



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**Relevancia de la interacción de Galectina-1 y
Aminopeptidasa N/CD13 en el hepatocarcinoma**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Luciana Sarrias

Directora de Tesis: Dra. María Fernanda Troncoso

Consejera de Estudios: Dra. Mirta Schattner

Lugar de trabajo: Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas “Prof.
Alejandro C. Paladini” (IQUIFIB, FFyB UBA-CONICET)

Buenos Aires, 2025

Relevancia de la interacción de Galectina-1 y Aminopeptidasa N/CD13 en el hepatocarcinoma

Resumen

El carcinoma hepatocelular o CHC es la tercera causa de muerte a nivel global y su incidencia equipara al índice de mortalidad, lo que refleja la pobre prognosis y la limitación de opciones terapéuticas. Galectina-1 (Gal-1) es una proteína con afinidad por β -galactósidos que se encuentra drásticamente aumentada en el CHC y se asocia con peores desenlaces. Previamente identificamos a CD13 como un receptor de Gal-1 en las células endoteliales sinusoidales derivadas de un tumor hepático, SK-HEP-1, por medio de técnicas proteómicas. CD13 es una exopeptidasa de membrana altamente glicosilada cuyos niveles se encuentran aumentados en células endoteliales durante la angiogénesis tumoral. En este trabajo, nos propusimos estudiar la relevancia de la interacción de Gal-1 y CD13 en la diseminación de las células de CHC y la neovascularización del endotelio sinusoidal hepático.

Caracterizamos la expresión de Gal-1 y CD13 en muestras de pacientes con CHC, en líneas celulares de hepatocitos tumorales y en células endoteliales, mediante ensayos *in silico* e *in vitro*. Confirmamos la interacción física y directa de ambas proteínas y estimamos su constante de afinidad en experimentos de resonancia plasmónica de superficie. Mediante la modulación de los niveles de expresión proteica, demostramos que tanto CD13 como Gal-1 participan en los procesos de diseminación y angiogénesis tumoral. Demostramos también una cooperación de ambas proteínas en la tubulogénesis de células SK-HEP-1, donde la presencia de CD13 sería importante para que Gal-1 pueda ejercer su efecto pro-angiogénico tumoral.

Palabras clave: Galectina-1, carcinoma hepatocelular, CD13, aminopeptidasa N, angiogénesis, diseminación, células endoteliales sinusoidales

Relevance of the Galectin-1 and Aminopeptidase N/CD13 interaction in hepatocellular carcinoma

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third leading cause of death worldwide, with an incidence rate that closely matches its mortality rate, reflecting its poor prognosis and limited therapeutic options. Galectin-1 (Gal-1) is a β -galactoside-binding protein that is drastically overexpressed in HCC and is associated with worse clinical outcomes. Previously, we identified CD13 as a Gal-1 receptor in sinusoidal endothelial cells derived from a hepatic tumor, SK-HEP-1, using a proteomic approach. CD13 is a highly glycosylated membrane-bound exopeptidase that is upregulated in endothelial cells during tumor angiogenesis. In this study, we aimed to investigate the relevance of the Gal-1/CD13 interaction in HCC cell dissemination and sinusoidal endothelial neovascularization.

We characterized the expression of Gal-1 and CD13 in patient-derived HCC samples, tumor hepatocyte cell lines, and endothelial cells using both *in silico* and *in vitro* assays. We confirmed the direct physical interaction between these two proteins and estimated their binding affinity constant by surface plasmon resonance experiments. Through the modulation of protein expression levels, we demonstrated that both CD13 and Gal-1 contribute to tumor cell dissemination and angiogenesis. Furthermore, we showed that these proteins cooperate in SK-HEP-1 cell tubulogenesis, where CD13 appears to be essential for Gal-1 to exert its tumoral pro-angiogenic effect.

Key words: Galectin-1, hepatocellular carcinoma, CD13, aminopeptidase N, angiogenesis, dissemination, sinusoidal endothelial cells.

Publicación surgida a partir de los resultados de este trabajo de tesis:

- “Galectin-1 and CD13 interaction promotes hepatocellular carcinoma dissemination and tumor angiogenesis”.

Sarrias L, Manzi M, Fernández MM, Espelt MV, Malchiodi EL, Elola MT, Rabinovich GA, Troncoso MF.

Manuscrito en preparación para ser enviado para su publicación a *Angiogenesis*.

Publicaciones como co-autora durante el transcurso de este doctorado:

- “Galectin-1 confers resistance to doxorubicin in hepatocellular carcinoma cells through modulation of P-glycoprotein expression”.

Carabias P, Espelt MV, Bacigalupo ML, Rojas P, **Sarrias L**, Rubin A, Saffioti NA, Elola MT, Rossi JP, Wolfenstein-Todel C, Rabinovich GA, Troncoso MF.

Cell Death and Disease (2022) 13(1):79. doi: 10.1038/s41419-022-04520-6.

- “The universe of galectin-binding partners and their functions in health and disease”.

Troncoso MF, Elola MT, Blidner AG, **Sarrias L**, Espelt MV, Rabinovich GA.

Journal of Biological Chemistry (2023) 299(12):105400. doi: 10.1016/j.jbc.2023.105400.

- “Glycosylation-driven programs coordinate immunoregulatory and pro-angiogenic functions of myeloid cells”.

Blidner AG, Bach CA, García PA, Merlo JP, Cagnoni AJ, Bannoud N, Manselle Cocco MN, Pérez Sáez JM, Pinto NA, Torres NI, **Sarrias L**, Dalotto-Moreno T, Gatto SG, Morales RM, Giribaldi ML, Stupirski JC, Cerliani JP, Salatino M, Troncoso MF, Mariño KV, Abba MC, Croci DO, Rabinovich GA.

Immunity. (2025) Jun 10;58(6):1553-1571.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2025.04.027. Epub 2025 May 16. PMID: 40381622.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero manifestar mi especial agradecimiento a las investigadoras del laboratorio de Glicobiología Tumoral, mejor conocido como L7:

- A la **Dra. María Fernanda Troncoso**, directora de esta Tesis, por confiar en mí para este trabajo y ofrecerme un lugar en su laboratorio. Por su constante apoyo, generosidad, por impulsarme siempre a mejorar y participar de nuevos proyectos. Gracias por tu infinita paciencia y dedicación para enseñarme.
- A la **Dra. María Teresa Elola**, por su calidez, sus consejos y fundamentales aportes que ayudaron a orientar los experimentos de este trabajo de investigación.
- A la **Dra. María Victoria Espelt**, por su apoyo, criterio y enseñanzas a lo largo del doctorado, especialmente en cultivo y microscopía. Gracias por tu sinceridad para ayudarme siempre a ser mejor.
- A la **Dra. Carlota Wolfenstein-Todel**, por aceptarme en su laboratorio y por el tiempo que hemos compartido, por sus palabras siempre lúcidas y por abrir el camino para más científicas en el mundo.

Las admiro enormemente, son un ejemplo de perseverancia, trabajo duro, amor por la ciencia y la docencia; y de profunda resiliencia para producir conocimiento en este país. Todos estos años de compartir almuerzos, mesada, seminarios y congresos me enseñaron muchísimo y me ayudaron a formarme no solo como científica sino como persona. ¡Gracias, las quiero mucho!

También quiero agradecer:

- A la **Dra. Mirta Schattner**, consejera de estudios y la **Dra. Mónica Vázquez-Levin**, integrante del comité de Tesis por su valioso tiempo, preguntas y agudas observaciones que sirvieron de guía para orientar mi investigación.
- A los **Dres. Emilio Malchiodi** y **Marisa Fernández** por la ejecución y análisis de la técnica de Resonancia Plasmónica de Superficie.
- A la **Dra. Lorena Bacigalupo**, por su generosidad y transmisión de conocimiento en la primera etapa de este doctorado.

- A mis compañeros de instituto y laboratorio que me acompañaron todos estos años, especialmente a la **Dra. Vanina Vachetta** por su buen humor, compañía y apoyo; a la **Dra. Fátima Ferragut**, la **Dra. Daniela Montagna** y a la **Lic. Lorena García**, mi joven padawan. ¡Fue un placer compartir esta última etapa con vos!

Quiero agradecer al **Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas** y la **Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica** que permitieron financiar mi beca de doctorado. Reconocer también a la **Universidad de Buenos Aires**, la universidad pública, gratuita y de calidad que me abrió sus puertas, me permitió estudiar una carrera de grado y posgrado, descubrir la docencia y elegir mi futuro.

Luego:

- A mi familia, especialmente a mi **mamá** por alentarme siempre a estudiar lo que me hiciera feliz y bancarme tantos años, a **Richard** por cultivar mi curiosidad científica y ser la mejor influencia que podía tener, a mis hermanas **Marina** y **Leti** que al usarme para practicar orales en sus carreras despertaron en mí la fascinación por las enfermedades; y a mi brillante sobrina, **Viena**, que pudo conocer a mis famosas células.
- A mi nueva familia, **Gustavo y Javier**.
- A las pibas de la estufa, **Mar, Any, Dai y Lu**; las andreawhartas, **Caro, Iaku y Barby** y mis otros amigos de hace más de una década, **Oso, Luz y Meri**, que siempre estuvieron para mí cuando lo necesité, con palabras de aliento aunque no entiendan bien de que va mi Tesis pero hacen el esfuerzo!
- A **Ariel**, gracias por compartir conmigo este camino desde el inicio y sostenerme en los tropiezos. La vida es mucho más linda con vos.

Por último y como excepción, se excluye de estos agradecimientos al **Sr. Loki**. A pesar de todos tus esfuerzos por impedirlo (subiéndote al teclado, mordiendo la pantalla, los cables y desconfigurando todo a tu paso), esta Tesis logró ver la luz del día.

Índice general

RESUMEN.....	2
PUBLICACIONES.....	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
ÍNDICE.....	7
INTRODUCCIÓN.....	12
SECCIÓN 1: Carcinoma hepatocelular (CHC)	13
1.1 Consideraciones generales del hígado.....	13
1.1.1 Hepatocitos.....	16
1.1.2 Colangiocitos.....	16
1.1.3 Células endoteliales sinusoidales hepáticas (CESHs).....	17
1.1.4 Células de Kupffer.....	18
1.1.5 Células estrelladas.....	19
1.1.6 Células <i>pit</i>	19
1.2 Carcinoma hepatocelular	20
1.2.1 Generalidades y epidemiología	20
1.2.2 Clasificación clínica	21
1.2.3 Fisiopatología.....	22
1.2.4 Roles de las CESHs en el CHC.....	24
1.2.5 Diagnóstico y tratamiento.....	25
1.3 Angiogénesis en el CHC.....	27
1.3.1 Biología vascular.....	27
1.3.2 Angiogénesis tumoral.....	30
1.3.3 Regulación angiogénica en el CHC.....	31
SECCIÓN 2: Galectinas.....	33
2.1 Consideraciones generales de las galectinas.....	33
2.1.1 Galectinas en el CHC.....	35
2.2 Galectina-1(Gal-1).....	36
2.2.1 Gal-1 en el CHC.....	38
2.2.2 Gal-1 en la diseminación tumoral.....	41
2.2.3 Gal-1 en el el endotelio tumoral	42
SECCIÓN 3: Aminopeptidasa N/CD13.....	44
3.1 Consideraciones generales.....	44
3.1.1 Estructura de CD13.....	44
3.1.2 CD13 como proteína multipropósito.....	46
3.2 CD13 en cáncer y en el CHC	48
3.2.1 CD13 en el proceso de adhesión.....	49

3.2.2 CD13 en la angiogénesis tumoral	50
3.2.3 Terapias antitumorales.....	50
3.3 CD13 y Gal-1.....	51
3.3.1 Resultados del laboratorio aún no publicados.....	51
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	54
Construcción de la hipótesis.....	55
RESULTADOS.....	57
CAPÍTULO 1. Análisis de la expresión de Galectina-1 y CD13 en muestras de pacientes con hepatocarcinoma y líneas celulares humanas.....	58
1.1 Análisis <i>in silico</i> de la expresión de los genes <i>LGALS1</i> y <i>ANPEP</i> , su asociación con la supervivencia de pacientes con CHC y su co- expresión.....	58
1.2 Análisis <i>in silico</i> de la expresión de Gal-1 y CD13 en células residentes del hígado y líneas celulares hepáticas y endoteliales tumorales mediante secuenciación de ARN de célula única.....	62
1.3 Análisis <i>in silico</i> de la expresión de Gal-1 y CD13 en líneas celulares hepáticas y endoteliales tumorales.....	65
1.4 Análisis <i>in silico</i> de la expresión proteica de Gal-1 y CD13 en muestras de pacientes con CHC.....	66
1.5 Análisis <i>in vitro</i> de la expresión proteica de Gal-1 y CD13 en líneas celulares hepáticas y endoteliales tumorales.....	69
CAPÍTULO 2. Estudio de la interacción física entre el receptor CD13 y Gal-1.....	73
2.1 Estudio de la interacción entre Gal-1 y CD13 mediante co- inmunoprecipitación.....	76
2.2 Estudio de la interacción entre Gal-1 y CD13 mediante <i>Far Western</i> <i>blotting</i>	78
2.3 Estudio de la interacción entre Gal-1 y CD13 mediante Resonancia Plasmónica de Superficie.....	80
CAPÍTULO 3. Estudio de la cooperación entre Gal-1 y CD13 en la diseminación y la angiogénesis del endotelio sinusoidal asociado al tumor hepático.....	86
3A Análisis de los roles de Gal-1 y CD13 en la adhesión heterotípica entre hepatocitos tumorales y endotelio sinusoidal hepático.....	86
3A.1 Análisis de la relevancia de CD13 en la adhesión heterotípica.....	86
3A.2 Análisis de la relevancia de la interacción de CD13 y Gal-1 en la adhesión heterotípica.....	88
3B Análisis de los roles de Gal-1 y CD13 en la angiogénesis asociada al tumor hepático.....	90

3B.1 Análisis de los roles de Gal-1 y CD13 en la proliferación de células SK-HEP-1.....	91
3B.1.1 Participación de CD13 en la proliferación de células SK-HEP-1.....	92
3B.1.2 Participación de Gal-1 en la proliferación de células SK-HEP-1.....	93
3B.2 Análisis de los roles de Gal-1 y CD13 en la migración de células SK-HEP-1.....	95
3B.2.1 Participación de CD13 en la migración de células SK-HEP-1.....	96
3B.2.2 Participación de Gal-1 en la migración de células SK-HEP-1.....	97
3B.2.3 Estudio de la cooperación de Gal-1 y CD13 en la migración de células SK-HEP-1.....	101
3B.3 Análisis de los roles de Gal-1 y CD13 en la tubulogénesis de células SK-HEP-1.....	103
3B.3.1 Participación de CD13 en la formación de túbulos de células SK-HEP-1	104
3B.3.2 Participación de Gal-1 en la formación de túbulos de células SK-HEP-1.....	106
3B.3.3 Estudio de la cooperación de Gal-1 y CD13 en la formación de túbulos de las células SK-HEP-1.....	107
3B.3.4 Estudio del rol de la actividad enzimática de CD13 en la formación de túbulos de las células SK-HEP-1	109
DISCUSIÓN	112
Capítulo 1.....	113
Capítulo 2.....	119
Capítulo 3.....	123
CONCLUSIÓN.....	131
PERSPECTIVAS.....	135
ANEXOS.....	138
MATERIALES Y MÉTODOS.....	144
Capítulo 1.....	145
1. Análisis bioinformático	145
1.1 UALCAN.....	145
1.2 Kaplan-Meier Plotter.....	145
1.3 cBioPortal.....	146

1.4 THPA	146
2. Cultivo de líneas celulares.....	148
2.1 Líneas celulares utilizadas.....	148
2.2 Cultivo y preservación de células.....	149
2.3 Determinación y eliminación de micoplasmas.....	150
3. Obtención de línea celular SK-HEP-1 con disrupción génica de CD13.....	151
4. Análisis de los niveles de expresión proteica por <i>Western blotting</i>	152
4.1 Extracción de proteínas.....	152
4.2 Determinación de la concentración de proteínas totales.....	153
4.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	153
4.4 Electrotransferencia e inmunodetección.....	154
Capítulo 2.....	157
1. STRING.....	157
2. Ensayo de co-inmunoprecipitación.....	157
2.1 Lisado de células SK-HEP-1.....	157
2.2 Incubación con el anticuerpo inmunoprecipitante.....	158
2.3 Acondicionamiento de muestras para el ensayo de <i>Western blotting</i>	158
3. Obtención de Gal-1 recombinante humana.....	158
3.1 Transformación y expresión de Gal-1 en bacterias.....	158
3.2 Purificación de rGal-1 en columna de lactosa-agarosa	159
3.3 Eliminación de endotoxinas.....	160
3.4 Control de pureza e integridad de rGal-1.....	160
3.5 Control de actividad de lectina de rGal-1.....	161
3.6 Acondicionamiento de rGal-1 para ensayos.....	161
4. Enriquecimiento de CD13.....	161
4.1 Extracción de proteínas de membrana.....	161
4.2 Preparación de la matriz de afinidad rGal-1 agarosa.....	162
4.3 Purificación de receptores de membrana de Gal-1 por cromatografía de afinidad.....	163
5. Ensayo de <i>Far Western blotting</i>	163
6. Ensayo de Resonancia Plasmónica de Superficie.....	164
Capítulo 3.....	166
1. Sobreexpresión de Gal-1 en la línea celular HEPG2.....	166

2. Ensayo de adhesión heterotípica.....	167
2.1 Ensayo de adhesión heterotípica con células de CHC que sobreexpresan Gal-1.....	168
3. Disminución de la expresión de Gal-1 en la línea celular SK-HEP-1.....	168
4. Ensayo de proliferación celular.....	169
4.1 Ensayo de proliferación celular en presencia de Gal-1 soluble agregada en forma exógena.....	170
4.2 Ensayo de proliferación celular con rGal-1 inmovilizada.....	170
5. Ensayo de migración celular.....	170
5.1 Ensayo de migración celular con rGal-1 soluble.....	171
5.2 Ensayo de migración celular con rGal-1 inmovilizada.....	171
6. Ensayo de tubulogénesis.....	172
6.1 Disminución de la expresión de CD13 en la línea celular SK-HEP-1 mediante transfección con siRNA.....	173
6.2 Ensayo de tubulogénesis con anticuerpo bloqueante de la actividad.....	173
7. Análisis estadístico.....	174
ABREVIATURAS.....	175
REFERENCIAS.....	179

INTRODUCCIÓN

Sección 1: Carcinoma hepatocelular

1.1 Consideraciones generales del hígado

El hígado es el órgano sólido más grande del cuerpo humano llegando a representar en individuos adultos el 2,5 % de su peso corporal. Posee una importancia fundamental para la vida, con numerosas funciones que exceden el marco de la fisiología digestiva: producción exócrina de bilis para la digestión y absorción de lípidos y vitaminas en el intestino delgado; absorción y metabolización de bilirrubina; depósito de hierro en forma de ferritina, cobre, vitaminas A, D, E, K y B12, producción de factores coagulantes de la sangre; depuración de sustancias tóxicas; metabolización y regulación de carbohidratos, lípidos, proteínas, hormonas y grupo hemo; y participación en la respuesta inmunitaria [1], [2].

Este órgano presenta doble suministro sanguíneo compuesto por dos grandes vasos aferentes: la arteria hepática y la vena porta, y por una vía eferente conformada por tres venas hepáticas que desembocan en la vena cava inferior. El 75 % de la sangre que llega al hígado, rica en nutrientes, lo hace por el circuito portal desde todo el tracto gastrointestinal, así como también desde el páncreas y el bazo. El 25 % de la sangre restante llega oxigenada, a través de la arteria hepática proveniente de la vía aórtica. Estos vasos sanguíneos ingresan juntos al hígado por el hilio y se subdividen en capilares cada vez más pequeños llamados sinusoides hepáticos que irrigan los lobulillos hepáticos. Por otra parte, los conductos biliares se inician en canalículos biliares que confluyen en conductos mayores para formar el conducto biliar común o colédoco que sale del hilio y transporta la bilis secretada por el hígado, en dirección opuesta a la de la sangre, hacia la segunda porción del duodeno (Fig. 1).

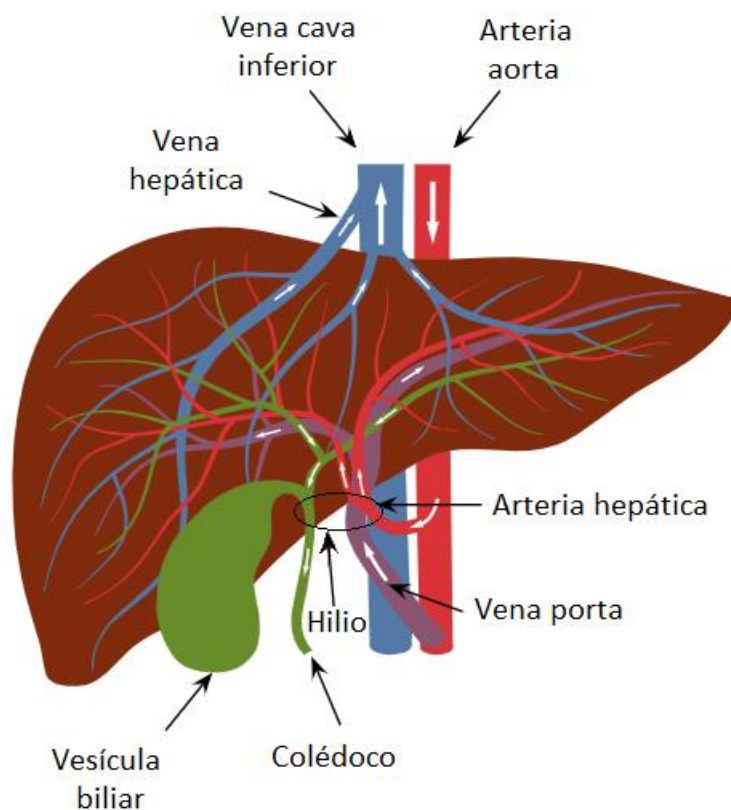


Figura 1. Irrigación sanguínea del hígado. Esquema simplificado del doble suministro sanguíneo por la arteria hepática y la vena porta que ingresan juntas al hígado por el hilio y se subdividen en sinusoides hepáticos que irrigan los lobulillos hepáticos. La irrigación continúa hacia vénulas hepáticas en el centro de los lobulillos que a través de tres venas hepáticas desembocan en la vena cava inferior. Los canalículos biliares confluyen en conductos mayores para formar el colédoco hacia la vesícula biliar y el duodeno. Imagen tomada y adaptada de [https://Olga Bolbot/shutterstock.com](https://OlgaBolbot/shutterstock.com).

El lobulillo hepático clásico es la unidad estructural y funcional del hígado (Fig. 2A). La división del órgano en segmentos funcionales se corresponde con las ramas de irrigación sanguínea hacia los sinusoides y de drenaje biliar hacia el conducto biliar. El lobulillo está compuesto por una masa de tejido hexagonal formado por pilas de cordones anastomosados de hepatocitos de una sola célula de espesor, separados por el sistema interconectado de sinusoides que irrigan las células (Fig. 2A). En los ángulos del hexágono se encuentran las tríadas portales (arteria hepática, vena porta y conducto biliar) y en el centro del lobulillo, una vénula hepática terminal, en la cual desembocan los sinusoides (Fig. 2B). Esta disposición tisular da como resultado un flujo sanguíneo sinusoidal desde el perímetro del hexágono hacia el centro, lo que determina un gradiente de oxígeno y una distribución y actividad enzimática, distintas. Se pueden diferenciar tres zonas concéntricas en forma de rombo entre dos lobulillos (Fig. 2C), en

la zona 1 se ubican las células que primero reciben oxígeno, nutrientes y toxinas desde la sangre sinusoidal y en la zona 3 se localizan las primeras células en sufrir necrosis isquémica (necrosis centrolobulillar) como consecuencia de insuficiencia cardíaca [3].

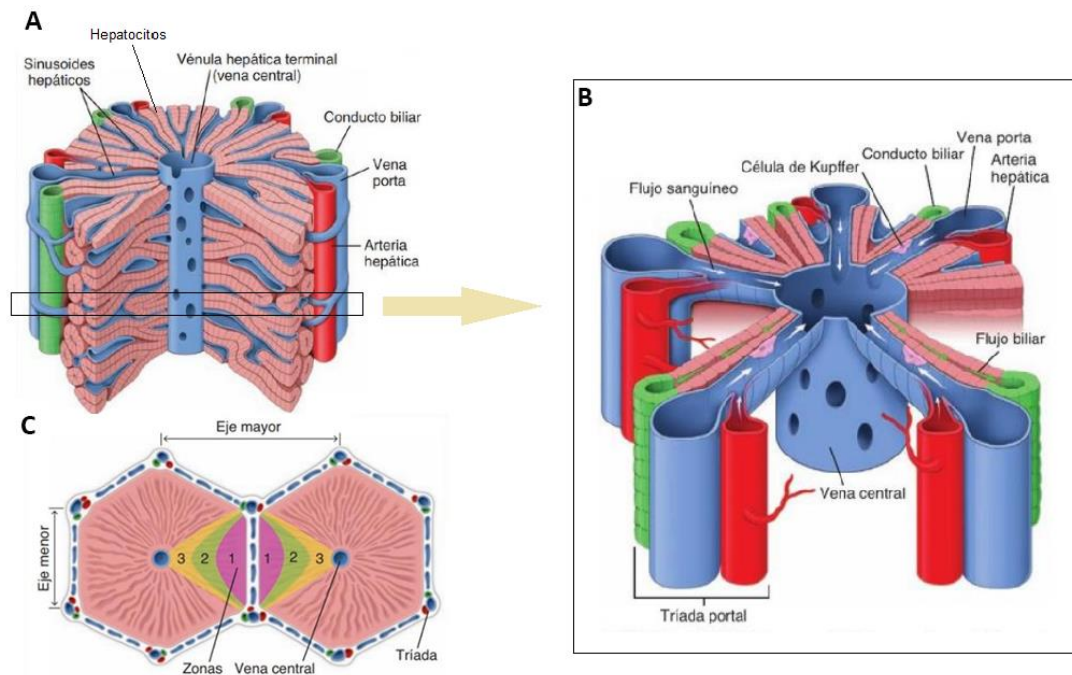


Figura 2. Lobulillo hepático clásico. (A) Los hepatocitos están organizados en cordones anastomosados irregulares que irradian hacia la vena central. (B) Los ángulos del lobulillo clásico poligonal están ocupados por la triada portal, la cual contiene ramas de la vena porta, la arteria hepática, los conductos biliares y los vasos linfáticos de pequeño calibre. Los sinusoides hepáticos forman canalículos vasculares irregulares que transcurren paralelos y entre los cordones de hepatocitos. En el panel inferior (C) se observa el acino hepático, una interpretación funcional de la organización hepática. Consiste en sectores contiguos de lobulillos clásicos separados mediante vasos sanguíneos de distribución. Las zonas marcadas 1, 2 y 3 poseen irrigación diferencial siendo la zona 1 irrigada con sangre más nutritiva y oxigenada. Tomado y adaptado de [3].

Citológicamente, el hígado se encuentra formado por células epiteliales parenquimatosas, o hepatocitos, que representan el 80 % de la masa hepática total. Entre 3-5 % del órgano se compone de células epiteliales biliares, o colangiocitos, los cuales constituyen la pared de los conductos biliares. El resto está conformado por células no parenquimatosas como son las células endoteliales sinusoidales (CES) y células de Kupffer, o macrófagos, principalmente. Otros residentes del tejido en menor proporción son las células estrelladas, o células de Ito, que se activan cuando hay lesión hepática, y las células inmunitarias *natural killer* (NK) con efecto citotóxico [1].

1.1.1 Hepatocitos

Los hepatocitos constituyen el 80 % de la población celular del hígado. Son células epiteliales poligonales, de gran tamaño (20-30 μm), con un núcleo esférico en el centro de la célula. Dado que los hepatocitos están involucrados en dos sistemas de flujo contrarios (síntesis y secreción de bilis por un lado, y absorción, procesamiento y secreción de componentes de la sangre sinusoidal por el otro), exhiben un fenotipo de polaridad celular único. La superficie basal-sinusoidal está en contacto con el espacio de Disse mientras que la superficie apical se comunica con el hepatocito contiguo para formar un canalículo biliar bordeado por uniones estrechas. Un solo hepatocito puede formar lumen con tres células vecinas y tener también dos dominios basales sinusoidales. A diferencia de la mayoría de los tejidos epiteliales, los hepatocitos no depositan suficientes moléculas de matriz extracelular (MEC) para formar una lámina basal ya que no se encuentra laminina ni nidógenos (entrecruzadores de matriz) en el microambiente de la MEC de hepatocitos maduros. La presencia de múltiples superficies basales-sinusoidales y la ausencia de membrana basal podrían haber evolucionado para maximizar el intercambio bidireccional de macromoléculas entre los hepatocitos y la sangre [4].

La MEC hepática es de baja densidad y se compone principalmente de fibronectina y colágeno tipo I, y cantidades menores de colágeno tipo III, IV, V y VI. La interacción entre la MEC y las células hepáticas es esencial para una homeostasis normal y su modificación resulta en una función hepática perturbada [5].

1.1.2 Colangiocitos

Los colangiocitos son células epiteliales (3-5 % de la población celular hepática) que forman las paredes de conductillos y conductos biliares. La bilis es transportada desde los canalículos biliares, formados por hepatocitos, a través del conducto de Hering, formado por hepatocitos y colangiocitos, hacia los conductillos biliares [3]. Se postula que los conductos de Hering actúan como reservorios de células progenitoras hepáticas, los cuales podrían migrar y diferenciarse a hepatocitos en estados patológicos [6]. Los colangiocitos modifican la composición de la bilis a través de la secreción de electrolitos y bicarbonato, entre otros procesos. Fisiológicamente son células

quiescentes, pero se vuelven proliferativas durante la injuria hepática como la obstrucción biliar extrahepática o la ingestión crónica de alcohol, toxinas o drogas [7].

1.1.3 Células endoteliales sinusoidales hepáticas (CESHs)

Las CESHs conforman más del 15 % de las células residentes del hígado, forman la pared de los sinusoides hepáticos y representan la interfase entre el plasma sanguíneo y los cordones de hepatocitos. Son células endoteliales altamente especializadas con una arquitectura discontinua, sin membrana basal, con fenestraciones sin diafragma, dispuestas en placas cribosas, lo que se traduce en una barrera permeable a los hepatocitos, de los cuales se encuentran separadas por el espacio de Disse [8]. Las fenestraciones miden entre 150 y 175 μm , se agrupan en placas cribosas (entre 20-40 fenestraciones) y ocupan aproximadamente un 8 % de la superficie endotelial. Actúan como un filtro dinámico dejando atravesar partículas menores al diámetro del poro. Dicho tamaño de poro es regulado por actina, miosina y pequeñas GTPasas, como Rho o calmodulina dependiente de calcio [9], [10]. Este fenotipo particular de la célula endotelial facilita la oxigenación de los hepatocitos y mejora su exposición a las macromoléculas de la circulación portal [11]. La modificación de las propiedades de las fenestraciones es un proceso natural conocido como pseudo-capilarización, asociado a la edad y la hipoxia [12], mientras que la capilarización es la pérdida total de fenestraciones y precede al desarrollo de la mayoría de las enfermedades hepáticas crónicas como el carcinoma hepatocelular (CHC) [13].

Esta vasculatura no posee células musculares de tipo liso que generen óxido nítrico (ON); sin embargo, las CESHs son las principales productoras de dicho gas. La producción de ON ocurre por el efecto de la tensión tangencial sobre la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) que induce la supresión de moléculas vasoconstrictoras como endotelina-1 (ET-1) [14], [15]. Los efectos de ET-1 sobre la modulación del tono vascular fueron observados en las células de Ito [16], actuando de forma parácrina sobre ellas en el espacio de Disse. Así, las CESH saludables mantienen a las células de Ito en reposo, inhibiendo su vasoconstricción [17] (Fig.3).

Otra característica distintiva de este endotelio particular es la alta capacidad endocítica, que combinada con una importante actividad lisosomal le otorga a las CESH la habilidad de eliminar macromoléculas solubles y moléculas pequeñas a través de

receptores de endocitosis (receptores *scavenger* como estabilina-1/2) [18]. Estas células también contribuyen al transporte de moléculas a través de la transcitosis [8].

Las CESHs expresan un singular conjunto de moléculas de adhesión que incluyen ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1), VCAM-1 (molécula de adhesión a células vasculares) y selectinas. La expresión de CD31 (PECAM-1 o molécula de adhesión a plaquetas y células endoteliales) en las CESHs ha sido objeto de debate durante mucho tiempo por la inconsistencia en su detección con diferentes métodos. Sin embargo, se pudo detectar el receptor en el interior de las CESHs normales, y recién al sufrir éstas el proceso de capilarización, CD31 se detectó en la membrana plasmática, como en el resto de los tejidos endoteliales [19]. No existe un marcador específico de las CESHs, la mayoría de los investigadores utiliza una combinación específica particular lo que da lugar a diferencias muy significativas. Entre los marcadores consensuados se encuentran CD32b+, CD4+, VEGFR2+, VE (vascular endotelial)-Cadherin+, Stabilin-1+, Factor VIII+, CD33+, CD31- y CD34- [20]. Recientemente fue propuesto un prometedor gen marcador específico en ratón, *Oit3* [21].

Las CESHs comparten la expresión de algunos receptores con las células de Kupffer, por ejemplo, los receptores de reconocimiento de patrones tipo Toll [22], la capacidad endocítica descrita previamente, expresión de antígenos e inmunocomplejos [23], [24]. Por otro lado, las CESHs también funcionarían como células presentadoras de antígenos ya que expresan el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) tipo I y II y existe evidencia que sugiere la presentación cruzada de antígenos a linfocitos T CD8 y CD4, contribuyendo así a la inmunotolerancia hepática [25].

1.1.4 Células de Kupffer

Las células de Kupffer son macrófagos residentes hepáticos con un rol esencial en el sistema inmune e inflamación. Están asociadas a la monocapa endotelial, en la cara luminal, donde ejercen sus funciones [11]. La cantidad de macrófagos en la zona 1 del acino hepático es el doble aproximadamente respecto del que se encuentra en la zona 3. Dichas células de la zona 1 exhiben mayor capacidad fagocítica y producción de TNF- α (factor de necrosis tumoral α), PGE2 (prostaglandina E2) e IL-1 (interleuquina 1) que las de la zona 2 [26](Fig. 2C).

1.1.5 Células estrelladas

Las células estrelladas o de Ito son los pericitos del endotelio sinusoidal hepático. Se localizan en el espacio de Disse, donde una célula puede envolver hasta 4 CESH y regular el flujo sanguíneo sinusoidal por contracción. En estado fisiológico normal, estas células se encuentran en estado quiescente, almacenan vitamina A en gránulos internos y secretan componentes de la MEC. En estados patológicos, las células estrelladas se activan y desdiferencian hacia miofibroblastos proliferativos y fibróticos, secretando grandes cantidades de colágeno a la matriz. Este proceso es identificado como el principal impulsor de la fibrosis hepática. Las CESH saludables promueven la desactivación de las células de Ito a través de la producción de ON estimulada por VEGF-A (factor de crecimiento vascular A), mientras que el endotelio capilarizado pierde dicha propiedad [11], [17] (Fig. 3).

1.1.6 Células *pit*

Los linfocitos *natural killer* residentes del hígado se denominan células *pit*. Representan una población pequeña (1 cada 10 células de Kupffer), se encuentran asociados a la cara luminal del endotelio sinusoidal en contacto con los macrófagos. A diferencia de éstos, las células *pit* no poseen función endocítica ni fagocítica. En experimentos *in vitro* se ha observado la capacidad de inducir apoptosis en células tumorales mediante la secreción de perforina y granzima [27].

Las interacciones entre las distintas células residentes del hígado desencadenan procesos de crecimiento, proliferación, migración y diferenciación o mantenimiento de un fenotipo regular. Células en estado saludable o dañadas se vuelven reguladores positivos o negativos de las células vecinas a través de la producción de citoquinas, factores de crecimiento, segundos mensajeros y hormonas. A la MEC se la considera depositaria de estas moléculas, además de proteínas que pueden ser liberadas o utilizadas por células en la proximidad, otorgándole un rol central en la comunicación en el sinusoide (Fig. 3) [11].

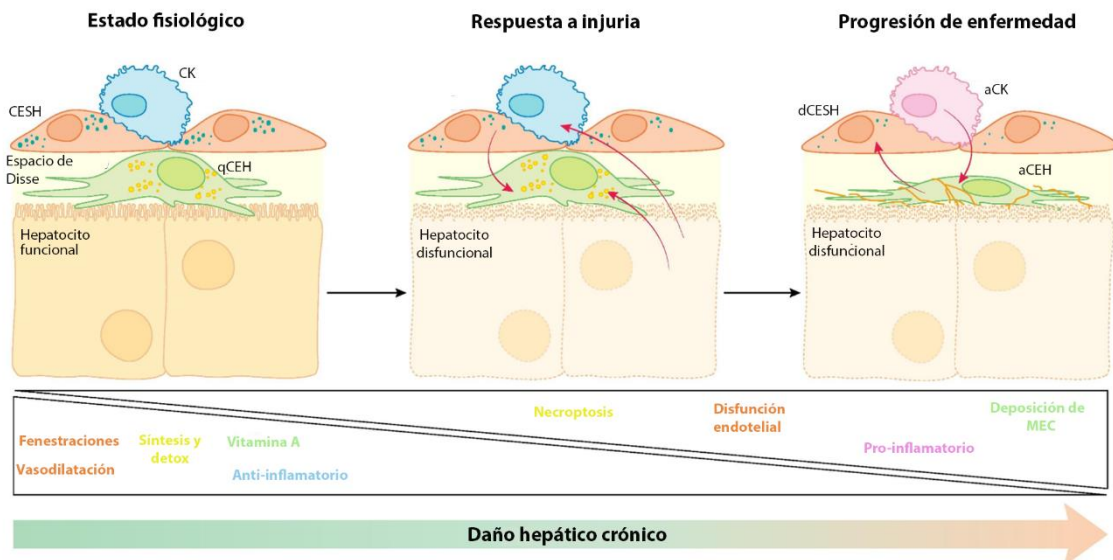


Figura 3. Comunicación entre células residentes del sinusoides hepático en enfermedades crónicas del hígado. La desregulación inicial de hepatocitos y células endoteliales sinusoidales hepáticas (CESH) debido a una injuria hepática conduce a una compleja red de interacciones parácrinas (flechas rojas) con células estrelladas hepáticas quiescentes (qCEH) y células de Kupffer (CK) produciendo, en última instancia, un microambiente sinusoidal disfuncional, compuesto por CESH disfuncionales (dCESH), células estrelladas activadas (aCEH), células de Kupffer activadas (aCK) y hepatocitos disfuncionales y necróticos. Las características fenotípicas de cada tipo celular se pierden progresivamente con el avance de la enfermedad hepática dando lugar a la pérdida de fenestraciones y vasodilatación en las CESH, deposición de MEC por las aCEH y aparición de un perfil proinflamatorio de las aCK. Tomado y adaptado de [11].

Poder dilucidar los mecanismos de esta comunicación particular en el sinusoides hepático resulta fundamental para profundizar en el conocimiento del hígado y sus patologías.

1.2 Carcinoma hepatocelular

1.2.1 Generalidades y epidemiología

El carcinoma hepatocelular o hepatocarcinoma (CHC) es el tipo de cáncer primario de hígado más frecuente (85-90 % total de los casos), seguido por el colangiocarcinoma. Es la tercera causa de muerte y el sexto cáncer más diagnosticado a nivel global [28], siendo la incidencia en hombres aproximadamente el doble que en mujeres y más predominante en Asia Oriental y África [29]. En Argentina, la tasa de

incidencia es menor a 5,6 casos anuales por cada 100.000 habitantes, equivalente a un nivel intermedio a nivel mundial [30].

Más del 90 % de los casos de CHC ocurren en un contexto de enfermedad hepática crónica. La cirrosis, independientemente de la etiología, es el factor de riesgo más importante. Los factores etiológicos más frecuentes incluyen el consumo crónico de alcohol, esteatosis no alcohólica asociada a diabetes u obesidad, infección por virus de hepatitis B o C y la edad, siendo la incidencia más alta en personas mayores a 70 años de edad. Menos frecuente son las cirrosis ocasionadas por colangitis biliar primaria o hemocromatosis [31]. En Argentina, las etiologías principales derivan de infecciones crónicas con el virus de la hepatitis C y alcoholismo. La enfermedad del hígado graso no alcohólico recientemente renombrada enfermedad hepática esteatótica asociada a disfunción metabólica (MASLD, por sus siglas en inglés) aumenta año a año como factor de riesgo [30].

1.2.2 Clasificación clínica

El sistema de clasificación por estadios utilizado generalmente en cáncer por la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) depende únicamente de la extensión de las lesiones, pero en el cáncer de hígado esto es más complicado ya que los pacientes tienen daño en el resto del órgano junto al carcinoma. Esto afecta no solo las opciones de tratamiento sino las perspectivas de supervivencia. Por esta razón, se han desarrollado otros sistemas de clasificación específicos que tienen en cuenta la función hepática también, siendo el más utilizado el de BCLC (*Barcelona Clinic Liver Cancer*) que incorpora el sistema de estadios de cirrosis *Child-Pugh*. En base a los niveles sanguíneos de bilirrubina, albúmina y tiempo de protrombina, más la evaluación de fluido ascítico en abdomen y la existencia de encefalopatías, el CHC se categoriza en estadios A (función hepática normal), B (anomalías leves) y C (anomalías severas) [32].

La clasificación BCLC se divide en 5 etapas (0-A-B-C-D), las cuales van asociadas a una estrategia de tratamiento específica para cada una (Fig. 4) [33]. En estadios tempranos se puede recurrir a las terapias más efectivas que incluyen la resección quirúrgica o el trasplante, pero menos del 40 % de los pacientes son diagnosticados en este estadio. Aun así, la tasa de recurrencia y metástasis post-cirugía es muy elevada [34], [35].

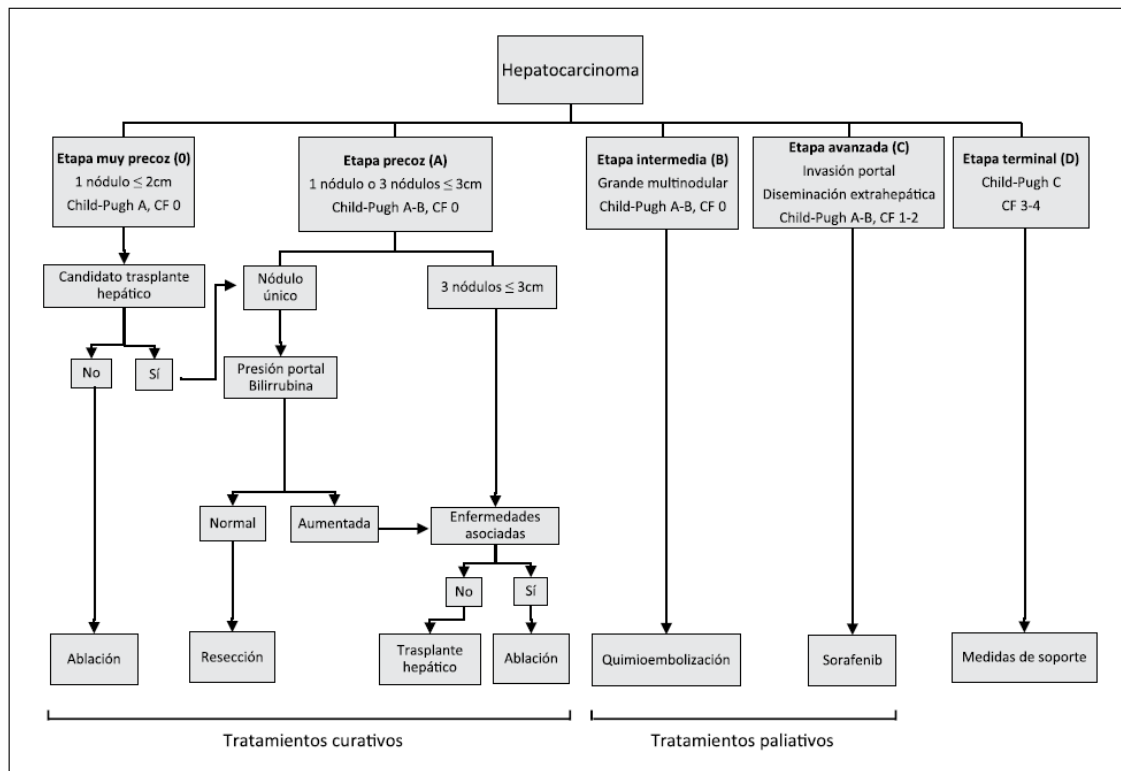


Figura 4. Clasificación BCLC y estrategias de tratamiento para CHC. Descripción de etapas de hepatocarcinoma: 0 (muy precoz), A (precoz), B (intermedia), C (avanzada) y D (terminal). Clasificación de cirrosis hepática *Child-Pugh*: A (función hepática normal), B (anomalías leves) y C (anomalías severas). Capacidad funcional (CF) sin síntomas = 0; 1 = con síntomas leves, capaz de hacer actividad ligera; 2 = capaz de autocuidarse, pero no de trabajar; 3 = capacidad limitada de autocuidado, en cama o sentado > 50 % del tiempo; 4 = dependiente, postrado. Tomado de [36].

1.2.3 Fisiopatología

El mecanismo fisiopatológico para el desarrollo del CHC es un complejo proceso de múltiples etapas. La interacción de varios factores son el origen de los primeros pasos de la transformación maligna del hepatocito y el desarrollo del CHC. Entre ellos se incluyen una predisposición hereditaria, interacciones recíprocas entre factores de riesgo virales y no virales, el microambiente tumoral, infiltración inmune y la severidad de la enfermedad hepática crónica de base [31].

La célula de origen del CHC es objeto de debate. El modelo actual propone el desarrollo metastásico a partir de células madre hepáticas, mientras que tradicionalmente se atribuyó a la transformación de hepatocitos maduros, los cuales poseen una vida media de 5 meses y retienen un considerable potencial proliferativo en respuesta a una injuria. Dada la alta plasticidad celular y metaplasia, la morfología y firma epigenética de un tumor no necesariamente refleja la célula de origen [37].

En el CHC se han identificado alteraciones recurrentes en proto-oncogenes o genes supresores de tumores. La activación de telomerasas debido a una mutación del promotor *TERT*, inserciones virales, traslocación cromosómica o amplificación génica, son las alteraciones más frecuentes observadas en ~80 % de los casos. Se demostró también la activación de la vía WNT- β -catenina en el 30-50 % de los casos a causa de mutaciones en el gen de β -catenina (*CTNNB1*), *AXINI* o inactivación de *APC* (inhibidores de la vía WNT) [38], [39]. Otras mutaciones frecuentes se encuentran en genes involucrados en el control del ciclo celular (*TP53*, *RBI*, *CCNA2*, *CCNE1*, *PTEN*, *ARID1A*, *ARID2*, *RPS6KA3* o *NFE2L2*), en genes implicados en la regulación epigenética, en el estrés oxidativo y en las vías de MAPK (proteína kinasa activada por mitógenos) y AKT-mTOR, como así también en los genes *CCND1*, *FGF19*, *VEGFA*, *MYC* o *MET*, donde se observan amplificaciones que conducen a la activación de varias vías de señalización proto-oncogénicas [40][31]. A pesar de que las mutaciones se acumulan azarosamente, ciertos genes específicos están emparentados con subclases moleculares de CHC definidas por perfiles transcriptómicos y fenotipos histológicos [41], [42].

Las clases moleculares de CHC fueron definidas en base al principal conductor molecular (*driver*) y las vías de señalización involucradas o estatus inmune del tumor. Se definen según las alteraciones genómicas, el perfil histopatológico y desenlace clínico (Fig. 5). La clase proliferativa constituye el ~50 % de los casos de CHC, está enriquecida en mutaciones en el gen *TP53* y en amplificaciones de los genes *FGF19* o *CCND1*, está asociada a la infección por el virus de hepatitis B y tiene el peor pronóstico. Incluye dos subclases: progenitor y de la vía WNT-TGF β (factor de crecimiento transformante β). La primera se caracteriza por la activación de las vías proliferativas clásicas (PI3K (fosfoinositol-3-kinasa)-AKT-mTOR, RAS-MAPK, cascadas de señalización MET e IGF (factor de crecimiento similar a insulina) y por la expresión de marcadores moleculares de células progenitoras como EPCAM (molécula de adhesión de células epiteliales) y α -fetoproteína (AFP). El grupo WNT-TGF β está caracterizado por la vía de activación no canónica WNT.

Por otro lado, la clase no proliferativa prevalece en el CHC asociado al consumo alcohólico y a la infección crónica con el virus de hepatitis C, y presenta mejores desenlaces clínicos. Se observan al menos dos subclases dentro de este grupo: una caracterizada por la activación de la vía WNT, asociada a mutaciones en el gen

CTNNB1, y la otra se caracteriza por la activación de la señalización del IFN α (interferón alfa) (Revisado en [31] (Fig. 5).

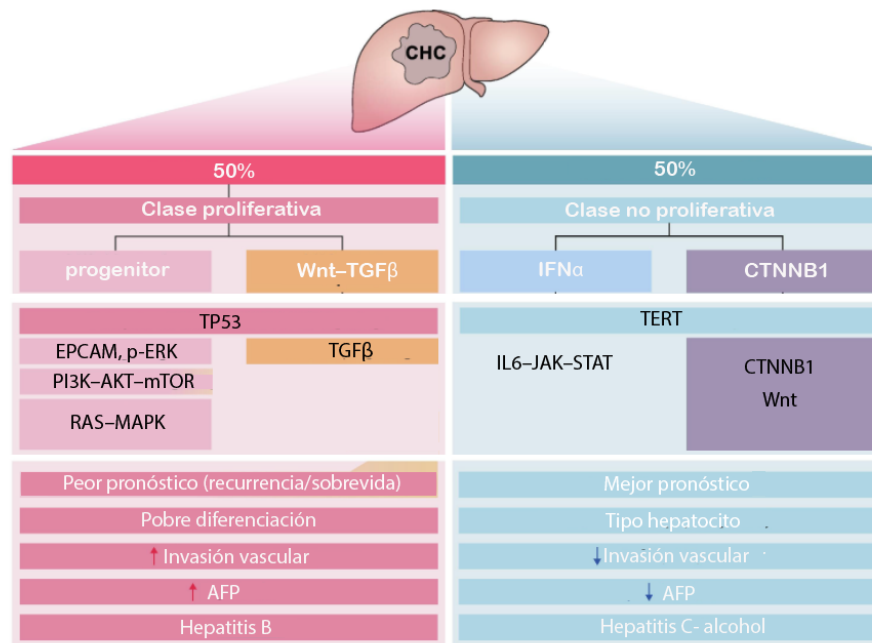


Figura 5. Clasificación molecular de CHC. Breve resumen de clases y subclases moleculares de CHC, principales mutaciones y vías de señalización, características clínicas y etiologías de cada subtipo. Tomado y adaptado de [41].

1.2.4 Roles de las CESHs en el CHC

Como ya se mencionó previamente, el desarrollo del CHC ocurre, la mayoría de las veces, en un contexto de enfermedad hepática crónica desde una lesión precancerosa a un tumor metastásico avanzado. Los nódulos displásicos se nutren de sangre preferentemente de la vía portal, pero en las primeras etapas del CHC ocurre un viraje hacia el suministro por vía arterial. De hecho, la detección de hipervascularización arterial es parte de los métodos no invasivos para establecer el diagnóstico clínico de CHC [43]. Las CESHs capilarizadas participan en este proceso de angiogénesis, coagulación y fibrinólisis que remodelan la vasculatura tumoral y dan como resultado un tumor altamente irrigado que promueve la tumorigénesis y el desarrollo de metástasis [44]. Las CESHs diferenciadas o maduras son capaces de mantener a las células estrelladas quiescentes en parte, debido a la liberación del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF por sus siglas en inglés) que las mantiene en ese estado. Por lo tanto, las CESHs son las principales protectoras de la fibrosis a través de este mecanismo. Las CESHs capilarizadas liberan fibronectina, lo cual se ha demostrado que

promueve la activación de las células estrelladas. La acumulación de colágeno en el espacio de Disse podría contribuir a la pérdida de fenestraciones endoteliales agravando la fibrosis hepática y autoperpetuando un ciclo proinflamatorio entre células estrelladas y CESHs capilarizadas que contribuyen a la extensión de la fibrosis (Revisado en [11]).

La regeneración hepática implica la participación no solo de los hepatocitos sino también de componentes del plasma como, células progenitoras sinusoidales y del sistema inmune, y plaquetas. Ante una injuria se induce la expresión hepática de VEGF, lo que induce el reclutamiento de células progenitoras sinusoidales ricas en factores de crecimiento hepatocitario (HGF) a la vez que promueve la expresión de este factor en CESHs residentes. HGF estimula la proliferación de hepatocitos y los progenitores sinusoidales reemplazan las CESHs perdidas en la lesión original. Los cuerpos apoptóticos de los hepatocitos producidos, capturados por las células estrelladas y las de Kupffer contribuyen a la activación de las mismas [45]. Luego de la injuria también se reclutan y secuestran plaquetas, que se adhieren a las CESHs. La activación plaquetaria subsiguiente resulta en la liberación de gránulos plaquetarios que estimulan también la proliferación de los hepatocitos. Las plaquetas también activan a las CESHs peritumorales, las cuales secretan factores de crecimiento como interleuquina-6 (IL-6), cuyos receptores se encuentran en las células de Kupffer y hepatocitos, estimulando una cascada de señalización vía JAK-STAT3 que desencadena el proceso tumorigénico y la angiogénesis del tumor [46].

1.2.5 Diagnóstico y tratamiento

Dado que la mayoría de los casos de CHC ocurren en una población de pacientes identificable (pacientes con hepatitis B crónica o cirrosis) existe un sistema de vigilancia que permite diagnosticar el tumor en etapas tempranas. Aun así, un 50 % de individuos se diagnostica por la presencia de una masa hepática identificada en imágenes solicitadas debido a otras razones o debido a sintomatología avanzada del CHC (dolor abdominal, pérdida de peso, empeoramiento de la disfunción hepática) (Revisado en [31]).

Los métodos de diagnóstico incluyen la determinación de niveles séricos de AFP (> 20 ng/ml) o la detección de nódulos hepáticos en imágenes de ecografía, los cuales requieren de un seguimiento en el tiempo. La mayoría de las lesiones menores a 1 cm de diámetro no suelen ser CHC, o no pueden diagnosticarse y deben repetirse los estudios

cada 3 meses. Las lesiones mayores a 1 cm deben ser evaluadas mediante tomografía computada o resonancia magnética nuclear con contraste. Estas metodologías pueden detectar un fenómeno conocido como hiperrealce de la fase arterial que proporciona información sobre el grado y patrón de la vascularización, y permite diagnosticar un carcinoma con 96 % de especificidad sin requerir confirmación histológica [31]. Hasta un ~30 % de los tumores posee una presentación atípica en el diagnóstico por imágenes. Histológicamente, el CHC presenta invasión del estroma, densidad celular aumentada, tractos portales intratumorales, arterias no pareadas, patrón pseudoglandular y hepatocitos con vacuolas lipídicas. Algunos pacientes requieren múltiples biopsias para un diagnóstico certero [47].

El tratamiento se asigna dependiendo del estadio del tumor y la relación costo-beneficio de intervenciones quirúrgicas siguiendo los preceptos de la BCLC (Fig. 4). Los pacientes con tumores en estadios tempranos son los candidatos preferenciales para la resección, trasplante y ablación local, mientras que los que se encuentran en estadios intermedios son candidatos a la quimioembolización. Este procedimiento es poco invasivo y bloquea el suministro de sangre al tumor luego de administrar drogas terapéuticas (Doxorrubicina, mitomicina C, cisplatino) en los vasos sanguíneos cercanos al tumor [36], [48].

Los pacientes con tumores en etapas avanzadas reciben primero tratamiento sistémico. En 2007 se aprobó el uso clínico de Sorafenib, un inhibidor de múltiples quinasas celulares que demostró una sobrevida de 2 o 3 meses en pacientes con CHC avanzado. Actúa bloqueando la proliferación y la angiogénesis tumoral al inhibir las vías de señalización de VEGF, PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), EGF (factor de crecimiento epidérmico) y de c-RAF [49]. Casi 10 años después fue aprobada la droga Lenvatinib, de administración oral, con la capacidad de inhibir las vías de señalización de VEGF, PDGF, del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y del receptor RET, y mostrando un éxito similar al Sorafenib [50]. En un estudio clínico más reciente, se observó que la terapia combinada de Atezolizumab (anti-PDL1) y Bevacizumab (anti-VEGF) mejoró la sobrevida total comparada con la del tratamiento con Sorafenib [51]. Como segunda línea de tratamiento, actualmente se utilizan tres fármacos aprobados, Regorafenib, Cabozantinib y Ramucirumab, siendo este último un anticuerpo anti-VEGFR-2. En base a nuevos estudios clínicos en fase II, existen otras terapias adicionales aprobadas post Sorafenib, tales como Pembrolizumab, Ipilimumab y Nivolumab. Este último es un inhibidor de la proteína PD-1, una molécula presente

en células de la inmunidad innata y adquirida, que induce apoptosis al unirse a su ligando interfiriendo con la tolerancia inmunológica del hígado [31]. El uso de estas terapias mejoró sustancialmente la sobrevida con una media de ~36 meses (estadios 0 y A); ~16 meses (B y C) y ~6 meses (D) en pacientes con un hígado bien preservado (Child-Pugh *score*: A) y enfermedad compensada (Revisado en [31]).

El proceso angiogénico como blanco terapéutico ha demostrado ser de suma importancia como parte del manejo de la patología, especialmente con los nuevos ensayos clínicos utilizando Bevacizumab y Ramucirumab [51], [52]. Sin embargo, la quimiorresistencia, la recurrencia y la metástasis son las causas más frecuentes de mortalidad entre los pacientes con CHC, lo que muestra la necesidad de seguir explorando los mecanismos que subyacen a la diseminación de células tumorales para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

1.3 Angiogénesis en el CHC

1.3.1 Biología vascular

En el embrión humano, los capilares sanguíneos surgen a partir de precursores endoteliales compartidos con los progenitores hematopoyéticos. Esta relación emparentada entre el sistema sanguíneo y el sistema vascular es fundamental y se mantiene a lo largo de toda la vida del individuo, incluso en la enfermedad. Los progenitores de origen mesodérmico se diferencian a angioblastos que se ensamblan en un laberinto vascular primitivo de pequeños capilares. Este proceso se denomina vasculogénesis [53]. Durante la fase angiogénica, el plexo vascular se expande de forma progresiva por medio de brotación y remodelación de capilares hacia una red vascular organizada de vasos que se ramifican en capilares más pequeños. Los canales endoteliales nacientes se cubren de pericitos y células de músculo liso proveyendo resistencia y la capacidad de regular la perfusión del vaso; este proceso se denomina arteriogénesis. Por su parte, los vasos linfáticos, encargados de recuperar el plasma que se filtra por los capilares en los tejidos y devolverlo al sistema sanguíneo, se transdiferencian a partir de tejido venoso (Revisado en [54]).

En individuos adultos, la mayoría de los vasos sanguíneos se encuentra en estado quiescente y la angiogénesis fisiológica ocurre solamente en el ciclo menstrual en el

ovario, en la placenta durante el embarazo y en los procesos de reparación de heridas. Las células endoteliales (CE) retienen la habilidad de rápida división ante estímulos fisiológicos como hipoxia e inflamación. En estas condiciones, la angiogénesis es un proceso altamente regulado que se inicia por breves períodos y luego es inhibida por completo[54].

El proceso angiogénico ocurre en una sucesión de etapas que incluyen la activación, proliferación y migración de las células endoteliales, y culmina con la maduración de los vasos formados. La regulación de este proceso es compleja e involucra interacciones entre células, numerosos factores solubles pro- y anti-angiogénicos y componentes de la MEC. En la figura 6 se observa un resumen resaltando las interacciones más relevantes.

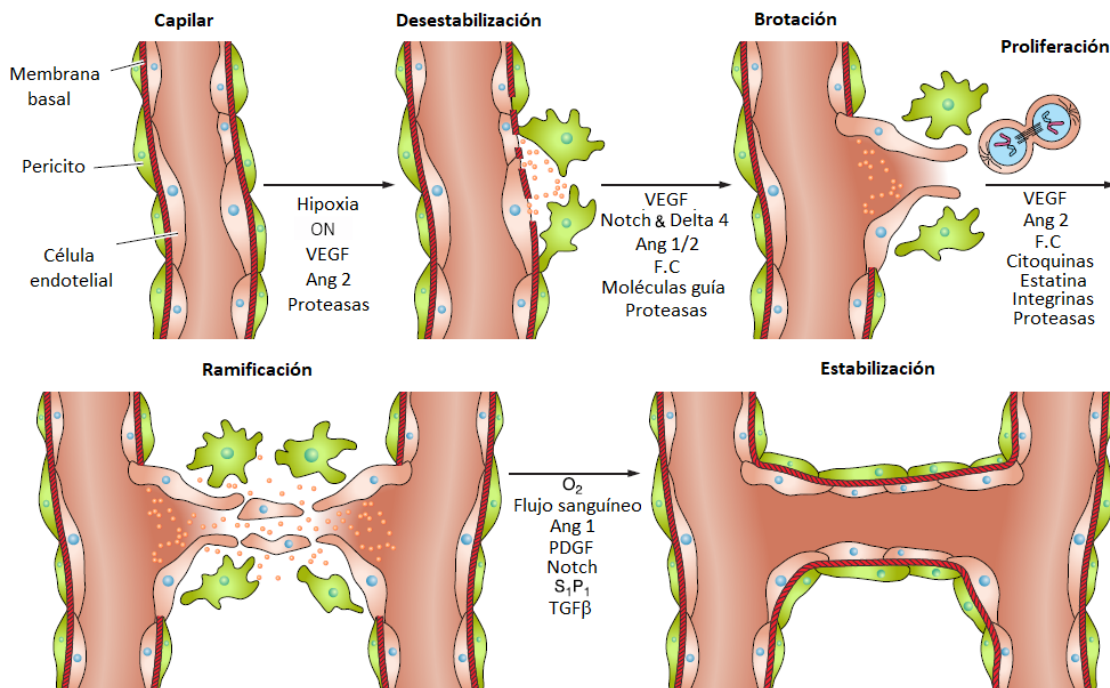


Figura 6. Etapas de la angiogénesis. La formación de nuevos vasos a partir de vasculatura pre-existente consta de etapas secuenciales finamente reguladas, que involucran distintitos factores pro- y anti-angiogénicos. Tomado y adaptado de [55].

La hipoxia en los tejidos regula positivamente la expresión y liberación de diversos factores pro-angiogénicos como VEGF, angiopoyetina-2 y óxido nítrico sintasa (NOS) [56]. El ON dilata los capilares y VEGF activa las CE en reposo en vasos sanguíneos adyacentes interrumpiendo el contacto célula-célula interendotelial, lo que causa vasopermeabilidad [57]. Las CE proliferan y migran, aunque solo una porción de ellas es seleccionada para este proceso de brotación y responden a las señales pro-

angiogénicas por mecanismos que involucran a receptores NOTCH y su ligando DELTA-like 4 [58]. La dirección de la migración de las CE está dirigida por VEGF, angiopoyetina-1 y -2 (Ang 1/-2) y el factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF). Otras citoquinas que contribuyen a este proceso son el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidermal (EGF), TGF β y las moléculas guía efrinas, semaforinas y netrinas [59]. Las CE activadas degradan la membrana basal y la MEC circundante mediante la secreción de proteasas que incluyen activadores del plasminógeno, metaloproteinasa de matriz (MMPs por sus siglas en inglés), heparinasas, triptasas y catepsinas. Estas proteasas degradan y alteran la composición de la MEC permitiendo el avance de las CE, y además mantienen secuestrados y almacenados distintos factores angiogénicos que son liberados después de la degradación y continúan estimulando a las CE [59].

El proceso de angiogénesis involucra también la proliferación de las CE, inducida principalmente por VEGF y Ang-2. La matriz degradada permite la adhesión de la célula endotelial mediada por integrinas, como por ejemplo los heterodímeros $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$, que participan en la comunicación intercelular con los receptores de VEGF y bFGF para promover o inhibir la proliferación de la CE [60]. Finalmente las CE se ensamblan en una estructura tubular. En la subsecuente formación de un lumen participa una estatina endotelial vascular asociada a la MEC (EGFL7) lo que conduce a la formación de nuevos capilares sanguíneos [61]. El flujo sanguíneo comienza a circular distribuyendo oxígeno, lo que disminuye la expresión local de VEGF y por tanto, la proliferación de las CE. Se secretan los componentes para una nueva membrana basal y los pericitos son reclutados, estos intervienen en la estabilización y maduración de los vasos recién formados. Este proceso está regulado por angiopoyetina-1 y su receptor Tie2, PDGF y el receptor β , la señalización a través de NOTCH, esfingosina-1-fosfato y el receptor de esfingolípidos acoplado a proteína G, y TGF β [62], [63]. Las proteasas también pueden modular este proceso liberando proteínas asociadas a la MEC como trombospondina-1, canstatina, tumstatina y endostatina e inhibidores no derivados de la MEC que incluyen angiostatina, vasoinhibinas, antitrombina II, protrombina kringle-2, plasminógeno kringle-5 y vasoestatina [64].

1.3.2 Angiogénesis tumoral

En 1971 se demostró por primera vez que un tumor no puede crecer más allá de unos milímetros si no recluta nuevos capilares de vasos sanguíneos, proponiéndose que el crecimiento tumoral es dependiente de la angiogénesis y que el propio tumor secreta factores difusibles que podrían estimularla [65]. Para ello, el tumor debe transformarse hacia un fenotipo angiogénico (“*switch* angiogénico”), el cual es regulado por los factores pro- y anti-angiogénicos mencionados previamente [66]. Además del mecanismo de angiogénesis por brotación ya explicado, se han identificados otros tipos de neovascularización en tumores como: angiogénesis intususceptiva (vasos pre-existentes se dividen en dos nuevos vasos por la formación de un pilar de tejido transvascular en el lumen del vaso sanguíneo); reclutamiento de células endoteliales progenitoras (involucra la captación de angioblastos circulantes o de médula ósea en la formación de nuevos capilares); cooptación de vasos (crecimiento avascular del tumor en tejidos muy vascularizados); mimetismo vasculogénico (células tumorales se desdiferencian hacia un fenotipo endotelial formando estructuras tipo tubulares lo que provee al tumor un sistema secundario de circulación independiente de angiogénesis) y linfangiogénesis (activación de CE de capilares linfáticos que genera nuevos capilares) (Revisado en [67]).

Los vasos tumorales difieren de los vasos normales en algunos aspectos debido a la desregulación de las vías de señalización involucradas y la alteración de la expresión génica de los factores angiogénicos. En comparación a los normales, los nuevos vasos tumorales formados son estructural y funcionalmente anormales. Generalmente poseen un diámetro irregular, carecen de membrana basal, poseen una escasa cubierta de pericitos o la misma puede estar ausente, forman cortocircuitos arteriovenosos y no se organizan siguiendo un patrón jerárquico claro, lo que produce filtraciones [68]. Algunos tumores poseen canales formados por células epiteliales tumorales (mimetismo vasculogénico) o por capilares mosaico, donde las células tumorales forman hasta un 25 % de la cara luminal [69], [70]. Estas características tienen impacto en el diagnóstico y las estrategias terapéuticas a usar. Se describió que las filtraciones en los vasos tumorales generan la difusión de las sustancias de contraste para el diagnóstico por imágenes o el incremento de fluido intersticial, comprometiendo el *delivery* de drogas al tejido tumoral [71].

1.3.3 Regulación angiogénica en el CHC

Los vasos recién formados en los tumores hepáticos también exhiben anomalías que conllevan a áreas hipovasculares con hipoxia severa y/o necrosis, causando una fuerte estimulación angiogénica. Si bien la hipoxia está asociada al crecimiento, progresión y resistencia a las terapias [56][72], no existe evidencia directa de que sea la causa directa de la hipervascularización y arterialización en el CHC humano [73]. Por otra parte, también existen mecanismos independientes de hipoxia para la activación de genes *HIF* (factor inducible por hipoxia) y de otras vías de señalización angiogénicas [74]. Los hepatocitos tumorales, las células inmunes infiltrantes y las células estrelladas activadas secretan factores como VEGF, bFGF, angiopoyetinas, PDGF, PLGF (factor de crecimiento derivado de placenta) y TGF β , entre otros, y promueven la formación de nuevos capilares a partir de vasos cercanos. En la tabla 1 se muestra un resumen de los principales factores pro- y anti-angiogénicos y su relevancia en el CHC (Revisado en [75], [76]).

Particularmente en el hígado, la proteína X del virus de la hepatitis B estaría asociada a altos niveles de HIF-1 y MMPs, y a alteraciones en los genes *P53*, *RAS*, *MYC*, *C-JUN* que pueden regular positivamente algunos factores pro-angiogénicos, revisado en [43].

VEGF/VEGFR-2	Es el eje regulador de la angiogénesis más importante y estudiado, crítico para el crecimiento y desarrollo del CHC. Existen 5 genes para VEGF llamados <i>VEGF-A</i>, <i>VEGF-B</i>, <i>VEGF-C</i>, <i>VEGF-D</i> y <i>VEGF-E</i>. VEGFR-2 es estimulado por la unión de VEGF-A, C o D, siendo el VEGF-A el más importante. Esta interacción lleva a una cascada de fosforilación resultando en proliferación, migración y tubulogénesis de CE. Los nuevos capilares poseen anomalías y filtraciones, en parte, por la sobreexpresión de VEGF, lo que resulta en áreas de gran presión intersticial y severa hipoxia o necrosis. El VEGF en circulación se encuentra aumentado en el CHC y correlaciona con la progresión y vascularización de tumores.
PDGF/PDGFR	El factor de crecimiento derivado de plaquetas es una familia de 4 isoformas de homodímeros PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D y un heterodímero PDGF-AB. La unión a los receptores PDGFR-tirosin kinasa α y β, expresados en fibroblastos, células de músculo liso y pericitos activa vías de señalización similares a las estimuladas por VEGF. En el CHC humano, la sobreexpresión del receptor correlaciona con la densidad microcapilar y peor pronóstico.
FGF/FGFR	Los factores de crecimiento de fibroblastos son una familia de 22 miembros que funcionan como ligandos de 4 receptores tirosin kinasa (FGFR-1,-2,-3 y -4). La comunicación intercelular de las vías bFGF y VEGF-A durante las fases iniciales del crecimiento tumoral induce la neovascularización. Ambos factores se asocian a sinusoides capilarizados en la angiogénesis del CHC. bFGF también modula la expresión de integrinas en CE y en otras células del microambiente tumoral.
Angiopoyetina/Tie2	Ang-1 y -2 son ligandos del receptor Tie2 en CE activadas. Ang-1 está ampliamente expresada en células murales (pericitos y músculo liso), Ang-2 se encuentra restringida a los sitios de remodelación vascular. Ambas isoformas tienen similar afinidad por Tie2. Mientras Ang-1 media la activación, Ang-2 antagoniza la unión, lo que modularía la vía. Ang-1 estabilizaría los vasos sanguíneos mientras que la sobreexpresión de Ang-2 en áreas de remodelado inhibe esta interacción, desestabilizando las células murales, un paso necesario para facilitar la proliferación o la brotación en presencia de VEGF. Los niveles de Ang-2 se ven incrementados en la cirrosis y aún más en el CHC.
Endogлина (CD105)	CD105 está regulado positivamente en las CE en proliferación en el CHC. Es un correceptor para bFGF. Su expresión correlaciona con el estadio, la diferenciación y agresividad del tumor de CHC. CD105 promueve la invasión y metástasis de hepatocitos tumorales al incrementar los niveles de VEGF.

Tabla 1. Principales factores pro-angiogénicos en el CHC. Tomado y adaptado de [75], [76].

Sección 2: Galectinas

2.1 Consideraciones generales de las galectinas

Las galectinas son una familia de proteínas evolutivamente conservada con afinidad por β -galactósidos. En 1975, galectina-1 (Gal-1) fue el primer miembro de la familia de las galectinas en ser descubierta en la anguila eléctrica. Esta proteína, llamada electrolectina, poseía capacidad de hemaglutinar eritrocitos de conejo tripsinizados [77]. En los años posteriores se encontraron lectinas similares en extractos de distintos tejidos y de otras especies animales que fueron nombradas según su origen y peso molecular aparente. Por ejemplo: una lectina de 29 kDa aislada de pulmón de rata se denominó RL29 (por sus siglas en inglés, 29 kDa *rat lung lectin*); una proteína de 35 kDa que une carbohidratos se llamó CBP35 (35 kDa *carbohydrate-binding protein*) y una lectina de 31 kDa aislada de células tumorales se identificó como L-31 (*cancer cell lectin of 31 kDa*). Actualmente, se uniformó la nomenclatura y estas proteínas se reconocen como galectina-3 (Gal-3) (Revisado en [78]).

Las galectinas reconocen específicamente al disacárido N-acetil-galactosamina (Gal β (1–4)-GlcNAc; LacNAc) presente en la superficie de glicoconjugados, a través de un dominio de reconocimiento a carbohidratos (DRC) que corresponde a una secuencia de aproximadamente 130 aminoácidos. El DRC se pliega espacialmente adoptando una estructura de *sandwich* β formada por dos hojas β antiparalelas. Notablemente, la unión a carbohidratos involucra 7 residuos aminoacídicos altamente conservados entre estas lectinas [79]. En 1994, se unificaron todas las proteínas descubiertas hasta el momento dentro de una misma familia bajo el nombre de galectinas, en base a su similitud de secuencia en el DRC y su capacidad de unirse a β -galactósidos [80].

Hasta la fecha se han identificado 15 galectinas en mamíferos, de las cuales 12 se encuentran en humanos [81]. Según las características estructurales se clasifican en 3 grupos (Fig. 7):

- Prototipo: poseen un único DRC. Se encuentran como monómeros o pueden dimerizar. Pertenecen a este grupo las galectinas -1, -2, -5, -7, -10, -11*, -13, -14 y -15* y -16.

- Quimera: poseen un único DRC ubicado en el extremo carboxilo al cual se fusiona una cola de aminoácidos ricos en prolina y glicina lo que permite formar estructuras tri o pentaméricas [81]. Galectina-3 es la única representante de este grupo.
- Repeticiones en tándem: poseen dos DRC distintos conectados por un péptido *linker*. Pertenecen a este subgrupo las galectinas -4, -6, -8, -9 y -12.

*misma proteína descubierta en placenta y ovario de oveja.

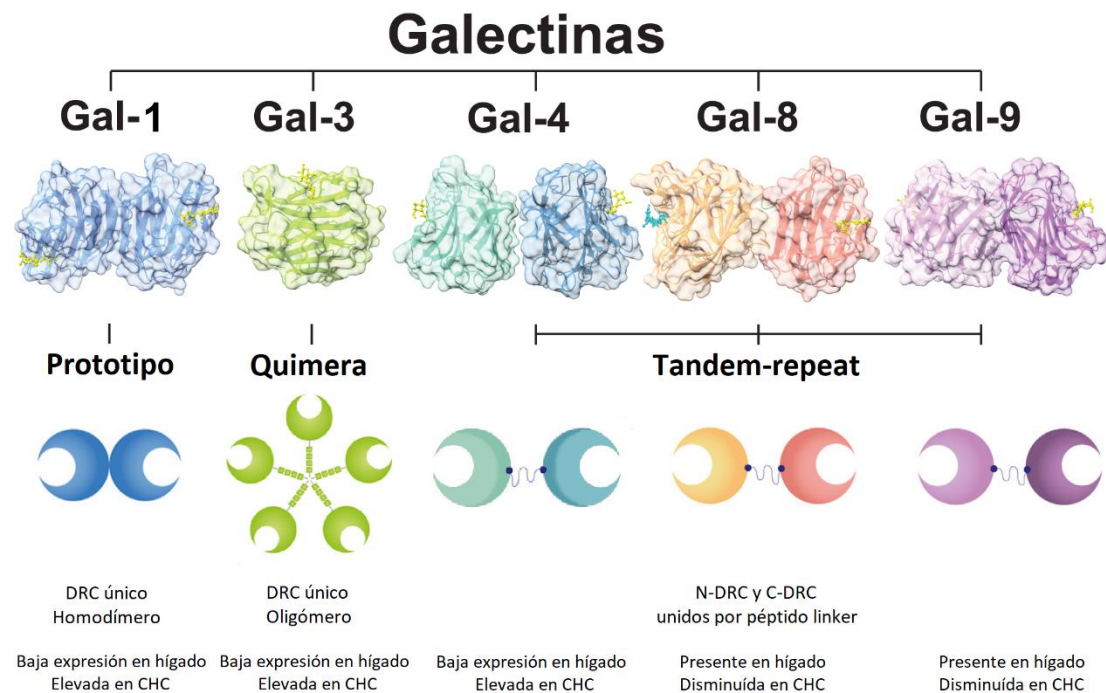


Figura 7. Estructura conservada de galectinas-1, -3, -4, -8 y -9, y clasificación según su estructura.

En base a sus características estructurales, las galectinas se clasifican en “prototipo”, “quimera” y “de repeticiones en tándem”. La estructura del DRC de Gal-1 se muestra en color azul (Código de identificación en el *Protein Data Bank*, PDB: 4Y1U); la del DRC de Gal-3 en verde (PDB: 4R9A); la del DRC del extremo amino (N-DRC) de Gal-4 en verde malaquita y la de su extremo carboxilo (C-DRC) en turquesa (PDB: 4YM3); la del N-DRC de Gal-8 en naranja y la de su C-DRC en rojo (PDB: 3VKM); y la del N-DRC de Gal-9 está mostrada en lila y la del C-DRC en violeta (PDB: 3WV6). Todas las estructuras están representadas en complejo con lactosa (amarillo) y el N-DRC de Gal-8 con SiaLac (3´ sialillactosa) en color cian. Adaptada de [82].

En cuanto a la distribución tisular, algunos miembros de la familia como Gal-1, Gal-3, Gal-8 y Gal-9 se encuentran expresadas de forma ubicua incluyendo células del sistema inmune, sistema gastrointestinal, fibroblastos y neuronas, mientras que otras galectinas tienen una localización tisular más restringida, como Gal-7 encontrada preferencialmente en el epitelio escamoso estratificado de intestino y piel, Gal-12

expresada en el tejido adiposo, Gal-5 en los eritrocitos, Gal-13 en la placenta o Gal-10 en eosinófilos y basófilos [83], [84].

Las galectinas se encuentran en el núcleo, citoplasma y también son secretadas quedando asociadas a la membrana plasmática o la MEC. No poseen péptido señal, son sintetizadas en ribosomas libres del citoplasma y exportadas a través de una vía no clásica, independiente de Golgi, con un mecanismo no completamente dilucidado [85], [86]. Estudios recientes sugieren que involucraría una acumulación de galectinas en parches discretos bajo la membrana plasmática y su externalización a través de vesículas extracelulares [87]. La oligomerización facilita algunas funciones de las galectinas como las interacciones célula-célula o célula-MEC. Estas interacciones proteína-glicano ocurren principalmente fuera de la célula mientras que las interacciones proteína-proteína en el citoplasma o núcleo median funciones intracelulares como *splicing* de pre-ARNm o señalización en apoptosis [88], [89].

En cuanto a las diversas funciones, dependiendo de la etapa del desarrollo del organismo y la localización tisular, estas proteínas asumen diversos roles en la regulación del ciclo celular, la apoptosis, la inmunidad, la diferenciación celular y la morfogénesis, entre otras [90]. Considerando la amplia variedad de funciones de las galectinas no es extraño que la desregulación de la expresión de las mismas esté implicada en distintas patologías, incluyendo inflamación y cáncer [81]. Las galectinas han demostrado facilitar varios procesos clave de la progresión tumoral, como la transformación de las células tumorales, metástasis y el escape inmune [91].

2.1.1 Galectinas en el CHC

Mientras que en el hígado normal Gal-1, -3 y -4 se expresan en niveles constitutivos bajos, su expresión en hepatocitos tumorales se encuentra incrementada. Por otro lado, la expresión de Gal-8 y Gal-9 en tumores hepáticos se encuentra alterada. La expresión aberrante de estas galectinas correlaciona con el crecimiento tumoral, la adhesión de células de CHC a la MEC, la migración e invasión, la agresividad del tumor, la metástasis, la recurrencia post-cirugía y el mal pronóstico (Revisado en [92]).

2.2 Galectina-1

Gal-1 es una proteína de ~14,5 kDa, contiene 135 aminoácidos y está codificada por el gen *LGALS1*, de las siglas en inglés *lectin, galactoside-binding, soluble 1* [80]. Es una proteína soluble que pertenece al grupo de galectinas prototipo ya que posee un único DRC, y que se encuentra como homodímero en solución. Cada monómero presenta una estructura de sándwich β , formada por dos hojas β antiparalelas de cinco (F1-F5) y seis (S1-S6a/b) cadenas cada una. Los extremos carboxilo y amino de cada monómero se encuentran en la interfase del dímero, cuya integridad es mantenida por interacciones hidrofóbicas, mientras que el DRC se localiza en cada subunidad en un bolsillo formado por las cadenas S4-S6a/b (Fig. 8) [93]. Cada monómero contiene seis residuos de cisteína (Cys2, Cys16, Cys42, Cys60, Cys88 y Cys130), los cuales deben encontrarse reducidos para mantener la actividad de lectina [94]. El homodímero se disocia espontáneamente en concentraciones menores a 7 μ M y la forma monomérica puede unirse a carbohidratos, pero lo hace con menor nivel de afinidad [95].

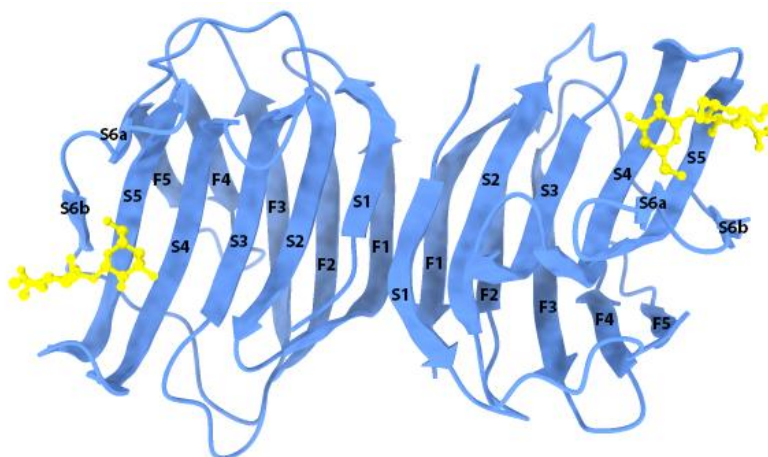


Figura 8. Estructura de Gal-1. Representación en modelo de cintas de la estructura cristalizada de Gal-1 (azul) unida al ligando lactosa (amarillo), resuelta por difracción de rayos X; PDB: 4Y1U. Cada monómero de Gal-1 posee una estructura de sándwich β : dos hojas β antiparalelas de cinco (F1-F5) y seis (S1-S6) hebras, respectivamente.

Gal-1 se encuentra tanto en el interior como en el exterior celular. Es una proteína con características citosólicas como un N-terminal acetilado y ausencia de glicosilaciones. Se la ha encontrado en el núcleo, citosol, a ambos lados de la membrana plasmática y en la MEC, a pesar de no poseer una secuencia señal de secreción para la vía clásica de retículo endoplasmático/Golgi (Revisado en [96]). Existe evidencia de

una posible exportación vía vesículas, el DRC constituiría el motivo *target* para la maquinaria de traslocación que utilizaría proteínas glicosiladas exponiendo residuos de β -galactósidos, funcionando además como mecanismo de control de calidad ya que la maquinaria de exportación solo reconocería galectinas correctamente plegadas [97].

Desde su descubrimiento, Gal-1 ha demostrado su participación en diversos procesos fisiológicos y patológicos. Las funciones intracelulares de Gal-1 se encuentran principalmente mediadas por interacciones proteína-proteína. Se conoce su participación en el procesamiento de ARNm al interactuar con la proteína gemin 4 en el núcleo celular [98], y su interacción con Raf-1 mediando la estabilización de H-RAS y la activación de la vía ERK [99]. En cuanto a las funciones extracelulares de Gal-1, que son dependientes de su actividad de lectina, ocurren gracias a la interacción del DRC con los glicoconjugados expuestos en la superficie celular y la MEC. Al igual que los otros miembros de la familia, Gal-1 posee la capacidad de configurar complejos multivalentes con glicoconjugados similares a redes o mallas denominadas *lattices* [100]. Estas redes formarían parte de la organización de dominios de membrana, en la regulación de umbrales de señalización y en la persistencia de receptores en la superficie celular disminuyendo la endocitosis [101].

Se han descripto funciones de Gal-1 en el desarrollo y diferenciación del tejido hematopoyético, músculo esquelético por la estimulación de células madre neuronales [96], así como funciones durante el embarazo como la modulación de la respuesta inmune materna, roles en la implantación y placentación del embrión, migración del trofoblasto, invasión, formación del sincicio, entre otros (Revisado en [102]).

Dentro del sistema inmune Gal-1 cumple variadas funciones. Se encuentra abundantemente expresada en sitios inmunoprivilegiados como placenta, testículo y ojo, a la vez que es regulada positiva o negativamente en condiciones inflamatorias incluyendo infecciones microbianas, autoinmunidad, alergias, enfermedades neurodegenerativas, desórdenes reproductivos y cáncer (Revisado en [103]). En modelos experimentales se observó que la expresión de Gal-1 es máxima durante la fase de resolución en enfermedades autoinmunes como encefalomiелitis, artritis reumatoidea o diabetes autoinmune entre otras, a través de la modulación de macrófagos, neutrófilos y células dendríticas [104]. Por otro lado, Gal-1 cumple un rol esencial al inducir la apoptosis de linfocitos T activados [105], [106].

Se ha reportado la expresión incrementada de Gal-1 en carcinoma de hígado, colon, mama, pulmón, cabeza y cuello, ovario, próstata, sarcoma de Kaposi, neoplasia

mieloproliferativa y linfoma de Hodgkin (Revisado en [107]). Gal-1 también se ha encontrado sobreexpresada en el estroma circundante a las células tumorales [108], [109]. Gal-1 extracelular también fue detectada en el plasma de pacientes con cáncer colorrectal y carcinoma escamoso de cabeza y cuello, a la vez que altos niveles correlacionaron con peores pronósticos [110], [111]. Resultados similares, vinculando altos niveles de Gal-1 en el tumor con el estadio de éste y el mal pronóstico clínico fueron encontrados en pacientes con cáncer gástrico, de cuello de útero, glioblastoma, colon, mama, sarcoma de Kaposi y próstata, lo que posiciona a Gal-1 como posible biomarcador y blanco terapéutico en cáncer (Revisado en [107], [112]). Dado el especial interés de este trabajo en el CHC, la participación de Gal-1 en este tipo de cáncer será abordado en detalle, así como sus roles en la angiogénesis y diseminación tumoral.

2.2.1 Gal-1 en el CHC

El estado de metilación del promotor del gen *LGALS1* fue identificado como un mecanismo central que controla la expresión de la proteína tanto en tejidos normales como en células transformadas y tumores [84]. En algunos trabajos se identificó la expresión de Gal-1 dramáticamente aumentada en el CHC y su correlación con peores pronósticos luego de la resección quirúrgica [113], [114]. Kondoh y colaboradores [115] estudiaron el estado de metilación del promotor del gen de Gal-1, encontrando que ciertos dinucleótidos CpG alrededor del sitio de inicio de la transcripción se encontraban frecuentemente metilados en el hígado no tumoral, mientras que en tumores y líneas tumorales se encontraba hipometilado. En un análisis de inmunohistoquímica en tumores de CHC se encontró también una acumulación preferencial de Gal-1 en el tejido estromal circundante al tumor sugiriendo la secreción y acumulación de Gal-1 por parte de los hepatocitos tumorales [116]. Resultados de nuestro laboratorio abonaron a esta teoría demostrando que la sobreexpresión de Gal-1 en células de CHC humano, HEPG2, promueve el crecimiento tumoral y la metástasis *in vivo*. Además se demostró que Gal-1 favorece la adhesión celular a laminina, componente mayoritario de la MEC y membranas basales, y que el efecto pro-adhesivo es mediado específicamente por integrinas α_1 , α_2 , α_3 , α_v y β_1 , a través de las vías de señalización PI3K y/o ERK1/2 [117]. Estas vías son estimuladas por la activación de H-Ras. Varios trabajos demostraron que Gal-1 estabiliza la formación de *nanoclusters* de

H-Ras en membrana, lo que contribuye a la transformación maligna alterando procesos de supervivencia celular, migración y proliferación [99], [118], [119].

Hay evidencia del efecto inmunomodulador de Gal-1 en distintos tumores, inclusive en el CHC. Garín y colaboradores [120] demostraron que Gal-1 es un modulador central sobre células T regulatorias (Tregs) $CD4^+CD25^+$, las cuales tienen un rol esencial en la inmunidad tumoral. Se observó que el número de células Tregs se encuentra incrementado en pacientes con neoplasias [121], y también una correlación positiva entre la expresión de Gal-1 y la infiltración tumoral de Tregs FoxP3⁺ [114]. En otro trabajo, se demostró la sobreexpresión de Gal-1 en células estrelladas asociadas al CHC coincidente con la expresión disminuida del micro ARN miR-22. Los autores demostraron que esto conduce a la inducción de apoptosis en linfocitos T y a un desbalance en la producción de citoquinas en los linfocitos Th1/Th2, sugiriendo que Gal-1 promueve un microambiente inmunosupresivo favoreciendo el desarrollo del tumor [122], [123].

Para comprender el rol de Gal-1 y su contribución al desarrollo del CHC, nuestro laboratorio se propuso continuar estudiando los mecanismos moleculares involucrados utilizando líneas celulares tumorales y modelos *in vivo*. Se demostró que la sobreexpresión de Gal-1 en hepatocitos tumorales HEPG2 induce la transición epitelio-mesénquima (TEM), proceso que incluye la pérdida de uniones adherentes, pérdida de polaridad celular y expresión de marcadores mesenquimales, resultando en la transformación de la célula epitelial hacia un fenotipo fibroblastoide. Las células que sobreexpresan Gal-1 también muestran una mayor adhesión a proteínas de la MEC y adquieren resistencia a anoikis (son capaces de crecer en forma independiente del anclaje). Además, demostramos que la sobreexpresión de Gal-1 conduce a la hiperactivación de las vías de PI3K/Akt y WNT/ β -catenina [124].

Resultados de nuestro laboratorio también demostraron que niveles incrementados de Gal-1 en células HEPG2 generan tumores más resistentes al tratamiento con Doxorrubicina y Sorafenib. Demostramos que esto ocurre por medio del aumento de transportador de drogas glicoproteínas-P (gp-P) y la disminución de los niveles intracelulares de la droga [125].

Recientemente, en un modelo de ratones con esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica y CHC (MASH-HCC, por sus siglas en inglés), con dieta occidental alta en azúcares y grasas, se demostró una relación entre Gal-1 y la vía de señalización Rho en múltiples niveles (Rho GTPasas, GTPasas efectoras y activadoras

de protein kinasas). Por análisis del transcriptoma se observó que ratones que sobreexpresaban Gal-1 en hígado aumentaban también las vías de fosforilación post-traducciona, desgranulación de plaquetas, efectores de Rho GTPasas y degradación de la MEC. Por otra parte, el silenciamiento de Gal-1 reguló negativamente dichas vías, lo que demuestra un impacto directo de los niveles de esta galectina en los procesos de remodelación de la MEC y la TEM [126]. En otro interesante trabajo del mismo autor, se observó que el silenciamiento de Gal-1 en un modelo de ratones con CHC reducía la TEM y la formación de matriz en los márgenes del tumor, provocando la infiltración de células inmunes y la expansión de linfocitos T citotóxicos [127].

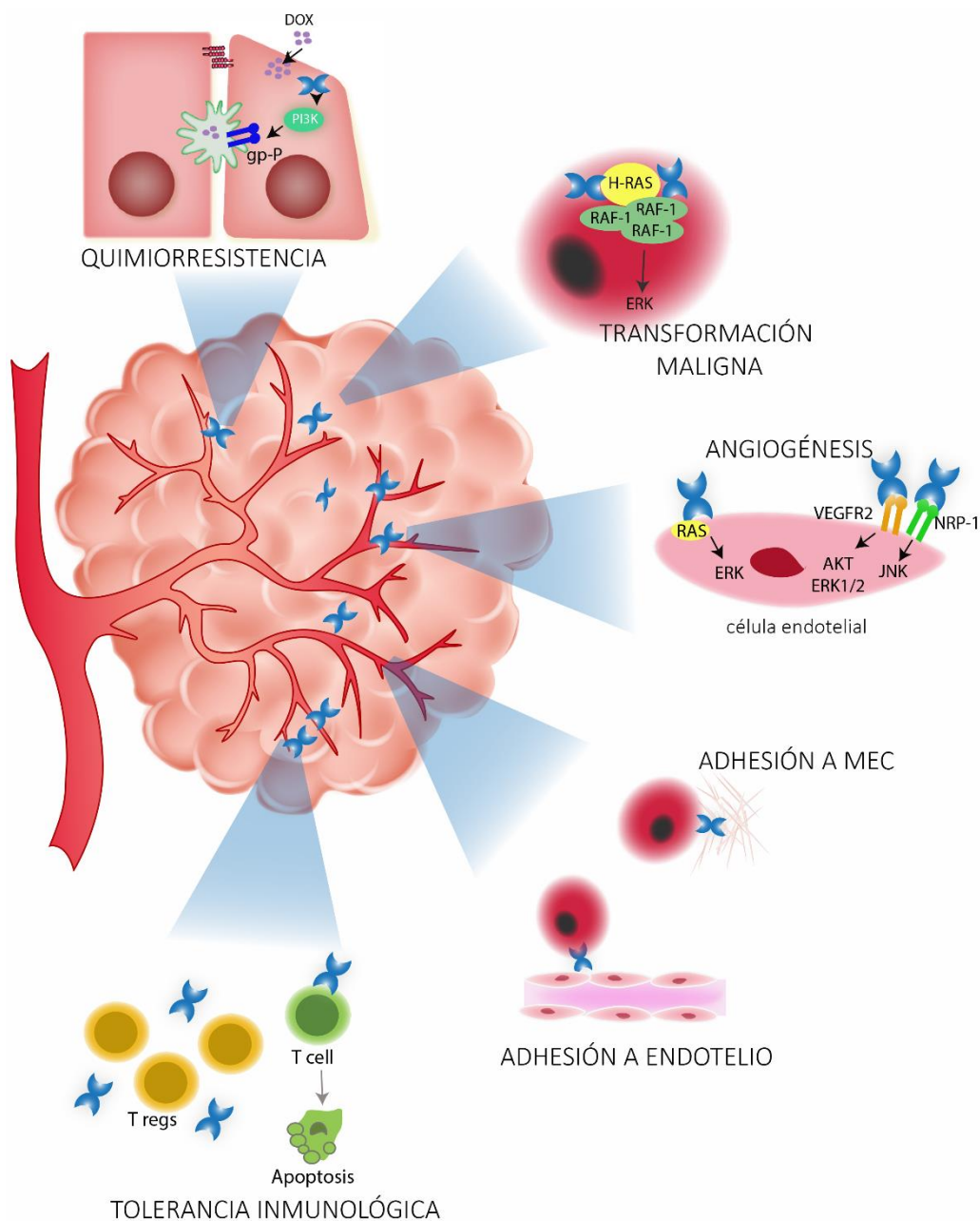


Figura 9. Roles de Gal-1 descritos en el microambiente tumoral. Gal-1 participa de diversos procesos clave en la progresión, metástasis y recurrencia de tumores de CHC. Además del crecimiento tumoral, Gal-1 se encuentra involucrada en la transformación maligna, adhesión célula-célula, célula-MEC, angiogénesis, quimiorresistencia y escape del tumor al sistema inmune [99], [114], [117], [123], [125], [126], [124].

2.2.2 Gal-1 en la diseminación tumoral

La diseminación de células tumorales es un proceso complejo que consta de sucesivas etapas que incluyen la adhesión célula-célula, célula-MEC, migración, invasión, angiogénesis y evasión de la respuesta inmune. Tradicionalmente se la ha entendido como un proceso lineal y secuencial pero más recientemente se acepta que el proceso metastásico involucra múltiples mecanismos paralelos de diseminación [128]. Entre ellos, Glinsky y colaboradores [129] demostraron que la adhesión al endotelio vascular de células tumorales metastásicas y la adhesión homotípica (agregación) representan dos pasos coordinados en la diseminación tumoral. Los investigadores propusieron que la adhesión homo- y heterotípica mediada por galactósidos y galectinas en el endotelio microvascular cumplen un rol importante en las etapas tempranas de la diseminación tumoral. Se ha descrito que Gal-1 favorece la adhesión de células a componentes de la MEC como laminina y fibronectina en distintos tipos de cáncer, como los de ovario y próstata [91], y a células del endotelio vascular [130], [131]. Las interacciones célula-célula se establecen a través de diversas moléculas que se clasifican en cadherinas, integrinas, selectinas y la superfamilia de inmunoglobulinas [132]. Las integrinas son heterodímeros no covalentes formadas por α y β subunidades que se unen a ciertos ligandos de la MEC como laminina, fibronectina y colágeno dependiendo su selectiva afinidad dada por la combinación de subunidades. Dado que Gal-1 ha sido descrita en numerosas ocasiones como ligando de integrinas en diversos tejidos [82], se ha propuesto que podría modular los mecanismos de adhesión celular en la metástasis tumoral a través de la unión o regulación de la expresión de las integrinas [91]. En nuestro laboratorio se demostró que tanto la adición de galectina-1 recombinante (rGal-1), como la sobreexpresión de la proteína endógena, incrementan la adhesión de células HEPG2 a laminina [117], a la vez que el aumento de la expresión de Gal-1, en parte inducido por TGF β 1, promueve la adhesión de las células de CHC al endotelio sinusoidal hepático [133]. Esto representaría un mecanismo a través del cual Gal-1 induce la diseminación de los hepatocitos tumorales.

2.2.3 Gal-1 en el endotelio tumoral

La expresión basal de galectinas en el endotelio humano normal quiescente se restringe a las galectinas-1, -3, -8 y -9 [134], [135]. Por inmunohistoquímica (IHQ) se reportó que la expresión de Gal-1 se encuentra ampliamente distribuida en el endotelio vascular pero con niveles muy bajos, mientras que las otras galectinas varían su expresión y localización dependiendo del tejido de origen. La activación endotelial *in vitro* incrementa significativamente la expresión global de Gal-1 a la vez que disminuye los niveles intracelulares de Gal -8 y Gal-9 (pero aumentan levemente en membrana), mientras que Gal-3 no se ve afectada [135]. Se ha demostrado que ciertos desencadenantes como las citoquinas, factores de crecimiento o la hipoxia pueden alterar los patrones de glicosilación en la superficie de CE afectando la capacidad o permisividad de unión de las galectinas hacia receptores específicos, lo cual interfiere con la funcionalidad del endotelio [136], [137], [138].

En 2006, Thijssen y colaboradores encontraron, por medio de distintas técnicas para identificar interacciones proteína-proteína, que Gal-1 era la proteína blanco del péptido anti-angiogénico *Anginex*, diseñado previamente en su laboratorio con eficacia como terapia en la angiogénesis tumoral [139], [140]. Numerosas publicaciones en los años siguientes dieron soporte para establecer que Gal-1 posee un rol clave en la angiogénesis de células endoteliales *in vitro* y angiogénesis *in vivo* [141], [142], [143], [144], [145], [146], [147], [148]. Hsieh y colaboradores encontraron que Gal-1 se une a través del DRC a neuropilina-1, un correceptor de VEGFR-2, aumentando la fosforilación de este último y con ello, su señalización río abajo. Croci y colaboradores [145] demostraron luego en el sarcoma de Kaposi la unión de Gal-1 a VEGFR-2, con un patrón de glicosilación alterada, lo que permite la inducción de la vía angiogénica. A su vez, D'Haene y colaboradores [149] reportaron que Gal-1 induce la fosforilación de VEGFR-2, mecanismo que podría mediar un retraso en la endocitosis del receptor. Es interesante notar que el agregado de un anticuerpo bloqueante de VEGFR-2 sólo inhibió los efectos proangiogénicos de Gal-1 de forma parcial, revelando la existencia de otros mecanismos alternativos por los que la galectina actuaría. En un trabajo más reciente, Cheng y colaboradores [150] observaron una correlación *in vivo* entre los niveles de expresión de Gal-1 y los de VEGF/VEGFR-2 en un modelo de ratones con isquemia cerebral inducida. En ratones tratados diariamente con Gal-1 se observó la remodelación vascular y reperusión sanguínea post-isquemia, a diferencia de lo observado en ratones

knock out (KO) para Gal-1. Recientemente también fue sugerido que Gal-1 podría interactuar, entre otros, con transcritos ARNm de VEGF, lo que podría interferir con la traducción y/o secreción del potente inductor angiogénico proponiendo un nuevo mecanismo [151] [148].

En nuestro laboratorio previamente describimos el efecto de Gal-1 secretada por los hepatocitos tumorales sobre el endotelio asociado al CHC y el microambiente tumoral. Entre otros resultados demostramos que, tanto la proteína secretada por células HEPG2 así como la obtenida de forma recombinante inducían la proliferación y migración de las CESHs SK-HEP-1 aisladas del líquido ascítico de un paciente con CHC [133].

Si bien algunas proteínas han sido identificadas como receptores de Gal-1 y algunas son conocidas por su importancia en la biología endotelial [82], [96], aún quedan interrogantes sobre cómo las interacciones Gal-1/glicoconjugados contribuyen a la función celular y el proceso angiogénico tumoral, en particular en el CHC.

Sección 3: Aminopeptidasa N/ CD13

3.1 Consideraciones generales

Las aminopeptidasas son enzimas que catalizan la ruptura de diversos sustratos oligopeptídicos hidrolizando los aminoácidos desde el amino terminal. Son exopeptidasas ya que liberan el o los aminoácidos terminales. Se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal y animal, así como en bacterias. Se clasifican principalmente en base a su localización subcelular, catión metálico utilizado en la reacción catalizada, resistencia al inhibidor bestatina y pH óptimo (Revisado en [152]). La aminopeptidasa N fue identificada por primera vez en 1952 por su actividad como cisteinil-glicinasa [153]. En los años posteriores pudo ser aislada mediante cromatografía y bioquímicamente caracterizada. Se le otorgó el nombre aminopeptidasa M, por su presencia en membrana; y también, alanil aminopeptidasa o aminopeptidasa N por su preferencia hacia aminoácidos neutros [154], [155].

Las células de linaje mieloide normales y leucémicas contienen un *set* de antígenos de membrana únicos, los cuales se llamaron por convención *differentiation clusters* (CD) debido a su reactividad hacia anticuerpos monoclonales. Algunos anticuerpos unían específicamente una glicoproteína de membrana de aproximadamente 150 kDa que se expresaba en células del linaje granulocitos-monocitos en todos los estadios de diferenciación, incluidas células progenitoras ya comprometidas. Dicho *cluster* al cual se asignó el número 13, también se expresaba en blastocitos en una alta proporción de pacientes con leucemia mieloide aguda [156], [157], [158]. En 1989, un grupo de investigadores determinó la estructura primaria de la proteína, la cual resultó ser idéntica a la descrita para aminopeptidasa N [159].

3.1.1 Estructura de CD13

En la actualidad, CD13/aminopeptidasa N se clasifica como una proteína integral de membrana tipo II y a su vez, pertenece a la familia M1 de las zinc metaloproteasas, también llamadas gluncinzinas [160]. En la mayoría de las especies existe como homodímero en la membrana plasmática, el cual se dimeriza en el retículo endoplasmático previo a la asociación con el aparato de Golgi [161]. CD13 también se

ha encontrado de forma soluble en plasma y orina, con un mecanismo de liberación de la membrana aún no caracterizado [162], [163].

En su extensión completa, la proteína CD13 de origen humano se compone de 967 aminoácidos y 7 secciones [164], [165](Fig. 9). Posee 4 ectodominios, el primero (I) estabiliza la proteína en la membrana plasmática; el ectodominio II contiene el sitio catalítico y el sitio de unión a zinc localizado en una cavidad amplia e interna, inaccesible al grueso del solvente; el ectodominio IV es el responsable de la interfase dimérica por medio de interacciones hidrofóbicas. Para la actividad catalítica, los 4 ectodominios se encuentran coordinados para formar una conformación abierta o cerrada, lo cual permite al sustrato atravesar un canal negativamente cargado hacia el sitio catalítico, lo que explicaría la particular afinidad a péptidos cortos. El ectodominio III permitiría un movimiento de 15° que origina la disposición abierta o cerrada. La proteína posee una única región transmembrana de 24 aminoácidos hidrofóbicos con una sección citoplasmática de apenas 9 aminoácidos.

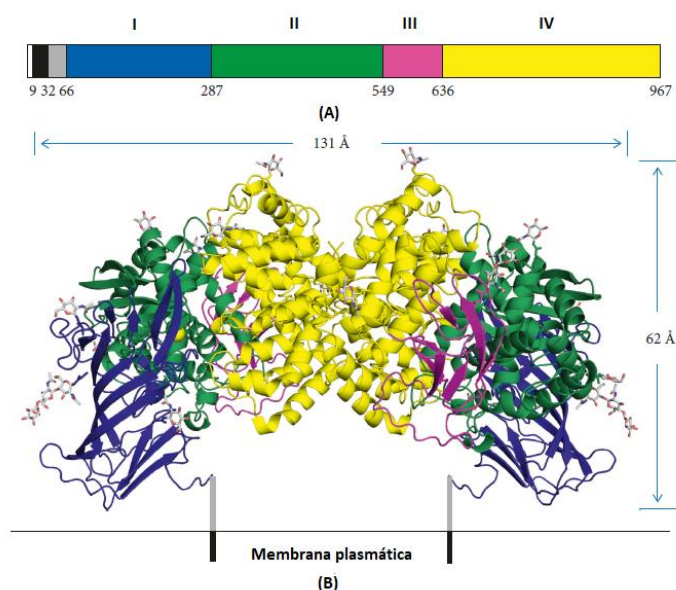


Figura 10. Estructura de CD13/aminopeptidasa N. (A) Organización de los dominios del monómero de CD13 humano. El dominio citoplasmático se muestra en color blanco; el segmento transmembrana en color negro; el tallo rico en serina (ser)/treonina (thr) se muestra en gris y el resto de los ectodominios se muestran en color azul (I), verde (II), magenta (III) y amarillo (IV). Los números indican los límites de cada dominio. (B) Representación en modelo de cintas de la estructura cristalizada de los ectodominios de CD13 humana dimerizada y representada en su probable orientación en la membrana plasmática. Los colores se corresponden con los descriptos anteriormente. Las esferas amarillas indican la localización del sitio activo en el dominio II (sólo se observa en el monómero izquierdo) mientras que los sitios de N-glicosilación se muestran en modelo de barras. Tomado y adaptado de [164].

Las glicosilaciones son una modificación post-traducciona muy común en proteínas de membrana y de exportación, lo que contribuye a la generación de distintas variantes con funciones y localizaciones distintas. El peso molecular de CD13 sin glicosilar es de 110 kDa, mientras que las distintas glicoformas encontradas oscilan entre 130 y 250 kDa, representando entre un 20 y 40 % de su masa total [166], portando residuos glicosilados en 10 sitios de N-glicosilación según el análisis de su secuencia [167]. La N-glicosilación consiste en la adición de una cadena de oligosacáridos de complejidad variable en un aminoácido asparagina (N) que se halla en la secuencia de aminoácidos N-X-Ser/Thr. En cuanto a la O-glicosilación, consiste en la adición covalente de una N-acetil-galactosamina (GalNAc) en un átomo de oxígeno de los aminoácidos serina o treonina. En CD13 se han encontrado sitios de O-glicosilación principalmente en la región del tallo [168], [169]. Si bien la existencia de isoformas o glicoformas de CD13 tejido-específicas ha sido postulada reiteradas veces, fue recientemente que se demostraron distintos patrones de glicosilación, no sólo en distintos tejidos sino principalmente entre tejidos normales y tumorales, presentando a CD13 como una oportunidad de blanco terapéutico [170].

3.1.2 CD13 como proteína multipropósito

Aminopeptidasa N/CD13 ha sido denominada una proteína multipropósito por la multiplicidad de funciones que posee en los distintos sistemas en los que se la ha estudiado [167]. Estas funciones resultan de 3 tipos de mecanismos de acción conocidos: enzimático, endocitosis y señalización molecular.

La expresión de CD13 se considera ubicua debido a la presencia generalizada en algunos órganos, tejidos y tipos celulares del cuerpo humano como el epitelio ribete en cepillo de los riñones, intestino delgado, membranas sinápticas en el sistema nervioso, placenta, cerebro, hígado y en varios tipos celulares incluyendo linfocitos, monocitos, macrófagos, granulocitos, células del estroma, fibroblastos, músculo liso y osteoclastos [167], [171], [172]. En las células endoteliales vasculares, su expresión se encuentra ausente, pero se ha reportado su expresión en el endotelio tumoral [173], [174]. En cuanto a la regulación génica se demostró que su expresión está controlada por dos promotores distintos, separados por un intrón de 8 kb, que produce dos transcritos que solo difieren en la región 5' no codificante. Un promotor cercano al inicio de transcripción dirige la expresión en células del intestino, riñón, hígado y endoteliales

mientras que el promotor distal regula la expresión de CD13 en células mieloides y fibroblastos [166], [175]. Dada la expresión ubicua de CD13 y que distintas isoformas exhiben especificidad variable por sus ligandos, se ha sugerido que las funciones de esta proteína probablemente dependan del sitio de expresión [176].

Entre las funciones fisiológicas descritas, se reportó que la actividad enzimática de la aminopeptidasa N es necesaria para la degradación de péptidos, la captación de aminoácidos y el metabolismo del tripéptido glutatión en el ribete en cepillo de las microvellosidades del epitelio del intestino delgado para facilitar la reabsorción [177]. En el tejido nervioso, la proteína posee roles clave en el metabolismo de neuropéptidos incluyendo la inactivación de encefalinas y endorfinas en la transducción de señales [178] y en el procesamiento de angiotensina III, influenciando la liberación de vasopresina [179]. Esta cualidad también se observó *in vivo* en la capacidad de disminuir la presión sanguínea en ratas hipertensas [180]. Dada la abundante presencia de CD13 en el plexo coroideo, se ha sugerido también que actúa como una barrera protectora de los péptidos circulantes que podrían ser potencialmente dañinos para el cerebro [181]. En el campo de la inmunología, CD13 posee un rol clave en el crecimiento y maduración de células dendríticas y la activación de macrófagos [182]. Además se ha descrito su participación en el remodelado extracelular de péptidos antigénicos de moléculas del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) [183], su rol esencial en la fagocitosis, inflamación y la degradación con la subsecuente inactivación de diversas citoquinas (Revisado en [167]).

Por otro lado, algunas funciones de CD13 resultan independientes de su actividad enzimática, por ejemplo, actúa como receptor del coronavirus 229E en humanos [184], del coronavirus respiratorio porcino (CoV), del virus porcino de la gastroenteritis transmisible (TGEV por sus siglas en inglés), del virus felino de peritonitis infecciosa (FIPV), y del coronavirus felino entérico (FeCoV) y canino (CCoV) [185]. La especificidad en cada especie se encuentra estrechamente relacionada a los sitios de N-glicosilación [186]. CD13 participa también como receptor en eventos tempranos del contagio por citomegalovirus humano (HCMV), asociándose a partículas víricas durante la etapa de maduración y volviéndose proteína inmunogénica durante la infección, por lo que se encuentran anticuerpos anti-CD13 en pacientes cursando la enfermedad y en pacientes con enfermedades autoinmunitarias positivos para autoanticuerpos HCMV-IgG [187], [188].

Además, tanto la sobreexpresión como la actividad incrementada de CD13 se han reportado en la literatura de forma extensiva y se ha sugerido a esta proteína como marcador diagnóstico en varias patologías como diabetes e hipertensión [180], enfermedades colágeno-vasculares (grupo de trastornos autoinmunes que afectan los tejidos conectivos, huesos y tendones) [189], Enfermedad de Crohn [188] y en distintos tipos de cáncer. Dado el particular interés para este trabajo, se revisará en mayor profundidad la asociación entre CD13 y el cáncer en la próxima sección.

3.2 CD13 en cáncer y en el CHC

La expresión de CD13 en tumores se ha asociado fuertemente a la progresión de la enfermedad, especialmente a la angiogénesis tumoral y la metástasis [167], [190]. Niveles inusualmente altos de CD13 se han encontrado en distintos tipos de cáncer como los de mama [171], [191], ovario [192], tiroides [193], páncreas [194], colorrectal [195] y de pulmón [196]. En el cáncer de páncreas, donde ha sido estudiado intensivamente, los niveles séricos de CD13 correlacionan con el tamaño del tumor, metástasis en nódulos linfáticos y grado metastásico. Se lo considera un biomarcador diagnóstico y pronóstico en etapas tempranas de la enfermedad y predictor de supervivencia general [197]. Song y colaboradores [198] estudiaron la expresión de CD13 y TGF β 1 en tumores primarios y metastásicos en cáncer gástrico, observando también una correlación entre el tamaño tumoral, la metástasis en nódulos linfáticos y la diferenciación tumoral. En otros tipos de cáncer, la relación no resulta tan lineal y existen reportes contradictorios. Por ejemplo, en el cáncer renal, Ishii y colaboradores [199] encontraron disminuidos los niveles de CD13 en comparación al tejido circundante no tumoral. Sin embargo en un trabajo más reciente, Liu y colaboradores, si bien demostraron por IHQ y *Western blotting* una menor expresión de CD13 en el tumor con respecto al tejido circundante normal, también encontraron que el tratamiento con bestatina (inhibidor de aminopeptidasas) inhibía la proliferación, migración e invasión de células renales tumorales [200]. Por otro lado, en pacientes con cáncer de colon se encontró que la actividad enzimática elevada de CD13 en el tejido tumoral correlacionaba con mejor supervivencia general, pero baja actividad en la proteína soluble en plasma correlacionaba con peores pronósticos, sin que existiera relación entre los niveles de expresión séricos y tumorales [201].

CD13 es un marcador de células madre tumorales en el CHC [202] y colangiocarcinoma [203]. Las denominadas *Cancer Stem Cells* (CSC) son células que exhiben un fenotipo del estilo progenitor, y son constituyentes de la mayoría de los cánceres sólidos y líneas celulares derivadas de ellos con capacidad de autorenovación. Esta cualidad sería de gran relevancia clínica por la capacidad de iniciación y progresión del tumor así como la resistencia, recurrencia y metástasis luego de la terapia quirúrgica o sistémica [204]. Entre otras características, las CSC pueden ser identificadas por marcadores de superficie específicos. El hecho de haber descubierto que CD13 es un marcador de CSC en el CHC y el colangiocarcinoma [205] [203], abrió el camino a nuevas investigaciones sobre esta proteína en los tumores hepáticos. Entre otros mecanismos, se encontró que la alta expresión de CD13 está asociada a la TEM inducida por TGF β y a la prevención del aumento de los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), lo que facilita la supervivencia de las células. Además, la inhibición farmacológica de la aminopeptidasa protege a las CSC de la muerte inducida por apoptosis [206] y las sensibiliza a los efectos de drogas terapéuticas como doxorubicina y 5-fluorouracilo [207], [208]. Más recientemente, Hu y colaboradores llevaron adelante un estudio clínico en el que observaron que altos niveles de expresión de CD13 en muestras metastásicas de CHC correlacionaban con peores pronósticos de los pacientes luego de la resección quirúrgica. También encontraron que tanto la administración de bestatina como el silenciamiento mediante siRNA lograban superar la resistencia a sorafenib. El estudio demostró que la sobreexpresión de CD13 conducía a la consiguiente activación de la vía de señalización NF- κ B, implicada en procesos inflamatorios y tumorales [209].

3.2.1 CD13 en el proceso de adhesión

La participación de CD13 en la adhesión celular se estudió principalmente en células mieloides y en menor medida, en células tumorales. En experimentos de inmunofluorescencia, Menrad y colaboradores [210] demostraron que CD13 se ubica en forma difusa en membrana de células de melanoma aisladas, pero se relocaliza hacia las zonas de contacto célula-célula al alcanzar la confluencia. En otro trabajo se encontró que el entrecruzamiento de dímeros de CD13 en monocitos humanos da como resultado un fenómeno de intensa agregación homotípica, independiente de la actividad enzimática [211]. Además se reportó que Gal-3 se

encuentra asociada a CD13 en monocitos, pero se disocia durante la agregación celular [212]. Adicionalmente, en el estudio de adhesión de monocitos a células endoteliales, se encontró que los receptores CD13 presentes en la membrana de cada tipo celular se encontraban formando parte de los mismos complejos durante la adhesión heterotípica, estudiado por co-inmunoprecipitación [213]. Utilizando células HUVEC silenciadas para CD13 se demostró también la participación de esta proteína en la migración y adhesión a proteínas de la MEC como colágeno y fibronectina [214].

3.2.2 CD13 en la angiogénesis tumoral

Pasqualini y colaboradores [215] fueron pioneros en el estudio de péptidos residentes en tumores (*tumor-homing peptides*) lo que llevó al descubrimiento del péptido asparagina-glicina-arginina (NGR) utilizando la tecnología de *phage-display*, lo que luego les permitiría acoplar drogas tumorales al péptido y dirigirlos hacia el sitio del tumor con una eficacia muy alta [216]. En los años siguientes, demostraron que CD13 era un receptor del péptido NGR en capilares tumorales y otros vasos sanguíneos en proceso angiogénico [173], abriendo un nuevo campo de estudio en relación a la proteína. La expresión de CD13 se encuentra regulada positivamente, tanto a nivel de ARN mensajero como de proteína, en el endotelio vascular en respuesta a hipoxia y a otros factores de crecimiento angiogénico, incluyendo bFGF, TNF α y VEGF [217]. En otro estudio sobre el endotelio, el silenciamiento a través de siARN dirigido a CD13 redujo la migración y formación de túbulos de células HUVEC, sugiriendo una actividad angiogénica fisiológica [214]. Posteriormente, sin embargo, se observó que ratones KO para la aminopeptidasa no conllevaba anomalías fisiológicas, excepto en condiciones de hipoxia donde la respuesta angiogénica se veía deteriorada [218].

Los roles de CD13 en la angiogénesis tumoral demostraron ser importantes para el crecimiento tumoral dado que la inhibición de su actividad mediante distintos inhibidores como bestatina y anticuerpos bloqueantes, y la pérdida de expresión indujeron el colapso de la neovasculatura tumoral [190], [219].

3.2.3 Terapias antitumorales

Dados los importantes roles demostrados en la progresión tumoral, CD13 se ha convertido en un interesante objetivo para el desarrollo de nuevas drogas

anticancerígenas. Diversos inhibidores de CD13 se encuentran en diferentes etapas de investigación preclínica y clínica. Si bien, ningún inhibidor ha sido aprobado aún para el tratamiento en humanos en Europa o Estados Unidos (Revisado en [220]), en Japón, Ubenimex (bestatina) se encuentra autorizado como terapia antitumoral e inmunomoduladora para cáncer de pulmón y leucemia aguda [221]. Recientemente se ha desarrollado un derivado de la molécula de bestatina que promete mayor capacidad antitumoral con menores efectos adversos [222]. La falta de especificidad de los inhibidores conocidos a la amplia familia de aminopeptidasas e incluso metaloproteasas, representa un desafío significativo para el desarrollo de inhibidores de CD13. Por otro lado, el uso de anticuerpos con enfoque terapéutico dependerá de la capacidad de éstos de unirse a las glicoformas de CD13, selectivamente expresadas en tejidos tumorales pero ausentes en normales, como ya se ha logrado para las glicoformas tumorales de otros receptores como LYPD3, MUC1 y CD43 [170].

3.3 CD13 y Gal-1

3.3.1 Resultados del laboratorio aún no publicados

Resultados previos de nuestro grupo que dieron origen a la Tesis Doctoral de la Bioquímica Malena Manzi demostraron que Gal-1 secretada por las células de CHC HEPG2 promueve la proliferación y migración de las CESHs SK-HEP-1 y la adhesión de los hepatocitos tumorales al endotelio [133], sugiriendo que Gal-1 cumpliría un rol importante en la angiogénesis y diseminación tumoral en el microambiente del CHC.

Dado que los efectos descriptos eran dependientes de la interacción de Gal-1 (a través de su DRC) con glicoconjugados, luego se llevó a cabo la búsqueda de posibles receptores de la galectina en la superficie de células SK-HEP-1. Para ello, una fracción de proteínas de membrana de dichas células se sometió a una cromatografía de afinidad en una columna de rGal-1. Las proteínas adsorbidas se eluyeron con lactosa por competencia, se resolvieron mediante SDS-PAGE, y se tiñeron con *Coomassie Brilliant Blue*. Las bandas seleccionadas se escindieron y se realizó una digestión con tripsina de las proteínas inmersas en el gel. Luego, los péptidos resultantes se extrajeron de dicho gel y se analizaron en un espectrómetro de masa 4800 MALDI TOF TOF. Las proteínas fueron identificadas de acuerdo con la búsqueda y comparación de perfiles de masas utilizando el programa *MS/MS ion search* de MASCOT con restricción taxonómica

utilizando la base de datos NCBIInr. Los experimentos de espectrometría de masa y el análisis de los datos se realizaron a través del servicio brindado por el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos, Proteínas y Espectrometría de Masa (LANAIS-PROEM, IQUIFIB, UBA-CONICET).

El estudio de los espectros de fragmentación permitió identificar los péptidos indicados en rojo en la figura 11, correspondientes a la proteína CD13 (103 kDa, Uniprot P15144), con un porcentaje de cobertura de la secuencia proteica del 24 % (Resultados no publicados, tesis doctoral M. Manzi, 2016).

Aminopeptidasa N (CD13) (103 kDa)

```

1  MAKGFYISKS LGILGILLGV AAVCTIIALS VVYSQEKKNK ANSSPVASTT
51  PSASATTNPA SATTLDDSKA WNRYRLPNTL KPDSYRVTLR PYLTPNDRGL
101 YVFKGSSTVR FTCKEATDVI IIHSKKLNYT LSQGHRVVL GVGGSQPPDI
151 DKTELVEPTE YLVVHLKGSL VKDSQYEMDS EFEGELADDL AGFYRSEYME
201 GNVKRVVATT QMQAADARKS FPCFDEPAMK AEFNITLIHP KDLTALS NML
251 PKGPSTPLPE DPNWNVTEFH TTPKMSTYLL AFIVSEFDYV EKQASNGVLI
301 RIWARPSAIA AGHG DYALNV TGPILNFFAG HYDTPYPLPK SDQIGLPDFN
351 AGAMENWGLV TYRENSLLFD PLSSSSSNKE RVVTVIAHEL AHQWFGNLVT
401 IEWWNDLWLN EGFASYVEYL GADYAEPTWN LKDLMVLNDV YRVMAVDALA
451 SSHPLSTPAS EINTPAQISE LFD AISYSGK ASVLRMLSSF LSEDVFKQGL
501 ASYLHTFAYQ NTIYLNLDWH LQEAVNNRSI QLPTTVRDIM NRWTLQMGFP
551 VITVDTSTGT LSQEHFLDLP DSNVTRPSEF NYVWIVPITS IRDGRQQQDY
601 WLIDVRAQND LFSTSGNEWV LLNLNVTGYY RVNYDEENWR KIQTQLQRDH
651 SAIPVINRAQ IINDAFNLAS AHKVPVTLAL NNTLFLIEER QYMPWEAALS
701 SLSYFKLMFD RSEVYGPMKN YLKKQVTPLF IHFRNNTNNW REIPENLMDQ
751 YSEVNAISTA CSNGVPECEE MVSGLFKQWM ENPNNNPIHP NLRSTVYCNA
801 IAQGGEEEWD FAWEQFRNAT LVNEADKLRA ALACSKELWI LNRYLSYTLN
851 PDLIRKQDAT STIISITNNV IGQGLVWDFV QSNWKKLFND YGGGSFSFSN
901 LIQAVTRRFS TEYELQQLEQ FKKDNEETGF GSGTRALEQA LEKTKANIKW
951 VKENKEVVLQ WFTENSK

```

Figura 11. Secuencia de aminoácidos de la proteína aminopeptidasa N, APN/CD13. El análisis se realizó con el programa *MS/MS ion search* de MASCOT con restricción taxonómica y se utilizó la base de datos NCBIInr. En rojo se resaltan los péptidos obtenidos por digestión triptica que permitieron la identificación de la proteína (Resultados no publicados, tesis doctoral M. Manzi, 2016).

Se investigó también la posible colocalización de Gal-1 y CD13 en la membrana plasmática para lo cual se realizó una doble inmunomarcación en las células SK-HEP-1 en ausencia de agentes permeabilizantes y se observó en un microscopio confocal. Las fotografías en la figura 12 muestran la superposición de ambos canales (fluorescencia verde y roja) lo que permite inferir que Gal-1 y CD13 colocalizan en la superficie de las células SK-HEP-1. Mediante el programa *Image Pro Plus* se calculó el índice de

Manders y determinó que, en casi la totalidad de las células (> del 98 %) la señal de CD13 coincidía con la de Gal-1 (y viceversa). Además, para confirmar la interacción de Gal-1 con glicanos, las células se preincubaron durante 30 minutos con lactosa (100 mM) de forma de bloquear el DRC de la galectina. La presencia de lactosa generó una disminución del porcentaje de células que mostraron colocalización de ambas proteínas.

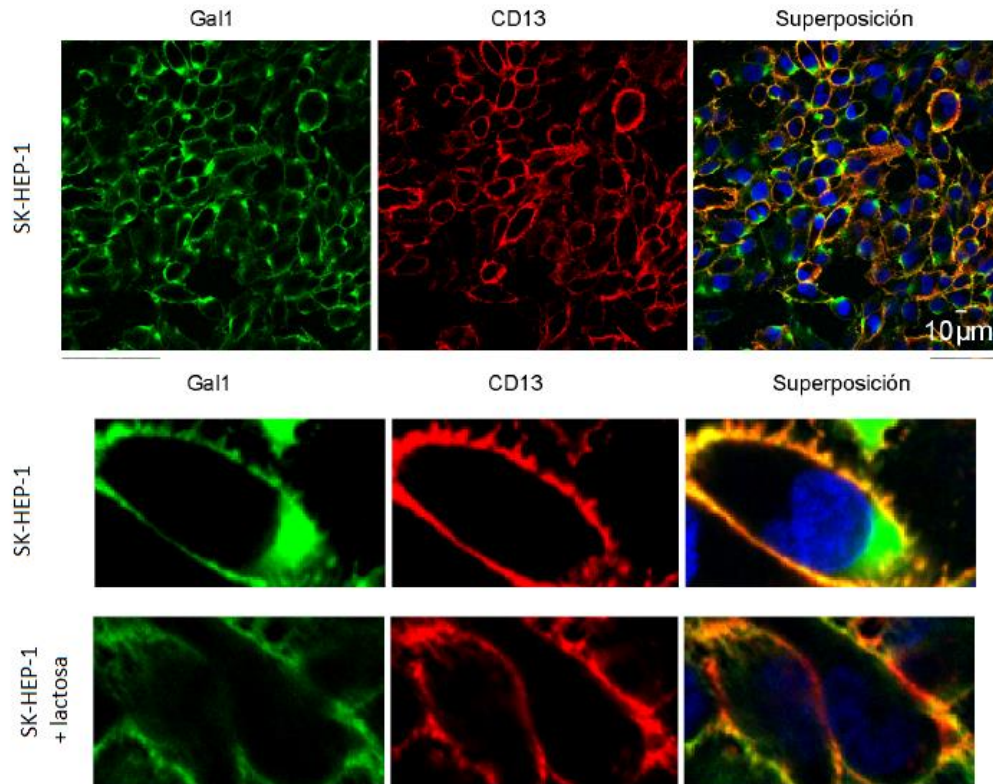


Figura 12. Colocalización de CD13 y Gal-1 en la membrana de las células SK-HEP-1. Se muestran fotografías representativas de un campo (panel superior) y de 1 o 2 células (panel inferior) en ausencia o presencia de lactosa. La doble inmunomarcación se realizó con un anticuerpo anti-CD13 (WM15, ab7417) y el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a Alexa-546 (canal rojo), seguido de un anticuerpo anti-Gal-1 (Santa Cruz) y el secundario correspondiente conjugado a FITC (canal verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI y se observó en un microscopio confocal (400X). (Resultados no publicados, adaptado de tesis doctoral M. Manzi, 2016).

Esta fue la primera vez que se identificó a CD13 como posible receptor de Gal-1. Hasta el momento, no se había descrito ningún receptor de galectinas en las CESHs.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Construcción de la hipótesis

A pesar de que los tratamientos de pacientes con carcinoma hepatocelular (CHC) han evolucionado durante la última década, la incidencia todavía se equipara con el índice de mortalidad, lo que refleja la pobre prognosis de la enfermedad y la necesidad de explorar los mecanismos que subyacen a la diseminación de las células de CHC para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

En los hepatocitos tumorales, el nivel de expresión de Gal-1 se encuentra incrementado y su sobreexpresión se asocia a una mayor invasión tumoral, metástasis, recurrencia y menor supervivencia de los pacientes, identificando a Gal-1 como un marcador de mal pronóstico en el CHC. A través de su interacción con glicanos de las superficies celulares, Gal-1 favorece el desarrollo tumoral, la metástasis, el escape al sistema inmune y la angiogénesis.

Los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio demostraron que:

- El aumento del nivel de Gal-1 en las células de CHC HEPG2 promueve su adhesión a las CESHs SK-HEP-1 en forma dependiente de glicanos, favoreciendo la diseminación tumoral.
- Gal-1 presente en el microambiente del CHC (secretada de las células HEPG2) estimula la proliferación y migración de las células SK-HEP-1 en forma dependiente de la unión a glicanos, lo que favorecería la angiogénesis.
- La aminopeptidasa N/CD13 sería un receptor de Gal-1 en las CESHs SK-HEP-1 y ambas proteínas colocalizan en la membrana plasmática de dichas células, sugiriendo una posible interacción a través de la cual Gal-1 podría ejercer sus efectos dentro del microambiente tumoral hepático.

CD13 es una exopeptidasa altamente glicosilada que se encuentra aumentada en la superficie de numerosos tipos de células tumorales y particularmente en las células endoteliales durante la angiogénesis tumoral. Además, CD13 promueve la tubulogénesis y migración de las CE HUVEC y su interacción con Gal-3 promueve la angiogénesis de dichas células [223].

Todas estas evidencias permitieron construir la hipótesis de este trabajo de tesis:

Hipótesis

CD13 es un receptor de Gal-1 y la interacción entre ambas proteínas promueve, en parte, la progresión y diseminación del hepatocarcinoma y la angiogénesis del endotelio sinusoidal

Objetivo General

Estudiar la relevancia de la interacción de Gal-1 con su novedoso receptor CD13, como un evento que favorece la progresión y diseminación del hepatocarcinoma y la neovascularización del endotelio sinusoidal hepático

Objetivos específicos:

- I. **Estudiar la expresión de Gal-1 y CD13** en muestras de hígado normal y tumores hepáticos de pacientes, en líneas celulares humanas de CHC, CESHs asociadas a tumores hepáticos y CEs no asociadas a tumor, mediante plataformas bioinformáticas y *Western blotting*.
- II. **Confirmar la interacción entre Gal-1 y CD13**, mediante co-inmunoprecipitación, *Far Western blotting* y resonancia plasmónica de superficie.
- III. **Evaluar la cooperación entre Gal-1 y CD13 en la diseminación de células de CHC y en la angiogénesis del endotelio sinusoidal asociado al tumor hepático**, mediante ensayos de adhesión heterotípica con microscopía de fluorescencia, y experimentos de proliferación, migración y tubulogénesis.

RESULTADOS

Capítulo 1.

Análisis de la expresión de Galectina-1 y CD13 en muestras de pacientes con hepatocarcinoma y líneas celulares humanas

Con el propósito de estudiar el rol de galectina-1 (Gal-1) y su novedoso receptor aminopeptidasa N o CD13 en la diseminación y neovascularización del hepatocarcinoma (CHC) evaluamos primero la expresión de ambas proteínas en muestras de pacientes con este tipo de tumor. Para ello, utilizamos herramientas bioinformáticas con acceso a bases de datos públicas y realizamos ensayos de *Western blotting* en líneas celulares tumorales hepáticas y en CEs no asociadas a tumor hepático.

1.1 Análisis *in silico* de la expresión de los genes *LGALS1* y *ANPEP*, su asociación con la supervivencia de pacientes con CHC y su co-expresión.

The Cancer Genome Atlas (TCGA) es un proyecto iniciado en 2005 por el Instituto Nacional de Cáncer y el Instituto Nacional de Investigaciones Genómicas Humanas de Estados Unidos, cuya finalidad es catalogar cambios moleculares de importancia biológica responsables del desarrollo de distintos tipos de cáncer. A la fecha, el programa ha generado 2,5 *petabytes* de información genómica, transcriptómica, proteómica e historias clínicas sobre 33 tipos de cáncer estudiados. Esta cantidad impresionante de información disponible recopilada de distintas bases de datos de hospitales y trabajos científicos genera la imperiosa necesidad del desarrollo de herramientas computacionales para transformar dichos datos crudos en conocimiento [224]. Para este fin se han desarrollado numerosas plataformas bioinformáticas que permiten acceder a las bases de datos TCGA y visualizar la información contenida en las mismas.

En este primer capítulo investigamos la expresión de los genes *LGALS1* y *ANPEP* que codifican las proteínas Gal-1 y CD13, respectivamente, en muestras de pacientes con cáncer de hígado y analizamos si dicha expresión se encuentra relacionada con el pronóstico de la enfermedad, en términos de supervivencia. Primero utilizamos la plataforma *University of Alabama at Birmingham CANcer data analysis Portal* (UALCAN) [225], la cual permite visualizar los datos de secuenciación del

transcriptoma entero (ARN-seq) para genes seleccionados en la base de datos obtenida del TCGA. El análisis incluyó muestras de 371 pacientes con CHC y 50 muestras de tejido hepático sano, y se pudo correlacionar los niveles de expresión génica con información clínica.

En el panel A de la figura 13 observamos que la expresión de ARN mensajero (ARNm) de la proteína Gal-1 es significativamente mayor en pacientes con CHC (mediana (Med) = 240,4 transcriptos por millón (TPM)) respecto a la de tejidos de pacientes sanos (142,9 TPM). En el panel B observamos lo mismo pero discriminado por estadio del tumor. La expresión del ARNm de Gal-1 en pacientes en estadio 1 (Med = 216,7 TPM), 2 (Med = 256,7 TPM), 3 (Med = 265,0 TPM) y 4 (Med = 442,6 TPM) es significativamente más alta comparada con la de tejidos sanos. En el panel C se observa el gráfico generado por la plataforma Kaplan-Meier Plotter [226], la cual utiliza un algoritmo que permite asociar los niveles de expresión del ARNm de Gal-1 con la supervivencia de los pacientes con CHC obtenida de sus historias clínicas en la misma base de datos del TCGA. Podemos observar aquí que altos niveles de expresión de Gal-1 se asocian con peores pronósticos en la supervivencia de los pacientes con cáncer de hígado.

cBioPortal [227],[228] es una plataforma *web* para la exploración interactiva de distintos *sets* de datos genómicos, incluida la base del TCGA. Permite la visualización, análisis y descarga de los mismos con el fin de que los investigadores puedan encontrar genes alterados dentro del estudio de interés. En nuestro caso utilizamos esta herramienta para evaluar la frecuencia de alteraciones genómicas de Gal-1 y CD13. En el panel D de la figura 13 observamos que la frecuencia de mutaciones para el gen *LGALS1* fue alrededor del 2 % en los pacientes con CHC principalmente correspondiendo a mutaciones de amplificación del número de copias de dicho gen.

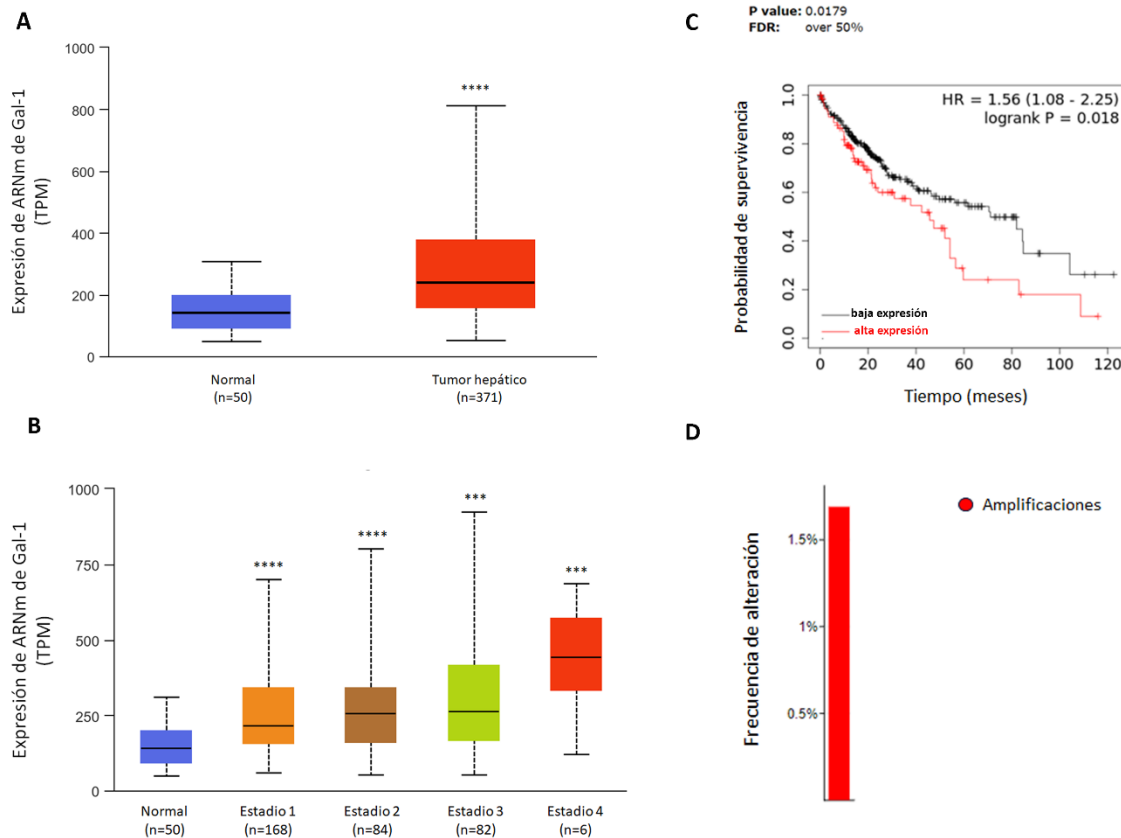


Figura 13. Análisis de la expresión, alteraciones genómicas y valor pronóstico de Gal-1 (*LGALS1*) en pacientes con CHC. (A) Expresión relativa de *LGALS1* en transcritos por millón (TPM) en muestras de hígado normal (en color azul) y de tumores primarios en pacientes con cáncer de hígado (CHC) (en color rojo). (B) Expresión relativa de *LGALS1* en tejidos hepáticos normales y tumorales de distintos estadios de diferenciación a partir de datos del TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) utilizando la plataforma UALCAN. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. (C) Asociación entre los niveles de expresión de *LGALS1* y la supervivencia global de pacientes con hepatocarcinoma generadas en la plataforma Kaplan-Meier Plotter a partir de datos del TCGA. (D) Frecuencia de alteraciones genómicas de *LGALS1* en pacientes con cáncer de hígado (TCGA) utilizando la plataforma cBioPortal.

En la figura 14A observamos la comparación de la expresión del ARNm del gen que codifica la proteína CD13 (*ANPEP*) en muestras de tejidos normales (Med = 194,6 TPM) con respecto a la de muestras de pacientes con CHC (158,7 TPM). Los valores provenientes de tumores hepáticos poseen gran dispersión y no resultan ser estadísticamente diferentes de los valores normales. En el panel B se compara la expresión del ARNm de CD13 entre los tejidos hepáticos normales y la de los distintos estadios del tumor (estadio 1: Med = 173,6 TPM; estadio 2: Med = 154,6 TPM; estadio 3: Med = 136,2 TPM; estadio 4: Med = 197,2 TPM).

La plataforma cBioPortal permitió concluir que la frecuencia de alteraciones genómicas de CD13 (*ANPEP*) resultó ser menor al 0,3 % en los pacientes con CHC alojados en la base de datos del TCGA (Fig. 14D).

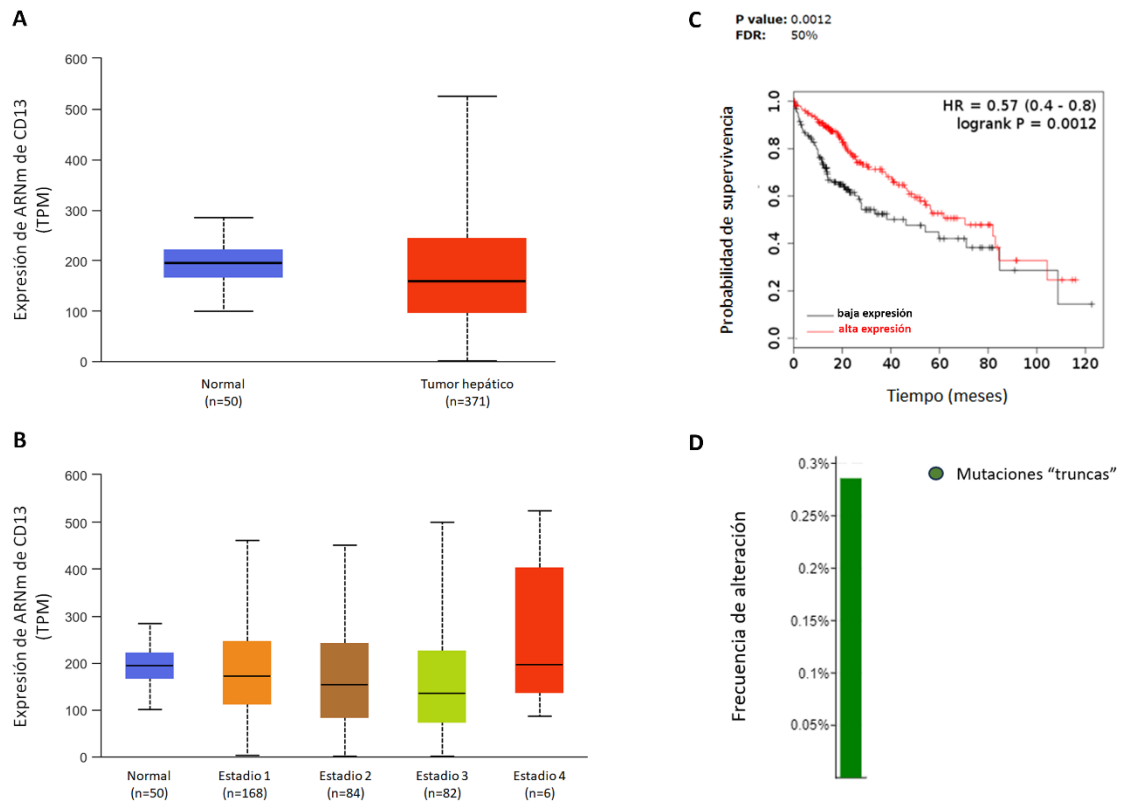


Figura 14. Análisis de la expresión, alteraciones genómicas y valor pronóstico de CD13 (*ANPEP*) en pacientes con CHC. (A) Expresión relativa de *ANPEP* en transcritos por millón (TPM) en muestras de hígado normal (en color azul) y en tumores primarios en pacientes con CHC (en color rojo). (B) Expresión relativa de *ANPEP* en tejidos hepáticos normales y tumorales de distintos estadios de diferenciación a partir de datos del TCGA utilizando la plataforma UALCAN. (C) Asociación entre los niveles de expresión de *ANPEP* con la supervivencia global de pacientes con cáncer de hígado generada en la plataforma Kaplan-Meier Plotter a partir de datos del TCGA. (D) Frecuencia de alteraciones genómicas de *ANPEP* en pacientes con cáncer de hígado (TCGA) utilizando la plataforma cBioPortal.

Por otra parte, el sitio cBioPortal permite analizar y realizar comparaciones a partir de la base de datos de TCGA. Se utilizó esta herramienta para analizar una posible correlación entre la expresión de Gal-1 y CD13, ya que se ha descrito que esta galectina modularía la expresión de algunos de sus receptores [229]. Como los datos se encuentran normalizados es posible utilizar el índice de Pearson como parámetro de correlación. Otra base de datos disponible proviene del proyecto *Chinese Liver Cancer Atlas* (CLCA) donde se realizó un muestreo de 239 pacientes con CHC [230]. Dado que el índice de Pearson arrojó un valor de -0,15 en TCGA y 0,11 en CLCA, se puede concluir que no habría correlación entre la expresión de los genes *LGALS1* y *ANPEP* en el CHC. Los índices de Spearman permiten arribar a la misma conclusión (Fig. 15).

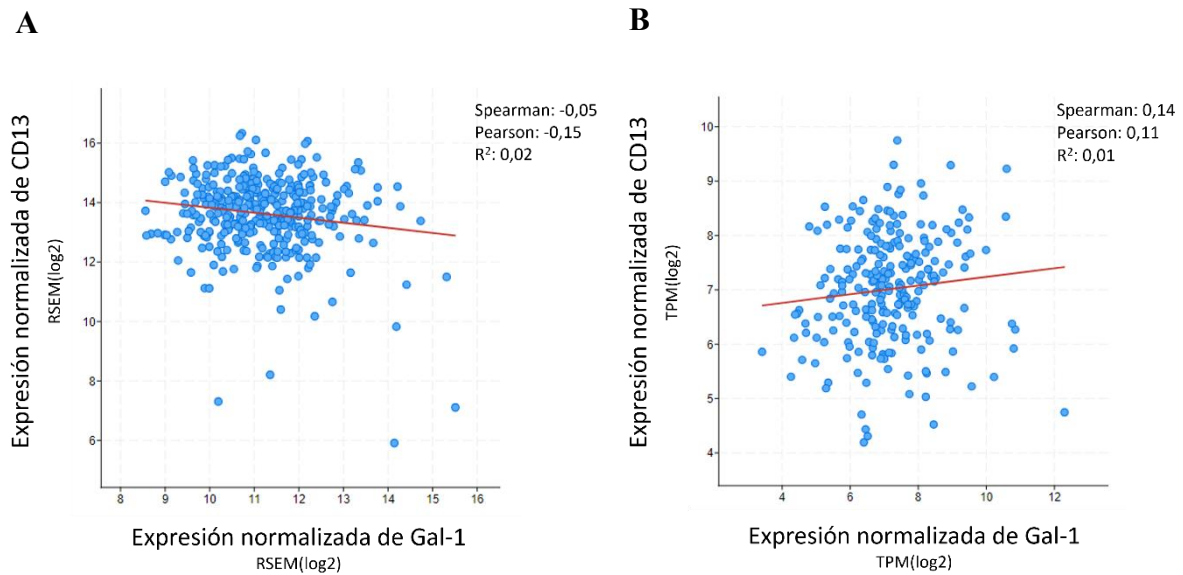


Figura 15. Análisis de correlación de expresión génica entre *LGALS1* y *ANPEP*. Se realizó la correlación entre las expresiones de ARNm normalizadas utilizando la base de datos (A) TCGA con el programa RSEM (RNAseq by Expectation-Maximization) y (B) en la base CLCA (TPM) con la plataforma cBioPortal.

1.2 Análisis *in silico* de la expresión de Gal-1 y CD13 en células residentes del hígado y líneas celulares hepáticas y endoteliales tumorales mediante secuenciación de ARN de célula única.

La sección *Single cell* de la plataforma *The Human Protein Atlas* (THPA) permite analizar la expresión de genes particulares a partir de la información de secuenciación de ARN de célula única (*single cell* RNAseq o scRNA-seq) obtenida de la base de datos GSE115469 construida a partir del análisis de 11.175 células [231]. Los distintos tipos de células que conforman el órgano hepático fueron identificados y seleccionados a partir de marcadores específicos del tejido, diferenciando los hepatocitos y demás residentes del hígado. Para las células endoteliales hepáticas se utilizaron vWF (factor de von Willebrand), SLC2A1 (Glut-1), CD34, PECAM-1 (molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria)/CD31 entre otros; por lo que se encuentran agrupadas las células endoteliales (CEs) vasculares, positivas para CD34 y las endoteliales sinusoidales hepáticas (CESHs), negativas para dicho marcador. Cabe recordar que CD31 no se expresa en las membranas celulares de las CESHs pero sí en vesículas internas en tejidos adultos sanos [232].

La visualización de los datos de expresión de ARNm de célula única se realizó mediante un gráfico de tipo UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*)

que permite el *clustering* o agrupamiento de datos y la reducción de dimensionalidad [233]. En la figura 16 se observa la expresión de ARNm de los genes CD31 y CD34, marcadores de CE vascular, y de los genes ICAM1 (molécula de adhesión intercelular 1), FCGR2B (receptor FC gamma o CD32b) y CD4, marcadores específicos de CESHs, en los distintos *clusters* hepáticos [232]. Dentro del *cluster* 5, correspondiente a las CE, se puede distinguir una subpoblación que es la que correspondería específicamente a las CESHs, la cual fue de nuestro interés para el análisis de los genes *LGALS1* y *ANPEP*.

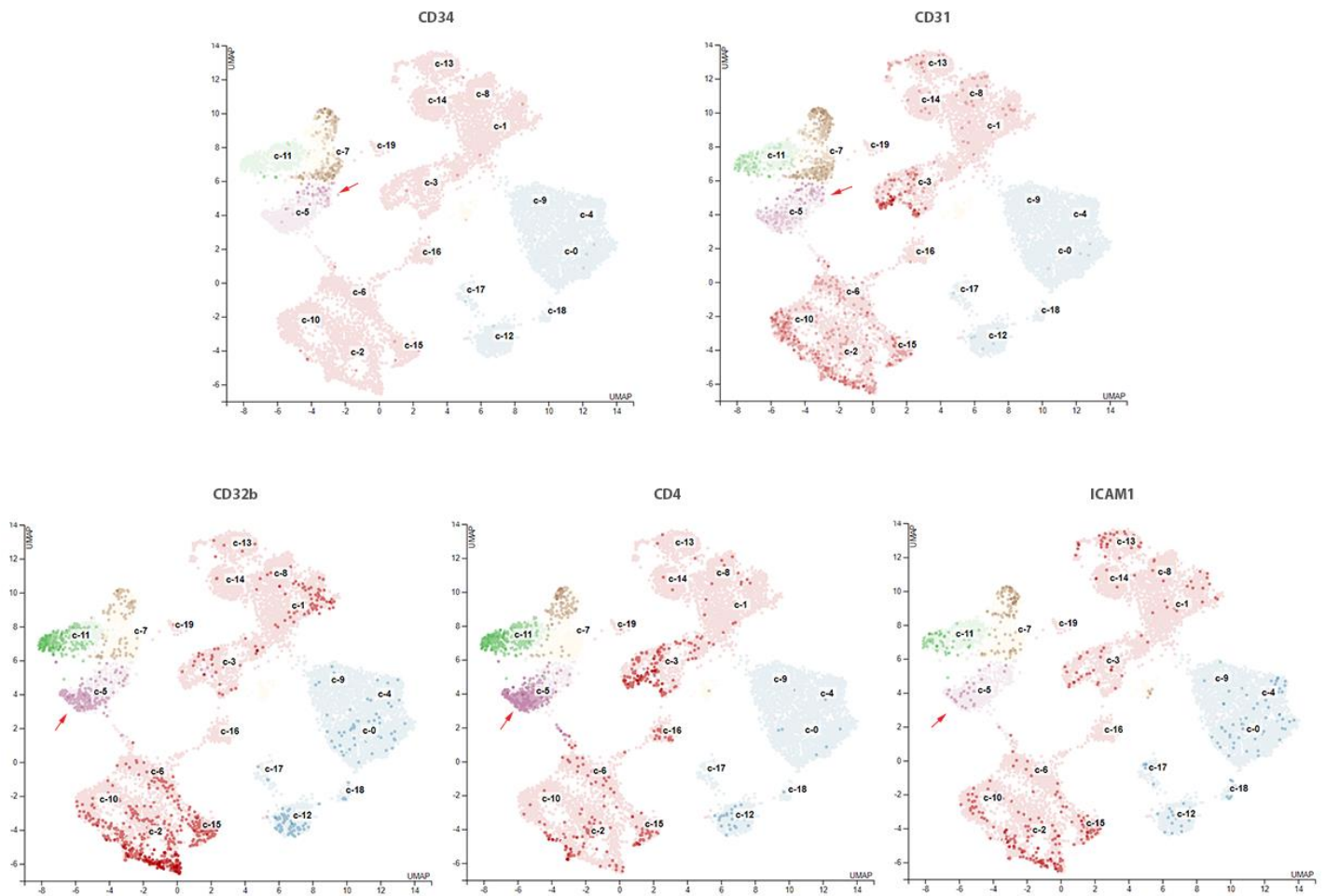


Figura 16. Gráfico UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) de *clusters* celulares del hígado. scRNAseq de los genes marcadores generales de células endoteliales CD34 y CD31 (panel superior) y marcadores específicos de células endoteliales sinusoidales CD32b, CD4 e ICAM1 (panel inferior). Los *clusters* están numerados según tipo celular, c0-4-9-12-18: hepatocitos; c1-8-13-14: células T; c16: células B; c2-6-10-15: células de Kupffer; c3: células del plasma; c5: células endoteliales; c7: células de músculo liso; c11: fibroblastos; c17: colangiocitos y c19: células eritroides.

El mismo análisis se realizó entonces para los genes *LGALS1* y *ANPEP*. En la figura 17 se observa que los niveles de expresión del ARNm de la lectina en las CE (*cluster* c5, 172,6 TPM normalizados (nTPM)) son más bajos que en los hepatocitos (*clusters* c0-4-9-12-18, 587,2 nTPM). El *cluster* de células de Kupffer (c2-6-10-15) tiene los niveles más altos de expresión del ARNm *LGALS1* del tejido (1853 nTPM). Por otro lado, *ANPEP* posee niveles de expresión más altos en el *cluster* de células endoteliales que en el correspondiente al de los hepatocitos (287,2 versus 165,4 nTPM). Este resultado se encuentra en línea con lo descrito por otros autores quienes también encontraron marcación positiva para CD13 en las CESs, mediante inmunohistoquímica (IHQ) [234]. Además, el patrón de expresión de *ANPEP* en el *cluster* 5 coincide con el encontrado para la expresión de CD32b, CD4 e ICAM1 en la figura 18. Los *clusters* que también mostraron moderada expresión de este marcador corresponden a colangiocitos (c17: 377,8 nTPM) y células de Kupffer (c2-6-10-15: 115 nTPM).

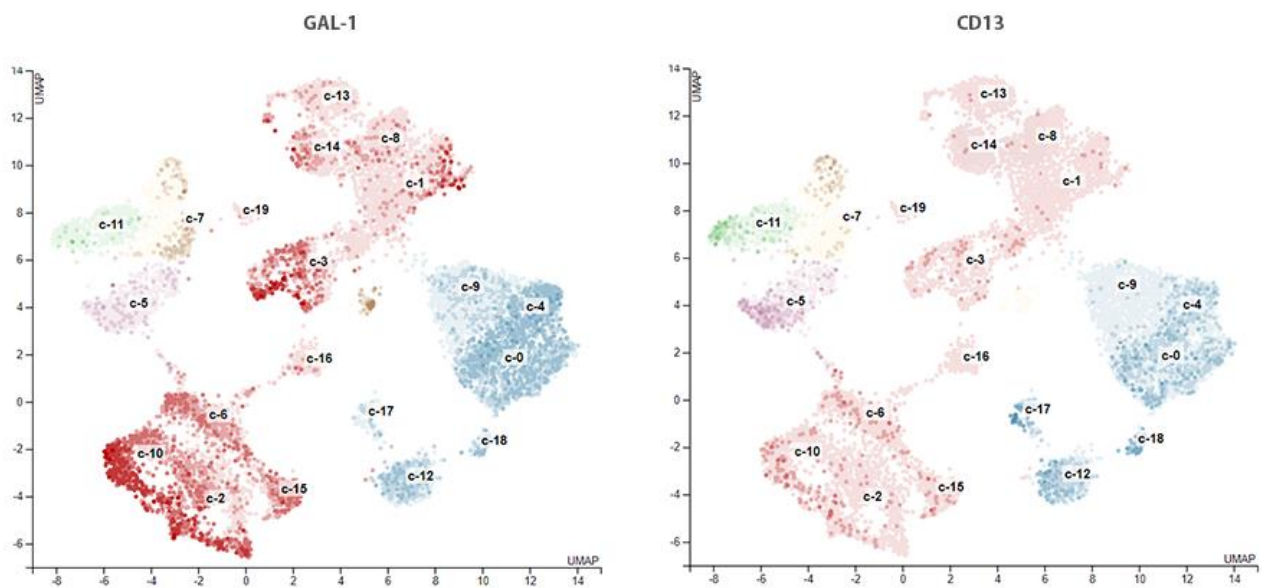


Figura 17. Gráfico UMAP de *clusters* celulares del hígado. scRNAseq de los genes *LGALS1* (Gal-1, izquierda) y *ANPEP* (CD13, derecha) en *clusters* de células residentes hepáticas. Los *clusters* están numerados según el tipo celular, c0-4-9-12-18: hepatocitos; c1-8-13-14: células T; c16: células B; c2-6-10-15: células de Kupffer; c3: células del plasma; c5: células endoteliales; c7: células de músculo liso, c11: fibroblastos; c17: colangiocitos y c19: células eritroides.

1.3 Análisis *in silico* de la expresión de Gal-1 y CD13 en líneas celulares hepáticas y endoteliales tumorales

La sección *Cell lines* de la plataforma THPA contiene el perfil de ARN de genes codificantes de proteínas de 1206 líneas celulares humanas ya establecidas, que incluyen 1132 líneas celulares tumorales, la mayoría de ellas obtenidas de la base de datos CCLE (*Cancer Cell Line Encyclopedia*). La plataforma THPA integra dicha información junto a la de una base de datos propia y clasifica la especificidad de la expresión génica en distintos tipos de cáncer, así como su distribución en todas las líneas celulares. Además, permite evaluar la consistencia de la expresión de los genes entre líneas celulares modelo y las cohortes de pacientes oncológicos correspondientes del TCGA [235]. Por ejemplo, en el cáncer de hígado, la comparación se puede realizar específicamente con las líneas celulares HEPG2 y SK-HEP-1 (utilizadas en este trabajo). En la figura 18 se observa la alta correspondencia entre la línea de hepatocitos tumorales HEPG2 y los datos obtenidos del TCGA. Por el contrario, para las células SK-HEP-1 se observa un bajo puntaje, en coincidencia con lo comentado previamente sobre el origen endotelial de esta línea celular hepática [236]. Sobre un total de 24 líneas celulares analizadas, las células HEPG2 se encuentran número 1 en el *ranking* de correspondencia, mientras que las células SK-HEP-1 se ubican en el número 21.

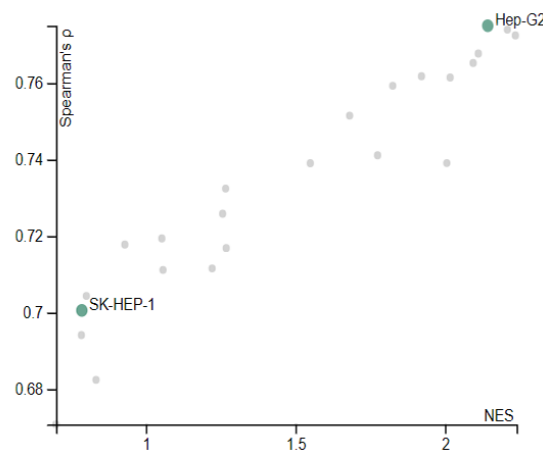


Figura 18. Consistencia entre líneas celulares y cohortes de CHC. Integración de *rankings* basada en la correlación de la expresión génica promedio de línea celular-cohorte de TCGA (ρ de Spearman) y la correlación de la expresión enriquecida en genes con elevada expresión; *Normalized Enrichment Score* (NES).

Además, la sección *Cell lines* de la plataforma THPA permite observar la expresión normalizada de un gen determinado en todas las líneas celulares disponibles.

Así, se obtuvo la expresión del ARNm de *LGALS1* en la línea celular endotelial SK-HEP-1 (7061,2 nTPM) y en la línea de hepatocitos tumorales HEPG2 (640,6 nTPM) (Fig. 19). En cuanto al gen *ANPEP* también se encontró que se expresa en mayor nivel en la línea SK-HEP-1 (725 nTPM) que en los hepatocitos tumorales HEPG2 (140,4 nTPM) (Fig. 19).

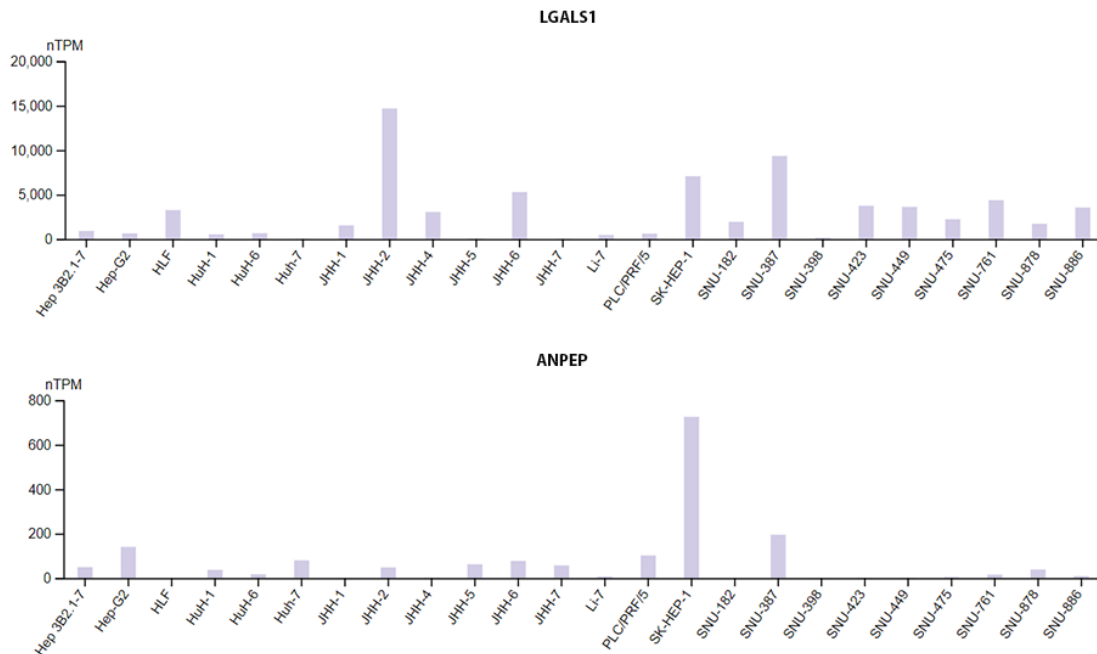


Figura 19. Expresión de ARNm (nTPM) de los genes *LGALS1* (panel superior) y *ANPEP* (panel inferior) para 24 líneas celulares tumorales hepáticas analizadas por THPA. Las líneas se encuentran ordenadas por orden alfabético.

1.4 Análisis *in silico* de la expresión proteica de Gal-1 y CD13 en muestras de pacientes con CHC

El sitio THPA (*The Human Protein Atlas*) [237] es un programa sueco que se inicia en 2003 con el objetivo de localizar todas las proteínas humanas en sus respectivas células, tejidos y órganos, utilizando la integración de varias tecnologías ómicas, incluyendo imágenes de histoquímica, proteómica basada en espectrometría de masa, transcriptómica y biología de sistemas. La sección *Pathology Atlas* en dicha plataforma permite acceder a imágenes de secciones histológicas de tejidos normales y de muestras tumorales. Dichas muestras fueron teñidas mediante la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) con 2 anticuerpos distintos conjugados con DAB (3,3'-diaminobencidina) (Atlas Antibodies/Sigma-Aldrich, Estados Unidos), mostrando

tinción positiva de coloración marrón. Las muestras provienen de material quirúrgico obtenido de pacientes con distinto grado de neoplasia.

En la figura 20 se observa la tinción de la proteína Gal-1 en las muestras de individuos normales y de pacientes con CHC. En línea con lo observado para la expresión del ARNm, los niveles de la lectina no son detectables en ninguna de las muestras provenientes de tejidos sanos (n=5). Por otro lado, de un total de 11 muestras de pacientes con CHC, en 3 de ellas se observó más del 75 % de las células positivas; en otra muestra se detectó entre el 25 y el 75 % de las células con marca citoplasmática y en las 2 muestras restantes se observó que menos del 25 % de las células tenía tinción en la membrana celular.

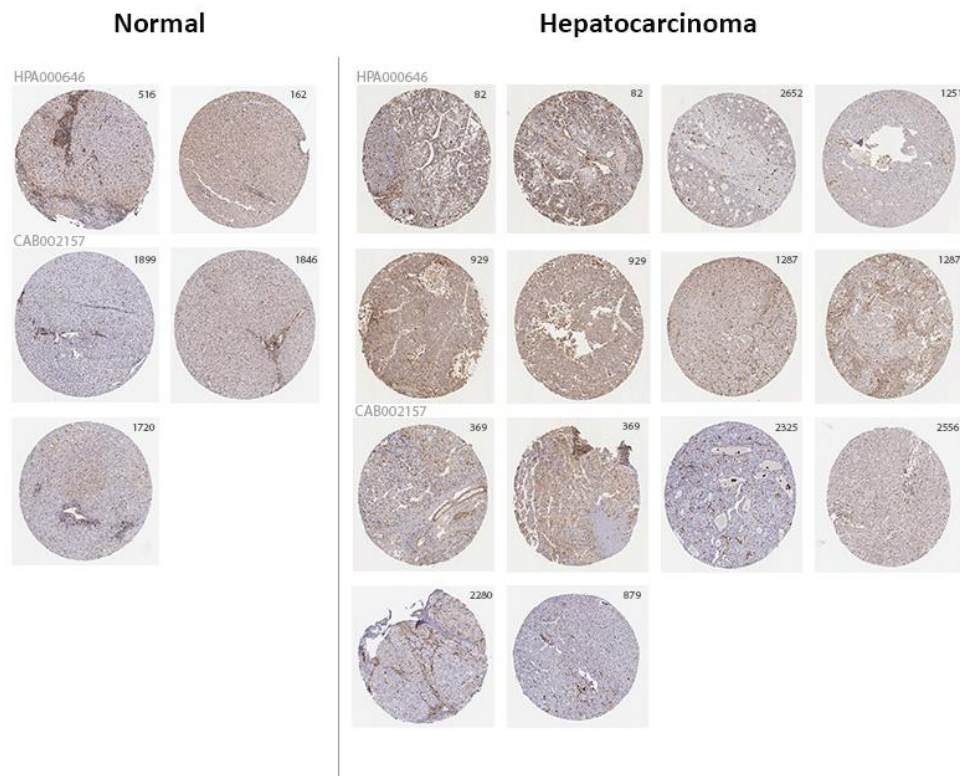


Figura 20. Expresión proteica de Gal-1 por IHQ en muestras de pacientes sanos (normal) y CHC. Muestras provenientes de individuos con y sin tumor hepático provenientes de biopsias anonimizadas fueron fijadas e incubadas con 2 anticuerpos distintos (HPA000646; CAB002157) seguidos de tinción con hematoxilina-eosina. Las muestras fueron analizadas por duplicado por patólogos especialistas y clasificadas según inmunoreactividad (negativo, débil, moderado, fuerte); representabilidad, como fracción de células teñidas (< 25 %, 25-75 % o > 75 %) y localización subcelular (nuclear o citoplasmática/membranosa). En cada imagen se detalla el número de paciente utilizado.

En la figura 21 se observan tinciones positivas para CD13 en 3 pacientes sanos, presentando una señal alta con fracción de células teñidas en tejidos tumorales mayor al 75 % (n=3) revelando con el anticuerpo HPA004625, y una fracción entre 25 y 75 % para al anticuerpo CAB002417 en los mismos pacientes.

En pacientes con CHC se observa también una señal alta y con fracción de células teñidas mayor al 75 % en todas las muestras reveladas con HPA004625 (n=6) mientras que la señal obtenida con CAB002417 resultó moderada con una fracción celular teñida mayor al 75 % en un solo paciente y entre 25 y 75 % en los restantes (n=2). Es interesante notar que la muestra proveniente del paciente 2556 fue analizada con ambos anticuerpos, observándose la menor tinción con anticuerpo CAB002417, como limitante de la técnica.

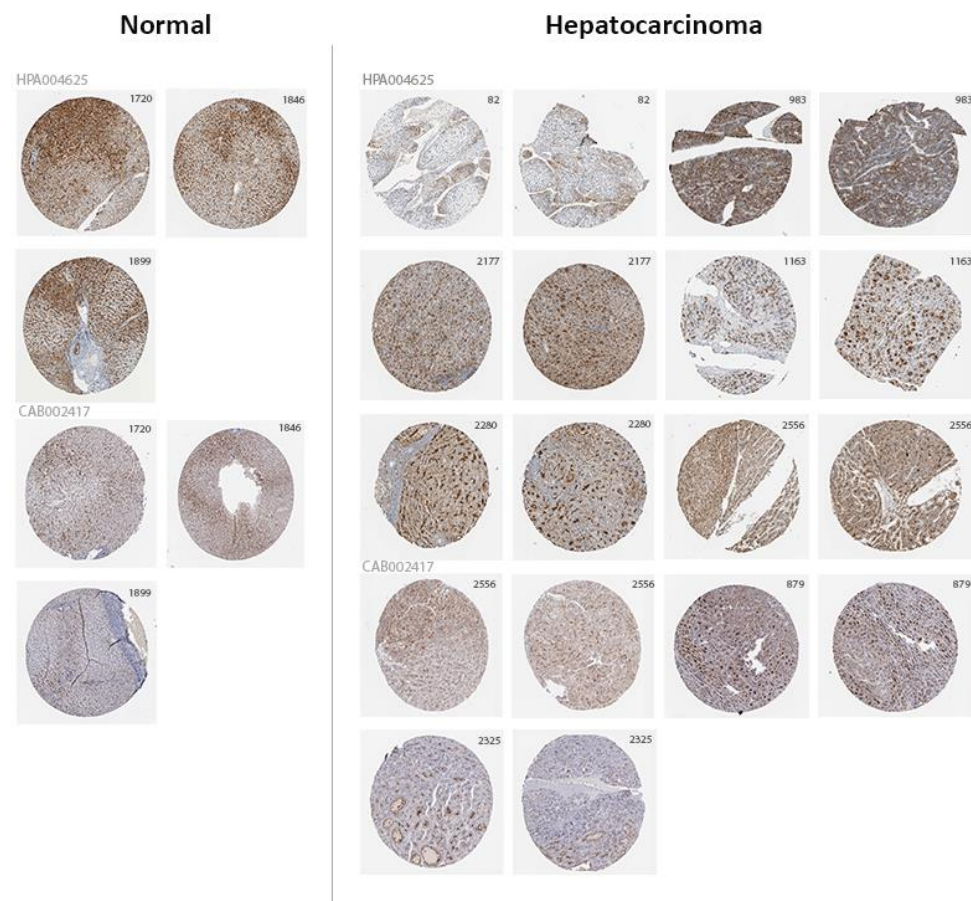


Figura 21. Expresión proteica de CD13 por IHQ en muestras de pacientes sanos (Normal) y CHC. Muestras provenientes de pacientes con y sin tumor hepático provenientes de biopsias anonimizadas fueron fijadas e incubadas con 2 anticuerpos distintos seguidos de tinción con hematoxilina-eosina. Las muestras fueron analizadas por duplicado por patólogos especialistas y clasificadas según inmunoreactividad (negativo, débil, moderado, fuerte); representabilidad como fracción de células teñidas

(< 25 %, 25-75 % o > 75 %) y localización subcelular (nuclear o citoplasmática/membranosa). En cada imagen se detalla el número de paciente utilizado.

Estos resultados nos permiten confirmar la expresión elevada de Gal-1 y CD13 a nivel proteico en muestras de pacientes con CHC.

1.5 Análisis *in vitro* de la expresión proteica de Gal-1 y CD13 en líneas celulares hepáticas y endoteliales tumorales

En primer lugar, se evaluó la expresión de las proteínas Gal-1 y CD13 en la línea celular endotelial hepática SK-HEP-1, utilizada como modelo de células endoteliales sinusoidales hepáticas (CESHs), y se la comparó con la expresión observada en la línea endotelial EA.hy.926, establecida a partir de células HUVEC. Se realizaron lisados celulares y se analizó la expresión proteica mediante *Western blotting*, tal como se detalla en el capítulo 1 de la sección Materiales y métodos.

En ambas líneas celulares se observó la presencia de una sola banda de aproximadamente 150 kDa, perteneciente a la aminopeptidasa CD13, sin diferir estadísticamente su expresión relativa entre las células SK-HEP-1 y EA.hy.926 (Fig. 22). La proteína Gal-1 se observa como una banda de aproximadamente 14 kDa, cuya expresión relativa se encuentra en un nivel 50 % menor en las células EA.hy.926 no asociadas a tumor hepático que en las células SK-HEP-1 derivadas de un cáncer de hígado (Fig. 22).

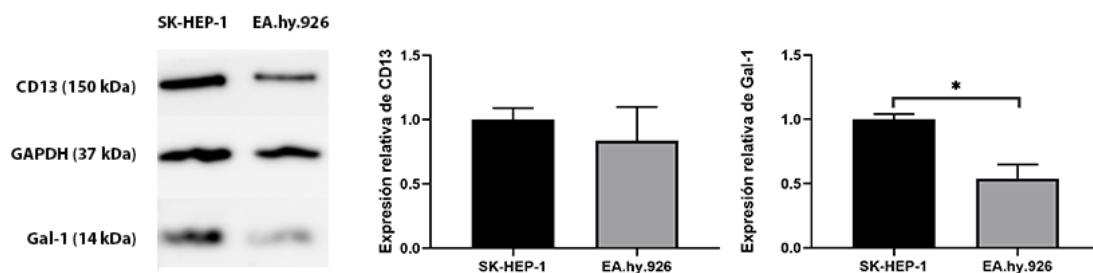


Figura 22. Expresión de CD13 y Gal-1 en células endoteliales. Se evaluó mediante *Western blotting* y análisis densitométrico la expresión de CD13 y Gal-1 en lisados de las líneas celulares SK-HEP-1 y EA.hy.926. Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH. Los datos se expresan como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) a partir de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ (Test *t* de Student).

En segundo lugar, se evaluó la expresión de CD13 en hepatocitos tumorales con distintos niveles de Gal-1 para estudiar la posible modulación recíproca entre Gal-1 y su presumible receptor CD13. Para ello se realizaron lisados totales de las células HEPG2 *wild type* (WT), transfectadas de manera estable con el plásmido pcDNA3.1-*LGALS1* (HEPG2-GAL) para sobreexpresar Gal-1 o con el plásmido sin inserto como control (HEPG2-MOCK). Además, se realizaron lisados a partir de células HEPG2 WT transfectadas con el plásmido *Galectin-1 shRNA Plasmid (h)*, (HEPG2-*shGal*) para silenciar en forma estable la expresión de Gal-1 o con un plásmido diseñado para generar un *shARN* sin un objetivo conocido en el transcriptoma humano *scrambled* (HEPG2-*shScr*) como control. En la figura 23 se observa que los niveles de expresión de la aminopeptidasa CD13 en las células HEPG2 no se modifican significativamente al incrementarse o disminuirse la expresión de Gal-1.

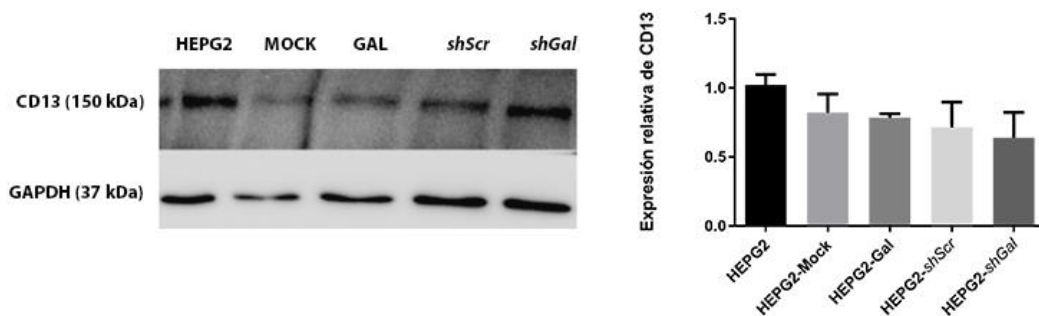


Figura 23. Expresión de CD13 en hepatocitos tumorales. Se evaluó mediante *Western blotting* y análisis densitométrico la expresión de CD13 en lisados celulares de las líneas (de izquierda a derecha): HEPG2 WT; HEPG2-MOCK control y HEPG2-GAL sobreexpresando Gal-1; HEPG2-*shScr* control y HEPG2-*shGal* con expresión de Gal-1 disminuida. Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH. Los datos se expresan como la media $\pm$ el error estándar (SEM) a partir de 4 experimentos independientes. (Test ANOVA de una vía seguido del Test de Tukey).

Con esta misma idea de estudiar la posible modulación recíproca de la expresión entre Gal-1 y CD13, se decidió analizar las CESHs SK-HEP-1 con edición génica de CD13 (KOCD13), en un clon generado utilizando el plásmido *CD13 Double Nickase Plasmid (h)* (como se describe en la sección de Materiales y métodos).

En la figura 24 se muestran los resultados que confirman que CD13 es indetectable en el clon de células SK-HEP-1 KOCD13, y se observa que los niveles de expresión de Gal-1 en las líneas transfectadas no se modifican respecto de la línea *wild type*.

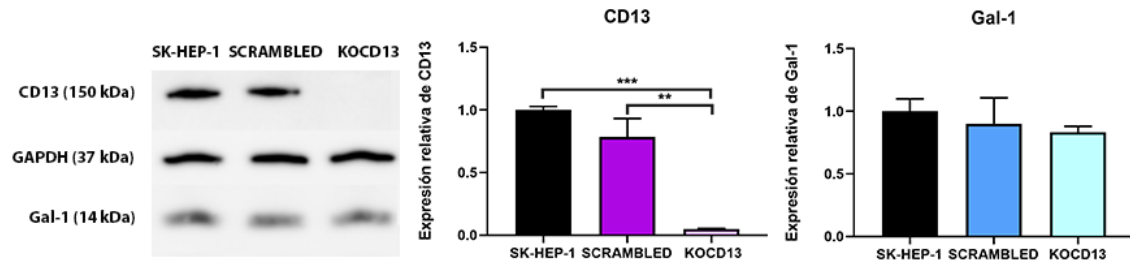


Figura 24. Expresión de CD13 y Gal-1 en CESHs SK-HEP-1. Se evaluó mediante *Western blotting* y análisis densitométrico la expresión de CD13 y Gal-1 en lisados de las células SK-HEP-1 WT; SCRAMBLED control y KOCD13. Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM a partir de 3 experimentos independientes. (Test ANOVA de una vía seguido del Test de Tukey. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

En resumen,

la información disponible en plataformas bioinformáticas en su conjunto nos permitió analizar distintas bases de datos públicas y concluir que se encuentran altos niveles de Gal-1 en muestras de pacientes con CHC y que dicha proteína está asociada a peores pronósticos de sobrevida.

CD13 es una proteína que se expresa en altos niveles basales tanto en hepatocitos como en CESHs y sus valores no se verían alterados en pacientes con la enfermedad.

En la línea SK-HEP-1, CD13 se expresa en niveles comparables a otra línea endotelial no tumoral, mientras que Gal-1 presenta una mayor expresión respecto a las células no tumorales.

La expresión de la aminopeptidasa en las células HEPG2 se mantiene estable independientemente de las variaciones en los niveles de Gal-1.

Estos resultados en conjunto nos permiten confirmar que las líneas celulares utilizadas en el presente trabajo resultan un buen modelo para su estudio.

En los próximos capítulos se presentarán los resultados que confirman la interacción entre Gal-1 y el receptor CD13, y que demuestran la relevancia de dicha interacción en el vínculo entre los hepatocitos tumorales y las CESHs.

Capítulo 2.

Estudio de la interacción física entre el receptor CD13 y Gal-1

Como se mencionó previamente, nuestro grupo de trabajo identificó posibles receptores de Gal-1 en las CESHs SK-HEP-1 mediante cromatografía de afinidad, digestión proteolítica *in gel* y espectrometría de masa, siendo uno de ellos la proteína CD13. En este capítulo, se describirán los resultados tendientes a confirmar la interacción entre Gal-1 y CD13.

Por medio de plataformas informáticas de minería de texto se puede realizar un análisis predictivo del interactoma de una proteína. STRING es una base de datos de interacciones proteína-proteína, tanto conocidas como de carácter predictivo. Incluye interacciones directas (físicas) y asociaciones indirectas (funcionales) provenientes de minería de texto automática y predicción computacional [238]. Esta herramienta nos permite evaluar entonces el conjunto de interacciones para las proteínas de interés, a las cuales se les asigna un puntaje que otorga el nivel de confianza en cada par de unión. Utilizando un umbral de 0,4 como puntaje y limitando a 50 interacciones como máximo, podemos observar las principales proteínas con las cuales interactúa la aminopeptidasa CD13 (Fig. 25). Entre ellas se encuentra Gal-3 (*LGALS3*) con un puntaje promedio de 0,437. La plataforma permite acceder a las fuentes primarias de la información donde, además del trabajo de Yang y colaboradores, ya discutido en la sección Introducción [223], encontramos otras fuentes de evidencia de interacción física [239], [240] y funcional [241] entre CD13 y Gal-3.

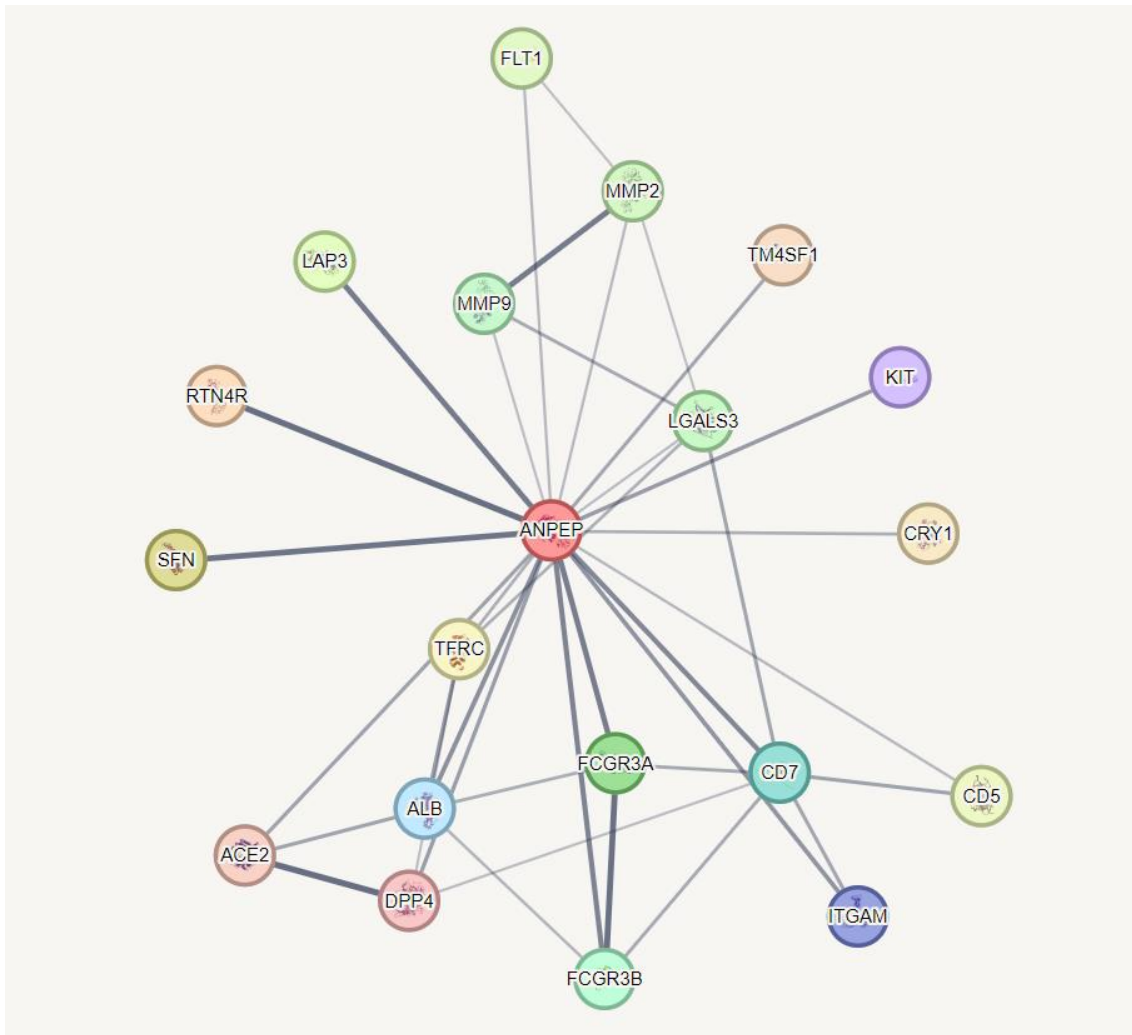


Figura 25. Red de interacción de CD13. Visualización de la red de interacciones proteína-proteína de CD13 (*ANPEP*) marcada en rojo. La intensidad de las conexiones es proporcional al nivel de evidencia y confianza. Número de nodos: 20; grado promedio 3,7 por nodo.

Por otro lado, el interactoma físico de Gal-1, utilizando los mismos filtros, no arrojó resultados con CD13 (Fig. 26) pero sí lo hizo en la ampliación de todos los filtros restrictivos con un puntaje de 0,392 (Fig. 27). Cuando accedimos a la información de las fuentes bibliográficas, observamos que la predicción estaba basada en las evidencias de interacción de CD13 con Gal-3 y Gal-4 [242].

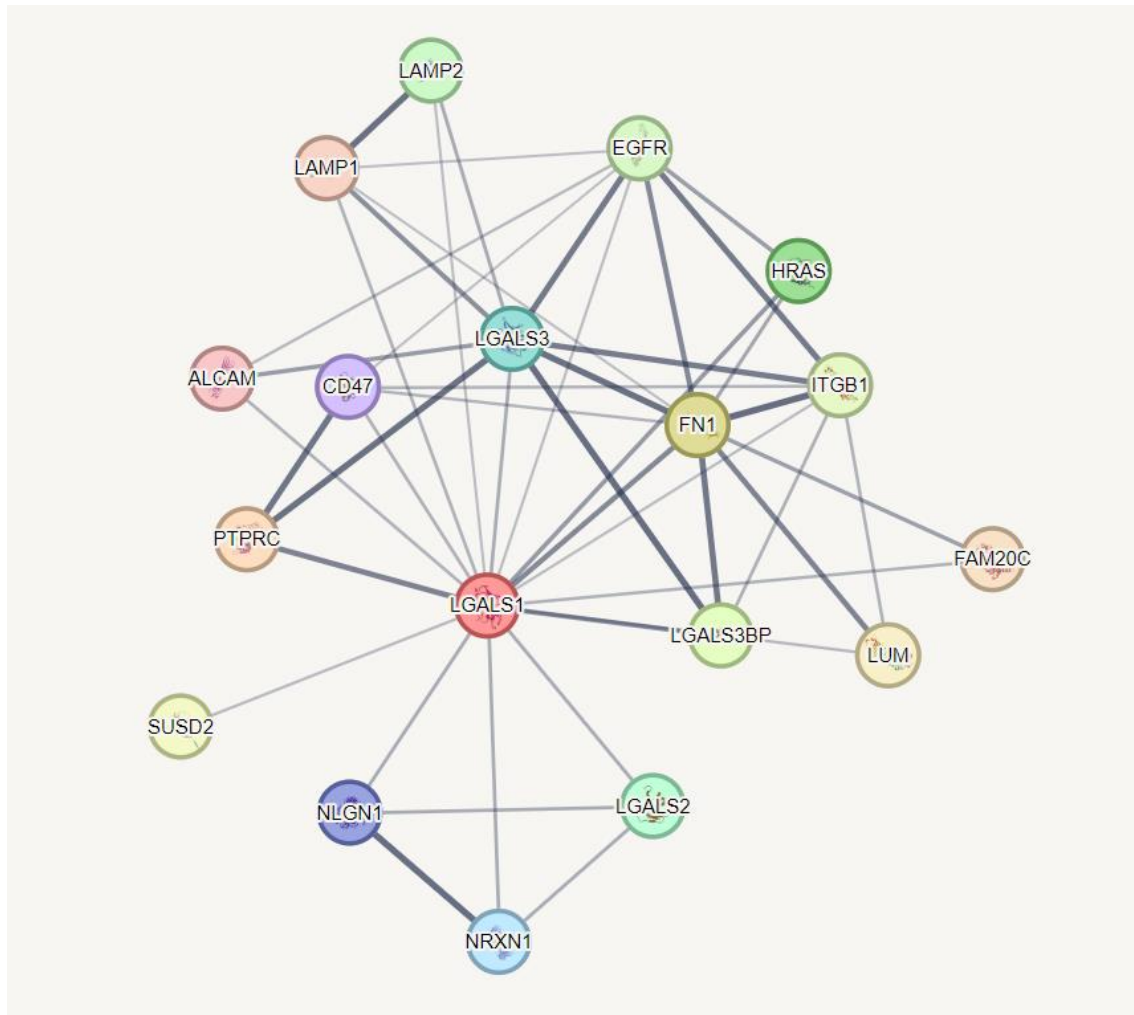


Figura 26. Red de interacción de Gal-1. Visualización de la red de interacciones proteína-proteína de Galectina-1 (*LGALS1*) marcada en rojo. La intensidad de las conexiones es proporcional al nivel de evidencia y confianza. Número de nodos: 18; grado promedio 5,1 por nodo.

en lisados celulares. Brevemente, se lisaron las células SK-HEP-1 como se explica en la sección de Materiales y métodos, y se incubaron toda la noche con un anticuerpo primario policlonal anti-Gal-1. Luego se realizó una incubación por 4 horas con una matriz de proteína A-agarosa anteriormente bloqueada con BSA al 0,1 %. La cantidad de lavados fue puesta a punto previamente para eliminar la unión inespecífica a la proteína A.

En la figura 28 se observan las calles sembradas con las muestras incubadas con los anticuerpos inmunoprecipitantes (IP) control (GAPDH, calle 1) y Gal-1 (calle 2), y la calle con la muestra INPUT (solubilizado sin anticuerpos). El revelado se realizó con el anticuerpo anti-CD13 (panel superior) y anti-Gal-1 (panel inferior). Podemos concluir que la técnica fue correctamente desarrollada pues, el anticuerpo precipitante efectivamente enriqueció la muestra con la proteína Gal-1: se observan las bandas correspondientes al monómero (14 kDa) y dímero (30 kDa), y bandas de mayor peso molecular correspondientes a agregados proteicos. Sin embargo, ante exhaustivos lavados, CD13 no co-inmunoprecipitó junto a Gal-1 (panel superior). Esto podría deberse tanto a la falta de unión como a una interacción demasiado débil o efímera para ser detectada con esta técnica.

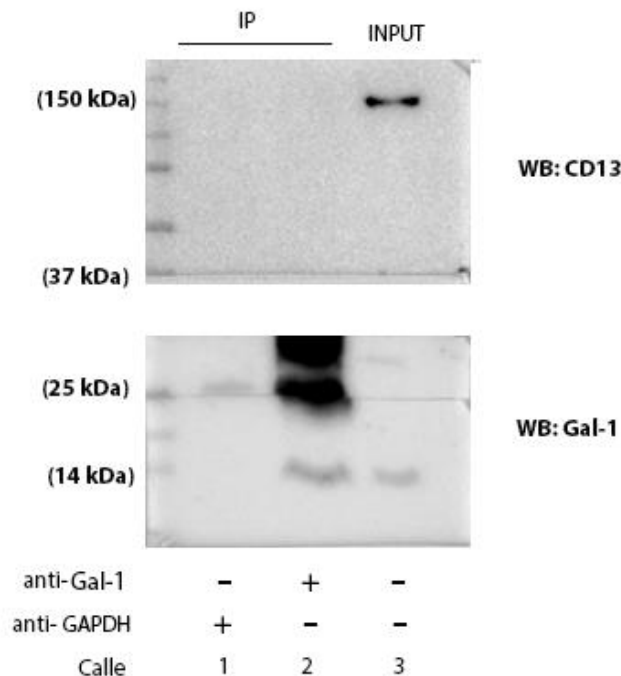


Figura 28. Evaluación de la co-inmunoprecipitación de Gal-1 y CD13 en células SK-HEP-1. *Western blotting* revelado con anti-CD13 (panel superior) y anti-Gal-1 (panel inferior) en muestras provenientes de un solubilizado de células SK-HEP-1 (INPUT) incubadas con anticuerpo inmunoprecipitante anti-Gal-1 o anti-GAPDH como control negativo.

2.2 Estudio de la interacción entre Gal-1 y CD13 mediante *Far Western blotting*

Far Western blotting es un método basado en la técnica de *Western blotting* para evidenciar la unión entre dos proteínas *in vitro* sobre una membrana de PVDF [244], [245]. Brevemente, se siembra un lisado celular o una muestra de un enriquecimiento de una fracción celular en un gel de poliacrilamida y se realiza la corrida electroforética en condiciones desnaturalizantes. Luego, las proteínas resueltas se electrotransfieren a una membrana de PVDF, la cual se incuba toda la noche con la proteína a testear (en condición nativa y pura), para finalmente revelar por *Western blotting*.

En el ensayo se utilizaron las células SK-HEP-1 transfectadas con el sistema *CD13 Double Nickase Plasmid (h)* que consiste en un par de plásmidos que codifican para la nucleasa Cas9 mutada D10A y un ARN guía de 20 nucleótidos (gARN) diseñados para la disrupción génica de CD13 humana, como se explica en el capítulo 1 de Materiales y métodos. El *knock-out* de CD13 se confirmó mediante *Western blotting*, tal como se describió en la Fig. 24 del capítulo 1 de la sección de Resultados. En las células KOCD13 la expresión de CD13 fue indetectable, y los niveles de Gal-1 no variaron significativamente en la línea KOCD13 con respecto a las células control SCRAMBLED y SK-HEP-1 sin transfectar.

En primer lugar, a partir de las células SK-HEP-1, SCRAMBLED y KOCD13 se obtuvieron fracciones de proteínas de membrana como se detalla en el capítulo 2 de Materiales y métodos. Dichas fracciones proteicas (eluatados), conteniendo o no a CD13, se sometieron a cromatografía de afinidad en una columna de Gal-1 humana recombinante (rGal-1)-agarosa. rGal-1 fue expresada y purificada como se detalla en el capítulo 2 de Materiales y métodos. Las proteínas de membrana retenidas en la columna de afinidad se eluyeron con lactosa, se determinó la concentración de proteínas totales y se ajustó a una concentración final de 2 mg/ml en todas las muestras. Luego, una alícuota de cada una de las fracciones, con o sin CD13, conteniendo las proteínas con afinidad por Gal-1 se sometieron a *Western blotting*. En la figura 29 se observa el resultado obtenido que demuestra que CD13 está presente en la fracción de proteínas de membrana de las células SK-HEP-1, y que posee afinidad por Gal-1. Además se confirmó que la fracción proteica proveniente de las células KOCD13 no expresa CD13.

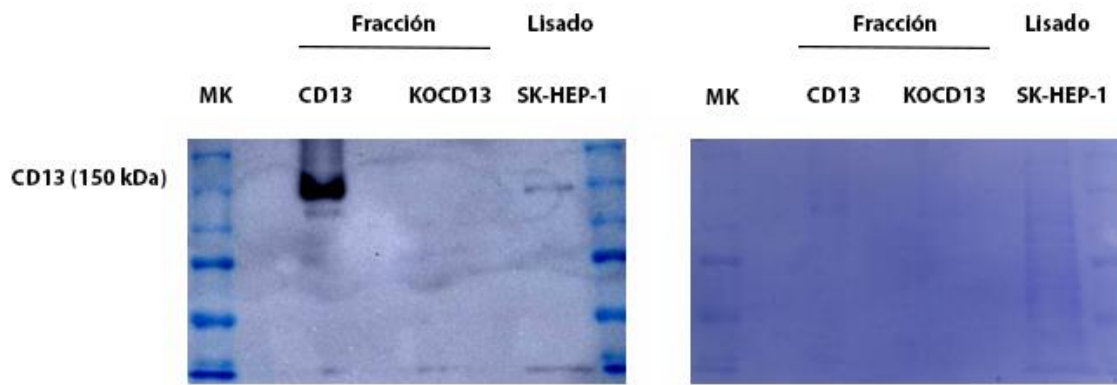


Figura 29. Expresión de CD13 en fracciones de proteínas de membrana con afinidad por Gal-1, derivadas de células SK-HEP-1 SCRAMBLED que expresan CD13 (calle CD13) o no (calle KOCD13) mediante *Western blotting*. Como control se utilizó un lisado total de células SK-HEP-1. La membrana de PVDF fue incubada con un anticuerpo anti-CD13, seguido del anticuerpo secundario correspondiente y el revelado se realizó con ECL (Pierce Biotechnology, Estados Unidos) (panel izquierdo). Luego, la misma membrana fue teñida con *Coomassie brilliant blue* (panel derecho). MK: marcadores de peso molecular. Se muestra un experimento representativo de 3 ensayos independientes.

Luego, las fracciones o eluatos de proteínas de membrana con afinidad por Gal-1, conteniendo o no CD13, se sometieron a *Far Western blotting*. Una vez realizadas la corrida electroforética y la electrotransferencia, la membrana de PVDF se bloqueó e incubó con rGal-1 en una concentración final de 5 $\mu\text{g/ml}$. Luego de lavados exhaustivos, se incubó la membrana con un anticuerpo primario anti-Gal-1 y a continuación, con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con HRP (peroxidasa de rábano picante). El revelado se realizó utilizando el reactivo 4-cloro-1-naftol como sustrato de la HRP en una reacción que forma un precipitado coloreado. Esta reacción colorimétrica menos sensible que el revelado por quimioluminiscencia nos permitió obtener un resultado más claro, dado que la incubación con rGal-1 mostró una excesiva señal positiva en la membrana.

En la figura 30 se observa el resultado obtenido al analizar muestras enriquecidas en proteínas de membrana de células SK-HEP-1 SCRAMBLED (contienen CD13) y KOCD13, con afinidad por Gal-1. En la membrana M1 (centro), incubada en presencia de rGal-1 y revelada con el anticuerpo anti-Gal-1, se observa una banda de peso molecular aparente de 150 kDa (calle CD13) y la ausencia de dicha banda en la calle KOCD13. En la membrana M2 (izquierda), incubada en ausencia de rGal-1 y revelada con el anticuerpo anti-Gal-1 (control negativo), no se observan bandas reactivas. En la membrana 3 (M3), revelada con el anticuerpo anti-CD13, se evidencia

la banda de CD13 a la altura de 150 kDa en la calle correspondiente (control positivo). Por lo tanto, se puede sugerir que Gal-1 interactúa físicamente con CD13 presente en la membrana de las células SK-HEP-1.

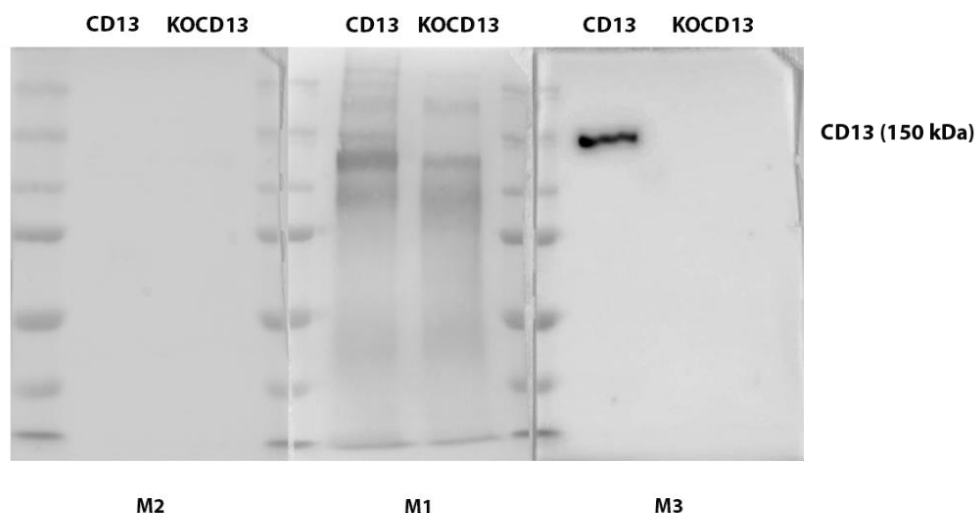


Figura 30. Interacción entre Gal-1 y CD13 en células SK-HEP-1 mediante la técnica de *Far Western blotting*. (A) Las calles fueron sembradas con 10 µg de fracciones de proteínas de membrana con afinidad por Gal-1, derivadas de células SK-HEP-1 SCRAMBLED que expresan CD13 (calle CD13) o no (calle KOCD13). Las membranas fueron bloqueadas con BSA al 3%. M1 fue incubada toda la noche con rGal-1 5 µg/ml en BSA al 1 %-TBS y M2 solo con BSA al 1 %-TBS. Luego de lavados exhaustivos ambas membranas fueron incubadas con un anticuerpo anti-Gal-1; seguido del anticuerpo secundario correspondiente y reveladas con 4-cloro-1 naftol. M3 fue incubada con un anticuerpo anti-CD13, seguida de la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente y revelada con ECL (Pierce Biotechnology, Estados Unidos). Se muestra un experimento representativo de 3 ensayos independientes.

2.3 Estudio de la interacción entre Gal-1 y CD13 mediante Resonancia Plasmónica de Superficie

A continuación se realizaron experimentos con la técnica de Resonancia Plasmónica de Superficie (RPS) para poder confirmar la unión específica, física y directa entre CD13 y Gal-1. Se utilizó a CD13 presente en la fracción de proteínas de membrana con afinidad por Gal-1 proveniente de las células SK-HEP-1 SCRAMBLED como ligando inmovilizado en un *chip* del equipo BIAcore. Por otro lado, como muestra blanco se empleó la fracción de proteínas de membrana con afinidad por Gal-1 proveniente de las células KOCD13. Como analito se utilizaron diluciones al medio de una solución de rGal-1 (20 mM), las cuales se inyectaron sobre el *chip* con CD13

acoplado. La técnica se desarrolló como se describe en el capítulo 2 de la sección de Materiales y métodos.

Los resultados fueron expresados como señal de respuesta (unidades de resonancia) en función del tiempo y representados en sensorgramas. En la Figura 31 se observa la evolución de la respuesta obtenida. A medida que aumenta la concentración de rGal-1, la señal de respuesta también se incrementa, lo que demuestra su interacción directa con CD13 en todas las concentraciones ensayadas. A partir de la pendiente de esta zona del gráfico se puede obtener la tasa de asociación o K_{on} . La forma de cada curva tiende a ser cuadrada, con asociaciones y disociaciones muy rápidas. La tasa de disociación o K_{off} es la velocidad con la que se disocia el complejo y se obtiene de la zona final de la curva.

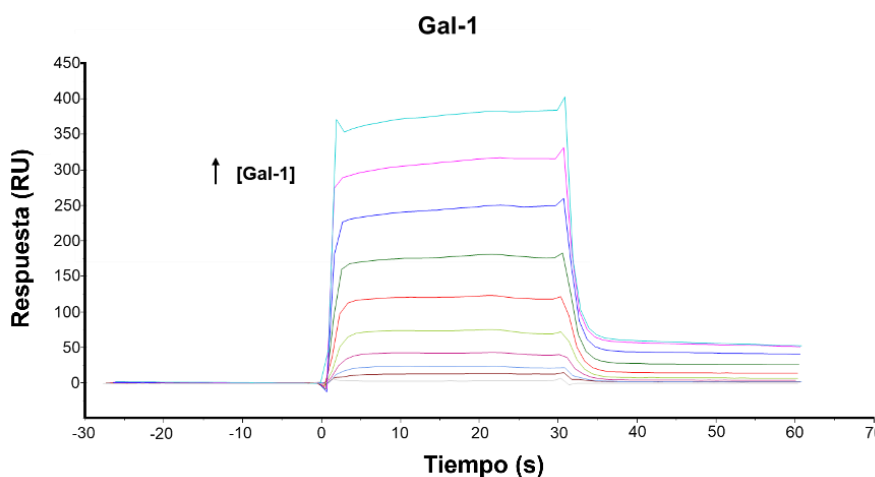


Figura 31. Interacción física y directa entre CD13 inmovilizada y rGal-1 en solución. Los eluatos “CD13” y “KOC13” fueron inmovilizados por química de aminas en un chip sensor CM5, tal como se describe en la sección de Materiales y métodos. “KOC13” fue utilizado como blanco. Soluciones en concentraciones crecientes de rGal-1 (0,0075 – 20 mM) fueron inyectadas durante 30 segundos con un tiempo de disociación de otros 30 segundos. Los sensorgramas resultantes fueron superpuestos en el gráfico de Respuesta (RU, unidad de resonancia) en función del tiempo.

En el gráfico de la figura 32 se observa el ajuste cinético no lineal de la respuesta máxima obtenida (de la Fig. 31) en función del tiempo para cada concentración de rGal-1 utilizada. Dicho ajuste permitió obtener un valor de constante de disociación (K_D) para cada curva a través de la determinación de los valores de K_{on} y K_{off} , y de su relación (K_{off}/K_{on}). El valor de K_D obtenido fue de $2,2 \times 10^{-6}$ M. Por otro lado, realizando una cinética de unión de las distintas RU alcanzadas en cada concentración en estado estacionario (Fig. 33), se estimó el valor de K_D o $K_{0.5}$ como la concentración de analito a la cual se encuentra el 50 % de la respuesta máxima, siendo

éste $4,0 \times 10^{-6}$ M.

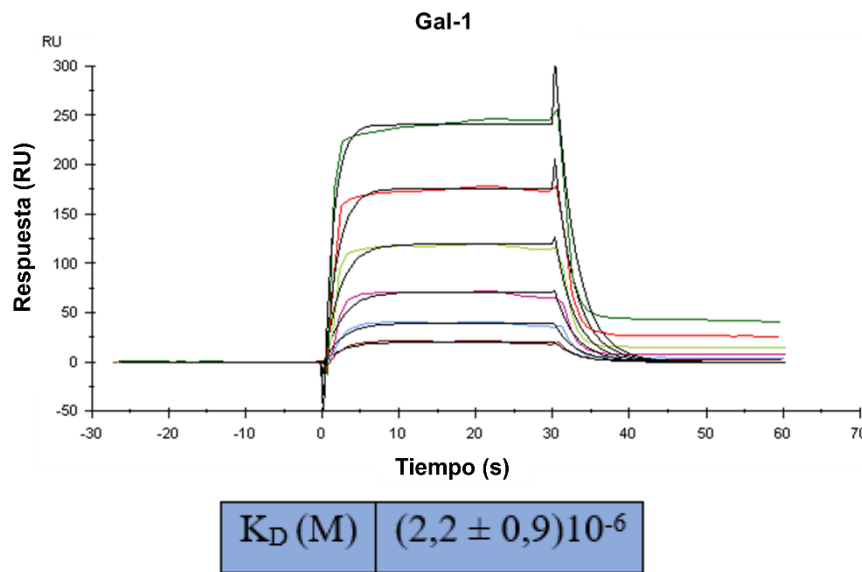


Figura 32. Cinética de la interacción entre CD13 y rGal-1. Ajuste cinético para cada concentración de rGal-1 para el cálculo de las tasas K_{on} (asociación) y K_{off} (disociación) a partir de 3 experimentos independientes promediados y analizados utilizando *BIAevaluation software*.

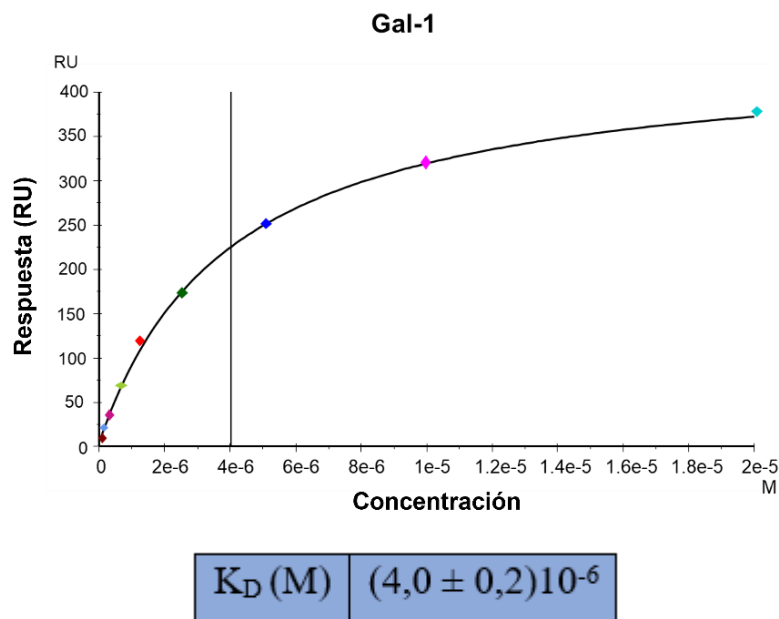


Figura 33. Cinética de la interacción entre CD13 y rGal-1. Ajuste hiperbólico de la RU alcanzada en estado estacionario en función de la concentración utilizada del analito rGal-1. K_D se calcula como la concentración de analito a la cual la respuesta es la mitad de la respuesta máxima.

Los valores obtenidos de K_D por medio de dos ajustes cinéticos distintos utilizando el *software* *BIAevaluation* fueron promediados siendo éste $3,1 \times 10^{-6}$ M para Gal-1.

Se analizó también la dependencia de glicanos en la interacción de Gal-1 con CD13. Utilizando una concentración de rGal-1 fija de 1,2 μM se comparó la inyección de la lectina sola, pre-incubada con lactosa, un azúcar competidor del DRC, o con sacarosa, como control negativo (Fig. 34). En la figura se observa que la interacción entre Gal-1 y CD13 se previno completamente en presencia de lactosa debido a que la respuesta relativa disminuyó a valores cercanos a 0. Por otro lado, la interacción entre ambas proteínas no se vió afectada cuando la corrida se realizó pre-incubando con sacarosa, un azúcar que no es capaz de unirse al DRC de Gal-1. Además, al volver a inyectar rGal-1 en el cuarto ciclo se confirmó que la superficie del *chip* no se vió comprometida luego de las pruebas realizadas. Los ciclos 5 (PBS + Lac) y 6 (PBS) son controles negativos y muestran que los vehículos utilizados no producen señal de respuesta sobre CD13.

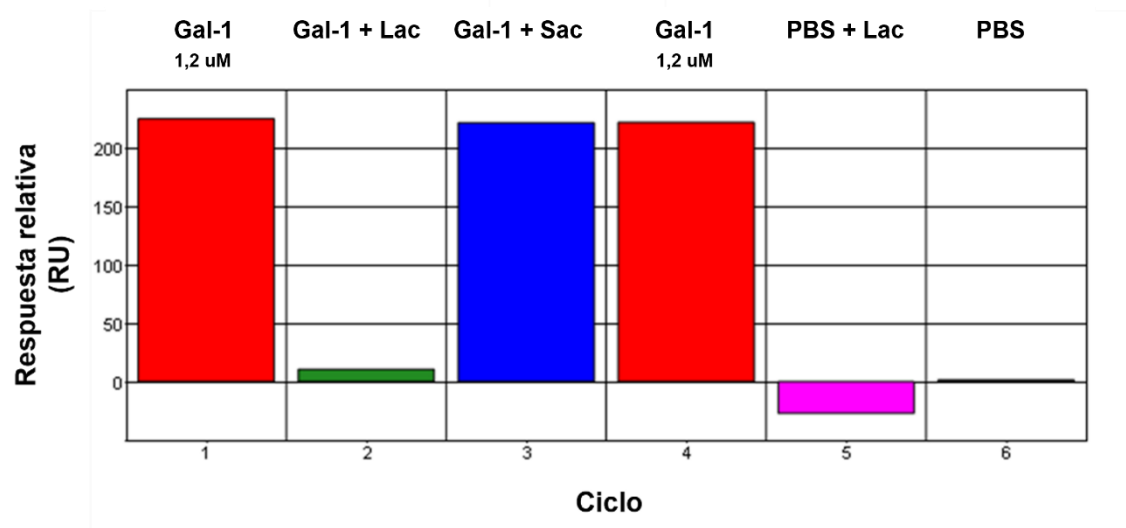


Figura 34. Dependencia de glicanos en la interacción directa entre CD13 y rGal-1. Pre-incubación con lactosa (Lac) 1 mM, azúcar inhibidor de galectinas reconocido por el DRC (ciclo 2); sacarosa (Sac) 1 mM, disacárido no reconocido por galectinas (ciclo 3); controles negativos de PBS-Lac (ciclo 5) y PBS solo (ciclo 6). La integridad de la superficie antes y después del ensayo fue confirmada inyectando Gal-1 1,2 μM (ciclos 1 y 4).

Como control positivo utilizamos a galectina-3 recombinante (rGal-3) en solución y confirmamos la interacción con CD13 (Fig. 35). Asimismo observamos que rGal-3 presenta una cinética de interacción diferente a la de rGal-1, con velocidades de asociación y disociación más lentas.

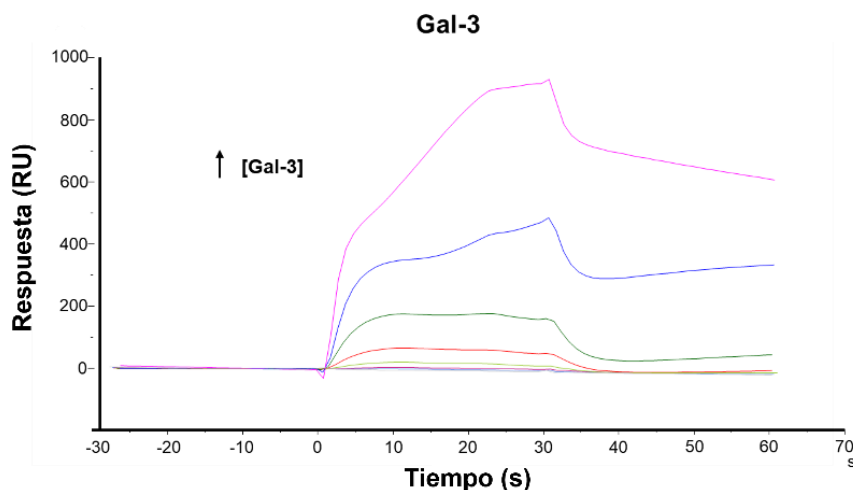


Figura 35. Interacción física y directa entre CD13 inmovilizada y rGal-3 en solución. Los eluatos “CD13” y “KOCD13” fueron inmovilizados por química de aminas en un chip sensor CM5 y “KOCD13” fue utilizado como blanco. Concentraciones crecientes del ligando conocido rGal-3 (0,075 – 2 μ M), fueron inyectados durante 30 segundos con un tiempo de disociación de otros 30 segundos. Los sensorgramas resultantes fueron superpuestos en el gráfico de RU en función del tiempo.

El valor obtenido de K_D por medio del ajuste cinético para Gal-3 fue $4,1 \times 10^{-6}$ M.

En resumen,

mediante bioinformática se pudo predecir que CD13 es un excelente candidato a ser receptor de Gal-1.

Aunque la técnica de co-IP no permitió evidenciar la interacción entre Gal-1 y CD13, el resultado obtenido mediante *Far Western blotting* sugirió que Gal-1 es capaz de interactuar con CD13 en las CESHs SK-HEP-1.

Por medio de RPS se confirmó la unión física y directa de ambas proteínas mediada por el DRC de Gal-1, con una K_D promedio estimada de $3,1 \times 10^{-6} \text{ M}$.

Capítulo 3.

Estudio de la cooperación entre Gal-1 y CD13 en la diseminación y la angiogénesis del endotelio sinusoidal asociado al tumor hepático

3A Análisis de los roles de Gal-1 y CD13 en la adhesión heterotípica entre hepatocitos tumorales y endotelio sinusoidal hepático

La formación de nuevos tumores, ya sea debido a la recurrencia local, micrometástasis o por diseminación a distancia, resulta de la interacción entre las células tumorales con su microambiente, especialmente los vasos sanguíneos y linfáticos [246]. Durante el proceso metastásico, las células tumorales interactúan primero con el endotelio, al cual deben adherirse localmente para poder trasvasar y colonizar nuevos tejidos [247].

Previamente, se reportó la participación de Gal-1 en el proceso de adhesión celular [248], [91] así como también la de CD13 [213], [214]. En particular, resultados de nuestro laboratorio demostraron que el aumento de la expresión de Gal-1 en células de CHC promueve su adhesión a las células endoteliales SK-HEP-1, mientras que su disminución inhibe dicho proceso [133]. En este trabajo decidimos evaluar la relevancia de CD13, y de su función como receptor de Gal-1, en la adhesión de los hepatocitos tumorales HEPG2 a las células endoteliales SK-HEP-1.

3A.1 Análisis de la relevancia de CD13 en la adhesión heterotípica

Con el objetivo de evaluar el rol de CD13 en el proceso de adhesión, se determinó la cantidad de células de carcinoma hepatocelular (CHC) HEPG2 adheridas a monocapas de células endoteliales hepáticas SK-HEP-1 que no expresan la proteína (KOCD13), con respecto a monocapas de células control (SK-HEP-1 WT y SCR). Para ello, los hepatocitos tumorales fueron marcados con calceína e incubados durante 30 minutos sobre las monocapas de células endoteliales en medio HEPES sin suero, siguiendo el protocolo previamente descrito en nuestro laboratorio [133]. Luego del lavado, se tomaron microfotografías de 12 campos de cada condición, tanto con luz

blanca para la observación de las células endoteliales como con microscopía de epifluorescencia para la detección de las células de CHC. A partir de dichas imágenes, se determinó el número de células HEPG2 adheridas. En la figura 36 se observa que la ausencia de expresión de CD13 en las células endoteliales SK-HEP-1 reduce la adhesión de los hepatocitos tumorales HEPG2 ($52 \pm 6 \%$) en comparación con la observada a las células SK-HEP-1 WT ($100 \pm 6 \%$) y control SCR ($86 \pm 9 \%$).

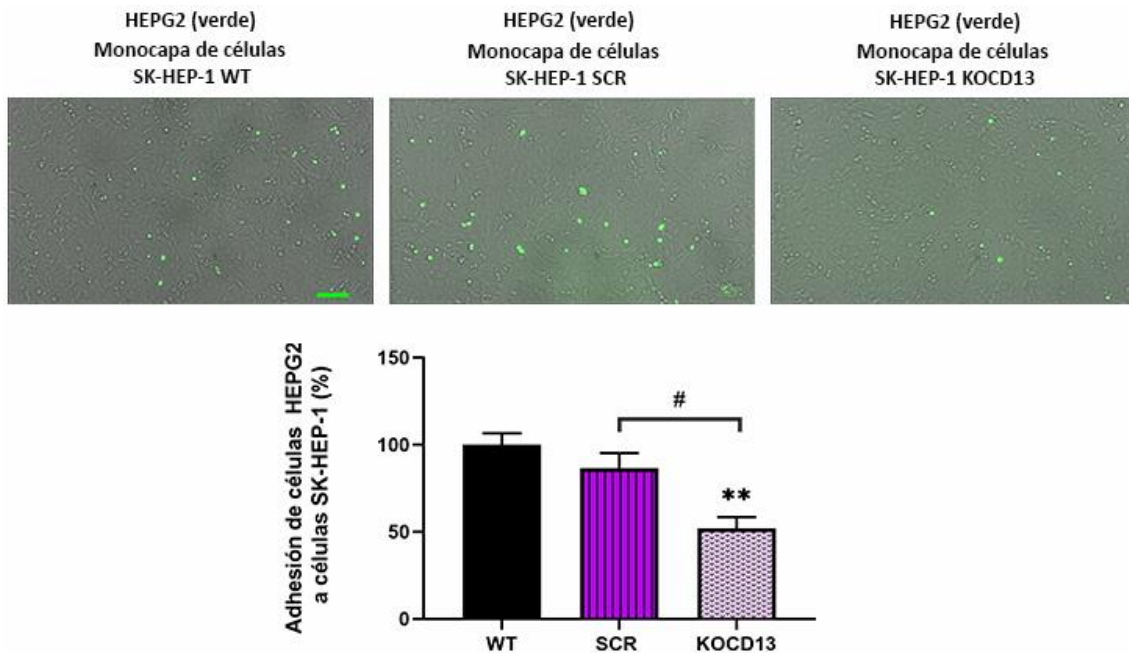


Figura 36. Participación de CD13 en la adhesión de hepatocitos tumorales HEPG2 a células endoteliales SK-HEP-1. Las células HEPG2 *wild type* fueron cargadas con calceína-AM e incubadas 30 minutos, en medio HEPES, sobre monocapas de células endoteliales SK-HEP-1 control (WT y SCR) y con edición génica para el *knock-out* de CD13 (KOCD13). Panel superior: Los hepatocitos fluorescentes (verdes) se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia mientras que las monocapas de células endoteliales se observaron con luz blanca. Se muestra la superposición de microfotografías representativas (100X, la barra de escala representa 100 μ m). Panel inferior: La adhesión celular se determinó como la cantidad de células HEPG2 fluorescentes adheridas a las monocapas de células SK-HEP-1 por campo, en 12 campos de cada condición. Los resultados se expresan como el porcentaje de células adheridas y corresponden a la media $\pm$ SEM con respecto a las células SK-HEP-1 WT (100 %) a partir de 5 experimentos independientes. ** $p < 0,01$ con respecto a la condición WT (Test ANOVA de una vía seguido del Test de Tukey), # $p < 0,05$ con respecto a la condición SCR (Test t de Student).

3A.2 Análisis de la relevancia de la interacción de CD13 y Gal-1 en la adhesión heterotípica

A continuación, evaluamos el efecto de la sobreexpresión de Gal-1 en la línea HEPG2 en su capacidad de adhesión a las monocapas de células endoteliales SK-HEP-1 SCR y KOCD13, con el objetivo de explorar la importancia de la interacción de Gal-1 y su receptor en este proceso. Para ello, los hepatocitos tumorales HEPG2 fueron transfectados con un plásmido (*pcDNA3.1-LGALS1*) diseñado para la sobreexpresión estable de Gal-1 (células GAL), y con un plásmido control sin inserto. El clon de células HEPG2-GAL seleccionado expresó aproximadamente 16 veces más Gal-1 que el control (células MOCK), el cual presentó niveles comparables a las células *wild type* (Fig. 37).

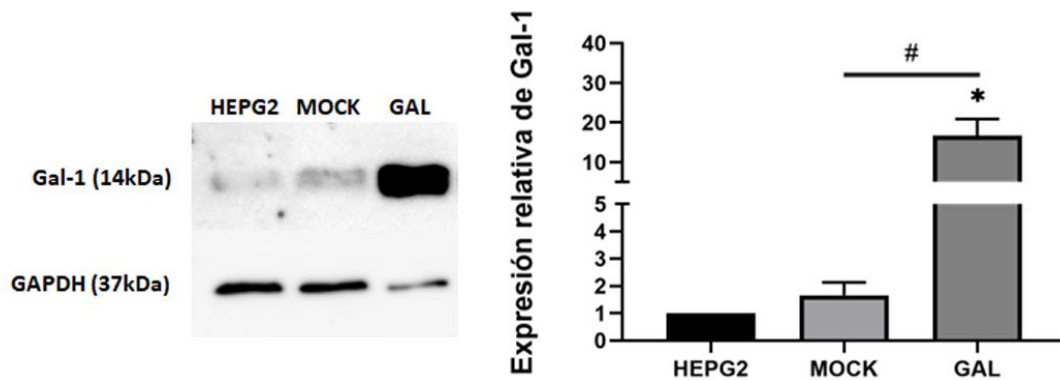


Figura 37. Expresión de Gal-1 en hepatocitos tumorales HEPG2. Mediante (A) *Western blotting* y (B) análisis densitométrico se evaluó la expresión de Gal-1 en lisados celulares de las líneas HEPG2, MOCK (transfectada con plásmido control) y GAL (transfectada con un plásmido para la sobreexpresión de Gal-1). Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH. Los niveles de expresión de Gal-1 relativos al control de carga se muestran como la media $\pm$ SEM a partir de 2 experimentos independientes. *,# $p < 0,05$ (Test ANOVA de una vía seguido del Test de Tukey).

Siguiendo el mismo protocolo utilizado en el experimento de la figura 36, se incubó el mismo número de células MOCK y GAL cargadas con calceína-AM sobre monocapas de células endoteliales SK-HEP-1 control (SCR) y KOCD13. Luego de 30 minutos de incubación se determinó el número de células de CHC adheridas por campo. De manera similar a lo observado en la figura 36, los resultados de la figura 38 muestran que las células MOCK se adhirieron significativamente menos a las células SK-HEP-1 KOCD13 que a las células SCR (78 ± 4 vs. 100 ± 7 %). Por otro lado, la sobreexpresión de Gal-1 en las células GAL incrementó significativamente la adhesión

a las células SK-HEP-1 SCR (139 ± 10 %) con respecto a lo observado para las células MOCK (100 ± 4 %). Sin embargo, la diferencia en la adhesión de las células GAL entre células endoteliales SCR y KOCD13 no fue significativa (ambas en torno a 140 %). Asimismo, tampoco se observaron diferencias significativas entre la adhesión de las células MOCK y GAL a las monocapas de células KOCD13 (78 ± 4 vs. 140 ± 25 %, respectivamente).

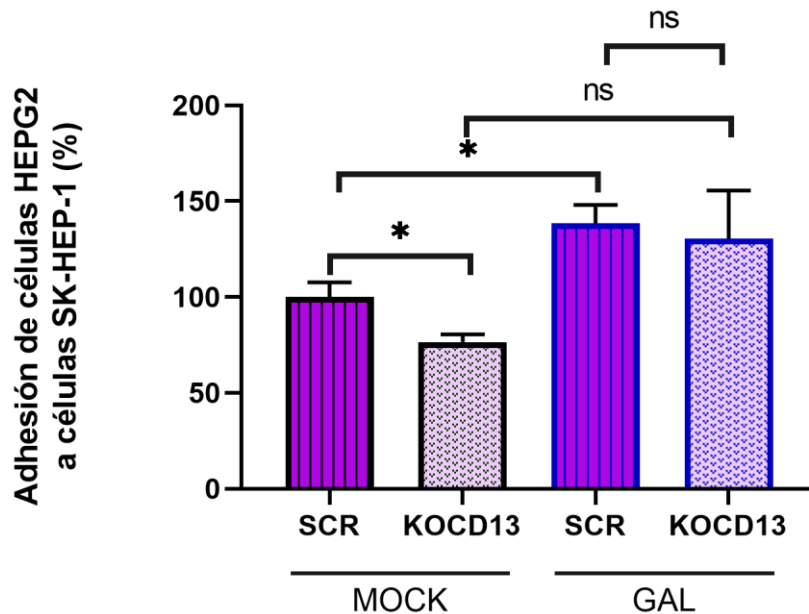


Figura 38. Adhesión de hepatocitos tumorales que sobreexpresan Gal-1 a células endoteliales SK-HEP-1 con edición génica de CD13 evaluada mediante microscopía de epifluorescencia. Las células HEPG2-MOCK y GAL fueron cargadas con calceína-AM e incubadas 30 minutos en medio HEPES sobre monocapas de células endoteliales SK-HEP-1 control (SCR) y con edición génica para CD13 (KOCD13). La adhesión celular se determinó como la cantidad de células HEPG2 fluorescentes adheridas a las monocapas de células SK-HEP-1 por campo, en 12 campos de cada condición. Los resultados se expresan como porcentaje y corresponden a la media $\pm$ SEM con respecto a las células HEPG2-MOCK adheridas a las SK-HEP-1 SCR (100 %) a partir de 6 experimentos independientes. * $p < 0,05$ (Multiple t Test seguido del Test de Holm-Sidak).

Estos resultados sugieren que la expresión de CD13 en las células SK-HEP-1 es necesaria para la adhesión de las células HEPG2, pero la presencia de este receptor no es esencial en este proceso. Además, dado que la sobreexpresión de Gal-1 en las células de CHC sigue favoreciendo la adhesión de dichas células a las CESHs, aun cuando las células SK-HEP-1 no expresan CD13, el efecto estimulador de la adhesión heterotípica de Gal-1 no dependería de su interacción con CD13.

3B Análisis de los roles de Gal-1 y CD13 en la angiogénesis asociada al tumor hepático

La angiogénesis tumoral es el proceso mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente, permitiendo que los tumores superen el tamaño crítico de 1–2 mm³ al obtener nutrientes y oxígeno. La angiogénesis por brotación implica la activación de células endoteliales por factores de crecimiento, la degradación de la matriz extracelular, y la migración y proliferación de estas células para formar nuevos capilares. Finalmente, estas estructuras se estabilizan con la incorporación de células murales (pericitos y células musculares lisas), dando lugar a una red vascular madura y funcional.[54], [67].

Existe amplia evidencia sobre el rol central de Gal-1 en la angiogénesis en tumores. Principalmente como inductora de la proliferación, migración y formación de túbulos en CEs de la macrovasculatura HUVEC [140], [141], [142], [145], [149], [249]. Previamente, en nuestro laboratorio también se determinó el rol pro-migratorio y proliferativo de Gal-1 secretada por los hepatocitos tumorales sobre el endotelio sinusoidal en el microambiente tumoral hepático [133].

Varios reportes demostraron que CD13 también se encuentra involucrada en la neovascularización [217], la formación de túbulos y migración de células HUVEC, en forma dependiente de su actividad proteasa [217], [250]. Asimismo se describió que Gal-3 promueve la angiogénesis en células HUVEC mediante su interacción con CD13 [223]. Sin embargo, hasta el momento de comenzar este trabajo de tesis no existían artículos de la literatura que describieran una relación funcional entre Gal-1 y CD13, ni la función de dicha exopeptidasa en CEs asociadas a tumores hepáticos.

En el presente trabajo evaluamos los roles de Gal-1 y CD13, y la relevancia de su interacción en ciertos pasos clave del proceso angiogénico tumoral en células endoteliales SK-HEP-1.

3B.1 Análisis de los roles de Gal-1 y CD13 en la proliferación de células SK-HEP-1

La conversión del reactivo bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazol (MTT) en formazán por acción de enzimas mitocondriales se utilizó como indicador de la viabilidad celular, la cual resulta proporcional al número de células en cultivo en cada tiempo de incubación. Luego, se determinó la tasa de proliferación celular, relativizando la absorbancia del formazán registrada al finalizar el ensayo con respecto a la obtenida en el tiempo inicial (t_0).

En primer lugar se puso a punto el tiempo y concentración de suero fetal bovino (SFB) adecuados para poder observar diferencias entre la tasa de proliferación de las células SK-HEP-1 WT y el resto de las líneas celulares en estudio. Las células se cultivaron durante 24 horas para su adherencia (t_0) y luego, durante otras 24, 48 y 72 horas en medio DMEM conteniendo distintas concentraciones de SFB. La absorbancia del reactivo formazán producido se registró en cada tiempo final y se la relativizó con respecto a la obtenida en el t_0 para obtener la tasa de proliferación celular (Fig. 39). A las 24 horas, la presencia de SFB no afectó la proliferación respecto al cultivo de las células en ausencia del mismo. En cambio, luego de 48 horas, el SFB en concentraciones de 5 y 10 % aumentó significativamente ($3,4 \pm 0,4$ y $4 \pm 0,3$ veces, respectivamente) la proliferación celular respecto a la condición sin SFB. Este incremento fue mayor luego de cultivar las células durante 72 horas, observándose tasas de proliferación de $12,5 \pm 1,3$ veces con 5 % y $10,1 \pm 0,1$ veces con 10 % de SFB.

A partir de los resultados obtenidos, y para realizar los ensayos subsiguientes, seleccionamos una concentración de SFB al 10 % y un tiempo de cultivo de 72 horas, es decir, una condición proliferativa.

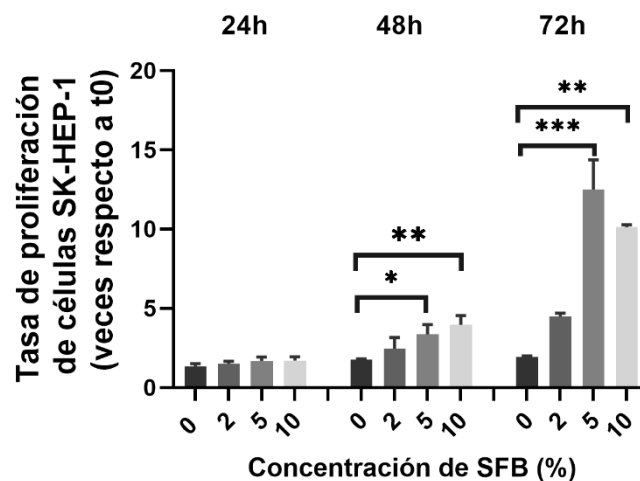


Fig 39. Proliferación de células SK-HEP-1 evaluada mediante el ensayo de MTT. Las células fueron incubadas en medio de cultivo DMEM en presencia de SFB al 2, 5, 10 % (v/v) o en su ausencia (0 %) durante diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas). La proliferación celular se midió como la relación entre la absorbancia registrada en 595 nm al tiempo final considerado (t_{24} , t_{48} , t_{72}) y la absorbancia medida en el tiempo inicial (t_0). Los resultados se muestran como la media $\pm$ SEM, a partir de 3 experimentos independientes, con respecto a la relación de absorbancias para las células cultivadas sin SFB en cada tiempo. El análisis estadístico se realizó mediante Test de ANOVA de una vía seguido del Test de Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3B.1.1 Participación de CD13 en la proliferación de células SK-HEP-1

Con el propósito de evaluar la participación de CD13 en la capacidad proliferativa de las células SK-HEP-1 se analizó el efecto de la ausencia de su expresión utilizando las células KOCD13. Las mismas mostraron una proliferación significativamente menor (69 ± 8 %) con respecto a las células SK-HEP-1 WT (100 ± 5 %) y a las células SCR (96 ± 2 %) (Fig. 40).

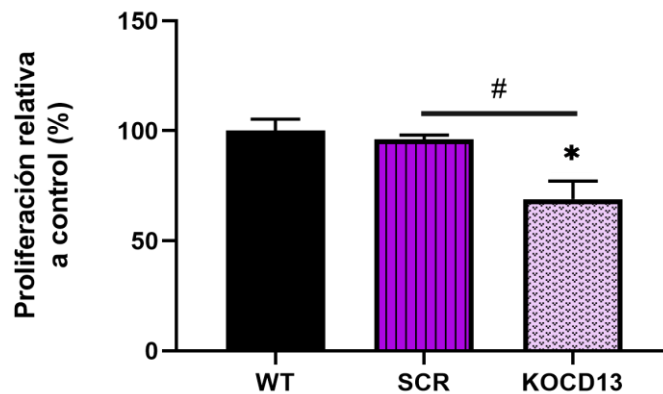


Figura 40. Proliferación de células SK-HEP-1 WT, SCR y con edición génica de CD13 (KOCD13) evaluada mediante el ensayo de MTT. Las células fueron incubadas en DMEM en presencia de SFB al 10 % (v/v) durante 72 horas. La proliferación celular se determinó como la relación entre la absorbancia en 595 nm registrada en el tiempo 72 horas y la absorbancia medida en el tiempo inicial (t_0), relativizada a la línea celular WT (control, 100 %). Los resultados se muestran como la media $\pm$ SEM a partir de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ respecto a WT, # $p < 0,05$ respecto a SCR (Test ANOVA de una vía, seguido del Test de Bonferroni).

3B.1.2 Participación de Gal-1 en la proliferación de células SK-HEP-1

Con la intención de investigar la función de Gal-1 en la proliferación de las células SK-HEP-1 se silenció su expresión. Para dicho objetivo, se transfectaron las células de manera estable con el plásmido *Galectin-1 shRNA Plasmid (h)* diseñado para la producción de *short hairpin RNAs* (shARNs), que procesados por el complejo Dicer, forma siRNAs específicos para el silenciamiento de la expresión de Gal-1, como se detalla en el capítulo 3 de Materiales y métodos. Se utilizó el plásmido *shRNA Plasmid-A* como control. Los clones celulares con el silenciamiento estable se seleccionaron por su resistencia al antibiótico puromicina y se analizó la expresión de Gal-1 mediante la técnica de *Western blotting*. Las células transfectadas (shGal-1) mostraron una expresión de Gal-1 significativamente menor (32 ± 16 %) con respecto a las células WT (100 %) y a las transfectadas con el plásmido control shSCR (99 ± 16 %) (Fig. 41).

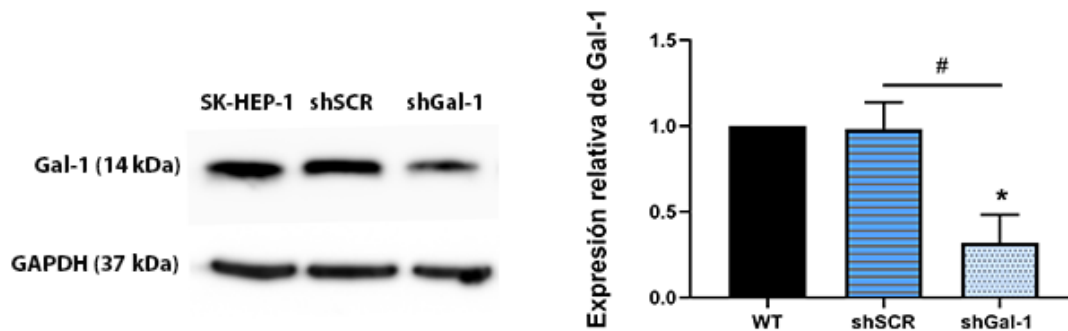


Figura 41. Expresión de Gal-1 en células SK-HEP-1 WT y transfectadas. Se evaluó mediante *Western blotting* y análisis densitométrico la expresión de Gal-1 en lisados de células SK-HEP-1 (WT); SCRAMBLED control (shSCR) y silenciadas para Gal-1 con el plásmido shARN (shGal-1). Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM a partir de 3 experimentos independientes. *, # $p < 0,05$ respecto de WT y shSCR respectivamente (Test ANOVA de una vía seguido del Test de Bonferroni).

Luego, se llevó a cabo el ensayo de proliferación utilizando las mismas condiciones descriptas en el ítem 3B.1.1, cultivándose las células SK-HEP-1 WT, shSCR y shGal-1 durante 72 horas en presencia de SFB al 10 %. Los resultados muestran que las células SK-HEP-1 silenciadas para Gal-1 proliferaron en forma similar a las células control WT (94 ± 7 % vs. 100 ± 13 %) y a las células shSCR (102 ± 9 %) (Fig. 42). Por lo tanto, el nivel de expresión de Gal-1 de las células SK-HEP-1 no tendría relevancia para la proliferación, en las condiciones ensayadas en este trabajo.

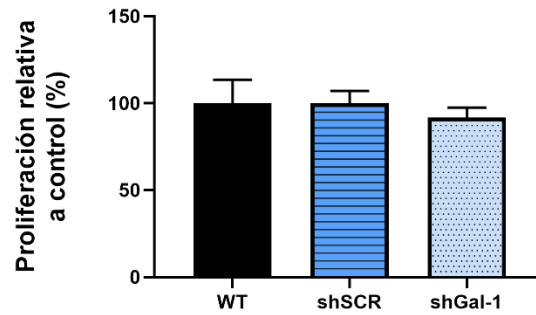


Figura 42. Proliferación de células SK-HEP-1 con expresión de Gal-1 disminuida evaluada mediante el ensayo de MTT. Las células fueron incubadas en DMEM con 10 % (v/v) SFB durante 72 horas. La proliferación celular se midió como la relación entre la absorbancia a 595 nm al tiempo final y la absorbancia medida al tiempo inicial (t_0) y se relativizó a la línea WT. Los datos corresponden a la media $\pm$ SEM a partir de 3 experimentos independientes y analizados mediante Test de ANOVA de una vía seguido del Test de Tukey.

Seguidamente, con el objetivo de investigar si la interacción entre Gal-1 y CD13 era importante para la proliferación de las células SK-HEP-1, se incubaron las células SK-HEP-1 WT con rGal-1 durante 72 horas. El experimento se realizó en presencia de SFB al 2 % y como control, se utilizó el vehículo PBS-ditiotreitol (DTT) 0,05 mM. El DTT es un agente reductor necesario para mantener la máxima actividad de la galectina. La concentración de SFB utilizada fue la mínima que permitió a las células SK-HEP-1 tolerar el efecto citotóxico del DTT sin enmascarar el posible efecto proliferativo de rGal-1. En estas condiciones, no se observaron diferencias significativas entre las células incubadas con rGal-1 y el control (Fig. 43A).

Gal-1 es una proteína que se exporta al medio extracelular y puede interaccionar con glicoconjugados presentes en la matriz extracelular (MEC) y quedar allí retenida. Por ello, también se evaluó su efecto sobre la proliferación inmovilizándola en los pocillos de una placa, como se detalla en el capítulo 3 de Materiales y métodos. Como control se inmovilizó la proteína BSA al 0,1 % (v/v). En estas condiciones, se observó que rGal-1 aumentó la proliferación de las células SK-HEP-1 WT (115 ± 4 %), con respecto a la BSA (100 %), aunque las diferencias no resultaron estadísticamente significativas (Fig. 43B).

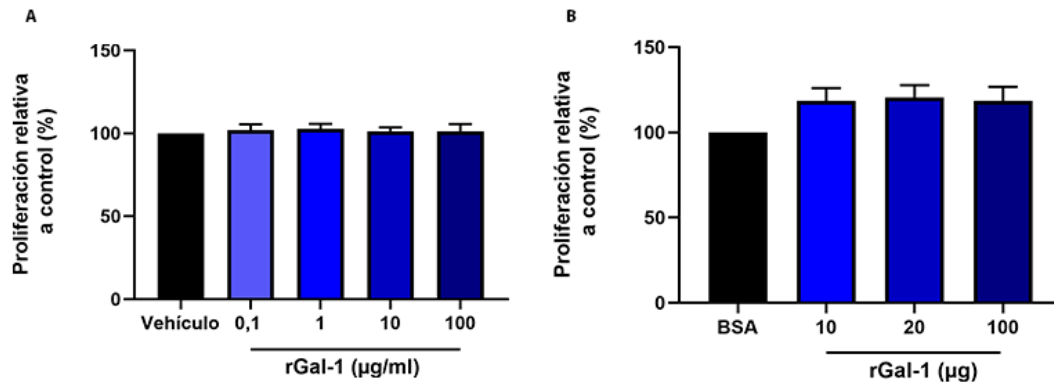


Figura 43. Proliferación de células SK-HEP-1 con rGal-1 soluble (A) e inmovilizada (B) evaluada mediante el ensayo de MTT. Las células fueron incubadas en DMEM con SFB al 2 % (v/v) durante 72 horas. La proliferación celular se midió como la relación entre la absorbancia a 595 nm al tiempo final y la absorbancia medida al tiempo inicial (t_0) y se relativizó al control (Vehículo o BSA, 100 %). Los datos corresponden a la media $\pm$ SEM a partir de 7 (A) y 3 (B) experimentos independientes y analizados mediante Test de ANOVA de una vía.

Estos resultados sugieren que CD13 participa en el proceso de proliferación celular en la línea SK-HEP-1. Por otro lado, el efecto observado con rGal-1 inmovilizada no resultó significativo con el método utilizado y en las condiciones ensayadas, por lo que el análisis de la cooperación entre CD13 y Gal-1 sobre la proliferación de las células SK-HEP-1 no fue continuado.

3B.2 Análisis de los roles de Gal-1 y CD13 en la migración de células SK-HEP-1

La migración de las CESHs se evaluó mediante el ensayo de cicatrización de la herida, tal como se describe en el capítulo 3 de la sección de Materiales y métodos. Brevemente, las células SK-HEP-1 se cultivaron durante 72 horas en placas de 96 pocillos hasta confluencia. Se realizaron heridas sobre las monocapas, se lavó con medio DMEM carente de SFB y luego, las células se incubaron en medio DMEM con SFB al 10 % o en ausencia de éste a 37 °C. Se midió el área total de la herida al inicio y al final del experimento y se determinó el porcentaje de cierre de la herida.

En primer lugar, se pusieron a punto las condiciones óptimas para el ensayo de cierre de la herida. Para ello se evaluó el efecto de la utilización de distintas concentraciones de suero y distintos tiempos de incubación. En la figura 44 se observa que el agregado de SFB al 10 % estimuló intensamente el cierre de la herida de la monocapa de células SK-HEP-1 WT comparado con la condición en ausencia del

mismo, siendo estadísticamente significativo a partir de las 9 horas. En ausencia de SFB, las células SK-HEP-1 alcanzaron aproximadamente un 40 % de cierre de la herida a las 24 horas, mientras que en presencia de SFB al 10 % se alcanzó más de un 90 % de cierre de la misma. Dado que los factores de crecimiento presentes en el SFB estimulan la migración y podrían enmascarar los posibles efectos de Gal-1 o CD13, se decidió trabajar en ausencia de suero (SFB al 0 %). Para evaluar el efecto de estas dos proteínas se decidió utilizar un tiempo final de 24 horas debido a que, como se demostró previamente (Fig. 39), en ese tiempo y en ausencia de suero, las células SK-HEP-1 no proliferan y por lo tanto, es posible analizar únicamente el proceso de migración celular.

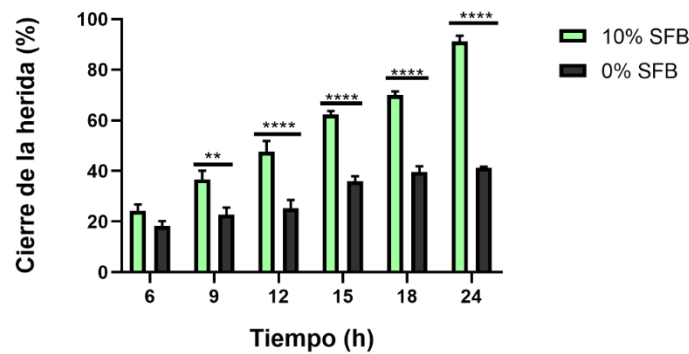


Figura 44. Efecto del SFB sobre el cierre de la herida de células SK-HEP-1 a diferentes tiempos de incubación. Las células fueron incubadas en medio de cultivo DMEM en presencia de SFB al 10 % (v/v) o en su ausencia (0 %) durante diferentes tiempos. El cierre de la herida se estimó como se indica en la sección de Materiales y métodos. Los datos corresponden a la media $\pm$ SEM a partir de 5 experimentos independientes. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ (Test ANOVA de dos vías seguido del Test de Sidak).

3B.2.1 Participación de CD13 en la migración de células SK-HEP-1

Con el propósito de evaluar la participación de CD13 en la capacidad migratoria de las células SK-HEP-1, se analizó el efecto de la ausencia de dicha proteína de membrana utilizando las células KOCD13. Los resultados indican que las CESHs con el gen CD13 *knockeado* migran significativamente menos (78 ± 8 %) respecto de las células WT (100 ± 7 %) y respecto de las células SCR (97 ± 5 %) (Fig. 45).

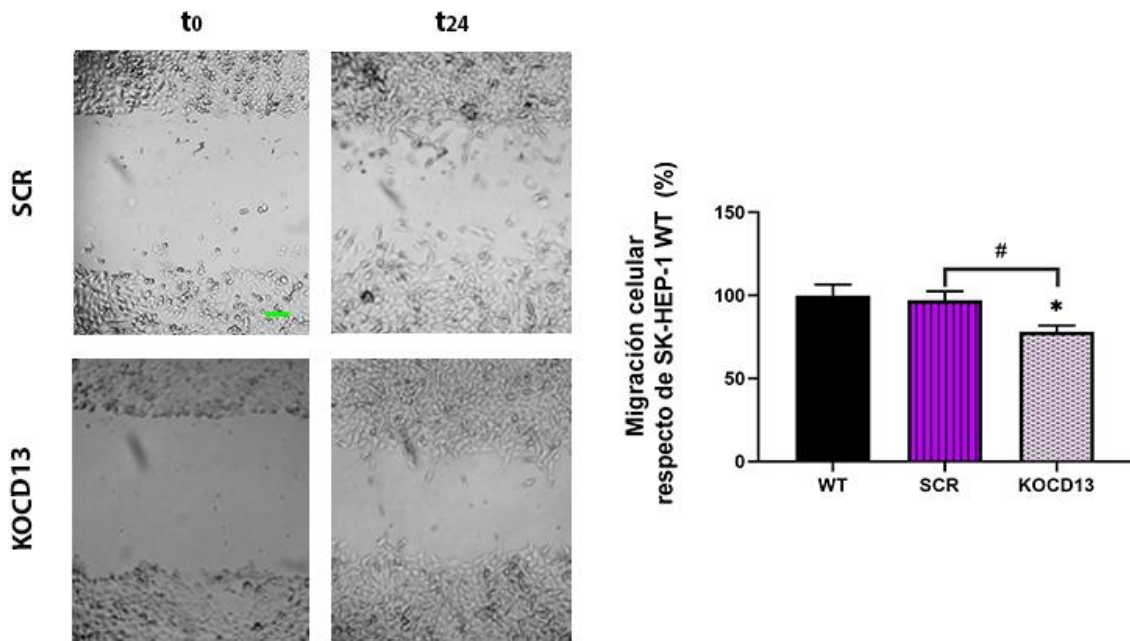


Figura 45. Migración de células SK-HEP-1 con disrupción génica de CD13. Las células fueron incubadas en ausencia de suero durante 24 horas luego de realizada la herida. Panel izquierdo: se muestran microfotografías representativas al inicio (t_0) y al final del experimento (t_{24}) (40X, la barra de escala representa 100 μ m). Panel derecho: La migración celular se determinó como se indica en Materiales y métodos. Los datos corresponden a la media $\pm$ SEM con respecto a la migración de la línea celular WT (100 %) a partir de 4-8 experimentos independientes. * $p < 0,05$ con respecto a WT, # $p < 0,05$ con respecto a SCR (Test ANOVA de una vía, seguido del Test de Tukey).

3B.2.2 Participación de Gal-1 en la migración de células SK-HEP-1

En las mismas condiciones descriptas anteriormente, se evaluó la capacidad migratoria de células SK-HEP-1 con la expresión de Gal-1 disminuida (según se mostró en la figura 41). Las CESHs shGal-1 migraron significativamente menos (61 ± 5 %) respecto de las células WT (100 ± 9 %) y de las células shSCR (101 ± 11 %) (Fig. 46).

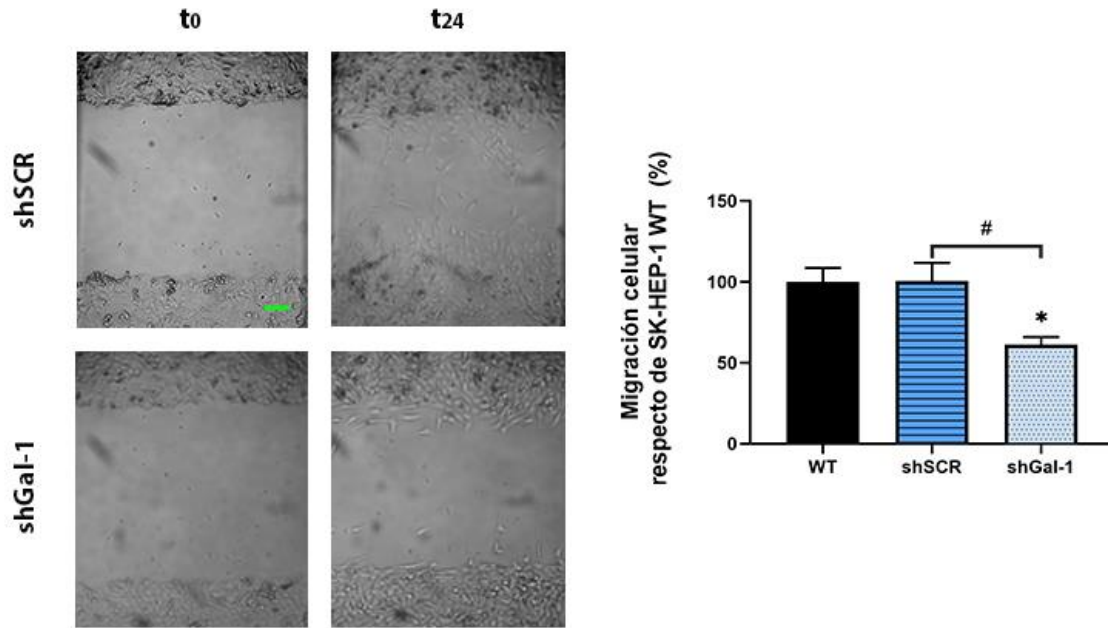


Figura 46. Migración de células SK-HEP-1 con expresión disminuida de Gal-1. Las células fueron incubadas en ausencia de suero durante 24 horas luego de realizada la herida. Panel izquierdo: se muestran microfotografías representativas al inicio (t_0) y al final del experimento (t_{24}) (40X, la barra de escala representa 100 μ m). Panel derecho: La migración celular se determinó como se indica en Materiales y métodos. Los datos corresponden a la media $\pm$ SEM a partir de 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$ con respecto a WT, # $p < 0,05$ con respecto a shSCR (Test ANOVA de una vía, seguido del Test de Tukey).

Por lo tanto, los resultados descriptos en los experimentos de las figuras 45 y 46 demuestran la participación individual de las proteínas endógenas Gal-1 y CD13 en la migración de las CESHs. A continuación, y para investigar la importancia de la interacción entre ambas proteínas en este efecto, se decidió evaluar el efecto de la incubación con rGal-1 agregada en forma exógena sobre la migración de las células SK-HEP-1 KOCD13.

Tal como se mencionó previamente, Gal-1 puede ser secretada de las células e interactuar con glicoconjugados de la MEC, como laminina o fibronectina, o quedar retenida en la MEC circundante y actuar ella misma como una proteína de la matriz. Así, Gal-1 es capaz de modular procesos de adhesión y migración celulares. Entonces, se realizó el ensayo de migración inmovilizando distintas concentraciones de rGal-1 en los pocillos de las placas de cultivo, tal como se describe en el capítulo 3 de la sección de Materiales y métodos. En primer lugar, se realizó este experimento evaluando la migración de las células SK-HEP-1 WT. No se observaron diferencias significativas en la migración de dichas células cultivadas sobre pocillos recubiertos con rGal-1, en

ninguna de las concentraciones ensayadas a las 24 horas de realizada la herida, respecto de las células incubadas sobre la proteína control BSA al 0,1 % (v/v) (Fig. 47).

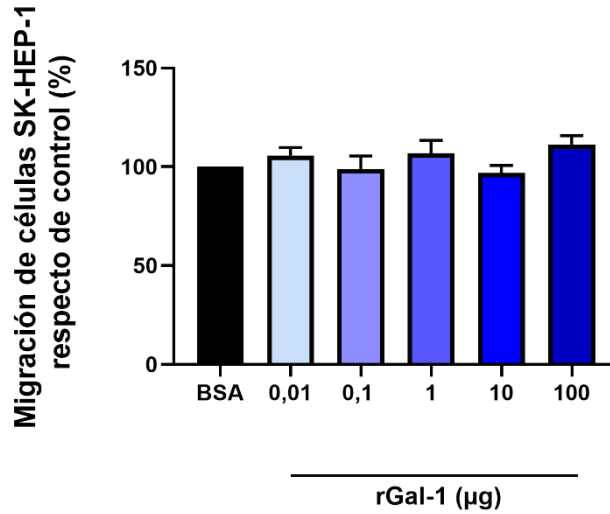


Figura 47. Migración de células SK-HEP-1 WT con rGal-1 inmovilizada. Las células fueron incubadas en ausencia de suero durante 24 horas sobre pocillos recubiertos con concentraciones crecientes de rGal-1. La migración celular se estimó determinando el porcentaje de cierre de la herida como se indica en Materiales y métodos y se relativizó al control (BSA al 0,1% (v/v) inmovilizada). Los datos corresponden a la media $\pm$ SEM a partir de 4 experimentos independientes (Test ANOVA de una vía, seguido del Test de Tukey).

Luego, analizamos el efecto de rGal-1 adicionada a las células en forma soluble. Dado que en ausencia completa de suero, el vehículo (PBS-DTT 0,05 mM) resultaba citotóxico, en este ensayo se utilizó un mayor porcentaje del mismo (0,5 %) para mantener la viabilidad de las CE's pero sin enmascarar los posibles efectos de la galectina. Entonces, se realizó el ensayo para evaluar el cierre de la herida en las nuevas condiciones, a distintos tiempos. Se seleccionó un menor tiempo para realizar el ensayo (15 h) dado que a mayores tiempos no hubo mayor cierre de la herida (Fig. 48).

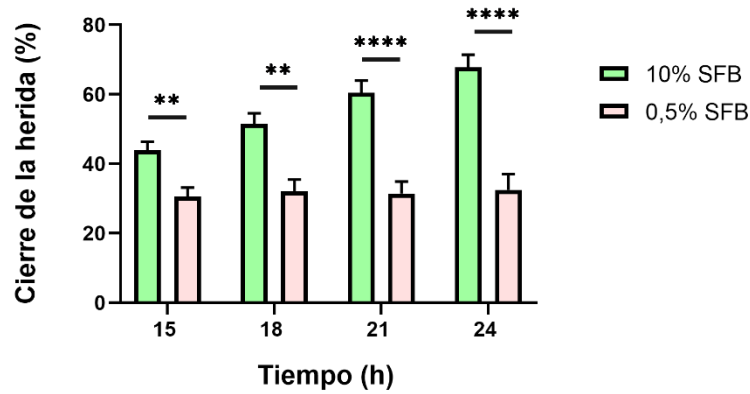


Figura 48. Cierre de la herida de células SK-HEP-1 en condiciones reductoras. Las células fueron incubadas en medio DMEM con SFB al 10 % o al 0,5 % (v/v), en presencia de DTT 0,5 mM, durante diferentes tiempos. El cierre de la herida se estimó como se indica en la sección de Materiales y métodos. Los datos corresponden a la media $\pm$ SEM a partir de 3 experimentos independientes. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ (Test ANOVA de dos vías seguido del Test de Sidak).

Cuando las células SK-HEP-1 WT se incubaron con rGal-1 soluble se observó una estimulación de la migración celular en todas las concentraciones utilizadas, pero sólo resultó significativa con la máxima concentración ensayada (100 $\mu\text{g/ml}$; 126 ± 4 % vs. control (vehículo). Para evaluar la dependencia de la interacción del DRC de rGal-1 con glicanos de la superficie celular en el efecto pro-migratorio observado, se preincubó la galectina con lactosa 100 mM durante 30 minutos. En presencia de dicho azúcar inhibidor de la actividad de Gal-1, se previno el efecto estimulador de la migración (95 ± 3 %) (Fig. 49).

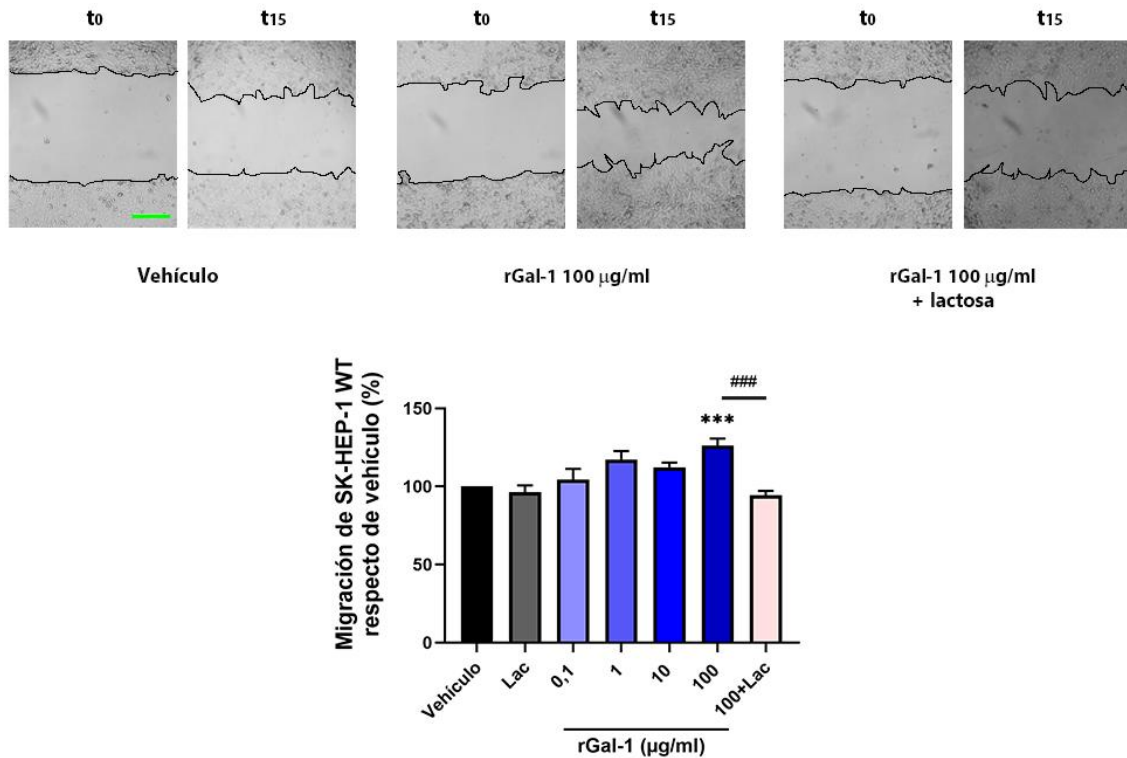


Figura 49. Migración de células SK-HEP-1 con rGal-1 soluble. Las células fueron incubadas en presencia de SFB al 0,5 % y concentraciones crecientes de rGal-1 (0,1; 1; 10; 100 µg/ml) en PBS-DTT 0,05 mM (vehículo) durante 15 horas. En la condición 100+Lac, la galectina se preincubó con lactosa 100 mM durante 30 min. Panel superior: se muestran microfotografías representativas al inicio (t_0) y al final del experimento (t_{15}) (40X, la barra de escala representa 100 µm). Panel inferior: la migración celular se determinó como se indica en la sección de Materiales y métodos, y se relativizó al vehículo. Los datos corresponden a la media $\pm$ SEM a partir de 4-8 experimentos independientes. *** $p < 0,001$ con respecto a vehículo, ### $p < 0,001$ con respecto a 100+Lac (Test ANOVA de una vía, seguido del Test de Tukey).

3B.2.3 Estudio de la cooperación de Gal-1 y CD13 en la migración de células SK-HEP-1

Con el objeto de evaluar si el efecto pro-migratorio de Gal-1 se produce a través de su interacción con CD13, se realizó el ensayo de cierre de la herida cultivando las células KOCD13 y como control, las células SCR, en presencia de rGal-1. Los resultados indican que las células que no expresan CD13 mostraron un aumento significativo de la migración (132 ± 5 %) cuando se las incubó con rGal-1 (100 µg/ml) con respecto a las células incubadas con el vehículo, y dicho efecto se previno cuando rGal-1 fue preincubada con lactosa (102 ± 8 %) (Fig. 50, panel A). En las células control SCR también se observó el efecto estimulador de la migración (130 ± 9 %) con el agregado de rGal-1 en la misma concentración con respecto al vehículo (panel B).

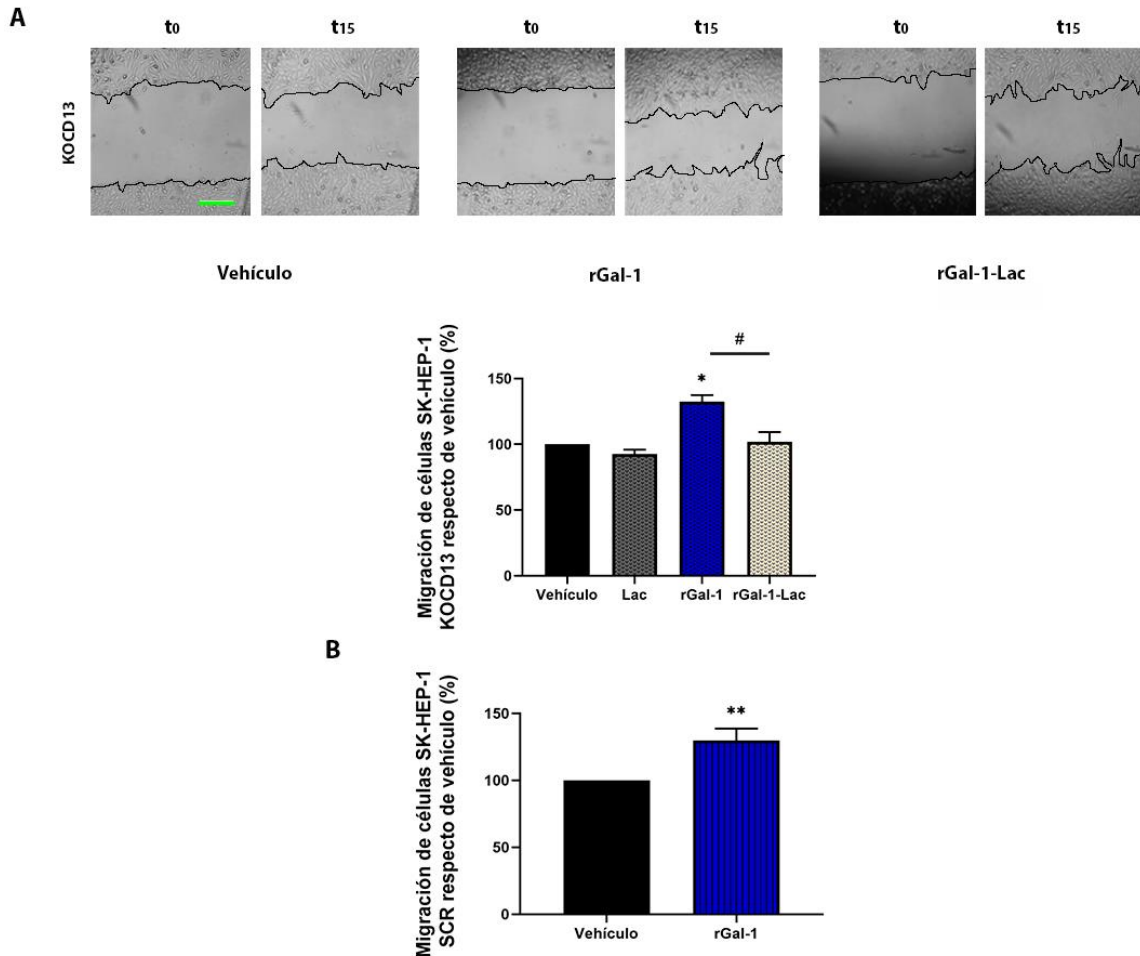


Figura 51. Migración de células SK-HEP-1 KOCD13 y SCR con rGal-1 soluble. Las células fueron incubadas en presencia de SFB al 0,5 % y rGal-1 100 $\mu\text{g/ml}$ en PBS-DTT 0,05 mM (vehículo) durante 15 h. En la condición rGal-1-Lac, la galectina se preincubó con lactosa 100 mM durante 30 min. Panel A superior: se muestran microfotografías representativas de la línea celular KOCD13 al inicio (t_0) y al final del experimento (t_{15}) (40X, la barra de escala representa 100 μm). Inferior: la migración celular se determinó como se indica en la sección de Materiales y métodos y se relativizó al vehículo. Panel B: la migración celular de la línea control SCR se determinó como se indica en la sección de Materiales y métodos y se relativizó al vehículo. Los datos corresponden a la media $\pm$ SEM a partir de 3-5 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ con respecto a vehículo, # $p < 0,05$ con respecto a control lactosa (rGal-1-Lac) (Test ANOVA de una vía, seguido del Test de Tukey).

Estos resultados sugieren que tanto CD13 como Gal-1 participan en el proceso de migración de las células SK-HEP-1, aunque estos efectos no dependerían de la interacción entre ambas proteínas.

3B.3 Análisis de los roles de Gal-1 y CD13 en la tubulogénesis de células SK-HEP-1

El ensayo de tubulogénesis en células endoteliales permite evaluar de manera rápida y funcional su capacidad para formar estructuras capilares *in vitro*. Esta técnica imita aspectos clave del proceso angiogénico que ocurre *in vivo*, como la migración, alineación y organización celular en redes tridimensionales, lo que la convierte en un modelo eficaz para investigar los mecanismos moleculares que regulan la formación de nuevos vasos sanguíneos. El ensayo involucra la adhesión de la célula endotelial mediante proteínas de la superficie, su migración y la actividad de proteasas, lo que conduce a la formación de túbulos cerrados con lumen en tiempos de cultivo cortos [251].

Con el fin de evaluar la relevancia de Gal-1 y CD13 en la morfogénesis de las células endoteliales SK-HEP-1 que deriva en la formación de capilares sanguíneos, se realizó el ensayo de tubulogénesis. Para ello, las células se cosecharon con PBS-EDTA para preservar la integridad de las proteínas de membrana y se sembraron sobre una superficie símil membrana basal (GeltrexTM) que ofrece un contexto más parecido al fisiológico.

En primer lugar, se buscaron las condiciones óptimas que permitieran observar la formación de estructuras tubulares de las células sobre una fina capa de GeltrexTM bajo en factores de crecimiento, ya que los mismos pueden estimular la tubulogénesis. Se seleccionaron tanto el número de células por pocillo, la concentración de SFB y el tiempo de ensayo adecuados para la formación de una red de túbulos. La dinámica del proceso observada consistió en la adhesión de las células en la primera hora de sembradas, luego la migración con dirección hacia otras células en las siguientes 2 a 4 horas y la formación de túbulos entre las 6 y 8 horas. A las 24 horas, las células se detectaron migrando hacia los nodos y desarmando la malla de túbulos.

La densidad óptima para observar la formación de una red de túbulos fue de 8000 células por pocillo. En base a la dinámica observada, el tiempo elegido para tomar las microfotografías fue a las 6 horas de sembradas las células. Dado que la presencia de suero inhibió completamente la formación de túbulos, en los experimentos subsiguientes se debió trabajar en ausencia del mismo (Fig. 52).

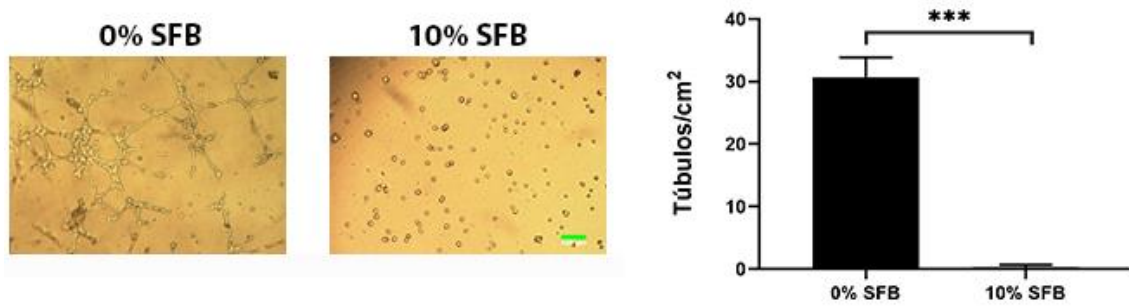


Figura 52. Formación de túbulos cerrados en células SK-HEP-1. Las células se incubaron en ausencia (0 %) y en presencia de SFB al 10 % durante 6 horas sobre Geltrex™ bajo en factores y se determinó el número túbulos cerrados o mallas por área (cm²). Panel izquierdo: se muestran microfotografías representativas (40X, la barra de escala representa 100 μ m). Panel derecho: los datos corresponden a la media $\pm$ SEM a partir de 3 experimentos independientes. *** $p < 0,001$ (Test t de Student).

3B.3.1 Participación de CD13 en la formación de túbulos de células SK-HEP-1

Se evaluó primero el efecto de la proteína CD13 en la formación de túbulos comparando la formación de mallas de las células SK-HEP-1 KOCD13 respecto de las células WT y SCR. El porcentaje de túbulos por pocillo disminuyó significativamente en las células que no expresan CD13 (56 ± 9 %) con respecto al observado en las células WT (100 ± 14 %) y células SCR (90 ± 14 %) (Fig. 53). Es importante destacar que las células KOCD13 no perdieron la capacidad de formar túbulos, y los mismos son de similar morfología que los de las células control, tal como se observa en la figura 53.

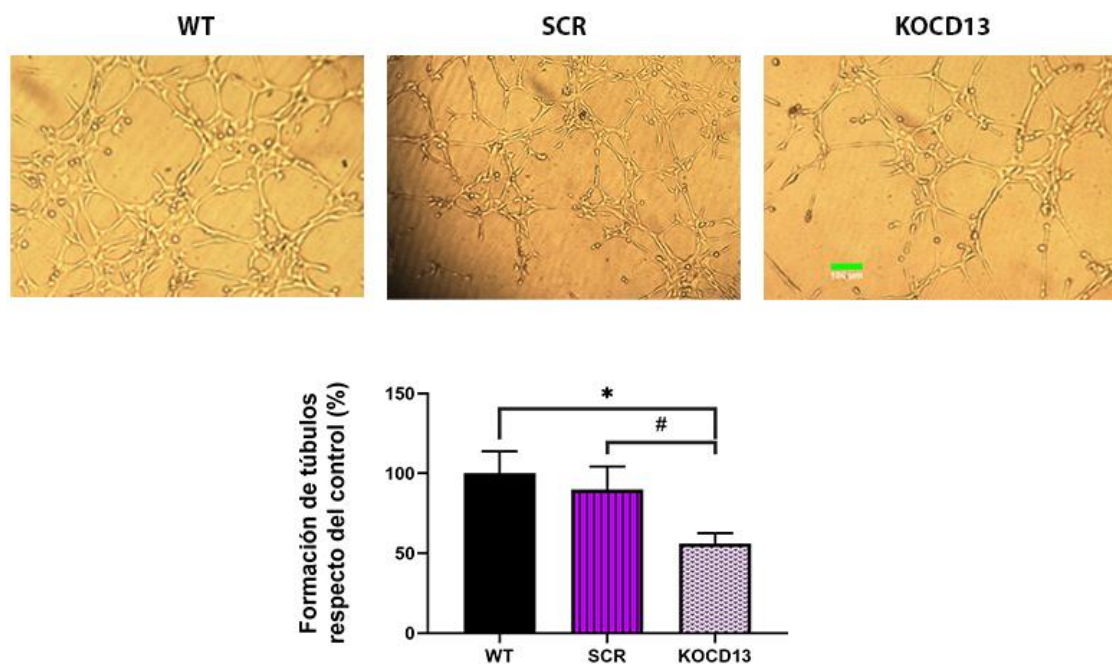


Figura 53. Formación de túbulos cerrados en células SK-HEP-1 WT, SCR y KOCD13. Las células fueron incubadas en ausencia de suero durante 6 h sobre Geltrex™ bajo en factores. Se determinó el número de túbulos cerrados o mallas por área (cm²) y se expresó como porcentaje relativo al obtenido con las células WT (100 %). Panel superior: se muestran microfotografías representativas (40X, la barra de escala representa 100 μm). Panel inferior: los datos corresponden a la media ± SEM a partir de 6 experimentos independientes. * $p < 0,05$ con respecto a células WT (Test ANOVA de una vía, seguido del Test de Tukey) y # $p < 0,05$ con respecto a control SCR (Test t de Student).

Dado que el bloqueo o disrupción de la expresión de un gen puede provocar efectos fisiológicos drásticos que alteren significativamente el funcionamiento celular, se optó por analizar también el efecto del silenciamiento transitorio de CD13 mediante ARN de interferencia (siARN). Esta estrategia alternativa permite reducir de manera parcial la expresión del gen, evitando así consecuencias extremas. Para ello, el ensayo de tubulogénesis se realizó 72 horas post-transfección con el siRNA, tiempo en el cual el silenciamiento de la expresión de CD13 fue máximo (Fig. 54). En estas condiciones, la formación de túbulos se inhibió considerablemente (40 ± 21 %) en las células transfectadas con siARN respecto de las transfectadas con siARN *scrambled* (100 %) con una secuencia sin *target* conocido (Fig. 55).

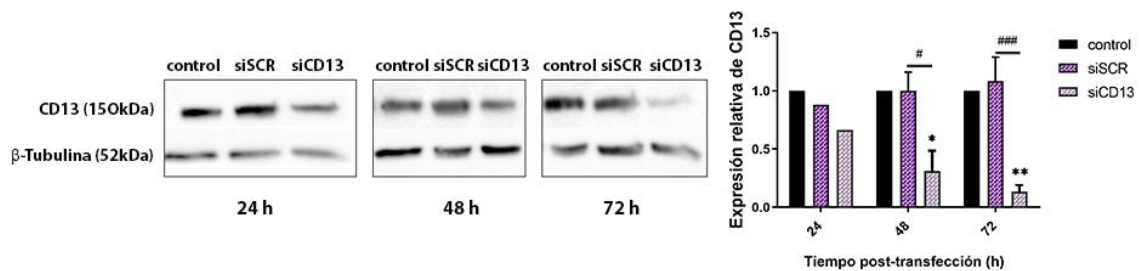


Figura 54. Expresión de CD13 en células SK-HEP-1 WT y transfectadas con siRNA. Se evaluó, mediante *Western blotting* y análisis densitométrico, la expresión de CD13 en lisados celulares de las líneas (de izquierda a derecha) SK-HEP-1 *wild type* (control); *SCRAMBLED* control (siSCR) y silenciadas para CD13 con siARN (siCD13). Los resultados se muestran como la expresión de CD13 relativa al control de carga (β-Tubulina) para cada línea celular luego de cada tiempo post-transfección (24, 48 o 72 horas) con respecto a las células control. Los datos se expresan como la media ± SEM a partir de 1-3 experimentos independientes. *, # $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ (Test modelo de efectos mixtos seguido del Test de Tukey).

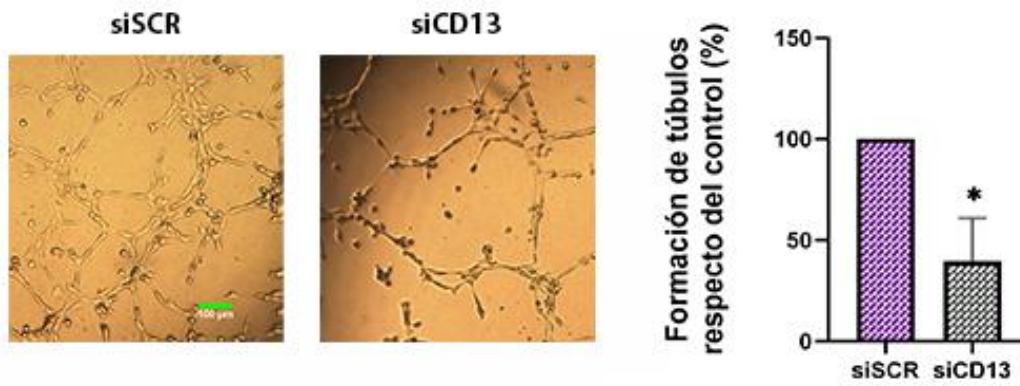


Figura 55. Formación de túbulos cerrados en células SK-HEP-1 transfectadas con ARN de interferencia con CD13 como *target* (siCD13) o control (siSCR). Las células fueron incubadas en ausencia de suero durante 6 horas sobre Geltrex™ bajo en factores. Se contó la cantidad de mallas (túbulos cerrados) por área (cm²) y se lo relativizó a las células control. Panel izquierdo: se muestran microfotografías representativas (40X, la barra de escala representa 100 μm). Panel derecho: los datos corresponden a la media ± SEM a partir de 3 experimentos independientes (Test *t* de Student).

Ambas estrategias de disminución de los niveles de CD13, tanto el silenciamiento transitorio mediante siRNA como la delección estable del gen, resultaron en una reducción significativa en la formación de túbulos por parte de las células SK-HEP-1, lo que sugiere que la expresión de CD13 es relevante en este proceso.

3B.3.2 Participación de Gal-1 en la formación de túbulos de células SK-HEP-1

Para determinar la relevancia de Gal-1 en el proceso de formación de túbulos de las células SK-HEP-1 WT se utilizó rGal-1 en la misma concentración (100 μg/ml) que demostramos previamente que estimula la migración celular (Fig. 49). El ensayo se realizó según el protocolo detallado en el capítulo 3 de la sección de Materiales y métodos. Como control se utilizó el vehículo PBS-DTT.

La incubación con rGal-1 durante 6 horas estimuló significativamente la formación de túbulos (319 ± 63 %) de las células SK-HEP-1 WT respecto del vehículo (100 %), mientras que la pre-incubación de la lectina con el azúcar tiodigalactósido (TDG) 20 mM (1 mM final) durante 30 minutos previno el efecto observado (45 ± 13 %) (Fig. 56). Dicho galactósido que compite con los glicoconjugados de la superficie celular por el DRC de rGal-1 tuvo que ser utilizado en este ensayo ya que la pre-incubación con lactosa 100 mM (5 mM final) afectó la adhesión de las células al Geltrex™ y formación de las estructuras tubulares.

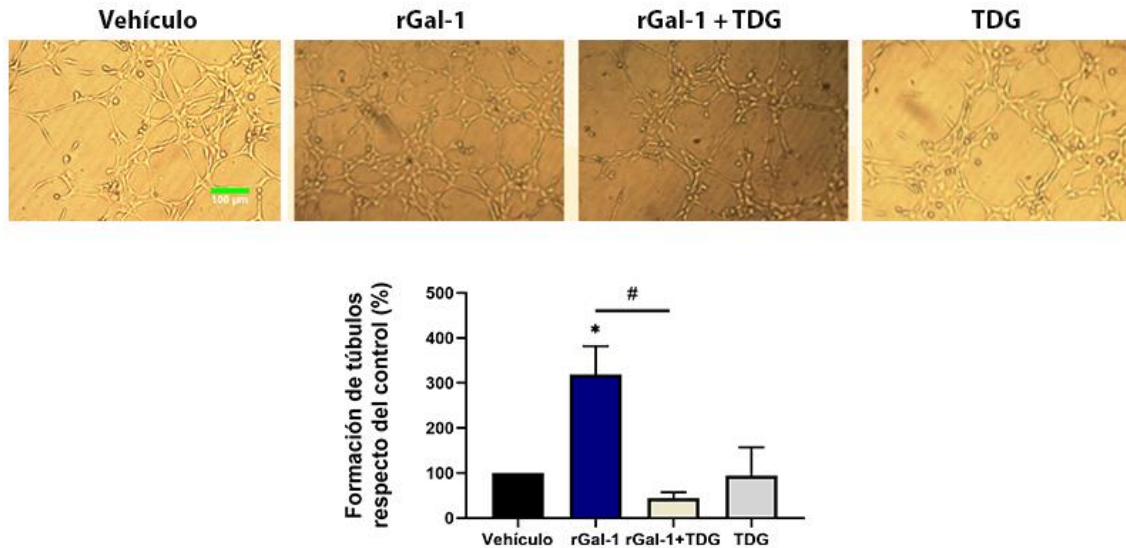


Figura 56. Formación de túbulos cerrados en células SK-HEP-1 WT en presencia de rGal-1. Las células fueron incubadas en ausencia de suero durante 6 horas sobre Geltrex™ bajo en factores en presencia de rGal-1 100 µg/ml, pre-incubada o no con TDG 20 mM. Se contó la cantidad de mallas (túbulos cerrados) por área (cm²) y se relativizó a la obtenida para las células SK-HEP-1 WT incubadas con el vehículo (PBS-DTT). Panel superior: se muestran microfotografías representativas (40X, la barra de escala representa 100 µm). Panel inferior: los datos corresponden a la media ± SEM a partir de 3 experimentos independientes. * p < 0,05 respecto al vehículo, # p < 0,05 respecto a la condición rGal-1-TDG (Test ANOVA de una vía, seguido del Test de Tukey).

3B.3.3 Estudio de la cooperación de Gal-1 y CD13 en la formación de túbulos de las células SK-HEP-1

Con el objeto de analizar la posible conexión entre los efectos observados para CD13 y Gal-1, y confirmar si la interacción entre Gal-1 y su receptor es relevante para la tubulogénesis de las CESHs SK-HEP-1, se realizó el ensayo cultivando las células KOCD13 en presencia de rGal-1. A diferencia de lo observado sobre las células SK-HEP-1 WT (Fig. 56), al utilizar una concentración de la lectina de 100 µg/ml no se observó el efecto estimulador sobre la formación de túbulos de las células que no expresan CD13 (101 ± 12 %) con respecto a las células incubadas con el vehículo (control, 100 %) (Fig. 57). Tampoco se detectaron diferencias al pre-incubar rGal-1 con TDG 20 mM (97 ± 19 %). En cambio, al incubar las células control SCR con rGal-1 sí se observó un mayor porcentaje de túbulos (259 ± 56 %) con respecto a la incubación con el vehículo, y dicho incremento fue prevenido al pre-incubar rGal-1 con TDG (82 ± 16 %).

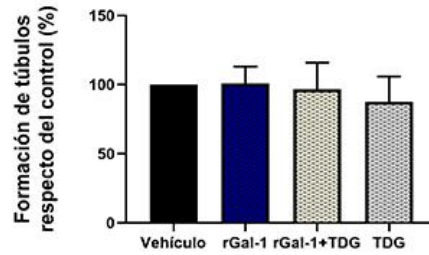
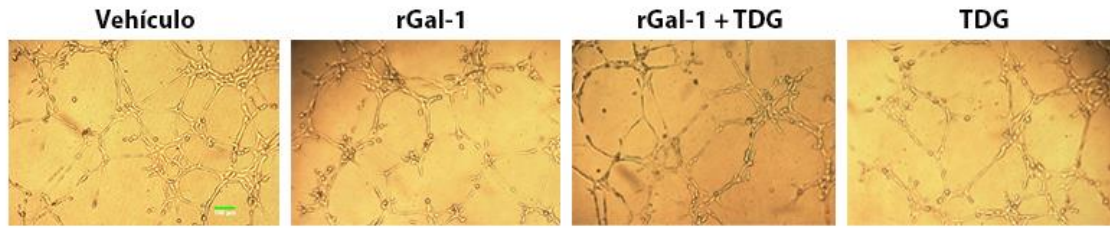
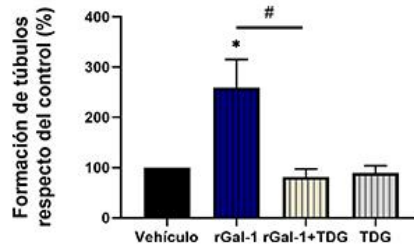
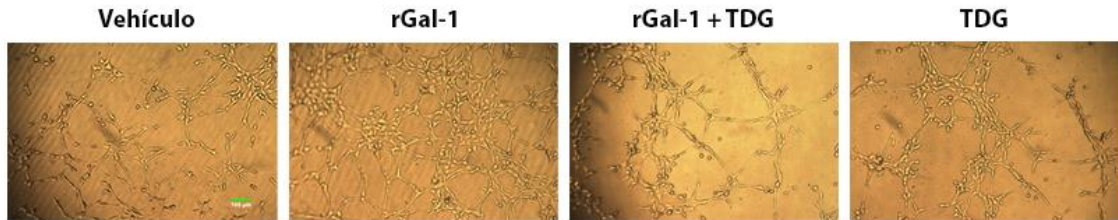
A SK-HEP-1 KOCD13**B SK-HEP-1 SCR**

Figura 57. Formación de túbulos cerrados en células SK-HEP-1 KOCD13 (A) y control SCR (B) en presencia de rGal-1. Las células fueron incubadas en ausencia de suero durante 6 horas sobre Geltrex™ bajo en factores en presencia de rGal-1 100 µg/ml, preincubada o no con TDG 20 mM. Se contó la cantidad de mallas (túbulos cerrados) por área (cm²) y se relativizó a la condición control con vehículo (PBS-DTT, 100 %). A y B, panel superior: se muestran microfotografías representativas (40X, la barra de escala representa 100 µm). A y B, panel inferior: los datos corresponden a la media ± SEM a partir de 3-6 experimentos independientes. * p < 0,05 respecto al vehículo, # p < 0,05 respecto a la condición rGal-1-TDG (Test ANOVA de una vía, seguido del Test de Tukey).

Estos resultados en conjunto demuestran que Gal-1 promueve la formación de túbulos de las CESHs SK-HEP-1, en parte, a través de la interacción con su receptor CD13.

3B.3.4 Estudio del rol de la actividad enzimática de CD13 en la formación de túbulos de las células SK-HEP-1

El efecto de CD13 puede ser consecuencia de su actividad enzimática, de la endocitosis de ligandos y/o la señalización molecular [167]. A continuación, decidimos determinar si Gal-1 favorece la tubulogénesis de las células SK-HEP-1 WT modulando la actividad aminopeptidasa de CD13. Para ello se realizó el ensayo de formación de túbulos utilizando el anticuerpo bloqueante de la actividad de CD13, WM15 [252]. En la figura 58 se puede observar que en presencia de rGal-1 y el anticuerpo bloqueante, el número de túbulos producido fue similar (397 ± 211 %) al obtenido sólo con rGal-1 (346 ± 105 %). Además, al inhibir la actividad de CD13 tampoco hubo diferencia en la tubulogénesis (154 ± 88 %) con respecto a la observada para las células incubadas con el vehículo (control, 100 %).

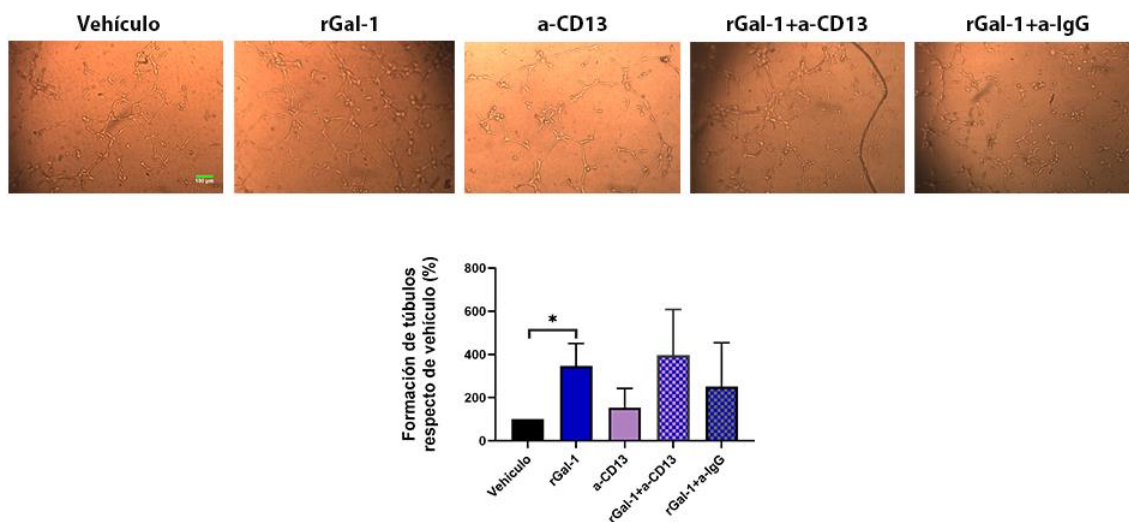


Figura 58. Participación de la actividad aminopeptidasa de CD13 en la formación de túbulos cerrados en células SK-HEP-1 WT en presencia de vehículo (Control), rGal-1, anticuerpo anti-CD13 bloqueante (a-CD13), co-incubación (rGal-1 + a-CD13) y co-incubación control de isotipo (rGal-1+a-CD13). Las células fueron incubadas en ausencia de suero durante 6 horas sobre Geltrex bajo en factores y rGal-1 100 μ g/ml o anti-CD13 WM15 25 μ g/ml. Se contó la cantidad de mallas (túbulos cerrados) por área y se lo relativizó a la condición control con vehículo. Panel superior: se muestran microfotografías representativas (40X, la barra de escala representa 100 μ m). Panel inferior: los datos corresponden a la media $\pm$ SEM a partir de 2-3 experimentos. * $p < 0,05$ (Test ANOVA de una vía seguido del Test de Tukey).

Estos resultados sugieren que CD13 promueve la formación de túbulos de las CESHs SK-HEP-1 en forma independiente de su actividad enzimática. Asimismo, el

bloqueo de dicha actividad no interferiría con la interacción y estímulo de rGal-1. A futuro, deberían realizarse más ensayos para confirmar estos resultados.

En resumen,

CD13 promueve la proliferación, migración y tubulogénesis de las CESHs tumorales SK-HEP-1, así como la adhesión de hepatocitos tumorales HEPG2 a dicho endotelio hepático. Además, si bien Gal-1 estimula la migración de las células SK-HEP-1 y la adhesión heterotípica de manera independiente de su interacción con CD13, su efecto pro-tubulogénico es dependiente de glicanos e involucra, al menos en parte, la participación de CD13.

DISCUSIÓN

Capítulo 1

De acuerdo con las últimas estimaciones de mortalidad global, más del 75 % de las muertes consideradas prematuras se deben a enfermedades no transmisibles. Las enfermedades cardiovasculares y el cáncer lideran el *ranking* en 127 países como la causa prevalente, siendo este último la principal razón de muerte prematura en 57 países, incluido Argentina. En otros 70 países, el cáncer es la segunda causa [253]. El carcinoma hepatocelular o CHC es la tercera causa de muerte a nivel global y el sexto cáncer más diagnosticado (<https://gco.iarc.fr/en>). En Argentina, durante el año 2022 se registraron 2504 nuevos casos de CHC y 2147 decesos [28]. A pesar de los avances en los tratamientos disponibles para esta enfermedad, su incidencia todavía se equipara con el índice de mortalidad [254], lo que refleja la pobre prognosis del CHC y la necesidad de comprender los mecanismos subyacentes a la progresión y diseminación del CHC para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

La recurrencia y la diseminación metastásica son las causas más frecuentes de mortalidad entre los pacientes. En el proceso de la metástasis de un tumor primario hacia otro tejido ocurre el escape de la célula neoplásica y su adhesión al endotelio asociado, por lo que es indispensable el estudio tanto del tumor como del microambiente tumoral donde se desarrolla.

Como se describió previamente, alteraciones en los niveles de expresión de Gal-1 están asociados, en muchos tipos de cáncer, con la transformación maligna, la proliferación, la migración e invasión de células tumorales y la metástasis [107], [255], [256]. Además, la expresión elevada de Gal-1 en el endotelio asociado al tumor resulta un factor clave para la angiogénesis [140].

Resultados previos de nuestro laboratorio evidenciaron la participación de Gal-1 en: I) la modulación de la adhesión de hepatocitos tumorales a la matriz extracelular, la polarización celular, la promoción del crecimiento tumoral y la metástasis *in vivo* [117]; II) la transición epitelio-mesénquima de hepatocitos tumorales a través de las vías de señalización de PI3K/Akt y Wnt/ β -catenina y la resistencia a *anoikis* [124] y III) la quimiorresistencia del CHC *in vivo* e *in vitro* a través de un mecanismo dependiente de la glicoproteína-P (gp-P) transportadora de drogas [125]. Demostramos que Gal-1 también promueve la adhesión de los hepatocitos tumorales a las CESHs SK-HEP-1 mediante su unión a glicanos, y que Gal-1 secretada por las células HEPG2-GAL

estimula la proliferación y migración de las células SK-HEP-1, favoreciendo la angiogénesis[133].

Con el objeto de profundizar en la comprensión de los mecanismos por los cuales Gal-1 secretada por los hepatocitos ejerce su acción sobre el endotelio asociado, es que se decidió realizar una cromatografía de afinidad a Gal-1 para identificar posibles receptores de membrana en las células SK-HEP-1. Luego, por espectrometría de masa se identificó, entre otros receptores, a la aminopeptidasa N o CD13 (Manzi, Tesis doctoral 2016). Ésta es una proteína exopeptidasa expresada normalmente en un gran linaje de células con múltiples funciones, no siempre dependientes de su actividad proteasa, tales como proliferación, diferenciación, migración, angiogénesis, invasión, metástasis y modulación de la respuesta inmune [167]. Está descrita también su expresión o actividad aumentada en varios tumores y su asociación con una peor prognosis en los pacientes [257]. Así mismo, se ha observado el aumento de la expresión en la superficie de células endoteliales durante la angiogénesis tumoral [167].

En base a estos antecedentes, en esta Tesis se investigó si Gal-1 y CD13, propuestas como ligando y receptor, se encontraban diferencialmente expresadas en el tejido hepático normal respecto del tumoral en muestras de pacientes con CHC, y su relación con la prognosis de la enfermedad y la supervivencia. Para estos estudios se utilizaron herramientas bioinformáticas que nos conceden acceso a distintas bases de datos clínicos.

Específicamente, el análisis de los datos genómicos de la base TCGA mostró que la expresión de Gal-1 se encuentra significativamente aumentada en el CHC respecto del tejido normal. Nuestros resultados son congruentes con la literatura disponible que describe, en un ensayo de cDNA *microarray* en tejidos de solo 8 pacientes con CHC, que los niveles de Gal-1 en el hígado de personas adultas normales se encuentran por debajo del nivel detectable, pero éstos se ven incrementados en tumores hepáticos [258]. Se observó también una expresión diferencial de Gal-1 entre una línea celular modelo de CHC indiferenciada (JHH-6) respecto de la línea celular bien diferenciada (HuH-7) [116].

Una mayor expresión de Gal-1 correlacionó con un peor pronóstico de supervivencia global en el estudio de TCGA con una evaluación de 377 pacientes. Esto se encuentra en coincidencia con un estudio realizado en el Instituto del Cáncer de Hígado de Shanghai, China, con el seguimiento de 386 pacientes. En dicho estudio,

altos niveles de Gal-1 se asociaron a tasas más altas de recurrencia y menor tiempo de sobrevida después de la resección del tumor primario [114].

Por otro lado, la mayor alteración genómica encontrada para Gal-1 a través de la plataforma cBioPortal es el aumento del número de copias del gen, aunque solo en 6 pacientes (~2 %). Es interesante comparar este tipo de mutación con las que ocurren en otros tipos de cáncer para este mismo gen (Anexo 1). Podemos observar que la amplificación es el tipo de mutación más frecuente, encontrándose también en melanoma, colangiocarcinoma (el segundo tipo de cáncer de hígado más común), cáncer de endometrio y de vejiga.

Con el programa del TCGA además pudimos comparar la expresión de ARNm de Gal-1 en otros tipos de tumores, cuyo valor también se encontró elevado respecto de los obtenidos en las correspondientes muestras de tejido normal (Anexo 2) [259]. Por ejemplo, esto lo observamos en el colangiocarcinoma, en los carcinomas de esófago, tiroides, riñón y en el glioblastoma. Pese a que existen estudios recientes que proponen a Gal-1 como proteína marcadora y potencial blanco terapéutico en algunos de estos tipos de tumores [260], [261], [262], [263], los mecanismos subyacentes se encuentran poco dilucidados, sobre todo en el CHC, y merecen una mayor investigación.

Con respecto a CD13, también estudiamos su expresión en muestras de hígado sano y en tumores hepáticos. La expresión del gen que codifica CD13, *ANPEP*, se encontró de manera similar en muestras de CHC de pacientes con respecto al tejido normal. La misma tendencia se encontró en las muestras obtenidas por IHQ, tanto los especímenes normales como tumorales tienen entre moderada y alta detección de la proteína.

En las últimas dos décadas se comenzó a estudiar en profundidad a una subpoblación de células tumorales latentes, arrestadas en la fase G0 del ciclo celular, resistentes a los tratamientos de quimioterapia y que mantenían la capacidad de desarrollar nuevamente el tumor primario. A estas células se las denominó *Cancer Stem Cells* (CSC), y se las encontró en distintas líneas celulares tumorales, incluyendo líneas hepáticas [202]. A partir de este punto se hicieron grandes esfuerzos por caracterizar estas subpoblaciones con marcadores de superficie en los que estuvieran enriquecidos. Luego de que CD13 fuera identificada, junto a otras, como proteína marcadora enriquecida en estas subpoblaciones de algunas líneas celulares hepáticas tumorales [205], Hu y colaboradores llevaron a cabo un estudio clínico en el que detectaron altos niveles de expresión de CD13 en muestras metastásicas de CHC y que correlacionaban

con peores pronósticos en pacientes luego de la resección quirúrgica [209]. Estos resultados se hallan en sintonía con lo reportado previamente por Wang y colaboradores. En dicho estudio, en 61 pacientes con CHC, CD13 junto a otros marcadores de CSC, correlaciona con estadios más avanzados de la enfermedad, tumores más grandes y peor supervivencia global [264]. En otro estudio clínico reciente utilizando muestras de 90 pacientes, se encontraron niveles de expresión de CD13 significativamente más altos en los tumores hepáticos que en tejidos adyacentes no tumorales y, que dichos niveles incrementados además correlacionaban positivamente con el tamaño del tumor [265].

Estos estudios se hallan en contraposición con nuestros resultados luego del análisis de la base de datos del TCGA. Teniendo en cuenta que esta última no posee datos genómicos diferenciados sobre tumores metastásicos o recurrentes, y que la investigación de Hu y colaboradores no incluyó perfiles de expresión en tejidos sanos, resulta compleja la comparación de ambos estudios. El proyecto CLCA tampoco incluye pacientes sanos para confrontar en las bases de datos.

En el anexo 3 se puede ver la expresión diferencial de CD13 en distintos tipos de cáncer respecto de la de las correspondientes muestras sanas. Los carcinomas de esófago y endometrio, y el glioblastoma son las principales enfermedades que muestran desregulación de la expresión de CD13 en este análisis del TCGA, aunque también se ha propuesto a CD13 como blanco terapéutico de cáncer de pulmón [266] y páncreas [267]. Es interesante que en ambos trabajos, cuyos resultados difieren de lo encontrado clínicamente por el proyecto TCGA, se estudió la expresión proteica tanto en células del tumor como en el endotelio asociado al tumor, encontrando en estas últimas una correlación positiva con peores pronósticos de supervivencia general. Tanto en las muestras de CHC del TCGA como en las obtenidas en el estudio clínico de Hu [209] se tienen los perfiles de expresión de muestras de tumores sólidos primarios, sin diferenciar entre los tipos celulares. Sería valioso contar con esta información en próximos estudios mediante IHQ o CITE-seq (*Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing-seq*).

En el anexo 4 se compara la frecuencia de alteraciones en el gen que codifica CD13 en distintos tipos de cáncer. Se observa que en melanoma, cáncer de endometrio, colorrectal y renal, la principal alteración es la mutación puntual, aunque en muy baja frecuencia, al igual que lo encontrado para el CHC. En otros tipos de cáncer como

carcinoma de esófago, ovario, mama, páncreas, sarcoma y cuello de útero prevalece la amplificación del número de copias.

Una forma de aproximación a la comparación de la expresión diferencial de *LGALS-1* y *ANPEP* en el endotelio sinusoidal hepático respecto de los hepatocitos normales fue posible mediante el análisis de scRNA-seq a través de la plataforma THPA. Los datos fueron obtenidos gracias a una publicación que caracterizó todas las células parenquimales y no parenquimales del hígado [231]. Aquí cabe recordar, como se mencionó en la introducción, que el 85 % de la población celular hepática está constituida por hepatocitos. A partir de expresiones diferenciales conocidas y marcadores de linaje, MacParland y colaboradores [231] identificaron 20 subpoblaciones celulares o *clusters*. Para las células endoteliales encontraron 3 poblaciones distinguibles: CEs vasculares (de vena central, arteria portal, venas endoteliales) y CESs portales (zona 1) y de zona central (zona 2/3). Las muestras analizadas nuevamente por el proyecto THPA agrupan estas 3 subpoblaciones en un solo *cluster*. Sin embargo, en el gráfico UMAP pueden distinguirse espacialmente al menos dos subgrupos, especialmente con los marcadores de CESHs CD4 y CD32b, cuya expresión espacial coincide con el encontrado para CD13. Esto concuerda con lo encontrado por IHQ en el hígado normal [268]. La expresión de CD13 en las CESHs sería también más elevada que en los hepatocitos estudiados (promedio de zonas).

Por lo tanto, el hecho de que las CESHs expresan CD13 y que su expresión se incrementa en el endotelio tumoral de varios tejidos, explica su detección en las células SK-HEP-1. Con el objetivo de determinar el nivel de CD13 en esta línea celular se utilizó el recurso ofrecido por la plataforma THPA, observándose que es la línea proveniente de un cáncer hepático con mayor expresión para dicho gen (unas 4,5 veces mayor expresión que en las células HEPG2). Además, en cuanto a la especificidad de la expresión génica en las líneas celulares respecto de las muestras de pacientes con distintos tipos de cáncer del TCGA, se confirmó lo demostrado por otros autores [236] en cuanto a que las células SK-HEP-1 son una línea de origen endotelial y no un modelo apropiado para el estudio de hepatocitos tumorales.

Nuestros resultados sobre la expresión de CD13 utilizando la técnica de *Western blotting* están de acuerdo con el análisis de los valores de RNAseq. Las soluciones de los anticuerpos primario y secundario para la detección de CD13 en las células HEPG2 tuvieron que utilizarse al doble de concentración respecto a las utilizadas para la inmunodetección en las células SK-HEP-1. Por lo tanto, una comparativa de la

expresión de CD13 entre ambas líneas celulares no resultó apropiada dada la gran diferencia de intensidades a las diluciones de anticuerpo ensayadas. En cuanto a Gal-1, las células SK-HEP-1 expresan mayores niveles de dicha proteína con respecto al endotelio sinusoidal normal, similar a lo demostrado en líneas endoteliales asociadas a otros tumores [140], [269].

Por otro lado, existen evidencias de asociación entre el nivel de expresión de algunas galectinas y sus respectivos receptores a través de la transducción de señales [229], [265]. Nuestros resultados indican que una alterada expresión de Gal-1 en hepatocitos tumorales no conlleva a una modificación de la expresión de CD13, en sintonía con las correlaciones observadas en pacientes en las bases de datos de TCGA y CLCA. En el caso de la línea endotelial SK-HEP-1, la ausencia de la proteína CD13 tampoco afectaría la expresión de su ligando propuesto, Gal-1.

Los resultados descriptos en el capítulo 1 demuestran que tanto Gal-1 como CD13 se encuentran en abundante expresión en el microambiente tumoral hepático. Dada la conocida implicancia de Gal-1 en la progresión del CHC, ésta podría actuar a través de mecanismos moleculares comunes con CD13.

Capítulo 2

Las galectinas pueden unirse a un amplio conjunto de receptores glicoconjugados conteniendo el motivo de β -galactosidasa, expresados en la superficie de una gran variedad de tipos celulares y en la matriz extracelular (MEC). Dada la alta conservación del DRC, los integrantes de la familia de las galectinas (especialmente Gal -1, -3, -4, -8 y -9) comparten receptores con glicosilaciones similares. Sin embargo, los DRCs pueden diferir en su secuencia de aminoácidos por fuera de los sitios conservados, abriendo las posibilidades de reconocimiento a distintos tipos de estructuras de glicanos. Por ejemplo, algunas galectinas reconocen la estructura LacNAc en una posición terminal, mientras que otras reconocen repeticiones internas de dicho glicano dentro de la estructura de glicosilaciones, o pueden reconocer moléculas de ácido siálico terminal o fucosas internas mientras que otras lectinas pierden la capacidad de unirse en presencia de estas modificaciones. Esta selectividad relativa podría explicar las variantes funcionales que se observan entre distintos integrantes de la familia de las galectinas [82], [270].

Gal-1 y Gal-3 son dos miembros de la familia que suelen encontrarse en una gran variedad de tejidos sin un patrón selectivo de distribución [271] y se las ha relacionado extensamente en roles fundamentales en procesos relacionados a la regulación de la respuesta inmune, procesos de inflamación y progresión del cáncer [255], [272], [273]. Entre las varias proteínas receptoras de superficie celular y de matriz extracelular que comparten ambas galectinas se encuentran VEGFR-1/VEGFR-2; CD146, CD44, CD45, LAMP-1/LAMP-2, laminina, fibronectina y distintos miembros de la familia de integrinas de la MEC [82]. Se han reportado diferencias importantes en la unión de las dos galectinas. Por ejemplo, si bien ambas pueden unirse al antígeno Thomsen–Friedenreich (TF), presente en proteínas con glicosilación aberrante provenientes de distintos tejidos tumorales, Gal-3 lo hace con una K_D dos órdenes de magnitud menor que Gal-1 [274], demostrando que Gal-3 posee mayor afinidad que Gal-1 por este antígeno.

Previo a este trabajo, Gal-3 fue identificada como ligando de la aminopeptidasa N o CD13 por medio de la técnica *Phage-display* en células HUVEC [223]. Tal como se mencionó en la sección de Introducción, la técnica de cromatografía de afinidad combinada con la de espectrometría de masa, nos permitió identificar potenciales

receptores de Gal-1 en la fracción de membrana de células SK-HEP-1, entre los que encontramos a CD13 (Manzi, Tesis doctoral, 2016). En el capítulo 2 de la sección de Resultados de este trabajo de Tesis se llevaron a cabo distintas estrategias para corroborar la hipótesis de que CD13 es un receptor de Gal-1.

En primer lugar, la superposición parcial observada entre los interactomas de Gal-1 y Gal-3 en la plataforma STRING apoya nuestra hipótesis de que Gal-1 también podría ser ligando de CD13. Por ello se intentó demostrar la interacción entre Gal-1 y CD13 realizando una co-IP. A pesar de los esfuerzos realizados, el complejo entre ambas proteínas, de formarse, no sería lo suficientemente fuerte o estable para ser detectado con esta técnica.

Dada la naturaleza transitoria y breve de algunas interacciones biológicas, se ha utilizado la tecnología de bioconjugación para capturar estas interacciones momentáneas, formando uniones covalentes a través de moléculas *cross-linkers* [275]. En particular, el uso de bis (sulfosuccinimidil)suberato, (BS³), análogo soluble del reactivo disuccinimidil suberato (DSS) resulta de utilidad para la captura de la interacción de proteínas extracelulares con proteínas de membranas previo a la co-IP, estrategia utilizada, por ejemplo, en la interacción del receptor CD45 [276] y MUC1 [277] con Gal-3. Una nueva generación de *cross-linkers* como la molécula sulfosuccinimidil 6-(4,4'-azipentanamido)hexanoato (Sulfo-LC-SDA) resulta idónea para las interacciones proteína-glicanos ya que uno de sus extremos conserva la probada reactividad a aminos de las proteínas mientras que el otro extremo contiene un grupo diazarina foto-activable que permite la unión a glicanos [278]. Sería interesante realizar los experimentos de co-IP con algunos de estos *cross-linkers* o contar a futuro con la tecnología de las diazarinas foto-activables que permitirían no solo capturar la interacción en la membrana de células vivas, sino también otorgar la especificidad de la unión del DRC de las galectinas a sus glicoproteínas receptoras.

El proceso de N-glicosilación que comienza en el retículo endoplasmático y continúa en el Golgi es mediado por glicosiltransferasas específicas de cada tipo celular y estado fisiológico. Además, se ha demostrado una glicosilación aberrante durante la transformación maligna, la que puede mediar fenómenos de señalización, adhesión y metástasis [279]. Dada la unión particular de las galectinas a los carbohidratos de glicoconjugados de las superficies celulares, y que el patrón de glicosilación puede variar de acuerdo al tipo celular, evaluamos la unión de Gal-1 a CD13 expresada por las células SK-HEP-1, en lugar de utilizar una proteína comercial expresada en otra célula u

organismo. Por ello, se decidió aislar el receptor CD13 endógeno producido en las células endoteliales SK-HEP-1 asociadas a un tumor hepático para evaluar la interacción directa con Gal-1.

Far Western blotting es una técnica derivada del *Western blotting*, utilizada para detectar la interacción entre dos proteínas *in vitro* sobre una membrana de PVDF. Mediante esta técnica y comparando una fracción de proteínas de membrana de las CESHs SK-HEP-1 enriquecida en CD13 con otra fracción proveniente de células KOCD13, se pudo detectar la unión de rGal-1 a la banda de CD13 en una membrana de PVDF. Esto nos permitió tener una evidencia más de la interacción de Gal-1 con CD13 en las CESHs SK-HEP-1. Dado que en la misma membrana, Gal-1 se unió a otras bandas proteicas de diferente movilidad electroforética, a futuro resultaría interesante identificar estos otros interactores de Gal-1.

La RPS es una técnica que permite determinar la unión de moléculas *in vitro* y además, calcular las constantes termodinámicas. Para la misma se utilizó el eluato de proteínas provenientes de la fracción de membrana de células SK-HEP-1 retenidas en la columna de afinidad de Gal-1-agarosa y como blanco, un eluato proveniente de células KOCD13. De esta manera, fue posible evaluar la unión de rGal-1 en solución a CD13 inmovilizada en el *chip*. Las curvas obtenidas en el sensorgrama presentaron una forma del tipo “cuadrada”, es decir, con asociaciones y disociaciones muy rápidas. En cambio, la cinética observada para Gal-3 fue distinta, se observaron asociaciones y disociaciones más lentas. Además, en el gráfico de respuesta relativa en función de la concentración de rGal-3 (Anexo 5) se observó también una curva sigmoidea (a diferencia de la hipérbola descrita para Gal-1, Fig. 33), compatible con una posible cooperatividad positiva de unión. Es decir, que a medida que aumenta la concentración de rGal-3 aumentaría la afinidad por CD13 debido a cambio conformacional en la estructura galectina. Es interesante recordar que Gal-3 es la única galectina tipo quimera capaz de formar trímeros y pentámeros en solución, lo que podría tener incidencia en el comportamiento observado. La oligomerización ocurriría al unirse a azúcares divalentes por un efecto de equilibrio de masas, dependiente únicamente de la concentración, en lugar de un cambio conformacional según [280].

Los ensayos mediante RPS demostraron que rGal-1 interacciona con CD13 expresada en el endotelio hepático tumoral a través de su DRC ya que, la pre-incubación con lactosa inhibió completamente la respuesta, no así con sacarosa. Por otro lado, la constante de disociación K_D entre ambas proteínas fue $3,1 \times 10^{-6}$ M. Este valor

se encuentra en línea con los reportados para otros receptores como CD45 proveniente de bazo de rata ($5,01 \times 10^{-6}$ M) [281] o CD146 de origen humano ($3,1 \times 10^{-7}$ M) [282] [295]. En cuanto a la unión de Gal-3 a CD13, el valor de K_D promedio que obtuvimos fue de $4,1 \times 10^{-6}$ M, siendo un orden de magnitud mayor que el descrito por Yang y colaboradores [223] para esta interacción ($3,5 \times 10^{-7}$). Las diferencias podrían deberse a que en el artículo mencionado, la proteína CD13 es de origen comercial, producida en rata (Sigma-Aldrich). El valor de K_D encontrado en nuestro trabajo sería más representativo de la afinidad entre Gal-3 y CD13 en un contexto angiogénico tumoral. Además, también se reportó la unión de Gal-3 a CD146, con una K_D de $1,1 \times 10^{-6}$ M [283].

De esta manera fue posible confirmar, de forma cualitativa y cuantitativa, la interacción física y directa entre Gal-1 y CD13. Mediante esta interacción, ambas proteínas podrían modular la fisiopatología del CHC y la angiogénesis asociada a este tumor.

Capítulo 3

En el capítulo 3 de esta Tesis se evaluó la relevancia fisiológica de la interacción entre Gal-1 y CD13 en el proceso de adhesión de hepatocitos tumorales al endotelio, así como en el proceso angiogénico de las células SK-HEP-1.

Demostramos, por primera vez, que CD13 desempeña un papel significativo en la adhesión de los hepatocitos tumorales HEPG2 a las CESHs SK-HEP-1. Como antecedente, se ha descrito la participación de CD13 en la adhesión homofílica[211]. Cabe resaltar que Gal-3 cumple una función esencial en la agregación homotípica de monocitos mediante su interacción con CD13, ya que su bloqueo con lactosa o un anticuerpo anti-Gal-3 inhibe completamente este proceso [212]. El efecto observado podría no limitarse a un fenómeno físico de adhesión celular, sino también involucrar cambios en la expresión o activación de otras moléculas de superficie. Osorio [213] propone que la adhesión entre monocitos y células endoteliales depende del *clustering* o *capping* de varias moléculas de CD13, ya que esta agrupación aumentaría la avidéz del receptor o induciría un cambio hacia una conformación activa, capaz de establecer interacciones con ligandos, por ejemplo Gal-3 o integrinas. El mecanismo hipotetizado sería un evento de señalización independiente de la actividad enzimática de CD13 que involucra la fosforilación de una tirosina quinasa y el flujo de Ca^{+2} , resultando en la polimerización de actina necesaria para la adhesión [213], [284].

Trabajos previos de nuestro laboratorio fueron los primeros en evidenciar el papel pro-adhesivo de Gal-1 en células de CHC. Por un lado, se observó que el incremento de Gal-1, ya sea mediante su sobreexpresión o por adición de la proteína recombinante, acelera la adhesión de células HEPG2 a laminina, una proteína de la MEC, a través de su unión a integrinas [117]. Por otro lado, se demostró que la sobreexpresión de Gal-1 en las células CHC potencia la adhesión de dichas células al endotelio sinusoidal, contribuyendo así al comportamiento invasivo del tumor [133].

Un trabajo pionero interesante ya había propuesto que Gal-1 favorece la adhesión heterotípica entre células de linfoma murino y células del endotelio sinusoidal hepático o células endoteliales microvasculares de pulmón *in vitro* [285]. Fue reportado también que Gal-3 facilita la adhesión de células tumorales de mama y próstata al endotelio al reconocer específicamente el antígeno Thomsen-Friedenreich expuesto en la superficie celular [130]. Además, la preincubación de células de cáncer de colon

humano con Gal-2, -4 y -8 recombinantes indujo un aumento, dependiente de la concentración, de la adhesión celular a monocapas de células endoteliales HUVEC [286].

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la sobreexpresión de Gal-1 en los hepatocitos tumorales HEPG2 aumenta su capacidad de adhesión a monocapas de CESHs SK-HEP-1 que no expresan CD13, sugiriendo que el rol pro-adhesivo de Gal-1 es independiente de CD13. Este resultado indica que Gal-1 estaría promoviendo la adhesión heterotípica mediante su unión a otros glicoconjugados de la superficie endotelial aún no caracterizados. Es importante destacar la ausencia de receptores de Gal-1 identificados en células hepáticas y CESHs previos a este trabajo [82]. A futuro, será importante identificar qué receptores de superficie de las CESHs son responsables de mediar el efecto pro-adhesivo de Gal-1, con el fin de ampliar nuestra comprensión del microambiente tumoral hepático y de su contribución a la diseminación y la angiogénesis.

Un modelo clásico del desarrollo de tumores sólidos propone la existencia de dos fases durante la tumorigénesis: una primera fase avascular en la que un nódulo se desarrolla hasta un estado de equilibrio entre la proliferación y la apoptosis (estado de latencia); en algunos casos se produce un “*switch* angiogénico” y procede la segunda fase, vascular, en la que el tumor es capaz de crecer en forma exponencial [66].

La angiogénesis tumoral consta de una serie de etapas consecutivas que llevan a la formación de nuevos capilares sanguíneos que le suministrarán oxigenación, nutrientes y detoxificación a la masa tumoral permitiendo no solo su desarrollo sino también su diseminación a distancia. El *switch* angiogénico estaría dado por la liberación de factores pro-angiogénicos desde las células neoplásicas hacia los receptores blanco que se encuentran en las células endoteliales (CE), activándolas e iniciando así el proceso. Como se explicó en la sección Introducción, el proceso de formación de nuevos capilares procede a partir de un fino equilibrio entre factores pro- y anti-angiogénicos que además determina el rol particular que cada célula tomará en esta dinámica. Así, mientras las células *tip* guían el proceso migratorio, las células del tallo o *stalk cells* son las que adquieren menor cantidad de filopodios pero mayor capacidad proliferativa, paso esencial para la formación de un nuevo vaso con lumen [287].

Dado que la proliferación de las CE del tallo es un proceso clave durante la fase de elongación en la tubulogénesis, nos propusimos analizar si las proteínas estudiadas

en este trabajo tienen algún efecto sobre este fenómeno. En primer lugar, determinamos que la ausencia de la aminopeptidasa CD13 reduce la tasa de proliferación en las células SK-HEP-1. En línea con estos hallazgos, se ha reportado que la inhibición irreversible de la actividad enzimática de CD13 con el polifenol curcumina disminuye la proliferación de células HUVEC [288]. Sin embargo, Bhagwat y colaboradores [217] no observaron efectos sobre la proliferación de dichas células al utilizar inhibidores reversibles de CD13 (bestatina, amastatina y ac-MY7). De esta manera, nuestros hallazgos son los primeros en describir que la expresión de CD13 afecta la proliferación de células endoteliales, sugiriendo un rol novedoso de esta ectoenzima en la regulación de la angiogénesis vascular.

Para investigar si la interacción entre Gal-1 y CD13 es relevante para la proliferación de las células SK-HEP-1, se comenzó el estudio del efecto de Gal-1 sobre dicho proceso. Se utilizó la estrategia de silenciar la expresión endógena de la lectina, así como también la de incorporar la proteína recombinante de manera soluble (en concentraciones entre 0,1 y 100 $\mu\text{g/ml}$) e inmovilizada (entre 10 y 100 $\mu\text{g/pocillo}$) y se realizó el ensayo de MTT. El nivel de expresión de Gal-1 en las células SK-HEP-1 no tendría relevancia para la proliferación, en las condiciones ensayadas en este trabajo. Además, no se observaron efectos significativos sobre la proliferación con rGal-1, a diferencia de lo descrito anteriormente (a partir de 10 $\mu\text{g/ml}$ aumentó la proliferación de las células SK-HEP-1) [133]. En dicho trabajo previo, realizado también en nuestro laboratorio, se utilizó un *kit* comercial de MTS (Promega, Estados Unidos), de mayor sensibilidad y precisión para determinar la proliferación celular, lo que podría explicar la diferencia en los resultados obtenidos. Existen otros reportes que describen un efecto proliferativo moderado de Gal-1 en CE HUVEC y en la línea inmortalizada EC-RF24 a una concentración de 0,1 μM ($\approx 3 \mu\text{g/ml}$) [149]. Sin embargo, a concentraciones más altas ($\approx 75 \mu\text{g/ml}$) se observó una inhibición de la proliferación en CE HUVEC, pero no en la línea inmortalizada. Por otro lado, en ese mismo trabajo se reportó una fuerte inducción proliferativa en las células HUVEC con rGal-1 en concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, efecto que no fue replicado en la línea EA.hy926 [149]. En distintos trabajos de otros investigadores, utilizando a Gal-1 recombinante, se reportó que sus efectos son dependientes de la concentración utilizada, con efectos estimulantes a determinadas concentraciones e inhibitorios de la proliferación o apoptóticos a altas concentraciones (en el orden mM), remarcando la importancia de la actividad bifásica en los estudios funcionales de la lectina [142], [282], [289], [290].

Los experimentos con rGal-1 soluble presentan dificultades técnicas especiales debido a la necesidad de utilizar un vehículo (DTT o β -mercaptoetanol) que mantenga reducidos los grupos sulfhidrilos de la proteína, su capacidad de dimerización y por lo tanto, su actividad máxima [291]. Es frecuente que dichos agentes reductores afecten la viabilidad celular. Por ello, se utilizaron distintos protocolos, con ambas formas de presentación de la lectina y hasta concentraciones de 100 $\mu\text{g/ml}$. Encontramos que rGal-1 inmovilizada, es decir, presentada como una proteína de matriz, promovió levemente la proliferación de las células SK-HEP-1, aunque el efecto no resultó estadísticamente significativo. Entonces, no se continuó el estudio sobre la interacción entre Gal-1 y CD13 en la proliferación de las células SK-HEP-1.

Posteriormente, se analizó la capacidad migratoria de las células SK-HEP-1 carentes de CD13 mediante el ensayo de la herida, observándose que la ausencia de esta proteína se asocia con una disminución en la migración celular. Este hallazgo evidencia la participación de CD13 en el proceso migratorio de las CESHs, y coincide con el efecto descrito luego del silenciamiento transitorio de su expresión en las CE HUVEC [214]. Recientemente, en un modelo de células de ataxia telangiectasia, se describió que la inhibición de la actividad enzimática de CD13 con bestatina ejerce un efecto supresor de la migración de fibroblastos [292]. Este efecto pro-migratorio ya había sido observado en un trabajo en el que se demostró que la sobreexpresión extrema de CD13 en células de melanoma promueve la degradación de colágeno tipo IV e invasión de la MEC de manera más activa que las células transfectadas control [293].

Con respecto a Gal-1, el silenciamiento estable de su expresión en la línea SK-HEP-1 permitió demostrar la participación de esta proteína en el proceso migratorio. Además, aunque rGal-1 presentada como proteína de matriz mostró un efecto positivo sobre la migración, sólo rGal-1 soluble (en presencia de suero para contrarrestar la alta mortalidad del vehículo) y a la máxima concentración ensayada (100 $\mu\text{g/ml} \approx 3 \mu\text{M}$) incrementó significativamente este proceso.

Gal-1 ha sido previamente identificada como partícipe en la migración de las CE HUVEC y EC-RF24 cultivadas *in vitro* [140], [227], [254]. En estas células, Gal-1 indujo la migración en niveles comparables a los observados en nuestro trabajo (25 %), pero en concentraciones cercanas a 0,1 μM ($\approx 3 \mu\text{g/ml}$). En cambio, a concentraciones más altas, similares a las aquí utilizadas ($\approx 2,5 \mu\text{M}$), se observó un efecto inhibitorio [140]. En conjunto, estos resultados sugieren que Gal-1 puede actuar como un

modulador de la migración endotelial, aunque su efecto depende estrechamente de la forma de presentación y la concentración.

La estimulación de la migración en células SK-HEP-1 KO para CD13 tras el tratamiento con rGal-1 fue comparable a la observada en células WT y control SCR, lo que sugiere que el efecto migratorio de Gal-1 se ejerce mediante un mecanismo independiente de su interacción con CD13. En conjunto, estos resultados indican que tanto Gal-1 como CD13 son relevantes para la migración de las CESHs SK-HEP-1, aunque actúan a través de mecanismos distintos.

En el ensayo de tubulogénesis con las células SK-HEP-1 se observó una menor capacidad de formación de túbulos cerrados en ausencia de la proteína CD13. También se evaluó el efecto de silenciar parcialmente su expresión, y los resultados muestran que incluso una reducción transitoria de CD13 afecta negativamente la capacidad tubulogénica de las células SK-HEP-1, demostrando la relevancia funcional de esta proteína en dicho proceso. La estrategia con siRNA complementa los hallazgos obtenidos en la línea KO, y permite discriminar entre los efectos derivados de una pérdida completa y los de una supresión parcial, aspecto especialmente valioso para evitar adaptaciones compensatorias que podrían surgir durante el establecimiento de líneas celulares estables [294].

Para evaluar el rol de rGal-1 en la tubulogénesis de las células SK-HEP-1 se utilizó la misma concentración que había demostrado ser efectiva en los ensayos de migración celular (100 µg/ml). En células WT y SCR control, el tratamiento con rGal-1 produjo un marcado incremento de estructuras tubulares cerradas, evidenciando el efecto pro-angiogénico de la lectina en estas condiciones. Sin embargo, la adición de rGal-1 a células KOCD13, con capacidad reducida para formar túbulos cerrados, no promovió una mayor tubulogénesis. Este resultado indica que la presencia de CD13 es necesaria para que rGal-1 ejerza su efecto sobre la morfogénesis vascular, al menos en este modelo de CESH.

Nuestros hallazgos concuerdan con lo descrito previamente para Gal-3 y su efecto pro-angiogénico dependiente de CD13 en CE HUVEC [223]. Esta similitud funcional entre galectinas sugiere un mecanismo común en el cual CD13 actúa como modulador o facilitador de distintos miembros de esta familia en la promoción de procesos angiogénicos. De hecho, diferentes galectinas pueden unirse a los mismos receptores, dependiendo del tipo celular y de la condición fisiopatológica [82]. Estas

interacciones pueden activar o modular vías de señalización convergentes o divergentes, dando lugar a una variedad de respuestas celulares.

Por ejemplo, se reportó que Gal-1 ejerce un efecto pro-angiogénico mediante su interacción directa con el receptor VEGFR2 [141]. Hsieh y colaboradores [142] demostraron que Gal-1 se une al co-receptor neuropilina-1 (NRP1), lo que aumenta la fosforilación de VEGFR-2 y activa distintas MAP kinasas [141]. También se describió la unión de Gal-3 a los N-glicanos en VEGFR-2, promoviendo su fosforilación y la regulación de su internalización en células endoteliales humanas [295]. Además, la adición de Gal-1 o Gal-3 recombinantes a células endoteliales EA.hy926 indujo la fosforilación de VEGFR-1 y VEGFR-2, favoreciendo la formación de túbulos [149].

Otro ejemplo ilustrativo es la interacción entre Gal-1 y CD146, co-receptor de VEGFR-2. La unión de Gal-1 a N-glicanos de VEGFR-2 activa una señalización similar a VEGF en tumores refractarios a anti-VEGF-A, promoviendo la progresión tumoral y la angiogénesis [137]. De manera, el eje Gal-1/CD146/VEGFR-2 regularía de manera crítica la angiogénesis durante la progresión tumoral. Cabe destacar que CD146 también ha sido identificado como receptor de Gal-3 y Gal-9 en distintos procesos angiogénicos e inflamatorios en células endoteliales [296], [297].

Ha sido caracterizada también la capacidad de las galectinas para establecer interacciones multivalentes con integrinas glicosiladas en la superficie celular, activando vías de señalización que modulan distintos procesos [82]. En las CE HUVEC, por ejemplo, Gal-3 induce la agrupación de la integrina $\alpha\beta3$, promoviendo así la activación de FAK y potenciando la angiogénesis mediada por VEGF y bFGF [295]. Por su parte, Gal-1 interactúa con la integrina $\alpha1\beta1$ estimulando la adhesión y migración de células trofoblásticas y modulando su integración en redes de células endoteliales [298].

La capacidad de las células para formar túbulos sobre Geltrex™ depende, además de la migración celular, de la capacidad de remodelación de dicha matriz extracelular [299]. Para poder determinar si el efecto pro-angiogénico desencadenado en conjunto por Gal-1 y CD13 era dependiente de la actividad proteasa del receptor, se incubó a las células SK-HEP-1 en presencia de rGal-1 y un anticuerpo monoclonal inhibidor de dicha actividad. En primer lugar, los resultados obtenidos sugieren que CD13 promueve la formación de túbulos de las CESHs en forma independiente de su actividad enzimática. Además, la actividad proteasa de CD13 no sería un requisito para el efecto pro-angiogénico dado por la interacción con Gal-1.

A diferencia de nuestros resultados, la inhibición de la actividad aminopeptidasa con anticuerpos bloqueantes (MY7) o compuestos como bestatina redujo el número de túbulos en CE HUVEC [217]. Sin embargo, bestatina no es un inhibidor específico de CD13 y se ha reportado que puede inducir apoptosis, lo que podría conducir a resultados erróneos [300]. En otro estudio interesante, en el que se analizó la formación de túbulos en CEs de la microvasculatura, se observó paradójicamente que tanto bestatina como los anticuerpos bloqueantes ejercieron un efecto pro-tubulogénico cuando las células se cultivaron sobre una matriz de fibrina, pero inhibitorio cuando se realizaba sobre la matriz MatrigelTM [301]. Más recientemente, se demostró que la forma soluble de CD13 (sCD13) induce la migración de monocitos de manera independiente de su actividad enzimática [302]. En ese trabajo, los autores emplearon inhibidores farmacológicos de vías como las de Erk1/2, Src, NF- κ B y GPCR durante el ensayo de tubulogénesis inducido por sCD13, demostrando que la señalización intracelular sería la responsable de su efecto pro-angiogénico.

Una posible hipótesis sobre el mecanismo involucrado que subyace a la interacción y cooperación entre Gal-1 y CD13 en la promoción de la tubulogénesis en el endotelio sinusoidal hepático es que CD13 actúe como co-receptor o facilite la internalización y la señalización efectiva de Gal-1. Existen reportes que respaldan este rol de CD13 como modulador de la entrada y señalización de moléculas asociadas. Por ejemplo, en células mieloides [303] se demostró que CD13 regula la endocitosis dependiente de clatrina y dinamina del *Toll-Like Receptor 4*, restringiendo la señalización celular. La función de CD13 como facilitador de la señalización también ha sido descrita en células endoteliales y fibroblastos: mediante el anclaje de un complejo de proteínas en membrana (IQGAP1-ARF6-EFA6), CD13 promueve la activación de ARF-6, lo que permite el reciclaje de integrinas, proceso esencial para la migración celular [304].

En el caso de Gal-1, también existen evidencias de que participa en procesos de internalización. En neuronas, se demostró que la unión de Gal-1 a neuropilina-1 y plexina A4 inicia la internalización del complejo proteico, lo que conduce a la activación del citoesqueleto de actina y a la regeneración axonal [305]. En linfocitos T tumorales, se reportó que Gal-1 se internaliza de manera dependiente de clatrina o caveolina, asociada a su interacción con CD7 y glangiosidos GM1 [306]. Además, la unión de otras galectinas a sus receptores, como es el caso de Gal-3 y CD44, puede promover la internalización independiente de clatrina [307].

Por otro lado, las galectinas son capaces de formar complejos multivalentes con glicoconjugados de la superficie celular, conocidos como entramados (*lattices*), que podrían participar en la organización de dominios de membrana (*clusters*), en la regulación de los umbrales de señalización en la superficie celular y en la persistencia del receptor en la superficie celular, inhibiendo la endocitosis [101].

Sería valioso investigar en mayor profundidad el mecanismo mediante el cual la unión de Gal-1 a CD13 desencadena la señalización que conduce a la tubulogénesis. Elucidar estas vías permitiría no solo comprender mejor el rol de Gal-1 y CD13 en la angiogénesis, sino también sustentar la hipótesis de utilizar a este complejo proteico como blanco terapéutico en la neovascularización hepática tumoral.

CONCLUSIÓN

Conclusión

El uso integrado de plataformas bioinformáticas permitió analizar distintas bases de datos públicas, permitiéndonos concluir que los pacientes con hepatocarcinoma presentan niveles altos de Gal-1, asociados a peores desenlaces en términos de sobrevida. Además, concluimos que la expresión basal de CD13 se mantiene elevada tanto en hepatocitos como en células endoteliales sinusoidales del hígado, sin diferencias significativas entre pacientes afectados con tumor e individuos sanos.

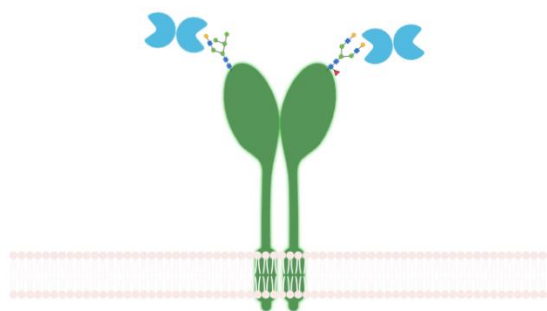
El empleo de dos técnicas distintas, RPS y *Far Western blot*, permitió demostrar por primera vez que Gal-1 interactúa con CD13 de manera física y directa a través del DRC de la lectina. Asimismo, el análisis bioinformático indicó que no hay correlación entre la expresión de los genes de Gal-1 y CD13 en pacientes con hepatocarcinoma, y que la expresión de CD13 en las células HEPG2 permanece constante aun cuando varían los niveles de Gal-1. Estos hallazgos sugieren que no existe una modulación de la expresión recíproca entre ligando y receptor, o que su regulación depende de vías de señalización independientes.

Nuestros resultados muestran que CD13 favorece procesos clave en las CESHs de origen tumoral, estimulando su proliferación, migración y capacidad de formar estructuras tubulares. Además, potencia la adhesión de hepatocitos tumorales a este endotelio hepático, lo que sugiere un rol activo en la interacción entre ambos tipos celulares.

Gal-1, por su parte, estimula tanto la migración de las células endoteliales como la adhesión heterotípica a hepatocitos de manera individual e independiente de su interacción con CD13. Sin embargo, su capacidad para promover la formación de estructuras tubulares depende de la presencia de glicanos y, al menos parcialmente, de CD13 como molécula de señalización, lo que indica una cooperación funcional entre ambas proteínas en este proceso.

En el siguiente esquema se resumen los hallazgos de este trabajo de tesis sobre los procesos modulados por CD13 en la biología del endotelio sinusoidal hepático tumoral y su relación con Gal-1.

A



B

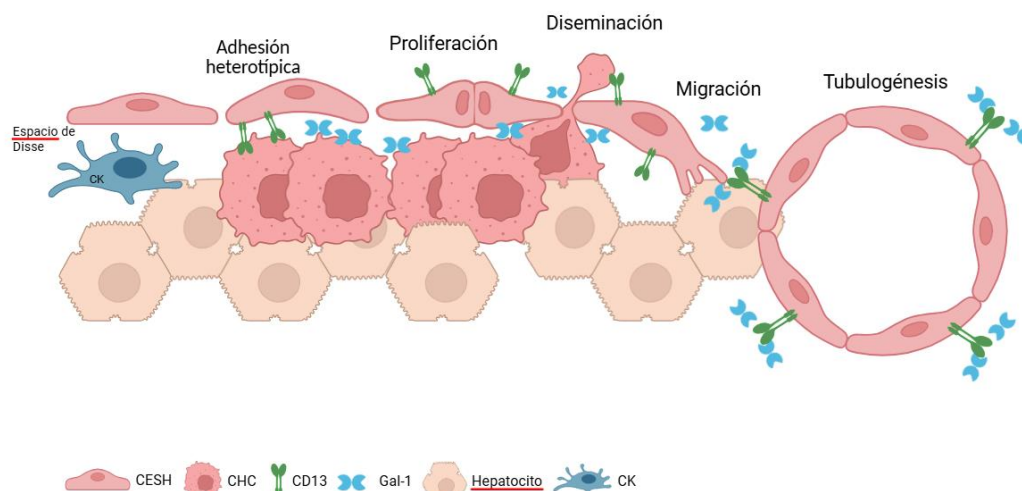


Figura 59. Relevancia de la interacción de Gal-1 y CD13 en el microambiente del CHC. En la figura se resumen los resultados obtenidos en este trabajo. A) Gal-1 posee la capacidad de unirse a glicanos del receptor CD13 en la superficie de CESHs. B) Los niveles de Gal-1, secretada por los hepatocitos tumorales, se encuentran elevados en el microambiente del CHC. Aquí se confirmó, que esta galectina participa en distintos procesos como adhesión heterotípica entre hepatocitos tumorales y CEs, migración y tubulogénesis de CESHs. CD13 se encuentra expresada en niveles basales altos en hepatocitos y endotelio en el CHC; y está también involucrada en los procesos de adhesión heterotípica, proliferación, migración y formación de túbulos. Los efectos de Gal-1 y CD13 en todos estos procesos llevarían a la progresión del CHC y a la diseminación de la célula hepática tumoral. La unión de Gal-1 a CD13 media el proceso de morfogénesis celular que permite la formación de nuevos vasos sanguíneos. En conjunto, estos resultados fundamentan la hipótesis de que existe una interacción física y funcional entre Gal-1 y CD13 en el contexto de la angiogénesis tumoral en el CHC. Creada con <https://BioRender.com>

En resumen,

nuestros resultados constituyen la primera evidencia de que Gal-1 actúa como ligando de CD13 en la superficie de células endoteliales sinusoidales hepáticas y de hepatocitos tumorales. Esta interacción directa favorece la cooperación entre ambas proteínas, promoviendo la angiogénesis del endotelio sinusoidal dentro del microambiente tumoral hepático. Estos hallazgos representan una contribución importante y novedosa para comprender los mecanismos mediante los cuales Gal-1 y CD13 participan en la glicobiología del CHC.

El progreso de esta línea de investigación podría sentar las bases para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas destinadas a combatir el CHC y mejorar la sobrevida de los pacientes.

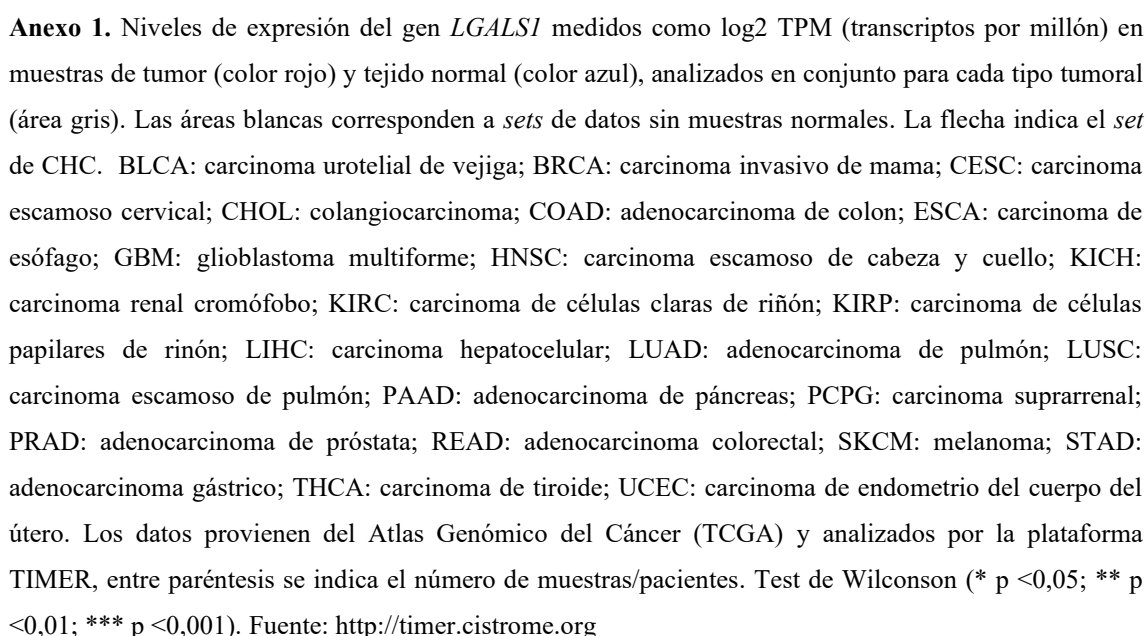
PERSPECTIVAS

Perspectivas

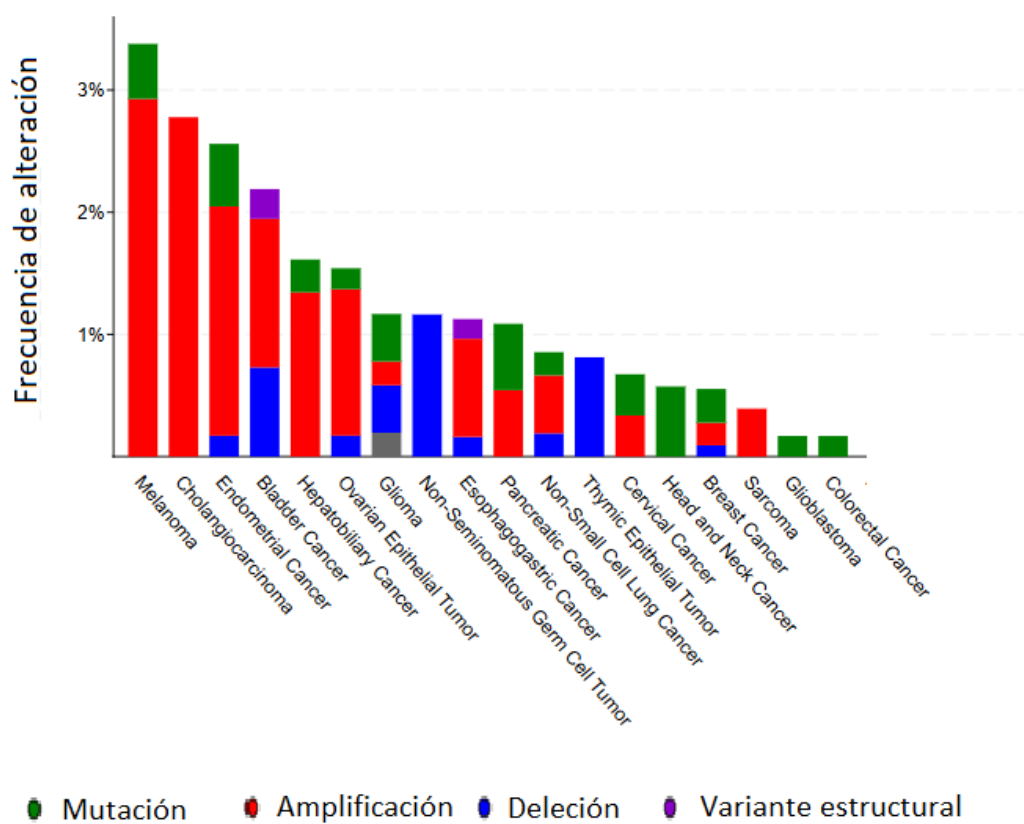
- Evaluar la interacción física entre Gal-1 y CD13 en la superficie celular de células SK-HEP-1 utilizando técnicas como *Ligand Proximity Assay* o FRET (Transferencia de Energía por Resonancia de Förster). Estas estrategias permitirían demostrar dicha unión en un contexto fisiológico de membrana plasmática íntegra en células vivas.
- Analizar la posible co-internalización de Gal-1 y CD13 en células SK-HEP-1 y HEPG2 mediante microscopía de epifluorescencia; y el mecanismo dependiente o independiente de clatrina asociado. Esto nos permitiría entender cómo la unión de Gal-1 modula la dinámica de CD13 en la membrana y su señalización. Por ejemplo, la interacción Gal-1/CD13 podría favorecer la segregación de la aminopeptidasa, favoreciendo su función morfogénica de túbulos.
- Analizar el perfil de expresión génica asociado a la angiogénesis inducida por Gal-1 en las CESHs SK-HEP-1 KOCD13.
- Inhibir VEGFR-2/VEGFR-1 con anticuerpos bloqueantes en los ensayos de migración y tubulogénesis para estudiar los efectos de Gal-1 independientes de dicha vía para iluminar el posible mecanismo de acción en conjunto con CD13.
- Determinar el perfil de glicosilación de CD13 expresada en células tumorales HEPG2 y SK-HEP-1, y comparar con el perfil de la proteína aislada de hepatocitos no tumorales (HepatoXcell™) y células endoteliales normales (HUVEC), respectivamente. El perfil de glicanos puede ser resuelto a partir de la técnica *lectin blot* o UPLC-HILIC (Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento-Columna de Fase Estacionaria de Interacción Hidrofílica) seguida de espectrometría de masas.
- Estudiar la interacción funcional de Gal-1 y CD13 en la formación de túbulos en otras células endoteliales de la microvasculatura tumorales o no tumorales, como HMEC-1.

- Evaluar la formación de ramificaciones vasculares (*sprouting*) en esferoides tridimensionales mixtos compuestos de hepatocitos tumorales HEPG2 (con distintos niveles de Gal-1) y células SK-HEP-1, con y sin expresión de CD13.
- Identificar, mediante digestión triptica *in gel* y espectrometría de masas, los otros posibles receptores de Gal-1 detectados en el ensayo de *Far Western blot*.

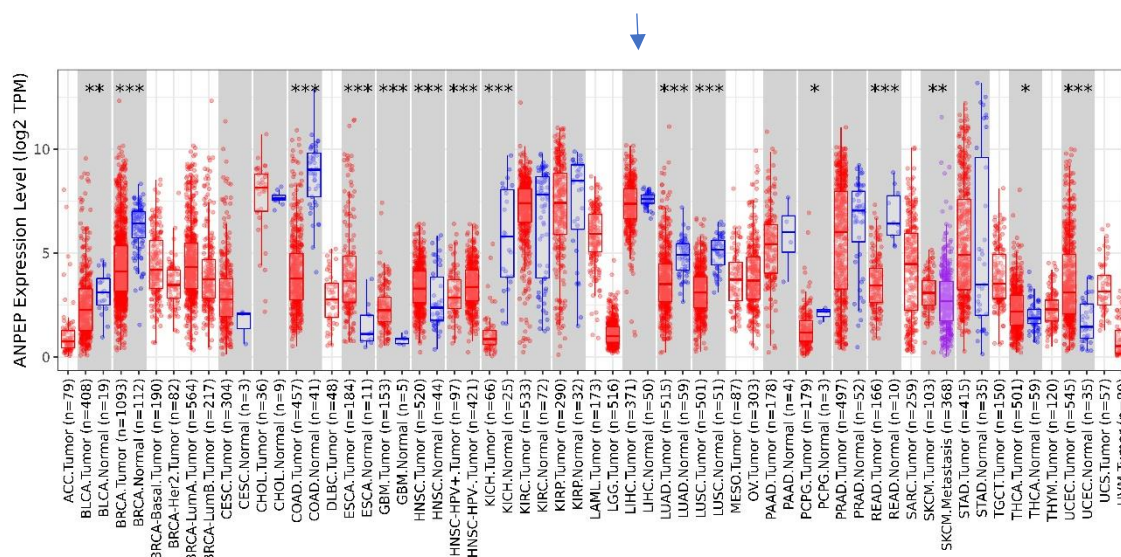
ANEXOS



Anexo 2. Frecuencia de alteración del gen *LGALS1* en distintos tipos de cáncer (TCGA)

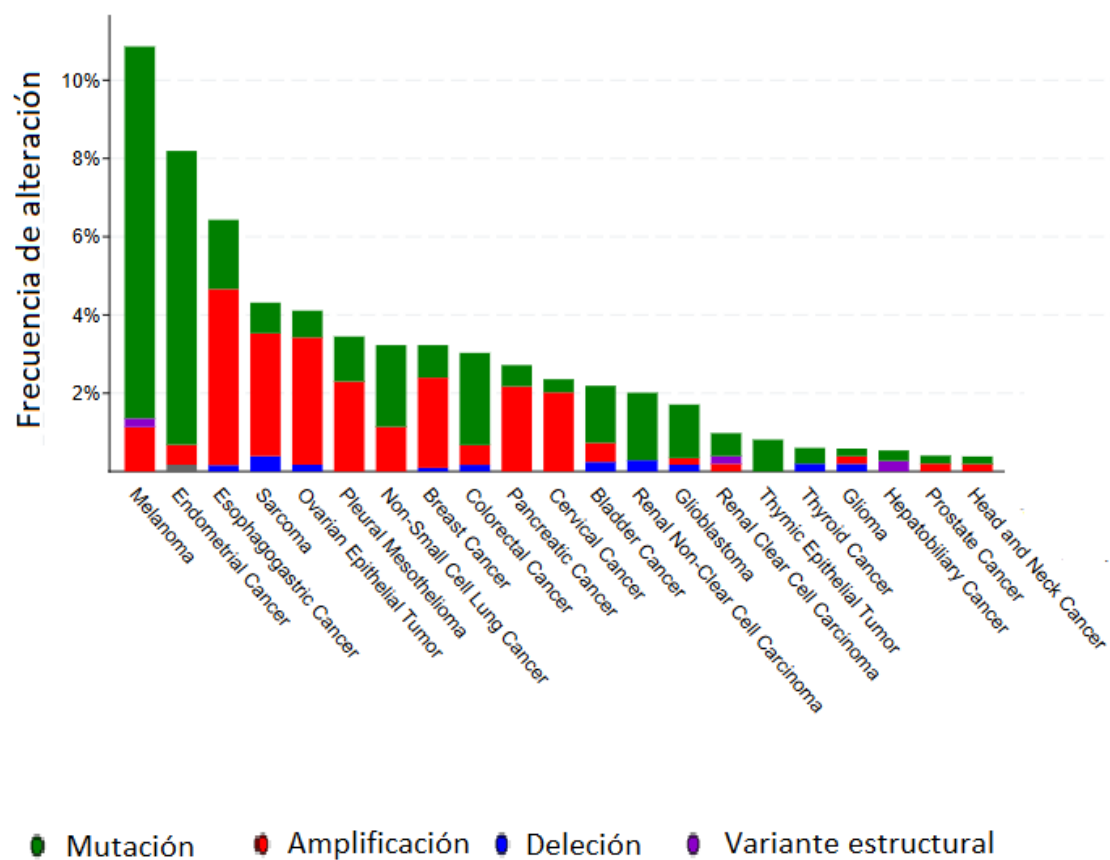


Anexo 2. Frecuencia de alteración del gen *LGALS1*. Se muestra el porcentaje de mutaciones, amplificaciones, deleciones y variantes estructurales para cada tipo de cáncer, según los colores indicados. Los datos provienen de la plataforma cBioPortal con datos provenientes del TCGA.

Anexo 3. Expresión del gen *ANPEP* en distintos tipos de cáncer (TCGA)

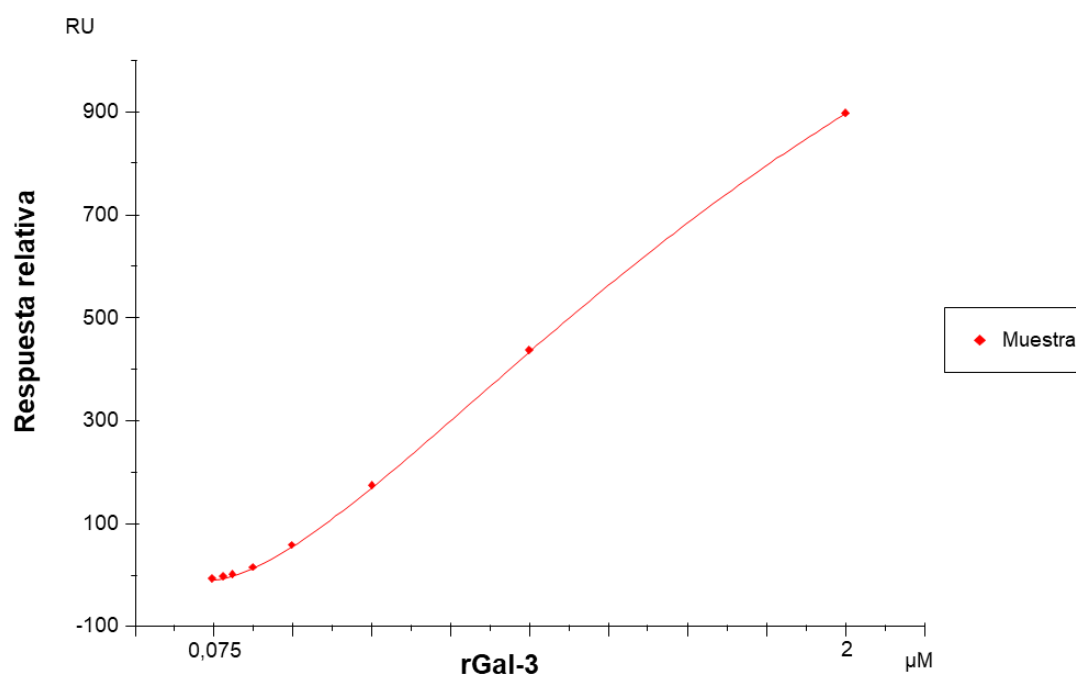
Anexo 3. Niveles de expresión del gen *ANPEP* medidos como log2 TPM (transcriptos por millón) de muestras de tumor en color rojo y azules (tejido normal) en *sets* con ambas muestras (área gris). Las áreas blancas corresponden a *sets* de datos sin muestras normales. La flecha indica el *set* de CHC. En color violeta se muestra un *set* de datos de metástasis. Abreviaturas: BLCA: carcinoma urotelial de vejiga; BRCA: carcinoma invasivo de mama; CESC: carcinoma escamoso cervical; CHOL: colangiocarcinoma; COAD: adenocarcinoma de colon; ESCA: carcinoma de esófago; GBM: glioblastoma multiforme; HNSC: carcinoma escamoso de cabeza y cuello; KICH: carcinoma renal cromóforo; KIRC: carcinoma de células claras de riñón; KIRP: carcinoma de células papilares de riñón; LIHC: carcinoma hepatocelular; LUAD: adenocarcinoma de pulmón; LUSC: carcinoma escamoso de pulmón; PAAD: adenocarcinoma de páncreas; PCPG: carcinoma suprarrenal; PRAD: adenocarcinoma de próstata; READ: adenocarcinoma colorectal; SKCM: melanoma; STAD: adenocarcinoma gástrico; THCA: carcinoma de tiroides; UCEC: carcinoma de endometrio del cuerpo del útero. Los datos provienen del TCGA y analizados por la plataforma TIMER, entre paréntesis se indica el número de muestras/pacientes. Test de Wilcoxon (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Fuente: <http://timer.cistrome.org>

Anexo 4. Frecuencia de alteración del gen *ANPEP* en distintos tipos de cáncer (TCGA)



Anexo 4. Porcentaje de mutaciones, amplificaciones, deleciones y variantes estructurales del gen *ANPEP* para cada tipo de cáncer. Los datos provienen de la plataforma cBioPortal con datos provenientes del TCGA.

Anexo 5. Respuesta relativa en función de la concentración de rGal-3



Anexo 5. Respuesta relativa en función de la concentración de rGal-3. Se evaluó mediante SPR la curva de respuesta (UR/UR max) de CD13 inmovilizada a distintas concentraciones de rGal-3 (μM) en solución. La sigmoidicidad sugiere un efecto cooperativo en los sitios de unión.

MATERIALES Y MÉTODOS

Capítulo 1

1. Análisis bioinformático

1.1 UALCAN

UALCAN (*University of ALabama at Birmingham CANcer data analysis Portal*) es una plataforma *web* que permite visualizar y analizar los niveles de expresión de proteínas y su relación con la historia clínica de los pacientes para diferentes tipos de cáncer, utilizando los datos genómicos de la base de datos TCGA (*The Cancer Genome Atlas*). Para analizar los niveles de expresión de los genes de las proteínas Gal-1 y CD13 en muestras de pacientes con cáncer de hígado, se accedió al sitio *web* <https://ualcan.path.uab.edu/> y en el sector “Enter gene symbol(s)” se ingresaron los nombres de los genes “LGALS1” y “ANPEP”, respectivamente. A continuación, se eligió el tipo de cáncer “Liver hepatocellular carcinoma”. Luego se seleccionó el tipo de análisis: “Expression” y “Survival” para evaluar los niveles de expresión de los genes y obtener las curvas de supervivencia asociadas a los mismos.

1.2 Kaplan-Meier Plotter

Kaplan-Meier Plotter es una herramienta *web* que permite asociar los niveles de expresión de un determinado gen en las muestras tumorales con la supervivencia de los pacientes, utilizando distintas bases de datos como GEO (*Gene Expression Omnibus*), CIT (*Cartes d’Identité des Tumeurs*) y TCGA. En el caso particular del cáncer de hígado, solo se encuentra disponible la base de datos TCGA. Luego de ingresar al sitio <https://kmplot.com/> seleccionamos la opción “Start KM Plotter for Liver Cancer” y elegimos el gen de interés (LGALS1 o ANPEP). Utilizamos la opción “Auto select best cut-off” que determina el mejor umbral de corte entre altos y bajos niveles de expresión. En la sección *survival* se seleccionó la opción “OS: overall survival” y se eligió un período de 240 meses para realizar el análisis.

1.3 cBioPortal

cBioPortal es un *software* de libre acceso que permite la exploración interactiva de distintos *data sets* de genómica del cáncer. El objetivo, al igual que el de las otras plataformas utilizadas y descritas previamente, es disminuir las barreras entre la bioinformática genómica compleja y los investigadores, proveyendo un acceso rápido, intuitivo y de alta calidad a los perfiles moleculares y atributos clínicos de proyectos genómicos de gran escala. Esta herramienta fue utilizada para evaluar alteraciones en los genes *LGALS1* (Gal-1) y *ANPEP* (CD13) en muestras provenientes de cáncer de hígado, ofrecidas por los proyectos TCGA y *Chinese Liver Cancer Atlas* (CLCA).

Al ingresar al portal <https://www.cbioportal.org/>, en la sección “*Select Genomic Profiles*” elegimos los perfiles genómicos que deseamos estudiar: “*mutations*”, que corresponde a datos de mutaciones del exoma completo o “*putative copy-number alteration from GISTIC*”, correspondiente a posibles alteraciones del gen analizadas con el algoritmo GISTIC, que detecta regiones alteradas por amplificación o delección. Una vez lanzada la búsqueda obtuvimos la información sobre la frecuencia de mutaciones y la co-expresión del gen de interés con otros genes, entre otros datos. En este trabajo utilizamos esta información para nuestros genes de interés *LGALS1* y *ANPEP* en el cáncer de hígado.

1.4 THPA

The Human Protein Atlas (THPA) es un proyecto iniciado en Suecia con el objetivo de mapear todas las proteínas humanas en células, tejidos y órganos utilizando la integración de distintas tecnologías ómicas que incluyen inmunohistoquímica (IHQ), proteómica basada en espectrometría de masas, transcriptómica y biología de sistemas. En este trabajo se utilizaron algunas de sus secciones para el estudio de la expresión génica a nivel de ARN y de proteína, en bases de datos de pacientes sin patologías hepáticas, de pacientes con cáncer de hígado y de líneas celulares tumorales.

En la sección *Tissue* se puede acceder al perfil de expresión de ARNm, obtenido mediante la secuenciación del transcriptoma entero (RNA-seq) y al perfil proteico, obtenido a través de la técnica de IHQ múltiple, proveniente de 44 tipos de tejidos humanos sanos. La búsqueda se realizó colocando el nombre del gen de interés en la barra *gene symbol* y se seleccionó la opción “*Liver*” para acceder a la información

normalizada de los datos de expresión de ARNm e imágenes de tinciones inmunohistoquímicas de tejidos hepáticos.

En la sección *Pathology* se accede a los datos normalizados y analizados de expresión de ARNm de la base TCGA y a las imágenes de IHQ obtenidas por THPA correspondientes a cáncer hepático.

En la sección *Single Cell* se encuentra información basada en la secuenciación de ARN de célula única (*single cell* RNAseq o scRNAseq) proveniente de 31 tejidos humanos. Dicha información proviene de un metaanálisis de estudios de scRNAseq descriptos en la literatura que incluyen tejidos humanos sanos. El criterio de aceptación para la incorporación de bases de datos fue: 1. que los transcriptomas estuvieran basados en la plataforma *Chromium single cell gene expression* (10X genomics, versión 2 ó 3); 2. que la secuenciación fuera realizada en células en suspensión de tejidos sin pre-enriquecimiento de tipos celulares y 3. que el estudio contara con más de 4 mil células y 20 millones de recuentos totales de lecturas. Para el análisis del tejido del hígado se utilizó la base de datos GSE115469 [231] que cumple con todos los requisitos: contiene 32,8 millones de recuentos de lecturas en un total de 11.175 células analizadas. Los recuentos fueron normalizados a transcritos por millón de genes codificantes para proteínas (pTPM) y dentro de cada *cluster* se utilizó una normalización TMM (*trimmed mean of M values*) para su comparación [308]. El criterio para la selección de los distintos *clusters* de tipo celular fue de manera manual, basado en una consulta extensiva de marcadores específicos de células que incluyeran las utilizadas en las publicaciones originales. En el caso del *set* elegido del hígado se realizaron simplificaciones del material original, sin separar a los *clusters* celulares por zona hepática (portal, periportal y central-venosa).

En la sección *Cell Line* se encuentra la información del perfil del transcriptoma de genes codificantes de 1206 líneas celulares humanas, que incluye 1132 líneas de origen tumoral. Los análisis contienen una clasificación basada en la especificidad de 28 tipos de cáncer y en la similitud de la línea celular con respecto al tipo de cáncer según la base de datos del TCGA. Los datos crudos fueron obtenidos de la base de datos CCLE (*Cancer Cell Line Encyclopedia*) y la abundancia de cada transcrito de gen codificante se estimó utilizando el valor de TPM promedio de las muestras individuales para cada línea celular.

Para el análisis de consistencia de la expresión de genes entre las líneas celulares modelo y las cohortes de pacientes oncológicos correspondientes de la base de datos

TCGA, se utilizó el coeficiente de correlación Spearman (ρ). Para cada gen anotado en el TCGA, su valor de transcripto por millón normalizado (nTPM) fue promediado por cohorte y para cada cohorte, el coeficiente ρ de Spearman se calculó entre el valor nTPM promedio y el valor nTPM de la línea celular de ese tipo de cáncer. El enriquecimiento en los genes sobreexpresados en las cohortes del TCGA y en las líneas celulares fue evaluado por GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*). Los genes con expresión elevada en los distintos tipos de cáncer en el TCGA deberían reflejarse en las líneas celulares tumorales elegidas como modelo. Para ello, la expresión génica en cada tipo de cáncer fue promediada y utilizada como línea de base. Para cada línea celular se calculó el número de veces de cambio de expresión en cada gen relativo a la expresión base. Los resultados fueron representados como NES (*Normalized Enrichment Score*) con un valor positivo que correlaciona con la consistencia entre líneas celulares y cohortes. Se realizó un ranking de líneas celulares basado en ambos parámetros (Spearman y NES).

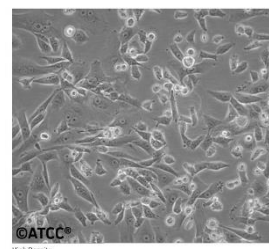
2. Cultivo de líneas celulares

2.1 Líneas celulares utilizadas

A continuación se presentan las líneas celulares utilizadas en esta tesis, sus características principales y una microfotografía representativa con la morfología celular:

SK-HEP-1 (ATCC HTB52)

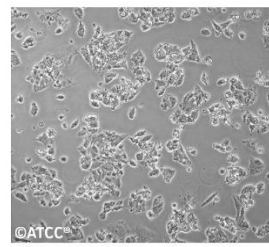
Es una línea celular de origen endotelial aislada del fluido ascítico del hígado de un paciente de género masculino de 52 años con adenocarcinoma. A pesar del origen de la muestra, la línea celular no presenta características de hepatocitos. Las células no expresan proteínas específicas de los hepatocitos tales como albúmina, alfa fibrinógeno o gama fibrinógeno. En cambio, hay un consenso sobre el uso de la línea celular SK-HEP-1 como modelo de células endoteliales sinusoidales hepáticas (CESHs). Las células SK-HEP-1 presentan fenestraciones, numerosas vesículas pinocíticas y gránulos densos consistentes con cuerpos de Weibel-Palade. A su vez expresan el factor von Willebrand, caveolina-1, VEGFR2, óxido nítrico sintasa endotelial y clatrina; sin embargo, no expresan CD31, lo



cual es una característica de las CESHs, sumada a la alta actividad endocítica, la morfología y funcionalidad típicas de las mismas. [309], [310]. En vista de las evidencias enumeradas, la línea celular SK-HEP-1 representa un modelo adecuado para el estudio de la microvasculatura hepática.

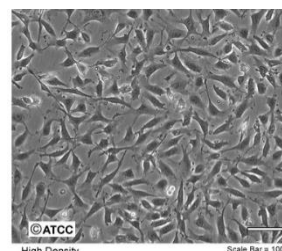
HEPG2-C3A (ATCC CRL-10741)

Esta línea celular deriva 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. En este trabajo utilizamos el clon C3A como modelo de hepatocitos tumorales.



EA.hy926 (ATCC CRL-2922)

La línea celular se estableció como una fusión de la línea primaria de vena umbilical humana (HUVEC) con un clon de la línea A549 (carcinoma epitelial de pulmón) resistente a tioguanina exponiéndola a poieltilenglicol (PEG). Los híbridos fueron seleccionados por la presencia del antígeno relacionado al factor VIII. Mediante microscopía electrónica se observa una distribución citoplasmática de cuerpos de Wiebel-Palade y organelas tejido-específicas, características de células endoteliales diferenciadas involucradas en angiogénesis, presión arterial e inflamación. Esta línea se utilizó como célula endotelial humana no asociada a tumor hepático.



2.2 Cultivo y preservación de células

Las líneas celulares utilizadas se cultivaron en medio esencial Dulbecco (DMEM) rico en glucosa (25 mM) (*Gibco-Invitrogen Life Technologies*, Estados Unidos) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Natocor, Argentina) al 10 % inactivado por calor, conteniendo penicilina 50 U/ml y estreptomycin 50 µg/ml. Las células se mantuvieron en estufa de cultivo a 37°C en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂.

Las células se subcultivaron 2 o 3 veces por semana para mantener la sincronización celular y evitar el exhaustamiento del medio de cultivo. Para ello se aspiró el medio de la botella de 25 cm² conteniendo las células, se lavó la monocapa subconfluente con *buffer* de fosfatos salino (PBS, 10 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM) y, en el caso de las líneas celulares endoteliales, se incubó con 300 µl de una solución de tripsina al 0,05 % (p/v) durante 2 minutos a temperatura ambiente. En el caso de las células de hepatocarcinoma HEPG2, la monocapa se incubó con 400 µl de la solución de tripsina al 0,05 % (p/v) durante 5 minutos a 37 °C. Luego, las células se resuspendieron en medio DMEM con SFB al 10 %. El número de células viables se determinó mediante el ensayo de exclusión del colorante vital Azul de Tripán al 0,4 % (p/v) y el recuento se realizó utilizando una cámara de Neubauer, siendo la viabilidad en todos los casos mayor al 95 %. A continuación, se realizó la siembra de las células en la dilución óptima en botellas de cultivo de 25 cm² en un volumen final de 5 ml: 3 x 10⁵ células endoteliales y 1 x 10⁶ células HEPG2.

Las líneas celulares fueron conservadas mediante criopreservación. Para ello, se partió de cultivos en fase exponencial de crecimiento (50-60 % de confluencia). Las células se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos (Gelec G-142, Argentina) luego de su cosecha, se resuspendieron en SFB-dimetilsulfóxido (DMSO) (9:1) y se alicuotaron en criotubos. Los mismos se almacenaron 24 horas en isopropanol a -70 °C (Mr. Frosty®, Nalgene, Estados Unidos) para permitir un descenso gradual de la temperatura y evitar la formación de cristales de agua intracelulares. A continuación, se transfirieron y conservaron en nitrógeno líquido (-180 °C).

Para un descongelamiento eficiente, los criotubos se mantuvieron en baño a 37 °C durante un minuto y se diluyeron en 5 ml de medio DMEM fresco conteniendo SFB al 20 %. Una vez adheridas las células, se realizó un cambio completo de medio para eliminar el DMSO.

La manipulación de las líneas celulares, así como la preparación de medios de cultivo y tratamientos de las células, se realizaron en condiciones de esterilidad trabajando en flujo laminar con bioseguridad de segundo nivel.

2.3 Determinación y eliminación de micoplasmas

Dado que los cultivos celulares contaminados con micoplasmas pueden presentar cambios morfológicos, bioquímicos, antigénicos y genéticos e interferir en los

experimentos realizados [311], se realizaron chequeos periódicos para confirmar la ausencia de los mismos mediante tinción de material genético utilizando Hoechst 33528 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Brevemente, las células se sembraron en baja densidad ($20 \times 10^3 - 40 \times 10^3$) sobre cubreobjetos durante 24 horas para su completa adhesión. Luego se añadió, sin desechar el medio de cultivo, el fijador Carnoy (metanol: ácido acético glacial, relación 3:1) durante 2 minutos. A continuación, se descartó el sobrenadante y se incubó durante otros 5 minutos con fijador Carnoy. Luego del lavado con PBS, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos utilizando el reactivo 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO, Fluka, Alemania) y se sellaron. Las células se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Nikon TE-200).

La tinción positiva se evidenció por la presencia de marca fluorescente en regiones extranucleares. En dichos casos, y en células con bajo número de pasajes, se realizó un tratamiento con plasmocin (InvivoGen, Francia) 25 $\mu\text{g/ml}$ durante 2 semanas.

3. Obtención de línea celular SK-HEP-1 con disrupción génica de CD13

Para algunos ensayos biológicos de pérdida de función de CD13 y para evaluar su interacción con Gal-1 se llevó a cabo la edición génica de *ANPEP/CD13* en las células SK-HEP-1 mediante el sistema CRISPR/CAS9 [312], [313]. Se utilizó el plásmido *CD13 Double Nickase Plasmid* (h) (Santa Cruz sc-401095-NIC) que consiste en un par de plásmidos que codifican para la nucleasa Cas9 mutada D10A y un ARN guía de 20 nucleótidos (gRNA) diseñados para la disrupción génica de CD13 humana mediada por Cas9 altamente específica que causa una doble mella imitando una ruptura de doble hebra (*double-strand break*) [314]. Cada par de secuencias gRNA está desplazado por aproximadamente 20 nucleótidos para permitir la edición del gen con alta eficiencia y mayor especificidad. Uno de los plásmidos contiene como marcador a la proteína verde fluorescente (GFP) para confirmar la transfección mediante microscopía de fluorescencia. El otro plásmido contiene un gen de resistencia a puromicina, el cual se utilizó para la selección de clones de células SK-HEP-1 KOCD13. A su vez, se obtuvieron células control utilizando el plásmido *Scrambled* (sc-437281) para establecer las células SK-HEP-1 SCRAMBLED.

La transfección de las células con el plásmido se realizó mediante liposomas catiónicos [315] utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Estados Unidos). Para ello se sembraron 9×10^4 células SK-HEP-1, de pasaje menor a 15 y libres de micoplasmas,

en una placa de 24 pocillos en medio de cultivo en presencia de SFB al 10 % y en ausencia de antibiótico, según protocolo descrito en el capítulo 1, sección 2.2, para obtener un 80 % de confluencia a las 24 horas. Al día siguiente se prepararon los lipoplexos incubando 0,5 µg de plásmido y 1,25 µl de Lipofectamina, relación 1:2,5, en medio de transfección (DMEM sin antibiótico (ATB), sin SFB) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, se lavaron las células con medio de transfección y se incubaron con 100 µl de los complejos durante 5 horas. Al finalizar, se realizó un cambio de medio con DMEM con SFB al 10 % para la recuperación celular. Veinticuatro horas post-transfección, las células se cosecharon, diluyeron al décimo y se sembraron en placas de 6 pocillos. Al día siguiente se les cambió el medio por medio fresco conteniendo puromicina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) 0,5 µg/ml. La selección se llevó a cabo a lo largo de 3 semanas con cambios de medio cada 3-4 días hasta la observación de colonias resistentes visibles. Se confirmó la selección de las colonias por su expresión de GFP, observándolas bajo microscopio de epifluorescencia (Nikon TE-200).

Las colonias elegidas se aislaron y cultivaron en superficies progresivamente más grandes hasta la confirmación del *knock-out* por *Western blotting* como se describe en la siguiente sección.

4. Análisis de los niveles de expresión proteica por *Western blotting*

4.1 Extracción de proteínas

Con el fin de evaluar la expresión de las proteínas Gal-1 y CD13 se sembraron 4×10^5 células SK-HEP-1 y EA.hy926, y 1×10^6 células HEPG2 en placas de 35 mm de diámetro y se incubaron a 37 °C. Luego de 24 horas, las células fueron lavadas con PBS frío sobre hielo, y lisadas utilizando la técnica de “*scraping*”, rascando toda la superficie vigorosamente con *tip* amarillo para luego recuperar los restos celulares en 100 µl de *buffer* de lisis conteniendo Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), Tritón X-100 al 1 % (v/v), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, deoxicolato de sodio al 1 % (p/v), dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,1 % (p/v), pirofosfato de sodio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) 100 mM, fluoruro de sodio (NaF) 50 mM, fluoruro de fenilmetil-sulfonilo (PMSF) 2 mM y aprotinina 1 mg/ml. La suspensión se mantuvo en hielo por 45 minutos y se agitó con *vórtex* reiteradas veces para favorecer la lisis celular. Luego, se centrifugó a una velocidad de 12.000 g a 4 °C

durante 10 minutos en una microcentrífuga Sorvall Legend Micro 17 (Thermo Scientific, Estados Unidos) y se recuperó el sobrenadante.

4.2 Determinación de la concentración de proteínas totales

La concentración de proteínas totales se determinó según el método descrito por Bradford [316]. En placas de 96 pocillos con fondo plano se sembraron 5 µl de la muestra a testear (diluciones 1:30 y 1:60) o de la solución de proteína estándar de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), en un rango de concentraciones de 0,02-0,24 mg/ml. Se agregaron 20 µl de agua destilada para una dilución 1:4 y se incubó 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 minutos. La absorbancia en 595 nm se determinó en un lector de placas (BioTek Instruments Inc, Estados Unidos).

4.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para preparar las muestras se disolvieron 25 µg de proteínas totales 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)) para un volumen máximo de 25 µl. Las proteínas se incubaron a 100 °C durante 5 minutos y luego se centrifugaron a 14.000 g durante 1 minuto en una microcentrífuga Sorvall Legend Micro 17.

Además de las muestras, se sembraron proteínas marcadoras de peso molecular pre-teñidas con el colorante Azul Brillante de *Coomassie* (*Precision Plus Protein*, Bio-Rad Laboratorios Inc., Estados Unidos) para su fácil visualización. Las proteínas se resolvieron mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Para ello se utilizó el sistema Mini-Protean 3 (Bio-Rad Laboratorios Inc., 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. Según las proteínas a resolver se emplearon distintos porcentajes de entrecruzamiento de poliacrilamida/bisacrilamida. Para el análisis de CD13 (150 kDa) se utilizó un gel separador al 7,5 %, mientras que para evaluar la expresión de Gal-1 (14 kDa) el mismo fue al 12 %. El gel concentrador se preparó al 4 %. En todos los casos, se utilizó una solución madre conteniendo acrilamida al 29,2 % (p/v) y bisacrilamida al 0,8 % (p/v).

Para Gal-1 se utilizó el sistema de *buffer* Tris-Tricina [317], el cual resuelve mejor las proteínas de peso molecular menor a 20 kDa. Durante la corrida se utilizó un sistema discontinuo de soluciones: *buffer* ánodo (Tris-HCl 200 mM, pH 8,9) en la cuba y *buffer* cátodo (Tris-HCl 100 mM, pH 8,25, Tricina 100 mM, SDS al 0,1 % (v/v)) por dentro de la represa.

Para un gel separador (~5,3 ml) se preparó la siguiente receta: acrilamida/bisacrilamida 12 % (p/v) 2,40 ml; Tris 3 M, pH 8,45, SDS al 0,1 % (p/v) 2 ml; agua destilada 0,80 ml; persulfato de amonio (PSA) al 10 % (p/v) 50 µl y tetrametiletilendiamina (TEMED) 5 µl. El gel concentrador suficiente para 1 gel (~2,6 ml) consistió en: acrilamida/bisacrilamida 4 % (p/v) 0,33 ml; Tris 3M, pH 8,45 SDS al 0,1 % (p/v) 0,62 ml; agua destilada 1,55 ml; PSA al 10 % (p/v) 30 µl y TEMED 3 µl.

En el caso de proteínas de alto peso molecular como CD13 se utilizó el sistema de un único *buffer* Tris-Glicina (Tris 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM, SDS al 0,1 % (p/v) durante la corrida (Laemmli, 1970).

Un solo gel separador (~5 ml) está compuesto por: acrilamida/bisacrilamida 7,5 % (p/v) 1,23 ml; Tris 1,5M, pH 8,8 1,3 ml; agua destilada 2,43 ml; PSA al 10 % (p/v) 20 µl y TEMED 5 µl.

Para preparar 1 gel concentrador (~2,7 ml) en el sistema *Laemmli* se utilizó la siguiente receta: acrilamida/bisacrilamida 4 % (p/v) 0,42 ml; Tris 0,5M, pH 6,8 0,63 ml; agua destilada 1,66 ml; PSA al 10 % (p/v) 30 µl y TEMED 3 µl.

Las corridas electroforéticas se desarrollaron a temperatura ambiente utilizando un voltaje constante de 50 V hasta que el frente de corrida alcanzó el gel separador. Luego, el voltaje se incrementó a 100 V.

4.4 Electrotransferencia e inmunodetección

Posterior a la corrida electroforética, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando el sistema de transferencia Mini-TransBlot (Bio-Rad) [319]. Todos los componentes del sistema fueron equilibrados en *buffer* de transferencia (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM, metanol al 20 % (v/v)). La transferencia se realizó aplicando un voltaje constante de 100 V durante 1 hora utilizando un refrigerante en la cuba y en agitación constante. A continuación se bloquearon los sitios de unión inespecíficos en la membrana por incubación con leche descremada al 5 % (p/v) en TBS (*buffer* Tris-HCl 10 mM, pH 8,

NaCl 150 mM). Seguido de este paso se añadieron los anticuerpos primarios en las diluciones correspondientes (Tabla 1) realizadas en la misma solución de bloqueo, y se incubó durante toda la noche a 4 °C y en agitación constante. Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces durante 15 minutos en abundante *buffer* TBS-Tween (Tween-20 al 0,1 % (v/v) en TBS) para luego incubar con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 2) conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (*Horseradish peroxidase*, HRP) diluido en solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante. Se realizaron 3 lavados con *buffer* TBS-Tween y finalmente otro lavado con *buffer* TBS para evitar la interferencia del surfactante con los reactivos del revelado.

Las bandas se detectaron con el *kit* de quimioluminiscencia ECL (Pierce Biotechnology, Estados Unidos) mediante una cámara refrigerada para la obtención de imágenes de quimioluminiscencia *ImageQuant LAS 500 system* (GE Healthcare, Estados Unidos). Para ciertos ensayos en los que se requirió mayor sensibilidad se utilizó el equipo *Sapphire* (Azure Biosystems, Estados Unidos).

La cuantificación de los niveles de proteína se llevó a cabo mediante el análisis densitométrico de la banda de interés respecto a la proteína utilizada como control de carga utilizando el software *ImageJ* versión 1.51j8 (*National Institutes of Health*, Estados Unidos).

TABLA 1: ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS EN ENSAYOS DE *WESTERN BLOTTING*

Antígeno	Tipo y origen	Fabricante	Código	Dilución
Gal-1	Policlonal, conejo	Dras. Nilda Fink y Mariana González (Universidad Nacional de La Plata).		1:4000 (para lisados de células SK-HEP-1 y EA.hy926) 1:1000 (para lisados de células HepG2)
CD13	Monoclonal, ratón	Santa Cruz Biotechnology	Sc-166105	1:200 (para lisados de células SK-HEP-1 y EA.hy926) 1:100 (para lisados de células HepG2)
GAPDH	Monoclonal, conejo	Abcam	Ab128915	1:8000

TABLA 2: ANTICUERPOS SECUNDARIOS UTILIZADOS EN ENSAYOS DE *WESTERN BLOTTING*

Antígeno	Tipo y origen	Fabricante	Código	Dilución
IgG conejo	Cabra-HRP	Sigma-Aldrich	A0545	1:10000
IgG ratón	Cabra-HRP	Santa Cruz Biotechnology	sc-2005	1:5000
IgG ratón	Caballo-HRP	Cell Signaling Technology	7076	1:8000

Capítulo 2

1. STRING

La plataforma *online* STRING (<https://string-db.org/>) es una base de datos que sistemáticamente recolecta e integra interacciones físicas proteína-proteína y asociaciones funcionales. La información se obtiene de distintas fuentes como minería de texto automática de la literatura científica, predicciones computacionales derivadas de la co-expresión, contexto genómico conservado, bases de datos de experimentos de interacción y vías de señalización compartidas conocidas de fuentes curadas. Toda esta información es evaluada y se le asigna un puntaje entre 0 y 1 a cada par de interacción y por lo tanto, un nivel determinado de confianza [238].

En este trabajo, la búsqueda se realizó en la solapa “*Search*” para ambos genes evaluados (*LGALS1* y *ANPEP*) y se aplicaron las siguientes restricciones en la solapa “*settings*”: *Network type* (tipo de red): *physical subnetwork* (las conexiones entre nodos indican que las proteínas forman parte de un complejo físico, sin implicar asociaciones funcionales); *meaning of network edges* (significado de líneas de conexión): *confidence* (el grosor de las líneas indica el nivel de confianza); *minimum required interaction score* (puntaje mínimo requerido): *medium confidence* (valor medio de 0,400); *max number of interactions to show* (máximo de interacciones a mostrar): 50. Luego, la información más detallada de la red se obtiene en la solapa “*Analysis*”.

2. Ensayo de co-inmunoprecipitación

2.1 Lisado de células SK-HEP-1

Las células SK-HEP-1 ($2,5 \times 10^7$) se cosecharon con PBS-EDTA 1 mM para preservar las proteínas de membrana, luego se lavaron (300 g, 5 minutos), se resuspendieron en un *buffer* de solubilizado (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-pireracíniletanosulfónico (HEPES) 100 mM, pH 7,4, Tritón X-100 al 1 %, pirofosfato de sodio decahidratado 100 mM, NaF 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sodio activado 10 mM, PMSF (fluoruro de fenilmetil-sulfonilo) 2 mM, aprotinina 1 mg/ml), y se lisaron en una jeringa 10 veces. Luego de vortexear, se incubó 45 minutos en agitación a 4 °C y se centrifugó 1 hora a 15000 g a 4 °C (Eppendorf Centrifuge 5415R,

Estados Unidos). Luego, se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford como se detalló en el capítulo 1 de la sección de Materiales y Métodos.

2.2 Incubación con el anticuerpo inmunoprecipitante

Los lisados celulares se incubaron con un anticuerpo inmunoprecipitante anti-Gal-1 1:50 toda la noche en agitación circular a 4 °C. Al día siguiente se agregó la matriz de proteína A-agarosa (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) (20 µl cada 200 µl de lisado) diluida en el *buffer* de solubilizado al 50 % (v/v), previamente bloqueada con una solución de BSA al 3 %. Las muestras se incubaron durante 2 horas en agitación circular a 4 °C, luego se centrifugó a baja velocidad (500 g) y se eliminó el sobrenadante.

2.3 Acondicionamiento de muestras para el ensayo de *Western blotting*

Para el acondicionamiento, los precipitados obtenidos (como se describió en el ítem anterior) se lavaron 3 veces con 200 µl de *buffer* de solubilizado, se resuspendieron en 50 µl de *sample buffer* 2x, se hirvieron durante 10 minutos, se centrifugaron y recuperó el sobrenadante. A continuación se procedió con el protocolo correspondiente de *Western blotting*, detallado en el capítulo 1 de la sección de Materiales y Métodos.

3. Obtención de Gal-1 recombinante humana

3.1 Transformación y expresión de Gal-1 en bacterias

Gal-1 es una proteína que no sufre modificaciones post-traduccionales ni posee plegamientos complejos por lo que resulta una candidata ideal para ser expresada en bacterias. En este trabajo, se expresó en forma heteróloga y se purificó la lectina Gal-1 recombinante (rGal-1) de origen humano, según el protocolo previamente puesto a punto en el grupo de investigación[320][117]. Se utilizó la cepa BL21 de *Escherichia coli* BL21.DE3, la cual se transformó por *shock* térmico para introducir el plásmido pT7IML-1-*LGALS1* con resistencia a ampicilina. Para esto, las bacterias se cultivaron en medio Luria Bertoni (LB: triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) y se hicieron competentes, es decir, aptas para recibir el ADN exógeno. Para ello, se incubó una alícuota de bacterias creciendo en fase logarítmica temprana (densidad

óptica, DO_{600nm} : 0,6) en una solución de $CaCl_2$ 0,1 M a 4 °C durante 1 hora. Luego, se adicionó el plásmido en una concentración de 0,5 $\mu g/\mu L$ a las bacterias, en una relación 1:100, y se incubó durante 30 minutos en hielo, luego durante 45 segundos en baño a 42 °C y otros 2 minutos nuevamente en hielo. Para la recuperación de las bacterias se agregó un medio rico SOC (LB 15 g/L; $MgCl_2$ 0,01 M; glucosa 0,02 M) y se incubó en estufa a 37 °C en agitación por 1 hora.

Las bacterias transformadas se seleccionaron mediante su incubación en placas con medio nutritivo LB y agar, conteniendo ampicilina en una concentración final de 100 $\mu g/\mu L$, durante toda la noche a 37 °C. Para la expresión de la lectina se utilizaron colonias resistentes a la ampicilina, las cuales se cultivaron en medio LB toda la noche en agitación a 37 °C. Luego se realizó una dilución con medio fresco LB-ampicilina y se incubó por 1 hora, también a 37 °C en agitación. A continuación se realizó la inducción de la expresión proteica con isopropil-tiogalactósido (IPTG) (Promega, Estados Unidos) en una concentración final de 0,1 mM durante 3 horas en agitación a 37 °C, seguido de otra incubación por 1 hora a 27 °C para favorecer el correcto plegamiento de las proteínas. Al finalizar este paso, el cultivo bacteriano se centrifugó durante 20 minutos a 3500 g, a 4 °C, en una centrífuga Sorvall RC-5C PLUS. El precipitado se resuspendió en *buffer* de sonicado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, ditiotreitól (DTT) 2 mM, PMSF 2 mM). El agente reductor DTT impide la oxidación de los grupos sulfhidrilos de los residuos de cisteínas de Gal-1, conservando así su actividad. Por ello, este reactivo se utilizó en todos los pasos subsiguientes de manipulación de la lectina.

3.2 Purificación de rGal-1 en columna de lactosa-agarosa

El precipitado de bacterias transformadas y resuspendido en *buffer* de sonicado, según se describió en ítem anterior, se sometió a sonicación de 3 ciclos de pulso al 20 % de la potencia máxima durante 3 minutos cada uno en hielo, y 3 minutos de descanso, para evitar la desnaturalización de las proteínas por calor. Se utilizó un sonicador Branson Sonifier 450 (Branson Ultrasonics, Estados Unidos). La muestra se centrifugó a 10.000 g durante 1 hora a 4 °C en una centrífuga Sorvall RC-5C PLUS para eliminar los restos celulares que podrían interferir u obstruir en los siguientes pasos.

rGal-1 se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando una matriz de lactosa-agarosa (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) en columna, aprovechando su

afinidad a través del DRC por los azúcares β -galactósidos. La columna se equilibró con un *buffer* DEPBS (PBS pH 7,4, EDTA 2 mM, DTT 2 mM), y en la misma se sembró el sobrenadante obtenido a partir del extracto bacteriano, a flujo lento y en cámara fría. Este procedimiento se repitió 3 veces. La elución se realizó con DEPBS conteniendo lactosa 100 mM. Las fracciones eluidas fueron concentradas por filtración utilizando filtros Amicon Ultra-15, con un tamaño de poro de 10 kDa (Millipore Corporation, Estados Unidos) y diluídas en DEPBS-Lactosa hasta alcanzar una concentración de rGal-1 máxima de 2 mg/ml para evitar agregaciones proteicas.

3.3 Eliminación de endotoxinas

Las proteínas recombinantes obtenidas utilizando como huéspedes de expresión a bacterias Gram negativas contienen restos de lipopolisacáridos (LPS), componentes principales de la membrana celular externa. Estos restos de LPS producen una fuerte reacción pro-inflamatoria y tóxica en mamíferos, por lo que deben ser eliminados (Bryant, 2010). Para ello se utilizó la técnica de cromatografía de afinidad utilizando una columna de polimixina B-agarosa (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) [322]. Se equilibró la columna con DEPBS-Lactosa 100 mM y se sembró la muestra a flujo lento. A continuación, se eluyó con DEPBS-Lactosa 100 mM. Luego se determinó la concentración de proteínas en las fracciones eluidas, las cuales se combinaron y concentraron como se indicó en el capítulo 1.

3.4 Control de pureza e integridad de rGal-1

La pureza de la fracción obtenida se analizó por SDS-PAGE al 12 % (técnica descrita en el Capítulo 1 de Materiales y métodos) sembrando 0,5; 1 y 2 μ g de rGal-1 en las calles del gel. Al finalizar la corrida, el gel se incubó toda la noche con una solución de tinte (*Coomassie Brilliant Blue* R-250 al 0,125 % (p/v), en metanol al 50 % (v/v) y ácido acético glacial al 10 % (v/v)) a temperatura ambiente. El gel fue luego desteñido en una solución de ácido acético glacial al 12 % (v/v) y metanol al 50 % (v/v), hasta decolorar el fondo y observar las bandas nítidamente.

3.5 Control de actividad de lectina de rGal-1

Se evaluó la actividad biológica de rGal-1 purificada mediante un ensayo de aglutinación de eritrocitos de conejo tripsinizados y fijados con glutaraldehído [323]. Brevemente, en una placa de 96 pocillos de fondo curvo se realizaron diluciones seriadas, al medio, de rGal-1 en un *buffer* PBS conteniendo DTT 1 mM en un volumen final de 25 μ l. A cada pocillo se le agregaron 25 μ l de BSA al 1 % en PBS (p/v) y luego 25 μ l de una suspensión de glóbulos rojos al 2,5 % en PBS (v/v). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se consideró como título a la inversa de la máxima dilución de la lectina que mostró aglutinación visible.

3.6 Acondicionamiento de rGal-1 para ensayos

Las fracciones de rGal-1 purificadas se conservaron a -20 °C, en alícuotas, y en presencia de lactosa 100 mM para mantener su estructura y actividad, y evitar la formación de agregados y su precipitación. Al momento de utilizar la proteína en los ensayos, una alícuota se dializó utilizando una membrana de poros de 0,22 μ m de diámetro Ultrafree-MC (Millipore Corporation, Estados Unidos), contra PBS DTT 1 mM, a 4 °C en agitación. La diálisis se repitió un total de 3 veces, realizando una dilución de 1/1000 cada vez. Para los experimentos en líneas celulares, la muestra fue filtrada a través de tubos Amicon Ultra con un poro que retiene hasta 10 kDa (Millipore, Irlanda) para su esterilización y utilizada inmediatamente.

4. Enriquecimiento de CD13

Con el objetivo de realizar el ensayo de RPS y *Far Western blot* para evaluar la interacción directa entre Gal-1 y CD13 se obtuvo una fracción enriquecida en proteínas de membrana con afinidad por Gal-1, tanto de células SK-HEP-1 SCRAMBLED como de células KOCD13. En ambos casos se partió de un mismo número de células (170×10^6) y se utilizó el protocolo que se detalla a continuación:

4.1 Extracción de proteínas de membrana

Se cosecharon monocapas confluentes de células SK-HEP-1 SCRAMBLED y KOCD13 utilizando PBS-EDTA 1 mM para proteger la integridad de las proteínas de membrana. Las células se lavaron con PBS y centrifugaron a 800 g durante 5 minutos

en una centrífuga Gelec G-142 (Gelec, Argentina), tomando una alícuota para determinar el número de células en cámara de Neubauer, como se describió en el capítulo 1. Los precipitados celulares se almacenaron a -20 °C hasta la extracción proteica. Una vez reunido el número de células requerido, se colectaron todos los precipitados y se resuspendieron en 3 ml de *buffer* de lisis (Tris 20 mM pH 7,4, PMSF 1 mM y aprotinina 1 mg/ml) durante 1 hora en hielo, utilizando el vórtex reiteradas veces. A continuación, se sonicaron las muestras utilizando un equipo Branson Sonifier 450 (Branson Ultrasonics, Estados Unidos) realizando 3 ciclos al 20 % de potencia total durante 15 segundos con 1 minuto de descanso entre los ciclos. Luego se centrifugaron las muestras a 1000 g durante 10 minutos a 4 °C (centrífuga Eppendorf, Estados Unidos). Los sobrenadantes se sometieron luego a ultracentrifugación (Beckman Optima XL-90, Estados Unidos) a 40000 g, 1 hora, 4 °C para obtener las membranas celulares. Los precipitados fueron resuspendidos en 500 µl de *buffer* de lisis conteniendo Tritón X-100 al 0,5 % y se incubó toda la noche en agitación circular a 4 °C para solubilizar las proteínas de membrana.

Al día siguiente se ultracentrifugó nuevamente la muestra (40000 g, 30 minutos, 4 °C) y se diluyó el sobrenadante con *buffer* de lisis sin Tritón-100 hasta una concentración final de 0,1 % (dilución 1/5). Luego, se determinó la concentración de proteínas de membrana por el método de Bradford (Capítulo 1, sección 3.2) realizando una curva de calibración con BSA conteniendo Tritón X-100 al 0,1 % para evitar distorsiones en los valores debido al surfactante.

4.2 Preparación de la matriz de afinidad rGal-1 agarosa

Para aislar proteínas de membrana con afinidad por Gal-1 se utilizó una matriz de agarosa a la cual se le acopló covalentemente la proteína recombinante obtenida según se describió en el ítem 3 de esta sección. Para ello se utilizó Affi-Gel 15 (gel de agarosa entrecruzado, derivatizado con ésteres de *N*-hidroxisuccinimida, Bio-Rad), que permite el acoplamiento de alta afinidad de cualquier ligando que posee un grupo amino primario, formando amidas con los ésteres de la matriz. El pH a utilizar debe ser entre 3 y 10 y el punto isoeléctrico del ligando a unir, menor a 6,5. Gal-1 posee un *pI* = 5,33. Para el acople se dializaron 4 mg de rGal-1 contra *Buffer* A (HEPES 20 mM pH 7,2, DTT 2 mM), realizando una dilución 1/1000, durante toda la noche a 4 °C en agitación. Se lavó 1 ml de matriz Affi-Gel 15 con agua MilliQ 3 veces centrifugando a 1000 g

durante 30 segundos y se resuspendió en *Buffer A*. Se diluyó al medio con los 4 mg de rGal-1 dializada y se incubó 4 horas en agitación circular a 4 °C para permitir la unión de la lectina a la matriz. La eficiencia del acople se monitoreó mediante la cuantificación de proteínas en alícuotas tomadas antes y después del acople, siendo mayor al 95 %. La matriz se empaquetó en una columna y se almacenó en *Buffer A*, en agitación circular toda la noche, para permitir la inactivación de los sitios reactivos libres de la matriz.

Al día siguiente se lavó la columna con 10 volúmenes de las siguientes soluciones en el siguiente orden: *Buffer A*; PBS; PBS-DTT 2 mM; PBS-DTT 2 mM conteniendo lactosa 100 mM, Tritón X-100 al 0,1 % (v/v); y finalmente con PBS-DTT 2 mM, Tritón X-100 al 0,1 % (v/v).

4.3 Purificación de receptores de membrana de Gal-1 por cromatografía de afinidad

A continuación, la fracción de membrana (obtenida como se describió en el ítem 4.1) se sembró a flujo lento reciclando 3 veces y se dejó en incubación circular toda la noche a 4 °C. El lavado se realizó con PBS-DTT 2 mM, Tritón X-100 al 0,1 % (v/v); se recogieron fracciones y se midió la absorbancia en 280 nm hasta que la misma fuera idéntica al blanco. Las proteínas de membrana retenidas en la columna se eluyeron con PBS-DTT 2 mM conteniendo lactosa 100 mM y Tritón X-100 al 0,1 % (v/v) en fracciones de 500 µl. Se determinó la concentración de proteínas utilizando el método de Bradford (Capítulo 1, sección 2.2).

5. Ensayo de *Far Western blotting*

Una fracción enriquecida en receptores de membrana con afinidad por Gal-1 (10 µg de proteínas) disuelta en *sample buffer* 2x, sin hervir, se sembró en un gel al 7,5 %. La corrida se realizó utilizando el sistema Laemmli y las proteínas se electrotransfirieron luego a una membrana de PVDF, como se detalla en el capítulo 1, secciones 3.2 y 3.3 de Materiales y Métodos. La membrana se incubó 1 hora en una solución TBS-BSA al 3 % y a continuación se incubó toda la noche con una solución de rGal-1 1 µg/ml en TBS. La membrana se lavó intensivamente durante 1 hora con TBS-*Tween* al 1 %, 3 veces, y se volvió a incubar toda la noche con el anticuerpo primario anti-Gal-1 en dilución 1:7000. Al día siguiente se incubó con el anticuerpo secundario

correspondiente en dilución 1:10000. Se reveló con una solución conteniendo 13 ml de Tris-HCl pH 7.4, 3 ml de 4-cloro-1-naftol (3 mg/ml en metanol) y 12 μ l H₂O₂ al 30 % (p/v) frío. La membrana fue incubada hasta visualizar las bandas de interés y se detuvo la reacción lavando las membranas con agua destilada.

6. Ensayo de Resonancia Plasmónica de Superficie (RPS)

La técnica de RPS permite evaluar la interacción entre dos moléculas en tiempo real. En este trabajo fue utilizada para confirmar la interacción física y directa entre Gal-1 y su novedoso ligando CD13 aislado de las células SK-HEP-1. La técnica se desarrolló en colaboración con la Dra. Marisa Fernández (Instituto de estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU), Facultad de Farmacia y Bioquímica (FFYB, UBA) utilizando un equipo Biacore T100 (GE Healthcare, Estados Unidos) (Fernández et al., 2007; 2011). Brevemente, una molécula ligando es inmovilizada en la superficie de un *chip* sensor y otra molécula, llamada analito se hace fluir en solución. Se hace incidir un haz de luz polarizada sobre el sensor donde ocurre un fenómeno de deslocalización de electrones libres sobre el metal (resonancia plasmónica) y se puede medir el ángulo de la luz reflejada como unidades de respuesta (UR) graficándose en un sensograma, o gráfico de respuesta, en función del tiempo. En el *software* Biacore se registra la equivalencia de: 1 UR = 1 pg/mm². El ligando unido al *chip* posee una determinada señal de respuesta que se toma como blanco, al inyectar en solución el analito puede haber una unión y el ángulo de incidencia de la luz reflejada detectada cambiará en base al tamaño y forma del complejo aumentando las UR.

En este trabajo utilizamos a rGal-1 como analito, obtenida como se explicó en el ítem 3 de esta misma sección. Suponíamos que la interacción entre la lectina y su receptor ocurre a través del reconocimiento de las glicosilaciones de CD13 por el DRC de Gal-1. Por ello consideramos de suma importancia obtener a la proteína CD13 endógena de las células SK-HEP-1, con el patrón de glicosilación característico de esta línea celular, de origen endotelial y tejido hepático tumoral. Para ello realizamos el aislamiento de CD13 tal cual se describió en el ítem 5 de esta misma sección. Además obtuvimos una fracción de proteínas de membrana (eluato) a partir de las células SK-HEP-1 KOCD13 para utilizar como blanco.

La fracción conteniendo a CD13 proveniente de las células SK-HEP-1 SCRAMBLED se inmovilizó sobre un *chip* CM5 (con una superficie de oro resonante

modificada con carboximetil dextrano para la unión del ligando) (Biacore AB, Suecia). Para ello, CD13 en una concentración 2 mg/ml se diluyó 20 veces en un *buffer* acetato de sodio, pH 4,5 y se inmovilizó covalentemente sobre la *Flow cell* 2 (Fc2) del *chip*, empleando química de aminas. Los grupos reactivos de carboximetil dextrán libres fueron bloqueados con etanolamina. Como blanco de reacción se empleó un eluato obtenido de la misma manera que el anterior, pero proveniente de la línea celular que no expresa CD13 (KOCD13). Este eluato se inmovilizó sobre la Fc1 del *chip* empleando el mismo procedimiento que para Fc2. Sobre las Fc1 y Fc 2 se hicieron flujir diluciones seriadas al medio de rGal-1 en el rango de 0,075 a 20 μ M en PBS-DTT por 30 segundos, con un tiempo de disociación de otros 30 segundos. La regeneración de la superficie se llevó a cabo con el mismo *buffer* de corrida. En el tiempo estipulado para el ensayo se alcanzó la saturación del sistema para cada concentración empleada, lo que permitió realizar el cálculo de la Constante de Disociación del sistema o K_D bajo estado estacionario (SSA, en el gráfico es la máxima respuesta constante para cada concentración), realizando el ajuste no lineal de la Respuesta Máxima en función de la concentración, determinada en RU. Como control positivo se utilizaron diluciones seriadas de rGal-3 en el rango de 0,075 a 2 μ M.

Además, se determinó la dependencia de glicanos en las interacciones, midiendo el efecto de azúcares que compiten por el DRC de las galectinas como lactosa (1 mM) y un azúcar no relacionado como sacarosa (1 mM). Las determinaciones fueron realizadas al menos 3 veces y los datos analizados utilizando el programa “*Biacore Evaluation 2.0.1*”.

Capítulo 3

1. Sobreexpresión de Gal-1 en la línea celular HEPG2

Se sembraron 3×10^5 células HEPG2, de pasaje menor a 30 y libres de contaminación con micoplasmas, en una placa de 24 pocillos en medio de cultivo rico en suero para obtener un 90 % de confluencia luego de 24 horas, según el protocolo descrito en el capítulo 1. Al día siguiente se prepararon 2 soluciones: 0,8 μg de plásmido pcDNA3.1-*LGALS1*, gentilmente donado por el Dr. Gabriel Rabinovich, diluidos en medio de transfección (DMEM en ausencia de suero y antibiótico) para un volumen final de 50 μl y 2 μl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Estados Unidos) diluidos en medio de transfección para un volumen final de 50 μl . Ambas soluciones se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, las mismas se mezclaron para formar los lipoplexos, en una relación ADN/lipofectamina 1:2,5, los cuales se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron con medio de transfección y se incubaron con 100 μl de los lipoplexos durante 5 horas. Al finalizar dicho tiempo de incubación, se realizó un cambio de medio con DMEM conteniendo SFB al 10 % para la recuperación celular. Veinticuatro horas post-transfección se diluyeron las células al décimo y se sembraron en placas de 6 pocillos. Al día siguiente se les cambió el medio por uno conteniendo el antibiótico de selección G418 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) 700 $\mu\text{g}/\text{ml}$, concentración seleccionada luego de realizar una curva de viabilidad celular mediante el ensayo de MTT explicado en la sección 2 de este mismo capítulo para determinar la menor concentración de antibiótico necesaria para eliminar el total de las células no transfectadas. La selección se llevó a cabo a lo largo de 3 semanas con continuos cambios de medio hasta la observación de colonias resistentes visibles. Las colonias elegidas se aislaron, se amplificaron y se confirmó la sobreexpresión de Gal-1 por *Western blotting*, como se describió en el capítulo 1. Estas células se denominaron HEPG2-GAL. Como control, se utilizaron células transfectadas con el plásmido pcDNA3.1 sin inserto (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), las células se denominaron HEPG2-MOCK).

2. Ensayo de adhesión heterotípica

Con el fin de estudiar el efecto de la proteína de membrana CD13 en la adhesión de hepatocitos tumorales a CESHs se utilizaron monocapas confluentes de células SK-HEP-1 *wild type* (WT), células transfectadas con plásmido control *scrambled* (SCR) y con ARN guía para disrupción génica del gen CD13 (KOCD13), tal como se detalla en el capítulo 1 de la sección de Materiales y Métodos. Para ello se sembraron 8×10^3 células SK-HEP-1 WT, KOCD13 y SCR en una placa de 96 pocillos e incubaron durante 72 horas en medio completo (conteniendo SFB al 10 %) a 37 °C para alcanzar monocapas completas y uniformes.

Las células HEPG2 derivadas de un carcinoma hepatocelular humano se cosecharon utilizando PBS-EDTA 1 mM para proteger la integridad de las proteínas de membrana. A continuación, se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos, se contaron con Azul de Tripán y, $4,8 \times 10^4$ células se resuspendieron en 50 μ l de *buffer* HEPES 20 mM pH 7,4 NaCl 130 mM, KCl 4,7 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, MgSO_4 1,2 mM; CaCl_2 1,5 mM y calceína AM verde (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) para una concentración final de 2 μ M. Las células se incubaron 1 hora en agitación circular a temperatura ambiente, luego se centrifugaron y resuspendieron en *buffer* HEPES.

Seguidamente, se retiró el medio de cultivo de las monocapas de células endoteliales y sobre ellas, se sembraron 100 μ l de los hepatocitos cargados con calceína AM verde. Se incubó la placa en oscuridad, en estufa a 37 °C durante 30 minutos. A continuación se retiraron las soluciones y se lavó suavemente con medio HEPES, 2 veces. Las células se mantuvieron en este mismo *buffer*, los hepatocitos tumorales se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX83, Japón), mientras que la monocapa de células endoteliales se observó con luz blanca. El éster acetoximetilo (AM) del fluorocromo, al ingresar a las células es clivado por esterasas intracelulares, lo que permite la fluorescencia verde y la retención dentro del citoplasma. Para su detección la muestra fue excitada con una longitud de onda (λ_{ex} 494 nm) y detectada con un filtro de emisión (λ_{em} 517 nm). Se tomaron microfotografías (con luz blanca y fluorescencia) de 12 campos por pocillo a partir de las cuáles se determinó el número de células HEPG2 adheridas a las monocapas de células SK-HEP-1 WT, SCR y KOCD13 y se relativizó al control WT.

2.1 Ensayo de adhesión heterotípica con células de CHC que sobreexpresan Gal-1

Con el objetivo de estudiar el efecto de la sobreexpresión de Gal-1 en la adhesión de hepatocitos tumorales a CESHs y la interacción con el receptor CD13, se utilizaron las células transfectadas HEPG2-GAL y HEPG2-MOCK con el mismo protocolo explicado en la sección previa sobre monocapas confluentes de células SK-HEP-1 SCR y KOCD13. Relativizando a la condición control (células HEPG2-MOCK sobre monocapas de células SK-HEP-1 SCR).

3. Disminución de la expresión de Gal-1 en la línea celular SK-HEP-1

Para algunos ensayos biológicos de pérdida de función se llevó a cabo el silenciamiento de la proteína Gal-1 en células SK-HEP-1 mediante transfección con el sistema *short hairpin* ARN (shARN) [326]. La transfección del plásmido se realizó utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Estados Unidos). Para ello se sembraron 9×10^4 células SK-HEP-1 de pasaje menor a 20 y libre de micoplasmas en una placa de 24 pocillos en medio rico de cultivo, según el protocolo descrito en el capítulo 1, para obtener un 80 % de confluencia en el momento de la transfección. Al día siguiente se prepararon los lipoplexos (ADN + lipofectamina) de la siguiente manera: en primer lugar se incubó: solución A: 0,5 µg de plásmido con gen de resistencia a puromicina Galectin-1 shARN Plasmid (human) (Santa Cruz Biotechnology) en medio de transfección (DMEM en ausencia de suero y antibiótico) en un volumen final de 50 µl, y solución B: 1,25 µl de lipofectamina en medio de transfección en un volumen final de 50 µl, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se mezclaron ambas soluciones para una relación de ADN:lipofectamina 1:2,5 y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Como control, se utilizaron células transfectadas con el plásmido shRNA plasmid-A (Santa Cruz Biotechnology), el cual codifica para un shARN *scrambled* cuya secuencia no lleva a la degradación de ningún ARNm conocido. Las células cultivadas desde el día anterior, se lavaron con medio de transfección y se incubaron con 100 µl de los complejos ADN + lipofectamina durante 5 horas. Al finalizar, se realizó un cambio de medio con DMEM con SFB al 10 % para la recuperación celular. Veinticuatro horas post-transfección, las células se cosecharon, diluyeron al décimo y se sembraron en placas de 6 pocillos. Al día siguiente se les cambió el medio de cultivo por medio fresco conteniendo puromicina (Sigma-Aldrich,

Estados Unidos) 0,5 µg/ml, concentración seleccionada luego de realizar una curva de viabilidad celular mediante el ensayo de MTT explicado en la sección 2 de este mismo capítulo. La selección de células transfectadas se llevó a cabo a lo largo de 3 semanas, con continuos cambios de medio hasta la observación de colonias resistentes visibles. Las colonias celulares seleccionadas fueron aisladas, amplificadas y se confirmó luego el silenciamiento de la expresión de Gal-1 por *Western blotting*, como se describió en el capítulo 1. Las células establemente transfectadas se mantuvieron en cultivo utilizando una concentración de mantenimiento de puromicina de 0,3 µg/ml en el medio de cultivo.

4. Ensayo de proliferación celular

Con el objetivo de estudiar los roles de CD13 y Gal-1 en la proliferación de las células SK-HEP-1 se utilizó el ensayo de MTT [327]. En células metabólicamente activas, las enzimas deshidrogenasas mitocondriales son capaces de reducir el compuesto (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (MTT) dando como resultado cristales de formazán, un producto de color violáceo insoluble en agua. Los cristales se disuelven en dimetilsulfóxido (DMSO) y se lee su absorbancia en 570 nm utilizando un lector de placas. Este método permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas como un indicador de viabilidad, siendo ésta proporcional a la cantidad de formazán producido. Además, puede ser utilizado en ensayos de citotoxicidad y en ensayos de proliferación, relativizando la viabilidad celular en un determinado tiempo a la registrada en el tiempo cero. Para la puesta a punto de la técnica se cultivaron las células SK-HEP-1 WT durante 24 horas para su adherencia (t_0) y luego durante otras 24, 48 y 72 horas en medio DMEM conteniendo distintas concentraciones de SFB (0, 2, 5 y 10 %).

Para evaluar los posibles efectos de CD13 y Gal-1 endógenas en la proliferación se sembraron 4×10^3 células SK-HEP-1 en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 y 72 horas en medio de cultivo en presencia de SFB al 2%. A los tiempos indicados se agregaron 10 µl del reactivo MTT y se incubó en estufa a 37 °C durante 2 horas. A continuación, se retiró delicadamente el medio líquido de los pocillos, se colocaron 200 µl de DMSO y se incubaron las placas en agitación durante al menos una hora en oscuridad para facilitar la solubilización de los cristales de formazán. La absorbancia en

595 nm se registró con el lector de placas Biotek (BioTek Instruments Inc, Estados Unidos). Se calculó el porcentaje de proliferación celular como la relación entre la absorbancia a 595 nm al tiempo final considerado (t_f) y la absorbancia medida al tiempo inicial (t_0).

4.1 Ensayo de proliferación celular en presencia de Gal-1 soluble agregada en forma exógena

En estos experimentos se adicionó rGal-1 a las células SK-HEP-1 en concentraciones finales de 0,1, 1, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$, las cuales se incubaron en medio de cultivo en presencia de SFB al 2 % por un período de 72 horas. El vehículo en el que se prepararon las soluciones de rGal-1 fue PBS-DTT 1 mM utilizado como control negativo (concentración final de DTT 0,05 mM). El reactivo DTT resultó tóxico para las células en concentraciones iguales o mayores a 1 mM. Luego se realizó el ensayo de MTT y se calculó el porcentaje de proliferación celular para cada concentración de rGal-1 respecto al vehículo. En algunos experimentos, rGal-1 se pre-incubó con lactosa 100 mM durante 30 minutos.

4.2 Ensayo de proliferación celular con rGal-1 inmovilizada

rGal-1 (10, 20 y 100 mg por pocillo) se inmovilizó en presencia de DTT 0,5 mM en placas de 96 pocillos de fondo plano durante 24 horas a 4 °C. BSA al 0,1 % inmovilizada se utilizó como control negativo. Se realizó un bloqueo con 100 μl BSA al 0,1 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron dos veces con PBS y a continuación, se sembraron 4×10^3 células SK-HEP-1 en medio de cultivo en presencia de SFB al 2 % en cada pocillo. Luego se realizó el ensayo de MTT a t_0 y a las 72 horas y se calculó la proliferación celular sobre rGal-1 inmovilizada respecto de la obtenida con BSA.

5. Ensayo de migración celular

Para poder determinar el efecto de CD13 en la migración de células SK-HEP-1 se utilizó el ensayo de la herida o “*scratch-wound healing assay*”. Las células SK-HEP-1 WT, KOCD13 y SCR (8×10^3) fueron sembradas en placas de 96 pocillos de fondo plano e incubadas durante 72 horas en medio conteniendo SFB al 10 % a 37 °C para

alcanzar la formación de una monocapa completa y asegurarse así una migración uniforme. Se realizó una herida en cada monocapa utilizando un *tip* de 10 μ L estéril. Luego, las monocapas se lavaron con medio DMEM libre de SFB delicadamente para retirar los restos celulares y se incubaron también con medio en ausencia total de SFB. Se tomaron microfotografías (Nikon, Eclipse TE300) al inicio del experimento t_0 y al tiempo final, elegido luego de ensayar distintos tiempos en presencia de SFB al 10 % y ausencia (0 %). Las imágenes fueron analizadas utilizando el *software ImageJ* versión 1.51j8 (*National Institutes of Health*, Estados Unidos), determinándose las áreas de las heridas. El cálculo de porcentaje de cierre de la herida se obtuvo utilizando la siguiente fórmula: Cierre de herida (%) = $(\text{Área } t_f / \text{Área } t_0) \times 100$.

5.1 Ensayo de migración celular con rGal-1 soluble

En los experimentos de migración en los que se utilizó rGal-1, el protocolo debió ser modificado dado que el vehículo (PBS-DTT 1 mM, concentración final del DTT 0,05 mM) resultaba citotóxico para la monocapa de células SK-HEP-1. En este caso, luego de la realización de la herida, las células fueron incubadas con medio DMEM en presencia de SFB al 0,5 % durante 15 horas en estufa a 37 °C. En algunos casos se pre-incubó la lectina con lactosa (100 mM) durante 30 minutos.

Para la elección del tiempo final se realizó un ensayo de migración en presencia de alta concentración de SFB (10 %) y baja (0,5 %) analizado a distintos tiempos luego de realizada la herida.

5.2 Ensayo de migración celular con rGal-1 inmovilizada

Concentraciones crecientes de rGal-1 fueron incubadas en pocillos de fondo plano en placas de 96 pocillos durante 24 horas a 4 °C para su inmovilización. Además, la proteína BSA al 0,1 % fue utilizada como control negativo. Luego, se adicionaron 100 μ L BSA al 0,1 % por pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente para realizar el bloqueo de los sitios inespecíficos. A continuación, los pocillos se lavaron dos veces con PBS y seguidamente se sembraron 8×10^3 células SK-HEP-1 en medio de cultivo en ausencia de SFB, y se procedió como se indicó anteriormente.

6. Ensayo de tubulogénesis

Para evaluar los efectos de Gal-1 y CD13 en la capacidad de las células endoteliales SK-HEP-1 de formar redes tubulares *in vitro* se siguió el siguiente protocolo [328]. Las células SK-HEP-1 se sembraron en placas de 96 pocillos sobre 45 μ l de extracto de membrana basal, libre de endotoxinas y reducido en factores de crecimiento (Geltrex™, ThermoFisher, Estados Unidos), ya que dichos factores podrían estimular la actividad angiogénica y enmascarar los efectos producidos por la lectina y/o la proteasa.

La matriz Geltrex se almacena congelada y debe ser descongelada manteniéndose en heladera (entre 2 y 8 °C) la noche anterior al día del experimento. El gel solidifica luego de 5-10 minutos por encima de los 15 °C, por lo que se debe trabajar sobre hielo, con los *tips* y placas de cultivo previamente enfriadas en *freezer* para evitar la prematura gelificación. De producirse burbujas en la superficie deben ser eliminadas utilizando agujas estériles antes de incubar las placas a 37 °C durante 30 minutos.

Las células se cosecharon utilizando PBS-EDTA 0,5 mM para proteger la integridad de las proteínas de membrana y se sembraron 8×10^3 células por pocillo en 100 μ l de medio DMEM en ausencia de SFB sobre la matriz Geltrex. En los casos en los que se evaluó el efecto de rGal-1 se utilizó como vehículo PBS-DTT 0,05 mM. En ciertos experimentos, rGal-1 se pre-incubó durante 30 min con β -D-galactopiranosil 1-tio- β -D-galactopiranosido (TDG) 20 mM para inhibir su actividad de lectina y prevenir su efecto (concentración final 1 mM).

La tubulogénesis fue evaluada a las 6 horas determinando el número total de mallas de túbulos formadas en cada pocillo como se muestra en la figura 60. Se tomaron microfotografías (Nikon, Eclipse TE300) de distintos campos representativos.

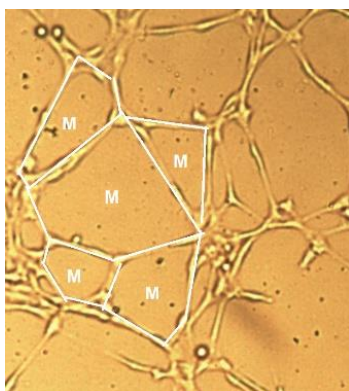


Figura 60. Imagen representativa de las mallas (M) o túbulos cerrados formados por las células SK-HEP-1.

6.1 Disminución de la expresión de CD13 en la línea celular SK-HEP-1 mediante transfección con siRNA

En el capítulo 1 se detalló el protocolo para la disrupción génica de CD13. En el capítulo 3, además de las células KOCD13, se utilizaron células transfectadas con siARN como método alternativo de pérdida de función. Las células SK-HEP-1 (9×10^5 células) fueron sembradas en placas de 24 pocillos en medio DMEM en presencia de SFB al 10 %, sin antibiótico durante 24 horas a 37 °C. Al día siguiente, se transfectaron con el ARN de interferencia CD13 siRNA sc-29960 (Santa Cruz Biotechnology), el cual está diseñado para silenciar específicamente la expresión de esta proteína. Como control se utilizó un ARN de interferencia sin blanco específico (siSCRAMBLED) (Santa Cruz Biotechnology). Para la transfección, los lipoplexos se formaron incubando por un lado, 1,6 µl de una solución *stock* 10 µM del siCD13 en 20 µl de medio de transfección y en otro *eppendorf*, 2 µl de lipofectamina en medio de transfección en un volumen final de 20 µl, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se combinaron ambas soluciones para una relación ARN:lipofectamina 1:1,25 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, las células se lavaron con medio de transfección y se incubaron con 160 µl de medio de transfección y 40 µl de los complejos ARN:lipofectamina preparados anteriormente, durante 5 horas. Al finalizar, se realizó un cambio de medio con DMEM conteniendo SFB al 10 % para la recuperación celular. La disminución de la expresión de CD13 fue evaluada mediante *Western blotting*, luego de 24, 48 y 72 horas de realizada la transfección, como se detalla en el capítulo 1.

6.2 Ensayo de tubulogénesis con anticuerpo bloqueante de la actividad

Para evaluar los efectos de Gal-1 sobre la actividad peptidasa de CD13 en la formación de redes tubulares *in vitro* en células SK-HEP-1 se siguió el mismo protocolo original, pero se adicionó un anticuerpo anti-CD13, bloqueante de la actividad (ab7417 WM15; Abcam, Estados Unidos), 25 µg/ml en vehículo PBS-DTT 0,05 mM. Como control de isotipo se utilizó un anticuerpo IgG de conejo (ab128915 Abcam, Estados Unidos).

7. Análisis estadístico

Todos los *sets* de datos utilizados fueron analizados mediante el Test de normalidad de Shapiro-Wilk para determinar la distribución normal de los mismos y el Test de Bartlett para determinar la homogeneidad de varianzas, obteniendo en todos los casos valores de $p > 0,05$.

La significancia de los resultados se evaluó mediante pruebas estadísticas como Test t de Student o ANOVA de una vía, según correspondiera, tal como se indica en la leyenda de cada figura. Todos los análisis se realizaron utilizando el *software* GraphPad Prism 8, considerando valores de $p < 0,05$ estadísticamente significativos.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
AFP: α -Fetoproteína
AJCC: *American Joint Committee on Cancer*
AKT: Proteína Kinasa B
ANPEP: *Alanyl aminopeptidase*; gen codificante para CD13
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
BCLC: *Barcelona Clinic Liver Cancer*
BSA: Sero-albúmina Bovina
bFGF: Factor de Crecimiento de Fibroblastos Básico
CCLE: *Cancer Cell Line Encyclopedia*
CCoV: Coronavirus Canino
CD: *Cluster of Differentiation*
CE: Células Endoteliales
CES: Células Endoteliales Sinusoidales
CESH: Células Endoteliales Sinusoidales Hepáticas
CHC: Carcinoma hepatocelular
CK: Células de Kupffer
CLCA: *Chinese Liver Cancer Atlas*
CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad
co-IP: Co-inmunoprecipitación
CoV: Coronavirus Respiratorio Porcino
CSC: *Cancer Stem Cells*
DABCO: 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM: Medio Esencial Dulbecco Modificado
DMSO: Dimetilsulfóxido
DRC: Dominio de Reconocimiento a Carbohidratos
DTT: Ditioneitol
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico
eNOS: Enzima Óxido Nítrico Sintasa Endotelial
EPCAM: Molécula de Adhesión de Células Epiteliales
ET-1: Endotelina-1
FeCoV: Coronavirus Felino Entérico
FGF: Factor de Crecimiento de Fibroblastos
FIPV: Virus Felino de Peritonitis Infecciosa
Gal-1: Galectina-1
Gal-3: Galectina-3
HCMV: Citomegalovirus Humano
HGF: Factores de Crecimiento Hepatocitario
HIF: Factor Inducible por Hipoxia
HRP: Peroxidasa de Rábano Picante
HUEC: Células Endoteliales de la Vena Umbilical Humana

ICAM-1: Molécula de Adhesión Intercelular 1
 IHQ: Inmunohistoquímica
 IL-1: Interleuquina-1
 IL-6: Interleuquina-6
 IP: Inmunoprecipitantes
 kb: Kilobase
 KO: *Knock out*
 LANAIS-PROEM: Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos, Proteínas y Espectrometría de Masa
 LGALS1: *Lectin, galactoside-binding, soluble 1*; gen codificante para Gal-1
 LPS: Lipopolisacáridos
 MAPK: Proteína Kinasa Activada por Mitógenos
 MASH: Esteatohepatitis Asociada a Disfunción Metabólica
 MASLD: Enfermedad Hepática Esteatótica asociada a Disfunción Metabólica
 MEC: Matriz extracelular
 Med: Mediana
 MK: Marcadores de peso molecular
 MMP: Metaloproteinasa de Matriz
 MTT: Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazol
 NES: *Normalized Enrichment Score*
 NF-κB: Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las Células B activadas
 NGR: Péptido asparagina-glicina-arginina
 NK: *Natural killer*
 NOS: Óxido Nítrico Sintasa
 ON: Óxido Nítrico
 PBS: Buffer de Fosfatos Salino
 PDGF: Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas
 PECAM-1: Molécula de Adhesión a Plaquetas y Células Endoteliales (CD31)
 PGE2: Prostaglandina e 2
 PLGF: Factor de Crecimiento derivado de Placenta
 PMSF: Fluoruro de FenilMetil-Sulfonilo
 PSA: Persulfato de Amonio
 rGal-1: Galectina-1 recombinante
 ROS: Especies Reactivas del Oxígeno
 RPS: Resonancia Plasmónica de Superficie
 RSEM: *RNAseq by Expectation-Maximization*
 RU: Unidades de Resonancia
 SDS: Dodecilsulfato de Sodio
 SEM: Error Estándar de la Media
 SFB: Suero Fetal Bovino
 TBS: Buffer Tris Salino
 TCGA: *The Cancer Genome Atlas*
 TDG: Tiodigalactósido

TEM: Transición Epitelio-Mesénquima

TGEV: Virus Porcino de la Gastroenteritis Transmisibile

TGF β : Factor de Crecimiento Transformante β

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral

TPM: Transcripts Por Millón

Tregs: Células T regulatorias

UALCAN: *University of ALabama at Birmingham CANcer data analysis Portal*

UMAP: *Uniform Manifold Approximation and Projection*

VCAM-1: Molécula de Adhesión a Células Vasculares

VEGF: Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular

VEGF-A: Factor de Crecimiento Vascular A

VEGFR: Receptor de VEGF

vWF: Factor de von Willebrand

WNT: Wingless

REFERENCIAS

-
- [1] Houssay AB, Cingolani HE. *Fisiología humana De Houssay*, 7a ed. El Ateneo, 2000.
 - [2] Tresguerres JAF. *Fisiología humana*, 3a ed. Madrid: McGraw-Hill, 2005.
 - [3] Ross MH y Pawlina W. *Histología, Texto y Atlas*, 7a ed. Barcelona: Wolters Kluwer, 2016.
 - [4] Müsch A. The unique polarity phenotype of hepatocytes. *Exp Cell Res*. 2014 Nov 1;328(2):276-83. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.06.006. Epub 2014 Jun 20. PMID: 24956563; PMCID: PMC4254207.
 - [5] Martinez-Hernandez A, Amenta PS. *A Pathological Anatomy and Histopathology The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution in normal liver*, Editorial Virchows Archiv, 1993.
 - [6] Oliva J, French BA, Qing X, French SW. The identification of stem cells in human liver diseases and hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2010 Jun;88(3):331-40. doi: 10.1016/j.yexmp.2010.01.003. Epub 2010 Jan 18. PMID: 20080086; PMCID: PMC3593713.
 - [7] Gandhi CR, *Cellular Anatomy of the Liver (Hepatocyte, BiLiary EpitheLial Cells, EndotheLial Cells, Kupffer Cells and Hepatic Stellate Cells)*, en *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*, Elsevier Inc., 2014, pp. 1759–1769. doi: 10.1016/B978-0-12-386456-7.04201-5.
 - [8] Braet, F., Wisse, E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol* 1, 1 (2002). <https://doi.org/10.1186/1476-5926-1-1>
 - [9] Yokomori H, Yoshimura K, Funakoshi S, Nagai T, Fujimaki K, Nomura M, Ishii H, Oda M. Rho modulates hepatic sinusoidal endothelial fenestrae via regulation of the actin cytoskeleton in rat endothelial cells. *Lab Invest*. 2004 Jul;84(7):857-64. doi: 10.1038/labinvest.3700114. PMID: 15107805.
 - [10] Zapotoczny B, Szafranska K, Lekka M, Ahluwalia BS, McCourt P. Tuning of Liver Sieve: The Interplay between Actin and Myosin Regulatory Light Chain Regulates Fenestration Size and Number in Murine Liver Sinusoidal Endothelial Cells. *Int J Mol Sci*. 2022 Aug 30;23(17):9850. doi: 10.3390/ijms23179850. PMID: 36077249; PMCID: PMC9456121. [11] G. Marrone, V. H. Shah, y J. Gracia-Sancho, “Sinusoidal communication in liver fibrosis and regeneration”, sep. 2016, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.jhep.2016.04.018.
 - [12] McLean AJ, Cogger VC, Chong GC, Warren A, Markus AM, Dahlstrom JE, Le Couteur DG. Age-related pseudocapillarization of the human liver. *J Pathol*. 2003 May;200(1):112-7. doi: 10.1002/path.1328. PMID: 12692849.
 - [13] Xu B, Broome U, Uzunel M, Nava S, Ge X, Kumagai-Braesch M, Hultenby K, Christensson B, Ericzon BG, Holgersson J, Sumitran-Holgersson S. Capillarization of hepatic sinusoid by liver endothelial cell-reactive

- autoantibodies in patients with cirrhosis and chronic hepatitis. *Am J Pathol*. 2003 Oct;163(4):1275-89. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63487-6. PMID: 14507637; PMCID: PMC1868294.
- [14] Shah V, Haddad FG, Garcia-Cardena G, Frangos JA, Mennone A, Groszmann RJ, Sessa WC. Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *J Clin Invest*. 1997 Dec 1;100(11):2923-30. doi: 10.1172/JCI119842. PMID: 9389760; PMCID: PMC508500.
- [15] Parmar KM, Larman HB, Dai G, Zhang Y, Wang ET, Moorthy SN, Kratz JR, Lin Z, Jain MK, Gimbrone MA Jr, García-Cardena G. Integration of flow-dependent endothelial phenotypes by Kruppel-like factor 2. *J Clin Invest*. 2006 Jan;116(1):49-58. doi: 10.1172/JCI24787. Epub 2005 Dec 8. PMID: 16341264; PMCID: PMC1307560.
- [16] Wirz W, Antoine M, Tag CG, Gressner AM, Korff T, Hellerbrand C, Kiefer P. Hepatic stellate cells display a functional vascular smooth muscle cell phenotype in a three-dimensional co-culture model with endothelial cells. *Differentiation*. 2008 Sep;76(7):784-94. doi: 10.1111/j.1432-0436.2007.00260.x. Epub 2008 Jan 3. PMID: 18177423.
- [17] He Q, He W, Dong H, Guo Y, Yuan G, Shi X, Wang D, Lu F. Role of liver sinusoidal endothelial cell in metabolic dysfunction-associated fatty liver disease. *Cell Commun Signal*. 2024 Jun 28;22(1):346. doi: 10.1186/s12964-024-01720-9. PMID: 38943171; PMCID: PMC11214243.
- [18] Sørensen KK, McCourt P, Berg T, Crossley C, Le Couteur D, Wake K, Smedsrød B. The scavenger endothelial cell: a new player in homeostasis and immunity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012 Dec 15;303(12):R1217-30. doi: 10.1152/ajpregu.00686.2011. Epub 2012 Oct 17. PMID: 23076875.
- [19] DeLeve LD, Wang X, Hu L, McCuskey MK, McCuskey RS. Rat liver sinusoidal endothelial cell phenotype is maintained by paracrine and autocrine regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004 Oct;287(4):G757-63. doi: 10.1152/ajpgi.00017.2004. Epub 2004 Jun 10. PMID: 15191879.
- [20] Poisson J, Lemoine S, Boulanger C, Durand F, Moreau R, Valla D, Rautou PE. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *J Hepatol*. 2017 Jan;66(1):212-227. doi: 10.1016/j.jhep.2016.07.009. Epub 2016 Jul 14. PMID: 27423426.
- [21] Li ZW, Ruan B, Yang PJ, Liu JJ, Song P, Duan JL, Wang L. Oit3, a promising hallmark gene for targeting liver sinusoidal endothelial cells. *Signal Transduct Target Ther*. 2023 Sep 12;8(1):344. doi: 10.1038/s41392-023-01621-2. PMID: 37696816; PMCID: PMC10495338.

- [22] Wu J, Meng Z, Jiang M, Zhang E, Trippler M, Broering R, Bucchi A, Krux F, Dittmer U, Yang D, Roggendorf M, Gerken G, Lu M, Schlaak JF. Toll-like receptor-induced innate immune responses in non-parenchymal liver cells are cell type-specific. *Immunology*. 2010 Mar;129(3):363-74. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03179.x. Epub 2009 Nov 16. PMID: 19922426; PMCID: PMC2826681.
- [23] Knolle PA, Limmer A. Control of immune responses by scavenger liver endothelial cells. *Swiss Med Wkly*. 2003 Sep 26;133(37-38):501-6. doi: 10.4414/sm.w.2003.10261. PMID: 14652798.
- [24] Steffan AM, Gendrault JL, McCuskey RS, McCuskey PA, Kirn A. Phagocytosis, an unrecognized property of murine endothelial liver cells. *Hepatology*. 1986 Sep-Oct;6(5):830-6. doi: 10.1002/hep.1840060505. PMID: 3758936.
- [25] Knolle PA, Wohlleber D. Immunological functions of liver sinusoidal endothelial cells. *Cell Mol Immunol*. 2016 May;13(3):347-53. doi: 10.1038/cmi.2016.5. Epub 2016 Apr 4. PMID: 27041636; PMCID: PMC4856811.
- [26] Dixon LJ, Barnes M, Tang H, Pritchard MT, Nagy LE. Kupffer cells in the liver. *Compr Physiol*. 2013 Apr;3(2):785-97. doi: 10.1002/cphy.c120026. PMID: 23720329; PMCID: PMC4748178.
- [27] Peng H, Wisse E, Tian Z. Liver natural killer cells: subsets and roles in liver immunity. *Cell Mol Immunol*. 2016 May;13(3):328-36. doi: 10.1038/cmi.2015.96. Epub 2015 Dec 7. PMID: 26639736; PMCID: PMC4856807.
- [28] Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024 May-Jun;74(3):229-263. doi: 10.3322/caac.21834. Epub 2024 Apr 4. PMID: 38572751.
- [29] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, Gavin A, Visser O, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer*. 2018 Nov;103:356-387. doi: 10.1016/j.ejca.2018.07.005. Epub 2018 Aug 9. PMID: 30100160.
- [30] Piñero F, Tanno M, Aballay Soteras G, Tisi Baña M, Dirchwolf M, Fassio E, Ruf A, Mengarelli S, Borzi S, Fernández N, Ridruejo E, Descalzi V, Anders M, Mazzolini G, Reggiardo V, Marciano S, Perazzo F, Spina JC, McCormack L, Maraschio M, Lagues C, Gadano A, Villamil F, Silva M, Cairo F, Ameigeiras B; Argentinean Association for the Study of Liver Diseases (A.A.E.E.H). Argentinian clinical practice guideline for surveillance, diagnosis, staging and treatment of hepatocellular carcinoma. *Ann Hepatol*. 2020 Sep-Oct;19(5):546-569. doi: 10.1016/j.aohep.2020.06.003. Epub 2020 Jun 25. PMID: 32593747.

-
- [31] Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, Lencioni R, Koike K, Zucman-Rossi J, Finn RS. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2021 Jan 21;7(1):6. doi: 10.1038/s41572-020-00240-3. Erratum in: *Nat Rev Dis Primers*. 2024 Feb 12;10(1):10. doi: 10.1038/s41572-024-00500-6. PMID: 33479224.
- [32] Ferral H, Patel NH. Selection criteria for patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunt procedures: current status. *J Vasc Interv Radiol*. 2005 Apr;16(4):449-55. doi: 10.1097/01.RVI.0000149508.64029.02. PMID: 15802443.
- [33] Reig M, Forner A, Rimola J, Ferrer-Fàbrega J, Burrel M, Garcia-Criado Á, Kelley RK, Galle PR, Mazzaferro V, Salem R, Sangro B, Singal AG, Vogel A, Fuster J, Ayuso C, Bruix J. BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. *J Hepatol*. 2022 Mar;76(3):681-693. doi: 10.1016/j.jhep.2021.11.018. Epub 2021 Nov 19. PMID: 34801630; PMCID: PMC8866082.
- [34] Ercolani G, Grazi GL, Ravaioli M, Del Gaudio M, Gardini A, Cescon M, Varotti G, Cetta F, Cavallari A. Liver resection for hepatocellular carcinoma on cirrhosis: univariate and multivariate analysis of risk factors for intrahepatic recurrence. *Ann Surg*. 2003 Apr;237(4):536-43. doi: 10.1097/01.SLA.0000059988.22416.F2. PMID: 12677151; PMCID: PMC1514472.
- [35] Vivarelli M, Risaliti A. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma on cirrhosis: strategies to avoid tumor recurrence. *World J Gastroenterol*. 2011 Nov 21;17(43):4741-6. doi: 10.3748/wjg.v17.i43.4741. PMID: 22147974; PMCID: PMC3229622.
- [36] Díaz LA, Barrera F. Clasificaciones en Gastroenterología Clasificación Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) de carcinoma hepatocelular. *Gastroenterol. latinoam* 2015; Vol 26, Nº 1: 63-68.
- [37] Sia D, Villanueva A, Friedman SL, Llovet JM. Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. *Gastroenterology*. 2017 Mar;152(4):745-761. doi: 10.1053/j.gastro.2016.11.048. Epub 2016 Dec 30. PMID: 28043904; PMCID: PMC12160040.
- [38] Schulze K, Imbeaud S, Letouzé E, Alexandrov LB, Calderaro J, Rebouissou S, Couchy G, Meiller C, Shinde J, Soysouvanh F, Calatayud AL, Pinyol R, Pelletier L, Balabaud C, Laurent A, Blanc JF, Mazzaferro V, Calvo F, Villanueva A, Nault JC, Bioulac-Sage P, Stratton MR, Llovet JM, Zucman-Rossi J. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet*. 2015 May;47(5):505-511. doi: 10.1038/ng.3252. Epub 2015 Mar 30. PMID: 25822088; PMCID: PMC4587544.

-
- [39] Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad IB, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Letexier M, Degos F, Clément B, Balabaud C, Chevet E, Laurent A, Couchy G, Letouzé E, Calvo F, Zucman-Rossi J. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2012 May 6;44(6):694-8. doi: 10.1038/ng.2256. PMID: 22561517; PMCID: PMC3819251.
- [40] Chiang DY, Villanueva A, Hoshida Y, Peix J, Newell P, Minguez B, LeBlanc AC, Donovan DJ, Thung SN, Solé M, Tovar V, Alsinet C, Ramos AH, Barretina J, Roayaie S, Schwartz M, Waxman S, Bruix J, Mazzaferro V, Ligon AH, Najfeld V, Friedman SL, Sellers WR, Meyerson M, Llovet JM. Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2008 Aug 15;68(16):6779-88. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0742. PMID: 18701503; PMCID: PMC2587454.
- [41] Calderaro J, Ziol M, Paradis V, Zucman-Rossi J. Molecular and histological correlations in liver cancer. *J Hepatol.* 2019 Sep;71(3):616-630. doi: 10.1016/j.jhep.2019.06.001. Epub 2019 Jun 10. PMID: 31195064.
- [42] Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology.* 2015 Oct;149(5):1226-1239.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2015.05.061. Epub 2015 Jun 20. PMID: 26099527.
- [43] Semela D, Dufour JF. Angiogenesis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2004 Nov;41(5):864-80. doi: 10.1016/j.jhep.2004.09.006. PMID: 15519663.
- [44] Thomann S, Weiler SME, Marquard S, Rose F, Ball CR, Tóth M, Wei T, Sticht C, Fritzsche S, Roessler S, De La Torre C, Ryschich E, Ermakova O, Mogler C, Kazdal D, Gretz N, Glimm H, Rempel E, Schirmacher P, Breuhahn K. YAP Orchestrates Heterotypic Endothelial Cell Communication via HGF/c-MET Signaling in Liver Tumorigenesis. *Cancer Res.* 2020 Dec 15;80(24):5502-5514. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-0242. Epub 2020 Oct 21. PMID: 33087321.
- [45] DeLeve LD. Liver sinusoidal endothelial cells and liver regeneration. *J Clin Invest.* 2013 May;123(5):1861-6. doi: 10.1172/JCI66025. Epub 2013 May 1. PMID: 23635783; PMCID: PMC3635729.
- [46] Xu J, Lin H, Wu G, Zhu M, Li M. IL-6/STAT3 Is a Promising Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma. *Front Oncol.* 2021 Dec 15;11:760971. doi: 10.3389/fonc.2021.760971. PMID: 34976809; PMCID: PMC8714735.
- [47] International Consensus Group for Hepatocellular NeoplasiaThe International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology.* 2009 Feb;49(2):658-64. doi:

- 10.1002/hep.22709. Erratum in: *Hepatology*. 2009 Mar;49(3):1058. PMID: 19177576.
- [48] Facciorusso A, Licinio R, Muscatiello N, Di Leo A, Barone M. Transarterial chemoembolization: Evidences from the literature and applications in hepatocellular carcinoma patients. *World J Hepatol*. 2015 Aug 8;7(16):2009-19. doi: 10.4254/wjh.v7.i16.2009. PMID: 26261690; PMCID: PMC4528274.
- [49] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J; SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008 Jul 24;359(4):378-90. doi: 10.1056/NEJMoa0708857. PMID: 18650514.
- [50] Kudo M, Finn RS, Qin S, Han KH, Ikeda K, Piscaglia F, Baron A, Park JW, Han G, Jassem J, Blanc JF, Vogel A, Komov D, Evans TRJ, Lopez C, Dutcus C, Guo M, Saito K, Kraljevic S, Tamai T, Ren M, Cheng AL. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*. 2018 Mar 24;391(10126):1163-1173. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30207-1. PMID: 29433850.
- [51] Cheng AL, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim TY, Lim HY, Kudo M, Breder V, Merle P, Kaseb AO, Li D, Verret W, Ma N, Nicholas A, Wang Y, Li L, Zhu AX, Finn RS. Updated efficacy and safety data from IMbrave150: Atezolizumab plus bevacizumab vs. sorafenib for unresectable hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2022 Apr;76(4):862-873. doi: 10.1016/j.jhep.2021.11.030. Epub 2021 Dec 11. PMID: 34902530.
- [52] Finn RS, Yau T, Hsu CH, De Toni EN, Goyal L, Galle PR, Qin S, Rao S, Sun F, Wang C, Widau RC, Zhu AX. Ramucirumab for Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma and Elevated Alpha Fetoprotein Following Non-Sorafenib Systemic Therapy: An Expansion Cohort of REACH-2. *Oncologist*. 2022 Dec 9;27(12):e938-e948. doi: 10.1093/oncolo/oyac183. PMID: 36190331; PMCID: PMC10249425.
- [53] Flamme I, Frölich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol*. 1997 Nov;173(2):206-10. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199711)173:2<206::AID-JCP22>3.0.CO;2-C. PMID: 9365523.
- [54] Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):932-6. doi: 10.1038/nature04478. PMID: 16355210.

- [55] Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, Martínez De La Escalera G. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev.* 2009 Oct;89(4):1177-215. doi: 10.1152/physrev.00024.2009. PMID: 19789380.
- [56] Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):677-84. doi: 10.1038/nm0603-677. PMID: 12778166.
- [57] Ashrafpour H, Huang N, Neligan PC, Forrest CR, Addison PD, Moses MA, Levine RH, Pang CY. Vasodilator effect and mechanism of action of vascular endothelial growth factor in skin vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 Mar;286(3):H946-54. doi: 10.1152/ajpheart.00901.2003. Epub 2003 Nov 26. PMID: 14644765.
- [58] Gridley T. Notch signaling in vascular development and physiology. *Development.* 2007 Aug;134(15):2709-18. doi: 10.1242/dev.004184. Epub 2007 Jul 4. PMID: 17611219. [59] R. H. Adams y K. Alitalo, "Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis", junio de 2007. doi: 10.1038/nrm2183.
- [60] Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2008 Aug;8(8):604-17. doi: 10.1038/nrc2353. Epub 2008 May 22. PMID: 18497750; PMCID: PMC2577722.
- [61] L. H. Parker y W. Ye, "The endothelial-cell-derived secreted factor Eglf7 regulates vascular tube formation", *Nature*, vol. 428, núm. 6984, pp. 754–758, abr. 2004, doi: 10.1038/nature02416.
- [62] Allende ML, Yamashita T, Proia RL. G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood.* 2003 Nov 15;102(10):3665-7. doi: 10.1182/blood-2003-02-0460. Epub 2003 Jul 17. PMID: 12869509.
- [63] Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, ten Dijke P. Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest.* 2005 Dec;128(6 Suppl):585S-590S. doi: 10.1378/chest.128.6_suppl.585S. PMID: 16373850.
- [64] Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res.* 2005 May 15;65(10):3967-79. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2427. PMID: 15899784.
- [65] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971 Nov 18;285(21):1182-6. doi: 10.1056/NEJM197111182852108. PMID: 4938153.
- [66] Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003 Jun;3(6):401-10. doi: 10.1038/nrc1093. PMID: 12778130.
- [67] Hillen F, Griffioen AW. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Dec;26(3-4):489-502. doi: 10.1007/s10555-007-9094-7. PMID: 17717633; PMCID: PMC2797856.

- [68] Nagy JA, Chang SH, Shih SC, Dvorak AM, Dvorak HF. Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost.* 2010 Apr;36(3):321-31. doi: 10.1055/s-0030-1253454. Epub 2010 May 20. PMID: 20490982; PMCID: PMC3278036.
- [69] Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol.* 2000 Feb;156(2):361-81. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64739-6. PMID: 10666364; PMCID: PMC1850026.
- [70] Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 19;97(26):14608-13. doi: 10.1073/pnas.97.26.14608. PMID: 11121063; PMCID: PMC18966.
- [71] Tong RT, Boucher Y, Kozin SV, Winkler F, Hicklin DJ, Jain RK. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res.* 2004 Jun 1;64(11):3731-6. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0074. PMID: 15172975.
- [72] Wu XZ, Xie GR, Chen D. Hypoxia and hepatocellular carcinoma: The therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007 Aug;22(8):1178-82. doi: 10.1111/j.1440-1746.2007.04997.x. Epub 2007 Jun 7. PMID: 17559361.
- [73] Cramer T, Vaupel P. Severe hypoxia is a typical characteristic of human hepatocellular carcinoma: Scientific fact or fallacy? *J Hepatol.* 2022 Apr;76(4):975-980. doi: 10.1016/j.jhep.2021.12.028. Epub 2022 Jan 3. PMID: 34990751.
- [74] Iommarini L, Porcelli AM, Gasparre G, Kurelac I. Non-Canonical Mechanisms Regulating Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha in Cancer. *Front Oncol.* 2017 Nov 27;7:286. doi: 10.3389/fonc.2017.00286. PMID: 29230384; PMCID: PMC5711814..
- [75] Pinto E, Pelizzaro F, Farinati F, Russo FP. Angiogenesis and Hepatocellular Carcinoma: From Molecular Mechanisms to Systemic Therapies. *Medicina (Kaunas).* 2023 Jun 9;59(6):1115. doi: 10.3390/medicina59061115. PMID: 37374319; PMCID: PMC10305396.
- [76] Morse MA, Sun W, Kim R, He AR, Abada PB, Mynderse M, Finn RS. The Role of Angiogenesis in Hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2019 Feb 1;25(3):912-920. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1254. Epub 2018 Oct 1. PMID: 30274981.
- [77] Teichberg VI, Silman I, Beitsch DD, Resheff G. A beta-D-galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. *Proc Natl Acad Sci*

- U S A. 1975 Apr;72(4):1383-7. doi: 10.1073/pnas.72.4.1383. PMID: 1055413; PMCID: PMC432538.
- [78] Leffler, Hakon. (2018). Galectin History, Some Stories, and Some Outstanding Questions. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. 30. SE129-SE135. 10.4052/tigg.1724.1SE.
- [79] Lobsanov YD, Gitt MA, Leffler H, Barondes SH, Rini JM. X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9-Å resolution. *J Biol Chem*. 1993 Dec 25;268(36):27034-8. doi: 10.2210/pdb1hlc/pdb. PMID: 8262940.
- [80] Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*. 1994 Feb 25;76(4):597-8. doi: 10.1016/0092-8674(94)90498-7. PMID: 8124704.
- [81] Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med*. 2008 Jun 13;10:e17. doi: 10.1017/S1462399408000719. PMID: 18549522.
- [82] Troncoso MF, Elola MT, Blidner AG, Sarrias L, Espelt MV, Rabinovich GA. The universe of galectin-binding partners and their functions in health and disease. *J Biol Chem*. 2023 Dec;299(12):105400. doi: 10.1016/j.jbc.2023.105400. Epub 2023 Oct 26. PMID: 37898403; PMCID: PMC10696404.
- [83] Nio-Kobayashi J. Tissue- and cell-specific localization of galectins, β -galactose-binding animal lectins, and their potential functions in health and disease. *Anat Sci Int*. 2017 Jan;92(1):25-36. doi: 10.1007/s12565-016-0366-6. Epub 2016 Sep 2. PMID: 27590897.
- [84] Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R, Bruni CB. Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconj J*. 2002;19(7-9):441-9. doi: 10.1023/B:GLYC.0000014073.23096.3a. PMID: 14758067.
- [85] Nickel W. The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur J Biochem*. 2003 May;270(10):2109-19. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03577.x. PMID: 12752430.
- [86] Seelenmeyer, Claudia & Wegehangel, Sabine & Tews, Ivo & Künzler, Markus & Aebi, Markus & Nickel, Walter. (2005). Cell surface counter receptors are essential components of the unconventional export machinery of galectin-1. *The Journal of Cell Biology*. 171. 373-381, doi: 10.1083/jcb.200506026.
- [87] Popa SJ, Stewart SE, Moreau K. Unconventional secretion of annexins and galectins. *Semin Cell Dev Biol*. 2018 Nov;83:42-50. doi: 10.1016/j.semcdb.2018.02.022. Epub 2018 Mar 9. PMID: 29501720; PMCID: PMC6565930.

-
- [88] Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Sep 19;1572(2-3):263-73. doi: 10.1016/s0304-4165(02)00313-6. PMID: 12223274.
- [89] Rabinovich GA, Toscano MA, Jackson SS, Vasta GR. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr Opin Struct Biol*. 2007 Oct;17(5):513-20. doi: 10.1016/j.sbi.2007.09.002. Epub 2007 Oct 22. PMID: 17950594; PMCID: PMC2100406.
- [90] Rabinovich GA. Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell Death Differ*. 1999 Aug;6(8):711-21. doi: 10.1038/sj.cdd.4400535. PMID: 10467344.
- [91] Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2005 Jan;5(1):29-41. doi: 10.1038/nrc1527. PMID: 15630413.
- [92] Bacigalupo ML, Manzi M, Rabinovich GA, Troncoso MF. Hierarchical and selective roles of galectins in hepatocarcinogenesis, liver fibrosis and inflammation of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2013 Dec 21;19(47):8831-49. doi: 10.3748/wjg.v19.i47.8831. PMID: 24379606; PMCID: PMC3870534.
- [93] López-Lucendo MF, Solís D, André S, Hirabayashi J, Kasai K, Kaltner H, Gabius HJ, Romero A. 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*. 2004 Oct 29;343(4):957-70. doi: 10.1016/j.jmb.2004.08.078. PMID: 15476813..
- [94] Inagaki Y, Sohma Y, Horie H, Nozawa R, Kadoya T. Oxidized galectin-1 promotes axonal regeneration in peripheral nerves but does not possess lectin properties. *Eur J Biochem*. 2000 May;267(10):2955-64. doi: 10.1046/j.1432-1033.2000.01311.x. PMID: 10806394.
- [95] Leppänen A, Stowell S, Blixt O, Cummings RD. 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*. 2005 Feb 18;280(7):5549-62. doi: 10.1074/jbc.M412019200. Epub 2004 Nov 19. PMID: 15556936..
- [96] Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*. 2006 Nov;16(11):137R-157R. doi: 10.1093/glycob/cwl025. Epub 2006 Jul 13. PMID: 16840800.
- [97] Nickel W. Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic*. 2005 Aug;6(8):607-14. doi: 10.1111/j.1600-0854.2005.00302.x. PMID: 15998317.

- [98] Vyakarnam A, Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol.* 1997 Aug;17(8):4730-7. doi: 10.1128/MCB.17.8.4730. PMID: 9234729; PMCID: PMC232325.
- [99] Blaževič O, Mideksa YG, Šolman M, Ligabue A, Ariotti N, Nakhaeizadeh H, Fansa EK, Papageorgiou AC, Wittinghofer A, Ahmadian MR, Abankwa D. Galectin-1 dimers can scaffold Raf-effectors to increase H-ras nanoclustering. *Sci Rep.* 2016 Apr 18;6:24165. doi: 10.1038/srep24165. PMID: 27087647; PMCID: PMC4834570.
- [100] Verkerke H, Dias-Baruffi M, Cummings RD, Arthur CM, Stowell SR. Galectins: An Ancient Family of Carbohydrate Binding Proteins with Modern Functions. *Methods Mol Biol.* 2022;2442:1-40. doi: 10.1007/978-1-0716-2055-7_1. PMID: 35320517.
- [101] Garner OB, Baum LG. Galectin-glycan lattices regulate cell-surface glycoprotein organization and signalling. *Biochem Soc Trans.* 2008 Dec;36(Pt 6):1472-7. doi: 10.1042/BST0361472. PMID: 19021578; PMCID: PMC2811491.
- [102] Barrientos G, Freitag N, Tirado-González I, Unverdorben L, Jeschke U, Thijssen VL, Blois SM. Involvement of galectin-1 in reproduction: past, present and future. *Hum Reprod Update.* 2014 Mar-Apr;20(2):175-93. doi: 10.1093/humupd/dmt040. Epub 2013 Sep 27. PMID: 24077937.
- [103] Sundblad V, Morosi LG, Geffner JR, Rabinovich GA. Galectin-1: A Jack-of-All-Trades in the Resolution of Acute and Chronic Inflammation. *J Immunol.* 2017 Dec 1;199(11):3721-3730. doi: 10.4049/jimmunol.1701172. PMID: 29158348.
- [104] Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10
- [105] Hernandez JD, Baum LG. Ah, sweet mystery of death! Galectins and control of cell fate. *Glycobiology.* 2002 Oct;12(10):127R-36R. doi: 10.1093/glycob/cwf081. PMID: 12244068.
- [106] Salatino M, Croci DO, Bianco GA, Ilarregui JM, Toscano MA, Rabinovich GA. Galectin-1 as a potential therapeutic target in autoimmune disorders and cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 2008 Jan;8(1):45-57. doi: 10.1517/14712598.8.1.45. PMID: 18081536.
- [107] Astorgues-Xerri L, Riveiro ME, Tijeras-Raballand A, Serova M, Neuzillet C, Albert S, Raymond E, Faivre S. Unraveling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer. *Cancer Treat Rev.* 2014 Mar;40(2):307-19. doi: 10.1016/j.ctrv.2013.07.007. Epub 2013 Aug 1. PMID: 23953240.
- [108] Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Dec 6;1473(1):172-85. doi: 10.1016/s0304-4165(99)00177-4. PMID: 10580137.

-
- [109] Satelli A, Rao PS, Gupta PK, Lockman PR, Srivenugopal KS, Rao US. Varied expression and localization of multiple galectins in different cancer cell lines. *Oncol Rep.* 2008 Mar;19(3):587-94. PMID: 18288388.
- [110] Saussez S, Lorfevre F, Lequeux T, Laurent G, Chantrain G, Vertongen F, Toubreau G, Decaestecker C, Kiss R. The determination of the levels of circulating galectin-1 and -3 in HNSCC patients could be used to monitor tumor progression and/or responses to therapy. *Oral Oncol.* 2008 Jan;44(1):86-93. doi: 10.1016/j.oraloncology.2006.12.014. Epub 2007 Mar 9. PMID: 17350328.
- [111] Watanabe M, Takemasa I, Kaneko N, Yokoyama Y, Matsuo E, Iwasa S, Mori M, Matsuura N, Monden M, Nishimura O. Clinical significance of circulating galectins as colorectal cancer markers. *Oncol Rep.* 2011 May;25(5):1217-26. doi: 10.3892/or.2011.1198. Epub 2011 Mar 1. PMID: 21369702.
- [112] Mariño KV, Cagnoni AJ, Croci DO, Rabinovich GA. Targeting galectin-driven regulatory circuits in cancer and fibrosis. *Nat Rev Drug Discov.* 2023 Apr;22(4):295-316. doi: 10.1038/s41573-023-00636-2. Epub 2023 Feb 9. PMID: 36759557.
- [113] Chung EJ, Sung YK, Farooq M, Kim Y, Im S, Tak WY, Hwang YJ, Kim YI, Han HS, Kim JC, Kim MK. Gene expression profile analysis in human hepatocellular carcinoma by cDNA microarray. *Mol Cells.* 2002 Dec 31;14(3):382-7. PMID: 12521301.
- [114] Wu H, Chen P, Liao R, Li YW, Yi Y, Wang JX, Sun TW, Zhou J, Shi YH, Yang XR, Jin JJ, Cheng YF, Fan J, Qiu SJ. Overexpression of galectin-1 is associated with poor prognosis in human hepatocellular carcinoma following resection. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012 Aug;27(8):1312-9. doi: 10.1111/j.1440-1746.2012.07130.x. PMID: 22432916.
- [115] Kondoh N, Hada A, Ryo A, Shuda M, Arai M, Matsubara O, Kimura F, Wakatsuki T, Yamamoto M. Activation of Galectin-1 gene in human hepatocellular carcinoma involves methylation-sensitive complex formations at the transcriptional upstream and downstream elements. *Int J Oncol.* 2003 Dec;23(6):1575-83. PMID: 14612929.
- [116] Spano D, Russo R, Di Maso V, Rosso N, Terracciano LM, Roncalli M, Tornillo L, Capasso M, Tiribelli C, Iolascon A. Galectin-1 and its involvement in hepatocellular carcinoma aggressiveness. *Mol Med.* 2010 Mar;16(3-4):102-15. doi: 10.2119/molmed.2009.00119. Epub 2009 Dec 21. PMID: 20200618; PMCID: PMC2829614.
- [117] Espelt MV, Croci DO, Bacigalupo ML, Carabias P, Manzi M, Elola MT, Muñoz MC, Dominici FP, Wolfenstein-Todel C, Rabinovich GA, Troncoso MF. Novel roles of galectin-1 in hepatocellular carcinoma cell adhesion, polarization, and in

- vivo tumor growth. *Hepatology*. 2011 Jun;53(6):2097-106. doi: 10.1002/hep.24294. PMID: 21391228.
- [118] Paz A, Haklai R, Elad-Sfadia G, Ballan E, Kloog Y. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene*. 2001 Nov 8;20(51):7486-93. doi: 10.1038/sj.onc.1204950. PMID: 11709720.
- [119] Elad-Sfadia G, Haklai R, Ballan E, Gabius HJ, Kloog Y. Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*. 2002 Oct 4;277(40):37169-75. doi: 10.1074/jbc.M205698200. Epub 2002 Jul 30. PMID: 12149263.
- [120] Garín MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollón E, Wait R, Lechler RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood*. 2007 Mar 1;109(5):2058-65. doi: 10.1182/blood-2006-04-016451. Epub 2006 Nov 16. PMID: 17110462.
- [121] Ha TY. The role of regulatory T cells in cancer. *Immune Netw*. 2009 Dec;9(6):209-35. doi: 10.4110/in.2009.9.6.209. Epub 2009 Dec 31. PMID: 20157609; PMCID: PMC2816955.
- [122] Zhang J, Yang Y, Yang T, Liu Y, Li A, Fu S, Wu M, Pan Z, Zhou W. microRNA-22, downregulated in hepatocellular carcinoma and correlated with prognosis, suppresses cell proliferation and tumourigenicity. *Br J Cancer*. 2010 Oct 12;103(8):1215-20. doi: 10.1038/sj.bjc.6605895. Epub 2010 Sep 14. PMID: 20842113; PMCID: PMC2967065.
- [123] You Y, Tan JX, Dai HS, Chen HW, Xu XJ, Yang AG, Zhang YJ, Bai LH, Bie P. MiRNA-22 inhibits oncogene galectin-1 in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Aug 30;7(35):57099-57116. doi: 10.18632/oncotarget.10981. PMID: 27494859; PMCID: PMC5302976.
- [124] Bacigalupo ML, Manzi M, Espelt MV, Gentilini LD, Compagno D, Laderach DJ, Wolfenstein-Todel C, Rabinovich GA, Troncoso MF. Galectin-1 triggers epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Physiol*. 2015 Jun;230(6):1298-309. doi: 10.1002/jcp.24865. PMID: 25469885.
- [125] Carabias P, Espelt MV, Bacigalupo ML, Rojas P, Sarrias L, Rubin A, Saffioti NA, Elola MT, Rossi JP, Wolfenstein-Todel C, Rabinovich GA, Troncoso MF. Galectin-1 confers resistance to doxorubicin in hepatocellular carcinoma cells through modulation of P-glycoprotein expression. *Cell Death Dis*. 2022 Jan 24;13(1):79. doi: 10.1038/s41419-022-04520-6. PMID: 35075112; PMCID: PMC8786848.
- [126] Setayesh T, Hu Y, Vaziri F, Wei D, Wan YY. The spatial impact of a Western diet in enriching Galectin-1-regulated Rho, ECM, and SASP signaling in a novel

- MASH-HCC mouse model. *Biomark Res.* 2024 Oct 14;12(1):122. doi: 10.1186/s40364-024-00660-3. PMID: 39402682; PMCID: PMC11476289.
- [127] Setayesh T, Hu Y, Vaziri F, Chen X, Lai J, Wei D, Yvonne Wan YJ. Targeting stroma and tumor, silencing galectin 1 treats orthotopic mouse hepatocellular carcinoma. *Acta Pharm Sin B.* 2024 Jan;14(1):292-303. doi: 10.1016/j.apsb.2023.10.010. Epub 2023 Oct 21. PMID: 38261802; PMCID: PMC10793093.
- [128] Katt ME, Wong AD, Searson PC. Dissemination from a Solid Tumor: Examining the Multiple Parallel Pathways. *Trends Cancer.* 2018 Jan;4(1):20-37. doi: 10.1016/j.trecan.2017.12.002. Epub 2018 Jan 10. PMID: 29413419; PMCID: PMC5806201.
- [129] Glinsky VV, Glinsky GV, Glinskii OV, Huxley VH, Turk JR, Mossine VV, Deutscher SL, Pienta KJ, Quinn TP. Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium. *Cancer Res.* 2003 Jul 1;63(13):3805-11. PMID: 12839977.
- [130] Glinsky VV, Huflejt ME, Glinsky GV, Deutscher SL, Quinn TP. Effects of Thomsen-Friedenreich antigen-specific peptide P-30 on beta-galactoside-mediated homotypic aggregation and adhesion to the endothelium of MDA-MB-435 human breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 2000 May 15;60(10):2584-8. PMID: 10825125.
- [131] Clausse N, van den Brûle F, Waltregny D, Garnier F, Castronovo V. Galectin-1 expression in prostate tumor-associated capillary endothelial cells is increased by prostate carcinoma cells and modulates heterotypic cell-cell adhesion. *Angiogenesis.* 1999;3(4):317-25. doi: 10.1023/a:1026584523789. PMID: 14517411.
- [132] Balzer EM, Konstantopoulos K. Intercellular adhesion: mechanisms for growth and metastasis of epithelial cancers. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2012 Mar-Apr;4(2):171-81. doi: 10.1002/wsbm.160. Epub 2011 Sep 12. PMID: 21913338; PMCID: PMC4476647.
- [133] Manzi M, Bacigalupo ML, Carabias P, Elola MT, Wolfenstein-Todel C, Rabinovich GA, Espelt MV, Troncoso MF. Galectin-1 Controls the Proliferation and Migration of Liver Sinusoidal Endothelial Cells and Their Interaction With Hepatocarcinoma Cells. *J Cell Physiol.* 2016 Jul;231(7):1522-33. doi: 10.1002/jcp.25244. Epub 2015 Nov 26. PMID: 26551914.
- [134] Baum LG, Seilhamer JJ, Pang M, Levine WB, Beynon D, Berliner JA. Synthesis of an endogeneous lectin, galectin-1, by human endothelial cells is up-regulated by endothelial cell activation. *Glycoconj J.* 1995 Feb;12(1):63-8. doi: 10.1007/BF00731870. PMID: 7795414.

- [135] Thijssen VL, Hulsmans S, Griffioen AW. The galectin profile of the endothelium: altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells. *Am J Pathol.* 2008 Feb;172(2):545-53. doi: 10.2353/ajpath.2008.070938. Epub 2008 Jan 17. PMID: 18202194; PMCID: PMC2312370.
- [136] Croci DO, Cerliani JP, Pinto NA, Morosi LG, Rabinovich GA. Regulatory role of glycans in the control of hypoxia-driven angiogenesis and sensitivity to anti-angiogenic treatment. *Glycobiology.* 2014 Dec;24(12):1283-90. doi: 10.1093/glycob/cwu083. Epub 2014 Aug 12. PMID: 25117007.
- [137] Croci DO, Cerliani JP, Dalotto-Moreno T, Méndez-Huergo SP, Mascanfroni ID, Dergan-Dylon S, Toscano MA, Caramelo JJ, García-Vallejo JJ, Ouyang J, Mesri EA, Junttila MR, Bais C, Shipp MA, Salatino M, Rabinovich GA. Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors. *Cell.* 2014 Feb 13;156(4):744-58. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.043. PMID: 24529377.
- [138] Maller SM, Cagnoni AJ, Bannoud N, Sigaut L, Pérez Sáez JM, Pietrasanta LI, Yang RY, Liu FT, Croci DO, Di Lella S, Sundblad V, Rabinovich GA, Mariño KV. An adipose tissue galectin controls endothelial cell function via preferential recognition of 3-fucosylated glycans. *FASEB J.* 2020 Jan;34(1):735-753. doi: 10.1096/fj.201901817R. Epub 2019 Nov 26. PMID: 31914594.
- [139] Brandwijk RJ, Nesmelova I, Dings RP, Mayo KH, Thijssen VL, Griffioen AW. Cloning an artificial gene encoding angiostatic anginex: From designed peptide to functional recombinant protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Aug 12;333(4):1261-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.06.029. PMID: 15979575.
- [140] Thijssen VL, Postel R, Brandwijk RJ, Dings RP, Nesmelova I, Satijn S, Verhofstad N, Nakabeppu Y, Baum LG, Bakkers J, Mayo KH, Poirier F, Griffioen AW. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Oct 24;103(43):15975-80. doi: 10.1073/pnas.0603883103. Epub 2006 Oct 16. PMID: 17043243; PMCID: PMC1635112.
- [141] Hsieh SH, Ying NW, Wu MH, Chiang WF, Hsu CL, Wong TY, Jin YT, Hong TM, Chen YL. Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells. *Oncogene.* 2008 Jun 12;27(26):3746-53. doi: 10.1038/sj.onc.1211029. Epub 2008 Jan 28. PMID: 18223683.
- [142] Thijssen VL, Barkan B, Shoji H, Aries IM, Mathieu V, Deltour L, Hackeng TM, Kiss R, Kloog Y, Poirier F, Griffioen AW. Tumor cells secrete galectin-1 to enhance endothelial cell activity. *Cancer Res.* 2010 Aug 1;70(15):6216-24. doi:

- 10.1158/0008-5472.CAN-09-4150. Epub 2010 Jul 20. Erratum in: *Cancer Res.* 2012 Feb 1;72(3):825. PMID: 20647324.
- [143] van Beijnum JR, Thijssen VL, Lappchen T, Wong TJ, Verel I, Engbersen M, Schulkens IA, Rossin R, Grull H, Griffioen AW, Nowak-Sliwinska P. A key role for galectin-1 in sprouting angiogenesis revealed by novel rationally designed antibodies. *Int J Cancer.* 2016 Aug 15;139(4):824-35. doi: 10.1002/ijc.30131. Epub 2016 May 5. PMID: 27062254.
- [144] Laderach DJ, Gentilini LD, Giribaldi L, Delgado VC, Nugnes L, Croci DO, Al Nakouzi N, Sacca P, Casas G, Mazza O, Shipp MA, Vazquez E, Chauchereau A, Kutok JL, Rodig SJ, Elola MT, Compagno D, Rabinovich GA. A unique galectin signature in human prostate cancer progression suggests galectin-1 as a key target for treatment of advanced disease. *Cancer Res.* 2013 Jan 1;73(1):86-96. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1260. Epub 2012 Oct 29. PMID: 23108139.
- [145] Croci DO, Salatino M, Rubinstein N, Cerliani JP, Cavallin LE, Leung HJ, Ouyang J, Ilarregui JM, Toscano MA, Domaica CI, Croci MC, Shipp MA, Mesri EA, Albin A, Rabinovich GA. Disrupting galectin-1 interactions with N-glycans suppresses hypoxia-driven angiogenesis and tumorigenesis in Kaposi's sarcoma. *J Exp Med.* 2012 Oct 22;209(11):1985-2000. doi: 10.1084/jem.20111665. Epub 2012 Oct 1. PMID: 23027923; PMCID: PMC3478924.
- [146] Pérez Sáez JM, Hockl PF, Cagnoni AJ, Méndez Huergo SP, García PA, Gatto SG, Cerliani JP, Croci DO, Rabinovich GA. Characterization of a neutralizing anti-human galectin-1 monoclonal antibody with angioregulatory and immunomodulatory activities. *Angiogenesis.* 2021 Feb;24(1):1-5. doi: 10.1007/s10456-020-09749-3. Epub 2020 Oct 1. PMID: 33006019.
- [147] Pranjol MZI, Zinovkin DA, Maskell ART, Stephens LJ, Achinovich SL, Los' DM, Nadyrov EA, Hannemann M, Gutowski NJ, Whatmore JL. Cathepsin L-induced galectin-1 may act as a proangiogenic factor in the metastasis of high-grade serous carcinoma. *J Transl Med.* 2019 Jul 3;17(1):216. doi: 10.1186/s12967-019-1963-7. PMID: 31269957; PMCID: PMC6610868.
- [148] Tang D, Gao J, Wang S, Ye N, Chong Y, Huang Y, Wang J, Li B, Yin W, Wang D. Cancer-associated fibroblasts promote angiogenesis in gastric cancer through galectin-1 expression. *Tumour Biol.* 2016 Feb;37(2):1889-99. doi: 10.1007/s13277-015-3942-9. Epub 2015 Sep 1. PMID: 26323258.
- [149] D'Haene N, Sauvage S, Maris C, Adanja I, Le Mercier M, Decaestecker C, Baum L, Salmon I. VEGFR1 and VEGFR2 involvement in extracellular galectin-1- and galectin-3-induced angiogenesis. *PLoS One.* 2013 Jun 17;8(6):e67029. doi: 10.1371/journal.pone.0067029. Erratum in: *PLoS One.* 2023 Dec 7;18(12):e0295736. doi: 10.1371/journal.pone.0295736. PMID: 23799140; PMCID: PMC3684579.

- [150] Cheng YH, Jiang YF, Qin C, Shang K, Yuan Y, Wei XJ, Xu Z, Luo X, Wang W, Qu WS. Galectin-1 Contributes to Vascular Remodeling and Blood Flow Recovery After Cerebral Ischemia in Mice. *Transl Stroke Res*. 2022 Feb;13(1):160-170. doi: 10.1007/s12975-021-00913-5. Epub 2021 May 10. PMID: 33973144.
- [151] Wei J, Li DK, Hu X, Cheng C, Zhang Y. Galectin-1-RNA interaction map reveals potential regulatory roles in angiogenesis. *FEBS Lett*. 2021 Mar;595(5):623-636. doi: 10.1002/1873-3468.14047. Epub 2021 Feb 8. PMID: 33483966.
- [152] Taylor A. Aminopeptidases: structure and function. *FASEB J*. 1993 Feb 1;7(2):290-8. doi: 10.1096/fasebj.7.2.8440407. PMID: 8440407.
- [153] Binkley F. Evidence for the polynucleotide nature of cysteinylglycinase. *Exp. Cell Res*, 1952, vol. 2, p. 145-157.
- [154] Pfleiderer G, Celliers PG. Isolierung einer aminopeptidase aus nierenpartikeln [Isolation of an aminopeptidase from kidney particles]. *Biochem Z*. 1963 Dec 3;339:186-9. German. PMID: 14206227.
- [155] Feracci H, Maroux S. Rabbit intestinal aminopeptidase N. Purification and molecular properties. *Biochim Biophys Acta*. 1980 Jul;599(2):448-63. doi: 10.1016/0005-2736(80)90190-x. PMID: 6105876.
- [156] Griffin JD, Mayer RJ, Weinstein HJ, Rosenthal DS, Coral FS, Beveridge RP, Schlossman SF. Surface marker analysis of acute myeloblastic leukemia: identification of differentiation-associated phenotypes. *Blood*. 1983 Sep;62(3):557-63. PMID: 6309279.
- [157] Bernard A, Boumsell L. Les antigènes de différenciation leucocytaire humains [Human leukocyte differentiation antigens]. *Presse Med*. 1984 Oct 27;13(38):2311-6. French. PMID: 6239187.
- [158] Griffin JD, Ritz J, Nadler LM, Schlossman SF. Expression of myeloid differentiation antigens on normal and malignant myeloid cells. *J Clin Invest*. 1981 Oct;68(4):932-41. doi: 10.1172/jci110348. PMID: 6945311; PMCID: PMC370880.
- [159] Look AT, Ashmun RA, Shapiro LH, Peiper SC. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J Clin Invest*. 1989 Apr;83(4):1299-307. doi: 10.1172/JCI114015. PMID: 2564851; PMCID: PMC303821.
- [160] Hooper NM. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett*. 1994 Oct 31;354(1):1-6. doi: 10.1016/0014-5793(94)01079-x. PMID: 7957888.
- [161] Danielsen EM. Dimeric assembly of enterocyte brush border enzymes. *Biochemistry*. 1994 Feb 15;33(6):1599-605. doi: 10.1021/bi00172a041. PMID: 7906143.

- [162] Jung K, Pergande M, Wischke UW. Characterization of particulate and soluble variants of the brush-border enzymes alanine aminopeptidase, alkaline phosphatase and gamma-glutamyltransferase in human urine. *Biomed Biochim Acta*. 1984;43(12):1357-64. PMID: 6152536.
- [163] Favalaro EJ, Browning T, Facey D. CD13 (GP150; aminopeptidase-N): predominant functional activity in blood is localized to plasma and is not cell-surface associated. *Exp Hematol*. 1993 Dec;21(13):1695-701. PMID: 7902291.
- [164] Wong AH, Zhou D, Rini JM. The X-ray crystal structure of human aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for peptide processing. *J Biol Chem*. 2012 Oct 26;287(44):36804-13. doi: 10.1074/jbc.M112.398842. Epub 2012 Aug 29. PMID: 22932899; PMCID: PMC3481283.
- [165] Santiago C, Mudgal G, Reguera J, Recacha R, Albrecht S, Enjuanes L, Casasnovas JM. Allosteric inhibition of aminopeptidase N functions related to tumor growth and virus infection. *Sci Rep*. 2017 Apr 10;7:46045. doi: 10.1038/srep46045. PMID: 28393915; PMCID: PMC5385526.
- [166] Riemann D, Kehlen A, Langner J. CD13--not just a marker in leukemia typing. *Immunol Today*. 1999 Feb;20(2):83-8. doi: 10.1016/s0167-5699(98)01398-x. PMID: 10098327; PMCID: PMC7141563.
- [167] Mina-Osorio P. The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends Mol Med*. 2008 Aug;14(8):361-71. doi: 10.1016/j.molmed.2008.06.003. Epub 2008 Jul 5. PMID: 18603472; PMCID: PMC7106361.
- [168] O'Connell PJ, Gerkis V, d'Apice AJ. Variable O-glycosylation of CD13 (aminopeptidase N). *J Biol Chem*. 1991 Mar 5;266(7):4593-7. PMID: 1705556.
- [169] Norén K, Hansen GH, Clausen H, Norén O, Sjöström H, Vogel LK. Defectively N-glycosylated and non-O-glycosylated aminopeptidase N (CD13) is normally expressed at the cell surface and has full enzymatic activity. *Exp Cell Res*. 1997 Feb 25;231(1):112-8. doi: 10.1006/excr.1996.3455. PMID: 9056417.
- [170] Barnieh FM, Galuska SP, Loadman PM, Ward S, Falconer RA, El-Khamisy SF. Cancer-specific glycosylation of CD13 impacts its detection and activity in preclinical cancer tissues. *iScience*. 2023 Oct 16;26(11):108219. doi: 10.1016/j.isci.2023.108219. PMID: 37942010; PMCID: PMC10628746.
- [171] Dixon J, Kaklamanis L, Turley H, Hickson ID, Leek RD, Harris AL, Gatter KC. Expression of aminopeptidase-n (CD 13) in normal tissues and malignant neoplasms of epithelial and lymphoid origin. *J Clin Pathol*. 1994 Jan;47(1):43-7. doi: 10.1136/jcp.47.1.43. PMID: 7907609; PMCID: PMC501755.
- [172] Ashmun RA, Look AT. Metalloprotease activity of CD13/aminopeptidase N on the surface of human myeloid cells. *Blood*. 1990 Jan 15;75(2):462-9. PMID: 1967220.

-
- [173] Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, Lahdenranta J, Sakamoto M, Stryhn A, Ashmun RA, Shapiro LH, Arap W, Ruoslahti E. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* 2000 Feb 1;60(3):722-7. PMID: 10676659; PMCID: PMC4469333.
- [174] Curnis F, Arrigoni G, Sacchi A, Fischetti L, Arap W, Pasqualini R, Corti A. Differential binding of drugs containing the NGR motif to CD13 isoforms in tumor vessels, epithelia, and myeloid cells. *Cancer Res.* 2002 Feb 1;62(3):867-74. PMID: 11830545.
- [175] Shapiro LH, Ashmun RA, Roberts WM, Look AT. Separate promoters control transcription of the human aminopeptidase N gene in myeloid and intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 1991 Jun 25;266(18):11999-2007. PMID: 1675638.
- [176] Luan Y, Xu W. The structure and main functions of aminopeptidase N. *Curr Med Chem.* 2007;14(6):639-47. doi: 10.2174/092986707780059571. PMID: 17346152.
- [177] Ward PE, Benter IF, Dick L, Wilk S. Metabolism of vasoactive peptides by plasma and purified renal aminopeptidase M. *Biochem Pharmacol.* 1990 Oct 15;40(8):1725-32. doi: 10.1016/0006-2952(90)90348-o. PMID: 1978675.
- [178] Gros C, Giros B, Schwartz JC. Identification of aminopeptidase M as an enkephalin-inactivating enzyme in rat cerebral membranes. *Biochemistry.* 1985 Apr 23;24(9):2179-85. doi: 10.1021/bi00330a011. PMID: 2859885.
- [179] Réaux A, de Mota N, Zini S, Cadel S, Fournié-Zaluski MC, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortès C. PC18, a specific aminopeptidase N inhibitor, induces vasopressin release by increasing the half-life of brain angiotensin III. *Neuroendocrinology.* 1999 May;69(5):370-6. doi: 10.1159/000054439. PMID: 10343178.
- [180] Danziger RS. Aminopeptidase N in arterial hypertension. *Heart Fail Rev.* 2008 Sep;13(3):293-8. doi: 10.1007/s10741-007-9061-y. Epub 2007 Nov 16. PMID: 18008160; PMCID: PMC7088157.
- [181] Bourne A, Barnes K, Taylor BA, Turner AJ, Kenny AJ. Membrane peptidases in the pig choroid plexus and on other cell surfaces in contact with the cerebrospinal fluid. *Biochem J.* 1989 Apr 1;259(1):69-80. doi: 10.1042/bj2590069. PMID: 2655579; PMCID: PMC1138474.
- [182] Rosenzweig M, Tailleux L, Gluckman JC. CD13/N-aminopeptidase is involved in the development of dendritic cells and macrophages from cord blood CD34(+) cells. *Blood.* 2000 Jan 15;95(2):453-60. PMID: 10627449.
- [183] Dong X, An B, Salvucci Kierstead L, Storkus WJ, Amoscato AA, Salter RD. Modification of the amino terminus of a class II epitope confers resistance to degradation by CD13 on dendritic cells and enhances presentation to T cells. *J*

- Immunol. 2000 Jan 1;164(1):129-35. doi: 10.4049/jimmunol.164.1.129. PMID: 10605003.
- [184] Yeager CL, Ashmun RA, Williams RK, Cardellichio CB, Shapiro LH, Look AT, Holmes KV. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature*. 1992 Jun 4;357(6377):420-2. doi: 10.1038/357420a0. PMID: 1350662; PMCID: PMC7095410.
- [185] Kolb AF, Hegyi A, Maile J, Heister A, Hagemann M, Siddell SG. Molecular analysis of the coronavirus-receptor function of aminopeptidase N. *Adv Exp Med Biol*. 1998;440:61-7. doi: 10.1007/978-1-4615-5331-1_8. PMID: 9782265.
- [186] Wentworth DE, Holmes KV. Molecular determinants of species specificity in the coronavirus receptor aminopeptidase N (CD13): influence of N-linked glycosylation. *J Virol*. 2001 Oct;75(20):9741-52. doi: 10.1128/JVI.75.20.9741-9752.2001. PMID: 11559807; PMCID: PMC114546.
- [187] Söderberg C, Giugni TD, Zaia JA, Larsson S, Wahlberg JM, Möller E. CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. *J Virol*. 1993 Nov;67(11):6576-85. doi: 10.1128/JVI.67.11.6576-6585.1993. PMID: 8105105; PMCID: PMC238095.
- [188] Rahbar A, Boström L, Söderberg-Naucler C. Detection of cytotoxic CD13-specific autoantibodies in sera from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Autoimmun*. 2006 May;26(3):155-64. doi: 10.1016/j.jaut.2006.02.003. Epub 2006 Apr 11. PMID: 16584867; PMCID: PMC7125970.
- [189] Dan H, Tani K, Hase K, Shimizu T, Tamiya H, Biraa Y, Huang L, Yanagawa H, Sone S. CD13/aminopeptidase N in collagen vascular diseases. *Rheumatol Int*. 2003 Nov;23(6):271-6. doi: 10.1007/s00296-003-0292-5. Epub 2003 Sep 12. PMID: 13680152; PMCID: PMC7079914.
- [190] Wickström M, Larsson R, Nygren P, Gullbo J. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Sci*. 2011 Mar;102(3):501-8. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01826.x. Epub 2011 Jan 30. PMID: 21205077; PMCID: PMC7188354.
- [191] Ranogajec I, Jakić-Razumović J, Puzović V, Gabrilovac J. Prognostic value of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and aminopeptidase N/CD13 in breast cancer patients. *Med Oncol*. 2012 Jun;29(2):561-9. doi: 10.1007/s12032-011-9984-y. Epub 2011 May 25. PMID: 21611838.
- [192] Surowiak P, Drag M, Materna V, Suchocki S, Grzywa R, Spaczyński M, Dietel M, Oleksyszyn J, Zabel M, Lage H. Expression of aminopeptidase N/CD13 in human ovarian cancers. *Int J Gynecol Cancer*. 2006 Sep-Oct;16(5):1783-8. doi: 10.1111/j.1525-1438.2006.00657.x. PMID: 17009972.

- [193] Kehlen A, Lendeckel U, Dralle H, Langner J, Hoang-Vu C. Biological significance of aminopeptidase N/CD13 in thyroid carcinomas. *Cancer Res.* 2003 Dec 1;63(23):8500-6. PMID: 14679016.
- [194] Ikeda N, Nakajima Y, Tokuhara T, Hattori N, Sho M, Kanehiro H, Miyake M. Clinical significance of aminopeptidase N/CD13 expression in human pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2003 Apr;9(4):1503-8. PMID: 12684426.
- [195] Hashida H, Takabayashi A, Kanai M, Adachi M, Kondo K, Kohno N, Yamaoka Y, Miyake M. Aminopeptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: its clinical significance in human colon cancer. *Gastroenterology.* 2002 Feb;122(2):376-86. doi: 10.1053/gast.2002.31095. PMID: 11832452.
- [196] Tokuhara T, Hattori N, Ishida H, Hirai T, Higashiyama M, Kodama K, Miyake M. Clinical significance of aminopeptidase N in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2006 Jul 1;12(13):3971-8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0338. PMID: 16818694.
- [197] Pang L, Zhang N, Xia Y, Wang D, Wang G, Meng X. Serum APN/CD13 as a novel diagnostic and prognostic biomarker of pancreatic cancer. *Oncotarget.* 2016 Nov 22;7(47):77854-77864. doi: 10.18632/oncotarget.12835. PMID: 27788483; PMCID: PMC5363626.
- [198] Song, Y. & Liu, P. & Wang, C. & Zhang, Q. & Ge, X. & Zhuang, A. & Zhou, H.. 2017. The clinical significance and expression of TGF- β 1 and CD13 in primary lesion and metastasis of gastric cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine.* 10. 10643-10651.
- [199] Ishii K, Usui S, Yamamoto H, Sugimura Y, Tatematsu M, Hirano K. Decreases of metallothionein and aminopeptidase N in renal cancer tissues. *J Biochem.* 2001 Feb;129(2):253-8. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a002852. PMID: 11173527; PMCID: PMC7109645.
- [200] Liu S, Xie F, Wang H, Liu Z, Liu X, Sun L, Niu Z. Ubenimex inhibits cell proliferation, migration and invasion in renal cell carcinoma: the effect is autophagy-associated. *Oncol Rep.* 2015 Mar;33(3):1372-80. doi: 10.3892/or.2014.3693. Epub 2014 Dec 23. PMID: 25571917.
- [201] Sanz B, Perez I, Beitia M, Errarte P, Fernández A, Blanco L, Estalella I, Loizate A, Irazusta J, López JI, Larrinaga G. Aminopeptidase N activity predicts 5-year survival in colorectal cancer patients. *J Investig Med.* 2015 Jun;63(5):740-6. doi: 10.1097/JIM.0000000000000199. PMID: 25929234.
- [202] Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Barnard GF, Mori M. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells.* 2006 Mar;24(3):506-13. doi: 10.1634/stemcells.2005-0282. Epub 2005 Oct 20. PMID: 16239320.

- [203] Cardinale V, Renzi A, Carpino G, Torrice A, Bragazzi MC, Giuliente F, DeRose AM, Fraveto A, Onori P, Napoletano C, Franchitto A, Cantafora A, Grazi G, Caporaso N, D'Argenio G, Alpini G, Reid LM, Gaudio E, Alvaro D. Profiles of cancer stem cell subpopulations in cholangiocarcinomas. *Am J Pathol*. 2015 Jun;185(6):1724-39. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.02.010. Epub 2015 Apr 17. PMID: 25892683; PMCID: PMC4450332.
- [204] Zhu P, Fan Z. Cancer stem cells and tumorigenesis. *Biophys Rep*. 2018;4(4):178-188. doi: 10.1007/s41048-018-0062-2. Epub 2018 Aug 29. PMID: 30310855; PMCID: PMC6153490.
- [205] Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, Tanaka F, Ohkuma M, Kim HM, Akita H, Takiuchi D, Hatano H, Nagano H, Barnard GF, Doki Y, Mori M. CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *J Clin Invest*. 2010 Sep;120(9):3326-39. doi: 10.1172/JCI42550. Epub 2010 Aug 9. PMID: 20697159; PMCID: PMC2929722.
- [206] Kim HM, Haraguchi N, Ishii H, Ohkuma M, Okano M, Mimori K, Eguchi H, Yamamoto H, Nagano H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. Increased CD13 expression reduces reactive oxygen species, promoting survival of liver cancer stem cells via an epithelial-mesenchymal transition-like phenomenon. *Ann Surg Oncol*. 2012 Jul;19 Suppl 3:S539-48. doi: 10.1245/s10434-011-2040-5. Epub 2011 Aug 31. PMID: 21879266.
- [207] Yamashita M, Wada H, Eguchi H, Ogawa H, Yamada D, Noda T, Asaoka T, Kawamoto K, Gotoh K, Umeshita K, Doki Y, Mori M. A CD13 inhibitor, ubenimex, synergistically enhances the effects of anticancer drugs in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*. 2016 Jul;49(1):89-98. doi: 10.3892/ijo.2016.3496. Epub 2016 Apr 25. PMID: 27121124; PMCID: PMC4902077.
- [208] Sun ZP, Zhang J, Shi LH, Zhang XR, Duan Y, Xu WF, Dai G, Wang XJ. Aminopeptidase N inhibitor 4cc synergizes antitumor effects of 5-fluorouracil on human liver cancer cells through ROS-dependent CD13 inhibition. *Biomed Pharmacother*. 2015 Dec;76:65-72. doi: 10.1016/j.biopha.2015.10.023. Epub 2015 Nov 10. PMID: 26653552.
- [209] Hu B, Xu Y, Li YC, Huang JF, Cheng JW, Guo W, Yin Y, Gao Y, Wang PX, Wu SY, Zhou J, Fan J, Yang XR. CD13 promotes hepatocellular carcinogenesis and sorafenib resistance by activating HDAC5-LSD1-NF- κ B oncogenic signaling. *Clin Transl Med*. 2020 Dec;10(8):e233. doi: 10.1002/ctm2.233. PMID: 33377659; PMCID: PMC7708822.
- [210] Menrad A, Speicher D, Wacker J, Herlyn M. Biochemical and functional characterization of aminopeptidase N expressed by human melanoma cells. *Cancer Res*. 1993 Mar 15;53(6):1450-5. PMID: 8095183.

- [211] Mina-Osorio P, Shapiro LH, Ortega E. CD13 in cell adhesion: aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells. *J Leukoc Biol.* 2006 Apr;79(4):719-30. doi: 10.1189/jlb.0705425. Epub 2006 Jan 13. PMID: 16415167; PMCID: PMC7166514.
- [212] Mina-Osorio P, Soto-Cruz I, Ortega E. A role for galectin-3 in CD13-mediated homotypic aggregation of monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Feb 16;353(3):605-10. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.12.081. Epub 2006 Dec 20. PMID: 17189612; PMCID: PMC7173192.
- [213] Mina-Osorio P, Winnicka B, O'Connor C, Grant CL, Vogel LK, Rodriguez-Pinto D, Holmes KV, Ortega E, Shapiro LH. CD13 is a novel mediator of monocytic/endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol.* 2008 Aug;84(2):448-59. doi: 10.1189/jlb.1107802. Epub 2008 May 21. PMID: 18495788; PMCID: PMC2493070.
- [214] Fukasawa K, Fujii H, Saitoh Y, Koizumi K, Aozuka Y, Sekine K, Yamada M, Saiki I, Nishikawa K. Aminopeptidase N (APN/CD13) is selectively expressed in vascular endothelial cells and plays multiple roles in angiogenesis. *Cancer Lett.* 2006 Nov 8;243(1):135-43. doi: 10.1016/j.canlet.2005.11.051. Epub 2006 Feb 7. PMID: 16466852.
- [215] Pasqualini R, Koivunen E, Ruoslahti E. A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *J Cell Biol.* 1995 Sep;130(5):1189-96. doi: 10.1083/jcb.130.5.1189. PMID: 7657703; PMCID: PMC2120548.
- [216] Curnis F, Sacchi A, Borgna L, Magni F, Gasparri A, Corti A. Enhancement of tumor necrosis factor alpha antitumor immunotherapeutic properties by targeted delivery to aminopeptidase N (CD13). *Nat Biotechnol.* 2000 Nov;18(11):1185-90. doi: 10.1038/81183. PMID: 11062439.
- [217] Bhagwat SV, Lahdenranta J, Giordano R, Arap W, Pasqualini R, Shapiro LH. CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood.* 2001 Feb 1;97(3):652-9. doi: 10.1182/blood.v97.3.652. PMID: 11157481; PMCID: PMC4470622.
- [218] Rangel R, Sun Y, Guzman-Rojas L, Ozawa MG, Sun J, Giordano RJ, Van Pelt CS, Tinkey PT, Behringer RR, Sidman RL, Arap W, Pasqualini R. Impaired angiogenesis in aminopeptidase N-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 13;104(11):4588-93. doi: 10.1073/pnas.0611653104. Epub 2007 Mar 7. PMID: 17360568; PMCID: PMC1815469.
- [219] Guzman-Rojas L, Rangel R, Salameh A, Edwards JK, Dondossola E, Kim YG, Saghatelian A, Giordano RJ, Kolonin MG, Staquicini FI, Koivunen E, Sidman RL, Arap W, Pasqualini R. Cooperative effects of aminopeptidase N (CD13) expressed by nonmalignant and cancer cells within the tumor microenvironment.

- Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jan 31;109(5):1637-42. doi: 10.1073/pnas.1120790109. Epub 2012 Jan 17. PMID: 22307623; PMCID: PMC3277167.
- [220] Barnieh FM, Loadman PM, Falconer RA. Is tumour-expressed aminopeptidase N (APN/CD13) structurally and functionally unique? *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2021 Dec;1876(2):188641. doi: 10.1016/j.bbcan.2021.188641. Epub 2021 Oct 22. PMID: 34695533.
- [221] Bauvois B, Dauzonne D. Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. *Med Res Rev*. 2006 Jan;26(1):88-130. doi: 10.1002/med.20044. PMID: 16216010; PMCID: PMC7168514.
- [222] Zhang J, Sun S, Liu J, Zhang L, Guo D, Zhang N, Zhao J, Kong D, Xu T, Wang X, et al. Discovery of a Novel Ubenimex Derivative as a First-in-Class Dual CD13/Proteasome Inhibitor for the Treatment of Cancer. *Molecules*. 2023; 28(17):6343. <https://doi.org/10.3390/molecules28176343>.
- [223] Yang E, Shim JS, Woo HJ, Kim KW, Kwon HJ. Aminopeptidase N/CD13 induces angiogenesis through interaction with a pro-angiogenic protein, galectin-3. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Nov 16;363(2):336-41. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.08.179. Epub 2007 Sep 7. PMID: 17888402.
- [224] Sirintrapun SJ, Zehir A, Syed A, Gao J, Schultz N, Cheng DT. Translational Bioinformatics and Clinical Research (Biomedical) Informatics. *Surg Pathol Clin*. 2015 Jun;8(2):269-88. doi: 10.1016/j.path.2015.02.015. Epub 2015 Mar 31. PMID: 26065800.
- [225] Chandrashekar DS, Karthikeyan SK, Korla PK, Patel H, Shovon AR, Athar M, Netto GJ, Qin ZS, Kumar S, Manne U, Creighton CJ, Varambally S. UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia*. 2022 Mar;25:18-27. doi: 10.1016/j.neo.2022.01.001. Epub 2022 Jan 22. PMID: 35078134; PMCID: PMC8788199.
- [226] Menyhárt O, Nagy Á, Györfy B. Determining consistent prognostic biomarkers of overall survival and vascular invasion in hepatocellular carcinoma. *R Soc Open Sci*. 2018 Dec 5;5(12):181006. doi: 10.1098/rsos.181006. PMID: 30662724; PMCID: PMC6304123.
- [227] Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*. 2012 May;2(5):401-4. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0095. Erratum in: *Cancer Discov*. 2012 Oct;2(10):960. PMID: 22588877; PMCID: PMC3956037.

- [228] Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*. 2013 Apr 2;6(269):p11. doi: 10.1126/scisignal.2004088. PMID: 23550210; PMCID: PMC4160307.
- [229] Rizzolio S, Corso S, Giordano S, Tamagnone L. Autocrine Signaling of NRP1 Ligand Galectin-1 Elicits Resistance to BRAF-Targeted Therapy in Melanoma Cells. *Cancers (Basel)*. 2020 Aug 8;12(8):2218. doi: 10.3390/cancers12082218. PMID: 32784465; PMCID: PMC7463444.
- [230] Chen L, Zhang C, Xue R, Liu M, Bai J, Bao J, Wang Y, Jiang N, Li Z, Wang W, Wang R, Zheng B, Yang A, Hu J, Liu K, Shen S, Zhang Y, Bai M, Wang Y, Zhu Y, Yang S, Gao Q, Gu J, Gao D, Wang XW, Nakagawa H, Zhang N, Wu L, Rozen SG, Bai F, Wang H. Deep whole-genome analysis of 494 hepatocellular carcinomas. *Nature*. 2024 Mar;627(8004):586-593. doi: 10.1038/s41586-024-07054-3. Epub 2024 Feb 14. PMID: 38355797.
- [231] MacParland SA, Liu JC, Ma XZ, Innes BT, Bartczak AM, Gage BK, Manuel J, Khuu N, Echeverri J, Linares I, Gupta R, Cheng ML, Liu LY, Camat D, Chung SW, Seliga RK, Shao Z, Lee E, Ogawa S, Ogawa M, Wilson MD, Fish JE, Selzner M, Ghanekar A, Grant D, Greig P, Sapisochin G, Selzner N, Winegarden N, Adeyi O, Keller G, Bader GD, McGilvray ID. Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations. *Nat Commun*. 2018 Oct 22;9(1):4383. doi: 10.1038/s41467-018-06318-7. PMID: 30348985; PMCID: PMC6197289.
- [232] Poisson J, Lemoine S, Boulanger C, Durand F, Moreau R, Valla D, Rautou PE. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *J Hepatol*. 2017 Jan;66(1):212-227. doi: 10.1016/j.jhep.2016.07.009. Epub 2016 Jul 14. PMID: 27423426.
- [233] McInnes L, Healy J, Melville J. UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction. 2018, doi: 10.48550/arXiv.1802.03426.
- [234] Scoazec JY, Feldmann G. In situ immunophenotyping study of endothelial cells of the human hepatic sinusoid: results and functional implications. *Hepatology*. 1991 Nov;14(5):789-97. doi: 10.1002/hep.1840140508. PMID: 1937383.
- [235] Jin H, Zhang C, Zwahlen M, von Feilitzen K, Karlsson M, Shi M, Yuan M, Song X, Li X, Yang H, Turkez H, Fagerberg L, Uhlén M, Mardinoglu A. Systematic transcriptional analysis of human cell lines for gene expression landscape and tumor representation. *Nat Commun*. 2023 Sep 5;14(1):5417. doi: 10.1038/s41467-023-41132-w. PMID: 37669926; PMCID: PMC10480497.
- [236] Tai Y, Gao JH, Zhao C, Tong H, Zheng SP, Huang ZY, Liu R, Tang CW, Li J. SK-Hep1: not hepatocellular carcinoma cells but a cell model for liver sinusoidal

- endothelial cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018 May 1;11(5):2931-2938. PMID: 31938418; PMCID: PMC6958242.
- [237] Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigyaró CA, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J, Pontén F. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015 Jan 23;347(6220):1260419. doi: 10.1126/science.1260419. PMID: 25613900.
- [238] Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R, Gable AL, Fang T, Doncheva NT, Pyysalo S, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res*. 2023 Jan 6;51(D1):D638-D646. doi: 10.1093/nar/gkac1000. PMID: 36370105; PMCID: PMC9825434.
- [239] Kovak MR, Saraswati S, Goddard SD, Diekman AB. Proteomic identification of galectin-3 binding ligands and characterization of galectin-3 proteolytic cleavage in human prostasomes. *Andrology*. 2013 Sep;1(5):682-91. doi: 10.1111/j.2047-2927.2013.00099.x. Epub 2013 Jul 9. PMID: 23836758; PMCID: PMC4180284.
- [240] Kovak MR, Saraswati S, Schoen DJ, Diekman AB. Investigation of galectin-3 function in the reproductive tract by identification of binding ligands in human seminal plasma. *Am J Reprod Immunol*. 2014 Oct;72(4):403-12. doi: 10.1111/aji.12273. Epub 2014 May 23. PMID: 24863808; PMCID: PMC4180297.
- [241] Villaseñor-Cardoso MI, Frausto-Del-Río DA, Ortega E. Aminopeptidase N (CD13) is involved in phagocytic processes in human dendritic cells and macrophages. *Biomed Res Int*. 2013;2013:562984. doi: 10.1155/2013/562984. Epub 2013 Aug 26. PMID: 24063007; PMCID: PMC3766993.
- [242] Danielsen EM, van Deurs B. Galectin-4 and small intestinal brush border enzymes form clusters. *Mol Biol Cell*. 1997 Nov;8(11):2241-51. doi: 10.1091/mbc.8.11.2241. PMID: 9362066; PMCID: PMC25705.
- [243] Du X, Li Y, Xia YL, Ai SM, Liang J, Sang P, Ji XL, Liu SQ. Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *Int J Mol Sci*. 2016 Jan 26;17(2):144. doi: 10.3390/ijms17020144. PMID: 26821017; PMCID: PMC4783878.
- [244] Wu Y, Li Q, Chen XZ. Detecting protein-protein interactions by Far western blotting. *Nat Protoc*. 2007;2(12):3278-84. doi: 10.1038/nprot.2007.459. PMID: 18079728.

- [245] Walsh BW, Lenhart JS, Schroeder JW, Simmons LA. Far Western blotting as a rapid and efficient method for detecting interactions between DNA replication and DNA repair proteins. *Methods Mol Biol.* 2012;922:161-8. doi: 10.1007/978-1-62703-032-8_11. PMID: 22976184; PMCID: PMC4257131.
- [246] Guan X. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm Sin B.* 2015 Sep;5(5):402-18. doi: 10.1016/j.apsb.2015.07.005. Epub 2015 Sep 8. PMID: 26579471; PMCID: PMC4629446.
- [247] Brooks SA, Lomax-Browne HJ, Carter TM, Kinch CE, Hall DM. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem.* 2010;112(1):3-25. doi: 10.1016/j.acthis.2008.11.022. Epub 2009 Jan 21. PMID: 19162308.
- [248] Elola MT, Wolfenstein-Todel C, Troncoso MF, Vasta GR, Rabinovich GA. Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Jul;64(13):1679-700. doi: 10.1007/s00018-007-7044-8. PMID: 17497244; PMCID: PMC11136145.
- [249] Ito K, Scott SA, Cutler S, Dong LF, Neuzil J, Blanchard H, Ralph SJ. Thiodigalactoside inhibits murine cancers by concurrently blocking effects of galectin-1 on immune dysregulation, angiogenesis and protection against oxidative stress. *Angiogenesis.* 2011 Sep;14(3):293-307. doi: 10.1007/s10456-011-9213-5. Epub 2011 Apr 27. PMID: 21523436; PMCID: PMC3155035.
- [250] Akita S, Hattori N, Masuda T, Horimasu Y, Nakashima T, Iwamoto H, Fujitaka K, Miyake M, Kohno N. MT95-4, a fully humanized antibody raised against aminopeptidase N, reduces tumor progression in a mouse model. *Cancer Sci.* 2015 Jul;106(7):921-8. doi: 10.1111/cas.12692. Epub 2015 May 29. PMID: 25950387; PMCID: PMC4520645.
- [251] Arnaoutova I, Kleinman HK. In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nat Protoc.* 2010 Apr;5(4):628-35. doi: 10.1038/nprot.2010.6. Epub 2010 Mar 11. PMID: 20224563.
- [252] Saiki I, Fujii H, Yoneda J, Abe F, Nakajima M, Tsuruo T, Azuma I. Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation. *Int J Cancer.* 1993 Apr 22;54(1):137-43. doi: 10.1002/ijc.2910540122. PMID: 8097496; PMCID: PMC7165932.
- [253] Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, Soerjomataram I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer.* 2021 Aug 15;127(16):3029-3030. doi: 10.1002/cncr.33587. Epub 2021 Jun 4. PMID: 34086348.
- [254] Rumgay H, Arnold M, Ferlay J, Lesi O, Cabasag CJ, Vignat J, Laversanne M, McGlynn KA, Soerjomataram I. Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040. *J Hepatol.* 2022 Dec;77(6):1598-1606. doi:

- 10.1016/j.jhep.2022.08.021. Epub 2022 Oct 5. PMID: 36208844; PMCID: PMC9670241.
- [255] Cousin JM, Cloninger MJ. The Role of Galectin-1 in Cancer Progression, and Synthetic Multivalent Systems for the Study of Galectin-1. *Int J Mol Sci*. 2016 Sep 16;17(9):1566. doi: 10.3390/ijms17091566. PMID: 27649167; PMCID: PMC5037834.
- [256] Compagno D, Gentilini LD, Jaworski FM, Pérez IG, Contrufo G, Laderach DJ. Glycans and galectins in prostate cancer biology, angiogenesis and metastasis. *Glycobiology*. 2014 Oct;24(10):899-906. doi: 10.1093/glycob/cwu055. Epub 2014 Jun 16. PMID: 24939371.
- [257] Lendeckel U, Karimi F, Al Abdulla R, Wolke C. The Role of the Ectopeptidase APN/CD13 in Cancer. *Biomedicines*. 2023 Feb 28;11(3):724. doi: 10.3390/biomedicines11030724. PMID: 36979703; PMCID: PMC10045183.
- [258] Chung EJ, Sung YK, Farooq M, Kim Y, Im S, Tak WY, Hwang YJ, Kim YI, Han HS, Kim JC, Kim MK. Gene expression profile analysis in human hepatocellular carcinoma by cDNA microarray. *Mol Cells*. 2002 Dec 31;14(3):382-7. PMID: 12521301.
- [259] Li T, Fan J, Wang B, Traugh N, Chen Q, Liu JS, Li B, Liu XS. TIMER: A Web Server for Comprehensive Analysis of Tumor-Infiltrating Immune Cells. *Cancer Res*. 2017 Nov 1;77(21):e108-e110. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0307. PMID: 29092952; PMCID: PMC6042652.
- [260] Gheysen L, Soumoy L, Trelcat A, Verset L, Journe F, Saussez S. New Treatment Strategy Targeting Galectin-1 against Thyroid Cancer. *Cells*. 2021 May 5;10(5):1112. doi: 10.3390/cells10051112. PMID: 34063063; PMCID: PMC8147933.
- [261] Arcolia V, Journe F, Wattier A, Leteurtre E, Renaud F, Gabius HJ, Rummelink M, Decaestecker C, Rodriguez A, Boutry S, Laurent S, Saussez S. Galectin-1 is a diagnostic marker involved in thyroid cancer progression. *Int J Oncol*. 2017 Sep;51(3):760-770. doi: 10.3892/ijo.2017.4065. Epub 2017 Jul 4. PMID: 28677745; PMCID: PMC5564411.
- [262] Chou SY, Yen SL, Huang CC, Huang EY. Galectin-1 is a poor prognostic factor in patients with glioblastoma multiforme after radiotherapy. *BMC Cancer*. 2018 Jan 30;18(1):105. doi: 10.1186/s12885-018-4025-2. PMID: 29378529; PMCID: PMC5789739.
- [263] Cui Y, Yan M, Wu W, Lv P, Wang J, Huo Y, Lou Y, Ma X, Chang J, Guan F, Cao W. ESCCAL-1 promotes cell-cycle progression by interacting with and stabilizing galectin-1 in esophageal squamous cell carcinoma. *NPJ Precis Oncol*. 2022 Mar 1;6(1):12. doi: 10.1038/s41698-022-00255-x. PMID: 35233069; PMCID: PMC8888636.

- [264] Wang R, Sun Q, Wang P, Liu M, Xiong S, Luo J, Huang H, Du Q, Geller DA, Cheng B. Notch and Wnt/ β -catenin signaling pathway play important roles in activating liver cancer stem cells. *Oncotarget*. 2016 Feb 2;7(5):5754-68. doi: 10.18632/oncotarget.6805. PMID: 26735577; PMCID: PMC4868719.
- [265] Zhai M, Yang Z, Zhang C, Li J, Jia J, Zhou L, Lu R, Yao Z, Fu Z. APN-mediated phosphorylation of BCKDK promotes hepatocellular carcinoma metastasis and proliferation via the ERK signaling pathway. *Cell Death Dis*. 2020 May 26;11(5):396. doi: 10.1038/s41419-020-2610-1. PMID: 32457292; PMCID: PMC7249043.
- [266] Schmidt LH, Brand C, Stucke-Ring J, Schliemann C, Kessler T, Harrach S, Mohr M, Görlich D, Marra A, Hillejan L, Müller-Tidow C, Lenz G, Wardelmann E, Wiewrodt R, Berdel WE, Schwöppe C, Hartmann W. Potential therapeutic impact of CD13 expression in non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2017 Jun 12;12(6):e0177146. doi: 10.1371/journal.pone.0177146. Erratum in: *PLoS One*. 2017 Aug 9;12(8):e0183201. doi: 10.1371/journal.pone.0183201. PMID: 28604784; PMCID: PMC5467809.
- [267] Ikeda N, Nakajima Y, Tokuhara T, Hattori N, Sho M, Kanehiro H, Miyake M. Clinical significance of aminopeptidase N/CD13 expression in human pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2003 Apr;9(4):1503-8. PMID: 12684426.
- [268] Lefkowitz JH, "The Normal Liver", *Scheuer's Liver Biopsy Interpretation*, pp. 17–28, ene. 2016.
- [269] Thijssen VLJL. Vascular galectins in tumor angiogenesis and cancer immunity. *Semin Immunopathol*. 2024 Jul 11;46(1-2):3. doi: 10.1007/s00281-024-01014-9. PMID: 38990363; PMCID: PMC11239785.
- [270] Stowell SR, Arthur CM, Mehta P, Slanina KA, Blixt O, Leffler H, Smith DF, Cummings RD. Galectin-1, -2, and -3 exhibit differential recognition of sialylated glycans and blood group antigens. *J Biol Chem*. 2008 Apr 11;283(15):10109-23. doi: 10.1074/jbc.M709545200. Epub 2008 Jan 23. PMID: 18216021; PMCID: PMC2442294.
- [271] Toscano MA, Martínez Allo VC, Cutine AM, Rabinovich GA, Mariño KV. Untangling Galectin-Driven Regulatory Circuits in Autoimmune Inflammation. *Trends Mol Med*. 2018 Apr;24(4):348-363. doi: 10.1016/j.molmed.2018.02.008. Epub 2018 Mar 16. PMID: 29555188.
- [272] Farhad M, Rolig AS, Redmond WL. The role of Galectin-3 in modulating tumor growth and immunosuppression within the tumor microenvironment. *Oncoimmunology*. 2018 Feb 20;7(6):e1434467. doi: 10.1080/2162402X.2018.1434467. PMID: 29872573; PMCID: PMC5980349.
- [273] Mendez-Huergo SP, Hockl PF, Stupirski JC, Maller SM, Morosi LG, Pinto NA, Berón AM, Musuruana JL, Nasswetter GG, Cavallasca JA, Rabinovich GA.

- Clinical Relevance of Galectin-1 and Galectin-3 in Rheumatoid Arthritis Patients: Differential Regulation and Correlation With Disease Activity. *Front Immunol.* 2019 Jan 9;9:3057. doi: 10.3389/fimmu.2018.03057. PMID: 30687310; PMCID: PMC6333668.
- [274] Sindrewicz P, Lian LY, Yu LG. Interaction of the Oncofetal Thomsen-Friedenreich Antigen with Galectins in Cancer Progression and Metastasis. *Front Oncol.* 2016 Mar 31;6:79. doi: 10.3389/fonc.2016.00079. PMID: 27066458; PMCID: PMC4814717.
- [275] Yakovlev, A.A. Crosslinkers and their utilization for studies of intermolecular interactions. *Neurochem. J.* **3**, 139–144 (2009). <https://doi.org/10.1134/S181971240902010X>.
- [276] Clark MC, Pang M, Hsu DK, Liu FT, de Vos S, Gascoyne RD, Said J, Baum LG. Galectin-3 binds to CD45 on diffuse large B-cell lymphoma cells to regulate susceptibility to cell death. *Blood.* 2012 Nov 29;120(23):4635–44. doi: 10.1182/blood-2012-06-438234. Epub 2012 Oct 12. PMID: 23065155; PMCID: PMC3512238.
- [277] Piyush T, Chacko AR, Sindrewicz P, Hilkens J, Rhodes JM, Yu LG. Interaction of galectin-3 with MUC1 on cell surface promotes EGFR dimerization and activation in human epithelial cancer cells. *Cell Death Differ.* 2017 Nov;24(11):1937–1947. doi: 10.1038/cdd.2017.119. Epub 2017 Jul 21. PMID: 28731466; PMCID: PMC5635220.
- [278] Tanaka Y, Kohler JJ. Photoactivatable crosslinking sugars for capturing glycoprotein interactions. *J Am Chem Soc.* 2008 Mar 19;130(11):3278–9. doi: 10.1021/ja7109772. Epub 2008 Feb 23. PMID: 18293988.
- [279] Drake PM, Cho W, Li B, Prakobphol A, Johansen E, Anderson NL, Regnier FE, Gibson BW, Fisher SJ. Sweetening the pot: adding glycosylation to the biomarker discovery equation. *Clin Chem.* 2010 Feb;56(2):223–36. doi: 10.1373/clinchem.2009.136333. Epub 2009 Dec 3. PMID: 19959616; PMCID: PMC2849286.
- [280] Ahmad N, Gabius HJ, André S, Kaltner H, Sabesan S, Roy R, Liu B, Macaluso F, Brewer CF. Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *J Biol Chem.* 2004 Mar 19;279(12):10841–7. doi: 10.1074/jbc.M312834200. Epub 2003 Dec 12. PMID: 14672941.
- [281] Symons A, Cooper DN, Barclay AN. Characterization of the interaction between galectin-1 and lymphocyte glycoproteins CD45 and Thy-1. *Glycobiology.* 2000 Jun;10(6):559–63. doi: 10.1093/glycob/10.6.559. PMID: 10814697.
- [282] Jouve N, Despoix N, Espeli M, Gauthier L, Cypowyj S, Fallague K, Schiff C, Dignat-George F, Vély F, Leroyer AS. The involvement of CD146 and its novel

- ligand Galectin-1 in apoptotic regulation of endothelial cells. *J Biol Chem*. 2013 Jan 25;288(4):2571-9. doi: 10.1074/jbc.M112.418848. Epub 2012 Dec 7. PMID: 23223580; PMCID: PMC3554924.
- [283] Zhang Z, Zheng Y, Wang H, Zhou Y, Tai G. CD146 interacts with galectin-3 to mediate endothelial cell migration. *FEBS Lett*. 2018 Jun;592(11):1817-1828. doi: 10.1002/1873-3468.13083. Epub 2018 May 24. PMID: 29741757.
- [284] Navarrete Santos A, Langner J, Riemann D. Enzymatic activity is not a precondition for the intracellular calcium increase mediated by mAbs specific for aminopeptidase N/CD13. *Adv Exp Med Biol*. 2000;477:43-7. doi: 10.1007/0-306-46826-3_4. PMID: 10849729.
- [285] Lotan R, Belloni PN, Tressler RJ, Lotan D, Xu XC, Nicolson GL. Expression of galectins on microvessel endothelial cells and their involvement in tumour cell adhesion. *Glycoconj J*. 1994 Oct;11(5):462-8. doi: 10.1007/BF00731282. PMID: 7696849.
- [286] Barrow H, Guo X, Wandall HH, Pedersen JW, Fu B, Zhao Q, Chen C, Rhodes JM, Yu LG. Serum galectin-2, -4, and -8 are greatly increased in colon and breast cancer patients and promote cancer cell adhesion to blood vascular endothelium. *Clin Cancer Res*. 2011 Nov 15;17(22):7035-46. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1462. Epub 2011 Sep 20. PMID: 21933892.
- [287] Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011 Sep 16;146(6):873-87. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.039. PMID: 21925313.
- [288] Shim JS, Kim JH, Cho HY, Yum YN, Kim SH, Park HJ, Shim BS, Choi SH, Kwon HJ. Irreversible inhibition of CD13/aminopeptidase N by the antiangiogenic agent curcumin. *Chem Biol*. 2003 Aug;10(8):695-704. doi: 10.1016/s1074-5521(03)00169-8. PMID: 12954328.
- [289] Adams L, Scott GK, Weinberg CS. Biphasic modulation of cell growth by recombinant human galectin-1. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Jun 13;1312(2):137-44. doi: 10.1016/0167-4889(96)00031-6. PMID: 8672536.
- [290] Vas V, Fajka-Boja R, Ion G, Dudics V, Monostori E, Uher F. Biphasic effect of recombinant galectin-1 on the growth and death of early hematopoietic cells. *Stem Cells*. 2005 Feb;23(2):279-87. doi: 10.1634/stemcells.2004-0084. PMID: 15671150.
- [291] Cedeno-Laurent F, Dimitroff CJ. Galectin-1 research in T cell immunity: past, present and future. *Clin Immunol*. 2012 Feb;142(2):107-16. doi: 10.1016/j.clim.2011.09.011. Epub 2011 Oct 6. PMID: 22019770; PMCID: PMC3266984.
- [292] Stevenson LK, Page AJ, Dowson M, ElBadry SK, Barnieh FM, Falconer RA, El-Khamisy SF. The DNA repair kinase ATM regulates CD13 expression and cell

- migration. *Front Cell Dev Biol.* 2024 Jun 12;12:1359105. doi: 10.3389/fcell.2024.1359105. PMID: 38933336; PMCID: PMC11199385.
- [293] Fujii H, Nakajima M, Saiki I, Yoneda J, Azuma I, Tsuruo T. Human melanoma invasion and metastasis enhancement by high expression of aminopeptidase N/CD13. *Clin Exp Metastasis.* 1995 Sep;13(5):337-44. doi: 10.1007/BF00121910. PMID: 7641419; PMCID: PMC7088232.
- [294] El-Brolosy MA, Stainier DYR. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet.* 2017 Jul 13;13(7):e1006780. doi: 10.1371/journal.pgen.1006780. PMID: 28704371; PMCID: PMC5509088.
- [295] Markowska AI, Liu FT, Panjwani N. Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response. *J Exp Med.* 2010 Aug 30;207(9):1981-93. doi: 10.1084/jem.20090121. Epub 2010 Aug 16. PMID: 20713592; PMCID: PMC2931172.
- [296] Zhang Z, Zheng Y, Wang H, Zhou Y, Tai G. CD146 interacts with galectin-3 to mediate endothelial cell migration. *FEBS Lett.* 2018 Jun;592(11):1817-1828. doi: 10.1002/1873-3468.13083. Epub 2018 May 24. PMID: 29741757.
- [297] Duan H, Zhao S, Xiang J, Ju C, Chen X, Gramaglia I, Yan X. Targeting the CD146/Galectin-9 axis protects the integrity of the blood-brain barrier in experimental cerebral malaria. *Cell Mol Immunol.* 2021 Oct;18(10):2443-2454. doi: 10.1038/s41423-020-00582-8. Epub 2020 Nov 17. PMID: 33203936; PMCID: PMC8484550.
- [298] Xu B, Shanmugalingam R, Chau K, Makris A, Hennessy A. Galectin-1-Related Modulation of Trophoblast Endothelial Interactions by Integrins $\alpha 1$ and $\beta 1$. *Reprod Sci.* 2020 May;27(5):1097-1109. doi: 10.1007/s43032-019-00046-z. Epub 2020 Apr 6. PMID: 32253734.
- [299] Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Dec 1;3(12):a005058. doi: 10.1101/cshperspect.a005058. PMID: 21917992; PMCID: PMC3225943.
- [300] Sekine K, Fujii H, Abe F. Induction of apoptosis by bestatin (ubenimex) in human leukemic cell lines. *Leukemia.* 1999 May;13(5):729-34. doi: 10.1038/sj.leu.2401388. PMID: 10374877.
- [301] van Hensbergen Y, Broxterman HJ, Peters E, Rana S, Elderkamp YW, van Hinsbergh VW, Koolwijk P. Aminopeptidase inhibitor bestatin stimulates microvascular endothelial cell invasion in a fibrin matrix. *Thromb Haemost.* 2003 Nov;90(5):921-9. doi: 10.1160/TH03-03-0144. PMID: 14597989.
- [302] Du Y, Lu C, Morgan RL, Stinson WA, Campbell PL, Cealey E, Fu W, Lepore NJ, Hervoso JL, Cui H, Urquhart AG, Lawton JN, Chung KC, Fox DA, Amin MA. Angiogenic and Arthritogenic Properties of the Soluble Form of CD13. *J*

- Immunol. 2019 Jul 15;203(2):360-369. doi: 10.4049/jimmunol.1801276. Epub 2019 Jun 12. PMID: 31189572; PMCID: PMC6644048.
- [303] Ghosh M, Subramani J, Rahman MM, Shapiro LH. CD13 restricts TLR4 endocytic signal transduction in inflammation. *J Immunol*. 2015 May 1;194(9):4466-76. doi: 10.4049/jimmunol.1403133. Epub 2015 Mar 23. PMID: 25801433; PMCID: PMC4402264.
- [304] Ghosh M, Lo R, Ivic I, Aguilera B, Qendro V, Devarakonda C, Shapiro LH. CD13 tethers the IQGAP1-ARF6-EFA6 complex to the plasma membrane to promote ARF6 activation, β 1 integrin recycling, and cell migration. *Sci Signal*. 2019 Apr 30;12(579):eaav5938. doi: 10.1126/scisignal.aav5938. PMID: 31040262; PMCID: PMC6756473.
- [305] Quintá HR, Wilson C, Blidner AG, González-Billault C, Pasquini LA, Rabinovich GA, Pasquini JM. Ligand-mediated Galectin-1 endocytosis prevents intraneural H₂O₂ production promoting F-actin dynamics reactivation and axonal re-growth. *Exp Neurol*. 2016 Sep;283(Pt A):165-78. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.06.009. Epub 2016 Jun 11. PMID: 27296316.
- [306] Fajka-Boja R, Blaskó A, Kovács-Sólyom F, Szebeni GJ, Tóth GK, Monostori E. Co-localization of galectin-1 with GM1 ganglioside in the course of its clathrin- and raft-dependent endocytosis. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Aug;65(16):2586-93. doi: 10.1007/s00018-008-8143-x. PMID: 18581052; PMCID: PMC11131775.
- [307] Lakshminarayan R, Wunder C, Becken U, Howes MT, Benzing C, Arumugam S, Sales S, Ariotti N, Chambon V, Lamaze C, Loew D, Shevchenko A, Gaus K, Parton RG, Johannes L. Galectin-3 drives glycosphingolipid-dependent biogenesis of clathrin-independent carriers. *Nat Cell Biol*. 2014 Jun;16(6):595-606. doi: 10.1038/ncb2970. Epub 2014 May 18. PMID: 24837829.
- [308] Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol*. 2010;11(3):R25. doi: 10.1186/gb-2010-11-3-r25. Epub 2010 Mar 2. PMID: 20196867; PMCID: PMC2864565.
- [309] Cogger VC, Arias IM, Warren A, McMahon AC, Kiss DL, Avery VM, Le Couteur DG. The response of fenestrations, actin, and caveolin-1 to vascular endothelial growth factor in SK Hep1 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008 Jul;295(1):G137-G145. doi: 10.1152/ajpgi.00069.2008. Epub 2008 May 22. PMID: 18497335; PMCID: PMC2494729.
- [310] Heffelfinger SC, Hawkins HH, Barrish J, Taylor L, Darlington GJ. SK HEP-1: a human cell line of endothelial origin. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1992 Feb;28A(2):136-42. doi: 10.1007/BF02631017. PMID: 1371504.
- [311] Drexler HG, Uphoff CC. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*. 2002

- Jul;39(2):75-90. doi: 10.1023/A:1022913015916. PMID: 19003295; PMCID: PMC3463982.
- [312] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 2014 Jun 5;157(6):1262-1278. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.010. PMID: 24906146; PMCID: PMC4343198.
- [313] van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2014 Jul;12(7):479-92. doi: 10.1038/nrmicro3279. Epub 2014 Jun 9. PMID: 24909109; PMCID: PMC4225775.
- [314] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 2013 Sep 12;154(6):1380-9. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.021. Epub 2013 Aug 29. Erratum in: *Cell*. 2013 Oct 10;155(2):479-80. PMID: 23992846; PMCID: PMC3856256.
- [315] Chong ZX, Yeap SK, Ho WY. Transfection types, methods and strategies: a technical review. *PeerJ*. 2021 Apr 21;9:e11165. doi: 10.7717/peerj.11165. PMID: 33976969; PMCID: PMC8067914.
- [316] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3. PMID: 942051.
- [317] Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, vol. 166, núm. 2, pp. 368–379, nov. 1987, doi: 10.1016/0003-2697(87)90587-2.
- [318] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5. doi: 10.1038/227680a0. PMID: 5432063.
- [319] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Sep;76(9):4350-4. doi: 10.1073/pnas.76.9.4350. PMID: 388439; PMCID: PMC411572.
- [320] Biron VA, Iglesias MM, Troncoso MF, Besio-Moreno M, Patrignani ZJ, Pignataro OP, Wolfenstein-Todel C. Galectin-1: biphasic growth regulation of Leydig tumor cells. *Glycobiology*. 2006 Sep;16(9):810-21. doi: 10.1093/glycob/cwl013. Epub 2006 Jun 12. PMID: 16769778.
- [321] Bryant CE, Spring DR, Gangloff M, Gay NJ. The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Jan;8(1):8-14. doi: 10.1038/nrmicro2266. PMID: 19946286.

-
- [322] Liu S, Tobias R, McClure S, Styba G, Shi Q, Jackowski G. Removal of endotoxin from recombinant protein preparations. *Clin Biochem.* 1997 Aug;30(6):455-63. doi: 10.1016/s0009-9120(97)00049-0. PMID: 9316739.
- [323] Nowak TP, Barondes SH. Agglutinin from *Limulus polyphemus*. Purification with formalinized horse erythrocytes as the affinity adsorbent. *Biochim Biophys Acta.* 1975 May 30;393(1):115-23. PMID: 1138917.
- [324] Fernández MM, Bhattacharya S, De Marzi MC, Brown PH, Kerzic M, Schuck P, Mariuzza RA, Malchiodi EL. Superantigen natural affinity maturation revealed by the crystal structure of staphylococcal enterotoxin G and its binding to T-cell receptor Vbeta8.2. *Proteins.* 2007 Jul 1;68(1):389-402. doi: 10.1002/prot.21388. PMID: 17427250.
- [325] M. M. Fernández, E. L. Malchiodi, y I. D. Algranati, “Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania Mexicana* and mammalian cells”, *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 55, núm. 1, pp. 86–93, ene. 2011, doi: 10.1128/AAC.00506-10.
- [326] Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* 2002 Apr 15;16(8):948-58. doi: 10.1101/gad.981002. PMID: 11959843; PMCID: PMC152352.
- [327] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16;65(1-2):55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4. PMID: 6606682.
- [328] Schulkens I. *Galectins as targets for angiostatic cancer therapy*. [Uitgever niet vastgesteld], 2015.

