelulares dependen de la unión a unidades de *N*-acetil lactosamina presentes en glicoconjugados de superficie [59]. A nivel intracelular, Gal-1 está involucrada en procesos fundamentales como el procesamiento del ARNm [78] y también, interactúa con el oncogén H-RAS y contribuye a su anclaje a la membrana plasmática, activando la vía de señalización RAF-1/ERK [79]. En el espacio

extracelular, Gal-1 se une a glicoconjugados de la superficie celular, incluyendo diferentes miembros de la familia de las integrinas y glicoproteínas de la MEC, como laminina y fibronectina. La presencia de dos DRC en el homodímero le confiere a Gal-1 la propiedad de modular el proceso de adhesión celular. Se ha descrito que esta galectina posee tanto funciones pro-adhesivas como anti-adhesivas, dado que puede potenciar o inhibir las interacciones célula-célula y célula-MEC. Estas diferencias pueden deberse a los diferentes ligandos de Gal-1 de acuerdo al tipo celular, distintos receptores para los componentes de la MEC, y a la concentración y estado de oligomerización de la galectina [80]. Además, la unión de Gal-1 a receptores de superficie transmite señales al interior de la célula [49]. Por ejemplo, mediante su interacción con la integrina β_1 induce la activación de la cascada de transducción de señales asociada a miembros no receptores de tirosina quinasas de la familia de quinasas de adhesión focal (FAK, por sus siglas en el idioma inglés) [81]. Por otro lado, en células endoteliales de cordón umbilical humano, Gal-1 interactúa con neuropilina-1 (NRP1), CD146 y VEGFR2 modulando la migración celular, la apoptosis y la angiogénesis [82-84].

En el sistema inmune, Gal-1 se expresa en el timo, en los nódulos linfáticos, en el bazo, en la médula ósea y en sitios inmunoprivilegiados [85]. Gal-1 es capaz de modular la respuesta inmune innata y adaptativa. Se demostró que inhibe el crecimiento celular y la activación de células T y promueve la apoptosis de células T activadas [86-89]. La administración de Gal-1 *in vivo* previene el desarrollo de la inflamación crónica y atenúa la enfermedad en modelos experimentales de encefalomiелitis autoinmune [90], artritis [91], colitis [92], hepatitis [93], y pancreatitis crónica [94]. Además, Gal-1 participa en los procesos de inflamación aguda y alergias, y

desempeñando actividades anti-inflamatorias, ya que bloquea o atenúa eventos de señalización que conducen a la infiltración, migración y reclutamiento de leucocitos [95].

II.3 Galectina-1 en tumores

Existe una vasta evidencia indicando que en las células tumorales hay un aumento en la expresión de Gal-1 respecto a las células normales y que además, ésta parece secretarse en mayor medida. La expresión de Gal-1 ha sido ampliamente documentada en diferentes tipos de tumores, incluyendo astrocitoma, melanoma, glioma, sarcoma de Kaposi, linfoma de Hodgkin, carcinoma de próstata, tiroides, colon, mama, pulmón, cabeza y cuello, vejiga y ovario (revisado en [96]). La acumulación de Gal-1 preferencialmente en el estroma peritumoral ha sido descrita para los carcinomas de tiroides, cabeza y cuello, colon, ovario y próstata [97].

Estudios realizados en tumores de colon, páncreas y vejiga indican que los niveles de expresión de Gal-1 son mayores en tumores de-diferenciados histológicamente e invasivos, respecto a tumores diferenciados o a tejidos normales [98-100]. En cáncer gástrico y cervical se describió una correlación positiva entre la expresión de Gal-1 y el estadio tumoral, invasión y metástasis en nódulos linfáticos [101, 102]. Resultados similares obtenidos en glioblastoma, sarcoma de Kaposi, cáncer de próstata, mama, colon y gástrico apoyan la correlación inversa entre los niveles de expresión de Gal-1 y la supervivencia [65, 101, 103-107], resaltando la relevancia de esta lectina como un posible biomarcador o blanco terapéutico en cáncer.

La proteína oncogénica H-RAS contribuye en varios aspectos del fenotipo tumoral incluyendo la regulación del crecimiento celular, apoptosis, adhesión y

migración celular, y metástasis. Las vías de señalización de PI3K y RAF-1/MAPK/ERK son las dos vías principales río abajo de H-RAS [108]. H-RAS asociada a la membrana plasmática recluta a Gal-1 desde el citosol a la membrana, y Gal-1 dirige la señal hacia RAF-1 a expensas de PI3K [109, 110]. La sobre-expresión de Gal-1 favorece la asociación de H-RAS-GTP a la membrana celular, donde funciona como una plataforma para la señalización a través de RAF-1, gatillando la activación sostenida de MAPK/ERK [110, 111] (**Figura 5**). De esta manera, Gal-1 a través de su interacción con H-RAS contribuye a la transformación maligna.

La metástasis tumoral incluye una serie de eventos como adhesión celular, invasión, angiogénesis y evasión de la respuesta inmune. La acumulación local de Gal-1 en el microambiente tumoral podría jugar un rol crítico en la adhesión y de-adhesión de las células tumorales a lo largo de la progresión tumoral [112]. Se ha descrito que Gal-1 aumenta la adhesión de células de melanoma, de carcinoma de próstata, ovario y colon a la MEC y a células endoteliales [113-116], y también favorece la migración de células de glioblastoma y de carcinoma hepatocelular [97, 117, 118] (**Figura 5**). La disminución de la expresión de Gal-1 mediante la técnica de ARN de interferencia demostró reducir el fenotipo invasivo de células de carcinoma cervical y de células escamosas [102, 119] y el número de lesiones metastásicas provenientes de tumores de colon y mama [105, 120].

La angiogénesis se refiere a la formación de nuevos vasos sanguíneos inducida por factores secretados por el tumor como VEGF, y es esencial para el crecimiento sostenido de los tumores. Los niveles de expresión de Gal-1 aumentan en las células endoteliales de tumores de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC, por sus siglas en el idioma inglés), colon y mama [82, 121, 122], respecto a las

células endoteliales de tejidos normales. Gal-1 secretada por las células tumorales es captada por las células endoteliales estimulando su proliferación y migración mediante la activación de la vía de señalización RAS/RAF/MAPK/ERK [106]. Mediante la interacción entre Gal-1 y NRP-1, un co-receptor VEGF, se activa la fosforilación de VEGFR2 gatillando la activación de la vía de señalización de las quinasas c-Jun N-terminal (JNK, por sus siglas en el idioma inglés), induciendo la migración y la adhesión de células endoteliales [82]. Gal-1 interactúa de manera dependiente de *N*-glicanos con VEGFR2 y activa la señalización a través del mismo incluyendo la fosforilación de AKT y de ERK1/2, de esta manera, promueve la migración y formación de túbulos de las células endoteliales [84]. Ito y col. demostraron que la secreción de Gal-1 por las células tumorales ejerce un efecto protector del estrés oxidativo en las células endoteliales [123]. En concordancia, Croci y col. demostraron que en condiciones de hipoxia, la expresión y secreción de Gal-1 aumenta a través de la vía de señalización del NFκB en el sarcoma de Kaposi [65]. Luego, Gal-1 secretada interactúa con las células endoteliales activando la angiogénesis (**Figura 5**).

Uno de los principales roles de Gal-1 en la progresión tumoral es inhibir la respuesta inmune promoviendo un ambiente “pro-tumor”. Esto ha sido documentado en modelos murinos de melanoma, linfoma y carcinoma de pulmón, donde el bloqueo de la expresión de Gal-1 resultó en el rechazo del tumor, mediado por la elevada expresión de IFN-γ [124-126]. El escape del linfoma de Hodgkin al sistema inmune ha sido asociado con mayores niveles de Gal-1, que determinan una respuesta predominantemente Th2, acompañado de mayor presencia de linfocitos T regulatorios (Tregs) [66]. En pacientes con HNSCC se describió una correlación inversa entre la expresión de Gal-1 y el reclutamiento de células T [127] (**Figura 5**).

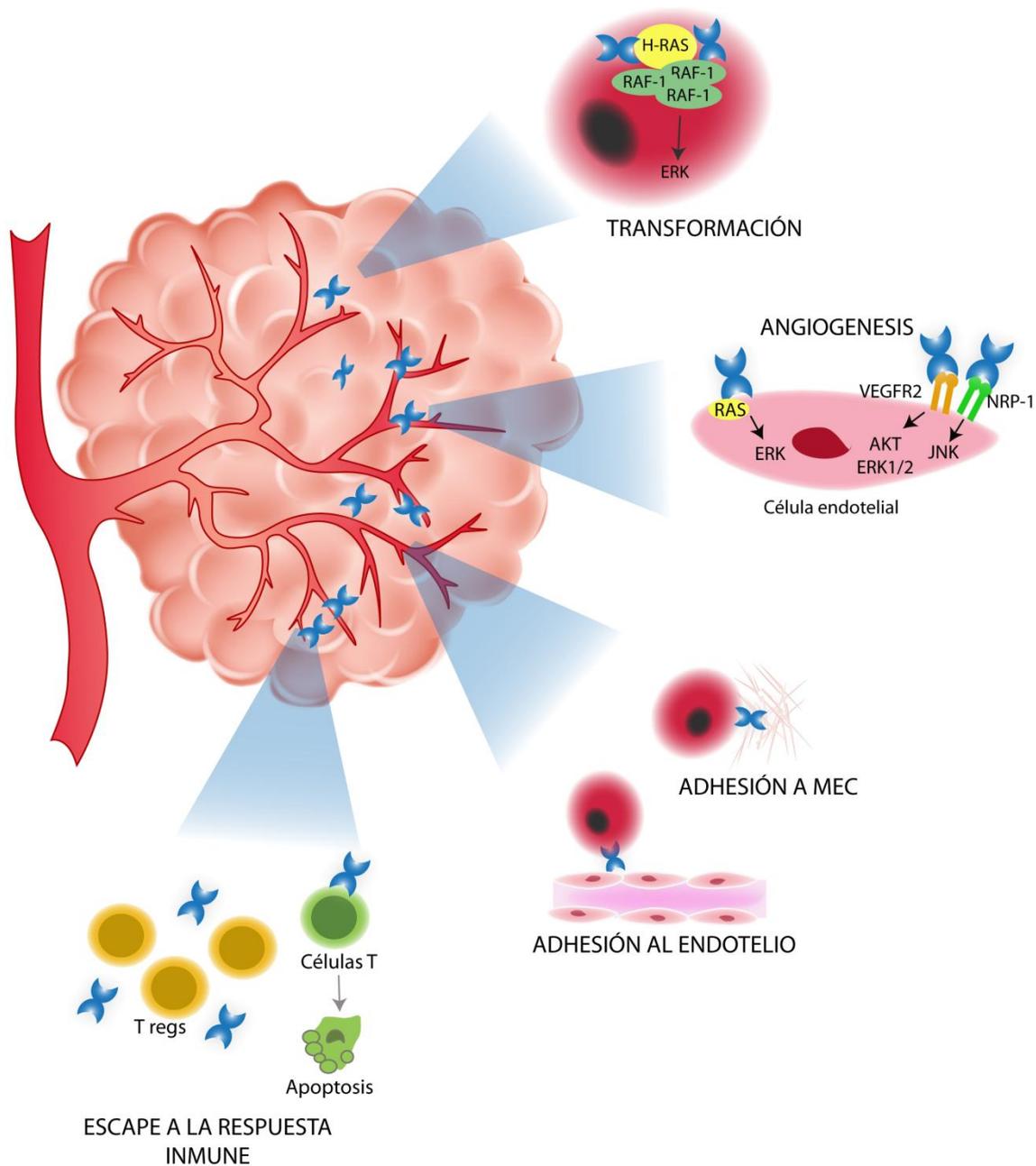


Figura 5. Rol de Gal-1 extracelular o intracelular en la transformación maligna, neovascularización, crecimiento tumoral y escape del tumor al sistema inmune.

II.4 Galectina-1 en la fisiopatología del hígado

Gal-1 se expresa en niveles constitutivos bajos en el hígado normal, mientras que en el CHC su expresión aumenta drásticamente [118, 128, 129]. Mediante un

análisis del perfil de expresión génica de tejidos hepáticos normales y de CHC utilizando una colección de secuencias ADN copia (ADNc) (*microarray*) se logró identificar al gen *LGALS1* como uno de los principales genes que se encuentra sobre-expresado en el CHC, característica que fue luego confirmada por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) [128].

Kondoh y col. dilucidaron el mecanismo molecular que controla la expresión de Gal-1 en los tumores del hígado [129]. Investigaron el estado de metilación del promotor de Gal-1 en tejidos humanos de CHC y tejidos no tumorales adyacentes al tumor, y en distintas líneas celulares de CHC. El análisis del perfil de metilación reveló que ciertos dinucleótidos CpG que rodean al sitio de inicio de la transcripción del promotor de Gal-1 estaban frecuentemente metilados en el hígado no tumoral, mientras que esas secuencias se encontraban hipometiladas en tejidos de CHC [129]. Mediante la técnica de *Northern blot*, los investigadores demostraron que el ARNm de Gal-1 estaba sobre-expresado en tejidos de CHC, en comparación con los tejidos no tumorales adyacentes al tumor y con los tejidos de hígado normal. Los niveles de ARNm de Gal-1 también fueron mayores en las líneas de CHC, HuH-7 y HLF, en comparación con otra línea de CHC, HepG2 y con células hepáticas embrionarias humanas [129].

A pesar de que la sobre-expresión de Gal-1 en el CHC se detectó tanto *in vivo* como *in vitro*, la función precisa de esta lectina en el fisiopatología del hígado fue un tema poco explorado durante muchos años. Sin embargo, trabajos recientes han puesto en evidencia la importancia de Gal-1 en el desarrollo y la progresión del CHC. Spano y col. reportaron que la expresión de Gal-1 se encuentra incrementada en muestras de CHC provenientes de pacientes con metástasis en comparación con las

muestras de pacientes con tumor primario sin desarrollo de metástasis [118]. Con la técnica de *microarray* se analizó el perfil de expresión de Gal-1 en las líneas celulares HuH-7 y JHH-6, en tejidos de hígado normal, cirrótico y CHC. En todos los casos, se confirmó el aumento de la expresión del gen *LGALS1* en el CHC. Además, análisis de inmunohistoquímica revelaron una acumulación preferencial de Gal-1 en el estroma circundante al tumor, sugiriendo que los hepatocitos neoplásicos secretan Gal-1, y ésta se acumula en el estroma [118].

La correlación entre el aumento del nivel de expresión de Gal-1 en el CHC y la presencia de metástasis fue validada en estudios funcionales *in vitro*. La sobre-expresión de Gal-1 en las células HuH-7 incrementó su capacidad de migratoria e invasiva, y ambos procesos involucraron la fosforilación del receptor tirosina quinasa (RTK) SYK [118]. Además, **resultados obtenidos en nuestro laboratorio** demostraron que la sobre-expresión de Gal-1 en células de CHC, HepG2, promueve el crecimiento tumoral y la metástasis *in vivo* [130]. Por lo tanto, como ha sido observado en el cáncer de mama [107], en neuroblastoma [131], en el carcinoma de células escamosas oral y en el adenocarcinoma de pulmón [119], los niveles de expresión de Gal-1 se correlacionan con la agresividad del CHC.

Acerca del valor pronóstico de Gal-1 en pacientes de CHC, Wu y col. reportaron que elevados niveles de expresión de Gal-1 en el CHC se correlacionan significativamente con la agresividad del tumor (invasión vascular, encapsulación incompleta, pobre diferenciación, y tamaño tumoral) y mayor riesgo de recurrencia luego de la operación [132]. La expresión de Gal-1 también se asoció con la recurrencia temprana del tumor (≤ 24 meses) y la diseminación de las células tumorales. Además, se observó una correlación positiva entre la expresión de Gal-1 y la presencia de

linfocitos Tregs FoxP3⁺ [132]. En concordancia con lo anterior, se ha demostrado que Gal-1 es un regulador clave de la respuesta de células Tregs CD4⁺CD25⁺ murinas [133] que juegan un rol esencial en la supresión de la respuesta inmune anti-tumoral. Teniendo en cuenta esta información es posible especular que la interacción de Gal-1 y células Tregs podrían desempeñar un rol en la supresión de la respuesta inmune anti-tumor en el CHC.

Las evidencias existentes al momento resaltan el papel fundamental de Gal-1 en procesos inflamatorios crónicos hepáticos, en la inflamación y fibrosis de los ductos biliares, y también en el crecimiento, agresividad y metástasis del CHC (revisado en [134]). Lo mencionado anteriormente apoya el desarrollo de nuevas terapias efectivas dirigidas contra Gal-1 en patologías hepáticas.

Sección III Transición epitelio-mesénquima

III.1 Características generales

La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un proceso celular durante el cual las células epiteliales pierden su organización y unión célula-célula, sufren cambios en su morfología y organización del citoesqueleto, y adquieren características mesenquimales. Los procesos de TEM ocurren en tres escenarios distintos, y en base a esto, pueden clasificarse en tres subtipos: 1, 2 y 3. La de **tipo 1** tiene lugar durante la embriogénesis, implantación y desarrollo de órganos. La **tipo 2** es la implicada en la inflamación y en reparación de tejidos. Finalmente, la **tipo 3** es la asociada con la progresión tumoral y metástasis.

El proceso de la TEM fue descrito por primera vez por Elizabeth Hay en el año 1982, en cultivos tridimensionales de células epiteliales de la córnea [135]. Al poco tiempo se demostró que las células epiteliales de riñón canino de Madin-Darby (MDCK) son convertidas en células fibroblastoides con propiedades invasivas al interrumpir la adhesión mediada por la proteína cadherina epitelial (E-cadherina) con anticuerpos específicos [136-138]. En los años siguientes, se demostró la pérdida de la expresión de E-cadherina en carcinomas invasivos de mama y estómago [139, 140], y esta disminución en la expresión coincide con la transición a un carcinoma invasivo en un modelo animal de carcinogénesis pancreática [141]. En la última década, se han identificado vías de señalización y factores de transcripción que inducen la TEM en el desarrollo y en la invasión y metástasis de carcinomas. Estos incluyen la vía de TGF- β , la vía WNT, la señalización a través de RTKs, y factores de transcripción como SNAIL, SLUG, ZEB y TWIST, que reprimen la expresión de E-cadherina [142]. La TEM no es un

proceso irreversible, de hecho, el programa reverso, la transición mesénquima-epitelio (TME) también ocurre durante el desarrollo embrionario y durante procesos patológicos [143, 144]. Dependiendo del tejido y la vía de señalización disparada, las células epiteliales pueden perder sólo algunas propiedades, o pueden exhibir algunas propiedades epiteliales y otras mesenquimales, esto es considerado como una TEM parcial.

El crecimiento celular descontrolado y la angiogénesis son características del inicio y de las primeras etapas de la progresión de tumores epiteliales [145]. Las células adquieren la capacidad invasiva en estadios más avanzados, lo que eventualmente conducirá a la diseminación metastásica. El programa de la TEM se propuso como un mecanismo crítico en la adquisición de un fenotipo maligno por las células tumorales epiteliales [146]. La evidencia más sólida de su rol durante la progresión tumoral es la habilidad de múltiples reguladores de la TEM para favorecer la formación tumoral y/o metástasis [146]. La similitud histológica de los tumores secundarios o focos metastásicos respecto al tumor primario, sugiere que luego de la TEM ocurriría el proceso reverso, la TME, para permitir la colonización en sitios secundarios.

III.2 Alteraciones celulares durante la TEM

Los eventos que se consideran fundamentales y que caracterizan el proceso de TEM son los siguientes: 1) Disolución de las uniones epiteliales célula-célula, 2) Pérdida de la polaridad apico-basal con la consecuente adquisición de una polaridad antero-posterior, 3) Reorganización del citoesqueleto y cambios en la morfología, 4) Cambios en el patrón de expresión génica, 5) Incremento de la motilidad, 6) Habilidad para degradar las proteínas de la MEC, invasión y resistencia a la anoikis (**Figura 6**).

Algunas de las mencionadas características que se relacionan directamente con este trabajo se desarrollan detalladamente en las secciones subsiguientes.

III.2.1 Polaridad y motilidad

Las células epiteliales se caracterizan por su polaridad apico-basal, esencial para sus funciones biológicas. Los dominios apical y basal están separados entre sí principalmente por las uniones célula-célula estrechas y adherentes. Una característica de las células mesenquimales, por otro lado, es la pérdida de la polaridad apico-basal y la adquisición de una polaridad antero-posterior, necesaria para la migración celular [147]. En contraste con las células epiteliales, las mesenquimales presentan una morfología plana, fibroblastoide y están débilmente asociadas entre sí.

El proceso de polarización es guiado por proteínas conservadas que proveen la “identidad” a los dominios apical y basolateral. Estas proteínas se organizan en tres complejos principales: *Crumbs*, *partitioning-defective* (PAR) y *Scribble* [148, 149]. *Crumbs* y PAR cooperan en el establecimiento del dominio apical y en la formación de las uniones estrechas, mientras que *Scribble* juega un rol esencial en la definición del dominio basolateral [149]. Existen vastas evidencias que indican que los tumores secuestran las maquinarias de los programas de polarización epitelial, resultando en una célula móvil e invasiva [149, 150]. Las alteraciones relacionadas con la TEM incluyen la sobre-expresión o desregulación de componentes de los complejos de polarización, deslocalización, depleción o producción de proteínas alteradas [151, 152]. Además, durante la TEM, las células deben reorganizar el citoesqueleto de actina, formando proyecciones de membrana que faciliten la migración: lamelipodios y

filopodios. Además, aumentan su contractilidad y forman fibras de estrés de actina [153, 154] (**Figura 6**).

III.2.2 Interacciones intercelulares

La desregulación de la adhesión intercelular es esencial en la TEM patológica, conduciendo a la transformación y metástasis. La adhesión entre células epiteliales se produce principalmente por tres tipos de uniones: las uniones estrechas, las uniones adherentes y los desmosomas. Dichas uniones están formadas por receptores de membrana, generalmente glicoproteínas, que interactúan con el citoesqueleto de la célula mediante su asociación a proteínas citoplasmáticas (**Figura 6**).

Los **desmosomas** son un tipo de unión que asocian los filamentos intermedios del citoesqueleto de células vecinas, formando una red transcelular con una alta resistencia a la tracción mecánica. Varias proteínas de los desmosomas, como placofilinas y desmoplaquina han sido implicadas en la proliferación y transformación celular y en la invasión de tumores [155-157].

Las **uniones estrechas** (UE) comprenden la estructura de unión más apical, y poseen dos funciones importantes: por un lado, establecen una barrera y por otro lado, constituyen un vallado. La primera se refiere a que las UE sellan las células epiteliales entre sí, creando una barrera semi-permeable selectiva para la difusión a través del espacio intercelular. La segunda, consiste en la separación física de los dominios de membrana apical y basolateral, y previene el intercambio de componentes entre ambos. En los últimos años, las UE han demostrado poseer complejos proteicos conservados que regulan la polarización y ensamblado de la

unión, y reclutan moléculas de señalización que participan en la regulación de la proliferación y diferenciación celular y expresión génica [158]. Las UE se componen de proteínas transmembrana, como claudinas, ocludinas y proteínas JAM (*junctional adhesion molecules*), y de proteínas periféricas localizadas en el citoplasma. Éstas incluyen a las llamadas **zonula occludens (ZO)**, y a proteínas regulatorias y de señalización [159, 160]. Las proteínas ZO interactúan directamente con el dominio carboxi-terminal de las ocludinas y claudinas, y a su vez, interactúan con el citoesqueleto de actina [159, 161]. La desregulación de las proteínas de las UE está implicada en la transformación e invasión tumoral. Varios estudios señalan la desregulación de la proteína ocludina, ZO-1 y ZO-2 en diferentes tipos de cáncer, y los bajos niveles de expresión de ZO-1 en tejidos de cáncer de mama se correlacionan con un peor pronóstico (revisado en [158, 160]).

Las **uniones adherentes (UA)** son los sitios de adhesión lateral célula-célula. La principal molécula transmembrana de las UA es **E-cadherina**, que opera de manera homofílica y dependiente de calcio. El dominio intracelular interacciona con las cateninas α , β y p120, que interactúan con los filamentos de actina. Esto crea una comunicación entre el contacto intercelular, regulación del citoesqueleto y morfología, manteniendo a las células inmóviles y unidas físicamente entre sí [147]. Durante la TEM se altera la expresión y localización de las UA, y se reemplaza la E-cadherina por la cadherina neural (N-cadherina), proceso conocido como “*switch* de cadherinas”. La disminución de la expresión de E-cadherina es la marca típica de la TEM y se detallará más adelante.

III.2.3 Interacción célula-MEC

Durante la TEM, las células requieren generar una fuerte interacción con la MEC, migrar a través de la misma y degradar las proteínas que la componen [147]. En primer lugar, se facilitan las interacciones entre las células y componentes de la MEC. Estas interacciones son mediadas principalmente por las integrinas, que a través de su dominio citoplasmático interactúan también con el citoesqueleto. Varias integrinas han sido asociadas con la TEM [162-164], y una de las características de las células mesenquimales es la deposición incrementada de proteínas de la MEC, incluyendo colágeno y fibronectina. Estos componentes estimulan la señalización a través de las integrinas, resultando en la formación de complejos de adhesión focal que facilitan la migración celular [165, 166]. Por otro lado, las células adquieren la capacidad de remodelar o degradar la MEC, generando mecanismos que concentran la actividad proteolítica en el microambiente pericelular como las metaloproteinasas de la matriz (MMPs). Durante la TEM, aumenta la expresión y actividad de las MMPs permitiendo que las células degraden la MEC favoreciendo la invasión de las mismas [167, 168] (**Figura 6**).

III.2.4 Expresión de marcadores mesénquimales

Durante la TEM, las células disminuyen la expresión de proteínas características del fenotipo epitelial, incluyendo aquellas que forman parte de las uniones célula-célula y las involucradas en el proceso de polarización, como se detalló anteriormente. La represión de los genes que codifican proteínas de uniones epiteliales es acompañada por la activación de la expresión de genes cuyos productos proteicos

promueven la adhesión mesenquimal. Específicamente, la disminución de la expresión de E-cadherina es balanceada por el aumento de los niveles de N-cadherina [169]. Mediante este “*switch* de cadherinas”, las células en transición pierden su asociación con las células epiteliales y adquieren una afinidad por las células mesenquimales a través de interacciones homotípicas de N-cadherina; estas interacciones son más débiles que las mediadas por E-cadherina y facilitan la migración e invasión [170].

También se producen cambios en la composición de los filamentos intermedios que favorecen la motilidad: se reprime la expresión de citoqueratina y se activa la de **vimentina** [171]. Los filamentos de queratina y vimentina regulan el tráfico de organelas y proteínas asociadas a membrana, pero difieren en las proteínas que dirigen hacia la membrana. Por ejemplo, los filamentos de queratina, pero no los de vimentina, dirigen a E-cadherina a la membrana [172]. Los filamentos de vimentina interactúan con proteínas motoras y de señalización, favoreciendo la motilidad y el fenotipo mesenquimal [173].

Las células epiteliales y mesenquimales interactúan con componentes diferentes de la MEC por lo que, durante la TEM, disminuye la expresión de algunas integrinas, como las $\alpha6\beta4$, y aumenta la expresión de otras, como $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$ y $\alpha5\beta1$ (revisado en [174]). Además, se incrementa la expresión de proteasas, como las MMP2 y MMP9, relacionadas con la invasión (**Figura 6**).

III.2.5 Resistencia a anoikis

Las células normales son “dependientes de anclaje” es decir, que crecen y se dividen sólo si están asociadas a un soporte sólido. Cuando las células pierden su interacción normal con la MEC, el ciclo celular se arresta y se inicia un tipo de muerte

celular programada, denominado **anoikis** [175]. El inicio y ejecución de la muerte por anoikis es mediado por las vías intrínseca (perturbación mitocondrial) y extrínseca (gatillada por receptores de muerte en la superficie), que convergen en la activación de caspasas, activación de las endonucleasas, fragmentación del ADN y muerte celular [176]. El proceso de anoikis, descrito por primera vez en células epiteliales y endoteliales, puede ser considerado como un relevante proceso fisiológico que asegura el desarrollo y homeostasis de tejidos. Actúa como defensa del organismo previniendo la re-adhesión de células en sitios incorrectos y su crecimiento inadecuado [177]. Por lo tanto, la falla en la ejecución del programa puede resultar en la supervivencia de células adherentes en suspensión, o en la proliferación de las mismas en sitios ectópicos.

Cuando las células cancerosas escapan de la masa tumoral e ingresan en la circulación, deben ser capaces de migrar y sobrevivir en ausencia de interacciones con la MEC, es decir deben escapar al proceso de anoikis. El "*crecimiento independiente de anclaje*" resultante es un paso crucial en la progresión tumoral, dado que estas células tienen el potencial de migrar, colonizar otros tejidos y generar metástasis [178]. La regulación del proceso de anoikis involucra vías de señalización parcialmente compartidas con las relacionadas con la TEM. De hecho, la resistencia al proceso de anoikis es considerada una característica de las células que atraviesan la TEM. La pérdida de E-cadherina induce la resistencia a anoikis promoviendo así, la metástasis [179, 180].

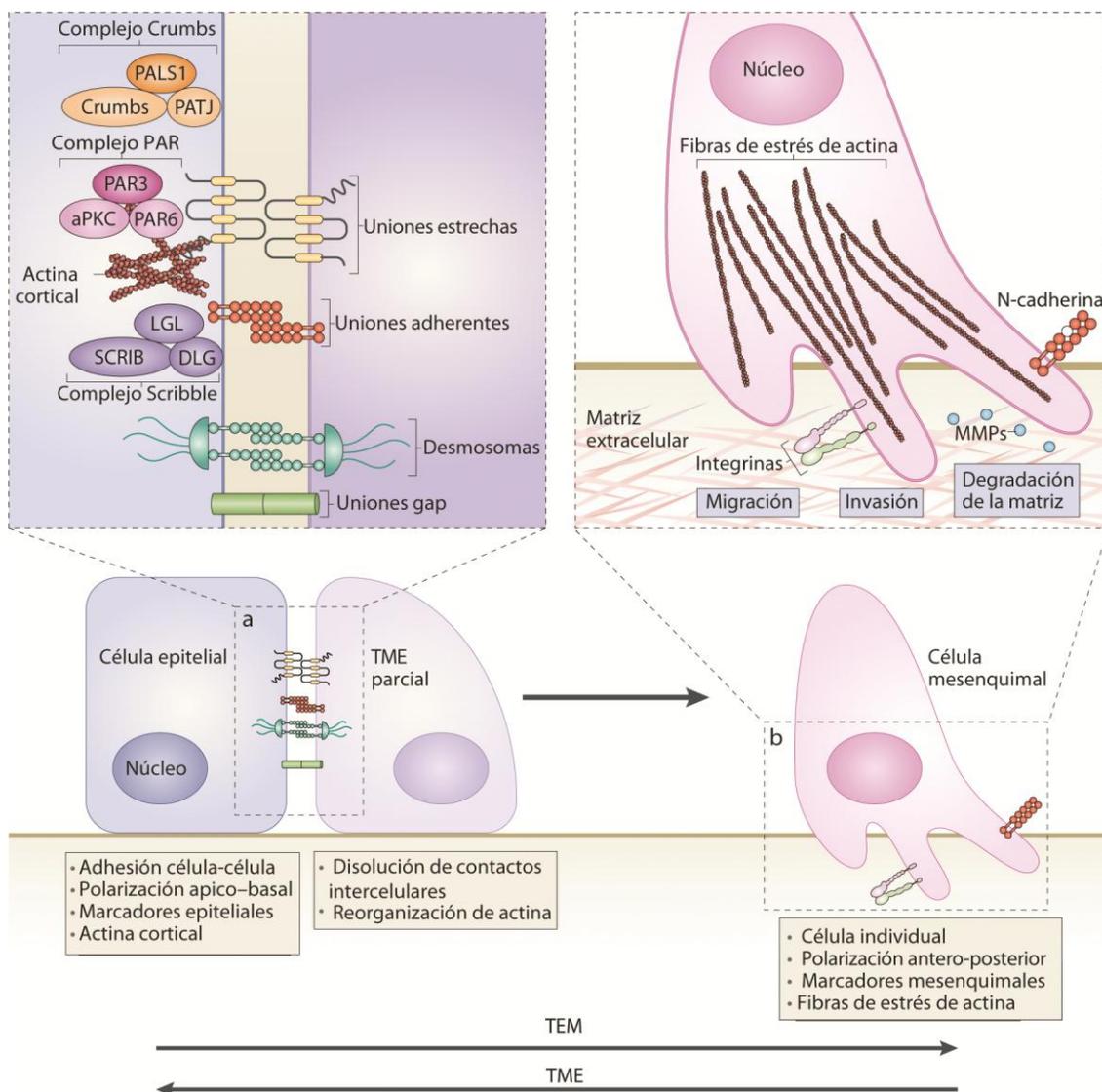


Figura 6. Eventos celulares durante la TEM. a) Los primeros pasos de la TEM son la desorganización de los contactos intercelulares (uniones estrechas, uniones adherentes, desmosomas y uniones gap) y la pérdida de polaridad apico-basal a través de la disrupción de los complejos de polaridad Crumbs, PAR y *Scribble*. Se reprime la expresión de genes epiteliales y se activa la expresión de genes mesenquimales. b) Se reorganiza el citoesqueleto de actina, y las células adquieren la capacidad de migrar e invadir secretando MMPs. El proceso inverso, TME, permite que la célula que ha pasado por la TEM pueda revertir hacia su fenotipo epitelial. Tomado y adaptado de [174].

III.3 El sistema de adhesión mediado por E-cadherina

Las cadherinas clásicas son proteínas transmembrana que interactúan con distintas proteínas citoplasmáticas para llevar a cabo sus funciones en la adhesión intercelular, anclaje del citoesqueleto y señalización. El dominio extracelular de las cadherinas consiste en cinco subdominios repetitivos, llamados dominios EC (del inglés *extracellular cadherin*), y cada uno de ellos contiene una secuencia de unión a calcio [181]. El dominio extracelular dimerizado de una célula interactúa con el correspondiente de la célula vecina. Los dominios citoplasmáticos de las cadherinas se encuentran conservados y se unen a las cateninas; mediante su porción adyacente a la membrana se asocia con la **catenina p120**, mientras que la región carboxi-terminal del dominio citoplasmático se une a **β -catenina**. La α -catenina se une a β -catenina y media la unión con el citoesqueleto, ya sea por unión directa a los filamentos de actina o indirectamente a través de proteínas de unión a actina, como vinculina, formina-1 y α -actinina (revisado en [182]) (**Figura 7**).

Además de su rol en la asociación física de las células, E-cadherina tiene un rol central en la señalización a través de su interacción con β -catenina. Esta catenina se encuentra asociada a la membrana en las uniones adherentes y también en forma libre en el citoplasma donde tiene un rol en la vía de señalización WNT/ β -catenina.

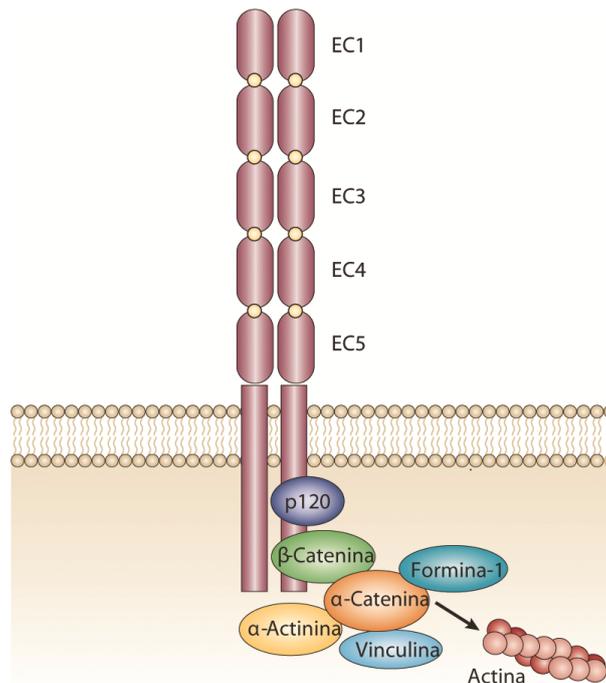


Figura 7. El complejo clásico cadherina-cateninas. La cadherina forma un homodímero en *cis*. La región extracelular contiene 5 dominios repetitivos (ECs). En el citoplasma está asociada a las cateninas p120, α y β . La α -catenina interactúa con la actina y con proteínas de unión a actina, como vinculina, formina-1 y α -actinina. Tomado y adaptado de [182].

III.3.1 Pérdida de función de E-cadherina

Una perturbación en la función de **E-cadherina** en los sistemas celulares de mamíferos es suficiente para iniciar la TEM [180, 183, 184]. En una gran variedad de tumores humanos, la pérdida de E-cadherina está asociada con un peor pronóstico, progresión tumoral y metástasis (revisado en [147]). Tanto en cultivos celulares como en modelos murinos, la expresión forzada de E-cadherina en células invasivas de carcinomas es capaz de inhibir su capacidad de invadir y metastatizar; y al contrario, el bloqueo funcional de E-cadherina en células tumorales no invasivas activa su potencial invasivo y metastásico [141, 185].

Existen múltiples mecanismos y factores implicados en la regulación de E-cadherina, tanto a nivel del ARNm como a nivel proteico, a través de cambios en la distribución subcelular, de eventos transcripcionales y traduccionales, y por degradación de la proteína. En varios carcinomas humanos, la pérdida de función de E-cadherina resulta de la producción de una proteína defectuosa, por ejemplo, por mutaciones somáticas. Además, la expresión de E-cadherina es frecuentemente inhibida por varios mecanismos epigenéticos, como hipermetilación del promotor, y por microARNs [146, 186]. Sin embargo, el mecanismo principal de regulación de esta proteína consiste en la represión transcripcional a través de reguladores que interactúan con las cajas E en el promotor del gen (*CDH1*) que codifica a E-cadherina. Los principales factores de transcripción identificados pertenecen a las familias de SNAIL, TWIST y ZEB (del inglés *zinc-finger E-box binding*) (revisado en [174]).

E-cadherina también se regula a nivel proteico a través de mecanismos relacionados con la estabilidad y modificaciones post-traduccionales. Las cadherinas recién sintetizadas son transportadas desde el aparato de Golgi hacia la membrana plasmática, y una vez en la superficie, serán eventualmente endocitadas. Luego de la internalización pueden ser recicladas de nuevo a la superficie celular [187] o dirigidas para su degradación vía lisosoma [188]. La catenina p120 se une al dominio adyacente a la membrana de la E-cadherina y tiene un rol esencial en su estabilidad [155]. Ireton y col. demostraron que la expresión exógena de p120 en una línea celular de carcinoma de colon es capaz de rescatar la morfología epitelial mediante la interacción con E-cadherina, incrementando sus niveles proteicos pero no de ARNm [189]. Este resultado fue confirmado mediante estudios que demostraron que la pérdida de p120

conduce a la endocitosis de E-cadherina [190]. La integridad del complejo adherente es alterada también por fosforilación. Por ejemplo, la fosforilación en el dominio adyacente a la membrana de la E-cadherina por la quinasa Src, produce el desplazamiento de la catenina p120 desestabilizando la unión adherente [191, 192]. E-cadherina es luego degradada por las ligasas de ubiquitina Hakai o MDM2 [193, 194].

III.4 Factores de transcripción involucrados en la TEM

Los cambios en la expresión génica que contribuyen a la represión del fenotipo epitelial y a la inducción del fenotipo mesenquimal involucra la participación de reguladores “maestros”, que incluye a las familias de factores de transcripción SNAIL, TWIST y ZEB. La expresión de los mismos se activa en etapas tempranas de la TEM, y como poseen distintos perfiles de expresión, su contribución a la TEM depende del tipo celular y de las vías de señalización implicadas. Suelen controlar su expresión mutuamente, y cooperan funcionalmente en la regulación de los genes blanco [195].

Entre los primeros represores identificados se encuentran las proteínas **SNAIL1** (también conocido como SNAIL) y **SNAIL2** (también conocido como SLUG), ambas activan el programa de la TEM durante el desarrollo, fibrosis y cáncer [196-198]. Estas proteínas se componen de una región carboxi-terminal conteniendo 4-6 dedos de Zinc, que median la interacción con el ADN, específicamente con promotores conteniendo la secuencia “cajas E” (CAGGTG). La región amino-terminal contiene el dominio conservado SNAG, esencial para la unión de complejos co-represores [199]. Modificaciones de las histonas, como metilación, fosforilación y acetilación, controlan la expresión génica alterando la estructura de la cromatina. SNAIL recluta enzimas modificadoras de histonas hacia los promotores blanco, a través de su dominio SNAG

(revisado en [174, 200]) conduciendo a la represión transcripcional. Además de reprimir la expresión, SNAIL también induce la expresión de genes asociados con un fenotipo mesenquimal (**Tabla 2**), mediante un mecanismo que aún no ha sido dilucidado. Las múltiples vías de señalización involucradas en la TEM a menudo activan la expresión de SNAIL1, como las vías mediadas por factores de crecimiento que actúan a través de RTKs, las vías de Notch, TGF- β y WNT [195]. El aumento en la expresión de SNAIL puede ocurrir a nivel transcripcional o post-traduccional. La enzima glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3 β , por sus siglas en el idioma inglés) es capaz de fosforilar a SNAIL1 favoreciendo su exportación nuclear, y una vez en el citosol SNAIL1 es degradada vía ubiquitina-proteosoma [201]. Varias vías de señalización incrementan la actividad de SNAIL1 influenciando la fosforilación mediada por GSK3 β , como la PI3K/AKT y WNT/ β -catenina.

Los factores de transcripción **hélice-loop-hélice básicos** incluyen a E12 y E47, TWIST 1 y 2, y a las proteínas inhibidoras de diferenciación (ID) que poseen importantes roles durante la TEM [174]. Se cree que TWIST regula la actividad transcripcional a través de la formación de homo o heterodímeros, las proteínas ID se asocian con TWIST, E12 o E47 e inhiben su función. Recientemente, se demostró que TWIST1 recluta a la metiltransferasa de la histona H4K20, y ambas proteínas cooperan para regular la expresión de E-cadherina y N-cadherina en células de carcinoma de mama [202]. Varias vías de señalización activan la expresión de TWIST durante el desarrollo y tumorigénesis. HIF-1 α induce su expresión en condiciones hipóxicas [203], la activación de la vía del TGF- β aumenta la actividad de TWIST [204], y la vía MAPK conduce a la fosforilación de TWIST, protegiéndolo de la degradación mediada por el

sistema ubiquitina-proteosoma [205]. Al igual que SNAIL, TWIST también reprime la transcripción de genes epiteliales e induce la expresión de genes mesenquimales (**Tabla 2**).

Los factores de transcripción **ZEB1** y **ZEB2** se unen a las secuencias regulatorias en las cajas E y pueden reprimir o activar la transcripción, reclutando un co-represor o un co-activador, respectivamente (**Tabla 2**) (revisado en [174]). La expresión de ZEB1 es inducida por SNAIL1 y en respuesta a varias vías de señalización, como son las vías de TGF- β , WNT, y factores de crecimiento que activan las vías de RAS y MAPK [168].

Recientemente se han descrito otros factores de transcripción que participan en la TEM, cuya regulación y función específica aún no están bien definidas. Muchos de estos factores de transcripción novedosos incluyen por ejemplo, a los de la familia GATA, y a los factores de transcripción “*SRY box*” (SOX) y “*forkhead box*” (FOX) (revisado en [174]). De todas maneras, es claro que los diversos factores de transcripción en conjunto coordinan la represión de los genes epiteliales y la inducción de los genes mesenquimales, siendo algunos reguladores maestros mientras que otros poseen funciones más restringidas dependiendo del contexto celular.

Factor de transcripción	Genes reprimidos durante la TEM	Genes activados durante la TEM	Vías de señalización regulatorias
SNAIL	E-cadherina, claudinas, ocludinas, Crumbs3, PALS1, PATJ, citoqueratinas, desmoplaquina, placofilina	Fibronectina, N-cadherina, colágeno, MMPs, TWIST, ZEB1, ZEB2	TGF- β , WNT/ β -catenina, Notch, PI3K/AKT, NF κ B, EGF y FGF
TWIST	E-cadherina, claudinas, ocludinas, desmoplaquina, placofilina	Fibronectina, N-cadherina, integrina α_5	TGF- β MAPK
ZEB	E-cadherina, ZO-1, Crumbs3, placofilina	N-cadherina, vimentina, MMPs	TGF- β , WNT/ β -catenina, MAPK

Tabla 2. Factores de transcripción maestros de la transición epitelio-mesénquima, sus blancos directos y vías de señalización que inducen su actividad. FGF, factor de crecimiento de fibroblastos; PALS1, proteína asociada con Lin-7 1; PATJ, proteína de las uniones estrechas asociada a PALS1. Revisado en [174, 206].

III.5 Vías de señalización asociadas a la TEM

La regulación de la TEM es compleja, involucra la activación de distintas vías de señalización que convergen en la regulación de la expresión de diversos factores de transcripción. Además, frecuentemente hay una intercomunicación entre dichas vías. La interacción de las células tumorales con el microambiente que las rodea puede inducir la secreción de factores de crecimiento y citoquinas que actúan de forma autócrina y/o parácrina conduciendo a la activación de la TEM.

Se han descrito varios factores de crecimiento y vías de señalización asociadas a la TEM, como por ejemplo EGF, PDGF, FGF, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, por sus siglas en el idioma inglés), TGF- β , WNT, Hedgehog, Notch y NF κ B [147]. La implementación del programa de TEM depende de la activación de las vías de señalización intracelulares, involucrando a las proteínas MAPK, ERK, PI3K, AKT, SMAD, RHO B, β -catenina, factor de células T (TCF, por sus siglas en el idioma inglés)/factor

potenciador linfoide (LEF, por sus siglas en el idioma inglés), RAS y proteínas de la superficie como las integrinas β_1 , $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_v\beta_6$ [207].

La hiperactivación de AKT es frecuente en las células tumorales, y ocurre a través de distintos mecanismos, como por ejemplo, mutaciones de RAS que activan a PI3K, observadas en los carcinomas de páncreas y de colon [208]. La activación de AKT mediada por PI3K conduce a la activación de mTOR, y promueve la progresión del ciclo celular y sobrevivida, inhibe apoptosis y está asociada con la invasión tumoral (revisado en [209]). La expresión de una forma constitutivamente activa de AKT induce la TEM en una línea celular de carcinoma de células escamosas [210]. Además, la fosforilación de GSK3 β mediada por AKT conduce a la estabilización de SNAIL1. También, la activación de la vía PI3K/AKT es esencial en la TEM inducida por TGF- β (revisado en [168]).

Las MAPK son un grupo de proteínas que consisten en al menos cuatro subfamilias: ERK 1 y 2; las quinasas activadas por estrés conocidas como JNK1, 2 y 3; la MAPK p38 y ERK5 [211]. La señalización ocurre a través de la fosforilación secuencial mediada por quinasas asociadas a la membrana celular de una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK), una MAPK quinasa (MAPKK) y una MAPK. Por ejemplo, ERK1 y ERK2 (MAPK) son fosforiladas por las MAPKKs MEK1 y MEK2, que a su vez son sustratos de la MAPKKK RAF-1 [211]. Para transmitir señales extracelulares al núcleo, los componentes terminales de las vías MAPK, como ERK1/2, JNK y p38 deben translocar al núcleo. La vía puede ser activada por factores de crecimiento o por mutaciones en RAS y RAF-1, y dicha activación contribuye en varios aspectos de la TEM. La señalización a través de RAS y RAF induce la activación de RHO GTPasas, conduciendo

a un fenotipo migratorio e invasivo; y estabiliza a TWIST1 [174]. Además, varias observaciones apoyan la existencia de una cooperación entre la vía MAPK y TGF- β en la inducción de la TEM (revisado en [168]).

III.6 Vía de señalización WNT/ β -catenina

La vía de señalización WNT/ β -catenina representa una vía conservada evolutivamente y controla procesos como proliferación y diferenciación celular, motilidad, mantenimiento de tejidos, especificación de linaje y mantenimiento de la pluripotencialidad [212]. Las glicoproteínas WNTs son ligandos de los receptores transmembrana de la familia *Frizzled* que modulan la señalización. En la vía canónica, la principal molécula efectora es β -catenina. En ausencia de señal WNT, los niveles de β -catenina se mantienen bajos mediante la degradación de la misma por un complejo de destrucción. Este complejo incluye múltiples proteínas incluyendo a los supresores tumorales *adenomatous polyposis coli* (APC) y AXINA, a las quinasas caseína-quinasa 1 (CK1, por sus siglas en el idioma inglés) y GSK3 β . APC recluta a β -catenina hacia el complejo de destrucción donde es fosforilada en residuos específicos del extremo amino por las quinasas CK1 y GSK3 β . Estas fosforilaciones facilitan la ubiquitinación de β -catenina y su posterior degradación vía proteosoma. De esta forma, la transcripción mediada por los factores de transcripción de la familia TCF/LEF se encuentra reprimida debido al reclutamiento de co-represores [212]. La interacción de un ligando WNT con el complejo de receptores conteniendo un miembro de la familia *Frizzled* y uno LRP5 o 6, conduce a la inactivación del complejo de destrucción por mecanismos que no están completamente dilucidados. Esto resulta en la aparición de un pool estable de β -catenina soluble en el citoplasma. Entonces, β -catenina puede ingresar al núcleo,

interactuar con los factores de transcripción TCF/LEF y en conjunto con co-activadores nucleares forma un complejo transcripcional que activa a los genes blanco de la vía WNT (revisado en [212]) (**Figura 8**).

Esta descripción de la activación de la vía se realizó en forma simplificada, sin embargo, la visión actual de la vía es más compleja, dado que la expresión, localización y función de β -catenina son reguladas por múltiples mecanismos.

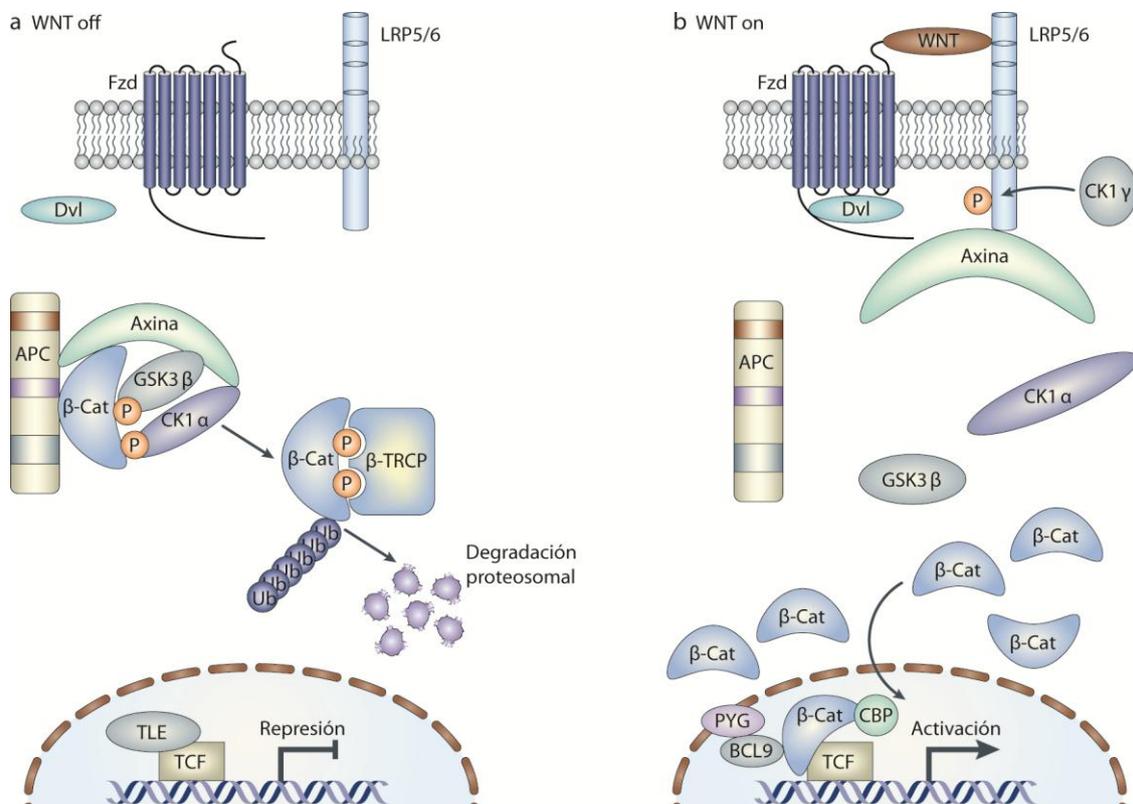


Figura 8. Vía de señalización WNT/β-catenina. A. En ausencia de señal, β-catenina es capturada por el complejo de destrucción, facilitando su fosforilación por CK1α y GSK3β y subsecuente ubiquitinación (mediada por β-TRCP) y degradación proteosomal. Los factores de transcripción TCF/LEF reclutan al co-represor *transducin-like enhancer of split* (TLE) impidiendo la transcripción génica. **B.** El ligando WNT se une a su receptor de la familia *Frizzled* y a LRP5 o LRP6 conduciendo a la inactivación del complejo, por ejemplo gatillando la formación de complejos *Dishevelled* (Dvl)-Fzd y posterior fosforilación de LRP reclutando a axina a la membrana. β-catenina se acumula en el citoplasma e ingresa al núcleo. Allí interactúa con las proteínas TCF desplazando al represor transcripcional, y recluta una serie de co-activadores de la transcripción como CBP, BCL9 y PYG, activando así la transcripción de los genes blanco. Tomado y adaptado de [213].

III.6.1 *β-catenina: estructura y función*

La proteína β -catenina pertenece a la familia de proteínas armadillo, caracterizadas por un dominio central que consiste en repeticiones de una secuencia de 42 aminoácidos denominada la “repetición armadillo”. Estudios estructurales y bioquímicos revelaron la presencia de un dominio amino-terminal y uno carboxi-terminal flexibles, y un dominio central conteniendo 12 repeticiones armadillo. En conjunto, las repeticiones armadillo forman una súper-hélice cargada positivamente, que es importante para la unión con otras proteínas (revisado en [214]). Estas proteínas exhiben sitios de unión solapados en la región central, lo que previene la unión simultánea de las mismas.

β -catenina tiene un rol crucial tanto en la adhesión celular, siendo un componente de las uniones adherentes, como en la señalización de la vía WNT. A lo largo de los años se ha intentado comprender cómo se coordinan ambas funciones, sin embargo, el tema sigue siendo controversial. Existen varios trabajos que sugieren que las funciones de β -catenina en la adhesión y señalización son mediadas por el mismo pool citoplasmático de β -catenina; por ejemplo sugieren que la disminución de cadherinas puede promover la liberación de β -catenina y por lo tanto, su actividad en la señalización; a su vez, la sobre-expresión de cadherinas puede “atrapar” a β -catenina que se encuentre libre en el citoplasma (revisado en [142]). Sin embargo, no se puede descartar que el pool citoplasmático de β -catenina sea recién sintetizado, o bien, sea el resultado de una alteración en su tasa de recambio celular (síntesis/degradación) [215].

A pesar de que la acumulación de β -catenina en el citoplasma parece ser un pre-requisito para su subsecuente translocación nuclear, el mecanismo mediante el cual la proteína ingresa al núcleo no está completamente dilucidado. β -catenina puede transportarse dinámicamente entre el núcleo y el citoplasma, pero no contiene ninguna secuencia de localización nuclear ni tampoco de exportación nuclear [214]. Recientemente, se demostró que interactúa directamente con componentes del complejo del poro nuclear sugiriendo que β -catenina podría pasar a través de los poros nucleares [216]. Además, la distribución relativa de β -catenina probablemente varíe de acuerdo a los niveles y distribución de sus compañeros de unión.

Una vez en el núcleo, β -catenina puede activar la transcripción de los genes blanco formando parte de un complejo con los factores de transcripción TCF/LEF. Los factores TCF se unen a través de su dominio *high mobility group* a un motivo específico en el ADN blanco, los elementos de respuesta a WNT. En ausencia de β -catenina, TCF forma un complejo con el represor transcripcional TLE. La unión de β -catenina desplaza físicamente a TLE y permite que TCF actúe como activador transcripcional [214]. Se ha descrito un gran número de genes blanco de la vía, sin embargo, muchos de éstos se expresan de manera tejido-específica y/o temporalmente restringida. Entre éstos se encuentran factores de transcripción (por ej. miembros de la familia de *SOX*, *C-MYC*, *LEF1* y *TCF*), proteínas reguladoras del ciclo celular (por ej. *CCND1*, codifica para ciclina D1), factores de crecimiento (por ej. *VEGF*), proteínas de la MEC (como fibronectina), citoquinas pro-inflamatorias y enzimas (incluyendo varias MMPs) (revisado en [215]).

III.6.2 Regulación por fosforilación

La función de la β -catenina puede ser regulada por fosforilación. Mientras que la fosforilación en el dominio amino-terminal de β -catenina, mediadas por las quinasas CK1 α y GSK3 β , conducen a su degradación; las fosforilaciones en el dominio carboxi-terminal se asocian con la activación de la señalización WNT. Por ejemplo, las fosforilaciones en los residuos Ser⁵⁵² y Ser⁶⁷⁵ mediadas por AKT y PKA respectivamente, pueden potenciar la activación transcripcional de β -catenina/TCF, posiblemente favoreciendo la interacción con co-activadores transcripcionales [217] (**Figura 9**).

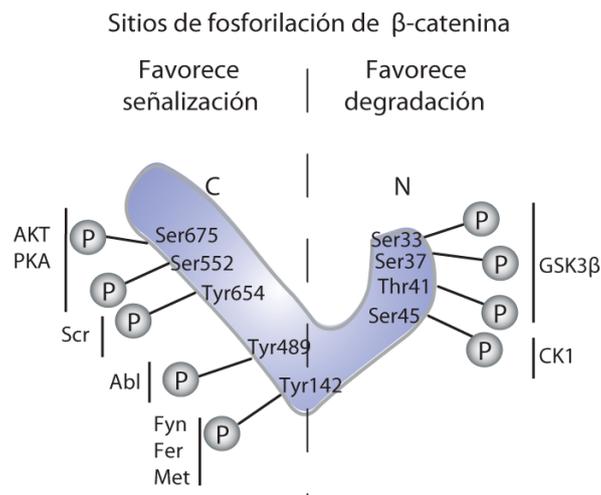


Figura 9. Sitios de fosforilación de β -catenina. β -catenina puede ser fosforilada por diferentes quinasas. La fosforilación en el amino-terminal favorece la degradación, mientras que la fosforilación en el dominio armadillo y el carboxi-terminal cambia la adhesividad a las cadherinas y promueve la translocación nuclear [142].

III.6.3 Vía de señalización WNT/ β -catenina en la TEM

Mutaciones activadoras en los componentes de la vía WNT/ β -catenina, como mutaciones de pérdida de función en *APC* o *CTNNB1* (gen codificante para β -catenina)

y ocasionalmente en *AXINA*, que conducen a un aumento de los niveles de β -catenina son frecuentemente observadas en tumores humanos, incluyendo a los carcinomas colorectal, gástrico y de ovario [218]. Sin embargo, en varios tumores se observa la acumulación nuclear de la misma, aún en ausencia de mutaciones, indicando la existencia de varios mecanismos de regulación (revisado en [219]). Además, un incremento en la expresión de los genes regulados por β -catenina se observa en las células que se ubican en el frente invasivo de tumores colorectales, donde ocurre la TEM [220].

Varios factores de transcripción que regulan la TEM son blancos transcripcionales directos o indirectos de la vía WNT/ β -catenina. Como se dijo en secciones anteriores, la vía WNT inactiva a la proteína GSK3 β por lo que aumentan los niveles de expresión de SNAIL1 (revisado en [214]). De modo interesante, SNAIL1 puede interactuar directamente con β -catenina y potenciar la expresión génica inducida por la misma, creando un mecanismo de retroalimentación positivo [221].

III.7 TEM en el carcinoma hepatocelular

Xu y col. fueron los primeros en demostrar la TEM en una línea celular de CHC humano (SMMC7721) utilizando TGF- β [222]. El fenotipo mesenquimal se confirmó observándose una morfología fibroblastoide, la pérdida de expresión de E-cadherina y la translocación nuclear de β -catenina [222]. Por otro lado, se demostró que la TEM puede ser inducida en una nueva línea celular, LH86 (derivada de un CHC bien diferenciado) a través de EGF, HGF, FGF, y TGF- β , confirmado por la disminución en la expresión de E-cadherina, albúmina, alfa 1-antitripsina (marcadores de fenotipo epitelial), y el aumento en la expresión de vimentina, fibronectina y colágeno [223].

Además, la expresión del gen X del virus de la Hepatitis B [224] y la proteína de la cápside del virus de la Hepatitis C [225] pueden inducir la TEM en células hepáticas en cultivo. Además, células de CHC con un fenotipo mesenquimal (células Mahlavu) son más migratorias e invasivas que aquellas que expresan marcadores epiteliales (células HepG2 y HuH-7) [226].

En cuanto a las evidencias clínicas, mediante inmunohistoquímica se demostró que el 58 % de los casos de CHC humanos presentan niveles reducidos de E-cadherina, de las cateninas α , β y p120, y un incremento de β -catenina nuclear. Notablemente, estos eventos se correlacionan significativamente con la invasión, presencia de metástasis intra-hepática y mal pronóstico [227]. La deslocalización de E-cadherina de la membrana en tumores humanos de CHC está asociada con una menor sobrevida y una mayor invasión vascular [228]. Además, la sobre-expresión de SNAIL y TWIST se asocia con la invasión y metástasis de tumores de CHC [229-231]. Por otro lado, se han encontrado mutaciones puntuales o deleciones en el gen de β -catenina en tumores de CHC de ratones y humanos, las cuales llevan a la acumulación de dicha proteína en el núcleo [232]. Recientemente, utilizando un modelo de ratón conteniendo una deleción en el gen codificante para E-cadherina en el hígado, se demostró que la pérdida de E-cadherina incrementa la susceptibilidad a la carcinogénesis inducida por dimetilnitrosamina y resulta en la progresión del CHC [228].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El carcinoma hepatocelular (CHC) es la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo. A pesar de que el tratamiento de esta enfermedad ha evolucionado durante la última década, su incidencia todavía se equipara con el índice de mortalidad, lo que refleja el mal pronóstico del CHC. La elevada tasa de mortalidad se debe principalmente a la presencia de metástasis, recurrencia tumoral, y a la falta de terapias efectivas. De modo que resulta importante dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen a la diseminación de las células de CHC para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

En la diseminación de las células tumorales, la transición epitelio-mesénquima (TEM) juega un papel esencial. A través de este proceso, las células epiteliales cambian su fenotipo hacia uno mesenquimal con capacidad migratoria e invasiva. Para esto se modifican interacciones célula-célula y célula-MEC; se pierde la polarización apico-basal; se pierden marcadores epiteliales y se adquieren mesenquimales; y se obtiene la capacidad de crecer de manera independiente de anclaje. Existen evidencias experimentales y clínicas que señalan la importancia de la TEM en la diseminación de los hepatocitos malignos durante la progresión del CHC.

Galectina-1 (Gal-1) es una proteína con afinidad por glicanos que contienen β -galactósidos abundantemente expresada en diversos tipos tumorales. Esta galectina puede interactuar con sus ligandos mediante interacciones proteína-carbohidrato y/o proteína-proteína. Se han descrito diversos receptores de Gal-1 en una gran variedad de tejidos, entre éstos se encuentran ligandos presentes en la MEC, en la superficie celular, y también a nivel intracelular. En el microambiente tumoral, actuando a nivel extracelular, Gal-1 modula la adhesión celular, el crecimiento de los tumores, la

migración de las células tumorales, la angiogénesis, la respuesta inmune y la metástasis. Por otro lado, a nivel intracelular interactúa con el oncogén RAS, evidenciándose su papel en la transformación maligna.

Los niveles de expresión de Gal-1 se encuentran drásticamente incrementados en los hepatocitos tumorales, y se asocian con la presencia de metástasis, mayor recurrencia y menor supervivencia en pacientes de CHC. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio demostraron que la sobre-expresión de Gal-1 en células de CHC promueve el crecimiento tumoral y la metástasis *in vivo*. Sin embargo, al momento de comenzar este Trabajo de Tesis, se desconocían los mecanismos mediante los cuales Gal-1 favorece la diseminación de las células de CHC. Por otro lado, nunca se había investigado la contribución de Gal-1 en el proceso de TEM de células epiteliales y tampoco se había descrito ningún ligando de Gal-1 en el CHC.

Bajo este escenario, la **hipótesis** planteada en este Trabajo de Tesis fue la siguiente:

“Un aumento en la expresión de Gal-1 en las células de CHC induce la transición epitelio-mesénquima, un evento crucial en la diseminación tumoral”.

El **objetivo general** propuesto fue:

Evaluar la contribución de Gal-1 en la diseminación de las células tumorales, en particular en la transición epitelio-mesénquima de células de CHC.

Mediante la utilización de líneas celulares humanas de CHC con distinto nivel de expresión de Gal-1, o con el agregado de Gal-1 recombinante (rGal-1) se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

- I. Investigar el papel de Gal-1 como un modulador de la adhesión de hepatocitos tumorales y evaluar las vías de señalización involucradas.*
- II. Evaluar el papel de Gal-1 en la polarización de hepatocitos tumorales, evaluando las vías de señalización que desencadena dicha galectina.*
- III. Determinar si Gal-1 altera la expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales, y su contribución a la resistencia a la anoikis.*
- IV. Investigar la participación de Gal-1 en la inducción de la vía de señalización WNT/ β -catenina, una de las principales vías asociadas a la TEM en el CHC.*
- V. Identificar ligandos de Gal-1 presentes en las células de CHC.*

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo celular

En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares:

HepG2-C3A (ATCC CRL-10741): Las células HepG2 son hepatocitos obtenidos de un carcinoma hepatocelular humano, proveniente de un adolescente de 15 años de género masculino. C3A es un clon derivado de las células HepG2 seleccionado por su fuerte inhibición del crecimiento por contacto, elevada producción de albúmina y alfa fetoproteína, y por su habilidad para crecer en medios deficientes en glucosa.

HuH-7 (JCRB 0403): Esta línea celular fue establecida por Nakabayshi y Sato en 1982. Son hepatocitos provenientes de un carcinoma hepatocelular en estadio diferenciado de un hombre de 57 años de edad. Estas células fueron donadas gentilmente por la Dra. Verónica Mathet (Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica, IMPAM, UBA-CONICET).

1.2. Mantenimiento y subcultivo de las células

Las líneas celulares HepG2-C3A y HuH-7 se cultivaron en botellas de 25 cm² con 5 ml de medio esencial Dulbecco (DMEM) rico en glucosa (25 mM) (Gibco-Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) suplementado con suero fetal bovino (SFB; Natocor, Córdoba, Argentina) al 10 % inactivado por calor, conteniendo penicilina 50 U/ml y estreptomycin 50 µg/ml, a 37 °C en una atmósfera húmeda de CO₂ al 5 % en aire. Al alcanzar un 80 % de confluencia, las células se lavaron con 5 ml de *buffer* de fosfatos salino (PBS, 10 mM, NaCl 150 mM pH 7,2) y se incubaron con 400 µl de una solución de tripsina al 0,25 % (p/v), ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM (Gibco) durante 1-3 min a 37 °C. Luego, el efecto proteolítico de la tripsina se inhibió

por dilución con medio de cultivo conteniendo SFB. El número de células viables se determinó mediante el ensayo de exclusión del colorante vital Azul de Tripán 0,4 % (p/v), siendo la viabilidad en todos los casos mayor al 95 %. A continuación, las células se subcultivaron en botellas de 25 cm².

Las líneas celulares se preservaron mediante criopreservación. Para ello, se utilizaron cultivos en fase exponencial de crecimiento (50-60 % de confluencia), se cosecharon las células como se indicó anteriormente y se resuspendieron en medio DMEM conteniendo SFB al 50 % y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10 %. Luego, las células se colocaron en criotubos, los cuales se conservaron a -70 °C durante 24-48 h, y luego se transfirieron a nitrógeno líquido.

2. Obtención de plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo se describen a continuación:

pT7IML-1-LGALS1: Este plásmido conteniendo la secuencia codificante para Gal-1 humana, y el gen de resistencia a ampicilina; se utilizó para preparar Gal-1 recombinante. Fue gentilmente donado por la Dra. Linda Baum (Universidad de California, Los Ángeles, Estados Unidos).

pcDNA3.1 y pcDNA3.1-LGALS1: El plásmido pcDNA3.1 se obtuvo de la compañía Invitrogen. El plásmido pcDNA3.1-LGALS1, conteniendo la secuencia codificante para Gal-1 y el gen de resistencia al antibiótico G418, fue gentilmente donado por el Dr. Gabriel A. Rabinovich (Instituto de Biología y Medicina Experimental; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA). Se utilizó para evaluar el efecto de la sobre-expresión de Gal-1 en las células de CHC.

pTOP-Flash y pFOP-Flash: El plásmido TOP-Flash posee tres copias del motivo TCF (CCTTTGATC), mientras que el FOP posee tres copias del motivo mutado (CCTTTGGCC); río arriba del promotor mínimo *c-Fos* que controla la transcripción del gen codificante para la enzima luciferasa [233]. Estos plásmidos fueron gentilmente donados por la Dra. Elba Vazquez (Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA). Se utilizaron para estudiar la activación de la vía WNT/ β -catenina.

pSV- β -galactosidasa: El vector de expresión de la enzima β -galactosidasa se obtuvo de la compañía Promega (Madison, WI, Estados Unidos). El gen *lacZ* está bajo el control del promotor constitutivo SV40. Se utilizó como control positivo para monitorear la eficiencia de transfección en el ensayo de genes reporteros.

2.1. Preparación de bacterias competentes

Las bacterias competentes de la cepa *Escherichia coli* DH5 α se prepararon partiendo de un cultivo de medio completo Luria-Bertani (LB; triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l) sin antibióticos, crecido toda la noche a 37 °C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0,4-0,6. Luego se centrifugaron a 700 x g durante 5 min a 4 °C en una centrífuga Sorvall RC-5C (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), el precipitado se resuspendió en 4 ml de CaCl₂ 50 mM estéril y se incubó durante 15 min en hielo. Luego, se centrifugó nuevamente 700 x g durante 5 min a 4 °C y el precipitado obtenido se resuspendió en 3 ml de CaCl₂ 50 mM frío y estéril conteniendo glicerol al 15 % (v/v) y se fraccionó. Las bacterias competentes obtenidas se conservaron a -70 °C.

2.2. Transformación de bacterias competentes

Se descongelaron 100 µl de las bacterias competentes y se transformaron con 1 µg del plásmido correspondiente. Luego de una incubación de 30 min en hielo, se realizó un *shock* térmico (2 min a 42 °C, luego 5 min en hielo) para permeabilizar la pared bacteriana. Luego de agregar 600 µl de medio LB sin antibiótico, se incubó durante 1 h a 37 °C en agitación. Para seleccionar las bacterias transformadas se rastrillaron 100 µl del cultivo en una placa de LB-agar (15 g/l) conteniendo el antibiótico de selección (100 µg/ml de ampicilina) y se incubaron durante 16 h a 37°C. Se picó una colonia individual con un tip y se la incubó en 2-3 ml de medio líquido LB conteniendo ampicilina durante 4-6 h a 37 °C en agitación. Luego se realizó una dilución 1:500 de este cultivo en medio LB conteniendo ampicilina y se incubó durante 16 h a 37 °C en agitación. Las bacterias transformadas obtenidas se conservaron en glicerol al 15 % (v/v) a -70 °C y a partir de ellas, se realizó la extracción del ADN plasmídico.

2.3. Aislamiento del ADN plasmídico

La extracción se llevó a cabo por el método de lisis alcalina utilizando el kit *QIAprep® Spin Miniprep* (Qiagen). El cultivo bacteriano crecido durante toda la noche, se centrifugó a 6.000 x g durante 5 min en una centrífuga Sorvall, el precipitado (obtenido de 10 ml de cultivo) se resuspendió en 0,5 ml de *buffer* P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, ARNasa A 100 µg/ml). Luego se agregó 0,5 ml de *buffer* de desnaturalización de ADN, P2 (NaOH 200 mM, dodecil sulfato de sodio (SDS) 1 % (p/v)), se mezcló por inversión, se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, y luego se agregó 0,7 ml de *buffer* de renaturalización N3 (Cloruro de guanidinio 4,2 M,

acetato de potasio 0,9 M pH 4,8). Este método aprovecha las diferencias de tamaño entre el ADN cromosómico y el plasmídico. Este último, de menor tamaño, es el único capaz de renaturalizarse. Luego de centrifugar a 17.000 x g durante 10 min en una microcentrífuga Sorvall Legend Micro 17 (Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), el sobrenadante se colocó en una columna, sobre un tubo colector y se volvió a centrifugar durante 1 minuto a la misma velocidad. Se lavó con 0,5 ml de *buffer* PB (cloruro de guanidinio 5 M, isopropanol 30 % (v/v)) y se centrifugó nuevamente. Luego de otro lavado con 0,75 ml de *buffer* PE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, etanol 80 % (v/v)) y una nueva centrifugación, el ADN plasmídico retenido en la columna se eluyó con 50 µl de *buffer* EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5). El plásmido aislado se cuantificó por espectrofotometría determinando la absorbancia a 260 nm y se analizó su pureza mediante electroforesis en geles de agarosa.

3. Preparación de Gal-1 recombinante (rGal-1)

3.1 Expresión de rGal-1

La expresión de rGal-1 se llevó a cabo en bacterias *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformadas por shock térmico con el plásmido pT7IML-1-LGALS1. Las bacterias transformadas se seleccionaron en presencia de ampicilina 100 µg/ml en medio de cultivo LB con agar 15 g/l. Las colonias obtenidas se incubaron en medio de cultivo LB durante toda la noche a 37 °C en agitación. Se indujo la expresión de la lectina con el agregado de isopropil-tiogalactósido (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) en una concentración final de 0,1 mM durante 3 h a 37 °C en agitación, seguidos de 1 h a 28 °C para permitir el correcto plegado proteico. El cultivo se cosechó por centrifugación a 3.500 x g durante 20 min a 4 °C, en una centrífuga Sorvall. El

precipitado bacteriano se resuspendió en *buffer* Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, ditioneitol (DTT) 2 mM, fluoruro de fenilmetil-sulfonilo (PMSF) 2 mM.

3.2 Purificación de rGal-1

La suspensión celular obtenida como se describió en el ítem anterior, se sonicó utilizando 3 ciclos de 2 min cada uno a un 20 % de la máxima potencia de un sonicador BRANSON Sonifier 450 (Branson Ultrasonics, Danbury, Estados Unidos). El extracto bacteriano se clarificó mediante centrifugación a 26.000 x g por 45 min a 4 °C en una centrífuga Sorvall. El sobrenadante se sometió a cromatografía de afinidad en una columna de lactosa-agarosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), aprovechando la propiedad de Gal-1 de unir β -galactósidos. La columna se equilibró con *buffer* DEPBS (PBS conteniendo EDTA 2 mM, DTT 2 mM) y la elución se llevó a cabo con DEPBS conteniendo lactosa 100 mM. Las fracciones eluidas se concentraron por ultrafiltración utilizando filtros Amicon Ultra-15, con un tamaño de poro de 10.000 Da (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) para alcanzar una concentración máxima de rGal-1 de 2 mg/ml. La pureza de rGal-1 obtenida se comprobó por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Su actividad de lectina se confirmó determinando su capacidad hemaglutinante sobre eritrocitos de conejo [234].

3.3 Eliminación de endotoxinas

Para eliminar el contenido de endotoxinas provenientes del cultivo bacteriano (Gram negativo), se realizó una cromatografía de afinidad en una columna de polimixina B-agarosa (Sigma-Aldrich) según indicaciones del fabricante [235, 236]. El

contenido de lipopolisacáridos (menos de 0,25 unidades de endotoxina/ml) se controló con el kit de detección de endotoxinas Gel-Clot *Limulus* (PyroLab). La preparación de rGal-1 libre de endotoxinas se conservó en DEPBS a -20 °C en presencia de lactosa 100 mM, para evitar la formación de agregados proteicos. Antes de cada ensayo, rGal-1 se dializó contra una solución de PBS conteniendo DTT 1 mM. Este agente reductor es necesario para conservar al máximo la actividad de unión a carbohidratos de Gal-1.

4. Análisis de la expresión de proteínas

4.1. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas celulares se realizó con 100 µl de *buffer* de lisis (Tris 100 mM, pH 7,4, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM, Tritón X-100 al 1 % (v/v), pirofosfato de sodio 100 mM, fluoruro de sodio 100 mM, orto-vanadato de sodio 10 mM, PMSF 2 mM y aprotinina 0,1 mg/ml) cada 1×10^6 células. La suspensión se agitó vigorosamente y se incubó a 4 °C durante 45 min. Luego se centrifugó a una velocidad de 14.000 x g a 4 °C durante 10 min en una microcentrífuga Sorvall Legend Micro 17. Se recuperó el sobrenadante y se determinó el contenido de proteínas mediante el micrométodo de Bradford, como se describe en el ítem 4.3 de esta sección.

4.2. Obtención de medios condicionados

Las células se cultivaron durante 24 h en medio DMEM conteniendo SFB al 10 % para obtener monocapas subconfluentes. Se reemplazó el medio por DMEM libre de SFB y las células se cultivaron otras 24 h. El medio condicionado del cultivo fue cosechado, y centrifugado a 1.000 x g durante 10 min. Al sobrenadante obtenido se le agregó SDS para obtener una concentración final de 0,5 % (v/v) y se calentó a 100 °C

durante 10 min. Se realizó una dilución 1/10 con metanol para precipitar las proteínas presentes en el medio condicionado, y se incubó toda la noche a -20 °C. Luego de centrifugar a 21.000 x g durante 30 min, se recuperó el precipitado y se resuspendió en 500 µl de agua destilada. El contenido de proteínas se determinó mediante el micrométodo de Bradford, como se describe en el ítem 4.3 de esta sección.

4.3. Determinación de la concentración de proteínas

El contenido de proteínas totales de las muestras a utilizar se determinó según el método descrito por Bradford [237]. El método se realizó en placas de 96 pocillos con fondo plano. 5 µl de la muestra o de la solución de proteína estándar, en la dilución correspondiente, se diluyeron en agua destilada (1:5). Luego se incubaron con 200 µl del reactivo de Bradford (Azul Brillante de *Coomassie* G-250 al 0,01 % (p/v), ácido fosfórico al 10 % (v/v), etanol al 5 % (v/v)) durante 5-10 min. Se determinó la absorbancia a 595 nm en un equipo ELISA Reader Model Σ960 (Metertech Inc., Taipei, Taiwan). La curva de calibración se realizó con una solución de seroalbúmina bovina (BSA, Sigma-Aldrich), en un rango de concentraciones de 0,02-0,24 mg/ml.

4.4. Preparación de muestras para SDS-PAGE

Entre 25 y 30 µg de proteínas de cada muestra se disolvieron en *buffer* de siembra 2X (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8; SDS al 4 % (p/v); glicerol al 20 % (v/v), β-mercaptoetanol al 10 % (v/v); azul de bromofenol al 0,005 % (p/v)). Las proteínas se desnaturalizaron mediante una incubación a 100 °C durante 5 min. Luego se centrifugaron a 14.000 x g durante 1 minuto en una microcentrífuga Sorvall Legend Micro 17.

4.5. SDS-PAGE

Las proteínas se resolvieron mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (en presencia de SDS) en el sistema Mini-Protean 3 (Bio-Rad Laboratorios Inc., Berkeley, California, Estados Unidos). Los geles se polimerizaron sobre placas de vidrio de 7,3 x 10,1 cm y 8,3 x 10,1 cm con separadores de 0,75 mm. Se utilizó un gel concentrador al 4 % de poliacrilamida (29,2 % (p/v) y bis-acrilamida 0,8 % (p/v), y un gel separador de entre 7,5 y 12 % de poliacrilamida, según las proteínas a separar (**Tabla 3**). El gel separador consistió en Tris 0,375 M, pH 8,8; Acrilamida/Bisacrilamida 12, 10 o 7,5 % (p/v); SDS al 0,1 % (p/v); Persulfato de amonio (PSA) al 0,1 % (p/v) y TEMED al 0,07 % (v/v). El gel concentrador consistió en Tris 0,125 M, pH 6,8; Acrilamida/Bisacrilamida 4 % (p/v); SDS al 0,1 % (p/v); PSA al 0,05 % (p/v) y TEMED al 0,05 % (v/v).

En la mayoría de los casos se utilizó el sistema de *buffer* Tris-Glicina [238]; cuyo *buffer* de corrida fue: Tris 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM, SDS al 0,1 % (p/v). Para evaluar la movilidad electroforética de Gal-1, se utilizó el sistema de *buffer* Tris-Tricina, el cual resuelve mejor proteínas de peso molecular menor a 20 kDa [239]. Sus *buffers* de corrida fueron: *buffer* Ánodo, Tris-HCl 200 mM, pH 8,9 y *buffer* cátodo, Tris-HCl 100 mM, pH 8,25, Tricina 100 mM, SDS al 0,1 % (v/v). En todos los casos se incluyeron proteínas marcadoras de peso molecular, siendo las mismas: miosina (200 kDa), β -galactosidasa (116,25 kDa), fosforilasa b (97,4 kDa), sero-albúmina bovina (BSA, 66 kDa), ovo-albúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (14,4 kDa) y aprotinina (6,5 kDa) (*Molecular weight standards, broad range*, Bio-Rad). Las corridas electroforéticas se desarrollaron a temperatura

ambiente, aplicando un voltaje constante de 50 V durante aproximadamente 30 min, hasta que las proteínas alcancen el gel separador, y luego se incrementó el voltaje a 100 V.

4.6. Técnica de Western blot

Luego de la corrida electroforética, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF; Bio-Rad) utilizando el sistema Mini-Trans Blot (Bio-Rad). La transferencia se realizó utilizando un *buffer* Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM, metanol al 20 % (v/v), aplicando un voltaje constante de 100 V durante 1 h a 4 °C. Para visualizar las proteínas transferidas, la membrana se tiñó con una solución de Rojo Ponceau-S al 0,5 % (p/v) en ácido acético al 1% (v/v), durante 5 min a temperatura ambiente. Luego de un exhaustivo lavado de la membrana, los sitios de unión inespecíficos se bloquearon mediante la incubación con una solución de bloqueo de leche en polvo descremada al 5 % (p/v) en *buffer* TBS (Tris-HCl 50 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. En aquellos casos donde se analizó la expresión de proteínas fosforiladas, la solución de bloqueo utilizada fue *buffer* TBS conteniendo BSA al 3 % (p/v). Luego, la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 3**), disuelto en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C en agitación. Seguido de exhaustivos lavados con TBS conteniendo Tween al 0,1 % (v/v), la membrana se incubó con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a la enzima peroxidasa durante 1 h a temperatura ambiente en agitación (**Tabla 3**). Luego de varios lavados con TBS conteniendo Tween al 0,1 % (v/v), se realizó el revelado con el Kit de quimioluminiscencia ECL (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, Estados Unidos) utilizando placas *Amersham*

Hyperfilm (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). La cuantificación de la expresión proteica se realizó mediante densitometría respecto a la proteína utilizada como control de carga utilizando el software *ImageJ* (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, Estados Unidos; <http://rbsweb.nih.gov/ij/>).

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en este trabajo. Se detallan los distintos anticuerpos, sus diluciones de trabajo y los porcentajes de entrecruzamiento utilizados en los experimentos de SDS-PAGE y *Western blot*, de acuerdo al tamaño de cada proteína analizada.

Antígeno	Tipo	Marca	Dilución	% Gel
E-cadherina	Ratón AcM	BD Transduction Laboratories	1:1000	7,5 %
β -catenina	Ratón AcM	BD Transduction Laboratories	1:3000	7,5 %
Catenina p120	Ratón AcM	BD Transduction Laboratories	1:3000	7,5 %
Vimentina	Ratón AcM	BD Pharmigen	1:100	12 %
SNAIL1	Conejo AcP	Abcam Inc.	1:200	12 %
ZO-1	Conejo AcP	Zymed	1:500	7,5 %
Fosfo- β -Catenina ^{Ser552}	Conejo AcM	Cell Signaling	1:2000	7,5 %
Fosfo-AKT ^{Thr308}	Conejo AcP	Cell Signaling	1:1000	7,5 %
AKT 1/2/3	Conejo AcP	Santa Cruz	1:1000	7,5 %
Fosfo-ERK1/2 ^{Thr202/Tyr204}	Conejo AcM	Cell Signaling	1:1000	10 %
ERK1/2	Conejo AcM	Cell Signaling	1:2000	10 %
Ciclina D1	Conejo AcP	Santa Cruz	1:1000	10 %
c-MYC	Conejo AcP	Santa Cruz	1:500	10 %
MRP2	Ratón AcM	Chemicon	1:200	7,5 %
MDR1	Ratón AcM	Calbiochem	1:200	7,5 %
Gal-1	Cabra AcP	Santa Cruz	1:50	12 %
Gal-1	Conejo AcP	*	1:1000	12 %
Prohibitina-1	Conejo AcP	Santa Cruz	1:700	12 %
β -actina	Conejo AcP	Sigma-Aldrich	1:1000	7,5/10/12 %
β -tubulina	Ratón AcP	Sigma-Aldrich	1:5000	10 %
IgG ratón	Cabra-HRP	Santa Cruz	1:10000	
IgG conejo	Cabra-HRP	Sigma Aldrich	1:10000	

AcP, anticuerpo policlonal. AcM, anticuerpo monoclonal. HRP, enzima peroxidasa. *Generado por las Dras. Nilda Fink y Mariana González (Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata).

5. Técnica de inmunofluorescencia

Las células correspondientes (50.000) se cultivaron a 37 °C sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro (Fisher Scientific) dispuestos en placas de 24 pocillos, previamente recubiertos con poli-L-lisina al 0,1 % (p/v) en agua destilada. Luego del tiempo de incubación indicado, se retiró el medio de los pocillos y las células se lavaron con 200 µl de PBS.

Para la inmunolocalización de las proteínas MRP2 y MDR1, la fijación de las células se llevó a cabo con 200 µl de p-formaldehído al 4 % (p/v) en PBS durante 15 min a temperatura ambiente, luego de tres lavados con 200 µl de PBS de 10 min cada uno, se permeabilizaron las células mediante la incubación con Tritón X-100 al 0,5 % (v/v) en PBS durante 10 min. En cambio, para la inmunolocalización de las proteínas E-cadherina, β-catenina y vimentina, las células se fijaron y permeabilizaron con 200 µl de metanol previamente enfriado, durante 10 min a -20 °C, seguido de tres lavados con 200 µl de PBS de 10 min cada uno. Luego, en todos los casos, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con 200 µl de BSA al 1 % (p/v), Tritón x-100 al 0,1 % (v/v) en PBS durante 1 h. Después, las células se incubaron con 50 µl del anticuerpo primario correspondiente a 4 °C durante toda la noche. Las diluciones de los anticuerpos se realizaron en la solución de bloqueo y fueron las siguientes: 1:20 para anti-MDR1 (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), 1:100 para anti-MRP2 (Chemicon, Millipore Corporation, Billerica, MA, Estados Unidos), 1:30 para E-cadherina (BD Transduction Laboratories, BD Biosciences), 1:300 para β-catenina (BD Transduction Laboratories), 1:100 para vimentina (BD Transduction Laboratories), 1:50 para prohibitina-1 (Santa Cruz). Seguido de tres lavados con solución de bloqueo de 5

min cada uno, se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación: para MRP2 y MDR1 se utilizó un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC, 1:100, Jackson Immunoresearch Laboratories, Baltimore, Maryland, Estados Unidos); para prohibitina-1 se utilizó un anti-IgG de conejo conjugado a cianina Cy3 (1:300, Jackson Immunoresearch Laboratories); mientras que para β -catenina, vimentina y E-cadherina se utilizó un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a Alexa-546 desarrollado en cabra (1:200, Molecular Probes, Invitrogen). Luego de 3 lavados con solución de bloqueo (5 min cada uno) se tiñeron los núcleos con 50 μ l de Hoechst 33528 (Sigma-Aldrich, 100 ng/ml en PBS) o con 50 μ l de 4',6'diamidino-2-fenilindol (DAPI, Fluka, 500 ng/ml en PBS) durante 10 min en oscuridad. Luego de un lavado durante 5 min con Tritón X-100 al 0,1 % (v/v) en PBS, y otro con PBS durante el mismo tiempo, se realizó el montaje de los cubreobjetos utilizando el reactivo 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO, Fluka, Steinheim, Alemania). Las células se observaron en un microscopio invertido de epifluorescencia Nikon TE-200 o en un microscopio confocal FLuoView 1000 (Olympus, Japón).

Con el objetivo de cuantificar la translocación nuclear de β -catenina se utilizó el programa *Image Pro Plus* (versión 5.1.). Luego de corregir el fondo, se determinó el coeficiente de superposición según Manders (R), entre las fluorescencias dadas por la inmunomarcación de β -catenina nuclear y por los núcleos teñidos con DAPI. Un valor de R mayor a 0,6 fue considerado positivo para la colocalización [240]. Se analizaron al menos 3 campos por cubreobjetos y dos cubres por tratamiento.

6. Sobre-expresión de Gal-1 en células de CHC

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos en medio DMEM completo sin antibióticos, seguido de una incubación a 37 °C por 24 h para alcanzar un 90 % de confluencia (300.000 células por pocillo). Luego, las células se transfectaron con 0,8 µg del plásmido pcDNA3.1-LGALS1 [91] utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos), según las indicaciones del fabricante. Para cada pocillo, en un tubo se mezclaron 50 µl de medio DMEM (libre de suero y antibióticos) con 0,8 µg del plásmido. Por otro lado, en un segundo tubo, se diluyeron 2 µl de lipofectamina en 50 µl de medio DMEM (libre de suero y antibióticos). Seguido de una incubación de 5 min a temperatura ambiente, se mezcló el contenido de ambos tubos y se incubó 20 min a temperatura ambiente. Luego se agregó la mezcla (100 µl) al pocillo conteniendo las células en DMEM completo sin antibióticos. 24 h después de la transfección, las células se diluyeron 10 veces, y al día siguiente se agregó el antibiótico de selección G418 (Sigma-Aldrich) en una concentración de 700 µg/ml. Luego de 2-3 semanas, se seleccionaron los clones resistentes como colonias independientes, éstas se aislaron y cultivaron en medio DMEM conteniendo SFB y G418 500 µg/ml (células HepG2-G1 y HepG2-G2). Como control, se utilizaron células transfectadas con el plásmido pcDNA3.1 vacío (células HepG2-M). La sobre-expresión de Gal-1 en los distintos clones se analizó mediante la técnica de *Western blot*, como se detalló en el ítem 4.6.

7. Disminución de la expresión de Gal-1 en células de CHC

Las células se incubaron en placas de 24 pocillos en medio DMEM completo sin antibióticos, a 37 °C durante 24 h, para alcanzar un 70 % de confluencia. Luego, se transfectaron con el ARN de interferencia anti-Gal-1 humana (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Estados Unidos) que consiste en 3 secuencias de ARN de 20-25 nucleótidos diseñados específicamente para silenciar la expresión de Gal-1 (células siGal-1). Como control se utilizó un ARN de interferencia inespecífico (Santa Cruz Biotechnology), es decir, una secuencia control que no conduce a la degradación específica de ningún ARNm celular conocido (células siControl). Para cada pocillo, se mezclaron 20 µl de medio de transfección (Santa Cruz Biotechnology) con 1,6 µl del ARN de interferencia correspondiente 10 µM. En un segundo tubo, 1,6 µl del reactivo de transfección (Santa Cruz Biotechnology) se diluyó en 20 µl de medio de transfección. Luego de 5 min de incubación a temperatura ambiente, se mezcló el contenido de ambos tubos y se realizó otra incubación de 20 min a la misma temperatura. Luego, se adicionaron 160 µl de medio de transfección, y esta mezcla se agregó a los pocillos conteniendo las células. A continuación, se realizó una incubación durante 5 h a 37 °C para permitir la transfección y luego se agregaron 200 µl de medio completo. La disminución de la expresión de Gal-1 se monitoreó mediante *Western blot* a los tiempos indicados como se detalló en el ítem 4.6.

8. Ensayos de adhesión de células de CHC

Los ensayos de adhesión se realizaron en placas de 96 pocillos. Las células se cultivaron a 37 °C en medio DMEM en ausencia de SFB en una densidad de 20.000

células por pocillo, durante distintos tiempos (0,5 - 4 h), en las condiciones experimentales que se detallan a continuación. En algunos casos, se incluyó la presencia de rGal-1 (1, 10, 100 y 400 $\mu\text{g/ml}$ (0,035-14 μM) en PBS-DTT 1 mM) o de galectina-3 recombinante (rGal-3, 0,35-7 μM , gentilmente donada por el Dr. Noorjahan Panjwani, Universidad de Tufts, Boston, MA, Estados Unidos). Para evaluar la participación del dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC) de Gal-1, la lectina se pre-incubó durante 30 min a temperatura ambiente con los siguientes azúcares: lactosa (Carlo Erba, Rodano, Italia) 100 mM, tiodigalactósido (TDG, D-galactopiranosil- β -D-tiogalactopiranosido, Sigma-Aldrich) 10 mM o sacarosa (Sigma-Aldrich) 100 mM. Para evaluar si Gal-1 podía actuar como una proteína de la MEC, o si podía promover la adhesión celular a las proteínas de MEC, por ejemplo, a laminina, se inmovilizaron ambas proteínas en los pocillos. Se prepararon soluciones de rGal-1 3,5 μM en PBS-DTT 1 mM, laminina (control positivo, promueve la adhesión celular) o poli-L-lisina (promotor no específico de la adhesión) en una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$. Como control negativo se utilizó una solución de BSA (Sigma-Aldrich) al 0,1 % (p/v) en PBS. Se colocaron 100 μl por pocillo de las soluciones proteicas correspondientes y se realizó una incubación a 4 °C durante toda la noche. Luego se retiró la solución de los pocillos y se lavó con 100 μl de PBS. Para bloquear los sitios que hayan quedado sin recubrir se incubó con 100 μl de BSA al 0,1 % (p/v) en PBS durante 1 h a temperatura ambiente, seguido de dos lavados con 100 μl de PBS. Para evaluar las vías de señalización involucradas, las células en suspensión fueron pre-tratadas con los inhibidores farmacológicos de PI3K (wortmanina 1 μM en DMSO, Sigma-Aldrich) y de MEK1/2 (PD98059 25 μM en DMSO, Sigma-Aldrich) durante 15 min. Luego las células tratadas se sembraron en presencia o ausencia de rGal-1 (14 μM). En otros

experimentos, se investigó la adhesión de las células con distinto nivel de expresión de Gal-1 y en algunos casos se incluyó la presencia de TDG 10 mM.

En todos los casos, luego del período de incubación indicado en cada ensayo, las células no adheridas se retiraron y las células adheridas se lavaron con 100 μ l de PBS. Luego de realizar la fijación con 100 μ l de formaldehído al 3,7 % (v/v) en PBS durante 10 min, las células se tiñeron con 100 μ l de una solución de Violeta Cristal al 0,5 % (p/v) en ácido acético al 3 % (v/v) durante 20 min a temperatura ambiente. Luego de extensivos lavados con agua destilada, el colorante se disolvió en presencia de 100 μ l SDS al 1 % (p/v) y se determinó la absorbancia a 600 nm utilizando un lector de placas de ELISA (Metertech Σ 960).

9. Ensayos de polarización de células de CHC

Los ensayos de polarización se realizaron cultivando las células a 37 °C sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro (Fisher Scientific) previamente recubiertos con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) al 0,1 % (p/v) en agua destilada. Se sembraron 50.000 células por cubreobjetos (confluencia inicial 30-40 %). Algunos ensayos se realizaron en presencia o ausencia de rGal-1 (7 μ M) durante distintos tiempos (24-72 h), o de rGal-3 (7 μ M) durante 24 h. Como control negativo se utilizó PBS DTT 1 mM. En algunos experimentos, se pre-incubó Gal-1 durante 30 min a temperatura ambiente con TDG 10 mM, o se incluyó la presencia de compuestos farmacológicos, wortmanina (inhibidor de PI3K, 1 μ M en DMSO, Sigma-Aldrich), PD98059 (inhibidor de la vía MEK1/2, 25 μ M en DMSO, Sigma-Aldrich) o H89 (inhibidor de la PKA, 10 μ M en agua destilada, Sigma-Aldrich). Para evaluar si los efectos de Gal-1 sobre la adhesión y la polarización de las células de CHC estaban interconectados se llevó a cabo el siguiente

protocolo: se sembraron 50.000 células por cubreobjetos y se cultivaron a 37 °C durante 4 h. Al cabo de este tiempo, las células se encuentran adheridas pero todavía no comienzan a desarrollar canalículos biliares. Entonces, una vez transcurridas las 4 h de incubación, se agregó rGal-1 (7 µM) a los cultivos y se determinó el porcentaje de polarización luego de 24 h de incubación a 37 °C. De esta manera, se logró distinguir el efecto de Gal-1 exclusivamente sobre el proceso de polarización. En otros experimentos, se investigó el proceso de polarización en las células con distinto nivel de expresión de Gal-1, y en algunos casos se incluyó la presencia de TDG 10 mM.

Luego de los tiempos de incubación correspondientes, se retiró el medio de los pocillos y se lavó con 200 µl de PBS. Las células de cada pocillo se fijaron con 200 µl de p-formaldehído al 4 % (p/v) en PBS durante 15 min a temperatura ambiente, y luego se realizaron tres lavados, de 10 min cada uno, con 200 µl de PBS. A continuación, las células se permeabilizaron mediante la incubación con Tritón X-100 al 0,5 % (v/v) en PBS durante 10 min, seguido de tres lavados, de 3 min cada uno, con Tritón X-100 al 0,1 % en PBS. Luego, se realizó el bloqueo con 200 µl de Tritón x-100 al 0,1 % (v/v) en PBS, BSA al 2 % (p/v) y azida de sodio al 0,1 % (p/v) durante 10 min. Para visualizar los canalículos biliares se tiñó la actina, que se acumula en el polo apical, utilizando el colorante faloidina conjugado a tetrametilrodamina (TRITC) (Sigma-Aldrich). Las células se incubaron en oscuridad con 50 µl del reactivo en una concentración final de 1 µg/ml en solución de bloqueo, durante 20 min. Luego se realizaron tres lavados, de 5 min cada uno, con Tritón X-100 al 0,1 % (v/v) en PBS. Además, los núcleos se tiñeron con 50 µl de Hoechst 33528 (Sigma-Aldrich) 100 ng/ml en solución de bloqueo, durante 10 min en oscuridad. Luego de un lavado de 5 min con Tritón X-100 al 0,1 % (v/v) en PBS,

y otro con PBS, se realizó el montaje de los cubreobjetos utilizando el reactivo DABCO. La polarización también se determinó inmunomarcando a la proteína apical MRP2, como se explicó en la sección “Técnica de inmunofluorescencia”. El porcentaje de polarización se determinó como el número de canalículos biliares presentes cada 100 células. Se observaron 2 cubreobjetos por tratamiento, y al menos 10 campos por cada cubreobjetos con más de 50 núcleos por campo en un microscopio invertido de epifluorescencia Nikon TE-200.

10. Análisis de morfología

Se sembraron 20.000 células sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro (Fisher Scientific) recubiertos con colágeno tipo I (Sigma-Aldrich) $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, dispuestos en placas de 24 pocillos, y se incubaron durante 72 h a 37°C . Luego, las células se fotografiaron usando un microscopio invertido Nikon Eclipse TE-300.

11. Anoikis: Ensayo de formación de colonias en agar blando

La capacidad de las células de crecer de manera independiente de anclaje se determinó mediante un ensayo de formación de colonias en agar blando en base al protocolo descrito por Cokakli y col. [241]. Los pocillos de una placa de 24 pocillos, se cubrieron con $600 \mu\text{l}$ de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma-Aldrich) al 0,6 % en DMEM suplementado con SFB 10 % y se permitió gelificar durante 20 min a 4°C . Luego, se cosecharon 2.500 células y se resuspendieron en $1.200 \mu\text{l}$ de agarosa de bajo punto de fusión al 0,4 % en DMEM suplementado con SFB 10 % y se sembraron sobre la capa anterior de agarosa. Las células se incubaron durante tres semanas a 37°C ,

agregando medio DMEM cada tres días. Luego, se determinó el número de colonias por pocillo.

12. Ensayo de genes reporteros

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos en medio DMEM completo sin antibióticos, seguido de una incubación a 37 °C por 24 h para alcanzar un 90 % de confluencia (300.000 células por pocillo). Luego, se transfectaron de manera transiente con 0,7 µg de los plásmidos FOP-Flash o TOP-Flash [91] utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), según las indicaciones del fabricante. Para normalizar la eficiencia de transfección las células se co-transfectaron con 0,1 µg del vector de expresión de la enzima β-galactosidasa. Luego de 24 h, las células se lisaron con 100 µl de *buffer* de lisis (Tris 25 mM, pH 7,8, EDTA 2 mM, DTT 2 mM, Tritón X-100 al 1 % (v/v), glicerol al 10 % (v/v)) por incubación de 10 min a temperatura ambiente. La actividad de luciferasa se determinó en 30 µl de lisado utilizando un luminómetro, en presencia de Mg₂SO₄ 8 mM, ATP 2 mM, Coenzima A 0,2 mg/ml y luciferina 0,5 mM. Para la normalización de los datos obtenidos, se utilizó la actividad de β-galactosidasa (control interno de transfección) y también respecto a la concentración de proteínas totales (micrométodo de Bradford). Para determinar la actividad de β-galactosidasa, el lisado celular se diluyó al medio con *buffer* de ensayo 2X (pirofosfato de sodio 200 mM, pH 7,3, MgCl₂ 2 mM, β-mercaptoetanol 100 mM, orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosido 1,33 mg/ml) y se incubó a 37 °C durante 30 min. Luego se frenó la reacción con Na₂CO₃ 1 M y se registró la absorbancia en 420 nm. Cada transfección se realizó por triplicado y se hicieron 3 experimentos independientes.

13. Identificación de ligandos de Gal-1 en células de CHC

13.1. Obtención de proteínas celulares

Para extraer las proteínas totales se siguió el protocolo descrito por Powlesland y col. [242]. Se cultivaron células HepG2 y HuH-7 hasta una confluencia del 80-90 % y se cosecharon con PBS-EDTA 1 mM para preservar la integridad de las proteínas de la membrana plasmática. Luego, las células se centrifugaron a 1.000 x g durante 15 min y a temperatura ambiente en una centrífuga Gelec G-142 (Gelec, Buenos Aires, Argentina). Alrededor de 1×10^9 de células HepG2 y HuH-7 cosechadas se resuspendieron en 2-3 ml de *buffer* de lisis (Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tritón X-100 al 1 % (v/v), DTT 2 mM, PMSF 2 mM y aprotinina 0,1 mg/ml). Esta suspensión se sometió a sonicación durante 10 segundos y se mantuvo 30 min en hielo. Luego se centrifugó a 3.500 x g durante 5 min a 4 °C en una centrífuga Sorvall. Se recuperó el sobrenadante y se determinó la cantidad de proteínas mediante el micrométodo de Bradford, tal como se describió en el ítem 4.3.

13.2. Preparación de la matriz de afinidad rGal-1-agarosa

Para la cromatografía de afinidad, rGal-1 se acopló a una matriz Affi-Gel 15 (gel de agarosa entrecruzado, derivatizado con ésteres de *N*-hidroxisuccinimida, Bio-Rad), según las instrucciones del fabricante. En primer lugar, rGal-1 purificada (4 mg) se dializó exhaustivamente utilizando membranas de diálisis con tamaño de poro de 10.000 Da, contra la solución de acople (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-pireracini-etanosulfónico (HEPES) 20 mM, pH 7,2, DTT 2 mM) a 4 °C. A su vez, la matriz Affi-Gel 15 (1 ml) se lavó con agua de calidad *MilliQ* y se resuspendió en la solución de acople.

Luego, la lectina dializada se acopló a la matriz mediante una incubación a 4 °C en agitación durante 4 h. La eficiencia del acople se monitoreó mediante la cuantificación de proteínas en alícuotas tomadas antes y después del acople. La matriz acoplada con rGal-1, inmersa en la solución de acople, se empaquetó en una columna cromatográfica y se mantuvo toda la noche a 4 °C para inactivar los sitios reactivos libres. Luego, la matriz se lavó con: a) solución de acople, b) PBS, c) PBS-DTT 2 mM, lactosa 100 mM, Tritón X-100 al 0,1 % (v/v).

13.3. Purificación de ligandos de Gal-1 por cromatografía de afinidad

La matriz preparada como se describió en la sección previa, se equilibró con PBS-DTT 2 mM, Tritón X-100 0,1 % (v/v) y luego se sembró la fracción proteica obtenida en el ítem 13.1. Para favorecer la interacción de los ligandos con rGal-1, la muestra se incubó con la matriz durante toda la noche a 4 °C en agitación. Al día siguiente, la matriz se lavó con PBS-DTT 2 mM, Tritón X-100 al 0,1 % (v/v) para lavar las proteínas retenidas en la matriz de manera inespecífica. Luego se realizó la elución de las proteínas adsorbidas específicamente con PBS-DTT 2 mM, Tritón X-100 al 0,1 % (v/v) conteniendo lactosa 100 mM. Este azúcar compite con las proteínas adsorbidas por el DRC de Gal-1, provocando la elución de las mismas de la matriz. Seguidamente se determinó la cantidad de proteínas presentes en las fracciones eluidas como se describió en el ítem 4.3.

13.4. Identificación de los ligandos de Gal-1 por digestión proteolítica en gel y espectrometría de masa

La fracción eluída luego de realizar el protocolo descrito en el ítem anterior, conteniendo los ligandos de Gal-1 se dializó contra SDS al 0,1 % (p/v) en agua *MilliQ* utilizando membranas de diálisis (tamaño de poro 10.000 Da). La muestra dializada se llevó a sequedad con el concentrador *Speed Vac SC110A* (Savant), y luego se resuspendió en el *buffer* de siembra (descrito en el ítem 4.4), seguido de una incubación a 100 °C durante 5 min. Las proteínas se resolvieron mediante SDS-PAGE utilizando un gel separador con un grado de entrecruzamiento de 7,5 % según se describió en el ítem 4.5. La visualización de las proteínas se realizó mediante la tinción con *Coomassie* coloidal G250. Las bandas seleccionadas se escindieron con bisturí en trozos de 1 mm², y se colocaron en tubos estériles. Se realizó una digestión con tripsina de las proteínas inmersas en el gel, luego los péptidos resultantes se extrajeron de dicho gel y se sometieron a espectrometría de masa para efectuar la identificación de las proteínas de origen. Brevemente, las bandas individuales se destiñeron por incubación con una solución de ácido acético al 12 % (v/v) y metanol al 50 % (v/v). Luego se lavaron con acetonitrilo para remover reactivos residuales y se llevaron a sequedad en un concentrador *Speed Vac SC110A*. Las muestras se incubaron en presencia de DTT 10 mM en bicarbonato de amonio 100 mM pH 8, durante 30 min a temperatura ambiente, seguido de una incubación con iodoacetamida 55 mM en bicarbonato de amonio 100 mM pH 8, durante 30 min. Luego de lavados con acetonitrilo y humectación con bicarbonato de amonio 50 mM pH 8, se realizó la digestión enzimática de las proteínas con tripsina 25 ng/μl durante toda la noche a 37

°C. Los péptidos obtenidos se extrajeron con ácido fórmico al 5 % (v/v) en acetonitrilo al 50 % (v/v). El concentrado, desalado y la purificación de la muestra se realizó con un tip ZipTip® conteniendo la resina C18 (Millipore), y luego se analizó en el espectrómetro de masa 4800 MALDI TOF TOF (Applied Biosystems). Se utilizó una banda correspondiente a BSA como control positivo, y una zona del gel sin muestra como control negativo. Los datos obtenidos se analizaron en los programas MASCOT PMF y MASCOT MS/MS, y se utilizó la base de datos *Matrixscience* de MASCOT. Este experimento se realizó a través del servicio brindado por el *Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos, Proteínas y Espectrometría de Masa* (LANAIS-PROEM, IQUIFIB-CONICET).

14. Análisis estadístico de los resultados experimentales

Los resultados experimentales se procesaron con el programa estadístico “*GraphPad Prism*” para Windows, versión 5.0.0.288. En todos los casos, se realizaron tres experimentos independientes como mínimo. El test de hipótesis particular que se utilizó en cada experimento se indica en la Sección de *Resultados*, en la leyenda de cada figura. El nivel de significancia se expresó según la siguiente convención: (*) ([#]) $p < 0,05$; (**) (^{&&}) $p < 0,01$ y (***) $p < 0,001$.

RESULTADOS



Capítulo 1. Expresión de Gal-1 en células HepG2

Las células epiteliales hepáticas HepG2 derivan de un carcinoma hepatocelular humano de estadio bien diferenciado. Se encuentran muy bien caracterizadas y representan un modelo útil para el estudio de las propiedades funcionales de los hepatocitos humanos, dado que mantienen la capacidad biosintética y las funciones especializadas de las células parenquimáticas del hígado normal [243, 244], tales como aquellas relacionadas con el metabolismo de fosfolípidos, colesterol, lipoproteínas y ácidos biliares [245, 246]. Esta línea celular constituye, además, un modelo aceptado para estudiar la polarización hepática, debido a que forman pseudo-canalículos biliares. Al ser cultivadas, las células HepG2 adquieren el fenotipo polarizado desarrollando canalículos biliares (CB) apicales entre 2 ó más células vecinas. Al crecer sobre la MEC derivada de las mismas células, se observa un agrupamiento, crecimiento en capas y un dramático remodelado de los CB, los cuales se extienden entre múltiples células [247]. Esta organización se asemeja a la establecida durante el desarrollo, la regeneración y la neoplasia del hígado.

El gen *LGALS1* se encuentra sobre-expresado en el CHC [118, 128, 248], y sus niveles de expresión se correlacionan con el crecimiento tumoral, la presencia de metástasis, recurrencia y menor supervivencia en pacientes de CHC [134]. En nuestro laboratorio, se había demostrado previamente que la inyección de células HepG2 sobre-expresando Gal-1 en ratones atímicos, promueve el crecimiento tumoral y la metástasis en nódulos drenantes al tumor [130]. En ese contexto, el objetivo general de este Trabajo de Tesis fue evaluar la contribución de Gal-1 en la transición epitelio-mesénquima de células de CHC, como mecanismo clave para la diseminación tumoral.

Las células HepG2 derivan de un CHC diferenciado, de bajo potencial invasivo, y que expresan marcadores epiteliales. Además, sus niveles de expresión de Gal-1 son menores en comparación con otras líneas de CHC. Por ello, se consideró a las células HepG2 como un modelo apropiado para estudiar el efecto del incremento de la expresión de Gal-1 como un factor desencadenante del proceso de TEM en los hepatocitos tumorales.

1.1 Sobre-expresión de Gal-1 en las células HepG2

En primer lugar, para evaluar el efecto de elevados niveles de expresión de Gal-1, se sobre-expresó dicha lectina en las células HepG2. Las células se transfectaron de manera estable con el plásmido pcDNA3.1 conteniendo la secuencia de ADNc de Gal-1 (pcDNA3.1-LGALS1) o bien, con el plásmido sin inserto como control. Se seleccionaron los clones resistentes a G418 y se analizó la expresión de Gal-1 mediante la técnica de *Western blot*. Se obtuvieron dos clones, G1 y G2, que expresaron niveles de Gal-1 significativamente más altos (HepG2-G1: 203 ± 34 %; HepG2-G2: 312 ± 32 %) que las células control (HepG2-M: 112 ± 9 %) (**Figura 10 A**).

Como se mencionó previamente, una gran variedad de tipos celulares secretan Gal-1 al medio extracelular. Por ello, se consideró interesante analizar la secreción de Gal-1 por parte de las células HepG2. Se obtuvieron medios condicionados libres de suero, a partir de monocapas subconfluentes de células HepG2, HepG2-M y HepG2-G2, y se determinó la expresión de Gal-1 mediante *Western blot*. En los medios condicionados de las células HepG2 y HepG2-M se detectó una baja expresión de Gal-1, mientras que las células que sobre-expresan Gal-1 secretaron mayores niveles de dicha lectina hacia el medio extracelular (**Figura 10 B**).

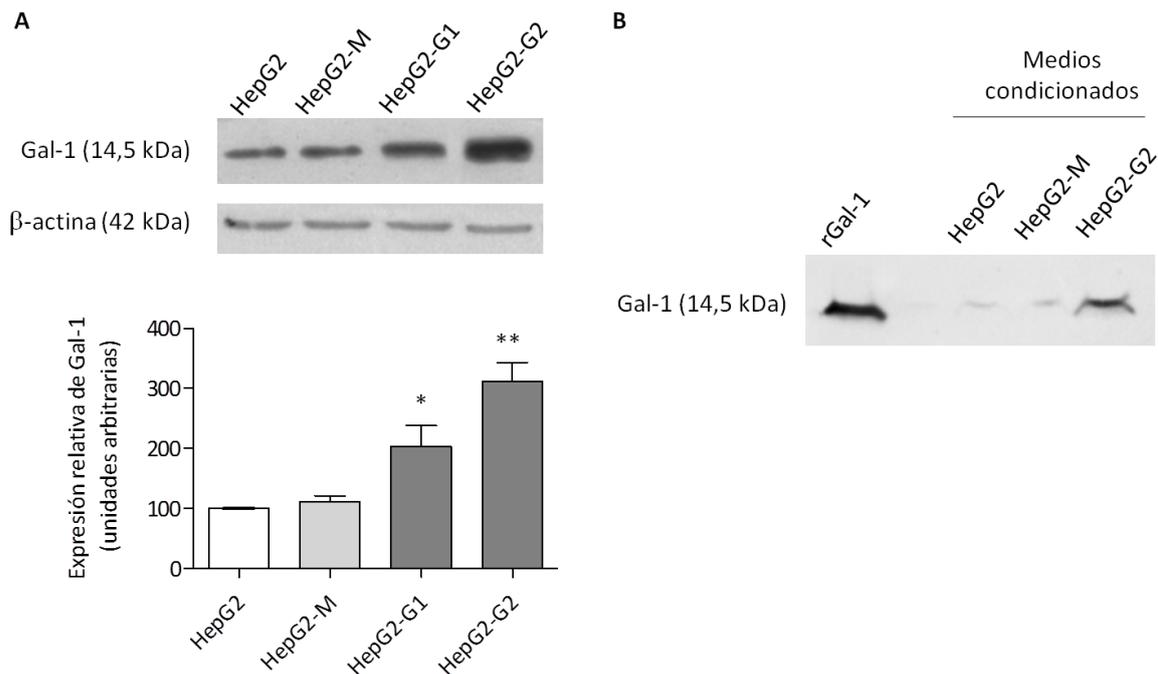


Figura 10. Sobre-expresión de Gal-1 en las células HepG2. A) Análisis de la expresión de Gal-1 mediante *Western blot* en células sin transfectar, transfectadas con el plásmido sin inserto (HepG2-Mock, HepG2-M) y transfectadas con el plásmido pcDNA3.1-LGALS1 (HepG2-G1 y G2). Como control de carga se utilizó la proteína β -actina. **B)** Secreción de Gal-1 al medio extracelular. Se analizó mediante *Western blot* la expresión de la lectina en los medios condicionados libres de suero obtenidos de monocapas subconfluentes. rGal-1: Gal-1 recombinante (1 ng). Los datos se expresan como la media \pm error estándar (ES), a partir de 4 experimentos independientes (n=4). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Test *t* de Student).

1.2 Disminución de la expresión de Gal-1 en las células HepG2

Para disminuir la expresión de Gal-1 en las células HepG2, se utilizó la técnica de ARN de interferencia. El ARN de interferencia específico para Gal-1 (siGal-1) adquirido de Santa Cruz Biotechnology, consiste en un conjunto de 3 secuencias de ARN de 19-25 nucleótidos diseñados específicamente para silenciar la expresión de Gal-1. Como control de especificidad se utilizó un conjunto de secuencias irrelevantes (siControl). La expresión de Gal-1 se evaluó mediante *Western blot*, a las 48 y 72 h posteriores a la transfección. Como puede observarse en la **Figura 11**, en las células

transfectadas con siGal-1 la expresión de Gal-1 disminuyó un 15 % y un 50 % a las 48 y 72 h, respectivamente, respecto al control. Dado que a las 72 h se observó el mayor porcentaje de silenciamiento de la expresión de Gal-1, en los ensayos subsiguientes los análisis se realizaron luego de dicho tiempo posterior a las transfecciones.

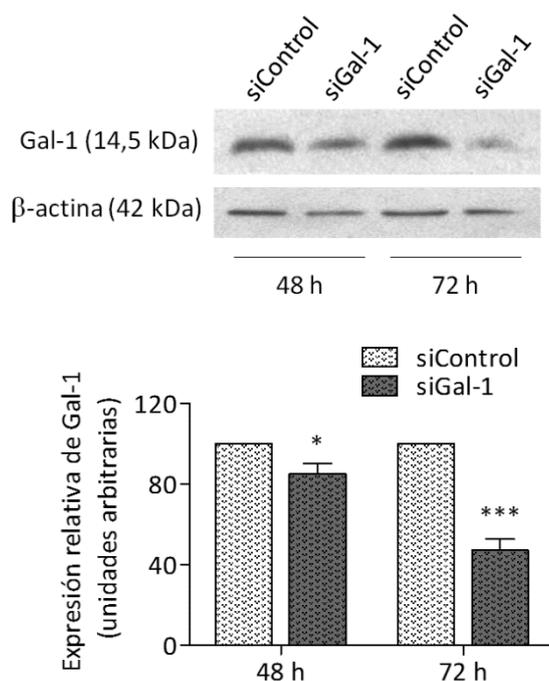


Figura 11. Disminución de la expresión de Gal-1 en las células HepG2 mediante la técnica de ARN de interferencia. Las células HepG2 se transfectaron con el ARN de interferencia específico para Gal-1 humana (80 nM, Santa Cruz), siGal-1, o con el control, siControl. Luego de 48 y 72 h, las células se lisaron y se evaluó la expresión de Gal-1 mediante *Western blot*. Como control de carga se utilizó la proteína β -actina. Los datos se expresan como la media \pm ES (n=4). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (Test *t* de Student).

1.3 Cambios en los niveles de Gal-1 no afectan la expresión de β -actina

La expresión de la proteína que se utiliza como control de carga en los experimentos de *Western blot* debería permanecer constante en las condiciones ensayadas. Dado que para los subsiguientes experimentos, se deseaba utilizar a la

proteína β -actina como control de carga, en primer lugar se confirmó que sus niveles de expresión no se vieran alterados en las células HepG2 al manipular los niveles de expresión de Gal-1. Para esto, se analizó la expresión de β -tubulina, una proteína del citoesqueleto frecuentemente utilizada también como control de carga en los ensayos de *Western blot*. En la **figura 12** se muestra la expresión de β -actina y β -tubulina en las células HepG2 con distintos niveles de expresión de Gal-1. No se detectaron cambios en los niveles de expresión de la proteína β -actina al manipular los niveles de expresión de Gal-1, por lo que resultó apropiado utilizar esta proteína como control de carga en los subsiguientes experimentos.

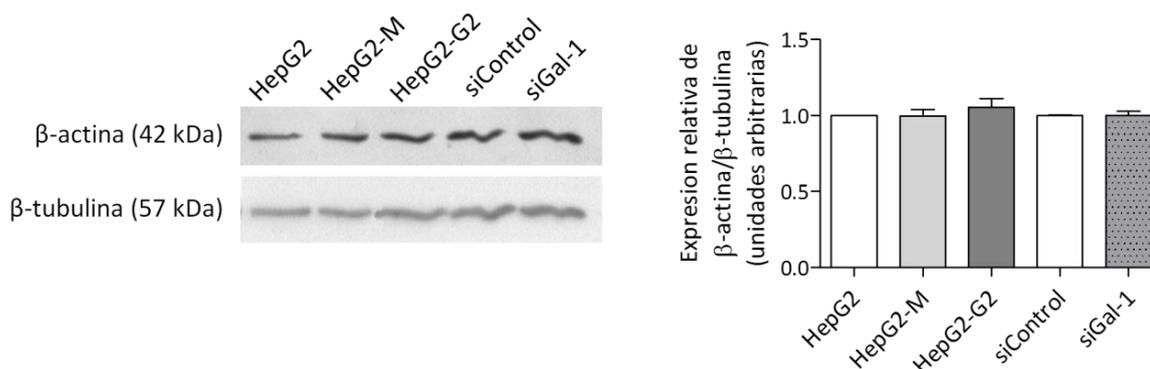


Figura 12. Los niveles de expresión de Gal-1 no modifican la expresión de β -actina. Las células HepG2 con distintos niveles de expresión de Gal-1 se cultivaron durante 72 h. Luego se lisaron y la expresión de β -actina y β -tubulina se analizó mediante *Western blot*. El análisis densitométrico muestra la expresión de β -actina respecto a la expresión de β -tubulina en las células correspondientes. Los datos se expresan como la media \pm ES (n=2).

Capítulo 2. Gal-1 modula la adhesión de células de CHC

La regulación de la adhesión de las células tumorales es un proceso clave en el desarrollo de un tumor. Dada la capacidad de unir glicoconjugados extracelulares, las galectinas pueden modular la adhesión entre células tumorales adyacentes o bien, entre las células tumorales y los componentes de la MEC. Existen numerosos estudios que demuestran que Gal-1 es capaz de modular la adhesión celular, tanto positiva como negativamente. Sin embargo, al momento de comenzar este trabajo de Tesis, no se había investigado la participación de Gal-1 en el proceso de adhesión de los hepatocitos tumorales.

En primer lugar, se analizó la participación de Gal-1 en la adhesión de las células HepG2, y se comparó su efecto sobre el proceso de adhesión de otra línea celular derivada de un CHC humano bien diferenciado, las células HuH-7. Primeramente, se comparó la expresión de Gal-1 en ambas líneas celulares mediante *Western blot*, tanto en los lisados celulares, así como también en los medios condicionados. Sorpresivamente, se observó un patrón de expresión de Gal-1 diferente en ambas líneas celulares. Las células HuH-7 expresaron menores niveles intracelulares de Gal-1 respecto a las células HepG2, sin embargo, los medios condicionados de las células HuH-7 mostraron elevados niveles de expresión de Gal-1. Estos resultados indican que en las células HepG2, la mayor parte de la proteína expresada permanece en el interior celular, mientras que las células HuH-7 secretan al medio extracelular la mayor parte de la galectina expresada (**Figura 13**).

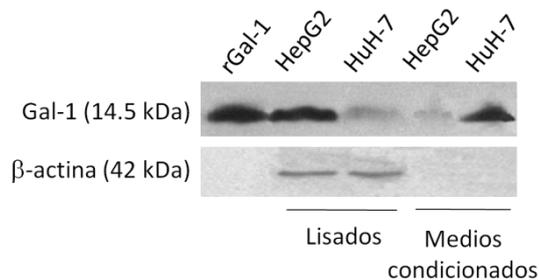


Figura 13. Expresión de Gal-1 en las células HepG2 y HuH-7. Se obtuvieron los lisados celulares y los medios condicionados, libres de suero, a partir de monocapas de las células HepG2 y HuH-7. Luego se analizó la expresión de Gal-1 mediante la técnica de *Western blot* utilizando como control de carga a la proteína β-actina. rGal-1: Gal-1 recombinante (1 ng).

2.1 Efecto de Gal-1 recombinante (rGal-1) sobre la adhesión de células de CHC

Diversos tipos celulares secretan Gal-1 al medio extracelular, y una vez allí, ésta puede actuar de forma autócrina o parácrina sobre las células. Para evaluar el rol de Gal-1 exógena sobre la adhesión de células de CHC, se realizaron los ensayos de adhesión en presencia de rGal-1 con las células HepG2 y HuH-7.

Las células se incubaron durante 1 h sobre pocillos sin recubrir en presencia de rGal-1 soluble a distintas concentraciones (0,0035–14 μM), y luego se determinó la adhesión mediante un método colorimétrico (tinción con cristal violeta). En el caso de las células HepG2, se observó un aumento en el porcentaje de células adheridas para las concentraciones de rGal-1 de 3,5 μM y 14 μM (137 ± 6 % y 156 ± 5 %, respectivamente) (**Figura 14 A**). Este efecto se observó a los 30 minutos, alcanzó su valor máximo luego de 1 h de incubación y se mantuvo hasta las 2 h; a las 4 h alcanzó el mismo valor que el control (ausencia de rGal-1) (**Figura 14 B**). Mientras que rGal-1 aumentó la adhesión de las células HepG2, en las células HuH-7 se observó una

disminución de la adhesión respecto al control a la máxima concentración ensayada ($66 \pm 5 \%$, $14 \mu\text{M}$) (**Figura 14 D**). Este efecto se detectó a los 30 minutos de incubación, se mantuvo hasta las 2 h y luego alcanzó el mismo valor que el control a las 4 h (**Figura 14 E**). Estos resultados sugieren que rGal-1 agregada exógenamente en forma soluble, es capaz de acelerar o retrasar la adhesión de las células de CHC a pocillos sin recubrir.

Con el objetivo de determinar si los efectos de Gal-1 sobre la adhesión celular estaban mediados por interacciones lectina-carbohidrato, se preincubó Gal-1 con tiodigalactósido (TDG, 10 mM) o lactosa (100 mM). Ambos son inhibidores de galectinas ya que son unidos específicamente por el DRC de las mismas. Como control, Gal-1 también se pre-incubó con sacarosa (100 mM), un disacárido que no es unido por el DRC de la galectina. En ambos tipos celulares, los efectos de rGal-1 observados fueron prevenidos parcialmente por la preincubación con lactosa, mientras que con TDG se inhibieron completamente. Cabe destacar que en presencia de sacarosa no se vio afectada la adhesión mediada por rGal-1 (**Figura 14 C y F**). Estos resultados sugieren que Gal-1 modula la adhesión de las células HepG2 y HuH-7 mediante interacciones lectina-carbohidrato.

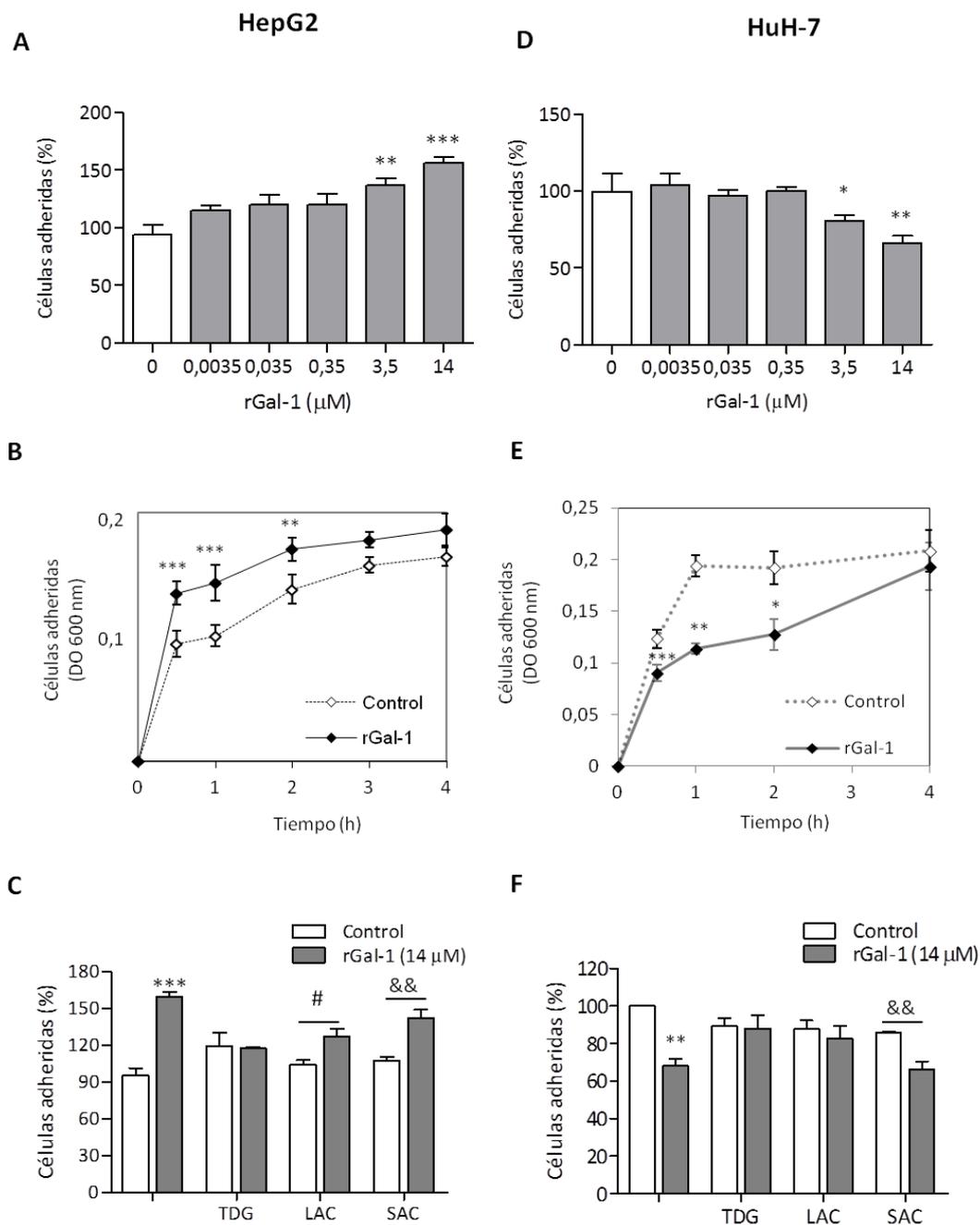


Figura 14. Efecto de rGal-1 soluble sobre la adhesión de células HepG2 y HuH-7. **A y D)** Las células se incubaron en presencia o ausencia de distintas concentraciones rGal-1 durante 1 h a 37°C sobre pocillos sin recubrir. **B y E)** Las células se incubaron con rGal-1 (14 μM) durante distintos tiempos. **C y F)** rGal-1 (14 μM) se pre-incubó con tiodigalactósido (TDG, 10 mM), lactosa o sacarosa (LAC, SAC, 100 mM) y luego se incubó con la suspensión celular durante 1 h. Los datos se expresan como la media \pm ES (n=3). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ respecto al control; # $p < 0,05$ respecto al control en presencia de lactosa; && $p < 0,01$ respecto al control en presencia de sacarosa (Test *t* de Student).

Gal-1 es capaz de unirse a glicoconjugados presentes en la MEC, tales como laminina o fibronectina, y a través de esta interacción puede favorecer la adhesión de las células a dicha matriz. Además, Gal-1 secretada por las células puede quedar retenida en la MEC circundante, actuando ella misma como una proteína de la matriz. Por ello, evaluamos la adhesión de las células HepG2 y HuH-7 a la glicoproteína de la MEC, laminina (rica en residuos de lactosamina) en presencia de rGal-1 soluble (14 μ M), y también la adhesión celular a rGal-1 inmovilizada (rGal-1(i)). Para esto, los pocillos se recubrieron con BSA (control negativo), laminina, rGal-1 (3,5 μ M) o con el promotor no específico de adhesión poli-L-lisina (1 μ g/ml) y las células se incubaron durante 1 h a 37 °C en presencia o ausencia de rGal-1 (14 μ M). En presencia de rGal-1 soluble, se incrementó la adhesión inducida por laminina, tanto de las células HepG2 (361 \pm 40 % respecto a 245 \pm 20 %), como la de las células HuH-7 (218 \pm 12 % respecto a 146 \pm 7 %). Probablemente, Gal-1 estaría actuando como un puente entre la laminina y los receptores de la superficie celular. Por otro lado, rGal-1 no tuvo efecto sobre la adhesión inducida por poli-L-lisina (**Figura 15 A y B**). Cuando las células se sembraron sobre pocillos recubiertos con rGal-1 (3,5 μ M) se produjo un aumento de la adhesión, tanto de las células HepG2 como de las HuH-7 (133 \pm 5 % y 121 \pm 5 %, respectivamente) respecto al control (BSA 100 %) (**Figura 15 A y B**).

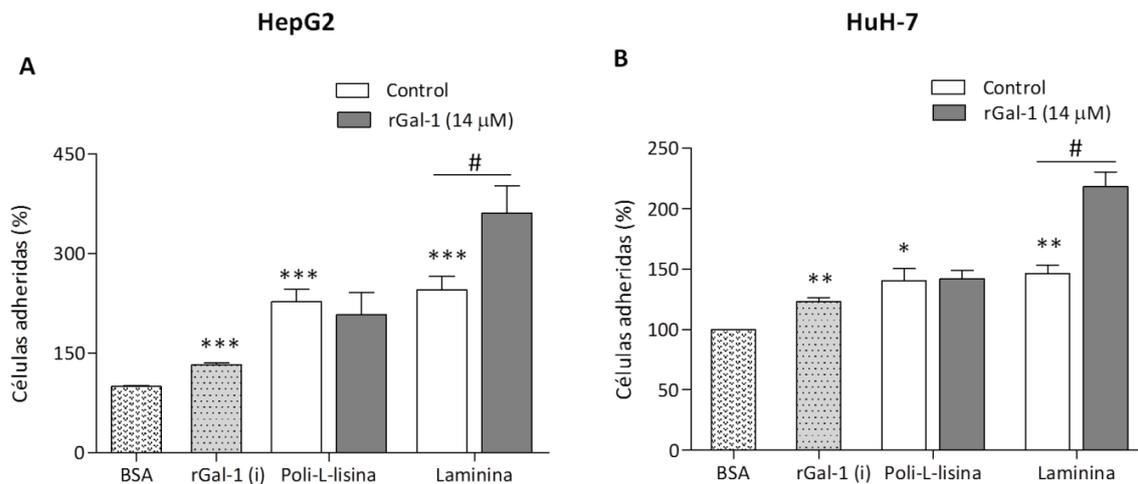


Figura 15. rGal-1 favorece la adhesión de células de CHC a la matriz extracelular. Las células HepG2 (A) o HuH-7 (B) se incubaron sobre pocillos recubiertos con BSA, rGal-1 (3,5 μM, rGal-1 (i): inmovilizada), poli-L-lisina o laminina (1 μg/ml) durante 1 h en presencia o ausencia de rGal-1 soluble (14 μM). Los datos se expresan como la media ± ES (n=3). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 respecto a pocillos recubiertos con BSA; #p<0,05 respecto a pocillos recubiertos con laminina (Test t de Student).

Estos resultados sugieren que Gal-1 actúa como una proteína moduladora de la adhesión de las células de CHC, en forma dependiente de glicanos y favoreciendo la adhesión a los componentes de la MEC. Además, los efectos dependerían de los niveles de Gal-1, tanto intracelulares como los de secreción al medio extracelular y/o de su localización, ya sea unida a sus ligandos en la superficie celular o a componentes de la MEC.

2.2 Efecto de Gal-1 endógena sobre la adhesión de células HepG2

A partir de los resultados anteriores se demostró que Gal-1 agregada exógenamente, ya sea en forma soluble o inmovilizada, es capaz de promover la adhesión de las células HepG2. Para comprobar si los niveles de la lectina endógena también modulaban la adhesión, se realizó el ensayo utilizando células que sobre-

expresan Gal-1 y con su expresión disminuida. Un mayor porcentaje de células adheridas se observó con las células HepG2-G1 y HepG2-G2, respecto al control (158 ± 14 % y 169 ± 23 %, respectivamente), y este efecto fue inhibido en presencia de TDG (110 ± 10 % y 112 ± 7 %). Por otro lado, la adhesión de las células con menor expresión de Gal-1 disminuyó con respecto al control, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa (79 ± 9 % respecto a siControl, 104 ± 7 %) (Figura 16).

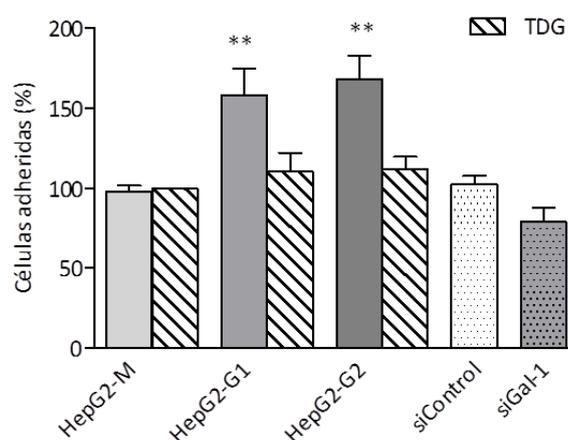


Figura 16. Efecto de cambios en los niveles de expresión de Gal-1 sobre la adhesión de células HepG2. Las células HepG2, HepG2-M, HepG2-G1, HepG2-G2, siControl y siGal-1 se incubaron durante 1 h sobre pocillos sin recubrir. En algunos casos, se incluyó la presencia de TDG (10 mM). Los datos se expresan como la media \pm ES (n=3). **p<0,01 respecto a HepG2-M (Test t de Student).

Por lo tanto, la sobre-expresión de Gal-1 en las células HepG2 también aumenta la adhesión de manera dependiente de glicanos. El hecho de que al silenciar la expresión de Gal-1 no se observe una diferencia significativa en la adhesión, sugiere que existen otras proteínas involucradas en dicho proceso.

2.3 Efecto Gal-3 recombinante (rGal-3) sobre la adhesión de células HepG2

Además de Gal-1, Gal-3 y Gal-4 también se encuentran sobre-expresadas en el CHC [128, 248, 249]. Para investigar si el efecto sobre de la adhesión era específico de Gal-1 o bien, si era común para otras galectinas, se evaluó la adhesión de las células HepG2 en presencia de Gal-3. Las células se incubaron en presencia de Gal-3 recombinante (rGal-3) a distintas concentraciones (0,35-7 μ M) durante 1 h sobre pocillos sin recubrir. Se observó un efecto promotor de la adhesión en presencia de rGal-3 a la máxima concentración ensayada (7 μ M) (142 ± 10 %), a concentraciones más bajas no se detectaron cambios sobre la adhesión de las células HepG2 (**Figura 17**).

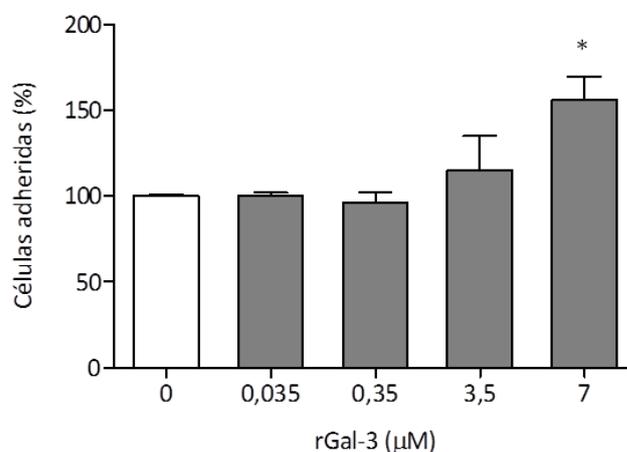


Figura 17. Efecto de rGal-3 sobre la adhesión de células HepG2. Las células se incubaron en presencia o ausencia de distintas concentraciones rGal-3 durante 1 h a 37 °C sobre pocillos sin recubrir. Los datos se expresan como la media \pm ES (n=2). *p<0,05 (Test t de Student).

Estos resultados indican que Gal-3 también participa de la adhesión celular en las células HepG2.

2.4 rGal-1 promueve la adhesión de las células HepG2 activando las vías de señalización mediadas por MAPK y PI3K

Con el objetivo de investigar las vías de señalización involucradas en el efecto de Gal-1 sobre la adhesión de las células HepG2, se utilizaron los inhibidores farmacológicos wortmanina (inhibidor de PI3K) y PD98059 (inhibidor de las quinasas MEK1/2). Las células se pre-trataron con el inhibidor correspondiente, o con el vehículo (DMSO) como control, durante 15 minutos en suspensión. Luego, se incubaron en presencia o ausencia de rGal-1 (14 μ M) durante 1 h a 37 °C. Cuando las células fueron pre-tratadas con wortmanina (1 μ M), rGal-1 promovió la adhesión de las mismas, sin embargo, en menor medida que en ausencia del inhibidor (129 ± 4 %, respecto a 156 % sin inhibidor), es decir que su efecto se previno de manera parcial. Notablemente, el tratamiento con PD98059 (25 μ M) inhibió completamente el efecto pro-adhesivo de la lectina (110 ± 3 %) (**Figura 18**).

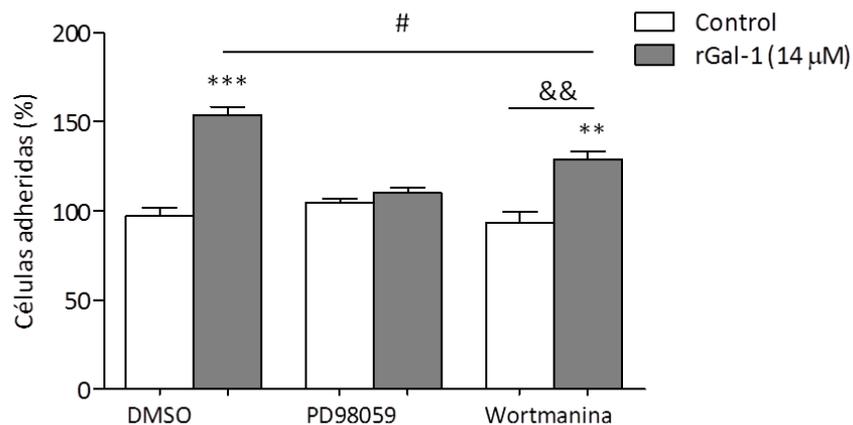


Figura 18. Las vías de señalización MAPK/MEK/ERK y PI3K están involucradas en el efecto pro-adhesivo de rGal-1. Las células se pre-incubaron con wortmanina (inhibidor de PI3K, 1 μM) o con PD98059 (inhibidor de MEK1/2, 25 μM) durante 15 minutos en suspensión y luego se incubaron en presencia o ausencia de rGal-1 (14 μM) durante 1 h a 37°C sobre pocillos sin recubrir. Los datos se expresan como la media ± ES (n=3). **p<0,01, ***p<0,001 respecto a las células en ausencia de inhibidores y de rGal-1; &&p<0,01 respecto al control en presencia de wortmanina; #p<0,05 respecto a las células en presencia de rGal-1 en ausencia de inhibidores (Test *t* de Student).

Por lo tanto, rGal-1 promueve la adhesión de las células HepG2 con la participación de las vías de señalización de MAPK y PI3K.

Capítulo 3. Gal-1 modula el proceso de polarización de células de CHC

Los hepatocitos son células polarizadas, la membrana plasmática se separa gracias a la presencia de uniones estrechas en los dominios sinusoidal (basolateral) y canalicular (apical). El proceso de polarización en las células epiteliales se encuentra altamente regulado. En los tumores de células epiteliales se produce un “secuestro” de la maquinaria celular, resultando en la pérdida de la polarización apico-basal [149]. Se han descrito efectos de otros miembros de la familia de las galectinas, Gal-3, -4 y -9, sobre el tráfico intracelular y la polarización de membranas de células epiteliales de intestino y riñón [250-252]. Sin embargo, al momento de comenzar este trabajo de Tesis, se desconocía el posible papel de Gal-1 en la polarización de hepatocitos tumorales.

Las células HepG2 han sido descritas como un excelente modelo para el estudio del desarrollo de la polarización de hepatocitos. Para estudiar el efecto de Gal-1 sobre la polarización, se evaluó la formación de canalículos biliares (CB). Los CB se pueden visualizar por inmunomarcación de las proteínas apicales [253, 254] y/o por la tinción del citoesqueleto de F-actina, abundante por debajo de la superficie apical, con faloidina conjugada a TRITC [255].

3.1 Efecto de rGal-1 sobre el proceso de polarización de células de CHC

Las células de CHC HepG2 y HuH-7 se incubaron sobre cubreobjetos en presencia o ausencia de rGal-1 (7 μ M). Los CB se detectaron mediante la incubación con faloidina-TRITC y se determinó el número de CB presentes cada 100 células.

Mientras que las células HepG2 adquirieron un fenotipo polarizado caracterizado por la aparición de CB entre células adyacentes de manera dependiente del tiempo (**Figura 19 A**); las células HuH-7 no formaron CB, en concordancia con lo descrito previamente [256], y esta característica no se modificó en presencia de rGal-1 (**Figura 19 B**). Dado que las células HuH-7 no representan un modelo apropiado para estudiar el proceso de polarización de células hepáticas, se continuó el trabajo con las células HepG2.

El proceso de formación de CB en las células HepG2 se encontró acelerado en presencia de rGal-1; a las 24 h se observó un promedio de 7-8 CB cada 100 células en el control, mientras que en presencia de rGal-1 este número ascendió a un promedio de 11 CB. A las 48 h de incubación se mantuvo la diferencia y se alcanzó el máximo de polarización a las 72 h, tiempo en el cual no se observaron diferencias entre las células control y las tratadas con rGal-1 (**Figura 19 C**). Cuando a las células control se les asignó el valor de 100 % de polarización a las 24 h, en presencia de rGal-1 se alcanzó un porcentaje del 150 %. Notablemente, este aumento fue prevenido en presencia de TDG (10 mM, 106 ± 16 % respecto al control con TDG, 111 ± 13 %) (**Figura 19 D**).

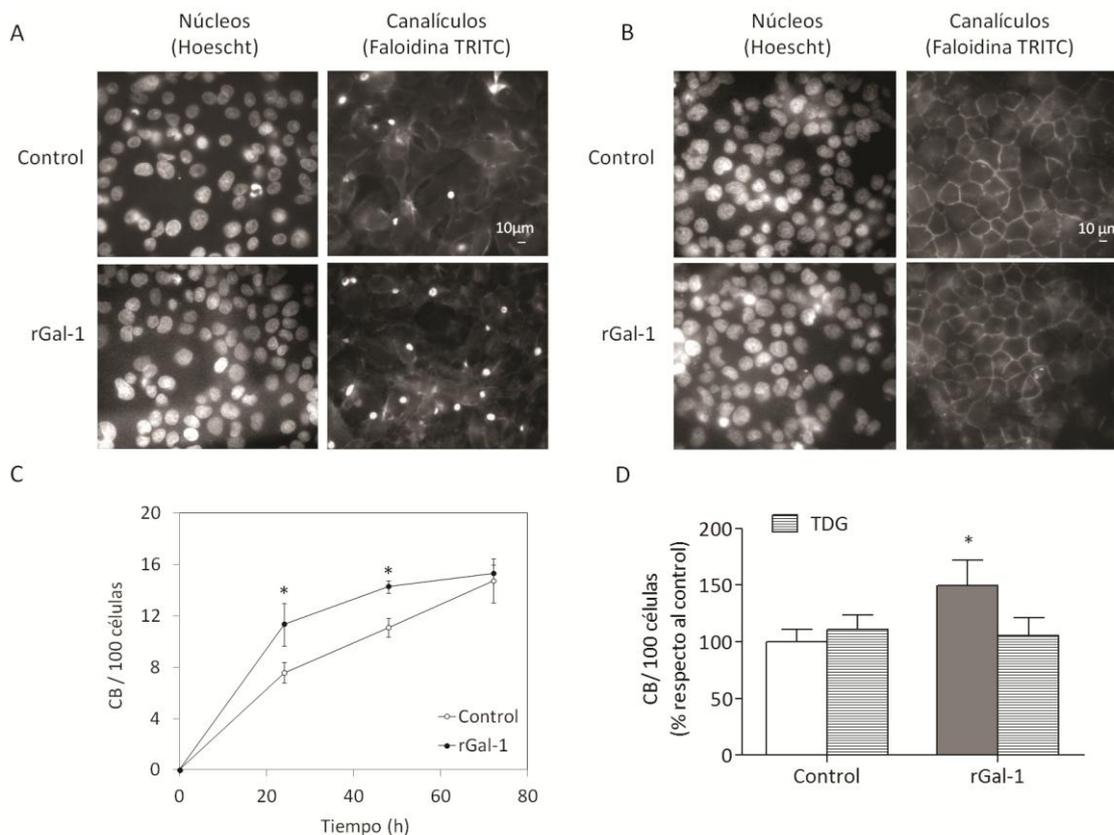


Figura 19. rGal-1 acelera el proceso de polarización de las células de CHC HepG2. Las células se incubaron sobre cubreobjetos previamente cubiertos con poli-L-lisina en presencia o ausencia de rGal-1 (7 μ M) durante 24 h. Las células se fijaron y permeabilizaron, y luego se tiñeron los núcleos con Hoescht 33258 y los CB con faloidina-TRITC. Se visualizaron en un microscopio invertido de epifluorescencia. Morfología polarizada de las células HepG2 (**A**) y de las células HuH-7 (**B**) en presencia o ausencia de rGal-1 luego de 24 h. Los CB se observan como puntos de intensa marca fluorescente (400x) **C**) La polarización de las células HepG2 se expresa como número de CB cada 100 células versus tiempo de incubación. **D**) Las células HepG2 se trataron con TDG 10 mM en presencia y ausencia de rGal-1. Se determinó la polarización luego de 24 h y se expresó como porcentaje de polarización respecto el control. Los datos se expresan como la media \pm ES (n=5). * $p < 0,05$ respecto al control (Test *t* de Student).

Estos resultados señalan un rol de Gal-1, hasta el momento desconocido, acelerando el desarrollo de CB en células hepáticas, a través de interacciones lectina-carbohidrato.

Dado que rGal-1 fue capaz de aumentar la velocidad de polarización de las células HepG2, el siguiente interrogante fue si esta galectina podría alterar la expresión y localización de proteínas de la membrana apical, como MDR1 y MRP2. Mediante inmunofluorescencia, se evaluó la localización de las proteínas MDR1 y MRP2 en células incubadas en presencia o ausencia de rGal-1 durante 24 h. Como se observa en la **Figura 20 A**, ambas proteínas se localizaron en la membrana apical de los hepatocitos, indicando que su transporte y direccionamiento hacia la membrana apical funciona correctamente en presencia de rGal-1. Luego, se determinó el número de CB formados mediante la inmunomarcación de la proteína MRP2. En presencia de rGal-1, luego de 24 h de incubación, el porcentaje de polarización fue mayor a respecto al control (136 ± 14 %) (**Figura 20 B**), obteniéndose un resultado similar al observado previamente mediante la tinción con faloidina.

A continuación, se evaluó la expresión de las proteínas apicales MDR1 y MRP2 en células tratadas con rGal-1 durante 24 h, mediante la técnica de *Western blot*. En presencia de rGal-1 no se observaron diferencias significativas en la expresión de MRP2 (89 ± 7 %) con respecto al control. En el caso de MDR1, se observó una tendencia hacia el aumento de su expresión en presencia de rGal-1, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa con respecto al control (127 ± 14 %) (**Figura 20 C y D**).

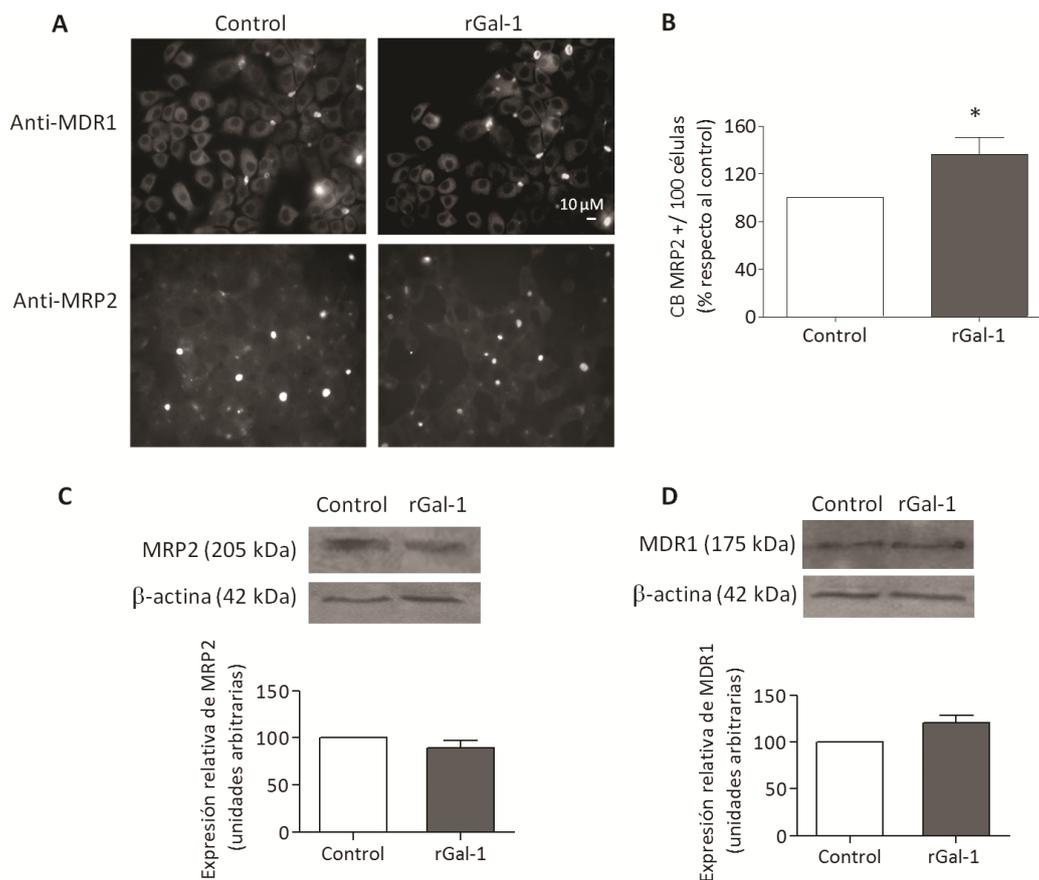


Figura 20. Efecto de rGal-1 sobre la expresión y localización de MDR1 y MRP2. Las células HepG2 incubadas en presencia o ausencia de rGal-1 (7 μ M) durante 24 h se fijaron y permeabilizaron, y se detectaron las proteínas específicas utilizando los anticuerpos anti-MDR1 o anti-MRP2, los cuales se revelaron con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados a Alexa-488. Se muestran las microfotografías de fluorescencia representativas (400x) **(A)** y la cuantificación de los CB marcados con anti-MRP2 **(B)**. **(C)** Mediante *Western blot* se analizó la expresión de MRP2 y de MDR1 en lisados totales de células HepG2 incubadas en presencia o ausencia de rGal-1 (7 μ M) durante 24 h. Como control de carga se utilizó la proteína β -actina. Los datos se expresan como la media \pm ES (n=3). *p<0,05 respecto al control (Test *t* de Student).

Por lo tanto, rGal-1 acelera el proceso de polarización en las células HepG2 sin alterar la expresión ni la localización de las proteínas apicales MDR1 y MRP2.

3.2 Efecto de rGal-3 sobre la polarización de las células HepG2

Previamente se demostró que tanto rGal-1 como rGal-3 eran capaces de promover la adhesión de células HepG2. Con el objetivo de dilucidar si rGal-3 también ejercía un efecto sobre la polarización de las células HepG2, las mismas se incubaron en presencia de rGal-3 (7 μ M) durante 24 h, y luego se determinó el porcentaje de CB teñidos con faloidina. Como puede observarse en la **Figura 21**, en presencia de rGal-3 no se produjeron diferencias significativas en el porcentaje de polarización respecto al control (76 \pm 19 %).

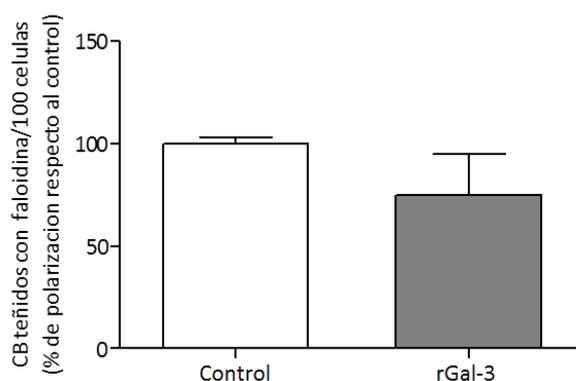


Figura 21. rGal-3 no altera el proceso de polarización de células HepG2. Las células se incubaron en presencia o ausencia de rGal-3 (7 μ M) durante 24 h, y se determinó el número de CB teñidos con faloidina-TRITC/100 células. Los datos se expresan como la media \pm ES (n=4).

Este resultado indica que el aumento en la velocidad de polarización observado en las células HepG2 sería un efecto específico de Gal-1.

3.3 Efecto de cambios en los niveles de expresión de Gal-1 en la polarización de las células HepG2

Lo siguiente fue investigar si cambios en los niveles de expresión de Gal-1 alteraban el proceso de polarización de las células HepG2. Se determinó que las células que sobre-expresan Gal-1 también desarrollan un fenotipo polarizado, evidenciado por la aparición de CB teñidos con faloidina (**Figura 22 A**). Al analizar la formación de CB en función del tiempo, observamos que las células HepG2-M, presentaron un promedio de 7 CB cada 100 células a las 24 h, 11 CB a las 48 h y 14 CB a las 72 h (**Figura 22 B**), es decir, una cinética de polarización similar a la observada para las células HepG2 sin transfectar (**Figura 22 C**). Sin embargo, las células HepG2-G2 alcanzaron el máximo de polarización a las 24 h, con un promedio de 10 CB cada 100 células, y luego este número se mantuvo constante hasta las 48 y 72 h de cultivo. Es decir que, a las 24 h las células que sobre-expresan Gal-1 presentaron un porcentaje de polarización mayor que el control (HepG2-G1: 117 ± 11 %; HepG2-G2: 139 ± 20 %), siendo este efecto fue prevenido en presencia de TDG 10 mM (110 ± 15 %). Sin embargo, luego de 72 h de cultivo, las células HepG2-G2 mostraron una disminución significativa en el grado de polarización respecto a las células control (70 ± 8 %) (**Figura 22 C**).

Por otro lado, al disminuir la expresión de Gal-1 en las células HepG2 no se observaron diferencias significativas en el proceso de polarización a las 24 h respecto al control (siGal-1: 90 ± 5 % respecto a siControl: 104 ± 14 %) (**Figura 22 C**).

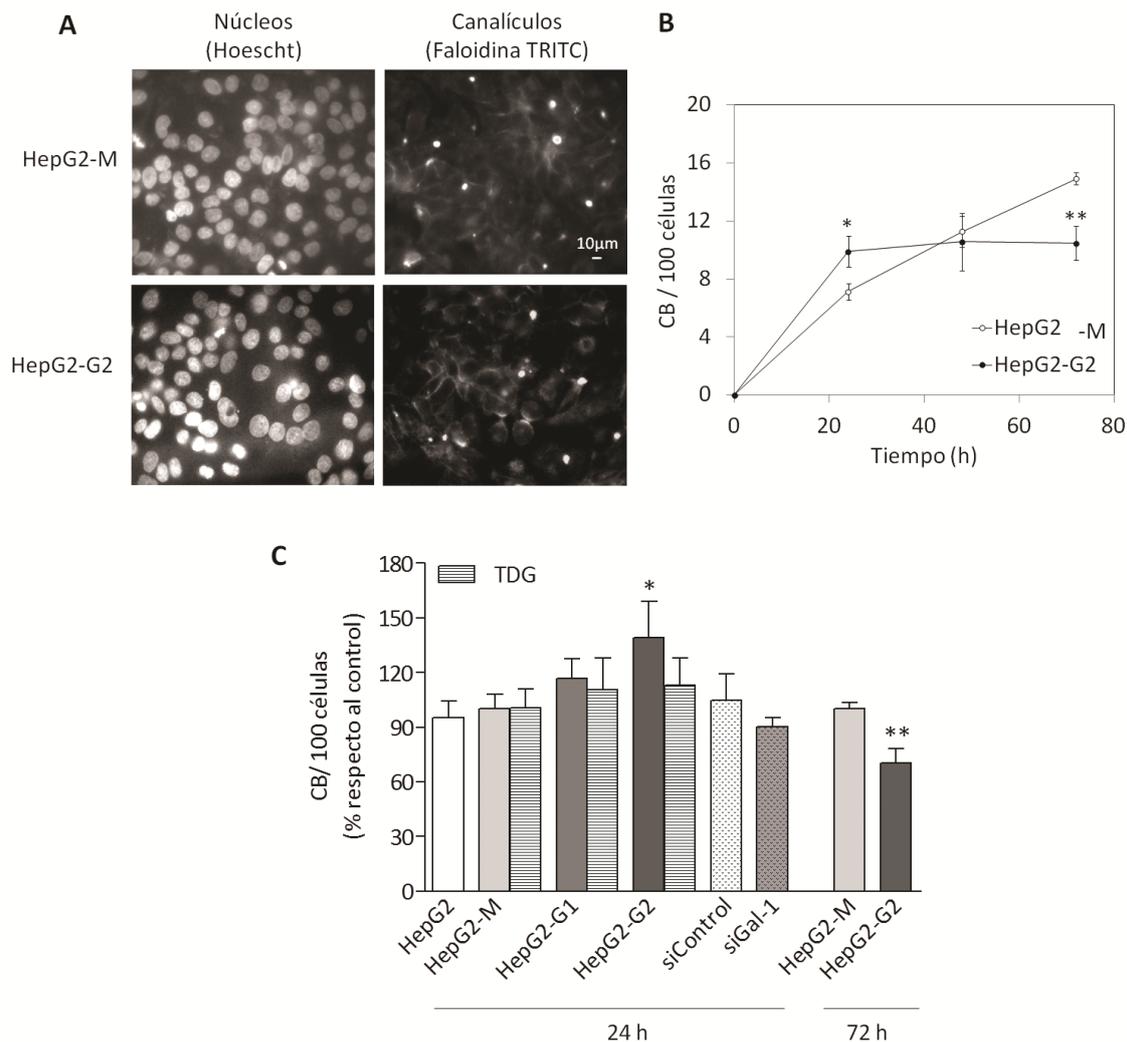


Figura 22. Polarización de células HepG2 con distintos niveles de expresión de Gal-1. Las células se incubaron sobre cubreobjetos previamente cubiertos con poli-L-lisina durante 24 h. Se fijaron, permeabilizaron, se tiñeron los núcleos con Hoescht 33258 y los CB con faloidina-TRITC, y se visualizaron en un microscopio de invertido de epifluorescencia. **A)** Morfología polarizada de las células HepG2-M y HepG2-G2 a las 24 h (400x). **B)** Polarización expresada como número de CB cada 100 células versus tiempo de incubación. **C)** Polarización expresada como porcentaje respecto al control de las células HepG2-G1, HepG2-G2, siControl y siGal-1 a las 24 h o 72 h, en algunos casos de incluyó la presencia de TDG 10 mM. Los datos se expresan como la media \pm ES (n=5). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ respecto a HepG2-M (Test *t* de Student).

Estos resultados sugieren que, si bien existe un incremento, dependiente de glicanos, en el porcentaje de CB luego de cultivar 24 h a las células HepG2-G2 (similar a lo observado con rGal-1), el aumento del grado de polarización respecto a las células

control no se mantiene en el tiempo. De hecho, las células HepG2-G2 presentan una aceleración en el proceso de polarización ya que alcanzan el máximo a las 24 h, pero luego el número de CB se mantiene constante. **Es decir que, el máximo grado de polarización alcanzado por las células HepG2-G2 es menor al alcanzado por las células control, indicando que la sobre-expresión de Gal-1, en realidad, estaría favoreciendo la pérdida de la polarización.**

Luego, al evaluar la localización de las proteínas MDR1 y MRP2 mediante la técnica de inmunofluorescencia, se observó que ambas proteínas se localizaron correctamente en la membrana apical en las células HepG2-G2 (**Figura 23 A**). Para confirmar los resultados obtenidos mediante la tinción de los CB con faloidina-TRITC, se cuantificó el grado de polarización utilizando el anticuerpo anti-MRP2. Luego de 24 h de cultivo, se observó un aumento en el porcentaje de polarización en las células HepG2-G2 respecto al control ($125 \pm 8 \%$), mientras que a las 72 h, también se observó un efecto contrario, es decir, una disminución en el porcentaje de células polarizadas ($65 \pm 2 \%$) (**Figura 23 B**).

A continuación, se analizó la expresión de las proteínas MRP2 y MDR1 mediante *Western blot*. Fue interesante observar que la sobre-expresión de Gal-1 en las células HepG2 produjo un incremento en los niveles de expresión de la proteína MDR1 respecto al control ($213 \pm 35 \%$), y una disminución significativa de la expresión de MRP2 ($82 \pm 7 \%$) (**Figura 23 C y D**, respectivamente).

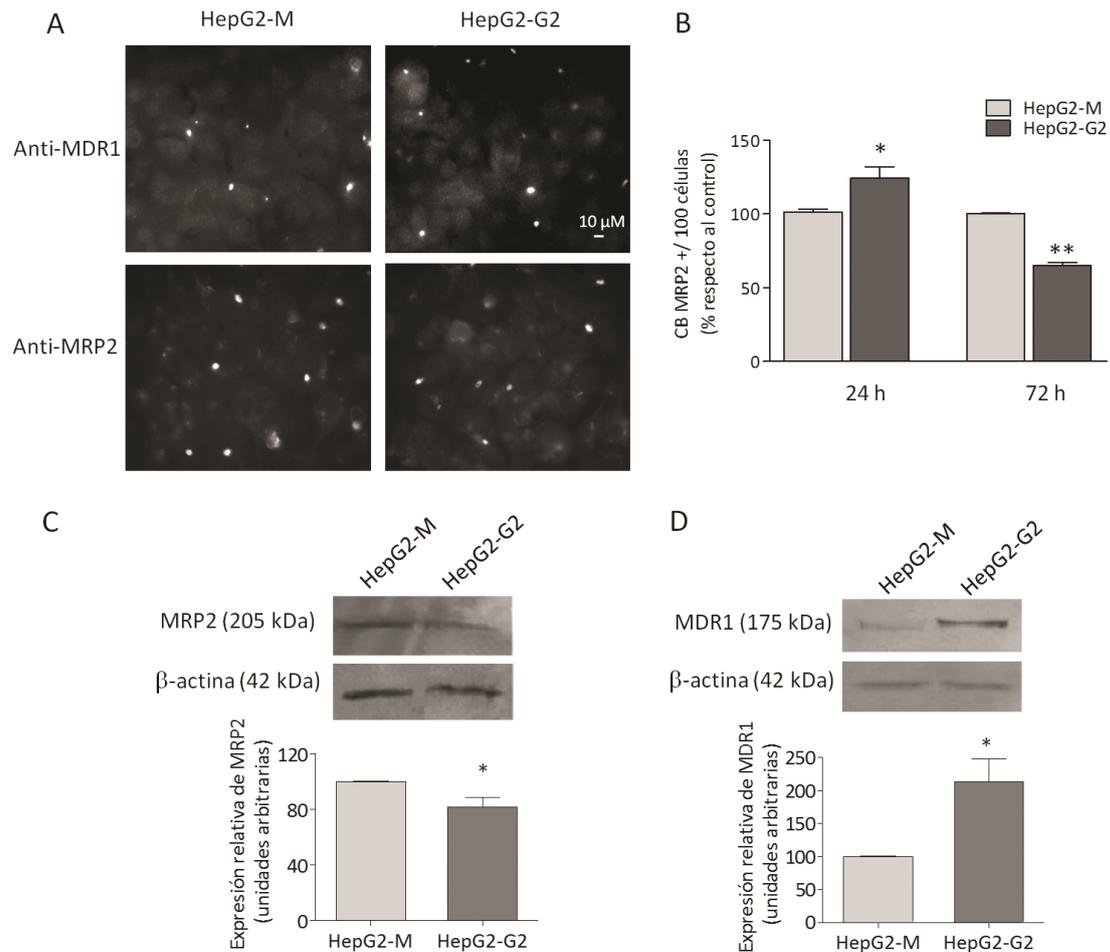


Figura 23. Expresión y localización de MDR1 y MRP2 en HepG2 células que sobre-expresan Gal-1. Las células HepG2-M y HepG2-G2 se cultivaron sobre cubreobjetos previamente cubiertos con poli-L-lisina durante 24 h y se detectaron las proteínas específicas utilizando los anticuerpos anti-MDR1 y anti-MRP2 y revelados con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados a Alexa-488. Se visualizó en un microscopio invertido de epifluorescencia (400x) **(A)**. Se cuantificaron los CB marcados con anti-MRP2 a las 24 y 72 h de incubación **(B)**. **(C)** Mediante *Western blot* se analizó la expresión de MRP2 y MDR1 en lisados totales de células HepG2-M y HepG2-G2 incubadas durante 24 h. Como control de carga se utilizó la proteína β -actina. Los datos se expresan como la media \pm ES (n=3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto a HepG2-M (Test *t* de Student).

Los resultados obtenidos indican que la sobre-expresión de Gal-1 en las células HepG2 no altera la localización de las proteínas de la membrana apical MDR1 y MRP2; pero sí modifica sus niveles de expresión, incrementando los correspondientes a MDR1 y disminuyendo los de MRP2.

3.4 rGal-1 acelera el proceso de polarización involucrando las vías de señalización PI3K, MAPK/ERK1/2 y PKA.

Para investigar las vías de señalización involucradas en el efecto de Gal-1 sobre la polarización de las células HepG2, las células se incubaron con rGal-1 en presencia de los inhibidores farmacológicos wortmanina y PD98059, o con DMSO (vehículo) como control. Luego de 24 h se determinó el porcentaje de polarización de las células respecto al control. Notablemente, tanto la presencia de wortmanina (1 μ M) como la de PD98059 (25 μ M) inhibieron significativamente el efecto de rGal-1 sobre la polarización (104 \pm 18 % y 78 \pm 11 %, respectivamente) (**Figura 24**).

Dado que la proteína quinasa A (PKA) ha sido implicada en el proceso que conduce a la formación de canalículos biliares [257, 258], se investigó si esta vía estaba implicada en la aceleración de la polarización observada en presencia de rGal-1. En presencia del inhibidor farmacológico de PKA, H89, se observó una disminución en el número de canalículos y esta disminución se mantuvo en presencia de rGal-1 (66 \pm 11 % y 55 \pm 11 %, respectivamente) (**Figura 24**).

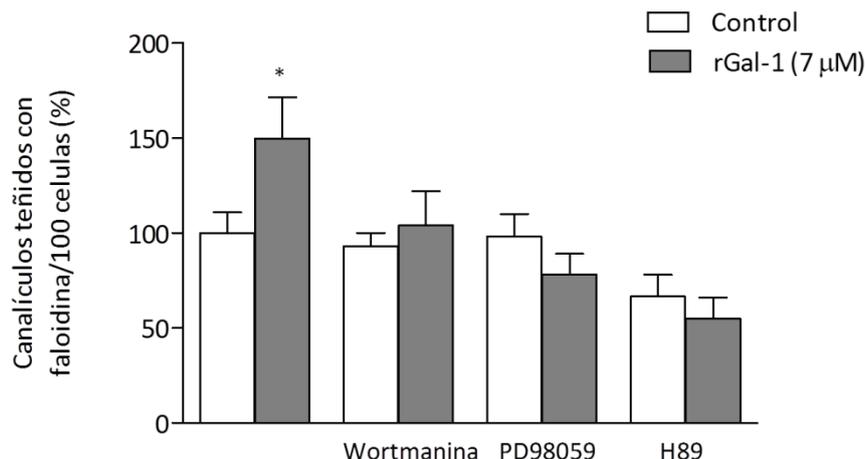


Figura 24. Las vías de señalización PI3K, MAPK/MEK/ERK y PKA están involucradas en el efecto de rGal-1 sobre la polarización. Las células HepG2 se incubaron en presencia o ausencia de rGal-1 (7 µM) durante 24 h, en presencia de wortmanina (inhibidor de PI3K, 1 µM), PD98059 (inhibidor de MEK1/2, 25 µM) o H89 (inhibidor de la PKA, 10 µM). Los datos se expresan como la media ± ES (n=2). * $p < 0,05$ respecto al control (Test *t* de Student).

Estos resultados indican que las vías de señalización PI3K, MAPK/ERK1/2 y PKA son requeridas para que rGal-1 acelere la formación de canálculos biliares en las células HepG2.

3.5 Adhesión y polarización de células HepG2 inducidas por Gal-1: ¿son dos procesos independientes?

Cuando Gal-1 es agregada en forma exógena a los cultivos de células HepG2 acelera la adhesión y la polarización de las mismas. Estos efectos podrían ser independientes, o bien, el incremento en el número de CB podría deberse al aumento en la adhesión de las células. Para responder a esta pregunta se diseñó el siguiente experimento: las células se incubaron durante 4 h en ausencia de rGal-1, dado que en este tiempo las células se adhieren completamente (no hay diferencias entre las células incubadas con el vehículo y con rGal-1, **Figura 14**) pero todavía no desarrollan

su morfología polarizada. Luego se agregó rGal-1 (7 μ M) y a las 24 h se determinó el grado de polarización. En este ensayo, cuando rGal-1 se agregó una vez que las células estaban adheridas, se observó que la misma no fue capaz de inducir un aumento en la formación de CB (111 ± 4 respecto al control, 100 ± 3) (**Figura 25**).

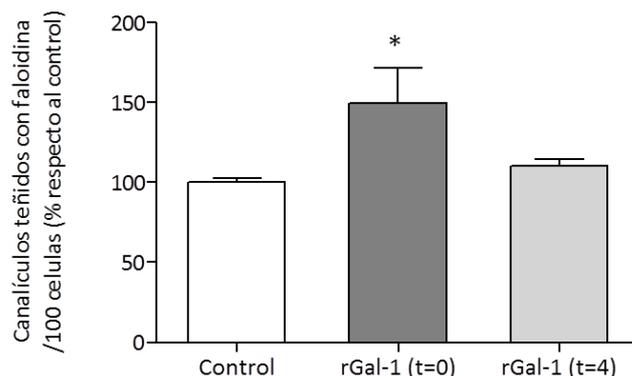


Figura 25. La adhesión y polarización inducidas por rGal-1 son dos procesos relacionados. Las células se incubaron sobre cubreobjetos durante 4 h en ausencia de rGal-1, y una vez adheridas se les agregó rGal-1 (7 μ M, t=4). Luego de 24 h se determinó el número de CB mediante la tinción con faloidina-TRITC cada 100 células. Como control, las células se incubaron en presencia de rGal-1 desde el tiempo cero (rGal-1, t=0). Los datos se expresan como la media \pm ES (n=3). * $p < 0,05$ (Test *t* de Student).

Este resultado indica que rGal-1 acelera la formación de CB como consecuencia de acelerar la adhesión de las células. Esto explica el hecho de que cuando Gal-1 es sobre-expresada por las células, se observa una aceleración inicial en la formación de CB, como consecuencia del aumento de la adhesión, pero luego estas células se polarizan menos que el control.

3.6 rGal-1 induce la fosforilación de ERK1/2 pero no la de AKT

Previamente se demostró que en presencia de los inhibidores de las vías de MAPK y PI3K, el efecto de rGal-1 sobre la adhesión y sobre la polarización se previno parcial o totalmente. Para confirmar la activación de dichas vías de señalización, se analizó la fosforilación de ERK1/2 y AKT. Las células se cosecharon e incubaron en suspensión en medio libre de suero y en presencia o ausencia de rGal-1 soluble (14 μ M). A los tiempos indicados, las células se procesaron para el análisis por *Western blot*. Cuando las células se incubaron en presencia de rGal-1 se observó una rápida fosforilación de ERK1/2 luego de 1 min de tratamiento, se mantuvo hasta los 5 min y disminuyó a los 10 min (**Figura 26 A**). Sin embargo, no se detectó fosforilación de AKT en presencia de rGal-1 hasta los 60 min de incubación (**Figura 26 B**).

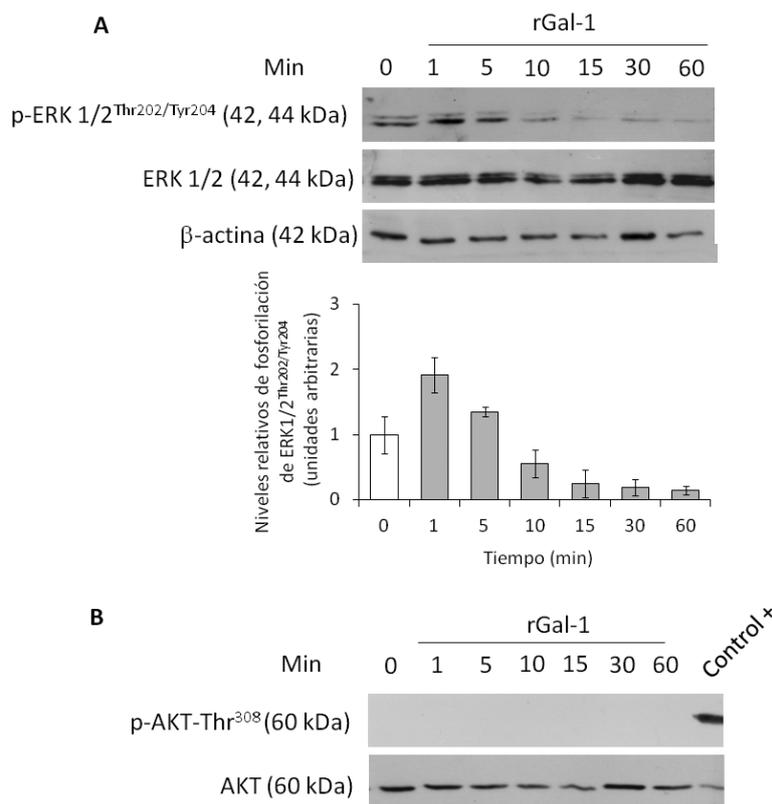


Figura 26. rGal-1 induce la fosforilación de ERK1/2 pero no la de AKT. Las células se incubaron en suspensión en medio libre de suero en presencia o ausencia de rGal-1 (14 μ M) durante los tiempos indicados. **A)** Se analizó la fosforilación de ERK1/2 en los residuos Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ relativa a la expresión de ERK1/2 total y β -actina. **B)** Se determinó la fosforilación de AKT en el residuo Thr³⁰⁸ y la expresión de AKT total. Control positivo, homogeneizado de hepatocitos de rata tratados con insulina. Los datos se expresan como la media \pm ES (n=3).

Estos resultados sugieren que rGal-1 induce la fosforilación de ERK1/2 pero no la de AKT.

Capítulo 4. La expresión de Gal-1 altera la expresión de marcadores epiteliales, mesenquimales y la resistencia a anoikis

Hasta aquí se había demostrado que Gal-1 es capaz de modular la adhesión y la polarización de las células de CHC, dos procesos relacionados con la TEM. Luego, para avanzar con el estudio de la participación de Gal-1 en dicho proceso, se analizó la expresión de proteínas asociadas con los fenotipos epitelial y mesenquimal, la cual se ve alterada durante la TEM.

4.1 Expresión de marcadores epiteliales

Entre las proteínas marcadoras de células epiteliales se incluyen principalmente a las moléculas involucradas en los sistemas de comunicación célula-célula, como E-cadherina (uniones adherentes), claudina, ocludina y ZO-1 (uniones estrechas), y citoqueratinas, entre otras. La glicoproteína E-cadherina es esencial para mantener la integridad de tejidos epiteliales, y su represión es un evento crucial de la TEM. Esta proteína puede ser inactivada a nivel funcional o silenciada por varios mecanismos, siendo la represión a nivel transcripcional el mecanismo predominante.

El primer interrogante planteado fue si los niveles de expresión de Gal-1 en las células HepG2 estarían relacionados con la expresión de E-cadherina. Para contestar esta pregunta, se obtuvieron lisados de cultivos confluentes de las células HepG2, HepG2-M, HepG2-G1, HepG2-G2, siControl y siGal-1. Mediante *Western blot*, se observó una disminución de la expresión de E-cadherina en las células que sobre-expresan Gal-1, HepG2-G1 y -G2, respecto al control (53 ± 8 y 38 ± 6 %, respectivamente). Por otro lado, la disminución de la expresión de Gal-1 produjo un

aumento en la expresión de E-cadherina ($119 \pm 4 \%$) (**Figura 27 A**). Este resultado indica que cambios en el nivel de expresión de Gal-1 en las células HepG2 modulan la expresión de E-cadherina. Dado que el clon HepG2-G2 fue el que mostró un mayor nivel de expresión de Gal-1 (**Figura 10**) y a su vez, un menor nivel de expresión de E-cadherina, los siguientes experimentos se realizaron únicamente con dicho clon.

Ciertos estudios demostraron que los niveles de expresión de E-cadherina dependen del grado de confluencia celular, siendo éstos mayores en cultivos de baja densidad celular respecto a aquellos con alta densidad [259-261]. Por lo tanto, se estudió si la densidad celular afectaba los niveles de expresión de E-cadherina. Para esto, se realizaron cultivos de las células HepG2-M y HepG2-G2 de baja y alta densidad celular (3×10^5 y 6×10^5 , respectivamente en placas de 6 pocillos) los cuales se incubaron durante 24 o 72 h. En todas las condiciones ensayadas se mantuvo la expresión de E-cadherina disminuida en las células que sobre-expresan Gal-1 respecto al control (**Figura 27 B**). Este resultado indica que la disminución de la expresión de E-cadherina dada por el incremento de los niveles de Gal-1 no depende del grado de confluencia o densidad celular, ni del tiempo de incubación del cultivo.

Además de una alteración en los niveles de expresión, se suele observar una deslocalización de E-cadherina. Mientras que en los hepatocitos de hígados normales y en los hepatocitos de tumores tempranos y diferenciados de CHC, E-cadherina se localiza en la membrana plasmática (en los contactos célula-célula); en los hepatocitos de tumores más avanzados y menos diferenciados disminuye su expresión y se observa una localización citoplasmática [262]. Por ello, mediante inmunofluorescencia se analizó la localización de E-cadherina en cultivos de células confluentes incubadas durante 72 h. En las células HepG2-M, E-cadherina se localizó principalmente en la

membrana plasmática de las mismas. Mientras que en las células que sobre-expresan Gal-1, se observó una expresión citoplasmática en la mayoría de las células, si bien algunas mantuvieron la expresión en membrana (**Figura 27 C**). Es decir que la sobre-expresión de Gal-1 no sólo disminuye la expresión de E-cadherina sino que también induce su deslocalización.

El recambio de E-cadherina resulta un evento crucial en los eventos de adhesión celular. La proteína catenina p120 se une al dominio de E-cadherina que se encuentra adyacente a la membrana plasmática. Esta interacción aumenta la estabilidad de E-cadherina en la membrana, pero ante la reducción de la expresión de catenina p120 se ha observado una inmediata internalización y degradación de E-cadherina (revisado por [155]). Por ello, a continuación se investigó si los niveles de expresión de Gal-1 podían afectar los de catenina p120. Dado que la mayoría de las células expresan múltiples isoformas de esta catenina, generadas por *splicing* alternativo [263-265], en un ensayo de *Western blot* se utilizó un anticuerpo que reconoce el dominio carboxi-terminal presente en todas las isoformas conocidas, que se encuentran entre 90-120 kDa. En las células HepG2, el anticuerpo reconoció dos bandas correspondientes a catenina p120, alrededor de 120 kDa. Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de expresión de ninguna de las isoformas al alterar los niveles de expresión de Gal-1. Esto sugiere que Gal-1 no estaría afectando el recambio de E-cadherina mediado por catenina p120 (**Figura 27 D**).

β -catenina forma parte de las uniones adherentes en asociación con E-cadherina y su disminución es frecuentemente observada en los tumores de CHC. Las células HepG2 poseen una mutación en el gen de β -catenina (*CTNNB1*), que consiste

en la delección del dominio regulatorio fosforilable por GSK3 β (aminoácidos 20-151) en uno de los alelos del gen [232]. De modo que las células expresan dos isoformas de la proteína, una silvestre (92 kDa) y una truncada o mutada (75 kDa). Entonces, mediante *Western blot*, se analizó la expresión de dicha proteína utilizando un anticuerpo dirigido contra los aminoácidos 571-781, es decir que reconoce ambas isoformas. En las células HepG2-G2 se observó una disminución en la expresión de la isoforma silvestre de β -catenina ($70 \pm 8 \%$), mientras que en las células con expresión de Gal-1 disminuida no se observaron diferencias significativas ($114 \pm 7 \%$) respecto de las células control. Por otro lado, no se observaron cambios en la expresión de la isoforma truncada en relación a los niveles de Gal-1 (**Figura 27 E**).

Las uniones estrechas generan una barrera de difusión pericelular y una barrera de difusión entre los compartimentos de membrana apical y basolateral [266]. Se componen de las proteínas transmembrana ocludina y claudina, que se unen en la periferia celular a las proteínas ZO-1, -2 y -3 [267]. La proteína ZO-1 es frecuentemente utilizada como marcador de las uniones estrechas, por lo que se analizó su expresión mediante *Western blot*. Las células HepG2-G2 presentaron una disminución en la expresión de ZO-1 respecto al control ($40 \pm 4 \%$), mientras que cuando la expresión de Gal-1 se disminuyó, no se observaron diferencias significativas (**Figura 27 F**).

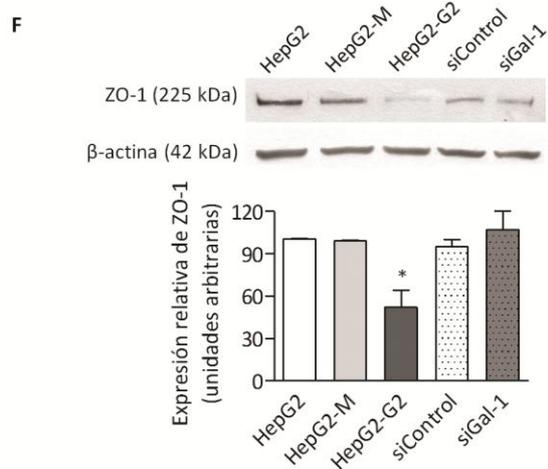
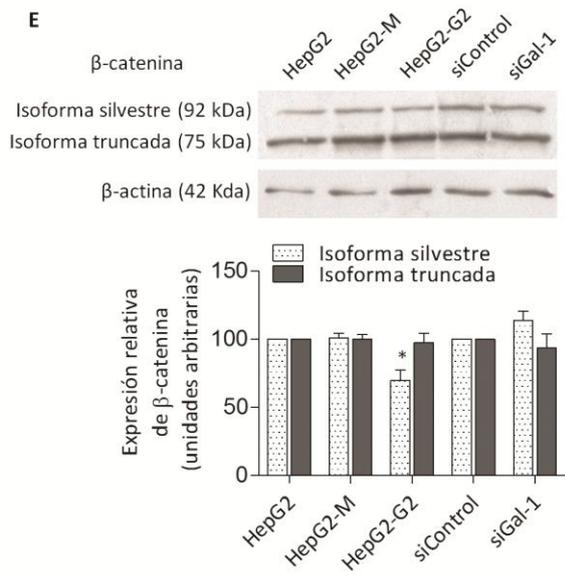
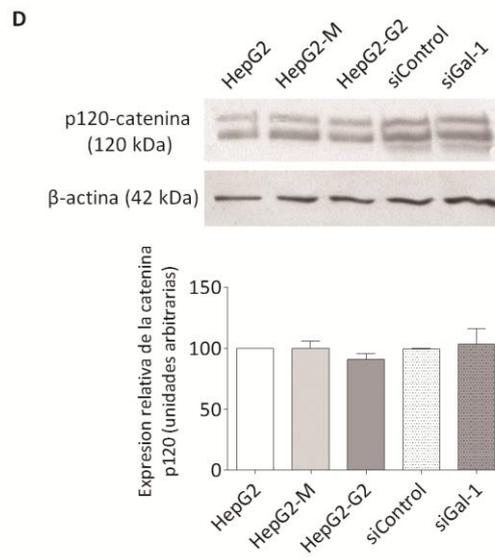
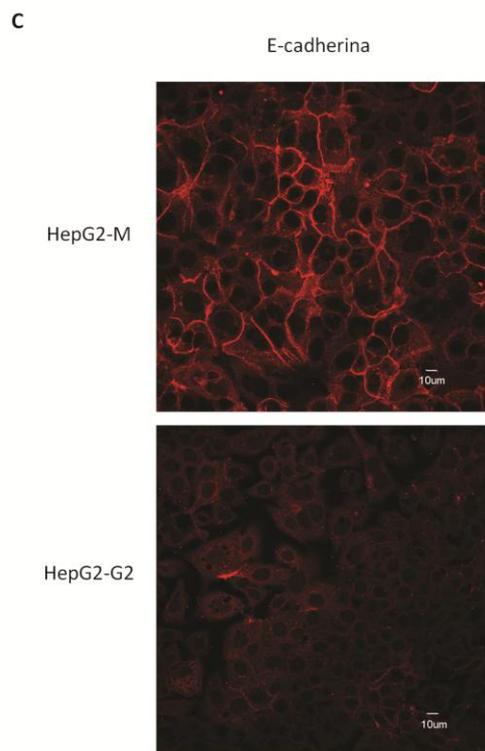
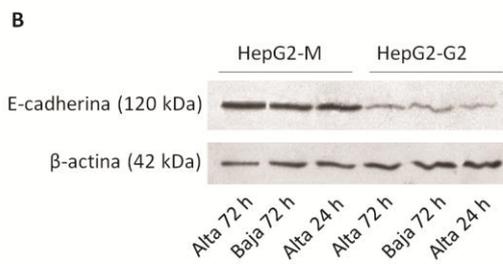
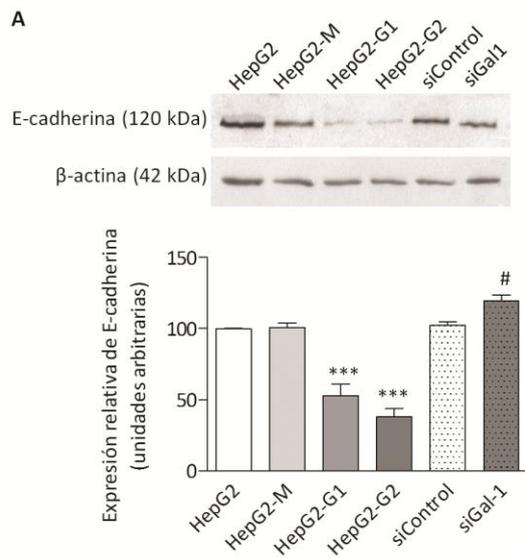


Figura 27. Gal-1 induce la disminución de marcadores epiteliales. Las células se incubaron durante 72 h para obtener monocapas confluentes. Luego se lisaron y mediante *Western blot* se determinó la expresión de E-cadherina (n=4) **(A)**, de catenina p120 (n=3) **(D)**, de β -catenina (n=4) **(E)** y de ZO-1 (n=3) **(F)**. **B** Se analizó la expresión de E-cadherina mediante *Western blot* en cultivos de alta y baja densidad celular. Control de carga, β -actina. Los datos se expresan como la media \pm ES. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ respecto a HepG2-M; # $p < 0,05$ respecto a siControl (Test *t* de Student). **C** Inmunofluorescencia de E-cadherina mediante microscopia confocal utilizando el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a Alexa-546 (400x). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Las fotografías son representativas de tres experimentos.

Estos resultados indican que la sobre-expresión de Gal-1 disminuye la expresión de marcadores epiteliales, demostrado por la reducción de la expresión de los componentes de las uniones célula-célula E-cadherina, β -catenina y ZO-1.

4.2 Expresión de marcadores de fenotipo mesenquimal

Durante la TEM las células alteran su morfología epitelial, y adquieren un fenotipo fibroblastoide. Con el objetivo de evaluar si la sobre-expresión de Gal-1 inducía este fenotipo, las células se cultivaron sobre colágeno tipo I, principal componente de la MEC de los hepatocitos, y luego de 72 h se fotografiaron en un microscopio invertido de campo claro. En la **Figura 28 A** se observa que las células HepG2-G2 presentaron una forma ahusada, característica de células mesenquimales.

Los miembros de la superfamilia de factores de transcripción SNAIL, incluyendo a SNAIL1 y SNAIL2/SLUG, son represores transcripcionales de E-cadherina. En el 60,2 % de los tumores de CHC humanos se observó una disminución de la expresión de E-cadherina, y esto se correlacionó con la sobre-expresión de SNAIL1 [226]. Por ello, resultó interesante evaluar la expresión de dicho factor de transcripción en las células HepG2 con distintos niveles de expresión de Gal-1. Mediante *Western blot*, se detectó

un aumento en la expresión de SNAIL1 en las células HepG2-G2 ($140 \pm 7 \%$), mientras que el silenciamiento de la lectina indujo una disminución en la expresión de SNAIL1 ($52 \pm 15 \%$) (**Figura 28 B**). Es decir que, Gal-1 modularía los niveles de expresión de SNAIL1 y, que dicho factor de transcripción podría estar involucrado en la TEM inducida por la sobre-expresión de Gal-1.

La proteína vimentina es el principal constituyente de la familia de filamentos intermedios involucrada en la remodelación del citoesqueleto. Esta proteína de 57 kDa es ubicuamente expresada en células mesenquimales, y se ha observado su sobre-expresión en tumores epiteliales. Mediante *Western blot*, se observó que las células que sobre-expresan Gal-1 expresaron mayores niveles de vimentina que las células control ($163 \pm 12 \%$), mientras que en las células siGal-1 se observó una disminución de su expresión ($54 \pm 14 \%$) (**Figura 28 C**). Esto se confirmó mediante inmunofluorescencia (**Figura 28 D**).

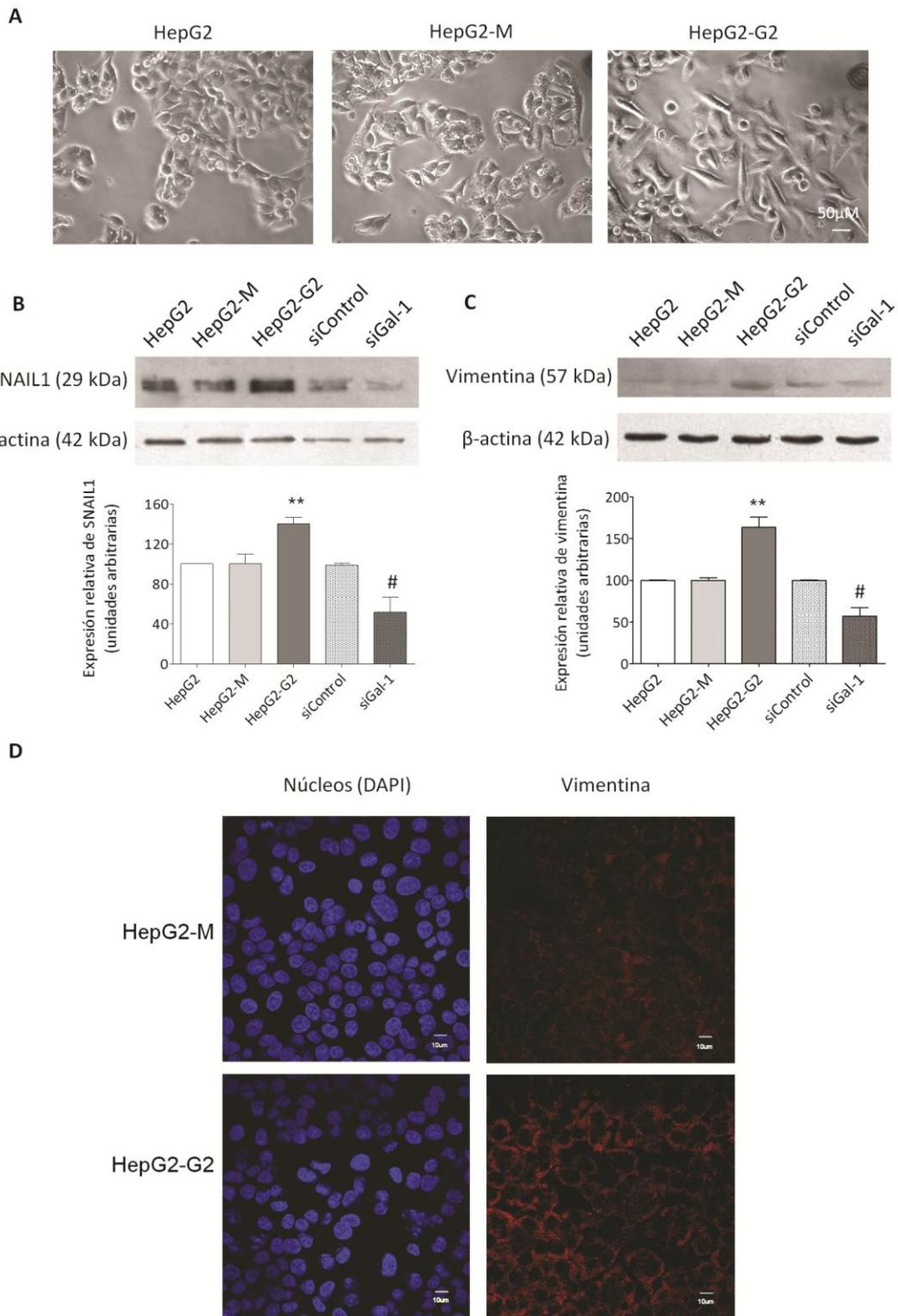


Figura 28. Gal-1 incrementa los niveles de expresión de SNAIL1 y vimentina, y favorece la morfología de tipo mesenquimal. A) Microfotografías de campo claro de las células cultivadas durante 72 h sobre colágeno tipo I, representativas de dos experimentos (200x). Las células correspondientes se incubaron durante 72 h obteniendo monocapas confluentes. Luego se lisaron y mediante *Western blot* se determinó la expresión SNAIL1 (**B**) y vimentina (**C**), relativa a β -actina. Los datos se expresan como la media \pm ES (n=3). **p<0,01 respecto a HepG2-M; #p<0,05 respecto a siControl (Test *t* de Student). **D)** Inmunofluorescencia de vimentina utilizando el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a Alexa-546. Los núcleos se tiñeron con DAPI y se observó en microscopio confocal (640x). Las fotografías son representativas de tres experimentos.

Los resultados obtenidos sugieren una asociación entre el nivel de expresión de Gal-1 y la adquisición de un fenotipo mesenquimal, demostrado por el incremento de los niveles de expresión del factor de transcripción SNAIL1 y la proteína mesenquimal vimentina, y por la aparición de una morfología ahusada, fibroblastoide.

4.3 La sobre-expresión de Gal-1 induce la disminución de la expresión de E-cadherina en las células HepG2 a través de un mecanismo dependiente de PI3K/AKT

Para investigar las vías de señalización involucradas en el efecto de Gal-1 sobre la TEM de las células HepG2, se utilizaron los inhibidores farmacológicos wortmanina (inhibidor de la PI3K) y PD98059 (inhibidor de las quinasa MEK1/2). Las células se incubaron en presencia del inhibidor correspondiente durante 72 h, y luego se determinó la expresión de E-cadherina por *Western blot*, dado que su disminución es la característica más representativa de la TEM. En presencia de wortmanina, la disminución de la expresión de E-cadherina en las células HepG2-G2 se previno

completamente, indicando la participación de esta vía. Por otro lado, en presencia de PD98059, se mantuvo una disminución significativa de la expresión de E-cadherina en las células HepG2-G2 (**Figura 29 A**).

El resultado anterior sugiere la participación de la vía de señalización PI3K/AKT en la disminución de la expresión de E-cadherina inducida por la sobre-expresión de Gal-1. Dado que esta vía media la fosforilación de AKT, se investigó si mayores niveles de Gal-1 podían promover la activación de AKT. Mediante *Western blot*, se analizó la fosforilación de AKT en el residuo Thr³⁰⁸. Las células HepG2-G2 mostraron mayores niveles de fosforilación de AKT respecto al control (188 ± 21 %) sugiriendo una activación constitutiva de la misma. Por otro lado, si bien se detectaron menores niveles de fosforilación de AKT en las células transfectadas con el siGal-1 respecto a las células siControl, esta diferencia no fue significativa (112 ± 13 % respecto a 144 ± 11 %) (**Figura 29 B**).

A nivel extracelular, Gal-1 puede modular procesos de adhesión y migración celular, crecimiento tumoral, angiogénesis y escape del tumor al sistema inmune [80, 120]. Sin embargo, Gal-1 también induce la transformación tumoral actuando en el compartimento intracelular; específicamente interactúa con H-RAS para mediar el anclaje de RAS a la membrana plasmática [79]. En los capítulos anteriores, se demostró que Gal-1 desde el espacio extracelular modula la adhesión y polarización de las células HepG2, por lo tanto, resultaba interesante evaluar si también era capaz de modular la expresión de E-cadherina. Para ello, las células HepG2 se incubaron en presencia de rGal-1 (7 μ M) durante 24 h y luego se determinó la expresión de E-cadherina mediante *Western blot*. En este ensayo, no se observaron diferencias en los

niveles de expresión de E-cadherina en presencia de rGal-1, sugiriendo que Gal-1 ejerce este efecto a nivel intracelular (**Figura 29 C**).

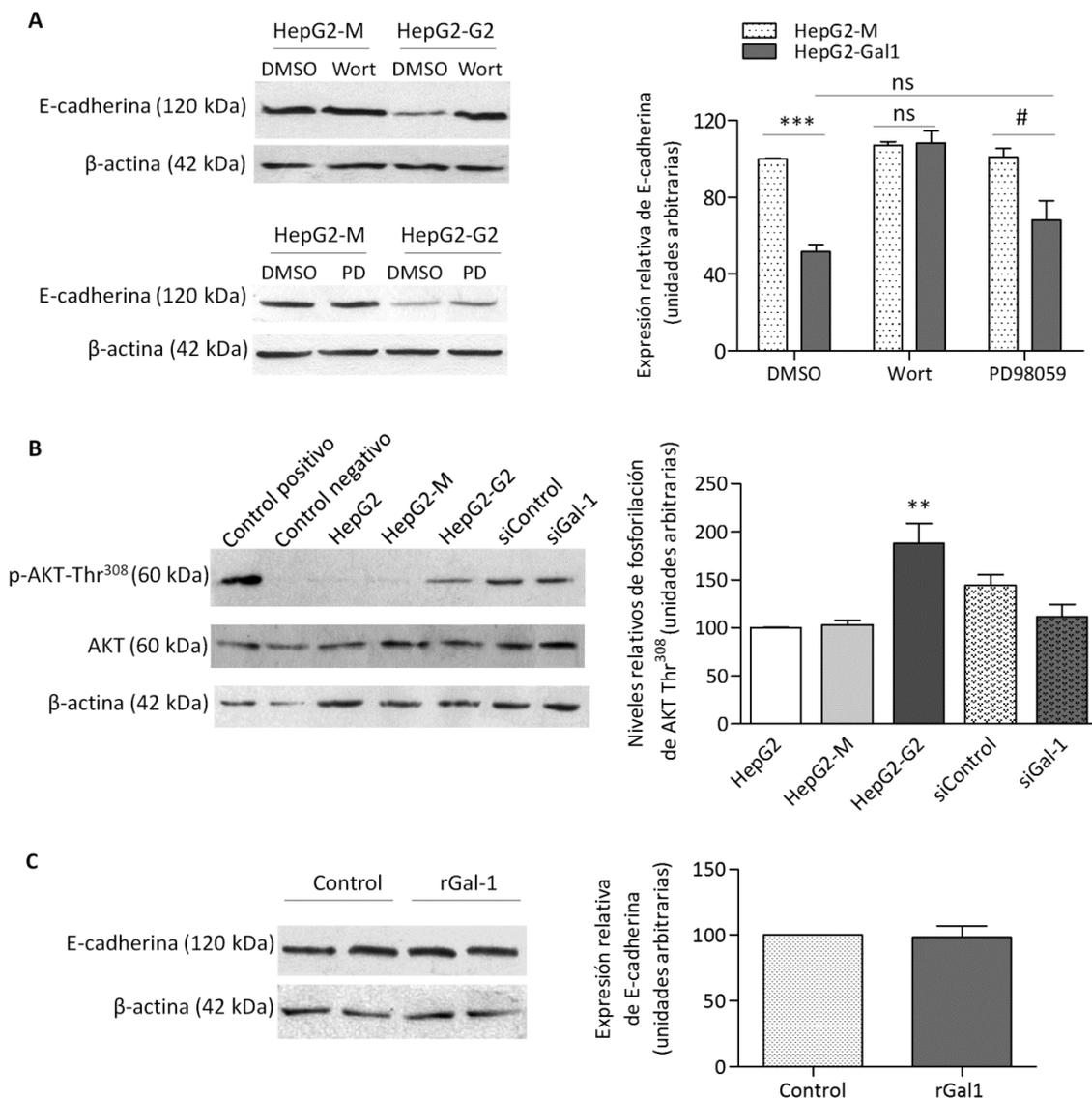


Figura 29. Gal-1 induce la disminución de la expresión de E-cadherina a través de la activación de la vía PI3K/AKT. Las células se incubaron durante 72 h en presencia de wortmanina (1 μM), PD98059 (25 μM) o DMSO como control (**A**), o durante 24 h en presencia de rGal-1 (7 μM) o PBS-DTT como control (**C**). Luego se lisaron y mediante Wb se determinó la expresión de E-cadherina. **B**) Las células se incubaron durante 24 h en ausencia de suero y luego se determinó la fosforilación de AKT en el residuo Thr³⁰⁸ relativa a la expresión de AKT total y β-actina. Control negativo, homogeneizado de hepatocitos de rata sin tratar; control positivo, homogeneizado de hepatocitos de rata tratados con insulina. Control de carga, β-actina. Los datos se expresan como la media ± ES (n=3). **p<0,01, ***p<0,001 respecto a HepG2-M; #p<0,05 respecto a HepG2-M en presencia de PD98059 (Test t de Student).

Los resultados obtenidos sugieren que Gal-1 a nivel intracelular induce la disminución de E-cadherina con la participación de la vía PI3K/AKT.

4.4 Resistencia a anoikis

En el proceso de TEM las células adquieren un mayor potencial metastásico, en parte, mediante la adquisición de resistencia a anoikis [180]. Anoikis es un tipo de muerte celular programada que se induce cuando las células no están adheridas a la MEC o cuando se adhieren en un sitio inapropiado. Por lo que si existen fallas en la ejecución de este programa se puede producir la supervivencia de las células en condiciones de suspensión (como es el torrente sanguíneo) y la proliferación de las mismas en sitios ectópicos [268]. El crecimiento independiente de anclaje se puede evaluar mediante el ensayo de formación de colonias en agar blando, el cual que permite determinar la proliferación en un medio de cultivo semi-sólido. Entonces, las células se resuspendieron en una solución de agar de bajo punto de fusión al 0,4 % y se sembraron sobre una capa de agar al 0,6 %. Luego de tres semanas, se determinó el número de colonias formadas y se observó que las células HepG2-G2 formaron más colonias que el control (18 ± 2 respecto 6 ± 2 colonias) (**Figura 30**).

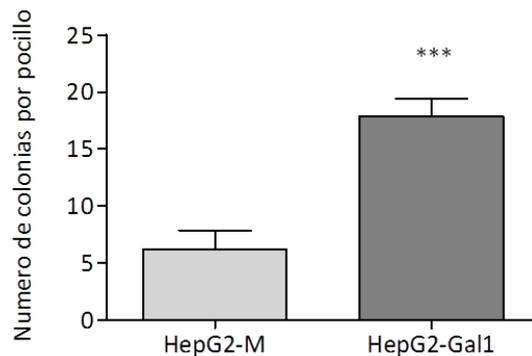


Figura 30. Gal-1 favorece el crecimiento independiente de anclaje. En placas de 24 pocillos se sembraron 2500 células en agarosa de bajo punto de fusión al 0,4 % por pocillo sobre una base de agarosa al 0,6 %. Luego de tres semanas de incubación a 37 °C se determinó el número de colonias formadas. El resultado se muestra como la media \pm ES de tres experimentos independientes *** $p < 0,001$ (Test t de Student).

Este resultado sugiere que un incremento en el nivel de expresión de Gal-1 favorece el crecimiento independiente de anclaje contribuyendo al potencial metastásico de las células de CHC.

Capítulo 5. Gal-1 participa en la activación de la vía WNT

La vía WNT/ β -catenina es de crucial importancia durante el desarrollo embrionario, en la proliferación celular, supervivencia y regeneración de tejidos. Estudios previos indican que la vía WNT/ β -catenina juega un rol esencial en el mantenimiento de la salud hepática y que está desregulada en los tumores de hígado [269]. Además, estudios realizados utilizando modelos experimentales y tumores de CHC humanos arrojaron evidencias que revelan la importancia de esta vía en la inducción del proceso de TEM, junto con la vía de señalización del TGF- β y la colaboración de virus hepáticos [262, 270].

5.1 La sobre-expresión de Gal-1 en las células HepG2 promueve la translocación nuclear de β -catenina

β -catenina desempeña un rol esencial en la adhesión, mediante su unión a E-cadherina, y en la activación de la vía WNT. Como se dijo anteriormente, las células HepG2 poseen una mutación en el gen que codifica a β -catenina (*CTNNB1*), la cual conduce a una activación constitutiva de la vía. En la sección 4.1 se demostró que las células HepG2-G2 presentan una disminución de la expresión de la isoforma silvestre, probablemente debido a su degradación como consecuencia de la disminución de la expresión de E-cadherina. La función de β -catenina puede ser regulada a través de fosforilaciones, mediadas por varias quinasas. Las fosforilaciones en el dominio amino-terminal de β -catenina conducen a la degradación de la misma; mientras que en el dominio carboxi-terminal promueven su función en la señalización [214]. Por ejemplo, la fosforilación en el residuo Ser⁵⁵² mediada por AKT promueve la localización nuclear

de β -catenina [217], resultando en la transcripción de genes blanco de la vía WNT [271]. Dado que se observó un aumento en los niveles de AKT activa (fosforilada) en las células HepG2-G2, el siguiente interrogante fue si esto podría conducir a mayores niveles de fosforilación de β -catenina en el residuo Ser⁵⁵². Entonces, mediante *Western blot*, se analizó la fosforilación utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente a la forma fosforilada de β -catenina en el residuo Ser⁵⁵² (p- β -catenina-Ser⁵⁵²). Notablemente, las células HepG2-G2 presentaron mayores niveles de fosforilación en el residuo Ser⁵⁵² de la isoforma truncada de la β -catenina respecto al control (150 ± 18 %), y, si bien se detectó un aumento de la fosforilación de la isoforma silvestre, éste no fue significativo (125 ± 11 %). En las células silenciadas no se observaron diferencias significativas (siGal-1 silvestre 87 ± 8 vs 108 ± 7 %; truncada 97 ± 13 vs 109 ± 8 %) (**Figura 31 A**).

La fosforilación de β -catenina en el residuo Ser⁵⁵² promueve la translocación nuclear de la misma, por lo que a continuación, se evaluó la localización de dicha catenina mediante inmunofluorescencia, utilizando el anticuerpo que reconoce ambas isoformas. En este experimento, se confirmó que la sobre-expresión de Gal-1 favorece la acumulación nuclear de β -catenina (**Figura 31 B**). Para cuantificar la colocalización de la fluorescencia de β -catenina y la de los núcleos teñidos con DAPI, se calculó el coeficiente de superposición según Manders (R) con el programa *Image-Pro*. En la **Figura 31 B** se detalla el valor R de algunas células a modo de ejemplo (R1=0,9; R2=0,36; R3=0,77; R4=0,89). Un valor R mayor a 0,6 fue considerado positivo, y luego se calculó el porcentaje de núcleos positivos para el coeficiente de superposición en cada campo. En las células HepG2-G2 se observó un número mayor de núcleos positivos respecto a las células control (59 ± 7 % respecto a 32 ± 12 %).

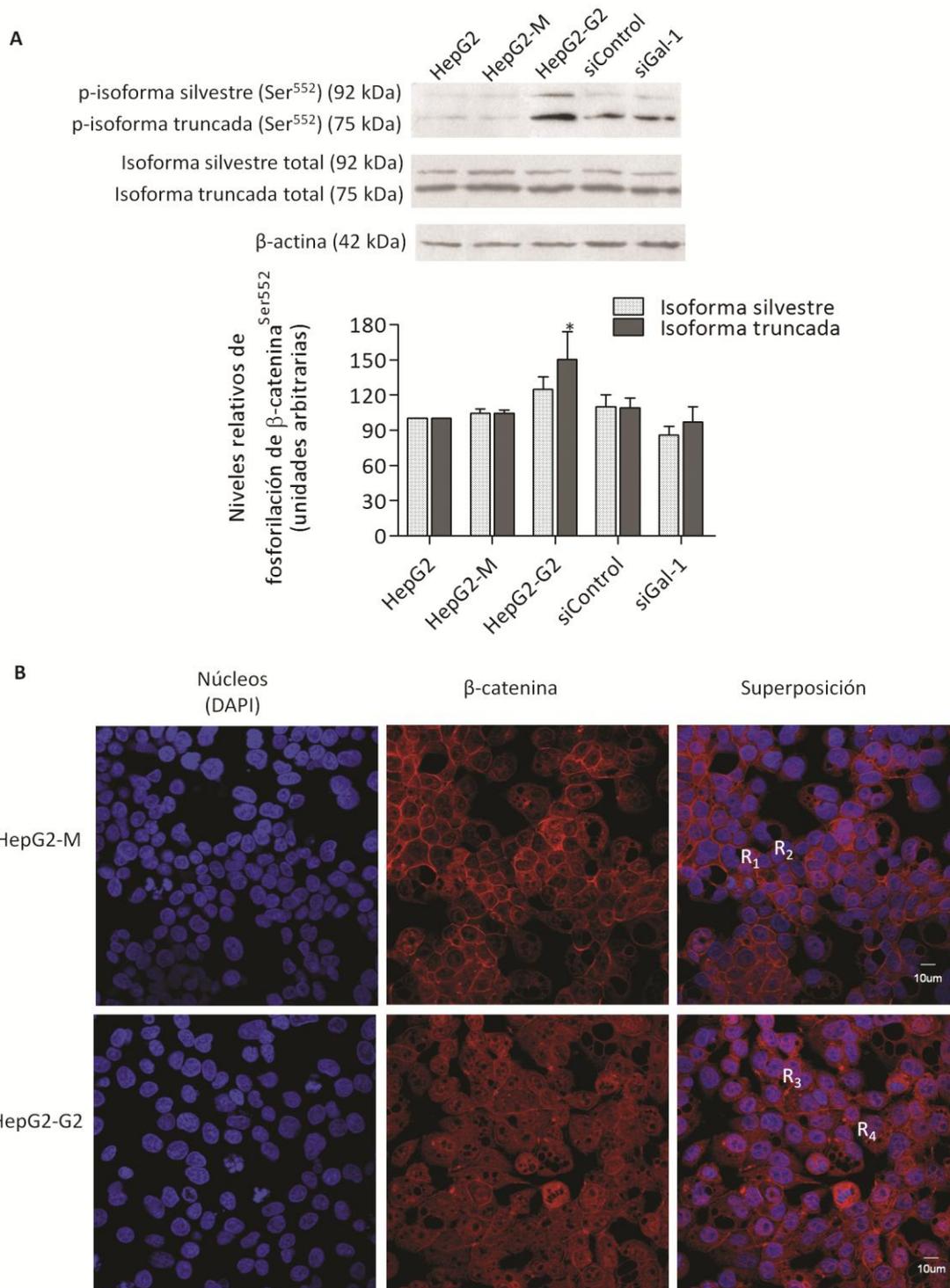


Figura 31. Gal-1 promueve la translocación nuclear de β -catenina. A) Las células se incubaron durante 24 h en ausencia de suero para estudiar la fosforilación de β -catenina en el residuo Ser⁵⁵² mediante *Western blot* (n=3). Control de carga, β -actina. *p<0,05 respecto HepG2-M (Test *t* de Student). **B)** La translocación de β -catenina al núcleo se visualizó por microscopía confocal utilizando el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a Alexa-546 (640x). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Las fotografías son representativas de tres experimentos. R indica el coeficiente de superposición según Manders. Como ejemplos R₁=0,9, R₂=0,36, R₃=0,77, R₄=0,89.

5.2 El incremento de la expresión de Gal-1 en las células HepG2 induce la actividad transcripcional de la vía WNT/ β -catenina

En las células HepG2-G2 se observó una mayor localización nuclear de β -catenina, sugiriendo que existiría una mayor actividad transcripcional de la vía. Para confirmarlo, se evaluó la actividad transcripcional de TCF/LEF mediante un ensayo con genes reporteros. Las células HepG2-M y HepG2-G2 se transfectaron de manera transiente con el plásmido TOP-Flash, que posee el gen reportero de la enzima luciferasa, bajo el control de un promotor que posee los sitios de unión a TCF. Como control se utilizó el plásmido FOP-Flash el cual posee los sitios de unión a TCF mutados. Además, como control de eficiencia de la transfección, las células se co-transfectaron con el plásmido de expresión de β -galactosidasa. Luego de 24 h se determinó la actividad de luciferasa relativa a la actividad de β -galactosidasa. En las células transfectadas con el plásmido TOP-Flash, se observó un aumento en la actividad de luciferasa en las células HepG2-G2 respecto al control (2,3 veces). Como se esperaba, luego de la transfección con el plásmido FOP-Flash, no se detectó actividad de luciferasa en las células HepG2-M ni en las HepG2-G2 (**Figura 32**).

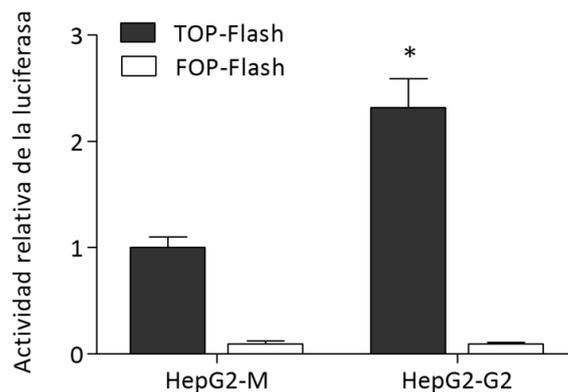


Figura 32. Gal-1 induce la activación transcripcional de la vía WNT/ β -catenina. Las células HepG2 y HepG2-G2 se transfectaron con los plásmidos reporteros TOP-Flash o FOP-Flash y el plásmido codificante para β -galactosidasa (control interno de eficiencia de transfección) por 24 h. Las células transfectadas se lisaron y se determinó la actividad de luciferasa y de β -galactosidasa. La actividad de luciferasa se normalizada con el control interno. Los datos representan la media \pm ES , a partir de tres experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$ respecto HepG2-M (Test t de Student).

5.3 La sobre-expresión de Gal-1 en las células HepG2 incrementa los niveles de proteínas blanco de la vía WNT/ β -catenina

Dado que previamente se había confirmado que la sobre-expresión de Gal-1 inducía la actividad transcripcional de la vía WNT/ β -catenina, el siguiente experimento se realizó para investigar si efectivamente ocurría una mayor expresión de las proteínas blanco de la vía. Mediante *Western blot* se analizó la expresión de ciclina D1 y c-MYC. En las células HepG2-G2 se detectaron mayores niveles de expresión de las proteínas ciclina D1 (129 ± 7 %) y c-MYC (139 ± 9 %) respecto a las células HepG2-M (**Figura 33 A y B**). Por otro lado, la disminución de la expresión de Gal-1 en las células HepG2 no produjo una disminución significativa de la expresión de las proteínas ciclina D1 (91 ± 9 %) y c-MYC (90 ± 16 %).

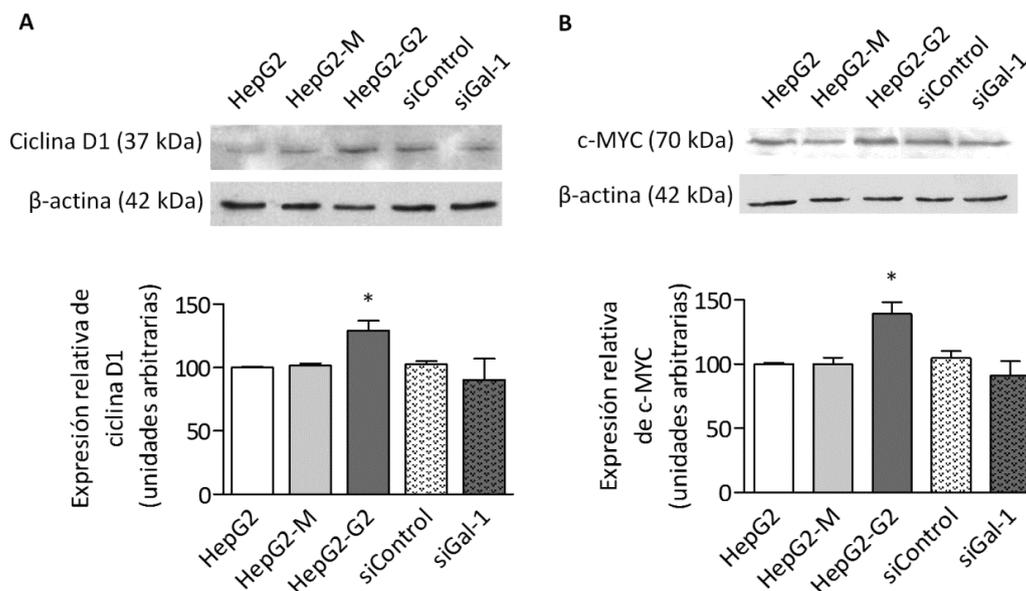


Figura 33. La sobre-expresión de Gal-1 incrementa los niveles de las proteínas blanco de la vía WNT/ β -catenina. *Western blot* y análisis densitométrico correspondiente para las proteínas ciclina D1 (**A**) y c-MYC (**B**) (n=3). Control de carga, β -actina. * $p < 0,05$ respecto HepG2-M (Test *t* de Student).

Estos resultados demuestran que un aumento en la expresión de Gal-1 en las células HeG2 favorece la translocación nuclear de β -catenina, lo que conduce a un incremento de la actividad transcripcional de TCF y a un aumento en la expresión de las proteínas blanco ciclina D1 y c-MYC, sugiriendo una hiperactivación de la vía de señalización WNT/ β -catenina.

Capítulo 6. Prohibitina-1: un novedoso ligando de Gal-1 en el CHC

Se han descrito diversos ligandos de Gal-1 en una gran variedad de tejidos, entre éstos se encuentran ligandos presentes en la MEC, en la superficie celular, y también ligandos intracelulares [54, 272]. Sin embargo, hasta el momento no se han descrito ligandos de Gal-1 en el hígado. Previamente, demostramos que Gal-1 a nivel extracelular es capaz de modular la adhesión y polarización celular, mientras que la transición epitelio-mesenquimal sólo se induce si Gal-1 es sobre-expresada en el interior de la célula. Dado que estos efectos podrían estar mediados a través de la interacción de Gal-1 con su/s ligando/s, nos propusimos determinar la existencia e identidad de los mismos en las células de CHC.

Para ello, se obtuvieron extractos de proteínas totales a partir de las células HepG2 y HuH-7, mediante sonicación. Estos extractos se sometieron a cromatografía de afinidad utilizando una matriz (Affi-Gel 15) en la que se inmovilizó rGal-1. Entonces, las proteínas retenidas en esta matriz corresponderían a aquellas que interactúan con Gal-1. La elución se realizó en presencia de lactosa (100 mM) ya que este azúcar compite con el DRC de Gal-1 y desplaza las proteínas adsorbidas. Luego, las fracciones eluidas se colectaron y las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE. Las bandas visualizadas mediante la tinción con *Coomasie* se escindieron del gel, y se efectuó la digestión proteolítica de las mismas con tripsina. Los péptidos resultantes se extrajeron y se analizaron por espectrometría de masa en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Proteínas y Espectrometría de Masa (LANAIS-PROEM). Paralelamente, se procesó un fragmento del gel sin proteína como blanco, y una banda

correspondiente a BSA que se sembró en el gel para utilizarlo como control interno de la técnica de digestión.

A partir de los extractos proteicos de las células HuH-7, se visualizaron dos bandas correspondientes a 45 y 30 kDa, las cuales se escindieron y procesaron. Las proteínas se identificaron de acuerdo a las búsquedas y comparación de perfiles de masas con el programa *MS/MS ion search* de MASCOT con restricción taxonómica. En cambio, a partir de las células HepG2 los extractos obtenidos, luego de varios experimentos, no rindieron suficiente cantidad de proteína y por ello, las bandas obtenidas en los SDS-PAGE no permitieron la identificación de ningún ligando.

De esta manera, se logró identificar a las proteínas **actina** (42 kDa) y **prohibitina-1 (PHB1)** (30 kDa). En el caso de actina se obtuvo un porcentaje de cobertura del 38 %; en la **Figura 34** se muestra su secuencia de aminoácidos, con los péptidos obtenidos resaltados en rojo. En el caso de PHB1, el porcentaje de cobertura fue del 12 %, y se también se muestra su secuencia de aminoácidos con los péptidos identificados en rojo en la **Figura 35**.

```

1  LVVDNGSGMC  KAGFAGDDAP  RAVFPSIVGR  PRHQGVMVGM  GQKDSYVGDE
51  AQSKRGILTL  KYPIEHGIVT  NWDDMEKIWH  HTFYNELRVA  PEEHPVLLTE
101 APLNPKANRE  KMTQIMFETF  NTPAMYVAIQ  AVLSLYASGR  TTGIVMDSGD
151 GVTHTVPIYE  GYALPHAILR  LDLAGRDLTD  YLMKILTERG  YSFTTTAERE
201  IVRDIKEKLC  YVALDFEQEM  ATAASSSSLE  KSYELPDGQV  ITIGNERFRC
251  PEALFQPSFL  GMESCGIHET  TFNSIMKCDV  DIRKDLYANT  VLSGGTTMYP
301 GIADRMQKEI  TALAPSTMKI  KIIAPPERKY  SVWIGGSILA  SLSTFQQMWI
351  SKQEYDESGP  SIVHRKCF

```

Figura 34. Secuencia de aminoácidos de la proteína β -actina. El análisis se realizó con el programa *MS/MS ion search* de MASCOT con restricción taxonómica. Estos estudios se realizaron en el LANAIS PROEM. En rojo se resaltan los péptidos obtenidos por digestión triptica.

```

1  MAAKVFESIG  KFGLALAVAG  GVNSALYNV  DAGHRAVIFD  RFRGVQDIVV
51  GEGTHFLIPW  VQKPIIFDCR  SRPRNVPVIT  GSKDLQNVNI  TLRILFRPVA
101 SQLPRIFTSI  GEDYDERVLP  SITTEILKSV  VARFDAGELI  TQRELVSRQV
151  SDDLTERAAT  FGLILDDVSL  THLTFGKEFT  EAVEAKQVAQ  QEAERARFVV
201  EKAEQQKAA  IISAEGDSKA  AELIANSLAT  AGDGLIELRK  LEAAEDIAVQ
251  LSRSRNITYL  PAGQSVLLQL  PQ

```

Figura 35. Secuencia de aminoácidos de la proteína PHB1. El análisis se realizó con el programa *MS/MS ion search* de MASCOT con restricción taxonómica. Estos estudios se realizaron en el LANAIS PROEM. En rojo se resaltan los péptidos obtenidos por digestión triptica.

Luego, se confirmó la expresión de PHB1 en las células de CHC mediante *Western blot* e inmunofluorescencia como se muestra a continuación en la **Figura 36**. Se observó que tanto las células HuH-7 como las HepG2 expresan PHB1.

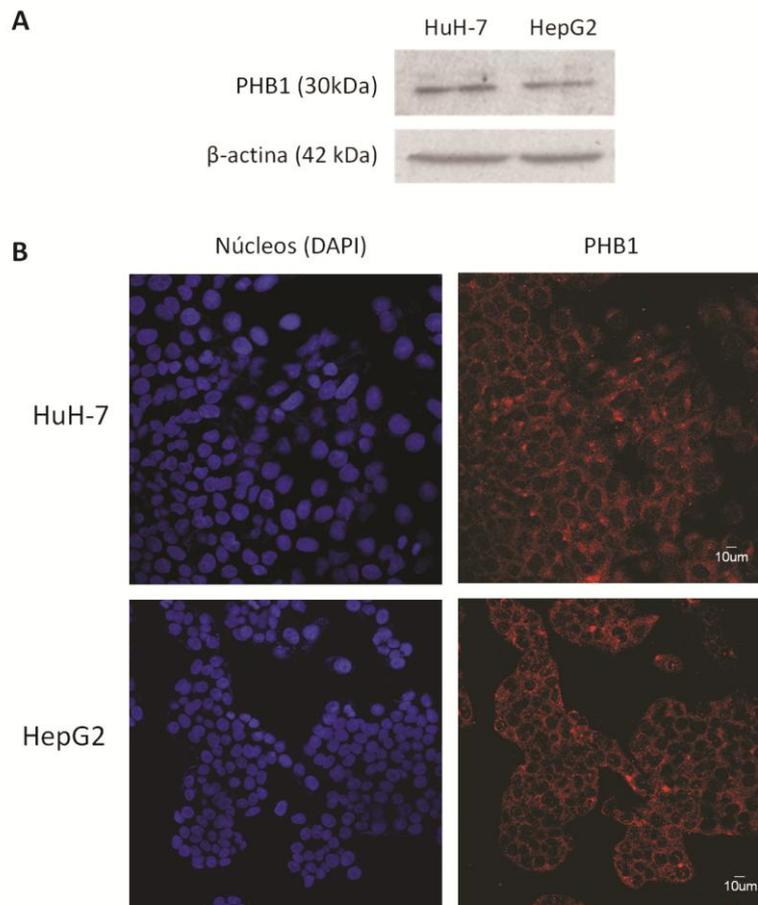


Figura 36. Expresión de PHB1 en células de CHC. A) Las células HepG2 y HuH-7 se cultivaron durante 72 h hasta obtener monocapas confluentes. Luego se lisaron y se analizó la expresión de PHB1 mediante *Western blot*. **B)** Inmunofluorescencia de PHB1 utilizando el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a Cy3. Los núcleos se tiñeron con DAPI y se observó en microscopio confocal (400x).

β -actina ya había sido descrita como un ligando de Gal-1 en cerebro [273], plaquetas [274, 275] y células de linfoma linfoblástico precursor de las células T [276]. **Prohibitina es una proteína que modula varios aspectos de la fisiología tumoral, y se sugirió que podría actuar como supresora de tumores en el hígado [277]. Es importante destacar que nunca había sido descrita como ligando de Gal-1 ni de otro miembro de la familia de las galectinas en ningún tejido.**

DISCUSIÓN

El carcinoma hepatocelular representa la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo y, a pesar de que el tratamiento ha evolucionado durante la última década, su incidencia todavía se equipara con el índice de mortalidad, lo que refleja su mal pronóstico [14, 278]. Por lo que resulta de crucial importancia explorar los mecanismos que subyacen a la diseminación de las células del CHC para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

Gal-1 contribuye a la progresión tumoral modulando la inmunidad tumoral, la angiogénesis, la migración de las células tumorales y la metástasis [120]. Existen vastas evidencias indicando que la expresión de Gal-1 está incrementada en las células de CHC, y sus niveles de expresión se han correlacionado con la presencia de metástasis, tamaño tumoral, invasión vascular y recurrencia temprana en pacientes de CHC [118, 132]. Sin embargo, pocos estudios describen cuál es el rol preciso de esta lectina en la fisiopatología del hígado. El objetivo de este trabajo de Tesis fue estudiar la contribución de Gal-1 en la diseminación de las células de CHC, en particular en la transición epitelio-mesénquima, utilizando como modelo a las células HepG2.

Hoshida y col. identificaron tres subclases de CHC, las cuales se correlacionan con las características histológicas, moleculares y clínicas de los pacientes [32]. Los tumores S1 presentan una aberrante activación de la vía WNT y se asocian a un fenotipo invasivo. Los de la subclase S2 poseen alta tasa de proliferación y activación de MYC y AKT. En cambio, los tumores S3 tienen características de hepatocitos diferenciados y se asocian a una buena sobrevida [32]. Las células HepG2 retienen características epiteliales y expresan niveles bajos de Gal-1 en comparación con otras líneas de CHC, por lo que representarían el estadio S3. Nuestro estudio, basado en la

sobre-expresión de Gal-1 en las células HepG2, pretendió simular el escenario que ocurre durante la progresión tumoral, hacia un estadio S2 o S1.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el aumento en los niveles de expresión de Gal-1 en las células HepG2 conduce a un cambio de su morfología epitelial polarizada hacia un fenotipo fibroblastoide; a un incremento en la expresión del marcador mesenquimal vimentina y del factor de transcripción SNAIL1; a una disminución en la expresión de las proteínas de las uniones intercelulares E-cadherina y ZO-1; y a la hiperactivación de la vía de señalización WNT/ β -catenina. Durante la TEM, disminuyen los contactos célula-célula y se facilitan las interacciones con la MEC. Además, se demostró que Gal-1 modula la adhesión de las células de CHC y que las células que sobre-expresan Gal-1 poseen una mayor capacidad de crecer de manera independiente de anclaje, es decir, son resistentes a la anoikis.

La regulación de la adhesión de células tumorales es considerada como un evento crucial en el desarrollo y progresión tumoral. Por ello, en primer lugar, se investigó la participación de Gal-1 como una proteína moduladora del proceso de adhesión de células de CHC. Se demostró que Gal-1 puede regular la adhesión, positiva o negativamente, dependiendo del tipo celular y de su concentración relativa [80]. Dado que Gal-1 es secretada por varios tipos celulares y como además, se ha descrito su acumulación en el estroma tumoral, en primer lugar se estudió la adhesión de las células de CHC en presencia de rGal-1. Las concentraciones de rGal-1 que mostraron efectos sobre la adhesión de las células de CHC se encontraron dentro del rango 3,5-14 μ M, en concordancia con las reportadas en experimentos similares utilizando células de carcinoma de ovario [116] y de melanoma [115].

La capacidad de Gal-1 de aumentar la adhesión de células tumorales a la MEC ha sido extensamente documentada. En este trabajo, se demostró que rGal-1 potencia la adhesión de las células de CHC, HuH-7 y HepG2, a laminina, una glicoproteína de la MEC y de las membranas basales. Laminina es una glicoproteína, rica en unidades de polilactosamina. Es decir que, probablemente rGal-1 promueva la adhesión actuando como puente entre receptores de la superficie celular y la laminina. Además, dado que se describió que Gal-1 secretada por las células puede permanecer retenida en la MEC [279], en este trabajo se realizaron ensayos de adhesión utilizando a Gal-1 como sustrato, es decir, actuando como una proteína de la MEC (rGal-1 inmovilizada). En esta situación, rGal-1 produjo un aumento de la adhesión, tanto de las células HepG2 como de las células HuH-7. Evidentemente, rGal-1 inmovilizada se presenta a la célula en un arreglo bidimensional que favorece la adhesión. Entonces, Gal-1 retenida en la MEC facilitaría su interacción con los glicoconjugados de la superficie celular. En general, los datos bibliográficos describen que rGal-1 inmovilizada promueve la adhesión celular; sin embargo, aquellos experimentos en los que se utilizó rGal-1 soluble muestran resultados contradictorios [80]. En este trabajo, se observó algo similar: cuando las células se adhirieron a pocillos sin recubrir en presencia de rGal-1 soluble, se observó un aumento en la adhesión de las células HepG2 pero una disminución en la adhesión de las células HuH-7, siendo ambos efectos dependientes de interacciones lectina-carbohidrato. En primera instancia, se podría plantear que las diferencias observadas podrían deberse a la presencia de distintas moléculas de adhesión en la superficie de los dos tipos celulares, a la distinta distribución y/o abundancia de las mismas. Por ejemplo, las células HuH-7 expresan una mayor cantidad de integrinas β_1 , α_5 y α_6 , y menores niveles de α_2 respecto a las HepG2 [280].

Además, tal como se describió en la sección de *Resultados* (Capítulo 2), las células HepG2 y HuH-7 poseen un patrón de expresión de Gal-1 diferencial: en las células HepG2 la mayor parte de la proteína expresada permanece en el interior celular, mientras que en las células HuH-7 la mayor parte se secreta al medio extracelular. De manera que al agregar rGal-1 en forma soluble a los cultivos de células HuH-7, se podría estar generando un exceso de dicha glectina en el compartimento extracelular. Se podría suponer entonces que, Gal-1 secretada por las células HuH-7 permanecería unida a las membranas, por ejemplo, formando complejos con determinadas subunidades de las integrinas y, al agregar rGal-1 exógena, se podrían estar alterando estos complejos, resultando en una disminución de la adhesión. El exceso de Gal-1 podría entonces generar un impedimento estérico enmascarando los sitios de unión o proteínas involucradas en la adhesión celular, o bien la proteína recombinante podría competir con la nativa por dichos sitios, retrasando la adhesión celular (**Figura 37**). Se ha descrito una situación similar con Gal-8 en otros tipos celulares: en presencia de un exceso de Gal-8 soluble, se manifiesta una acción anti-adhesiva mediada por su interacción selectiva con algunas integrinas (α_3 , α_6 y β_1) [281], mientras que si la lectina se encuentra inmovilizada actúa como un constituyente de la matriz extracelular con una función pro-adhesiva, favoreciendo los re-arreglos del citoesqueleto para la extensión o esparcimiento celular [282].

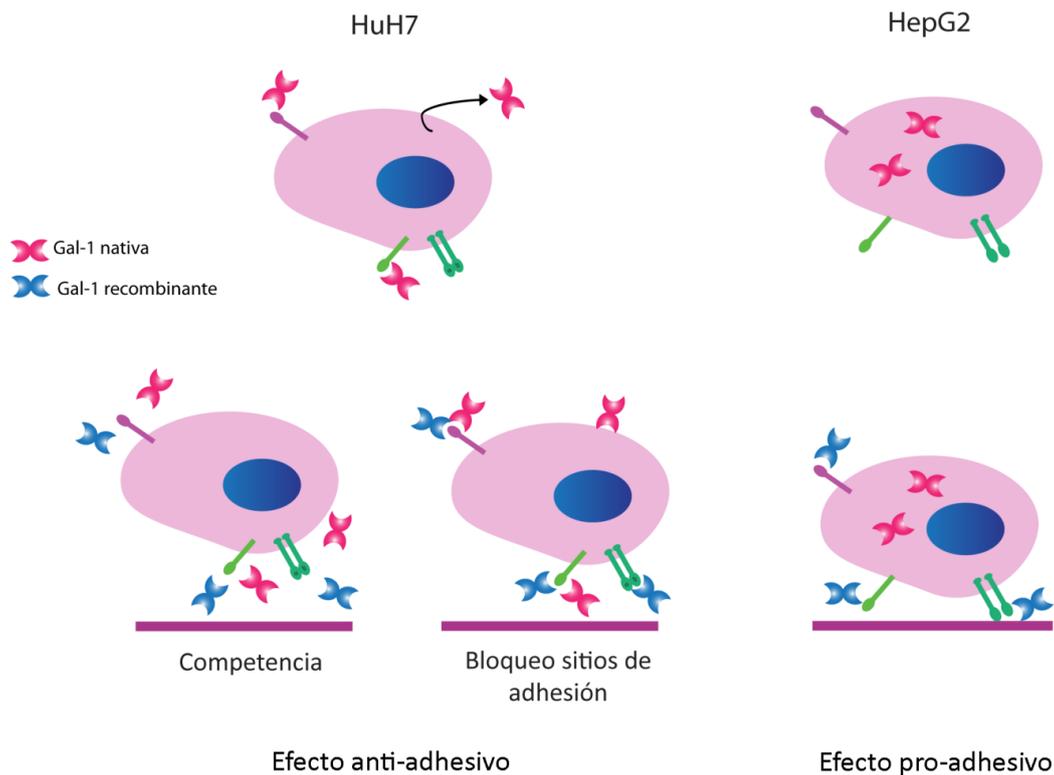


Figura 37. Efecto de rGal-1 soluble sobre la adhesión de las células HepG2 y HuH-7. Gal-1 presente en el medio extracelular puede unirse a moléculas de la superficie celular promoviendo la adhesión. Las células HuH-7 secretan gran parte de la lectina expresada. Al agregar rGal-1 se podría generar un exceso de Gal-1 soluble que inhibe la adhesión, ya sea por competencia o enmascarando los sitios necesarios para la adhesión.

Por otro lado, se observó un efecto pro-adhesivo en las células HepG2 que sobre-expresan Gal-1, el cual se inhibió en presencia de TDG. Dicho efecto probablemente esté mediado por las abundantes cantidades de Gal-1 que son secretadas hacia el medio extracelular por estas células. En cambio, la disminución de los niveles de expresión de Gal-1 no provocó cambios significativos en la adhesión, lo cual es razonable, ya que Gal-1 no es la única proteína involucrada en la regulación de dicho proceso. De hecho, rGal-3 que también se encuentra sobre-expresada en el CHC, fue capaz de aumentar la adhesión celular. De manera que una desregulación en la expresión de Gal-1 en los hepatocitos diferenciados, que conduzca a aumentar sus

niveles, impactaría promoviendo la adhesión a las proteínas de la MEC favoreciendo el fenotipo agresivo.

Es interesante señalar que las vías de señalización de PI3K y/o MAPK ERK1/2 están involucradas en la adhesión de las células HepG2 mediada por Gal-1. De manera similar, Gal-1 induce la adhesión, por ejemplo, de las células de cáncer de colon Colo201 a la matriz de manera dependiente de PI3K y/o ERK1/2 [114]. El hecho de que se activen ciertas vías de señalización indica que Gal-1 no sólo actúa como un puente para regular la adhesión, sino que mediante la unión a gliconjugados de superficie envía señales al interior celular.

El desarrollo de la polaridad apico-basal es crítica para la función de los hepatocitos. Sus membranas plasmáticas se separan a través de uniones estrechas en los dominios sinusoidal (basolateral) y canalicular (apical), los cuales contienen diferentes proteínas y lípidos. La expresión de las galectinas está regulada temporal y espacialmente durante la morfogénesis de tejidos, en particular en epitelios polarizados [283]. Si bien habían sido descritos efectos de otros miembros de la familia de las galectinas, como por ejemplo, los efectos de Gal-3, -4 y -9 sobre el tráfico intracelular y la polarización de membranas de células epiteliales de intestino y riñón; el efecto de Gal-1 sobre la polarización epitelial permanecía desconocido [252, 284].

Las células HepG2 son un modelo utilizado para estudiar el desarrollo de la polaridad celular. El cultivo de dichas células en presencia de rGal-1, pero no de rGal-3, aceleró el proceso de polarización de manera dependiente de glicanos. De modo importante, este efecto fue secundario al efecto pro-adhesivo inducido por Gal-1. La

adhesión celular es considerada como un pre-requisito en el establecimiento de la polaridad, y un evento importante en la diferenciación hepática, ya que a través de la unión de las integrinas a los componentes de la MEC se desencadena su señalización [1, 285]. Es importante mencionar que resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que Gal-1 modula la adhesión en forma dependiente de las integrinas α_1 , α_2 , α_3 , α_v y β_1 [130], y que además, regularía la expresión y maduración de la integrina β_1 (Carabias P, Tesis Doctoral en curso). Es decir que Gal-1 mediante su unión a los glicanos presentes en las integrinas podría enviar señales al interior de las células, modulando la adhesión, y como consecuencia también la polarización celular. Sin embargo, no puede descartarse que Gal-1 pueda ser internalizada, a través de un mecanismo dependiente de receptores, como ha sido demostrado para otros tipos celulares [106, 286].

La adquisición de polaridad es un programa complejo que resulta de un conjunto de vías de señalización que se activan en forma secuencial. Se han identificado algunas moléculas claves caracterizadas por su rol en la polarización hepática, como el factor nuclear hepático 4 α (HFN-4 α , por sus siglas en el idioma inglés), que regula la expresión de genes asociados con la función hepática; la oncostatina M que regula la maduración hepática a través de la activación de los factores de transcripción HFN-4 α , STAT3, y de las proteínas K-RAS y PKA; y los ácidos biliares, tales como taurocólico, ursodesoxicólico, y tauroursodesoxicólico, que estimulan los procesos de polarización y secreción canalicular (revisado en [1]). En hepatocitos de rata, el ácido biliar tauroursodesoxicólico, a través del sistema integrinas/FAK/Src/PI3K activa las vías de señalización de las MAPK ERK1/2 y p38 [287].

Además, el ácido ursodesoxicólico acelera la formación y extensión de los canalículos activando las vías de señalización MAPK y PKC- δ [288]. Por otro lado, PKA juega un rol crucial y regula el establecimiento y mantenimiento de los canalículos biliares en respuesta a señales intracelulares o extracelulares [255, 289, 290]. Notablemente, rGal-1 aceleró el proceso de polarización en las células HepG2 modulando las vías de señalización de las proteínas PI3K, MAPK y PKA.

Entonces, rGal-1 acelera la adhesión y polarización de las células HepG2 con la participación de las vías de señalización PI3K, MAPK y PKA. Notablemente, el tratamiento con rGal-1 indujo la fosforilación de ERK1/2, mientras que no se detectó fosforilación de AKT en las condiciones ensayadas. La activación de ERK1/2 mediada por Gal-1 ha sido ampliamente documentada en distintos tipos celulares (revisado en [291, 292]). En células estrelladas pancreáticas y hepáticas, rGal-1 induce la fosforilación de MEK y ERK1/2, pero no la de AKT [293, 294]. Los efectos de los ácidos biliares taurocólico y tauroursodesoxicólico sobre la polarización son mediados por la proteína PI3K, independientemente de AKT, involucrando las vías mediadas por PKC- δ y MEK/ERK1/2 [11, 287, 295].

La pérdida de la polaridad apico-basal es una característica que contribuye al desarrollo del fenotipo invasivo de los tumores de células epiteliales. En este trabajo, se demostró que la pérdida de la polaridad apico-basal en las células HepG2 está asociada con la sobre-expresión de Gal-1, sin alterar la localización de las proteínas canaliculares MDR1 y MRP2. El grupo de Théard y col. demostró que la introducción de una mutación en la línea celular HepG2, que impide la formación de las uniones adherentes, produjo una disminución en la formación de los canalículos, sin alterar

tampoco la correcta localización de las de dichas proteínas canaliculares [296]. Por otro lado, el tratamiento de las células HepG2 con el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), un inductor de la angiogénesis presente en los microambientes tumorales, produjo una disrupción de las uniones estrechas y consecuentemente una disminución en el número de canalículos, involucrando la activación de la proteína PKC- α [297]. De modo interesante, en el presente trabajo también se observó una disminución de la expresión de la proteína de las uniones estrechas, ZO-1, en relación a la sobre-expresión de Gal-1. Además, la expresión de Crumbs3, una proteína transmembrana esencial en la generación de las uniones estrechas y de la membrana apical y, se encuentra reprimida a nivel transcripcional y post-traducciona por SNAIL en las células MDCK [298]. Estas evidencias sugieren que ante un evento molecular que llevara a la sobre-expresión de Gal-1, esta galectina podría, a través del incremento en los niveles de SNAIL, reprimir la expresión de Crumbs3, lo que conduciría a la pérdida de la polaridad apico-basal de los hepatocitos tumorales.

La regulación de los transportadores hepáticos ocurre a “largo plazo”, a nivel de la transcripción, o a “corto-plazo” a nivel de disponibilidad de sustrato, modificaciones post-traduccionales y mecanismos de inserción y reciclado [13]. La sobre-expresión de Gal-1 en las células HepG2 condujo a un aumento en la expresión de MDR1 y a una disminución de MRP2. En línea con estos resultados, en pacientes con daño hepático (cirrosis biliar, hepatitis crónica por infección con el virus de la Hepatitis C, necrosis celular masiva) se detectó una mayor expresión de MDR1, MRP1 y MRP3 respecto al hígado normal, tanto a nivel de los ARNm como de las proteínas [299], mientras que la

expresión de la proteína MRP2 se encontró disminuida, sin detectar cambios en el ARNm [300-302]. MDR1 tiene un rol central en el desarrollo de la resistencia a multidrogas en células tumorales [303]. De modo interesante, el carcinógeno 2-acetilaminofluoreno indujo la expresión de MDR1 en las células HepG2 a través de la vía de señalización PI3K/AKT/NFκB [304]. Además, un clon de células HepG2 resistente a multidrogas (HepG2-R) mostró una supresión de la expresión de E-cadherina, por hipermetilación del promotor (*CDH1*); y al re-expresar esta cadherina, las células HepG2-R revirtieron su fenotipo resistente: disminuyeron los niveles de expresión de MDR1 y aumentaron su sensibilidad a la muerte por apoptosis inducida por doxorubicina [305]. La participación de Gal-1 en la quimio-resistencia ha sido descrita para células de carcinoma de ovario, cervical, de pulmón y en gliomas [306-309], por lo que nuestros resultados plantean un nuevo interrogante que será interesante contestar en el futuro *¿juega Gal-1 un papel importante en la quimio-resistencia del CHC?*

Como se mencionó anteriormente, en este trabajo se demostró una correlación positiva entre los niveles de expresión de Gal-1 y SNAIL1. La expresión de SNAIL1 o de TWIST1 se asocia con menor supervivencia de los pacientes de CHC, y la expresión simultánea de dichos factores tiene un efecto aditivo sobre la represión transcripcional de E-cadherina, sugiriendo que estos factores de transcripción desempeñan roles distintos pero cooperativos, durante la progresión del tumor [226]. En otro estudio, la expresión de TWIST1 se asoció con la angiogénesis y metástasis del CHC, pero no con la disminución de E-cadherina [310]. En concordancia, Sugimachi y col. sugirieron que

SNAIL1 es el principal factor asociado a la represión de E-cadherina en tumores de CHC [231]. Además, la expresión de SNAIL1 en tumores de CHC se asoció con la invasión de la vena porta y la presencia de metástasis intrahepática [230].

También se observó una disminución de la expresión de E-cadherina y de la isoforma silvestre de β -catenina en las células HepG2 que sobre-expresan Gal-1. La expresión reducida del complejo E-cadherina y cateninas α , β y γ se observa frecuentemente en muestras de pacientes con CHC [227]. Además, la pérdida de E-cadherina ha demostrado jugar un rol causal en la adquisición de la resistencia a anoikis [179]; y a través de este mecanismo la pérdida de E-cadherina promueve la metástasis [180]. Resulta importante remarcar también que alteraciones en el gen de β -catenina (*CTNBB1*) que conducen a la activación de la vía WNT/ β -catenina, tales como la presente en las células HepG2, son frecuentemente seleccionadas durante la hepatocarcinogenesis [232]. Estas mutaciones junto con niveles de expresión elevados de Gal-1, ya sea por modificaciones epigenéticas o por señales del microambiente tumoral, podrían resultar en el desarrollo de fenotipos más agresivos.

La sobre-expresión de Gal-1 condujo a la activación constitutiva de AKT y además, se detectaron mayores niveles de fosforilación de β -catenina en el residuo Ser⁵⁵², la translocación nuclear de β -catenina, mayor actividad transcripcional de TCF y un incremento en la expresión de ciclina D1 y c-MYC, sugiriendo la hiperactivación de la vía WNT/ β -catenina. En línea con estos resultados, la infección de hepatocitos de rata con el virus de la Hepatitis C induce la TEM a través de la activación de AKT y subsecuentemente, la fosforilación de β -catenina^{Ser552} [311]. Además, en una línea de

carcinoma oral de células escamosas la activación constitutiva de AKT indujo el proceso de TEM, caracterizado por una disminución de E-cadherina y β -catenina [210].

Apoyando la interacción entre las galectinas y las cadherinas, se reportó que el silenciamiento de la expresión de Gal-1 en células de glioblastoma U87 produce un aumento en la expresión cadherina 6 [312]. Además, Gal-3 es capaz de unirse directamente a β -catenina y al complejo TCF/LEF induciendo la transcripción de genes blanco de la vía WNT [313]. Por otro lado, la cadherina no clásica, protocadherina-24, al ser expresada en células de carcinoma de colon, ancla a Gal-1 y Gal-3 a la membrana plasmática resultando en la inactivación de la PI3K y la supresión de la señalización de β -catenina [314]. Además, en células de carcinoma de pulmón, los niveles de expresión de Gal-1 se asociaron con la migración, invasión y expresión de marcadores de la TEM (disminución de E-cadherina, claudina-3 y ZO-1, y aumento de α -SMA y fibronectina) promoviendo la activación de AKT mediado por la señalización a través de las integrinas $\alpha_6\beta_4$, y Notch/Jagged2 [315]. Colectivamente, éstos y nuestros resultados demuestran una fuerte relación entre las galectinas, cadherinas y la vía de señalización WNT/ β -catenina durante la progresión tumoral.

Actuando a nivel extracelular, Gal-1 puede modular la adhesión celular, el crecimiento tumoral, la migración, la angiogénesis, el escape tumoral del sistema inmune y la metástasis [80, 120]. Sin embargo, Gal-1 también puede inducir la transformación tumoral actuando intracelularmente a través de la unión a H-RAS mediando su anclaje a la membrana [79]. En este trabajo, se demostró que Gal-1 modula la adhesión tanto al ser sobre-expresada por las células como al ser agregada en forma exógena, mientras que la pérdida de polarización apico-basal y la

disminución de la expresión de E-cadherina se observaron únicamente cuando la lectina fue sobre-expresada por las células. Por lo tanto, Gal-1 extracelular (ya sea la proteína recombinante o la secretada por las células HepG2-G2) podría estar involucrada en procesos como la adhesión celular, sin embargo, no es relevante para la disminución de expresión de E-cadherina. Por lo que elevados niveles de expresión de Gal-1 a nivel intracelular son responsables de la disminución de la expresión de E-cadherina en las células HepG2 involucrando la vía de señalización PI3K/AKT. De modo interesante, si bien a nivel extracelular Gal-1 no indujo la fosforilación de AKT, si lo hizo a nivel intracelular. Estas diferencias podrían deberse a la activación de dos poblaciones de PI3K, una de ellas estaría asociada a RTK o a integrinas, a los cuales se uniría Gal-1 extracelular conduciendo a su activación; mientras que la otra podría ubicarse en microdominios en las cercanías de PDK1 y AKT, siendo activado por Gal-1 intracelular. En línea con esta hipótesis, se demostró el papel clave de la compartimentación de microdominios de membrana en la señalización a través de la vía PI3K/AKT [316].

Recientemente, Chung y col. propusieron que Gal-1 a nivel intracelular, pero no desde el compartimento extracelular, promueve la progresión y quimio-resistencia de células de carcinoma de pulmón [306]. En los últimos años se han desarrollado varias estrategias terapéuticas para bloquear los efectos de Gal-1, como inhibidores que bloquean el DRC (revisado en [96]), y un anticuerpo bloqueante de Gal-1 que ha demostrado tener efectos beneficiosos *in vivo* [65]. Sin embargo, dichas estrategias están dirigidas contra Gal-1 a nivel extracelular, por lo que nuestros resultados resaltan

la importancia de dilucidar los mecanismos biológicos en los que participa Gal-1 en los distintos tipos tumorales con el fin de desarrollar una terapia efectiva.

La disminución de la expresión de Gal-1 en las células HepG2 no provocó cambios significativos en muchos de los experimentos realizados. Parecería ser que en estas células diferenciadas que presentan un nivel de expresión de Gal-1 relativamente bajo, es la sobre-expresión lo que causa efectos significativos. Entonces, en el futuro será interesante disminuir la expresión de esta galectina en células de CHC indiferenciadas, con fenotipos altamente invasivos, como por ejemplo la línea celular Mahlavu, para investigar si la reducción de los niveles de Gal-1 es capaz de revertir el fenotipo mesenquimal hacia uno epitelial, es decir, promover la TME.

En el presente trabajo se logró identificar un ligando novedoso de Gal-1 en las células de CHC, prohibitina-1 (PHB1). La PHB1 es una proteína conservada y ubicua con diversas funciones celulares. Existen evidencias de que la depleción específica de PHB1 en los hepatocitos conduce a un marcado daño hepático, estrés oxidativo, fibrosis y desarrollo de HCC en ratones [277], sugiriendo que PHB1 actuaría como una proteína supresora de tumores en el hígado. Sin embargo, también se le ha asignado un rol pro-tumorigénico. Esta dicotomía se debe a la heterogeneidad de los distintos tipos de tumores, los cuales manifiestan diversas alteraciones en sus vías de señalización, a las modificaciones post-traduccionales que sufre PHB1, así como también a su localización sub-celular [317]. Aparentemente, en la superficie celular promueve la quimio-resistencia, pero en la cara interna de la membrana plasmática contribuye a la

activación oncogénica de C-RAF. Por otro lado, se especula que su localización nuclear está relacionada con la actividad anti-tumorigénica.

PHB1 sufre varias modificaciones post-traduccionales, entre las que se encuentran la fosforilación, glicosilación, palmitoilación, transamidación y nitrosilación, las cuales modulan su actividad. Por ejemplo, se describió que PHB1 participa en la vía de señalización de RAS/RAF/MAPK. La heterodimerización de PHB1 (fosforilada en el residuo Thr²⁵⁸) con C-RAF es indispensable para la activación de C-RAF por RAS. La fosforilación en dicho residuo de PHB1 activa entonces las vías de señalización de PI3K/AKT y C-RAF/ERK, lo que promueve la proliferación y metástasis [318]. Es interesante mencionar que Gal-1 es capaz de unirse a H-RAS activada promoviendo su anclaje a membrana controlando así la duración de la señal de RAS [110]. Entonces, se podría plantear que Gal-1 interactúa con PHB1 favoreciendo su fosforilación y heterodimerización con C-RAF, y de esta manera, promovería su activación por RAS.

Por lo tanto, dado que PHB1 es un ligando de Gal-1 nunca antes descrito, aquí se abre una nueva línea de investigación, ya que resulta sumamente interesante estudiar las características y consecuencias funcionales de dicha interacción. Es así como nuevos interrogantes se plantean: *¿Existe una correlación entre la expresión de Gal-1 con la localización y/o expresión de PHB1? ¿Mediante su interacción con PHB1, puede Gal-1 modular las vías de señalización oncogénicas que promueven la diseminación del HCC?*

En conclusión, los resultados obtenidos permitirían plantear un modelo hipotético en el que la sobre-expresión de Gal-1 contribuiría al proceso de TEM en las células de CHC, favoreciendo la diseminación del tumor (Figura 38).

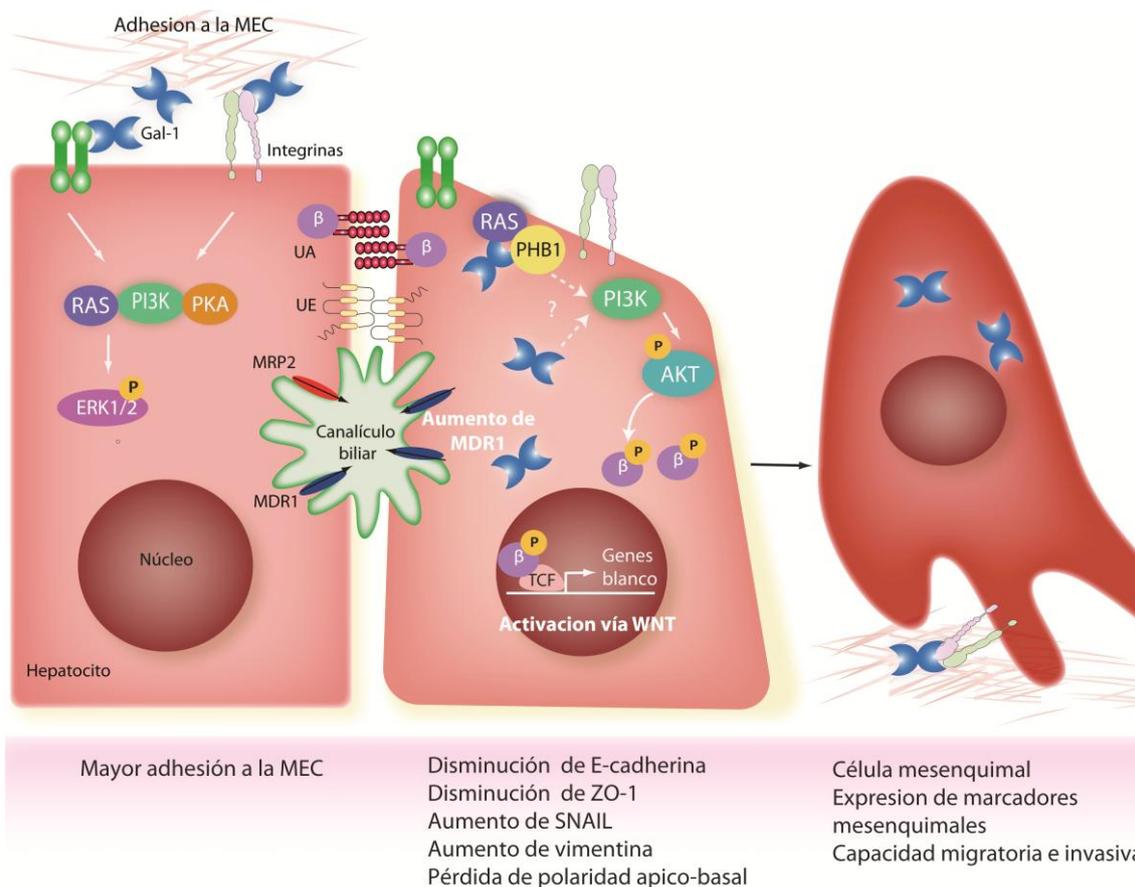


Figura 38. Modelo propuesto del mecanismo de inducción de TEM en células de CHC por Gal-1. Un aumento de la expresión de Gal-1 en las células de CHC activaría la vía de PI3K/AKT. La activación constitutiva de AKT conduciría a la adquisición de un fenotipo mesenquimal, al menos en parte, por la hiperactivación de la vía WNT: AKT fosforilaría a β-catenina^{Ser552} favoreciendo su translocación nuclear y la consecuente activación de la vía WNT, promoviendo la transcripción de los genes blanco, como ciclina D1 y c-MYC. Además, se activaría la transcripción de genes que llevan a la pérdida del fenotipo epitelial y a la adquisición del fenotipo mesenquimal. Entonces, el eje PI3K/AKT/WNT/β-catenina aumentaría los niveles de SNAIL1, lo cual reprimiría la expresión de E-cadherina, perdiéndose las uniones célula-célula. También, la sobre-expresión de Gal-1 conduciría a la pérdida de la polaridad apico-basal junto con la disminución de ZO-1 y aumentaría los niveles de vimentina. Por otro lado, niveles incrementados de Gal-1 actuando a nivel extracelular, favorecerían la adhesión de las células de CHC a la MEC contribuyendo a la migración a través de la misma. Aunque no demostrado en este trabajo, también se puede suponer que la interacción de Gal-1 con PHB1/RAS podría ser un mecanismo de activación de PI3K en estas células. UA, uniones adherentes; UE, uniones estrechas, β, β-catenina.

CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Conclusión

Los niveles de expresión de Gal-1 están incrementados en las células de CHC, y se correlacionan con la presencia de metástasis, tamaño tumoral, invasión vascular y recurrencia temprana en pacientes de CHC. Sin embargo, pocos estudios describen cuál es el rol preciso de esta lectina en la fisiopatología del hígado. El objetivo de este trabajo de Tesis fue estudiar la contribución de Gal-1 en la diseminación de las células de CHC, en particular en la transición epitelio-mesénquima, utilizando como modelo a las células HepG2.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el aumento en los niveles de expresión de Gal-1 en las células HepG2 conduce a un cambio de su morfología epitelial polarizada hacia un fenotipo fibroblastoide; a un incremento en la expresión del marcador mesenquimal vimentina y del factor de transcripción SNAIL1; a una disminución en la expresión de las proteínas de las uniones intercelulares E-cadherina y ZO-1; y a la hiperactivación de la vía de señalización WNT/ β -catenina. También se demostró que Gal-1 modula la adhesión de las células de CHC y que las células que sobre-expresan Gal-1 son resistentes a la anoikis.

En conclusión, estos resultados demuestran que Gal-1 está involucrada en el desarrollo de la TEM en las células de CHC, y aportan conocimientos hacia el entendimiento de las bases moleculares de la diseminación de este tumor. Además, señalan que Gal-1 podría ser un posible nuevo blanco terapéutico para restringir la progresión del CHC.

Perspectivas

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este Trabajo de Tesis constituyen sólo el inicio del camino hacia el entendimiento de los mecanismos moleculares en los que participa Gal-1 que conducen a la diseminación del CHC. Aún, muchas otras preguntas quedan sin responder; sin embargo, intentaremos responder algunas de ellas en el futuro en nuestro laboratorio, como por ejemplo:

¿Existe una correlación entre la expresión de Gal-1 con la localización y/o expresión de PHB1? ¿Mediante su interacción con PHB1, puede Gal-1 modular las vías de señalización oncogénicas que promueven la diseminación del HCC?

En este Trabajo de Tesis se logró identificar a PHB1 como un ligando de Gal-1 en el CHC. PHB1 posee múltiples funciones, dependiendo de la localización sub-celular y modificaciones post-traduccionales. Teniendo en cuenta que PHB1 participa en la activación de RAF-1 por RAS, y además, que Gal-1 interactúa con RAS, se planteó la hipótesis de que Gal-1, mediante su interacción con PHB1, podría modular las vías de señalización oncogénicas que promueven la diseminación del HCC. Esto abre una nueva línea de trabajo para evaluar la expresión y localización de PHB1 en células de CHC con distintos niveles de expresión de Gal-1; evaluar la interacción entre Gal-1 y PHB1 mediante co-inmunoprecipitación y co-localización, e investigar las implicancias funcionales de dicha interacción. Los resultados de dicha investigación representarían una interesante contribución al entendimiento de los mecanismos de acción de Gal-1.

¿Qué actores dentro del microambiente tumoral gatillan la sobre-expresión de Gal-1 durante los procesos pre-carcinogénicos en contextos de fibrosis e inflamación crónica?

Además del estado de metilación del promotor de *LGALS1* [56, 62], se han descrito algunos factores de transcripción implicados en la regulación de su expresión. Entre estos se encuentran HIF-1, en células de cáncer colorectal [63]; NFκB en células T [64] y en sarcoma de Kaposi [65], la proteína activadora 1 en linfoma de Hodgkin [66]. Por otro lado, TGF-β es una citoquina presente en el microambiente tumoral y es considerada un inductor de la TEM, especialmente en el CHC. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que el tratamiento de las células de CHC, HepG2 y HuH-7, con TGF-β induce la expresión de Gal-1 (Manzi M, Tesis Doctoral en curso), posicionando a dicho factor como una de las señales involucradas en el aumento de la expresión de Gal-1 dentro del microambiente tumoral.

¿Qué papel que juega Gal-1 dentro del microambiente del CHC?

Nuestros resultados demuestran que la sobre-expresión de Gal-1 en las células HepG2 favorece la adhesión de las mismas a las células endoteliales sinusoidales, SK-HEP-1. Además, Gal-1, secretada por los hepatocitos tumorales, es capaz de promover la proliferación y migración de las células SK-HEP-1, sugiriendo un posible rol de Gal-1 en la angiogénesis del CHC (Manzi M, Tesis Doctoral en curso).

¿Modula Gal-1 la expresión, localización, maduración y/o señalización de integrinas en las células de CHC?

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que Gal-1 modula la adhesión de las células HepG2 en forma dependiente de las integrinas α_1 , α_2 , α_3 , α_v y β_1 [130], y además, resultados preliminares indican que la sobre-expresión de Gal-1 regularía la expresión y maduración de la integrina β_1 , lo que conduciría también al establecimiento de un fenotipo más agresivo e invasivo (Carabias P, Tesis Doctoral en curso).

¿Cumple Gal-1 un papel importante en la quimio-resistencia del CHC?

Los resultados presentados en esta Tesis indican que la sobre-expresión de Gal-1 en las células HepG2 conduce a un aumento en la expresión de la proteína MDR1, implicada en la resistencia a drogas quimioterapéuticas. Ensayos preliminares realizados en el laboratorio utilizando camptotecina y doxorubicina indican que la sobre-expresión de Gal-1 estaría asociada a la resistencia a la muerte celular inducida por dichas drogas. Estos resultados señalan un posible rol de Gal-1 en la quimio-resistencia del CHC, y nos alientan a continuar el estudio, teniendo como meta para el futuro la utilización de Gal-1 como un blanco terapéutico, en combinación con las terapias convencionales, para el tratamiento del CHC.

REFERENCIAS

1. Treyer A y Musch A, 2013. Hepatocyte polarity. *Compr Physiol.* **3**(1): p. 243-87.
2. Cingolani HE, Houssay BA, y Houssay AB. 2000. *Fisiologia humana de Houssay/ Human Physiology of Houssay*. El Ateneo.
3. Martinez-Hernandez A y Amenta PS, 1993. The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution in normal liver. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* **423**(1): p. 1-11.
4. McClelland R, Wauthier E, Uronis J, y Reid L, 2008. Gradients in the liver's extracellular matrix chemistry from periportal to pericentral zones: influence on human hepatic progenitors. *Tissue Eng Part A.* **14**(1): p. 59-70.
5. Weibel ER, Staubli W, Gnagi HR, y Hess FA, 1969. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. *J Cell Biol.* **42**(1): p. 68-91.
6. Hofmann AF, 1994. Maximal bile acid biosynthesis in humans. *Gastroenterology.* **106**(1): p. 273-4.
7. Trauner M y Boyer JL, 2003. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev.* **83**(2): p. 633-71.
8. Reichen J, 1999. The Role of the Sinusoidal Endothelium in Liver Function. *News Physiol Sci.* **14**: p. 117-121.
9. Bohan A y Boyer JL, 2002. Mechanisms of hepatic transport of drugs: implications for cholestatic drug reactions. *Semin Liver Dis.* **22**(2): p. 123-36.
10. Muller M y Jansen PL, 1997. Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am J Physiol.* **272**(6 Pt 1): p. G1285-303.
11. Roma MG, Crocenzi FA, y Mottino AD, 2008. Dynamic localization of hepatocellular transporters in health and disease. *World J Gastroenterol.* **14**(44): p. 6786-801.
12. Crawford AR, Smith AJ, Hatch VC, Oude Elferink RP, y col., 1997. Hepatic secretion of phospholipid vesicles in the mouse critically depends on mdr2 or MDR3 P-glycoprotein expression. Visualization by electron microscopy. *J Clin Invest.* **100**(10): p. 2562-7.
13. Haussinger D, Kubitz R, Reinehr R, Bode JG, y col., 2004. Molecular aspects of medicine: from experimental to clinical hepatology. *Mol Aspects Med.* **25**(3): p. 221-360.
14. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, y col., 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* **127**(12): p. 2893-917.
15. Bosetti C, Levi F, Boffetta P, Lucchini F, y col., 2008. Trends in mortality from hepatocellular carcinoma in Europe, 1980-2004. *Hepatology.* **48**(1): p. 137-45.
16. Qiu D, Katanoda K, Marugame T, y Sobue T, 2009. A Joinpoint regression analysis of long-term trends in cancer mortality in Japan (1958-2004). *Int J Cancer.* **124**(2): p. 443-8.
17. El-Serag HB, 2011. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* **365**(12): p. 1118-27.

18. Villanueva A, Hernandez-Gea V, y Llovet JM, 2013. Medical therapies for hepatocellular carcinoma: a critical view of the evidence. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* **10**(1): p. 34-42.
19. Ercolani G, Grazi GL, Ravaioli M, Del Gaudio M, y col., 2003. Liver resection for hepatocellular carcinoma on cirrhosis: univariate and multivariate analysis of risk factors for intrahepatic recurrence. *Ann Surg.* **237**(4): p. 536-43.
20. Vivarelli M y Risaliti A, 2011. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma on cirrhosis: strategies to avoid tumor recurrence. *World J Gastroenterol.* **17**(43): p. 4741-6.
21. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, y col., 2008. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* **359**(4): p. 378-90.
22. Llovet JM y Bruix J, 2008. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* **48**(4): p. 1312-27.
23. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, y col., 2009. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol.* **10**(1): p. 25-34.
24. Pang RW y Poon RT, 2007. From molecular biology to targeted therapies for hepatocellular carcinoma: the future is now. *Oncology.* **72 Suppl 1**: p. 30-44.
25. Shen YC, Hsu C, y Cheng AL, 2010. Molecular targeted therapy for advanced hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives. *J Gastroenterol.* **45**(8): p. 794-807.
26. Matar P, Alaniz L, Rozados V, Aquino JB, y col., 2009. Immunotherapy for liver tumors: present status and future prospects. *J Biomed Sci.* **16**: p. 30.
27. Farazi PA y Depinho RA, 2006. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer.* **6**(9): p. 674-87.
28. But DY, Lai CL, y Yuen MF, 2008. Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* **14**(11): p. 1652-6.
29. Baffy G, Brunt EM, y Caldwell SH, 2012. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. *J Hepatol.* **56**(6): p. 1384-91.
30. Yu J, Shen J, Sun TT, Zhang X, y col., 2013. Obesity, insulin resistance, NASH and hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol.* **23**(6): p. 483-91.
31. Zhang DY y Friedman SL, 2012. Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Hepatology.* **56**(2): p. 769-75.
32. Hoshida Y, Nijman SM, Kobayashi M, Chan JA, y col., 2009. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **69**(18): p. 7385-92.
33. Forner A, Llovet JM, y Bruix J, 2012. Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* **379**(9822): p. 1245-55.

34. Cervello M, Mccubrey JA, Cusimano A, Lampiasi N, y col., 2012. Targeted therapy for hepatocellular carcinoma: novel agents on the horizon. *Oncotarget*. **3**(3): p. 236-60.
35. Drickamer K, 1988. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem*. **263**(20): p. 9557-60.
36. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, y col., 1994. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*. **76**(4): p. 597-8.
37. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, y Leffler H, 1994. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*. **269**(33): p. 20807-10.
38. Guardia CM, Gauto DF, Di Lella S, Rabinovich GA, y col., 2011. An integrated computational analysis of the structure, dynamics, and ligand binding interactions of the human galectin network. *J Chem Inf Model*. **51**(8): p. 1918-30.
39. Hirabayashi J y Kasai K, 1993. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology*. **3**(4): p. 297-304.
40. Yang RY, Rabinovich GA, y Liu FT, 2008. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med*. **10**: p. e17.
41. Ahmad N, Gabius HJ, Andre S, Kaltner H, y col., 2004. Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *J Biol Chem*. **279**(12): p. 10841-7.
42. Cooper DN, 2002. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta*. **1572**(2-3): p. 209-31.
43. Di Lella S, Sundblad V, Cerliani JP, Guardia CM, y col., 2011. When galectins recognize glycans: from biochemistry to physiology and back again. *Biochemistry*. **50**(37): p. 7842-57.
44. Liu FT, Patterson RJ, y Wang JL, 2002. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta*. **1572**(2-3): p. 263-73.
45. Nickel W, 2005. Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic*. **6**(8): p. 607-14.
46. Hughes RC, 1999. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. **1473**(1): p. 172-85.
47. Rabinovich GA y Toscano MA, 2009. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol*. **9**(5): p. 338-52.
48. Hsu DK y Liu FT, 2004. Regulation of cellular homeostasis by galectins. *Glycoconj J*. **19**(7-9): p. 507-15.
49. Compagno D, Laderach DJ, Gentilini L, Jaworski FM, y col., 2013. Delineating the "galectin signature" of the tumor microenvironment. *Oncoimmunology*. **2**(4): p. e23565.

50. Thijssen VL, Rabinovich GA, y Griffioen AW, 2013. Vascular galectins: regulators of tumor progression and targets for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* **24**(6): p. 547-58.
51. Rabinovich GA y Croci DO, 2012. Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer. *Immunity.* **36**(3): p. 322-35.
52. Schattner M, 2014. Platelets and galectins. *Ann Transl Med.* **2**(9): p. 85.
53. Troncoso MF, Elola MT, Croci DO, y Rabinovich GA, 2012. Integrating structure and function of 'tandem-repeat' galectins. *Front Biosci (Schol Ed).* **4**: p. 864-87.
54. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, y Kiss R, 2006. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology.* **16**(11): p. 137R-157R.
55. Dumic J, Dabelic S, y Flogel M, 2006. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta.* **1760**(4): p. 616-35.
56. Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R, y Bruni CB, 2004. Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconj J.* **19**(7-9): p. 441-9.
57. Lahm H, Andre S, Hoeflich A, Kaltner H, y col., 2004. Tumor galectinology: insights into the complex network of a family of endogenous lectins. *Glycoconj J.* **20**(4): p. 227-38.
58. Van Den Brule F, Califice S, y Castronovo V, 2004. Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj J.* **19**(7-9): p. 537-42.
59. Liu FT y Rabinovich GA, 2005. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer.* **5**(1): p. 29-41.
60. Thijssen VL, Rabinovich GA, y Griffioen AW, 2013. Vascular galectins: Regulators of tumor progression and targets for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* **24**(6): p. 547-58.
61. Cedeno-Laurent F y Dimitroff CJ, 2012. Galectins and their ligands: negative regulators of anti-tumor immunity. *Glycoconj J.* **29**(8-9): p. 619-25.
62. Benvenuto G, Carpentieri ML, Salvatore P, Cindolo L, y col., 1996. Cell-specific transcriptional regulation and reactivation of galectin-1 gene expression are controlled by DNA methylation of the promoter region. *Mol Cell Biol.* **16**(6): p. 2736-43.
63. Zhao XY, Chen TT, Xia L, Guo M, y col., 2010. Hypoxia inducible factor-1 mediates expression of galectin-1: the potential role in migration/invasion of colorectal cancer cells. *Carcinogenesis.* **31**(8): p. 1367-75.
64. Toscano MA, Campagna L, Molinero LL, Cerliani JP, y col., 2011. Nuclear factor (NF)-kappaB controls expression of the immunoregulatory glycan-binding protein galectin-1. *Mol Immunol.* **48**(15-16): p. 1940-9.
65. Croci DO, Salatino M, Rubinstein N, Cerliani JP, y col., 2012. Disrupting galectin-1 interactions with N-glycans suppresses hypoxia-driven angiogenesis and tumorigenesis in Kaposi's sarcoma. *J Exp Med.* **209**(11): p. 1985-2000.

66. Juszczynski P, Ouyang J, Monti S, Rodig SJ, y col., 2007. The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**(32): p. 13134-9.
67. Zhao YM, Wu KN, Wang YJ, Wu GQ, y col., 2011. [Synergistic cytotoxic effects of rapamycin and idarubicin on human acute T-cell lymphoblastic leukemia Jurkat cells]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. **40**(5): p. 482-8.
68. Bourne Y, Bolgiano B, Liao DI, Strecker G, y col., 1994. Crosslinking of mammalian lectin (galectin-1) by complex biantennary saccharides. *Nat Struct Biol*. **1**(12): p. 863-70.
69. Lopez-Lucendo MF, Solis D, Andre S, Hirabayashi J, y col., 2004. Growth-regulatory human galectin-1: crystallographic characterisation of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding. *J Mol Biol*. **343**(4): p. 957-70.
70. Cho M y Cummings RD, 1995. Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. I. Physical and chemical characterization. *J Biol Chem*. **270**(10): p. 5198-206.
71. Leppanen A, Stowell S, Blixt O, y Cummings RD, 2005. Dimeric galectin-1 binds with high affinity to alpha2,3-sialylated and non-sialylated terminal N-acetyllactosamine units on surface-bound extended glycans. *J Biol Chem*. **280**(7): p. 5549-62.
72. Inagaki Y, Sohma Y, Horie H, Nozawa R, y col., 2000. Oxidized galectin-1 promotes axonal regeneration in peripheral nerves but does not possess lectin properties. *Eur J Biochem*. **267**(10): p. 2955-64.
73. Pande AH, Gupta RK, Sumati, y Hajela K, 2003. Oxidation of goat hepatic galectin-1 induces change in secondary structure. *Protein Pept Lett*. **10**(3): p. 265-75.
74. Stowell SR, Cho M, Feasley CL, Arthur CM, y col., 2009. Ligand reduces galectin-1 sensitivity to oxidative inactivation by enhancing dimer formation. *J Biol Chem*. **284**(8): p. 4989-99.
75. Clerch LB, Whitney P, Hass M, Brew K, y col., 1988. Sequence of a full-length cDNA for rat lung beta-galactoside-binding protein: primary and secondary structure of the lectin. *Biochemistry*. **27**(2): p. 692-9.
76. Cooper DN y Barondes SH, 1990. Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J Cell Biol*. **110**(5): p. 1681-91.
77. Quinta HR, Pasquini JM, Rabinovich GA, y Pasquini LA, 2014. Glycan-dependent binding of galectin-1 to neuropilin-1 promotes axonal regeneration after spinal cord injury. *Cell Death Differ*. **21**(6): p. 941-55.
78. Vyakarnam A, Dagher SF, Wang JL, y Patterson RJ, 1997. Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol*. **17**(8): p. 4730-7.
79. Paz A, Haklai R, Elad-Sfadia G, Ballan E, y col., 2001. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene*. **20**(51): p. 7486-93.

-
80. Elola MT, Wolfenstein-Todel C, Troncoso MF, Vasta GR, y col., 2007. Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell Mol Life Sci.* **64**(13): p. 1679-700.
 81. Moiseeva EP, Williams B, Goodall AH, y Samani NJ, 2003. Galectin-1 interacts with beta-1 subunit of integrin. *Biochem Biophys Res Commun.* **310**(3): p. 1010-6.
 82. Hsieh SH, Ying NW, Wu MH, Chiang WF, y col., 2008. Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells. *Oncogene.* **27**(26): p. 3746-53.
 83. Jouve N, Despoix N, Espeli M, Gauthier L, y col., 2013. The involvement of CD146 and its novel ligand Galectin-1 in apoptotic regulation of endothelial cells. *J Biol Chem.* **288**(4): p. 2571-9.
 84. Croci DO, Cerliani JP, Dalotto-Moreno T, Mendez-Huergo SP, y col., 2014. Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors. *Cell.* **156**(4): p. 744-58.
 85. Perillo NL, Marcus ME, y Baum LG, 1998. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med (Berl).* **76**(6): p. 402-12.
 86. Chung CD, Patel VP, Moran M, Lewis LA, y col., 2000. Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J Immunol.* **165**(7): p. 3722-9.
 87. Blaser C, Kaufmann M, Muller C, Zimmermann C, y col., 1998. Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur J Immunol.* **28**(8): p. 2311-9.
 88. Rabinovich GA, Iglesias MM, Modesti NM, Castagna LF, y col., 1998. Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J Immunol.* **160**(10): p. 4831-40.
 89. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, y Baum LG, 1995. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature.* **378**(6558): p. 736-9.
 90. Offner H, Celnik B, Bringman TS, Casentini-Borocz D, y col., 1990. Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* **28**(2): p. 177-84.
 91. Rabinovich GA, Daly G, Dreja H, Tailor H, y col., 1999. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J Exp Med.* **190**(3): p. 385-98.
 92. Santucci L, Fiorucci S, Rubinstein N, Mencarelli A, y col., 2003. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology.* **124**(5): p. 1381-94.
 93. Santucci L, Fiorucci S, Cammilleri F, Servillo G, y col., 2000. Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology.* **31**(2): p. 399-406.

94. Wang L, Friess H, Zhu Z, Frigeri L, y col., 2000. Galectin-1 and galectin-3 in chronic pancreatitis. *Lab Invest.* **80**(8): p. 1233-41.
95. Guevremont M, Martel-Pelletier J, Boileau C, Liu FT, y col., 2004. Galectin-3 surface expression on human adult chondrocytes: a potential substrate for collagenase-3. *Ann Rheum Dis.* **63**(6): p. 636-43.
96. Astorgues-Xerri L, Riveiro ME, Tijeras-Raballand A, Serova M, y col., 2014. Unraveling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer. *Cancer Treat Rev.* **40**(2): p. 307-19.
97. Danguy A, Camby I, y Kiss R, 2002. Galectins and cancer. *Biochim Biophys Acta.* **1572**(2-3): p. 285-93.
98. Nagy N, Legendre H, Engels O, Andre S, y col., 2003. Refined prognostic evaluation in colon carcinoma using immunohistochemical galectin fingerprinting. *Cancer.* **97**(8): p. 1849-58.
99. Langbein S, Brade J, Badawi JK, Hatzinger M, y col., 2007. Gene-expression signature of adhesion/growth-regulatory tissue lectins (galectins) in transitional cell cancer and its prognostic relevance. *Histopathology.* **51**(5): p. 681-90.
100. Chung JC, Oh MJ, Choi SH, y Bae CD, 2008. Proteomic analysis to identify biomarker proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma. *ANZ J Surg.* **78**(4): p. 245-51.
101. Chen J, Zhou SJ, Zhang Y, Zhang GQ, y col., 2013. Clinicopathological and prognostic significance of galectin-1 and vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* **19**(13): p. 2073-9.
102. Kim HJ, Do IG, Jeon HK, Cho YJ, y col., 2013. Galectin 1 expression is associated with tumor invasion and metastasis in stage IB to IIA cervical cancer. *Hum Pathol.* **44**(1): p. 62-8.
103. Laderach DJ, Gentilini LD, Giribaldi L, Delgado VC, y col., 2013. A unique galectin signature in human prostate cancer progression suggests galectin-1 as a key target for treatment of advanced disease. *Cancer Res.* **73**(1): p. 86-96.
104. Barrow H, Rhodes JM, y Yu LG, 2011. The role of galectins in colorectal cancer progression. *Int J Cancer.* **129**(1): p. 1-8.
105. Dalotto-Moreno T, Croci DO, Cerliani JP, Martinez-Allo VC, y col., 2013. Targeting galectin-1 overcomes breast cancer-associated immunosuppression and prevents metastatic disease. *Cancer Res.* **73**(3): p. 1107-17.
106. Thijssen VL, Barkan B, Shoji H, Aries IM, y col., 2010. Tumor cells secrete galectin-1 to enhance endothelial cell activity. *Cancer Res.* **70**(15): p. 6216-24.
107. Jung EJ, Moon HG, Cho BI, Jeong CY, y col., 2007. Galectin-1 expression in cancer-associated stromal cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast cancer. *Int J Cancer.* **120**(11): p. 2331-8.
108. Downward J, 2003. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* **3**(1): p. 11-22.

-
109. Prior IA, Muncke C, Parton RG, y Hancock JF, 2003. Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J Cell Biol.* **160**(2): p. 165-70.
110. Elad-Sfadia G, Haklai R, Ballan E, Gabius HJ, y col., 2002. Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem.* **277**(40): p. 37169-75.
111. Rotblat B, Niv H, Andre S, Kaltner H, y col., 2004. Galectin-1(L11A) predicted from a computed galectin-1 farnesyl-binding pocket selectively inhibits Ras-GTP. *Cancer Res.* **64**(9): p. 3112-8.
112. Lindstedt R, Apodaca G, Barondes SH, Mostov KE, y col., 1993. Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway. *J Biol Chem.* **268**(16): p. 11750-7.
113. Ellerhorst J, Troncoso P, Xu XC, Lee J, y col., 1999. Galectin-1 and galectin-3 expression in human prostate tissue and prostate cancer. *Urol Res.* **27**(5): p. 362-7.
114. Horiguchi N, Arimoto K, Mizutani A, Endo-Ichikawa Y, y col., 2003. Galectin-1 induces cell adhesion to the extracellular matrix and apoptosis of non-adherent human colon cancer Colo201 cells. *J Biochem.* **134**(6): p. 869-74.
115. Van Den Brule FA, Buicu C, Baldet M, Sobel ME, y col., 1995. Galectin-1 modulates human melanoma cell adhesion to laminin. *Biochem Biophys Res Commun.* **209**(2): p. 760-7.
116. Van Den Brule F, Califice S, Garnier F, Fernandez PL, y col., 2003. Galectin-1 accumulation in the ovary carcinoma peritumoral stroma is induced by ovary carcinoma cells and affects both cancer cell proliferation and adhesion to laminin-1 and fibronectin. *Lab Invest.* **83**(3): p. 377-86.
117. Rorive S, Belot N, Decaestecker C, Lefranc F, y col., 2001. Galectin-1 is highly expressed in human gliomas with relevance for modulation of invasion of tumor astrocytes into the brain parenchyma. *Glia.* **33**(3): p. 241-55.
118. Spano D, Russo R, Di Maso V, Rosso N, y col., 2010. Galectin-1 and its involvement in hepatocellular carcinoma aggressiveness. *Mol Med.* **16**(3-4): p. 102-15.
119. Wu MH, Hong TM, Cheng HW, Pan SH, y col., 2009. Galectin-1-mediated tumor invasion and metastasis, up-regulated matrix metalloproteinase expression, and reorganized actin cytoskeletons. *Mol Cancer Res.* **7**(3): p. 311-8.
120. Ito K, Stannard K, Gabutero E, Clark AM, y col., 2012. Galectin-1 as a potent target for cancer therapy: role in the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev.* **31**(3-4): p. 763-78.
121. Thijssen VL, Hulsmans S, y Griffioen AW, 2008. The galectin profile of the endothelium: altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells. *Am J Pathol.* **172**(2): p. 545-53.
122. Thijssen VL, Postel R, Brandwijk RJ, Dings RP, y col., 2006. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**(43): p. 15975-80.

123. Ito K, Scott SA, Cutler S, Dong LF, y col., 2011. Thiodigalactoside inhibits murine cancers by concurrently blocking effects of galectin-1 on immune dysregulation, angiogenesis and protection against oxidative stress. *Angiogenesis*. **14**(3): p. 293-307.
124. Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, y col., 2004. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell*. **5**(3): p. 241-51.
125. Banh A, Zhang J, Cao H, Bouley DM, y col., 2011. Tumor galectin-1 mediates tumor growth and metastasis through regulation of T-cell apoptosis. *Cancer Res*. **71**(13): p. 4423-31.
126. Zacarias Fluck MF, Hess L, Salatino M, Croci DO, y col., 2012. The aggressiveness of murine lymphomas selected in vivo by growth rate correlates with galectin-1 expression and response to cyclophosphamide. *Cancer Immunol Immunother*. **61**(4): p. 469-80.
127. Le QT, Shi G, Cao H, Nelson DW, y col., 2005. Galectin-1: a link between tumor hypoxia and tumor immune privilege. *J Clin Oncol*. **23**(35): p. 8932-41.
128. Chung EJ, Sung YK, Farooq M, Kim Y, y col., 2002. Gene expression profile analysis in human hepatocellular carcinoma by cDNA microarray. *Mol Cells*. **14**(3): p. 382-7.
129. Kondoh N, Hada A, Ryo A, Shuda M, y col., 2003. Activation of Galectin-1 gene in human hepatocellular carcinoma involves methylation-sensitive complex formations at the transcriptional upstream and downstream elements. *Int J Oncol*. **23**(6): p. 1575-83.
130. Espelt MV, Croci DO, Bacigalupo ML, Carabias P, y col., 2011. Novel roles of galectin-1 in hepatocellular carcinoma cell adhesion, polarization, and in vivo tumor growth. *Hepatology*. **53**(6): p. 2097-106.
131. Cimmino F, Schulte JH, Zollo M, Koster J, y col., 2009. Galectin-1 is a major effector of TrkB-mediated neuroblastoma aggressiveness. *Oncogene*. **28**(19): p. 2015-23.
132. Wu H, Chen P, Liao R, Li YW, y col., 2012. Overexpression of galectin-1 is associated with poor prognosis in human hepatocellular carcinoma following resection. *J Gastroenterol Hepatol*. **27**(8): p. 1312-9.
133. Garin MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, y col., 2007. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood*. **109**(5): p. 2058-65.
134. Bacigalupo ML, Manzi M, Rabinovich GA, y Troncoso MF, 2013. Hierarchical and selective roles of galectins in hepatocarcinogenesis, liver fibrosis and inflammation of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. **19**(47): p. 8831-8849.
135. Greenburg G y Hay ED, 1982. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol*. **95**(1): p. 333-9.
136. Behrens J, Birchmeier W, Goodman SL, y Imhof BA, 1985. Dissociation of Madin-Darby canine kidney epithelial cells by the monoclonal antibody anti-arc-1: mechanistic aspects and identification of the antigen as a component related to ovomorulin. *J Cell Biol*. **101**(4): p. 1307-15.

137. Imhof BA, Vollmers HP, Goodman SL, y Birchmeier W, 1983. Cell-cell interaction and polarity of epithelial cells: specific perturbation using a monoclonal antibody. *Cell*. **35**(3 Pt 2): p. 667-75.
138. Behrens J, Mareel MM, Van Roy FM, y Birchmeier W, 1989. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol*. **108**(6): p. 2435-47.
139. Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, y col., 1994. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res*. **54**(14): p. 3845-52.
140. Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, De Leeuw WJ, y col., 1995. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J*. **14**(24): p. 6107-15.
141. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, y col., 1998. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*. **392**(6672): p. 190-3.
142. Heuberger J y Birchmeier W, 2010. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. **2**(2): p. a002915.
143. Boyer B y Thiery JP, 1993. Epithelium-mesenchyme interconversion as example of epithelial plasticity. *APMIS*. **101**(4): p. 257-68.
144. Davies JA, 1996. Mesenchyme to epithelium transition during development of the mammalian kidney tubule. *Acta Anat (Basel)*. **156**(3): p. 187-201.
145. Hanahan D y Weinberg RA, 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. **100**(1): p. 57-70.
146. Thiery JP, 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. **2**(6): p. 442-54.
147. Voulgari A y Pintzas A, 2009. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta*. **1796**(2): p. 75-90.
148. Margolis B y Borg JP, 2005. Apicobasal polarity complexes. *J Cell Sci*. **118**(Pt 22): p. 5157-9.
149. Tanos B y Rodriguez-Boulán E, 2008. The epithelial polarity program: machineries involved and their hijacking by cancer. *Oncogene*. **27**(55): p. 6939-57.
150. Wodarz A y Nathke I, 2007. Cell polarity in development and cancer. *Nat Cell Biol*. **9**(9): p. 1016-24.
151. Etienne-Manneville S, 2008. Polarity proteins in migration and invasion. *Oncogene*. **27**(55): p. 6970-80.
152. Guarino M, 2007. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol*. **39**(12): p. 2153-60.
153. Ridley AJ, 2011. Life at the leading edge. *Cell*. **145**(7): p. 1012-22.

-
154. Yilmaz M y Christofori G, 2010. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res.* **8**(5): p. 629-42.
155. Reynolds AB y Rocznik-Ferguson A, 2004. Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene.* **23**(48): p. 7947-56.
156. Gallet A, Angelats C, Erkner A, Charroux B, y col., 1999. The C-terminal domain of armadillo binds to hypophosphorylated teashirt to modulate wingless signalling in *Drosophila*. *EMBO J.* **18**(8): p. 2208-17.
157. Hyafil F, Morello D, Babinet C, y Jacob F, 1980. A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell.* **21**(3): p. 927-34.
158. Matter K y Balda MS, 2007. Epithelial tight junctions, gene expression and nucleo-junctional interplay. *J Cell Sci.* **120**(Pt 9): p. 1505-11.
159. Shin K, Fogg VC, y Margolis B, 2006. Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **22**: p. 207-35.
160. Knights AJ, Funnell AP, Crossley M, y Pearson RC, 2012. Holding Tight: Cell Junctions and Cancer Spread. *Trends Cancer Res.* **8**: p. 61-69.
161. Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, y Avila-Flores A, 2000. MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol.* **11**(4): p. 315-24.
162. Bates RC, Bellovin DI, Brown C, Maynard E, y col., 2005. Transcriptional activation of integrin beta6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. *J Clin Invest.* **115**(2): p. 339-47.
163. Strizzi L, Bianco C, Normanno N, Seno M, y col., 2004. Epithelial mesenchymal transition is a characteristic of hyperplasias and tumors in mammary gland from MMTV-Cripto-1 transgenic mice. *J Cell Physiol.* **201**(2): p. 266-76.
164. Maschler S, Wirl G, Spring H, Bredow DV, y col., 2005. Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization. *Oncogene.* **24**(12): p. 2032-41.
165. Zhao Y, Min C, Vora SR, Trackman PC, y col., 2009. The lysyl oxidase pro-peptide attenuates fibronectin-mediated activation of focal adhesion kinase and p130Cas in breast cancer cells. *J Biol Chem.* **284**(3): p. 1385-93.
166. Imamichi Y y Menke A, 2007. Signaling pathways involved in collagen-induced disruption of the E-cadherin complex during epithelial-mesenchymal transition. *Cells Tissues Organs.* **185**(1-3): p. 180-90.
167. Mohamed MM y Sloane BF, 2006. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer.* **6**(10): p. 764-75.
168. Xu J, Lamouille S, y Derynck R, 2009. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* **19**(2): p. 156-72.
169. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, y col., 2008. Cadherin switching. *J Cell Sci.* **121**(Pt 6): p. 727-35.

-
170. Theveneau E y Mayor R, 2012. Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells. *Curr Opin Cell Biol.* **24**(5): p. 677-84.
171. Huang RY, Guilford P, y Thiery JP, 2012. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci.* **125**(Pt 19): p. 4417-22.
172. Toivola DM, Tao GZ, Habtezion A, Liao J, y col., 2005. Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol.* **15**(11): p. 608-17.
173. Mendez MG, Kojima S, y Goldman RD, 2010. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J.* **24**(6): p. 1838-51.
174. Lamouille S, Xu J, y Derynck R, 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **15**(3): p. 178-96.
175. Frisch SM y Ruoslahti E, 1997. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol.* **9**(5): p. 701-6.
176. Grossmann J, 2002. Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis.* **7**(3): p. 247-60.
177. Frisch SM y Francis H, 1994. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol.* **124**(4): p. 619-26.
178. Gassmann P y Haier J, 2008. The tumor cell-host organ interface in the early onset of metastatic organ colonisation. *Clin Exp Metastasis.* **25**(2): p. 171-81.
179. Derksen PW, Liu X, Saridin F, Van Der Gulden H, y col., 2006. Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. *Cancer Cell.* **10**(5): p. 437-49.
180. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, y col., 2008. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* **68**(10): p. 3645-54.
181. Overduin M, Harvey TS, Bagby S, Tong KI, y col., 1995. Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science.* **267**(5196): p. 386-9.
182. Gumbiner BM, 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**(8): p. 622-34.
183. Burdsal CA, Damsky CH, y Pedersen RA, 1993. The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak. *Development.* **118**(3): p. 829-44.
184. Auersperg N, Pan J, Grove BD, Peterson T, y col., 1999. E-cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human ovarian surface epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(11): p. 6249-54.
185. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, y col., 1991. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol.* **113**(1): p. 173-85.

186. Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, y Goodall GJ, 2008. MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle*. **7**(20): p. 3112-8.
187. Le TL, Yap AS, y Stow JL, 1999. Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *J Cell Biol*. **146**(1): p. 219-32.
188. Xiao K, Allison DF, Kottke MD, Summers S, y col., 2003. Mechanisms of VE-cadherin processing and degradation in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*. **278**(21): p. 19199-208.
189. Ireton RC, Davis MA, Van Hengel J, Mariner DJ, y col., 2002. A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol*. **159**(3): p. 465-76.
190. Davis MA, Ireton RC, y Reynolds AB, 2003. A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol*. **163**(3): p. 525-34.
191. Behrens J, Vakaet L, Friis R, Winterhager E, y col., 1993. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J Cell Biol*. **120**(3): p. 757-66.
192. Ishiyama N, Lee SH, Liu S, Li GY, y col., 2010. Dynamic and static interactions between p120 catenin and E-cadherin regulate the stability of cell-cell adhesion. *Cell*. **141**(1): p. 117-28.
193. Fujita Y, Krause G, Scheffner M, Zechner D, y col., 2002. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol*. **4**(3): p. 222-31.
194. Yang JY, Zong CS, Xia W, Wei Y, y col., 2006. MDM2 promotes cell motility and invasiveness by regulating E-cadherin degradation. *Mol Cell Biol*. **26**(19): p. 7269-82.
195. Peinado H, Olmeda D, y Cano A, 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. **7**(6): p. 415-28.
196. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, y col., 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*. **2**(2): p. 76-83.
197. Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, y col., 2003. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci*. **116**(Pt 3): p. 499-511.
198. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, y col., 2000. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol*. **2**(2): p. 84-9.
199. Nieto MA, 2002. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **3**(3): p. 155-66.
200. Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, y col., 2013. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets*. **13**(9): p. 963-72.

-
201. Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, y col., 2004. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol.* **6**(10): p. 931-40.
202. Yang F, Sun L, Li Q, Han X, y col., 2012. SET8 promotes epithelial-mesenchymal transition and confers TWIST dual transcriptional activities. *EMBO J.* **31**(1): p. 110-23.
203. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, y col., 2008. Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nat Cell Biol.* **10**(3): p. 295-305.
204. Kang Y, Chen CR, y Massague J, 2003. A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell.* **11**(4): p. 915-26.
205. Hong J, Zhou J, Fu J, He T, y col., 2011. Phosphorylation of serine 68 of Twist1 by MAPKs stabilizes Twist1 protein and promotes breast cancer cell invasiveness. *Cancer Res.* **71**(11): p. 3980-90.
206. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, y Thompson EW, 2006. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol.* **172**(7): p. 973-81.
207. Tse JC y Kalluri R, 2007. Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *J Cell Biochem.* **101**(4): p. 816-29.
208. Yap TA, Garrett MD, Walton MI, Raynaud F, y col., 2008. Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Curr Opin Pharmacol.* **8**(4): p. 393-412.
209. Larue L y Bellacosa A, 2005. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene.* **24**(50): p. 7443-54.
210. Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, y col., 2003. The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res.* **63**(9): p. 2172-8.
211. Gui T, Sun Y, Shimokado A, y Muragaki Y, 2012. The Roles of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in TGF-beta-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *J Signal Transduct.* **2012**: p. 289243.
212. Jamieson C, Sharma M, y Henderson BR, 2012. Wnt signaling from membrane to nucleus: beta-catenin caught in a loop. *Int J Biochem Cell Biol.* **44**(6): p. 847-50.
213. Barker N y Clevers H, 2006. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* **5**(12): p. 997-1014.
214. Valenta T, Hausmann G, y Basler K, 2012. The many faces and functions of beta-catenin. *EMBO J.* **31**(12): p. 2714-36.
215. Baarsma HA, Konigshoff M, y Gosens R, 2013. The WNT signaling pathway from ligand secretion to gene transcription: molecular mechanisms and pharmacological targets. *Pharmacol Ther.* **138**(1): p. 66-83.

-
216. Sharma M, Jamieson C, Johnson M, Molloy MP, y col., 2012. Specific armadillo repeat sequences facilitate beta-catenin nuclear transport in live cells via direct binding to nucleoporins Nup62, Nup153, and RanBP2/Nup358. *J Biol Chem.* **287**(2): p. 819-31.
217. Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, y col., 2007. Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem.* **282**(15): p. 11221-9.
218. Giles RH, Van Es JH, y Clevers H, 2003. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta.* **1653**(1): p. 1-24.
219. Lu Z y Hunter T, 2004. Wnt-independent beta-catenin transactivation in tumor development. *Cell Cycle.* **3**(5): p. 571-3.
220. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, y col., 2001. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**(18): p. 10356-61.
221. Stemmer V, De Craene B, Berx G, y Behrens J, 2008. Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with beta-catenin. *Oncogene.* **27**(37): p. 5075-80.
222. Xu Z, Shen MX, Ma DZ, Wang LY, y col., 2003. TGF-beta1-promoted epithelial-to-mesenchymal transformation and cell adhesion contribute to TGF-beta1-enhanced cell migration in SMMC-7721 cells. *Cell Res.* **13**(5): p. 343-50.
223. Ogunwobi OO, Wang T, Zhang L, y Liu C, 2012. Cyclooxygenase-2 and Akt mediate multiple growth-factor-induced epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* **27**(3): p. 566-78.
224. Lee TK, Man K, Poon RT, Lo CM, y col., 2006. Signal transducers and activators of transcription 5b activation enhances hepatocellular carcinoma aggressiveness through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* **66**(20): p. 9948-56.
225. Battaglia S, Benzoubir N, Nobilet S, Charneau P, y col., 2009. Liver cancer-derived hepatitis C virus core proteins shift TGF-beta responses from tumor suppression to epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One.* **4**(2): p. e4355.
226. Yang MH, Chen CL, Chau GY, Chiou SH, y col., 2009. Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* **50**(5): p. 1464-74.
227. Zhai B, Yan HX, Liu SQ, Chen L, y col., 2008. Reduced expression of E-cadherin/catenin complex in hepatocellular carcinomas. *World J Gastroenterol.* **14**(37): p. 5665-73.
228. Schneider MR, Hiltwein F, Grill J, Blum H, y col., 2014. Evidence for a role of E-cadherin in suppressing liver carcinogenesis in mice and men. *Carcinogenesis.* **35**(8): p. 1855-62.
229. Lee TK, Poon RT, Yuen AP, Ling MT, y col., 2006. Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Clin Cancer Res.* **12**(18): p. 5369-76.
230. Miyoshi A, Kitajima Y, Kido S, Shimonishi T, y col., 2005. Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* **92**(2): p. 252-8.

-
231. Sugimachi K, Tanaka S, Kameyama T, Taguchi K, y col., 2003. Transcriptional repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* **9**(7): p. 2657-64.
232. De La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, y col., 1998. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(15): p. 8847-51.
233. Korinek V, Barker N, Morin PJ, Van Wichen D, y col., 1997. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science.* **275**(5307): p. 1784-7.
234. Nowak TP, Haywood PL, y Barondes SH, 1976. Developmentally regulated lectin in embryonic chick muscle and a myogenic cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* **68**(3): p. 650-7.
235. Anspach FB y Hilbeck O, 1995. Removal of endotoxins by affinity sorbents. *J Chromatogr A.* **711**(1): p. 81-92.
236. Liu S, Tobias R, McClure S, Styba G, y col., 1997. Removal of endotoxin from recombinant protein preparations. *Clin Biochem.* **30**(6): p. 455-63.
237. Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: p. 248-54.
238. Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**(5259): p. 680-5.
239. Schagger H y Von Jagow G, 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* **166**(2): p. 368-79.
240. Zinchuk V, Zinchuk O, y Okada T, 2007. Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta Histochem Cytochem.* **40**(4): p. 101-11.
241. Cokakli M, Erdal E, Nart D, Yilmaz F, y col., 2009. Differential expression of Caveolin-1 in hepatocellular carcinoma: correlation with differentiation state, motility and invasion. *BMC Cancer.* **9**: p. 65.
242. Powlesland AS, Hitchen PG, Parry S, Graham SA, y col., 2009. Targeted glycoproteomic identification of cancer cell glycosylation. *Glycobiology.* **19**(8): p. 899-909.
243. Chiu JH, Hu CP, Lui WY, Lo SC, y col., 1990. The formation of bile canaliculi in human hepatoma cell lines. *Hepatology.* **11**(5): p. 834-42.
244. Knowles BB, Howe CC, y Aden DP, 1980. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science.* **209**(4455): p. 497-9.
245. Javitt NB, 1990. Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *FASEB J.* **4**(2): p. 161-8.

-
246. Gibbons GF, Khurana R, Odwell A, y Seelaender MC, 1994. Lipid balance in HepG2 cells: active synthesis and impaired mobilization. *J Lipid Res.* **35**(10): p. 1801-8.
247. Herrema H, Czajkowska D, Theard D, Van Der Wouden JM, y col., 2006. Rho kinase, myosin-II, and p42/44 MAPK control extracellular matrix-mediated apical bile canalicular lumen morphogenesis in HepG2 cells. *Mol Biol Cell.* **17**(7): p. 3291-303.
248. Kondoh N, Wakatsuki T, Ryo A, Hada A, y col., 1999. Identification and characterization of genes associated with human hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res.* **59**(19): p. 4990-6.
249. Hsu DK, Dowling CA, Jeng KC, Chen JT, y col., 1999. Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* **81**(4): p. 519-26.
250. Delacour D, Koch A, Ackermann W, Eude-Le Parco I, y col., 2008. Loss of galectin-3 impairs membrane polarisation of mouse enterocytes in vivo. *J Cell Sci.* **121**(Pt 4): p. 458-65.
251. Delacour D, Gouyer V, Zanetta JP, Drobecq H, y col., 2005. Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *J Cell Biol.* **169**(3): p. 491-501.
252. Mishra R, Grzybek M, Niki T, Hirashima M, y col., 2010. Galectin-9 trafficking regulates apical-basal polarity in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**(41): p. 17633-8.
253. Roelofsen H, Wolters H, Van Luyn MJ, Miura N, y col., 2000. Copper-induced apical trafficking of ATP7B in polarized hepatoma cells provides a mechanism for biliary copper excretion. *Gastroenterology.* **119**(3): p. 782-93.
254. Slimane TA, Trugnan G, Van ISC, y Hoekstra D, 2003. Raft-mediated trafficking of apical resident proteins occurs in both direct and transcytotic pathways in polarized hepatic cells: role of distinct lipid microdomains. *Mol Biol Cell.* **14**(2): p. 611-24.
255. Zegers MM y Hoekstra D, 1998. Mechanisms and functional features of polarized membrane traffic in epithelial and hepatic cells. *Biochem J.* **336** (Pt 2): p. 257-69.
256. Decaens C, Durand M, Grosse B, y Cassio D, 2008. Which in vitro models could be best used to study hepatocyte polarity? *Biol Cell.* **100**(7): p. 387-98.
257. Roma MG, Milkiewicz P, Elias E, y Coleman R, 2000. Control by signaling modulators of the sorting of canalicular transporters in rat hepatocyte couplets: role of the cytoskeleton. *Hepatology.* **32**(6): p. 1342-56.
258. Wojtal KA, Diskar M, Herberg FW, Hoekstra D, y col., 2009. Regulatory subunit I-controlled protein kinase A activity is required for apical bile canalicular lumen development in hepatocytes. *J Biol Chem.* **284**(31): p. 20773-80.
259. Conacci-Sorrell M, Simcha I, Ben-Yedidia T, Blechman J, y col., 2003. Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol.* **163**(4): p. 847-57.
260. Sarrio D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, y col., 2008. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res.* **68**(4): p. 989-97.

-
261. Lau MT, Klausen C, y Leung PC, 2011. E-cadherin inhibits tumor cell growth by suppressing PI3K/Akt signaling via beta-catenin-Egr1-mediated PTEN expression. *Oncogene*. **30**(24): p. 2753-66.
262. Van Zijl F, Zulehner G, Petz M, Schneller D, y col., 2009. Epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Future Oncol*. **5**(8): p. 1169-79.
263. Keirsebilck A, Bonne S, Staes K, Van Hengel J, y col., 1998. Molecular cloning of the human p120ctn catenin gene (CTNND1): expression of multiple alternatively spliced isoforms. *Genomics*. **50**(2): p. 129-46.
264. Reynolds AB, Daniel J, Mccrea PD, Wheelock MJ, y col., 1994. Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol*. **14**(12): p. 8333-42.
265. Mo YY y Reynolds AB, 1996. Identification of murine p120 isoforms and heterogeneous expression of p120cas isoforms in human tumor cell lines. *Cancer Res*. **56**(11): p. 2633-40.
266. Matter K y Balda MS, 2003. Functional analysis of tight junctions. *Methods*. **30**(3): p. 228-34.
267. Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, y Jaramillo BE, 2003. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol*. **81**(1): p. 1-44.
268. Paoli P, Giannoni E, y Chiarugi P, 2013. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta*. **1833**(12): p. 3481-98.
269. Fatima S, Lee NP, y Luk JM, 2011. Dickkopfs and Wnt/beta-catenin signalling in liver cancer. *World J Clin Oncol*. **2**(8): p. 311-25.
270. Firrincieli D, Boissan M, y Chignard N, 2010. Epithelial-mesenchymal transition in the liver. *Gastroenterol Clin Biol*. **34**(10): p. 523-8.
271. Rimerman RA, Gellert-Randleman A, y Diehl JA, 2000. Wnt1 and MEK1 cooperate to promote cyclin D1 accumulation and cellular transformation. *J Biol Chem*. **275**(19): p. 14736-42.
272. Elola MT, Chiesa ME, Alberti AF, Mordoh J, y col., 2005. Galectin-1 receptors in different cell types. *J Biomed Sci*. **12**(1): p. 13-29.
273. Joubert R, Caron M, Avellana-Adalid V, Mornet D, y col., 1992. Human brain lectin: a soluble lectin that binds actin. *J Neurochem*. **58**(1): p. 200-3.
274. Gonzalez MM, Yoshizaki L, Wolfenstein-Todel C, y Fink NE, 2012. Isolation of galectin-1 from human platelets: its interaction with actin. *Protein J*. **31**(1): p. 8-14.
275. Pacienza N, Pozner RG, Bianco GA, D'atri LP, y col., 2008. The immunoregulatory glycan-binding protein galectin-1 triggers human platelet activation. *FASEB J*. **22**(4): p. 1113-23.
276. Pace KE, Lee C, Stewart PL, y Baum LG, 1999. Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J Immunol*. **163**(7): p. 3801-11.

277. Ko KS, Tomasi ML, Iglesias-Ara A, French BA, y col., 2010. Liver-specific deletion of prohibitin 1 results in spontaneous liver injury, fibrosis, and hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology*. **52**(6): p. 2096-108.
278. De Lope CR, Tremosini S, Forner A, Reig M, y col., 2012. Management of HCC. *J Hepatol*. **56** Suppl 1: p. S75-87.
279. He J y Baum LG, 2004. Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. *J Biol Chem*. **279**(6): p. 4705-12.
280. Masumoto A, Arao S, y Otsuki M, 1999. Role of beta1 integrins in adhesion and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*. **29**(1): p. 68-74.
281. Hadari YR, Arbel-Goren R, Levy Y, Amsterdam A, y col., 2000. Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis. *J Cell Sci*. **113**(Pt 13): p. 2385-97.
282. Levy Y, Arbel-Goren R, Hadari YR, Eshhar S, y col., 2001. Galectin-8 functions as a matricellular modulator of cell adhesion. *J Biol Chem*. **276**(33): p. 31285-95.
283. Hughes RC, 2004. Galectins in kidney development. *Glycoconj J*. **19**(7-9): p. 621-9.
284. Delacour D, Koch A, y Jacob R, 2009. The role of galectins in protein trafficking. *Traffic*. **10**(10): p. 1405-13.
285. Kamiya A, Kojima N, Kinoshita T, Sakai Y, y col., 2002. Maturation of fetal hepatocytes in vitro by extracellular matrices and oncostatin M: induction of tryptophan oxygenase. *Hepatology*. **35**(6): p. 1351-9.
286. Fajka-Boja R, Blasko A, Kovacs-Solyom F, Szebeni GJ, y col., 2008. Co-localization of galectin-1 with GM1 ganglioside in the course of its clathrin- and raft-dependent endocytosis. *Cell Mol Life Sci*. **65**(16): p. 2586-93.
287. Haussinger D, Kurz AK, Wettstein M, Graf D, y col., 2003. Involvement of integrins and Src in tauroursodeoxycholate-induced and swelling-induced choleresis. *Gastroenterology*. **124**(5): p. 1476-87.
288. Ikebuchi Y, Shimizu H, Ito K, Yoshikado T, y col., 2012. Ursodeoxycholic acid stimulates the formation of the bile canalicular network. *Biochem Pharmacol*. **84**(7): p. 925-35.
289. Van Ijzendoorn SC y Hoekstra D, 2000. Polarized sphingolipid transport from the subapical compartment changes during cell polarity development. *Mol Biol Cell*. **11**(3): p. 1093-101.
290. Zegers MM y Hoekstra D, 1997. Sphingolipid transport to the apical plasma membrane domain in human hepatoma cells is controlled by PKC and PKA activity: a correlation with cell polarity in HepG2 cells. *J Cell Biol*. **138**(2): p. 307-21.
291. Laderach DJ, Compagno D, Toscano MA, Croci DO, y col., 2010. Dissecting the signal transduction pathways triggered by galectin-glycan interactions in physiological and pathological settings. *IUBMB Life*. **62**(1): p. 1-13.
292. Nakahara S y Raz A, 2006. On the role of galectins in signal transduction. *Methods Enzymol*. **417**: p. 273-89.

-
293. Masamune A, Satoh M, Hirabayashi J, Kasai K, y col., 2006. Galectin-1 induces chemokine production and proliferation in pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **290**(4): p. G729-36.
294. Maeda N, Kawada N, Seki S, Arakawa T, y col., 2003. Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways. *J Biol Chem.* **278**(21): p. 18938-44.
295. Kurz AK, Block C, Graf D, Dahl SV, y col., 2000. Phosphoinositide 3-kinase-dependent Ras activation by tauroursodesoxycholate in rat liver. *Biochem J.* **350**(Pt 1): p. 207-13.
296. Theard D, Steiner M, Kalicharan D, Hoekstra D, y col., 2007. Cell polarity development and protein trafficking in hepatocytes lacking E-cadherin/beta-catenin-based adherens junctions. *Mol Biol Cell.* **18**(6): p. 2313-21.
297. Schmitt M, Horbach A, Kubitz R, Frilling A, y col., 2004. Disruption of hepatocellular tight junctions by vascular endothelial growth factor (VEGF): a novel mechanism for tumor invasion. *J Hepatol.* **41**(2): p. 274-83.
298. Whiteman EL, Liu CJ, Fearon ER, y Margolis B, 2008. The transcription factor snail represses Crumbs3 expression and disrupts apico-basal polarity complexes. *Oncogene.* **27**(27): p. 3875-9.
299. Ros JE, Libbrecht L, Geuken M, Jansen PL, y col., 2003. High expression of MDR1, MRP1, and MRP3 in the hepatic progenitor cell compartment and hepatocytes in severe human liver disease. *J Pathol.* **200**(5): p. 553-60.
300. Kullak-Ublick GA, Baretton GB, Oswald M, Renner EL, y col., 2002. Expression of the hepatocyte canalicular multidrug resistance protein (MRP2) in primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res.* **23**(1): p. 78-82.
301. Zollner G, Fickert P, Zenz R, Fuchsbichler A, y col., 2001. Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases. *Hepatology.* **33**(3): p. 633-46.
302. Hinoshita E, Taguchi K, Inokuchi A, Uchiumi T, y col., 2001. Decreased expression of an ATP-binding cassette transporter, MRP2, in human livers with hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* **35**(6): p. 765-73.
303. Hoffmann U y Kroemer HK, 2004. The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance. *Drug Metab Rev.* **36**(3-4): p. 669-701.
304. Kuo MT, Liu Z, Wei Y, Lin-Lee YC, y col., 2002. Induction of human MDR1 gene expression by 2-acetylaminofluorene is mediated by effectors of the phosphoinositide 3-kinase pathway that activate NF-kappaB signaling. *Oncogene.* **21**(13): p. 1945-54.
305. Jiang L, Chan JY, y Fung KP, 2012. Epigenetic loss of CDH1 correlates with multidrug resistance in human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **422**(4): p. 739-44.

-
306. Chung LY, Tang SJ, Sun GH, Chou TY, y col., 2012. Galectin-1 promotes lung cancer progression and chemoresistance by upregulating p38 MAPK, ERK, and cyclooxygenase-2. *Clin Cancer Res.* **18**(15): p. 4037-47.
307. Huang EY, Chen YF, Chen YM, Lin IH, y col., 2012. A novel radioresistant mechanism of galectin-1 mediated by H-Ras-dependent pathways in cervical cancer cells. *Cell Death Dis.* **3**: p. e251.
308. Le Mercier M, Lefranc F, Mijatovic T, Debeir O, y col., 2008. Evidence of galectin-1 involvement in glioma chemoresistance. *Toxicol Appl Pharmacol.* **229**(2): p. 172-83.
309. Zhang P, Zhang P, Shi B, Zhou M, y col., 2014. Galectin-1 overexpression promotes progression and chemoresistance to cisplatin in epithelial ovarian cancer. *Cell Death Dis.* **5**: p. e991.
310. Niu RF, Zhang L, Xi GM, Wei XY, y col., 2007. Up-regulation of Twist induces angiogenesis and correlates with metastasis in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* **26**(3): p. 385-94.
311. Bose SK, Meyer K, Di Bisceglie AM, Ray RB, y col., 2012. Hepatitis C virus induces epithelial-mesenchymal transition in primary human hepatocytes. *J Virol.* **86**(24): p. 13621-8.
312. Camby I, Decaestecker C, Lefranc F, Kaltner H, y col., 2005. Galectin-1 knocking down in human U87 glioblastoma cells alters their gene expression pattern. *Biochem Biophys Res Commun.* **335**(1): p. 27-35.
313. Shimura T, Takenaka Y, Fukumori T, Tsutsumi S, y col., 2005. Implication of galectin-3 in Wnt signaling. *Cancer Res.* **65**(9): p. 3535-7.
314. Ose R, Oharaa O, y Nagase T, 2012. Galectin-1 and Galectin-3 Mediate Protocadherin-24-Dependent Membrane Localization of beta-catenin in Colon Cancer Cell Line HCT116. *Curr Chem Genomics.* **6**: p. 18-26.
315. Hsu YL, Wu CY, Hung JY, Lin YS, y col., 2013. Galectin-1 promotes lung cancer tumor metastasis by potentiating integrin alpha6beta4 and Notch1/Jagged2 signaling pathway. *Carcinogenesis.* **34**(6): p. 1370-81.
316. Gao X, Lowry PR, Zhou X, Depry C, y col., 2011. PI3K/Akt signaling requires spatial compartmentalization in plasma membrane microdomains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**(35): p. 14509-14.
317. Mishra S, Ande SR, y Nyomba BL, 2010. The role of prohibitin in cell signaling. *FEBS J.* **277**(19): p. 3937-46.
318. Chiu CF, Ho MY, Peng JM, Hung SW, y col., 2013. Raf activation by Ras and promotion of cellular metastasis require phosphorylation of prohibitin in the raft domain of the plasma membrane. *Oncogene.* **32**(6): p. 777-87.