



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

Participación de CLIC5 durante la transición epitelio-
mesénquima en el carcinoma hepatocelular

Que presenta

M. en C. Teresita del Niño Jesús Flores Téllez

Para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS

En la especialidad de
BIOLOGÍA CELULAR

Director de Tesis
Dr. Saúl Villa Treviño

Marzo 2018

ÍNDICE

ABREVIATURAS	4
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS	9
ANEXOS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN	13
CÁNCER	14
LA TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA (EMT)	18
APORTACIONES DEL ESTUDIO DE LA EMT AL CONOCIMIENTO DEL CÁNCER	19
MODIFICACIONES DEL CITOESQUELETO Y POLARIDAD EN LA EMT	22
MODIFICACIONES DEL CITOESQUELETO Y MOTILIDAD EN LA EMT	23
INDUCTORES DE LA EMT	24
FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA	25
CARCINOMA HEPATOCELULAR	30
ANTECEDENTES DIRECTOS	34
LA PARTICIPACIÓN DE LA FAMILIA CLIC EN CÁNCER	35
CLIC5	39
HIPÓTESIS	42
OBJETIVOS	42
GENERAL	42

PARTICULARES	42
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	<u>43</u>
MATERIAL BIOLÓGICO	43
LÍNEAS CELULARES.	43
MACROARREGLO DE MUESTRAS DE BIOPSIAS DE PACIENTES	43
METODOLOGÍA	44
INMUNOCITOQUÍMICA	44
EL ESTÍMULO CON TGF-B	44
INMUNOPRECIPITACIÓN	44
ANÁLISIS MORFOLÓGICO	45
REARREGLOS EN EL CITOESQUELETO DE ACTINA	45
INMUNOFLUORESCENCIA	45
WESTERN BLOT	46
EVALUACIÓN DE VIABILIDAD POR MTT	47
SILENCIAMIENTO POR SHRNAs	47
ENSAYO DE CIERRE DE HERIDA	48
ENSAYO DE MIGRACIÓN POR CÁMARAS DE BOYDEN	49
ENSAYO DE INVASIÓN POR CÁMARAS DE BOYDEN	49
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	49
ANÁLISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICA	50
<u>RESULTADOS</u>	<u>51</u>
LA PROTEÍNA CLIC5 SE ENCUENTRA SOBREENPRESADA EN EL CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO.	51
LA PROTEÍNA CLIC5 SE EXPRESA EN EL CITOPLASMA Y NÚCLEO DE LÍNEAS CELULARES HUMANAS DERIVADAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR.	63
CLIC5 INTERACCIONA CON PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO <i>IN VITRO</i>.	70
CLIC5 SE SOBREENPRESA DURANTE LA TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA.	71
CLIC5 PARTICIPA EN LOS PROCESOS DE MIGRACIÓN E INVASIÓN EN LA LÍNEA CELULAR HUH7.	78
<u>DISCUSIÓN</u>	<u>83</u>
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>96</u>
<u>PERSPECTIVAS</u>	<u>97</u>
<u>ANEXOS</u>	<u>98</u>

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ACTA1	Actina alfa 1
ACTN1	Actinina 1
AMT	Invasión ameboidea a mesenquimal
ATF3	Factor de transcripción 3
BSA	Del inglés: Bovine serum albumin, Albumina sérica bovina
BMPs	Proteínas formadoras del hueso
CAK	Cinasa activadora de CDK
CAM	Invasión colectiva a mesenquial
CAT	Invasión colectiva a ameboidea
CHC	Carcinoma hepatocelular
CLICs	Del inglés: Chloride Intracellular Channels, Canales de Cloro Intracelulares
CLIC5	Del inglés: Chloride Intracellular Channel 5, Canal de Cloro Intracelular 5
DMEM	Del inglés: Dulbecco's Modified Eagle Medium, Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERM	Ezrina-radixina-moesina
Ezr	Ezrina
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
GDFs	Factores de crecimiento y diferenciación
GDNFs	Factores neurotróficos derivados de la glía
GSN	Gelsolina
GSTO	Glutation S-transferasa omega
h	horas
IQGAP1	Motivo IQ que contiene la proteína activadora de GTPasa 1
LAP	Proteína asociada a la latencia
LPS	Lipopolisacárido
MAT	Invasión mesenquimal a ameboidea

MEC	Matriz extracelular
MIA	Migración e invasión ameboidea
MIC	Migración e invasión colectiva
min	Minutos
MIS	Del inglés: Müllerian-inhibiting substance, Sustancia inhibidora Muleriana
MMHR	Modelo modificado del hepatocito resistente
MRTF	Del inglés: Myocardin-related transcription factor, Factor de transcripción relacionado con miocardina
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NK	Del inglés: Natural killers, Células asesinas naturales
NLS	Del inglés Nuclear localization signal, Señal de localización nuclear
PA	Paraformaldehído
PBS	Solución salina fisiológica
Podxl	Podocalixina
PP2A	Proteína fosfatasa 2a
PVDF	Del inglés: Polyvinylidene fluoride Polifluoruro de vinilideno
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Suero fetal bovino
TA	Temperatura ambiente
T β RI	Del inglés TGF β Receptor type I, Receptor de TGF β tipo I
T β RII	Del inglés TGF β Receptor type II, Receptor de TGF β tipo II
EMT	Del inglés: Epithelial Mesenchymal Transition, Transición epitelio mesénquima
TGF- β 1	Del inglés: Transforming Growth Factor beta 1Factor de crecimiento transformante beta 1
TM1	Dominio transmembranal 1
TM2	Dominio transmembranal 2
MET	Del inglés Mesenchymal Epithelial Transition, Transición mesénquima a epitelial
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C

Vim	Vimentina
Zeb	Zinc-finger E-box binding
ZO1	Zonula occludens 1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de las diez características del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011).

Figura 2. Los diferentes tipos de migración e invasión en cáncer: transición epitelio mesénquima (EMT), migración e invasión colectiva (MIC) y ameboidea (MIA).

Figura 3. Modificaciones celulares durante transición epitelio-mesénquima (EMT).

Figura 4. Vía canónica y no canónica de TGF- β .

Figura 5. Integrantes de los miembros de la familia de CLIC's, p64 es el primer integrante descrito en bovino.

Figura 6. CLIC5 se encuentra sobreexpresada en biopsias de pacientes diagnosticados con CHC.

Figura 7. El mRNA CLIC5 se encuentra sobreexpresado en pacientes diagnosticados con CHC.

Figura 8. CLIC5 se encuentra expresada en líneas celulares humanas derivadas de CHC.

Figura 9. Expresión de CLIC5 en la línea celular humana HepG2.

Figura 10. Expresión de CLIC5 en la línea celular humana HuH7.

Figura 11. Expresión de CLIC5 en la línea celular humana SNU387.

Figura 12. Predicción *in silico* de las regiones de localización nuclear de CLIC5B.

Figura 13. CLIC5 se expresa en el citoplasma y en el núcleo de líneas celulares derivadas de CHC.

Figura 14. Predicción de la estructura CLIC5B en el servidor I-TASSER.

Figura 15. CLIC5 interacciona con proteínas de citoesqueleto (Ezrina, Podocalixina y Actina).

Figura 16. CLIC5 interacciona con Actina (Act) en núcleo y citoplasma.

Figura 17. Patrón de expresión de los marcadores de EMT en las tres líneas celulares HepG2, HuH7 y SNU387.

Figura 18. Evaluación de la EMT en la línea celular HuH7 a las 24, 48, 72 y 96 h.

Figura 19. Evaluación de la viabilidad durante la EMT en las células HuH7.

Figura 20. TGF- β induce la migración de la línea celular HuH7.

Figura 21. CLIC5 se sobreexpresa durante la EMT en HuH7.

Figura 22. Silenciamiento de CLIC5 por shRNAs.

Figura 23. El silenciamiento de CLIC5 afecta la migración de las células HuH7.

Figura 24. El silenciamiento de CLIC5 afecta la migración e invasión de las células HuH7.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Marcadores epiteliales y mesenquimales modificados durante la EMT.

Tabla 2. Tipos de migración e invasión celular en cáncer.

Tabla 3. La familia de CLICs.

Tabla 4. Lista de anticuerpos en donde se especifica marca, bloqueo y el protocolo de incubación.

Tabla 5. Posibles interacciones de CLIC5 con otras proteínas de acuerdo a cBioportal. Se enlista el nombre de la proteína y sus funciones descritas por Uniprot.

ANEXOS

Anexo 1. Información desglosada de pacientes de la base de datos Inserm (Natgene 2015) de cBioportal.

Anexo 2. Mapas de calor que desglosan la información obtenida en el servidor ONCOMINE, se presentan todas las bases de datos ocupadas en este estudio.

Anexo 3. Análisis *in silico* de la probable localización nuclear a través de la identificación de la secuencia de localización nuclear (NLS) en CLIC4.

Anexo 4. Alineamiento de los integrantes de la familia CLIC5.

Anexo 5. Proteínas que estructuralmente son más cercanas a la probable estructura tridimensional de CLIC5.

Anexo 6. Gráfico de Ramachandran obtenido en el servidor SAVES.

Lista 1. Evaluación de los residuos del análisis del gráfico de Ramachan.

Anexo 7. La expresión de CLIC5 no se observa afectada durante la EMT parcial en la línea celular HepG2.

RESUMEN

La metástasis es la principal causa de muerte por cáncer debido a que una vez que el tumor se disemina su eliminación es prácticamente imposible. Dentro de los primeros pasos de la metástasis se encuentra la migración y la invasión, siendo la transición epitelio-mesénquima (EMT) el principal mecanismo de diseminación descrito para varios tipos de tumor, entre ellos el carcinoma hepatocelular (CHC). Anteriormente, en nuestro y otros grupos de estudio se ha demostrado los cambios que ocurren en la expresión genética durante el desarrollo de la hepatocarcinogénesis; sin embargo, pocos genes han sido estudiados a fondo. Uno de los genes que se reportaron altamente expresados en un modelo de hepatocarcinogénesis química fue el CLIC5 (*del inglés* Chloride Intracellular Channel 5), no obstante, su función no ha sido clarificada. Por lo cual en este trabajo se investigó la participación de CLIC5 en la EMT y el desarrollo del CHC. Nuestros resultados mostraron que la proteína CLIC5 se encuentra sobreexpresada en líneas celulares derivadas de CHC, así como en biopsias de seres humanos; estos resultados han sido corroborados a través de minerías de datos donde encontramos la sobreexpresión del gen en pacientes diagnosticados con CHC. Se describe por primera vez en cáncer de hígado la ubicación celular de CLIC5, tanto en citoplasma como en núcleo y su capacidad de interactuar con proteínas asociadas a citoesqueleto como Actina, Ezrina y Podocalixina. Finalmente se demostró que CLIC5 está participando en los procesos de migración e invasión, a través del mecanismo de la EMT inducida por la citocina TGF β -1. El presente trabajo ha contribuido a esclarecer la función de CLIC5 en los tumores hepáticos y ofrece la propuesta de este gen como probable oncogén en el CHC y presenta su sobreexpresión como una herramienta para el diagnóstico, pronóstico o tratamiento de la enfermedad.

ABSTRACT

Metastasis is the leading cause of cancer death because when tumor spreads, its elimination is almost impossible. Within the first steps of metastasis, migration and invasion are crucial steps in carcinogenesis, being the epithelial mesenchymal transition (EMT) the main mechanism described to carry out these biological processes in hepatocellular carcinoma (HCC). Previously, we and another research groups described changes in gene expression during the development of hepatocarcinogenesis, however few genes have been thoroughly studied. One of these highly expressed genes, reported and validated by our research group due to its overexpression in a chemical hepatocarcinogenesis rat model was CLIC5 (Chloride Intracellular Channel 5); however, its function has not been described. Based on all above, the aim of this work was to investigate CLIC5 participation in human HCC. Our results demonstrated that the protein CLIC5 is overexpressed in cell lines derived from HCC, as well as in HCC of clinical biopsies; these results were corroborated by data mining analysis from public microarray databases of patient cohorts diagnosed with HCC. Additionally, it was described for first time the cellular location of CLIC5 in liver cancer at cytoplasm as well as nuclear, and its ability to interact with cytoskeletal associated proteins such as Actin, Ezrin and Podocalixin. Finally, CLIC5 was involved in migration and invasion processes, probably through the EMT mechanism mediated by TGF β -1. The present work contributed to clarify the role of CLIC5 as a probable oncogene in HCC and to propose the study of others proteins that could function in molecular pathways of HCC, enriching the tools for diagnosis, prognosis or treatment target of the disease.

INTRODUCCIÓN

Un organismo multicelular es considerado como una sociedad que tiene como principal característica la colaboración y especialización de cada una de las células, con la finalidad de llevar a cabo una función delimitada [1]. Para lograr la homeostasis en este pequeño ecosistema, existe una regla fundamental que consiste en el autosacrificio aceptado por cada uno de los individuos que le conforman; este microecosistema mantiene su equilibrio gracias al balance entre los fenómenos biológicos de sobrevivencia y de muerte celular. No obstante, existen dentro de la gama de patologías descritas para el ser humano las que presentan un disturbio en la armonía multicelular en donde se desencadena la competencia por la sobrevivencia de un grupo de células aberrantes que se han sublevado a la regla fundamental de equilibrio celular y por lo tanto culmina en la destrucción del organismo [2]. A dicha enfermedad se le ha acuñado el nombre de cáncer, siendo una patología que pertenece al grupo de enfermedades no transmisibles y pertenece a las cinco principales causas de muerte del ser humano a nivel mundial [3].

En cualquier tejido se puede desarrollar el cáncer siendo la malignidad de esta enfermedad variable dependiendo de la agresividad de las células tumorales, de las características biológicas de cada tipo tumoral y del individuo que lo padece. Hasta la fecha se postula que el éxito del cáncer depende de los principios de mutación y selección debido a la influencia de factores exógenos y endógenos que influyen en el tumor [1]. Aunado a lo anterior, nuestro conocimiento es que un bajo porcentaje del cáncer se asocia directamente a aberraciones genéticas heredables *per se provenientes de mutaciones en células germinales*, mientras que aproximadamente el 90% de los casos de esta enfermedad se atribuye a alteraciones genéticas en células somáticas inducidas o promovidas por infecciones por los virus de hepatitis B (VHB) y C (VHC), virus del papiloma humano, entre otros así como a la alta exposición a factores de riesgo como aflatoxina B1, contaminación en general, productos químicos procedentes de la industria o al estilo de vida como el consumo de alcohol exacerbado, el fumar, los hábitos alimenticios, entre otros [4-8]. Por lo cual, se estima que muchos tipos de cáncer (entre el 30% y 50%) pueden ser prevenibles, siempre y cuando se

modifique el estilo de vida, se eviten los factores ambientales así como la exposición a carcinógenos [9].

CÁNCER

El cáncer es una enfermedad determinada por una proliferación celular incontrolada que culmina con la formación de una masa tumoral, adicionalmente posee la propiedad de invadir las zonas adyacentes o bien diseminarse de forma incontrolada a otros tejidos del organismo. A pesar de la gran gama de factores de riesgo que posee esta enfermedad, y de la heterogeneidad en su comportamiento entre los diferentes tipos de cáncer, o dentro de la propia masa tumoral o entre los individuos que lo padecen, se le han atribuido una lista de cualidades que permiten delimitarla. Hanahan y Weinber han denominado dichas características como “*hallmarks*” y corresponden a las siguientes: señalización proliferativa sostenida, insensibilidad a factores inhibidores del crecimiento, evasión a la respuesta inmune, escape a la apoptosis, replicación ilimitada, angiogénesis, desregulación energética, inestabilidad y mutación del genoma, inflamación tumoral sostenida, invasión y metástasis [10] (Fig. 1).



Figura 1. Esquema de las diez características del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011).

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. En 2012 se registraron alrededor de 14 millones de nuevos casos, mientras que para el 2015 se reportaron 8.8 millones de defunciones, por lo cual se concluye que una de cada seis defunciones en el mundo se debe a esta enfermedad. Se prevé que el número de nuevos casos aumentará aproximadamente un 70% en los próximos 20 años [9, 11]. Asimismo, la detección de varios tipos de cáncer generalmente se da en una fase sintomática, es decir, en etapas avanzadas, dificultando así el tratamiento adecuado de la enfermedad [12]. A diferencia de una neoplasia no cancerosa, considerada como proliferación incontrolada de cierto grupo celular que puede ser removido y por lo tanto, eliminado; en el cáncer un subgrupo celular del tumor obtendrá la capacidad de diseminarse. De manera conceptual y operacional, entre más se disemine el tumor más difícil resulta su erradicación, por lo cual el proceso de diseminación, conocido como metástasis, es la principal causa de la muerte del paciente (~90% de los casos) [13].

La metástasis es la habilidad que posee un grupo de células tumorales para escapar del tumor inicial a un tejido distante y formar un segundo tumor. Pese a que el descubrimiento de la quimioterapia ha mostrado en algunos casos ser útil para detener la proliferación incontrolada en el desarrollo tumoral, esta fue diseñada para dirigirse principalmente al tumor primario y por ende, no afecta a aquellos tumores desarrollados por la metástasis. Debido a que la metástasis fue un aspecto no esperado en el desarrollo tradicional de terapias antitumorales, su investigación y desarrollo de drogas se encuentran todavía muy rezagadas [14]. Por otro lado, varias preguntas surgen con respecto a este proceso biológico que aún no ha podido ser resuelto, entre ellas ¿existe alguna correlación entre el tamaño del tumor primario y los tumores metastásicos? ¿en qué momento comienza la diseminación? ¿por qué no todas las células tumorales tienen la misma capacidad de producir metástasis? y ¿qué cambios genéticos y epigenéticos se establecen en la célula para ganar la habilidad de migrar e invadir? [15].

Actualmente existe consenso en los pasos necesarios para que se lleve a cabo la metástasis, las modificaciones biológicas que ocurren en las células tumorales son: la pérdida de la unión célula-matriz extracelular y unión célula-célula, la ganancia y capacidad de

migrar e invadir a tejido adyacente y de introducirse a los vasos sanguíneos o linfáticos, de sobrevivir en las condiciones adversas de la circulación y por último, colonizar el tejido blanco [16]. Dentro de la manera o forma descrita y altamente aceptada en que suceden los pasos de la migración e invasión, se encuentra: la migración de tipo colectiva, la migración de tipo individual que incluye a la migración ameboidea y la migración por la transición epitelio-mesénquima. Para cada una de estas maneras de migrar e invadir se ha descrito lo siguiente:

- ❖ *Migración e invasión celular colectiva (MIC)*. Se denomina al fenómeno biológico en el cual grupos de células con apariencia heterogénea se movilizan de manera coordinada y polarizada en hilera o en grupos celulares, variando desde unas pocas células a una gran masa celular. La MIC está presente en la morfogénesis, desarrollo y reparación de los tejidos, así como en el cáncer. En el cáncer, la MIC ofrece las ventajas de incrementar la migración contra la resistencia del ambiente agresivo al cual se enfrentan las células tumorales. Aunque se desconocen muchos aspectos de este tipo de migración celular, hay evidencia que en el grupo de células el mantenimiento de los contactos intercelulares es por medio de moléculas de adhesión como las cadherinas. Además, en la MIC se le ha descrito un frente celular que mantiene un fenotipo mesenquimal o puntos intermedios epitelial-mesenquimal, mientras que el resto de las células mantienen características epiteliales, siendo las Rho GTPasas las principales moléculas de señalización para su locomoción. Las células del frente son consideradas las “líderes o guías” que son las que abrirían el camino a las células “seguidoras” través de la matriz extracelular (MEC) por medio de secreción de proteasas; por último, se han descrito células “accesorias” como los fibroblastos que podrían participar en la promoción de invasión y remodelación de la MEC [17-20].

- ❖ *Migración e invasión tipo ameboidea (MIA)*. Este tipo de migración e invasión se considera como la más primitiva y más eficiente para la migración de una célula individualizada. Las células malignas del tumor han demostrado adoptar una morfología que dependerá de la matriz extracelular que le rodea, por lo cual se le

considera una invasión independiente de la adhesión y degradación de la MEC. Para los movimientos y la reubicación celular, se da una serie de ciclos sucesivos rápidos de expansión y contracción en la célula con el desarrollo de protrusiones celulares tipo “ampollas” de la membrana además de la deformación pronunciada del núcleo causada por la falta de la degradación proteolítica de la matriz circundante. Debido a esta reducida dependencia de interacción célula-célula y célula-matriz algunos autores consideran a MIA como el estado menos diferenciado dentro de los tipos migración, lo cual se ha corroborado con la ganancia de genes pluripotenciales como Nanog y Oct4 en células de melanoma. La vía de señalización que se encuentra más involucrada en este tipo de locomoción es Rho/ROCK, PI3K y varios reguladores de actina como Formina FMNL2, Cdc42 y algunas proteínas de la familia ERM (ezrina-radixina-moesina) [21-23].

- ❖ *Transición epitelio mesénquima (EMT)*. Este proceso es un factor clave de la progresión del cáncer que ha sido demostrado *in vitro* utilizando líneas tumorales específicas, así como modelos experimentales; no obstante, su estudio *in vivo* así como el establecimiento e identificación de sus principales características ha sido una tarea compleja. Pese a la dificultad del estudio de este proceso biológico, se ha llegado al consenso de lo que sucede en la EMT: las células epiteliales malignas pierden su polaridad apical-basal debido a la interrupción de las uniones estrechas y a la pérdida de las moléculas de adhesión celular; el citoesqueleto de actina celular cambia y se somete a una remodelación con la formación de fibras de actina, formando protuberancias celulares específicas. Posteriormente, se produce la degradación de la membrana basal subyacente del epitelio, lo que otorga la capacidad de penetración en la matriz estromal circundante y comienzan la migración activa. Las moléculas hasta el momento descritas y que juegan un papel importante en la polarización durante la transición son las Rho GTPasas, Rac1 y Cdc42 así como moléculas de adhesión [24].

Actualmente varios grupos de trabajo consideran que estos diferentes tipos de migración no son mutuamente excluyentes. Por lo cual, considerar la transición de una morfología epitelial y apical a un fenotipo migratorio e invasivo como solo un paso lineal es

considerado como algo utópico, debido a que abarca a un proceso gradual de pasos intermedios, probablemente transitorios e interconvertibles dependiendo de las condiciones extracelulares, particularmente la rigidez y la composición de la MEC [25-27]. En este proceso, las células cancerosas utilizan diferentes formas de migración e invasión con la participación de células individuales o bien de agrupaciones celulares; entonces esta flexibilidad y habilidad de adaptación explica el por qué la metástasis es un punto problemático en el cáncer con una intervención terapéutica limitada [28] (Fig. 2).

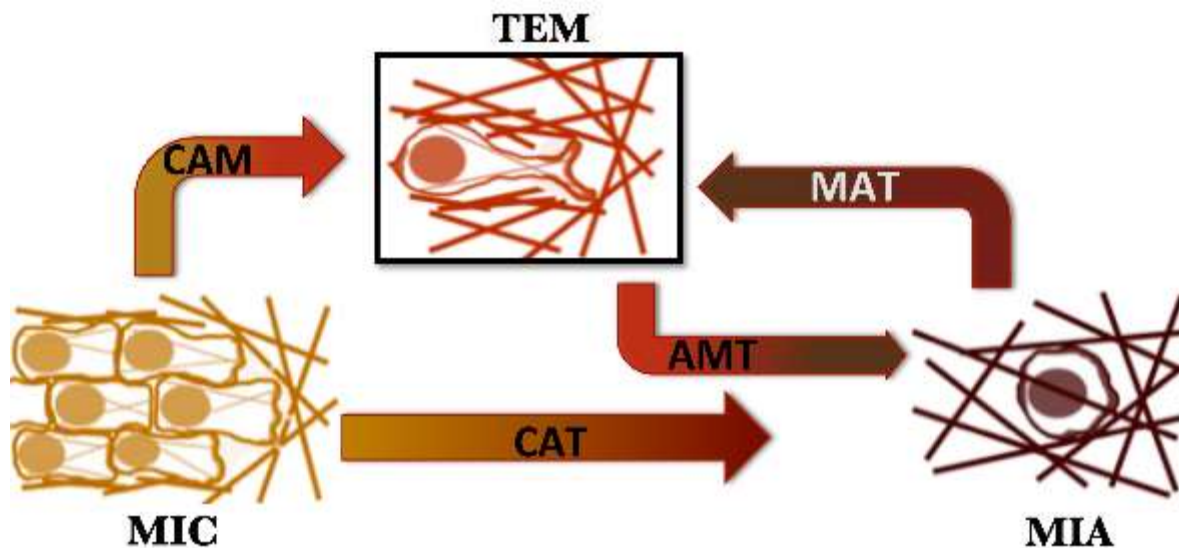


Figura 2. Los diferentes tipos de migración e invasión en cáncer: transición epitelio mesénquima (EMT), migración e invasión colectiva (MIC) y ameboidea (MIA). Se considera que no existe exclusión entre ellas y se puede dar una interconversión celular durante el desarrollo tumoral. CAM: invasión colectiva a mesenquimal; CAT: invasión colectiva a ameboidea; MAT: invasión ameboidea a mesenquimal; AMT: invasión mesenquimal a ameboidea (Imagen modificada de Brabek *et al.*, 2010 [29]).

LA TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA (EMT)

La EMT se presenta en una serie de procesos biológicos durante la vida de un organismo multicelular como la embriogénesis, la reparación de tejidos o en aspectos patológicos como en la fibrosis o en los tumores. Si bien la interconversión entre el estado epitelial y el mesenquimal fue descrita en 1908 por Frank Lillie y en 1960 Elisabeth Hay proporcionó una descripción detallada de la formación de una estructura que parecía un punto intermedio entre las células epiteliales y mesenquimales [30], este proceso de EMT no fue

reconocido hasta 1982, poco después de que Michael Stocker y Michael Perryman realizaran experimentos del efecto del medio condicionado obtenino a partir de fibroblastos sobre células epiteliales polarizadas de riñón denominadas MDCK y observaron la conversión de estas células en fibroblastos migratorios, pero sin relacionar este fenómeno biológico con malignidad [31].

Tomó mucho tiempo para que la EMT fuera reconocida como uno de los mecanismos de la propagación del carcinoma. Una de las principales razones para esto es que la EMT no se puede seguir en el tiempo y el espacio en tumores de seres humanos. La gran diversidad de organización celular, así como el poco grado de diferenciación que se observa en los tumores de seres humanos hace que sea imposible reconocer la EMT sin ambigüedad [32-34]. Por otra parte, actualmente se reconoce un estado intermedio o parcial denominado EMT parcial o híbrido y este estado celular se refiere a que las células ya han adquirido las propiedades necesarias para una migración exitosa, pero continúan reteniendo los contactos célula-célula y se le asocian con movimientos colectivos de las células tumorales o bien las células no llegan a modificar todos sus marcadores epiteliales a mesenquimales [35-37]. Es importante resaltar que este fenómeno biológico de transición es un estado temporal y está implícito en este proceso la plasticidad de reversión una vez que ha colonizado el nicho; es decir se lleva a cabo una transición mesénquima a epitelio (MET, del inglés mesenchymal epithelial transition) [38-40].

APORTACIONES DEL ESTUDIO DE LA EMT AL CONOCIMIENTO DEL CÁNCER

El estudio de la EMT ha ganado interés ya que su participación en el cáncer se le relaciona estrechamente con la ganancia del prototipo de algunas características anteriormente consideradas por Hanahan y Weinberg. Entre ellas se encuentran las siguientes:

- *Resistencia a la muerte celular y senescencia:* Se ha descrito que la participación de algunos factores de crecimiento y el estado contextual celular ayudan al escape de la

apoptosis, un claro ejemplo es TGF- β y células de cáncer de mama; cuando se encuentra presente el estímulo de la citocina y las células tumorales expresan Ras activado mantienen un estado de EMT sostenido; además TGF- β es un potente inductor de la expresión de Snail, una molécula que está relacionada con la resistencia a la muerte celular [41]. La actividad de Snail puede tener la cooperación de Twist y este antagoniza el efecto proapoptótico de c-Myc en neuroblastoma. Por otro lado, Twist1 y Twist2 previenen que las células experimenten senescencia inducida por oncogenes inhibiendo p16/ink4a y p21/cip [42]. De este modo, la expresión constitutiva de los inductores de EMT puede mantener el fenotipo mesenquimatoso invasivo y asegurar la supervivencia de las células que producen pequeñas e iniciales metástasis (micrometástasis), mediante la supresión de dos mecanismos de salvaguardia contra el cáncer: senescencia prematura y apoptosis [43, 44].

- *Evasión a la respuesta inmune:* La modificación que sufre la célula durante su reprogramación celular llevará a que los antígenos expresados en la superficie celular se modifiquen a lo largo de este proceso celular por lo cual, para las células del sistema inmune que se encuentran activadas por ciertos epítopes, les será difícil reconocer a aquellas células tumorales que en una etapa las expresaban y ahora no, suceso al que se le conoce como inmunoedición [45]. La expresión de Snail1 se correlaciona con la recurrencia del tumor de mama y dicho factor transcripcional está asociado con la activación de citocinas inmunosupresoras, células T reguladoras, células citotóxicas, resistencia a los linfocitos T citotóxicos y a la generación de alteraciones en células dendríticas. Evidencia en varios estudios, sugiere que TGF- β inhibe la proliferación y los efectos de células CD8⁺ efectoras, induce la diferenciación y activación de las T reguladoras (Tregs), y Th17 inhibe la activación de la proliferación y citotoxicidad de las natural killers (NKs) e incrementa la quimiotaxis de macrófagos y neutrófilos, desencadenando un ambiente inflamatorio propiciando un ciclo positivo de sostenimiento de la EMT [46]. Por lo tanto, durante la EMT, hay múltiples puntos donde puede darse la inmunosupresión, así como los mecanismos de inmunorresistencia, alterando la respuesta del huésped al tumor [47].

- *Invasión y Metástasis:* El esquema aceptado del proceso de metástasis es que reaccionando a un estímulo, una célula comienza la polarización y extiende las protrusiones en la dirección de la migración lo cual se origina con la extensión del borde delantero por protrusión de lamelipodios y/o filopodios, impulsada por la polimerización de la actina y el alargamiento del filamento. Después de la protrusión, se induce la adhesión entre la célula y el sustrato en el borde delantero en gran parte por receptores de integrinas que se unen a dominios específicos de proteínas de matriz extracelular. Enseguida, la contracción mediada por la actomiosina produce el movimiento hacia adelante de la célula, iniciado por fuerzas contráctiles que se generan cerca del borde delantero, acoplado con el desprendimiento del borde posterior. Además, la célula en migración secreta las proteasas (metaloproteasas principalmente) necesarias para romper las proteínas de la matriz extracelular, abriendo un camino para la célula que avanza. Estas metaloproteasas degradan la membrana basal y la matriz extracelular propiciando el paso entre el tejido adyacente para favorecer la invasión. Curiosamente, las metaloproteasas también realizan una retroalimentación para sostener la EMT. Por ejemplo, MMP3 desencadena la EMT mediante el aumento de los niveles celulares de especies reactivas de oxígeno, que a su vez induce la expresión de Snail1. MMP13 también desencadena EMT después de ser fuertemente inducido por FGF1. Por último, la periostina, una proteína de matriz extracelular secretada por osteoblastos, interactúa con integrinas y vías de señalización principalmente PI3K/Akt para promover EMT, invasión y metástasis [48-50].

Por otra parte, existen otros aspectos en los cuales la EMT aporta ventaja a las células tumorales y que han sido ampliamente estudiados tales como:

- *Ganancia de un fenotipo troncal:* En varios estudios con diferentes tipos de células tumorales el grado de reprogramación llega a ser muy marcado y las células comienzan a expresar genes involucrados en troncalidad que se encuentran apagados o subexpresados en una célula diferenciada [51, 52]. Por ejemplo, hay un cambio en la expresión de la proteína E-cadherina a N-cadherina, la primera pertenece al grupo

de moléculas de un tejido establecido mientras que la última se ha caracterizado en estadios embrionarios; además hay expresión de Vimentina, metaloproteasas y factores transcripcionales como Snail [53]. Por otra parte, hay correlación de la ganancia de la EMT con la de marcadores superficiales de troncalidad como CD133 [54], CD44 [55, 56], CD90 [57], por mencionar algunos representativos.

- *Resistencia a fármacos o drogas anticancerígenas:* Debido a que las células pasan a través de una reprogramación celular (desdiferenciación), se da un cambio no solo morfológico sino molecular, llevando una modificación en la expresión de sus proteínas superficiales. Por lo cual, si un fármaco o droga tenía la finalidad de reconocer a cierto epítipo y actúa únicamente en esa población celular, será menos probable que el fármaco actúe en aquellas células que están sufriendo una transformación a través de la EMT. Por ejemplo, en las líneas celulares epiteliales de carcinoma ovárico existe una correlación entre la resistencia a paclitaxel y la adquisición de marcadores EMT y por ende, a la pérdida del fenotipo epitelial. Se ha reportado que inhibiendo a Twist, se puede revertir parcialmente la resistencia a múltiples fármacos en células de cáncer de mama y que Snail también confiere resistencia a paclitaxel, adriamicina y radiación antagonizando la apoptosis mediada por p53 [58, 59].

MODIFICACIONES DEL CITOESQUELETO Y POLARIDAD EN LA EMT

Durante la EMT en cáncer, la integridad del tejido se ve alterada, se afectan aquellos complejos proteicos que se especializan en las uniones adherentes, uniones estrechas, y las uniones laterales como los desmosomas; dichas uniones sufren rearrreglos en las proteínas encargadas de la polaridad celular por relocalización o bien degradación (Fig. 3). La disolución de las uniones estrechas durante la EMT se acompaña de la disminución de la expresión de claudina y ocludina, y de zonula occludens 1 (ZO1, también conocido como TJP1). En cuanto a la desestabilización de las uniones adherentes, la cadherina epitelial (E-cadherina) se escinde en la membrana plasmática y posteriormente se degrada. En consecuencia, la β -catenina no puede interactuar más con la E-cadherina

pero puede protegerse de la degradación (por ejemplo, en respuesta a la señalización de WNT), de modo que puede actuar a nivel nuclear en la transcripción. Durante la iniciación de la EMT también se alteran los desmosomas, y la integridad de las uniones estrechas se ve comprometida por la disminución de los niveles de Conexina. A medida que la EMT progresa, la expresión de las proteínas de unión se reprime transcripcionalmente, lo que desestabiliza las uniones epiteliales. Otras proteínas pertenecientes al complejo apical como el complejo PAR (PAR3 y PAR6) y CRB así como proteínas pertenecientes a la zona baso-lateral como Scribble (SCRIB), Disc large (DLG) y LGL se ven suprimidas o disminuidas en su expresión. En consecuencia, la disolución de las uniones epiteliales durante EMT confiere una pérdida de polaridad apical-basal que culminará en una reducción de la adhesión celular e incrementará la capacidad de movilidad [60].

MODIFICACIONES DEL CITOESQUELETO Y MOTILIDAD EN LA EMT

Durante la EMT las células reorganizan su citoesqueleto de actina cortical en uno que permite el alargamiento dinámico de las células y la motilidad direccional. Se sintetizan nuevas proyecciones de membrana ricas en actina. Estas proyecciones incluyen protrusiones membranales, los lamelipodios y filopodios. Los invadopodios ricos en actina ejercen una función proteolítica en la degradación de ECM, facilitando así la invasión celular. Por último, en la EMT hay un aumento de la contractilidad celular y la formación de fibras de estrés de actina. Estos cambios dinámicos en la organización de la actina son mediados probablemente por las proteínas reguladoras tales como Moesina, pero los mecanismos moleculares que controlan la dinámica de F-actina todavía no se aclaran. La conversión de la polaridad apical-basal a la polaridad delantera-trasera implica la interacción entre las GTPasas RHO y las proteínas que definen la polaridad apical-basal. Para lograr la polaridad direccional, los complejos PAR y Scribble junto con PATJ del complejo Crumbs se relocalizan al borde delantero de la célula, donde Rac1 y Cdc42 activan la polimerización de actina y la formación de protrusión de membrana. Por el contrario, RhoA se localiza en la parte posterior de la célula y promueve el desmontaje de los complejos de adhesión y la retracción celular. PI3K juega un papel central en el inicio de la polaridad delantera-trasera de la célula y participa en

la producción de PiP3 y por ende la activación cdc42 y Rac. La polaridad delantera-trasera se mantiene a través de mecanismos de retroalimentación que implican proteínas de polaridad y GTPasas pequeñas [61] (Fig 3).

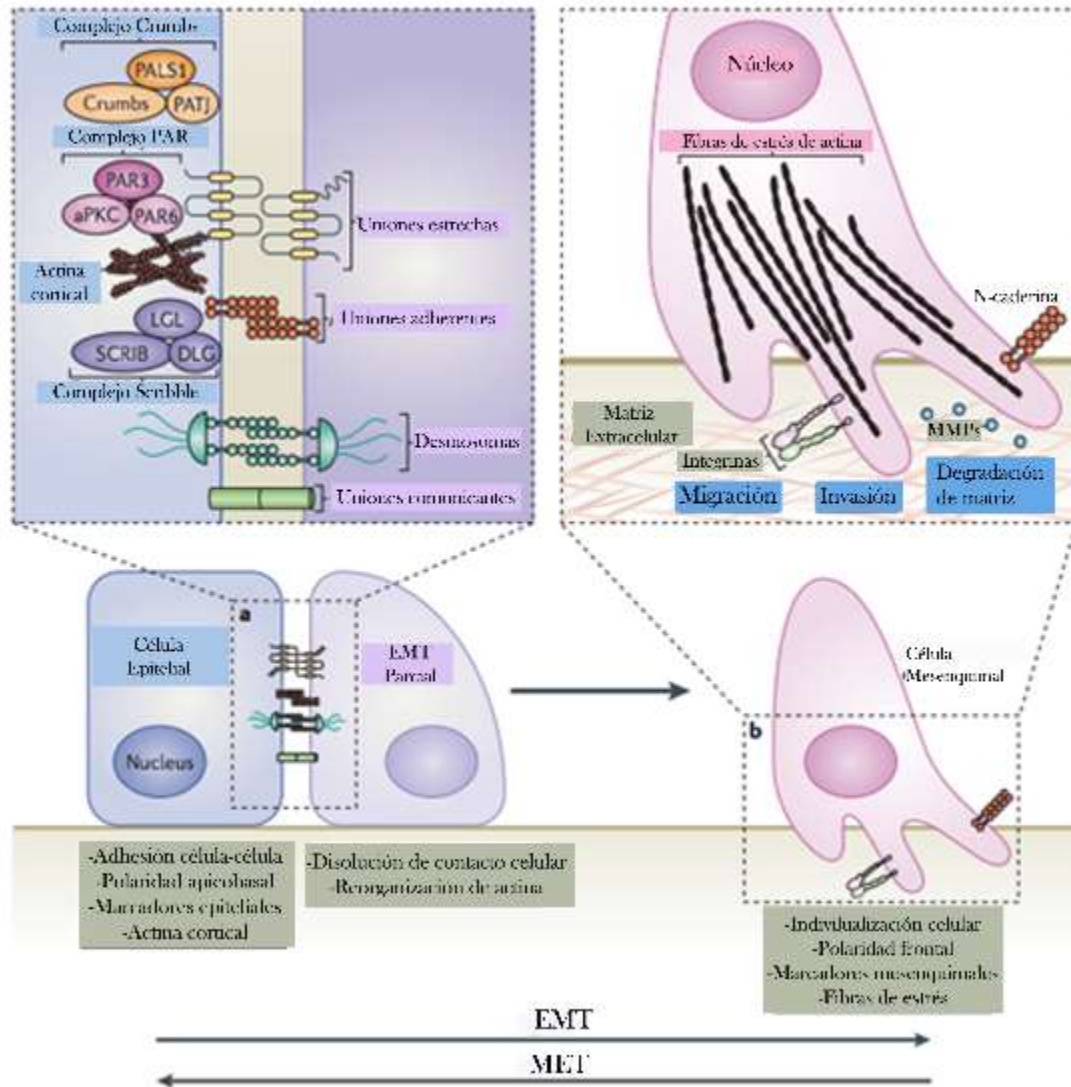


Figura 3. Modificaciones celulares durante transición epitelio mesénquima (EMT). Desensamble de uniones celulares (uniones estrechas, uniones adherentes, desmosomas y uniones comunicantes). Reorganización del citoesqueleto, aparición de fibras de estrés y estructuras como invadipodios o lamelipodios los cuales no solo aportan la adquisición de motilidad, además permiten la degradación de la matriz extracelular y el proceso de invasión. El proceso de transición EMT permite una plasticidad celular en donde bajo ciertos estímulos puede darse un regreso al estado epitelial (Imagen traducida de Lamouille *et al.*, 2014 [60]).

INDUCTORES DE LA EMT

Si bien la EMT es un fenómeno que sucede en cierto grupo celular, existen varios factores que permiten desencadenarlo o bien impulsar que se lleve a cabo. Dentro de los estímulos o propiciadores de la EMT que más se encuentran reportados son el estrés oxidativo [62], la epigenética [63], algunas moléculas como metaloproteasas [64], molécula de adhesión 1 [65], interleucina 6 (IL6) [66], podoplanina [67] y finalmente ciertos factores de crecimiento [68], entre ellos el factor de crecimiento transformante beta o TGF- β [57].

FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA

El factor de crecimiento transformante beta o TGF- β (Del inglés Transforming Growth Factor Beta) es una citocina perteneciente a la familia de las TGF- β . Esta familia está subdividida en varios grupos, entre los cuales se encuentra los factores de crecimiento transformantes beta (TGF- β s), las activinas e inhibinas, las proteínas formadoras de hueso (BMPs), los factores de crecimiento y diferenciación (GDFs), la hormona anti-Mülleriana (AMH) y los factores neurotróficos derivados de la glía (GDNFs) [69]. Si bien estas comparten el mismo flujo de activación en su vía de señalización, existen notables diferencias entre ellas, desde las moléculas que participan en sus respectivas vías, así como la función y respuesta final [70]. Para el caso de TGF- β en particular, sus funciones fisiológicas y fisiopatológicas son extensas; hasta la fecha no se ha demostrado que los blancos celulares de la citocina se limiten a una línea o aun tipo celular específico. Se conocen tres isoformas en mamíferos de TGF- β : 1, 2 y 3. La citocina TGF- β 1 es la más estudiada y la isoforma predominante. Las líneas celulares tumorales generalmente expresan altos niveles TGF- β 1. El TGF- β 1 es secretado como un pequeño complejo, el cual consiste en la proteína asociada a la latencia (LAP) y el TGF- β 1 maduro, permaneciendo de manera asociada no covalente a este precursor. La activación del TGF- β 1 latente ha sido estudiada intensamente *in vitro*, donde varios factores como pH, calor, algunas proteasas o agentes caotrópicos pueden causar la liberación de TGF- β 1 activo del complejo latente [71].

La vía de transducción de TGF- β 1, inicia cuando la citocina se une al receptor tipo II (T β RII), permitiendo entonces que el ligando pueda interactuar con el receptor tipo I

(T β RI) formándose así un complejo heterotetramérico. Posteriormente se da la transfosforilación del T β RI en el dominio GS (denominado así debido a su riqueza en glicinas y serinas). Esta fosforilación permitirá su activación y transmisión de la señal extracelular al interior de la célula por medio de la activación de las proteínas SMAD (Mothers Against Decapentaplegic homolog). Las SMAD (SMAD2, SMAD3 y SMAD4) son hasta ahora los únicos sustratos identificados para los receptores I y son consideradas como las proteínas transductoras citoplasmáticas, proteínas efectoras intracelulares o como mediadores intracelulares de la vía del TGF- β . Después de su translocación en el núcleo, los complejos SMAD activan genes específicos a través de interacciones cooperativas con elementos que se unen a las SMADs, estos complejos formados a su vez se unen a las regiones promotoras de los genes diana. Los factores de unión al ADN actuarán entonces como coactivadores transcripcionales o corepresores transcripcionales, permitiendo así la afinidad y especificidad para los genes dianas. La activación de SMAD está regulada negativamente por SMAD inhibitoras (SMAD6 y SMAD7), que compiten con SMAD2 y SMAD3 por su unión a los receptores de tipo I [72, 73]. Además de la vía de señalización canónica o de las SMAD, TGF- β también activa diversas vías de señalización, denominadas no-SMAD o no canónicas [74]. Entre ellas, se encuentra la activación de Ras, proteínas cinasas mitógeno-activadas (MAPK), como ERK [75] y p38 MAPK [76], Rho GTPasas [77], la tirosina cinasa Axl [78] y la vía de señalización de PI3K/AKT [79]. Estas vías de señalización también regulan procesos distintos incluyendo la organización del ciclo celular, citoesqueleto, supervivencia celular, migración e invasión, entre otras. (Fig. 4).

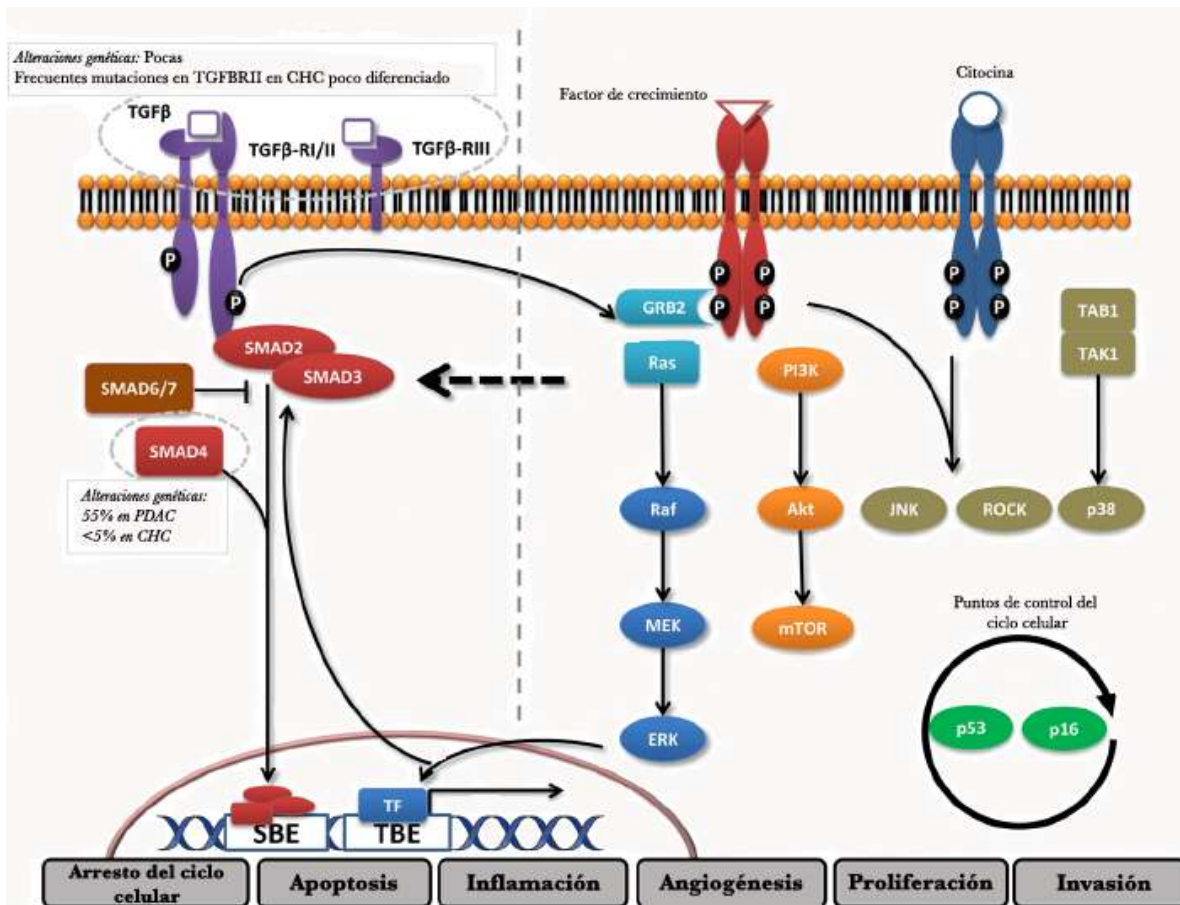


Figura 4. Vía canónica y no canónica de TGF- β . La vía canónica incluye a las proteínas SMAD y la no canónica las proteínas que corresponden a otras vías de señalización como Ras, PI3K, entre otras. Todas afectan a funciones importantes tales como arresto en el ciclo celular, apoptosis, inflamación, angiogénesis, proliferación e invasión. SBE: elemento de unión a SMAD (del inglés, SMAD binding element), TBE: elemento de unión a la caja T (del inglés, T-box binding element), TF: Factor de transcripción (del inglés, transcription factor) (Imagen traducida de Neuzillet *et al.*, 2015 [80]).

Esta vía de señalización ha resultado de gran interés al mostrar un comportamiento dual, es decir actúa diferente en el contexto normal versus patologías como el cáncer. En la situación de un tejido epitelial normal se sabe que la citocina TGF- β actúa inhibiendo la proliferación celular descontrolada por medio de arresto celular y apoptosis por una parte vía c-myc. La regulación de c-myc es importante para la inducción del inhibidor de Cdk p15INK4B, que inhibe a Cdk4-CycD. El inhibidor p27Kip1 también es afectado por TGF- β para inhibir Cdk2-CycE. La supresión de Cdk previene la hiperfosforilación de Rb, manteniéndolo hipofosforilado, es decir en estado supresor del crecimiento. TGF- β también modula el control postranscripcional de la progresión del ciclo celular mediante la activación de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), que a su vez inactiva p70s6k, una serina/treonina cinasa

que induce la traducción de los RNAm blanco y es esencial para la progresión de fase G1/S. Mediante un mecanismo de señalización aún por definir, la señalización de TGF- β también puede conducir a la inhibición de la cinasa activadora de CDK (CAK) y la regulación negativa de la fosfatasa activadora de CDK Cdc25A. Un punto importante de esta vía de señalización es la regulación de la cinasa p160ROCK ya que directamente inhibe la actividad de Cdc25A para inducir arresto celular en células epiteliales, pero no en fibroblastos [81].

En el contexto del tumor, la vía de señalización de TGF- β , actúa favoreciendo la EMT debido a que los complejos SMAD activan y aumentan la actividad de los factores de transcripción relacionados a EMT. Además, TGF- β induce la expresión de SNAIL1 a través de SMAD3, mientras que la expresión de SNAIL2 es inducida indirectamente por el factor de transcripción relacionado con miocardina (MRTF). SMAD3-SMAD4 también cooperan con SNAIL1 al suprimir los genes que codifican E-cadherina y Ocludina. TGF- β también induce la expresión de ZEB1, que controla adicionalmente la señalización de MAPK, y los complejos SMAD3-SMAD4 interaccionan con ZEB1 y ZEB2 para mediar la expresión génica regulada por TGF- β . Los complejos SMAD3-SMAD4 también interaccionan con el factor de transcripción 3 dependiente de AMP-c (ATF3) para reprimir la expresión de la proteína inhibidora de unión a ADN (ID1), aumentando así la expresión y actividad de TWIST. Además, otros cambios en la expresión génica durante la EMT ocurren sin la necesidad de factores de transcripción asociados a la EMT, pero si controlados por TGF- β vía SMADs. Las SMADs activan directamente la expresión de algunos genes mesenquimales; por ejemplo, los que codifican Fibronectina, Vimentina o colágena α I. Además, la asociación de los complejos SMAD inducidos por Nodal con la proteína motivo de interacción tripartita (TRIM33) media sus interacciones con las marcas de histonas, lo que conduce a la activación de la expresión de genes involucrados en destinos mesodérmicos [82].

Otras modificaciones durante la EMT que no son a nivel genético sino epigenético, es la regulación por microRNAs. Se ha propuesto que la familia miR200 junto con miR205 son marcadores epiteliales y supresores de la EMT; en la EMT inducida por TGF- β son reprimidos cinco de sus miembros, cuya función normal es reforzar el fenotipo epitelial y

regular negativamente el proceso por regulación negativa de los represores de E-cadherina, ZEB1 y Sip1/ZEB2. A su vez, ZEB1 reprime la expresión de esta familia miR200 creando retroalimentación negativa que induce la progresión de la EMT. Una retroalimentación negativa similar existe entre ZEB y miR34, Snail y miR34, miR203 y Snail; además, miR34 y miR200c son activados por p53 reprimiendo la EMT [63, 83]. La familia de let7 también ha sido implicada en la EMT, específicamente let-7i, así otro miRNA denominado miR10b, ambos reguladas por Twist. También se ha descrito represión de Snail por miR29b y mir30, de manera que su expresión aumentada puede revertir la EMT, mientras que miR143 y miR145 inhiben la migración de las células metastásicas de cáncer de próstata por inducción de E-cadherina. En estas mismas células transfectadas con miR203 se observó aumento de E-cadherina en la membrana y disminución de SIP1/ZEB2, Vimentina y Fibronectina [84, 85].

Por practicidad la EMT ha sido estudiada *in vitro*, permitiendo la caracterización de varias vías de señalización, así como el descubrimiento de la modificación de los denominados “genes maestros de la EMT” que son piezas claves para disparar este proceso biológico dentro de los cuales se incluyen factores transcripcionales como Snail, Twist, Zinc-finger E-box binding (Zeb) y E47. Su expresión es crucial mientras se da la activación de la EMT, y por lo tanto tienen un papel central en el desarrollo del cáncer. Como estos factores de transcripción tienen perfiles de expresión distintos, su contribución en la EMT depende del tipo de células o tejidos implicados y las vías de señalización que se activan. Con frecuencia controlan la expresión de los genes blanco y factores de transcripción adicionales que conducen la progresión de la EMT. En conjunto, estos factores de transcripción coordinarán la represión de genes epiteliales y la inducción de genes mesenquimales [86, 87]. Dentro de los genes considerados como los sellos distintivos de la transición epitelio mesénquima y que se encuentran generalmente controlados por los factores transcripcionales anteriormente mencionados, los más representativos se encuentran enunciados en la Tabla 1.

Tabla 1. Marcadores epiteliales y mesenquimales modificados durante la EMT.

Marcador	Papel en el cáncer
Epitelial	
E-cadherina	Adhesión célula-célula; se correlaciona inversamente con metástasis

Claudinas	Su alteración está en eventos tempranos de varios carcinomas
Ocludinas	Decrementa su expresión durante la metástasis
Desmoplaquinas	Ausente o distribución alterada en cáncer
Citoqueratinas	Sus niveles de expresión se encuentran reducidos en líneas celulares de cáncer
Mucina	MUC4 promueve metástasis en cáncer de ovario
ZO-1	Su decremento está relacionado con mal pronóstico
Mesenquimal	
Fibronectina	Se le ha relacionado a la progresión de varios carcinomas
Vimentina	Expresión asociada con mal pronóstico y tendencia a desarrollar metástasis
FSP-1	Alta expresión se relaciona con incremento en la agresividad de varias líneas celulares
N-cadherina	Promueve la motilidad e invasión celular
Snail1	Involucrado en la inducción de la EMT, crecimiento, supervivencia y migración celular.
β -catenina	Regula la adhesión celular, papel transcripcional en la progresión de la EMT
Slug	Metástasis y recurrencia, metástasis a nódulos linfáticos
Twist	Promueve invasión
SIP1	Represor de E-cadherina
DDR-2	Activa MMPs para degradar MEC
Zeb-1	Relacionado a pobre diagnóstico y subexpresión de E-cadherina

CARCINOMA HEPATOCELULAR

De acuerdo a GLOBOCAN 2012 el carcinoma de hígado es la tercera causa de muerte por cáncer en nuestro país [11]. Es de los principales tipos de cáncer con gran mortalidad y con la tendencia a incrementar en los próximos años. Dentro de los principales factores de riesgo se encuentran la infección por virus de la Hepatitis B o C; y no menos importantes, pero en menor grado, la cirrosis, el hígado graso, la esteatosis, entre otros [88-90]. Dentro de esta patología el carcinoma hepatocelular (CHC) es el cáncer de hígado más común [91, 92].

El CHC tiene un pobre pronóstico cuando hay un diagnóstico tardío además de la falta opciones de tratamiento efectivas. Mientras que varios tratamientos anticancerígenos han tenido buenos resultados, en el CHC resultan poco efectivos ya que la población de células tumorales tiene una gran heterogeneidad y entre ellas varias células con un fenotipo mesenquimal [93].

Existen alteraciones en la vía de señalización de TGF- β , se ha visto su participación en varios procesos previos al CHC como inflamación y cirrosis [94]. Existe una buena

correlación de la alta expresión de TGF- β en el suero de pacientes y el diagnóstico de CHC en comparación con pacientes que únicamente presentan cirrosis, y estos niveles pueden decrecer cuando los pacientes son sometidos a terapias y se logra obtener un buen resultado. Por ejemplo, en el caso de algunos carcinomas hepáticos, el sorafenib ha mostrado buenos resultados al inhibir STAT3 y a afectar a TGF- β cuando ambos se encuentran sobreexpresados en la EMT [95, 96].

Dentro de las diversas maneras de invasión celular que se han reportado, para el caso particular del CHC se le ha atribuido la EMT como el principal mecanismo involucrado (Tabla 2), siendo la citocina TGF- β un factor que ayuda a propiciar la EMT [97, 98]. De hecho, en condiciones normales los niveles de la citocina son bajos, y se ha reportado que los hepatocitos no son los responsables en producirla; no obstante, en las etapas tardías de cáncer, los hepatocitos adquieren la habilidad de síntesis y al responder a TGF- β [94]; ya no se van a apoptosis o arresto celular, sino que la señalización está estrechamente relacionada con ganancia de un fenotipo más agresivo, disparar la EMT, metástasis y algunas características del cáncer anteriormente citadas [37].

Tabla 2. Tipos de migración e invasión en cáncer (Traducida de Tang *et al.*, 2012 [99]).

Tipo de migración e invasión	Tipo de cáncer
Colectiva	Carcinoma de células escamosas orales Carcinoma colorectal Melanoma Cáncer de mama Carcinoma endometrial Cáncer de páncreas
Individual	
Mesenquimal	Fibrosarcoma Glioblastoma Melanoma
Ameboidea	Cáncer de mama Linfoma Carcinoma de células pequeñas de pulmón Carcinoma de próstata Melanoma Sarcoma
<i>Transición epitelio mesénquima</i>	<i>Carcinoma hepatocelular</i> Cáncer de mama Cáncer colorectal

	Cáncer de pulmón Cáncer de próstata Cáncer de páncreas
Invasión ameboidea a mesenquimal	Fibrosarcoma Carcinoma de mama Melanoma
Invasión colectiva a ameboidea	Melanoma

Es posible determinar la EMT en el CHC, en biopsias de pacientes mediante inmunohistoquímica por medio de la expresión de las proteínas consideradas biomarcadores característicos de la EMT. Varios estudios han evaluado la correlación entre la expresión de la alfa-feto proteína en suero, la expresión por inmunohistoquímica de E-cadherina y Vimentina y la presencia de invasión y metástasis. La correlación de un pobre pronóstico y en una enfermedad más avanzada cuando hay mayor pérdida de marcadores epiteliales, mientras que un buen pronóstico se refleja por la poca expresión de marcadores mesenquimales [100, 101]. Los estudios de inmunohistoquímica nos señalan un momento de la historia celular, más no los eventos o cambios que ocurren a lo largo de esta transición. Por lo cual muchos conceptos se basan en ensayos *in vitro*, especialmente con líneas celulares [102]. Por ejemplo, en un estudio de cultivo primario de hepatocitos, la actividad de TGF- β inhibe la proliferación celular; mientras que en células malignas o con mutaciones o modificaciones en la expresión de ciertos genes TGF- β promueve su crecimiento y ayuda a impulsar la EMT [103-106]. En líneas celulares derivadas de cáncer de hígado desde las 24 horas muestran un cambio en la morfología y una tendencia a la ganancia del fenotipo mesenquimal que se sostiene durante el tratamiento con la citocina [107].

Coulouarn y colaboradores describe los perfiles de expresión genética, ocupando microarreglos en muestras de pacientes, en líneas celulares y en un modelo animal de ratón donde se encuentra afectada la vía de señalización de TGF- β , [108]. El estudio llega a la conclusión que TGF- β participa en el CHC y reafirma los términos firma temprana y firma tardía de TGF- β que corresponden con recurrencia, pobre supervivencia y alta probabilidad de metástasis en pacientes; además encuadra un fenotipo más agresivo, mayor capacidad de invasión y características mesenquimales en las líneas celulares. Todo esto se corrobora en los animales en donde la vía de señalización de TGF- β se encuentra afectada. En ese estudio

ellos registran una lista de genes modificados (subexpresados y sobreexpresados), siendo estos de gran interés para posteriores estudios en el CHC. Dentro de estos resaltan unas proteínas que pertenecen al grupo de las CLIC's o canales intracelulares de cloro, específicamente CLIC 1 y CLIC4. No obstante, otros estudios con microarreglos analizados en el laboratorio indican otros genes que se modifican en CHC y su estudio no es exhaustivo y no incluye otros integrantes de esta familia de proteínas.

ANTECEDENTES DIRECTOS

La familia de las CLICs (en inglés *Chloride Intracellular Channels*) incluye varios miembros; en mamíferos se han reportado 6 [CLIC1-CLIC6]. En el descubrimiento del primer integrante de esta familia, p64, se usó el inhibidor de canales de cloro IAA-96, en un estudio de riñón de bovino [109]. La localización subcelular de estas proteínas es tejido específica debido a que se le ha descrito en membrana, citoplasma, núcleo, vesículas extracelulares secretadas, caveolas, aparato de Golgi, mitocondria y retículo endoplasmático, además de participar en varias funciones como tráfico membranal, citoesqueleto, apoptosis, control del ciclo celular, tubulogénesis, angiogénesis, modulación de receptores así como su participación en vías de señalización y diferenciación celular [110] (Tabla 3).

Esta familia posee un grado de identidad de aminoácidos entre el 60-70%; para el caso particular de CLIC5 su identidad con CLIC1 es de 63% y de 75% con respecto a CLIC4. La región carboxilo terminal es la zona más conservada entre los integrantes de la familia de CLIC's, teniendo dos dominios transmembranales denominados TM1 y TM2. Un dominio de interacción proteína-proteína SH3BD, tres probables sitios de fosforilación y un sitio de señal de localización nuclear (NLS) [110] (Figura 5). La región amino terminal es la que presenta la mayor diferencia entre las CLIC's lo que permite diferenciarlas y probablemente proveer diversas funciones específicas. Pese a la gran cantidad de funciones que se les han atribuido a esta familia, su participación como canales de cloro *in vivo* aún se encuentra en controversia. Singh y colaboradores en un estudio *in situ*, demostraron la baja afinidad hacia el ion Cl^- , pero mayor hacia cationes como Na^+ y K^+ en CLIC1, CLIC4 y CLIC5 recombinantes insertadas en bicapas planares; no obstante en este mismo estudio demuestran que estas tres proteínas tienen capacidad de interaccionar con actina sugiriendo que la actividad de CLIC1 y CLIC5 como canal no selectivo depende de su asociación con actina [111, 112]).

Para el caso de CLIC2, se le ha descrito un alto grado de similitud de secuencia con CLIC1 y cierta similitud con la clase omega de glutatión transferasas (GSTO). Un modelo

por homología sugirió que CLIC2 pertenece a la familia estructural GST, pero a diferencia de las GSTs, CLIC2 existe como un monómero. Además, pese a que presenta el motivo del sitio activo CXXC, el cual se conserva entre CLIC2 y las glutaredoxinas, no se detectó actividad tiol transferasa pero sí una baja actividad de glutatión peroxidasa. Además, se reportó que CLIC2 inhibe los canales de liberación de Ca^{2+} del receptor de rianodina cardíaca en bicapas lipídicas. La inhibición de los canales de rianodina (RyR) se revirtió eliminando CLIC2 de la solución o añadiendo un anticuerpo anti-CLIC2. Los resultados sugieren que una función de CLIC2 podría ser limitar la liberación de Ca^{2+} de las reservas internas en las células [113]. Finalmente, con respecto a CLIC6, se le ha descrito a nivel de RNAm en el plexo coroideo, la zona subventricular estriada, el cerebelo, la hipófisis y células de Purkinje de los lóbulos IX y X [114]. En células HEK293 transfectadas, al sobreexpresar CLIC6 no se observó ningún efecto en la concentración de cloro intracelular; sin embargo, por medio del ensayo de doble híbrido se observó que CLIC6 interactúa con receptores de dopamina (RD_3), MUPP1 y radixin, sugiriendo que podría participar en un complejo con los receptores RD_3 no sólo por su interacción directa con su zona C-terminal de estos, sino que también a través de interacciones con otras proteínas de andamiaje [115].

Aunque los patrones de expresión y las localizaciones difieren entre cada miembro de la familia CLIC, se sabe que todas las proteínas CLIC se asocian con los orgánulos membranosos. Además, las proteínas CLIC tienen características estructurales inusuales para los canales iónicos al describirse su localización intracelular en gran medida soluble y en menor grado membranoso [116]. No obstante, pese a la poca evidencia que existe en relación a su función como canal, no se ha descartado completamente la actividad como transportador transmembranoso; de hecho, varios autores sugieren considerar importante un cambio de la nomenclatura más adecuado para los integrantes de la familia de “CLIC”.

LA PARTICIPACIÓN DE LA FAMILIA CLIC EN CÁNCER

Si bien la importancia fisiológica de las proteínas del canal de cloro ha aumentado los últimos años, su conexión directa con la patogénesis del cáncer tiene aún muchas incógnitas. Las células cancerosas deben desatar varios procesos intracelulares que le permitan compensar y mantener las condiciones óptimas de viabilidad y proliferación [117, 118]. Para el caso de los integrantes de la familia de CLICs se les han correlacionado con capacidades relacionadas a los *hallmarks* que se describen en el cáncer; además varios miembros de la familia se unen con proteínas relacionadas al citoesqueleto de actina; siendo la alteración del citoesqueleto de actina una característica común e importante en varios tipos de cáncer. Brevemente se enuncian a continuación la participación de los integrantes de la familia de CLIC en cáncer, resaltando especialmente en el CHC.

CLIC1. Se le ha reportado sobreexpresado y postulado como un biomarcador de pronóstico en varios tipos de cáncer como: cáncer gástrico [119], cáncer colorectal [120], carcinoma nasofaríngeo [121], adenocarcinoma de pulmón [122], cáncer de ovario [99, 123] y en células metastásicas intraperitoneales derivadas de cáncer de ovario [124], cáncer de endometrio [125], gliomas [126] y especialmente en la subpoblación de células troncales [127], cáncer de vesícula biliar [128], cáncer de próstata [58], cáncer de páncreas [129] y leucemia linfoblástica aguda [130]. Para el caso en especial de CHC fue reportada su sobreexpresión por primera vez en muestras de pacientes así como en las líneas celulares HuH7 y PLC5 [86, 87], además se le atribuye una importante participación en proliferación, invasión [131], migración vía Anexina7, Gelsolina [132] y mapsina [133], en ascitis producida por CHC [134], en metástasis linfática [135], así como relación a un mal pronóstico en pacientes que presentan a CLIC1 sobreexpresado [136].

CLIC2. Hasta la fecha, no se ha reportado ninguna relación entre esta proteína y algún tipo de cáncer.

CLIC3. La expresión de la proteína es necesaria para la migración celular y se le asocia con la señalización de integrina activada tanto en un ensayo de microambientes 3D *ex vivo*, así como en tumores humanos de adenocarcinoma ductal pancreático. Además, los niveles de CLIC3 dictan metástasis a ganglios linfáticos y una pobre supervivencia del paciente, lo que

destaca la importancia del tráfico de integrinas para la progresión del cáncer *in vivo* [137]. Además, en cáncer de mama se relaciona su sobreexpresión con resistencia a la droga Neratinib, un inhibidor de tirosina cinasas [138], otro estudio indica la importancia de CLIC3 en el control del reciclaje de los endosomas tardíos y por lo tanto dictan la invasión y metástasis [139], además su secreción promueve la progresión del cáncer [140]. Sin embargo, para el caso del CHC no se ha reportado ninguna participación al respecto.

CLIC4. Es la proteína más estudiada de todos los integrantes de la familia de CLICs [141]. Se ha descrito su participación en fibroblastos de cáncer de mama [142], en cáncer de pulmón se reporta que la alteración podría estar restringido a una fracción específica de estas células [143], en cáncer de ovario se le describe como biomarcador [123], así como su participación en la transdiferenciación de fibroblastos a miofibroblastos [144], en el citoplasma de células tumorales pancreáticas y en el núcleo de los fibroblastos asociados al tumor [145], en células tumorales del carcinoma de cabeza y cuello se encuentra sobreexpresado [146], en cáncer colorrectal [147]. En cáncer de mama se ha visto la participación de CLIC4 con TGF- β en la regulación de fibroblastos asociados al cáncer, contribuyendo a inducir un fenotipo estacionario colectivo a miofibroblastos [148]. Además, CLIC4 se eleva durante la apoptosis inducida por TNF α en líneas celulares de osteosarcoma humano. No obstante, en el carcinoma de células cutáneas escamosas, CLIC4 participa como un supresor tumoral [149]. En un modelo de queratinocitos descubrieron que participa en la inducción de apoptosis dependiendo de la participación de las mitocondrias y consideran a CLIC4 un objetivo para la terapia del cáncer [150]. Se le ha reportado en las mitocondrias y el citoplasma de los queratinocitos, participando en la respuesta apoptótica al estrés. Además, Kuh y colaboradores delimitan que esto es debido a su translocación al núcleo en el mismo modelo celular. Para el caso del CHC, se le reportó en las líneas celulares Hca-P y HcaF, donde participa en la proliferación, debido a que en el silenciamiento de CLIC4 por medio de shRNA; las células son llevadas a apoptosis [151].

Tabla 3. La familia de CLICs. Datos obtenidos de NCBI Protein, Uniprot, literatura obtenida en PubMed. N.I. Indica información no disponible o no indicada hasta el momento (Ampliada de Suh *et al.*, 2005 [110]).

<i>Miembro de la familia</i>	<i>Localización cromosomal</i>	<i>Tamaño de la proteína</i>	<i>Localización subcelular</i>	<i>Células o tejidos donde se expresan</i>	<i>Función</i>	<i>Activación, características y/o enfermedad</i>
CLIC1	6p21.33 (294 kb)	27 kDa (241 aa)	Extracelular vesículas secretoras, citoplasma núcleo y membrana, citoesqueleto	Neutrófilos, macrófagos, corazón, microglia, espermatozoide	Ciclo celular, diferenciación, proliferación, migración e invasión	Biomarcador en leucemia Sobreexpresión en varios tumores sólidos, activación ante estrés oxidativo (GST)
CLIC2	Xq28 (58 kb)	28 kDa (247 aa)	Citoplasma y posiblemente membranal	Hígado, músculo esquelético, pulmón, bazo, cerebro, corazón, placenta	Actividad de canal dependiente de pH y el estado redox	Modula la actividad de RYR2 e inhibe el flujo de calcio Presente en lupus eritematoso, inflamatoria
CLIC3	9q34.3 (2 kb)	24 kDa (207 aa)	Citoplasma, núcleo	Placenta, pulmón, corazón, riñón, páncreas	Crecimiento	Sobreexpresada en varios tipos de tumores Interactúa con ERK y se le relaciona con formación de endosomas.
CLIC4	1p36.11 (46 kb)	29 kDa (253 aa)	Citoplasma, núcleo, mitocondria, Golgi, ER, citoesqueleto	Corazón, placenta, músculo esquelético, piel, espermatozoide	División celular, tubulogénesis, angiogénesis, arresto celular.	Sobreexpresada en varios tipos de tumores, regula el sostenimiento de la vía de señalización TGF- β , inflamación
CLIC5	6p12.1 (179 kb)	Dos isoformas: CLIC5B 47 kDa (410 aa) CLIC5A 28 KDa (250 aa)	Citoplasma, membrana, mitocondria, Golgi, citoesqueleto	Corazón, músculo esquelético, riñón, espermatozoide	Diferenciación celular, división celular.	Mantenimiento de estructuras celulares. Sobreexpresado en leucemias, participación en resistencia a apoptosis
CLIC6	21q22.12 (49 kb)	Dos isoformas: CLIC6B 73 kDa (700 aa) CLIC6A 71 kDa (686 aa)	Citoplasma, membrana	Cerebro, placenta, páncreas, hígado	Probablemente influye en la secreción hormonal.	Interacción con receptores de dopamina DRD2, DRD3, DRD4

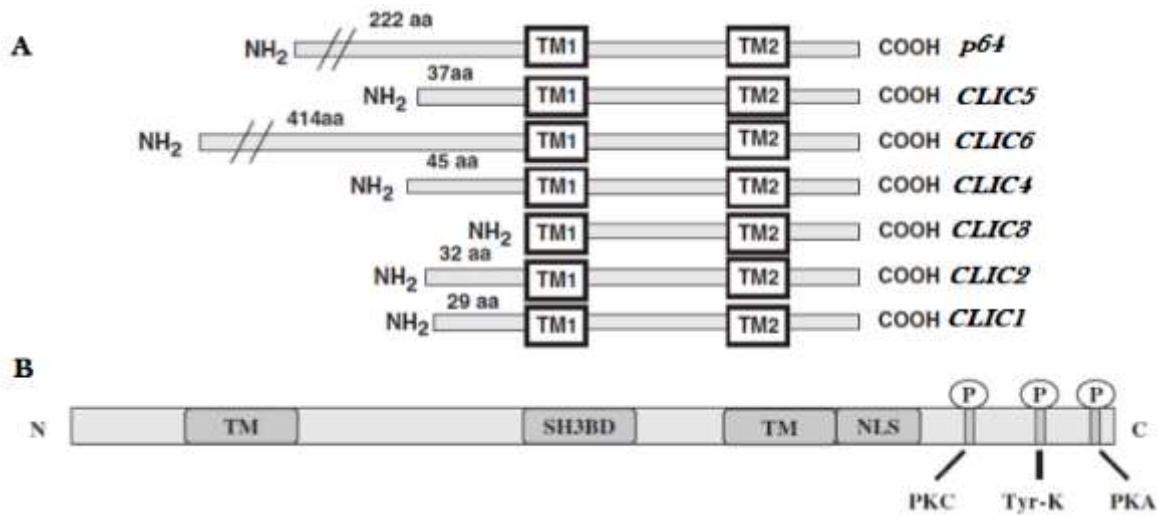


Figura 5. Integrantes de los miembros de la familia de CLIC's, p64 es el primer integrante descrito en bovino. **A)** Esquemas alineados de los integrantes de la familia CLIC's. **B)** Dominios distintivos de cada uno de los integrantes de la familia CLIC's: la zona carboxilo terminal es la más conservada contiene dos dominios transmembranales (TM1 y TM2), una señal de localización nuclear (NLS) y sitios de probable fosforilación (Imagen modificada de Suh *et al.*, 2005 [110])

CLIC5

CLIC5 es una proteína que fue descrita en las vellosidades de la placenta asociada a proteínas de citoesqueleto (entre las cuales se encuentran Actina, Ezrina, Gelsolina IQGAP1 y α -actinina) [152]. Al igual que sus familiares CLIC's, se le ha reportado con probable función de canal, sin embargo, no se ha concluido de manera definitiva esta participación [112]. En dos estudios independientes Pierchala y Wegner respectivamente, demuestran que en el glomérulo renal es importante para la formación y estructura del podocito así como para la filtración renal. En ambos grupos de trabajo demuestran que cuando la proteína es suprimida afecta la formación de prolongaciones celulares así como la expresión e interacción física con otras proteínas relacionadas a andamiaje y citoesqueleto, tales como Podocalixina y Ezrina [153-155]. Estas dos proteínas (Podocalixina y Ezrina) se les han descrito independientemente en su participación como proteínas de andamiaje y en la formación de estructuras celulares como lamelipodios, fibras de estrés y filopodios, en su capacidad de interactuar tanto directa como indirectamente entre ellas así como en su interacción con diversas proteínas en diferentes modelos celulares [156-159]; además la

sobreexpresión de cada una de ellas está asociada a un mal pronóstico y mayor agresividad, capacidad de migración e invasión en diferentes tipos de cáncer [160-162].

En el glomérulo renal, se ha reportado la importancia de CLIC5 para la activación de la proteína de andamiaje Ezrina, es decir su fosforilación y por ende la asociación con actina; siendo una función que puede ser compensada por CLIC4 ante su delección [163]. Por otra parte, Salles y Gagnon respectivamente han descrito su participación en la formación de estereocilios en el oído interno, gracias a su interacción con el citoesqueleto y específicamente con la proteína Actina [164, 165]. En un modelo de osteoclastos de pollo se le ha descrito que tiene la capacidad de interaccionar físicamente con Src en SH3 y SH2, siendo probablemente una interacción que influye en la reabsorción de las células [166]. Otro estudio hecho por Li en fibroblastos 3T3, demostró que cuando se induce la sobreexpresión de CLIC5 los fibroblastos no pueden pasar al estado de diferenciación de adipocitos, por lo cual la proteína podría estar asociada a otro tipo de funciones dependiendo del tipo celular y probablemente difiriendo tanto en condiciones normales como patológicas [167]. Además, en otro estudio con células C2C12 (mioblastos), se describió que la sobreexpresión de CLIC5 participa en la proliferación así como en la diferenciación miogénica *in vitro* [168].

Desde el momento del descubrimiento de CLIC5, se han descrito dos isoformas de aproximadamente 28 kDa y 47 kDa respectivamente siendo el sitio N-terminal el que permite diferenciarlos. A pesar de que existe un modelo animal donde se eliminó la expresión de ambas isoformas hasta la fecha no se ha delimitado las posibles funciones diferenciales de estas dos proteínas [152]. Los ratones KO a la proteína CLIC5, denominados jitterbug o jbg, presentan disfunción auditiva y vestibular debido a que poseen estereocilios dimórficos y degeneración de células pilosas [165]. Además, en otro estudio se demostró que las células endoteliales glomerulosas del riñón pertenecientes a los ratones jbg presentan un ensachamiento y modificación estructural de los podocitos; lo cual se asocia a microalbuminuria y problemas en el funcionamiento renal. Finalmente para el caso particular del hígado, la única evidencia que se reporta es la reducción en acumulación de lípidos en hígados de ratones jbg ante una dieta alta en grasa y por lo tanto los autores concluyen que la eliminación de la expresión de CLIC5 permite una resistencia a la obesidad inducida [169].

Por otra parte, en células de cáncer de colón, se le ha descrito a ambas isoformas no solo ubicación citoplasmática sino también a nivel de aparato de Golgi asociándose con AKAP350 [170] y mitocondria en cardiomiocitos [171]. Aunado a todo lo anterior, los miembros de la familia más cercanos CLIC1 y CLIC4 se han visto sobreexpresados en líneas celulares derivadas de CHC influyendo en ciertas funciones importantes para el mantenimiento del tumor como resistencia a apoptosis, metástasis linfática, migración e invasión [132, 133, 151].

Anteriormente, en dos estudios, en cáncer de mama y de próstata respectivamente, se había reportado la sobreexpresión del gen CLIC5; no obstante, su validación proteica nunca fue realizada y quedó como un gen tentativo para el pronóstico [172, 173]. Por otra parte, Torres Mena JE en 2010 describe un grupo de genes que se ven modificados en un modelo de hepatocarcinogénesis química denominado modelo modificado del hepatocito resistente (MMHR), entre ellos describe que la proteína CLIC5 se encuentra sobreexpresada y que probablemente tenga la capacidad funcional de ser una proteína de andamiaje al predecir su interacción con proteínas como Ezrina y Actina [174, 175]. La sobreexpresión del gen CLIC5 en CHC fue un dato que corroboraba con datos encontrados en el laboratorio en un análisis previo, pero la expresión proteica o algún tipo de funcionalidad relacionada a este tipo de tumor no fue validada. Finalmente, durante mi tesis de maestría se validó la sobreexpresión reportada en microarreglos de CLIC5 en el MMHR en tiempos tardíos seleccionando zonas tumorales y no tumorales, se validó la sobreexpresión reportada por RT-qPCR así como la expresión proteica por medio de inmunohistoquímica y western blot [176]. Con base en todo lo anterior nosotros proponemos estudiar a CLIC5 y definir si su sobreexpresión tiene algún papel funcional en el CHC humano.

HIPÓTESIS

La proteína CLIC5 se encuentra sobreexpresada en carcinoma hepatocelular humano y participa en la transición epitelio mesénquima como una proteína asociada al citoesqueleto.

OBJETIVOS

General

Determinar la participación de CLIC5 en la transición epitelio mesénquima durante la progresión del carcinoma hepatocelular.

Particulares

- 1) Evaluar la expresión de CLIC5 en CHC humano.
- 2) Comprobar si hay interacción de CLIC5 con proteínas de citoesqueleto *in vitro*.
- 3) Evaluar a CLIC5 durante la EMT *in vitro*.
- 4) Silenciar la expresión de CLIC5 y evaluar el efecto sobre EMT *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Biológico

Líneas celulares.

Las líneas celulares derivadas de carcinoma hepatocelular humano: HepG2 y HuH7, además de la línea celular de mioblasto muscular C2C12 fueron crecidas de acuerdo a las indicaciones dadas por ATCC. Brevemente, se crecieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y antibióticos (ampicilina y estreptomycin). Para el caso de la línea SNU387, fue cultivada en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 suplementado con SFB al 10% y antibióticos. Todas las líneas celulares fueron crecidas en ambiente húmedo a 37 °C y un 5% de CO₂. La línea celular C2C12, fue ocupada como control positivo de CLIC5 de acuerdo a lo descrito por Li en 2010 [168].

Macroarreglo de muestras de biopsias de pacientes

Biopsias hepáticas embebidas en parafina de casos de CHC (n=10) y otras patologías del hígado (esteatosis (n=8), cirrosis (n=10), fibrosis (n=3), entre otras (n=17)) fueron donadas por la Dra. Rebeca García Román (Universidad Veracruzana). Todas las muestras fueron previamente teñidas con hematoxilina-eosina y evaluadas por diagnóstico rutinario histológico. En todos los casos las laminillas fueron revisadas siendo el diagnóstico confirmado por dos expertos patólogos independientes. Este trabajo fue hecho de acuerdo con la Declaración de Helsinki (2000) del World Medical Association y bajo la Ley General de Salud Mexicana (2011), La ley General de Regulación de Investigación de Salud (1987) y la Ley de Salud del estado de Veracruz-Llave (2008) y evaluadas por el Comité Científico y de Ética del Hospital (Centro de Especialidades Médicas del Estado de Veracruz, CEMEV) (permiso 005/2011). Los parámetros de nuestro análisis fueron la intensidad de la señal observada en la inmunohistoquímica; dividida en alta, media, baja y negativa y la fracción de células positivas en el área de la imagen.

Metodología

Inmunocitoquímica

Las células descritas con anterioridad se crecieron en cubreobjetos estériles, hasta el día correspondiente del análisis, se retiró el medio de cultivo y se lavó 3 veces con PBS. La fijación se realizó con paraformaldehído (PA) a TA por 10-15 min, posteriormente se procedió a realizar 3 lavados con PBS para eliminar detritos celulares. Se permeabilizó por 10 min con PBS-Tritón al 0.1% y se realizaron los lavados con PBS. El bloqueo se realizó con BSA 6% diluida en PBS, posteriormente los respectivos anticuerpos primarios se incubaron toda la noche a 4° C, al día siguiente se realizaron 2 lavados con PBS y posteriormente se incubaron los anticuerpos secundarios peroxidados (a-Ms: anti-Ratón, a-Rb: anti-Conejo y a-Gt: anti-Cabra) por 1 h a TA. La reacción fue realizada por DEAB y censada en el microscopio Leica. Finalmente se detuvo la reacción al obtener buena señal con agua corriente por 5 min y se contratiñó con hematoxilina para montarla finalmente con resina sobre el portaobjetos.

El estímulo con TGF- β

Para el estudio de la transición epitelio mesénquima se colocó el estímulo con la citocina TGF- β diluida en medio DMEM a las 24, 48, 72 y 96 h respectivamente en una concentración de 2 ng/mL de acuerdo a lo descrito anteriormente. Finalmente se determinó la EMT por medio del cambio morfológico celular, la aparición de fibras de estrés de actina, la ganancia del marcador Vimentina y la pérdida del marcador E-cadherina evaluados por medio de inmunohistoquímica y western blot.

Inmunoprecipitación

A partir de la misma concentración de extracto proteico 30 μ g/mL, se incubaron 400 μ g en el rotador a 4 °C toda la noche, con los respectivos anticuerpos de interés. Al día siguiente se añadieron 60 μ L de proteína G-sephrosa® (diluída previamente en una relación 1:5), se incubó en el rotador a 4 °C por 1 hora. Se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm por 1 min. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet obtenido 3 veces con el buffer TNTE

0.1%. Entre cada lavado se realizaron centrifugaciones por 10 s y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron las muestras en buffer Laemmli 3x para la preparación de la muestra.

Análisis morfológico

Aquellas células que fueron sometidas al tratamiento con TGF- β se obtuvieron las imágenes por fotodocumentación en un microscopio invertido acoplado a una cámara NIKON. Como imágenes representativas en campo claro, para su análisis se procedió a realizar la fijación de las células con PA en cajas de 35 mm. Brevemente, se retiró el medio de cada una de las cajas, se realizaron lavados con PBS y la fijación se llevó a cabo por 10 min. La tinción fue realizada con cristal violeta, y posteriormente se hicieron 3 lavados con agua MQ. La fotodocumentación de estas se realizó en un microscopio Leica. El análisis se realizó por medio de la relación largo/ancho de 50 células para cada grupo y tiempo; es decir células control (sin estímulo) y células con estímulo a las 0, 24, 48 72 y 96 h respectivamente.

Rearreglos en el citoesqueleto de actina

Se sembraron 1×10^5 células en cubreobjetos estériles y fueron fijadas con PA al 4% a TA durante 10-15 min, posteriormente fueron lavadas 3 veces con PBS, permeabilizadas con PBS-Tritón 0.1%, y posteriormente teñidas con faloidina por 10 min, después de ser lavadas 3 veces con PBS las muestras fueron teñidas con DAPI por 10 min, lavadas 3 veces con PBS y montadas con el medio de montaje Vectashield.

Inmunofluorescencia

Para la inmunofluorescencia 1×10^3 células fueron sembradas en los cubreobjetos, colocados en cajas de 24 pozos, cuando correspondiera su análisis, las células fueron lavadas 3 veces con PBS y fijadas con PA al 4% durante 10-15 min, posteriormente se retiró el PA y se procedió a 2 lavados con PBS. La permeabilización se realizó con PBS-Tritón al 0.1% de 10-15 min, se realizaron los lavados y se realizó el bloqueo con BSA 6% y SFB 3% en PBS-Tritón 0.1% durante 2 h. La incubación del anticuerpo se realizó toda la noche a 4° C. Al día siguiente, se procedió a realizar lavados con PBS para retirar el exceso del anticuerpo, y se incubaron los anticuerpos secundarios durante 1 h 30 min protegiéndolos de la luz. Se procedió a los subsecuentes lavados y la incubación con los colorantes Faloidina (10 min) a

TA y DAPI (15 min) a TA, cuando correspondiera, al final se realizaron 2 lavados con PBS y uno con agua MQ. Se procedió a montar con medio de Vectashield y a fijar los cubreobjetos en portaobjetos limpios. Las muestras fueron examinadas usando un microscopio confocal Leica TCS-SP2 de escaneo laser. Dependiendo la línea celular se realizaron cortes ópticos en un rango de 15 a 7.

Western blot

La obtención de proteína total fue realizada con buffer de lisis RIPA y de citoesqueleto respectivamente, conteniendo 100 uL/mL de un coctel de inhibidores de proteasas COMPLETE (Roche Applied Science, Mainheim Germany) y 10 uL/mL de inhibidores de fosfatasas. Cantidades iguales de proteína (30 µg/mL) fueron corridas en gel 10% SDS-PAGE a 60 V por 20 min en la primera fase de corrida y 2-3 h la segunda fase de corrida. La integridad de las proteínas fue verificada por medio de tinción con azul de Coomassie. Después, el equilibrio de las membranas de polivinilidene fluoride (PVDF) fue llevado a cabo por 10 min. La transferencia del gel a las membranas de PVDF fueron realizada a 300 mA por 2 h, posteriormente la membrana fue teñida con colorante de Ponceu para corroborar la transferencia de las proteínas. El bloqueo de las membranas fue realizado con leche baja en grasas en polvo diluida en TBS–Tween 0.05%, respectivamente. Y la incubación de los anticuerpos fue realizada toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con la solución TBS-Tween 0.05%, para posteriormente incubarse con el respectivo anticuerpo secundario 1 h a TA. Después de 3 lavados con la respectiva solución se procedió a realizar la incubación de la membrana con luminol Santa Cruz o Millipore respectivamente. La tabla 4 indica con mayor detalle los protocolos de los anticuerpos utilizados en este trabajo.

Tabla 4. Lista de anticuerpos en donde se especifican marca, bloqueo y el protocolo de incubación.

Anticuerpo Dilución	Marca	Bloqueo	Incubación del primario	Incubación del secundario
CLIC5 1:1,000	Abcam	Leche 3% BSA 2%	Toda la noche BSA 2%	Leche 3% a-Rb 1h TA

E-cadherina 1:1,000	Abcam	Leche 3% BSA 2%	Toda la noche BSA 2%	Leche 3% a-Ms 1h TA
Vimentina 1:1,000	Abcam	Leche 5%	Toda la noche Leche 3%	Leche a-Gt 1h TA
GAPDH 1:10,000	Cell Signaling Technologies	Leche 3% BSA 2%	Toda la noche BSA 2%	Leche a-Rb 1h TA
Lamina- β 1:1,000	Santa Cruz	Leche 5%	Toda la noche Leche 3%	Leche a-Gt 1h TA
α -Tubulina 1:1,000	Santa Cruz	Leche 5%	Toda la noche Leche 3%	Leche a-Ms 1h TA

Evaluación de viabilidad por MTT

Dependiendo del tipo y tiempo de evaluación, se sembraron de 50,000 a 100,000 células en 300 uL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) en cajas de 24 pozos, suplementado con 10% de SFB. Durante su incubación las células se mantuvieron en condiciones de humedad, a 37°C y con 5% de CO₂. La viabilidad se determinó mediante la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color morado (formazan). Las células se incubaron con 5 ug/mL de MTT a 37 °C durante 3 h. A continuación, se retiró el medio y se disolvió el formazán precipitado en dimetilsulfóxido (DMSO). La absorbancia se leyó a 460 nm. Se consideraron triplicados para cada lectura.

Silenciamiento por shRNAs

El silenciamiento se realizó en 4 etapas: La evaluación de la toxicidad con polibreno, la evaluación de toxicidad con puromicina, la determinación de viabilidad celular y finalmente la selección de aquellas células que lograron ser silenciadas. Con respecto a la toxicidad con polibreno: brevemente, se sembraron 1×10^5 células dejándoles crecer toda la noche. Se procedió a realizar curva de concentración con polibreno a 0, 1, 3, 5, 7, 10, 13 y 15 $\mu\text{g/mL}$ diluido en medio incubando por 12 h; posteriormente se evaluó la viabilidad celular por MTT. Para el caso de puromicina, se procedió a sembrar 1×10^5 células dejándoles crecer toda la noche, se adicionó puromicina diluida en medio siguiendo las mismas concentraciones que en polibreno pero incubando 24 h y 48 h respectivamente, para

posteriormente realizar MTT. La concentración elegida fue aquella donde hay una eficiencia del 100% de muerte celular. Respecto a la transducción de partículas lentivirales shRNA (poner inserto), se siembran las células blanco 24 h antes de la infección viral. Se les deja crecer durante toda la noche con la finalidad de obtener una confluencia del 50% al siguiente día que corresponde a la infección. La cantidad de células se ajustó de acuerdo a la zona de crecimiento del pocillo o placa. Se preparó la concentración adecuada de polibreno, se eliminó el medio de los pocillos para posteriormente ser remplazado con medio adicionado con polibreno. Previamente se descongelaron las partículas lentivirales a TA, se realizó la infección de las células añadiendo las partículas lentivirales de shRNA al cultivo. Se agitó con cuidado la placa para mezclar y se incubó toda la noche. La cantidad de partículas virales necesarias varían de acuerdo a las características de las células, para este estudio se ocuparon las condiciones reportadas en el inserto. Al día siguiente se eliminó el medio de cultivo y se remplazó con 1 mL de medio completo sin polibreno y se incubaron las células durante toda la noche. Al día siguiente se seleccionaron las clonas que expresan de forma estable el shARN, dividiéndolas en una relación e 1:5 y se incubaron las células 24 h. La selección se realizó con puromicina, de acuerdo a la curva de toxicidad de puromicina. Se reemplazó el medio con puromicina fresca cada 3-4 días hasta que las colonias resistentes pudieron ser identificadas. Se seleccionaron las células por medio de la resistencia al antibiótico, se crecieron y se analizó la expresión estable de shRNA. Los controles incluidos en el ensayo fueron, células sin tratamiento con shRNA, células con shRNA scramble y células que reciben GFP.

Ensayo de cierre de herida

Se sembraron las células a evaluar HuH7 (consideradas como control), shCLIC5 y HuH7 estimuladas con TGF- β en cajas de 10 mm y se dejaron crecer hasta confluencia completa o a la formación de una monocapa celular. Posteriormente las células fueron colocadas en ayuno toda la noche para posteriormente colocarles mitomicina (40 μ g por dos horas) con la finalidad de descartar crecimiento celular. En el punto 0 se realizó la herida trazando una línea recta con la punta de pipeta de 100 μ L. Se lavaron las cajas con PBS con la finalidad de eliminar aquellas células arrastradas o despegadas por la herida, posteriormente se agregó medio nuevo. La evaluación de la herida se realizó a diferentes

puntos 24, 48, 72 y 96 h respectivamente. Se realizó la fijación de cada una de las cajas del ensayo de cierre de herida para posteriormente teñirlas con cristal violeta. La fotodocumentación se llevó a cabo en el microscopio OLYMPUS IX70.

Ensayo de migración por cámaras de Boyden

Se siguieron las indicaciones del fabricante, brevemente se sembraron 1×10^5 células en el inserto superior, en medio sin SFB, se les lleva a un volumen final de 500 μ L. En la parte inferior de la cámara se colocaron 500 μ L de medio con suero al 10%. La incubación se hizo durante toda la noche. Se retiró el medio del inserto y se pasó a pozos que contenían cristal violeta para la tinción. Se lavaron varias veces con agua MQ y con un hisopo estéril se eliminaron las células que no migraron. Se disolvió el colorante con el buffer de extracción y se leyó en un rango de 560 nm.

Ensayo de invasión por cámaras de Boyden

Se procedió a las indicaciones del fabricante, siendo las condiciones muy similares a las de la de migración con la cámara de Boyden, teniendo como modificación que la cámara contiene un matrigel y el tiempo de incubación de 48 h.

Análisis bioinformático

El modelado de la estructura se realizó utilizando el servidor I-TASSER, que permite la predicción de estructuras *in silico* 3-D <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>; con la finalidad de validar el modelo 3-D dado por I-TASSER; se evaluó por medio del gráfico de Ramachandran en el servidor <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>. Para el caso de análisis de minerías de datos de muestras de pacientes se ocuparon los servidores ONCOMINE <https://www.oncomine.org/resource/login.html> y cBioportal <http://www.cbioportal.org/>, ambos se basan en análisis realizados por diferentes grupos de investigación que permiten el acceso público al comportamiento de la expresión de varios genes en diferentes tipos de cáncer. El análisis de predicción de secuencia de localización nuclear se realizó en los servidores cNLS Mapper http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi y NucPred <http://www.sbc.su.se/>. Para el caso del reporte de asociaciones proteicas

funcionales, se ocupó el servidor <https://string-db.org/> . Finalmente para el análisis de alineamiento se ocuparon los servidores ClustalW2 y ESPript 3.0 <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> y <http://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/> , respectivamente.

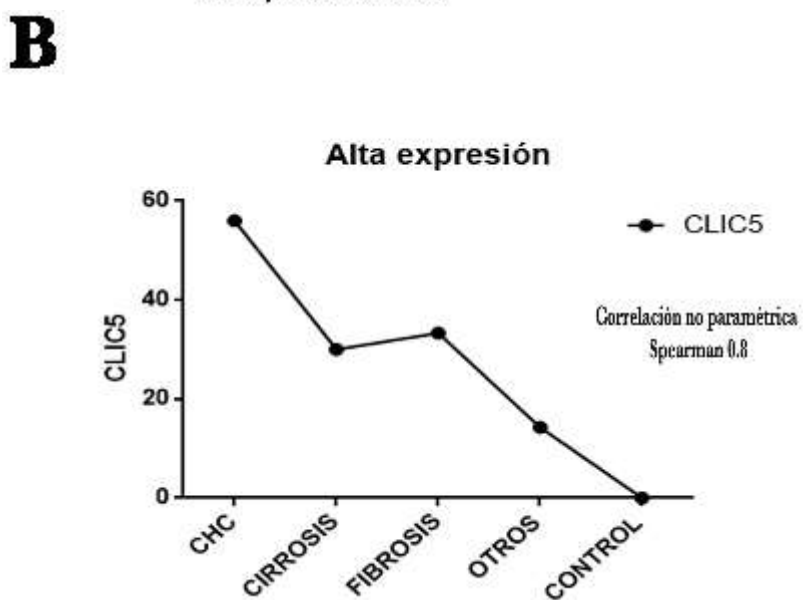
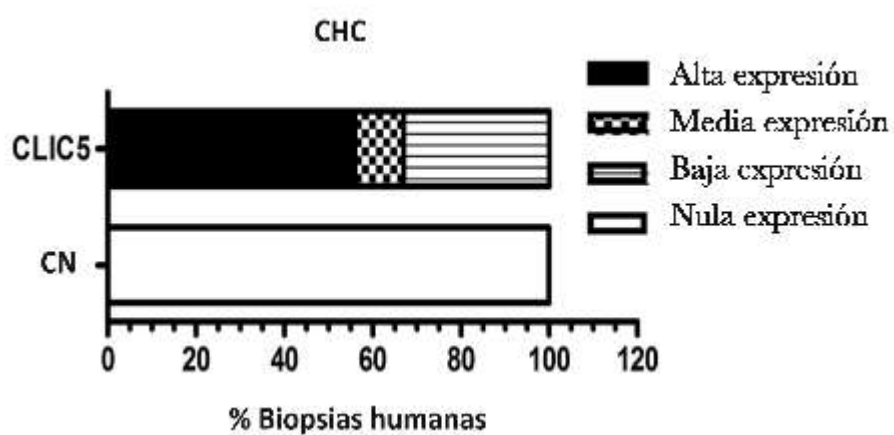
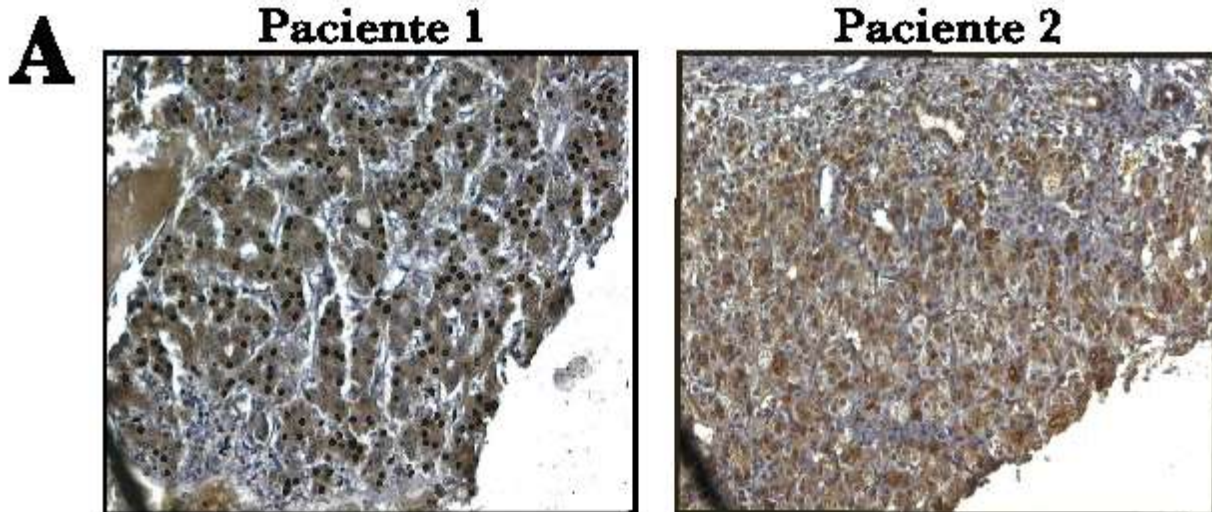
Análisis de datos y estadística

Para el caso del análisis de los westerns blots, las imágenes fueron digitalizadas y la intensidad de banda fue evaluada por medio del programa ImageJ. Para el caso del análisis de las muestras de pacientes (macroarreglo de tejidos) se ocupó el software ImageJ, el cual permitió determinar las características de baja expresión, media expresión y alta expresión, en el caso del análisis estadístico se realizó por medio de la prueba no paramétrica de Sperman. El análisis estadístico se realizó por medio del programa Graph Prism 6.0. Los resultados se expresaron como la media +/- D.E. de al menos 3 experimentos independientes. La prueba *t* de Student fue usada para determinar la significancia estadística. Considerando el cohorte de 0.05.

RESULTADOS

La proteína CLIC5 se encuentra sobreexpresada en el carcinoma hepatocelular humano.

Previamente se demostró la sobreexpresión de la proteína CLIC5 en tejido tumoral de ratas sometidas al Modelo Modificado del Hepatocito Resistente a los 9, 12 y 18 meses; con la finalidad de verificar si los resultados obtenidos de un modelo de hepatocarcinogénesis química en rata también acontecen en el CHC de ser humano, en el presente trabajo se procedió a verificar este mismo patrón de sobreexpresión en un macroarreglo de tejido proveniente de pacientes diagnosticados con diferentes patologías del hígado. A partir de las biopsias donadas por la Dra. Rebeca García Román, investigadora del Instituto de Salud Pública en la Universidad de Veracruz y diagnosticadas con cirrosis, fibrosis, así como CHC, entre otras (hepatitis aguda, esteatosis, colecistitis crónica, absceso hepático, hiperplasia nodular regenerativa y quiste hepático); se procedió a clasificar en alta, media, baja y nula expresión de acuerdo a la intensidad de la señal obtenida en el ensayo de inmunohistoquímica. La señal para CLIC5 se pudo observar principalmente a nivel citoplasmático y en algunas muestras de las biopsias de pacientes también se obtuvo señal a nivel nuclear en ciertos hepatocitos. Para el caso de las muestras correspondientes a CHC se observó que más del 50% caían en la clasificación de alta intensidad, un 10% en intensidad media y el resto en baja expresión; cabe resaltar que para todas las muestras de pacientes ninguna presentó nula expresión de CLIC5 a comparación del control negativo (hígado sano). Por otra parte, las otras patologías del hígado mostraban menor porcentaje en la categoría de alta intensidad de señal para CLIC5. Finalmente, realizando un análisis no paramétrico de Spearman se obtuvo una correlación del 0.8, indicando una buena correlación entre CHC y alta intensidad de señal de la proteína CLIC5 a comparación de las otras patologías (cirrosis, fibrosis, otros) y el control (Fig. 6).



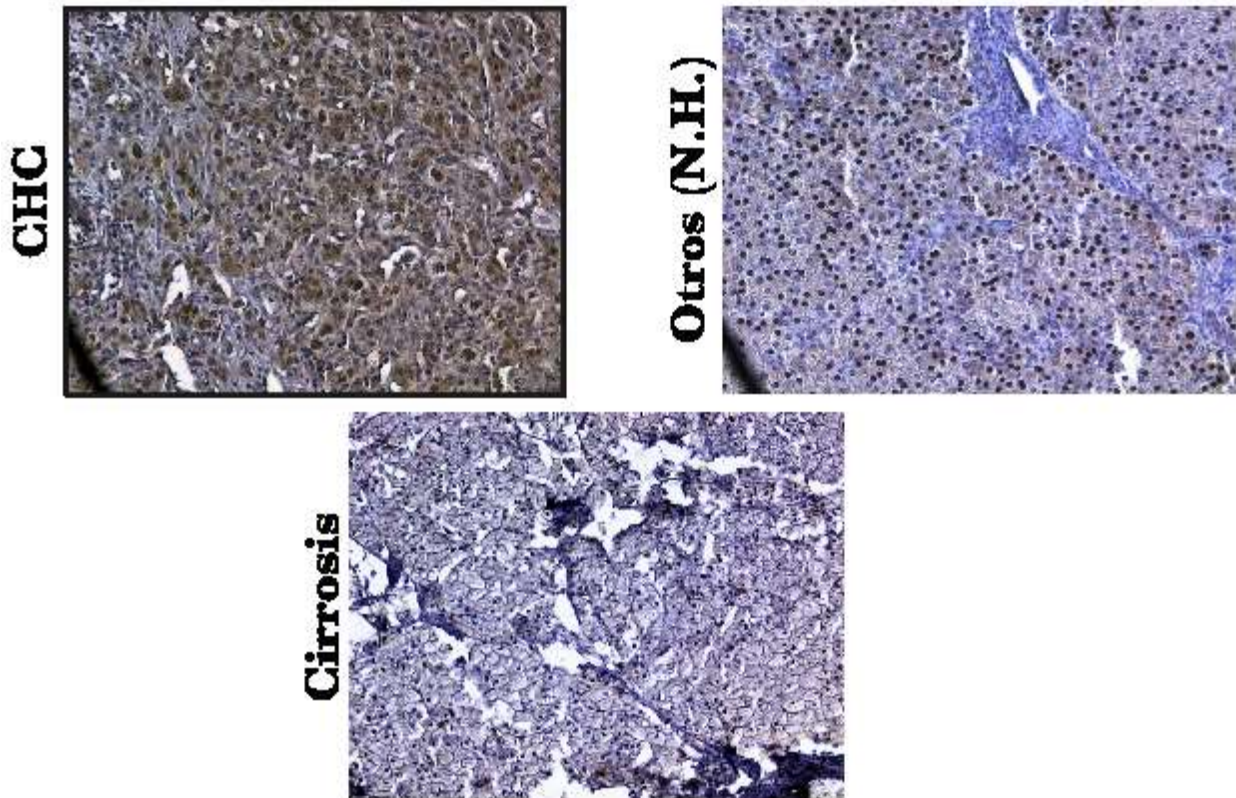


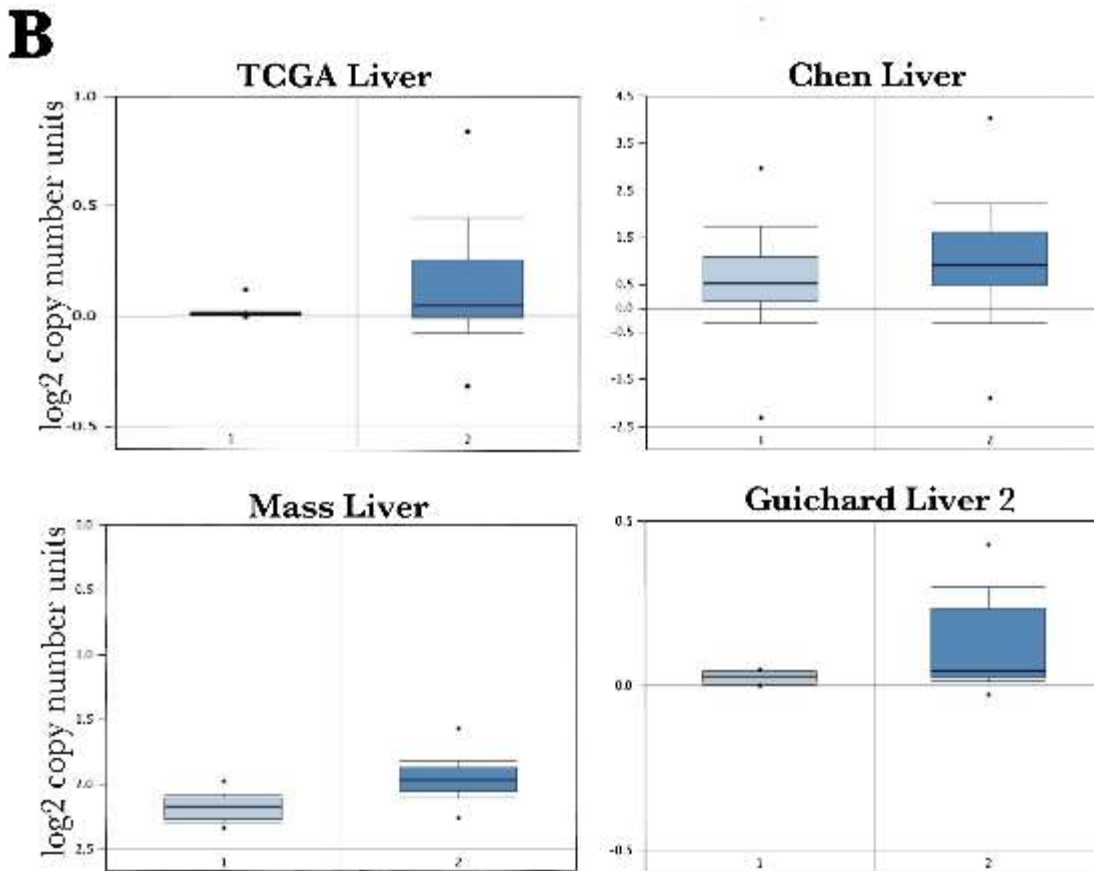
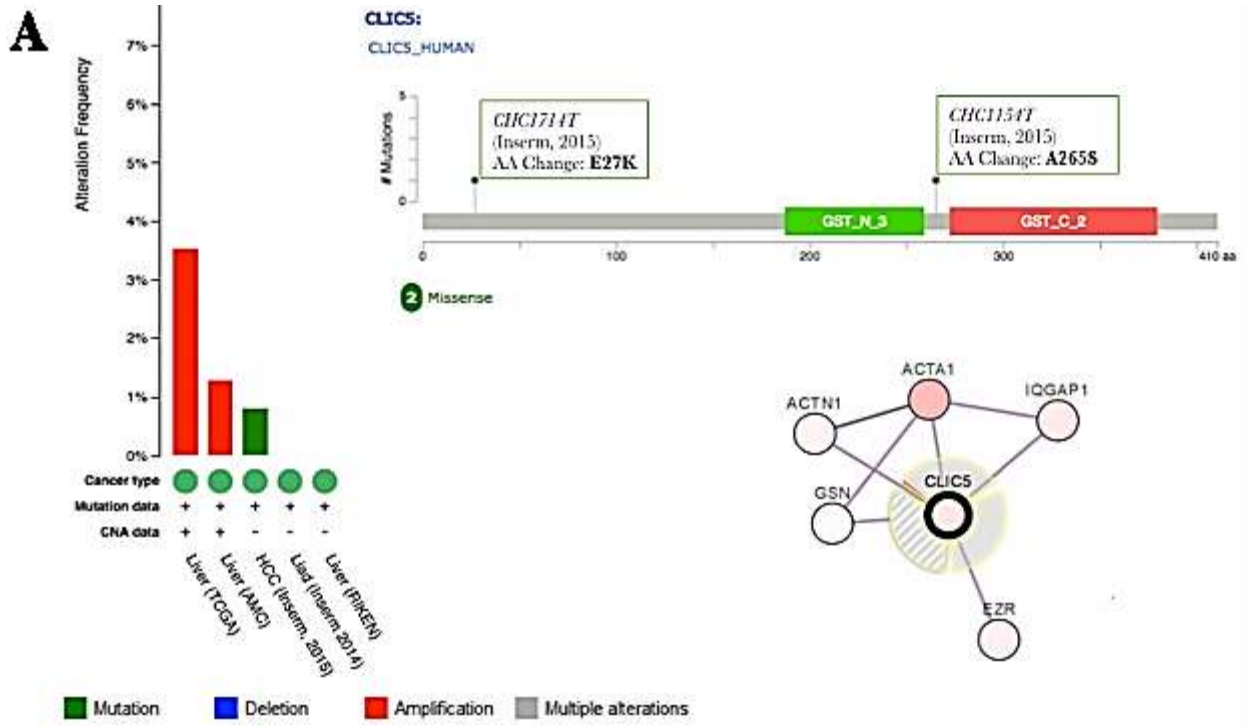
Figura 6. CLIC5 se encuentra sobreexpresada en biopsias de pacientes diagnosticados con CHC. **A)** Arriba, imágenes representativas de muestras de pacientes con CHC, la inmunohistoquímica va dirigida contra CLIC5 (Paciente 1 y 2). Abajo, gráfica de intensidad de señal de CLIC5 en biopsias de pacientes diagnosticados con CHC. **B)** Arriba, gráfica que muestra la correlación no paramétrica de Spearman (0.8) entre variable de alta expresión (intensidad de señal) y las diferentes patologías del hígado: CHC, cirrosis, fibrosis, otros y control. Abajo, imágenes representativas de algunas patologías de hígado. N.H. Nódulo hepático.

Debido al número limitado de biopsias disponibles para este análisis (n=10 para CHC) y con la finalidad de aumentar el tamaño de la cohorte, se realizó una búsqueda en dos servidores que tienen a disposición y libre acceso bases de datos de microarreglos que pertenecen a diferentes grupos de estudio denominados: cBioPortal y ONCOMINE; al elegir nuestro gen de interés en la opción cáncer de hígado, ambos servidores reportaron la tendencia de sobreexpresión de CLIC5 en muestras de pacientes diagnosticados con CHC. El servidor cBioportal muestra gráficamente los tipos de alteración genética (mutación, deleción, amplificación y múltiples alteraciones) con respecto a su porcentaje de frecuencia; aunado a esto se desglosa un esquema lineal de la secuencia de aminoácidos de la proteína considerada como canónica, es decir CLIC5B e indica en que sitio se encuentran esas

mutaciones. Para la base de datos denominada Insem 2015 de cBioPortal, indica mutaciones en dos pacientes; para el paciente CHC1714T se observa un cambio en un ácido glutámico por lisina en la posición 27 aa (*E27K*) y para el paciente CHC1154T un cambio de alanina por serina en la posición 265 aa (*A265S*), siendo sustituciones de un aminoácido alifático por uno ácido y de un aminoácido hidrofóbico por hidrofílico (Anexo 1). Por otra parte, basándose en la información que existe en la literatura, así como en los algoritmos de predicción de otros servidores o páginas web; el servidor cBioportal nos indica la probable asociación funcional que podría tener CLIC5 con otras proteínas. Los resultados de este análisis indican que CLIC5 podría unirse o interactuar principalmente con proteínas relacionadas a citoesqueleto como ACTN1, ACTA1, IQGAP1, GSN y EZR; siendo proteínas importantes para el anclaje, el andamiaje y la señalización (Tabla 5). En ONCOMINE, el servidor proporciona los datos de expresión de los pacientes diagnosticados con CHC y de sujetos control de cada uno de los estudios. De forma didáctica el servidor provee un mapa de calor de acuerdo al grado de sobreexpresión de CLIC5 en las biopsias de los pacientes, así como una gráfica donde se compara el comportamiento de las muestras de los sujetos control versus los pacientes diagnosticados con CHC y permite en algunos casos desglosar la información de acuerdo al estadio o etapa de la enfermedad (Anexo 2). Las gráficas mostradas en el presente trabajo son muestra representativa de los datos estratificados que proveen los microarreglos incluidos en este servidor (TCGA Liver, Chen Liver, Mass Liver y Guichard Liver 2), en todos ellos se observa un cambio de expresión “Fold change” mayor a 1 de las muestras problema (n=276) comparadas con las muestras control (n=310) con valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$) (Fig. 7). Como se puede observar existe una tendencia en estas bases de datos de microarreglos de la sobreexpresión del gen CLIC5 en pacientes diagnosticados con CHC, lo cual confirma nuestros resultados de validación de la sobreexpresión de CLIC5 realizada en el macroarreglo de biopsias humanas.

Tabla 5. Posibles interacciones de CLIC5 con otras proteínas de acuerdo a cBioportal. Se enlista el nombre de la proteína y sus funciones descritas por Uniprot.

Símbolo	Nombre de la proteína	Función
ACTN1	Actinina 1	Proteína de entrecruzamiento de F-actina que se ancla a actina y a una variedad de estructuras intracelulares. Involucrada en la regulación del citoesqueleto de actina, organización de uniones celulares y adhesiones focales.
ACTA1	Actina alfa 1	Pertenece a una familia de proteínas altamente conservadas que están implicadas en diversos tipos de motilidad celular y se expresan de manera ubicua en todas las células eucarióticas. En los vertebrados hay 3 isoformas: alfa, beta y gamma. Las alfa se encuentran en los tejidos musculares y son un componente principal del aparato contráctil. Las beta y gamma coexisten en la mayoría de los tipos celulares como componentes del citoesqueleto y como mediadores de la motilidad celular interna.
IQGAP1	Motivo IQ que contiene la proteína activadora de GTPasa 1	Se une a CDC42 activado pero no estimula su actividad GTPasa. Se asocia con calmodulina. Podría servir como proteína de andamio para la organización de complejos multimoleculares y reorganización del citoesqueleto, gracias a señales extracelulares.
GSN	Gelsolina	Proteína moduladora de la actina, regulada por calcio que se une a los extremos + de los monómeros o filamentos de actina, evitando el intercambio de monómeros (bloqueo terminal). Puede promover el ensamblaje de monómeros en filamentos (nucleación) así como cortar filamentos ya formados.
EZR	Ezrina	Proteína involucrada en las principales estructuras de conexión entre el citoesqueleto y la membrana plasmática. En células epiteliales, es necesaria para la formación de microvellosidades y otras estructuras de membrana en el polo apical.



C

Expresión de mRNA	Control [C] (Número de muestras)	CHC (Número de muestras)	P value	Fold change CHC vs C
TCGA Liver	115	97	3.22E-7**	1.085
Chen Liver	83	114	0.009*	1.291
Mass Liver	86	39	1.40E-9**	1.166
Guichard Liver2	26	26	0.001*	1.065
Total	310	276	---	-----

Figura 7. El mRNA CLIC5 se encuentra sobreexpresado en pacientes diagnosticados con CHC. **A)** Información obtenida de cBioportal de Cancer Genomics, a la izquierda se observa gráfica de alteración versus frecuencia de alteración de las diferentes bases de datos; a la derecha superior se indican las mutaciones reportadas en dos pacientes (E27K y A265S), en la parte inferior se indica las probables interacciones funcionales de CLIC5 con otras proteínas (ACTA1, GSN, EZR, IQGAP1, ACTN1). **B)** Análisis obtenido del servidor ONCOMINE. Gráficas de cuatro bases de datos de microarreglos (TCGA Liver, Chen Liver, Mass Liver y Guichard Liver 2). **C)** Tabla que enlista datos correspondientes a los diferentes microarreglos: número de muestras control [C], número de muestras de pacientes diagnosticados con CHC, p-value y el Fold change. Se tiene un total de cohorte de 310 muestras control y 276 muestras de pacientes diagnosticados con CHC, el Fold-change para todos los casos fue > 1 (* $p < 0.01$; ** $p < 0.0001$). 1. Hígados control, 2. CHC (Diagnosticados con Carcinoma Hepatocelular).

Con la finalidad de evaluar la participación biológica de CLIC5 en el CHC, se optó por realizar los siguientes estudios *in vitro*, por medio de líneas celulares. En primera instancia se procedió a evaluar la expresión de la proteína CLIC5 por medio de western blot en las líneas celulares humanas derivadas de CHC denominadas como: HepG2, HuH7 y SNU387 respectivamente. Siendo HepG2 y HuH7 consideradas como líneas con características menos agresivas, con baja capacidad de migración e invasión y una morfología epitelial en comparación con la línea celular SNU387, considerada como más agresiva y con mayor capacidad de migración e invasión, así como con una morfología de tipo mesenquimal. La evaluación por western blot fue a partir del lisado total de las células, así como detección

de la proteína en el medio condicionado (MC), es decir medio sin SFB. Para ambos casos en el western blot se obtuvo una banda de ~47 kDa (peso que se ha reportado para la isoforma B de CLIC5), además de mostrar una clara tendencia de incremento de la expresión de la proteína en la línea más agresiva SNU387 en comparación con las células con características menos agresivas, es decir HepG2 y HuH7. Realizando el análisis densitométrico se encontró diferencias estadísticamente significativas de las líneas celulares HuH7 y SNU387 a comparación de HepG2 en el lisado total, pero no se obtuvo diferencia significativa entre estas dos células. Para el caso del MC, se encontró diferencia significativa de expresión entre HepG2 y SNU387 así como entre Huh7 y SNU387, pero no entre HepG2 y HuH7. Además, es importante resaltar que la tendencia del incremento de la expresión de CLIC5 es más marcada en la proteína obtenida extracelularmente en comparación con el lisado total (Fig. 8).

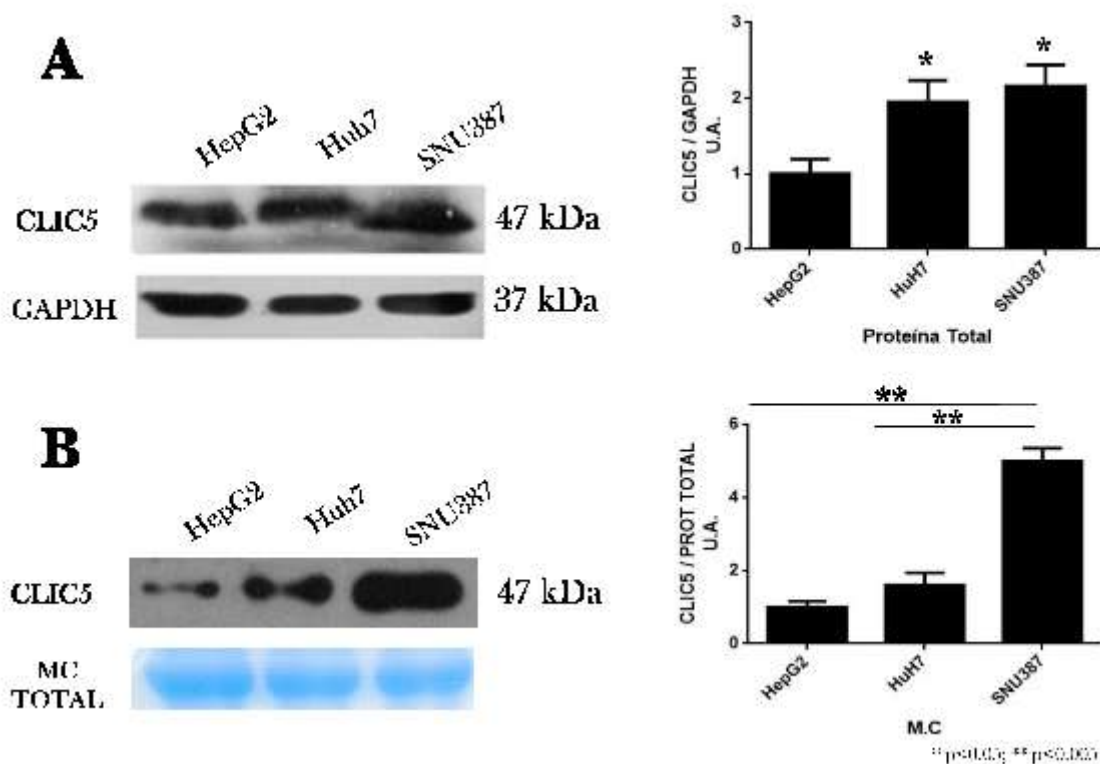


Figura 8. CLIC5 se encuentra expresada en líneas celulares humanas derivadas de CHC. **A)** Izquierda, imagen representativa de western blot de proteína total; como control de carga se ocupó GAPDH. Derecha, análisis densitométrico. **B)** Izquierda, imagen representativa del análisis por western blot de la proteína extracelular; como control de carga se ocupó una banda del gel teñido con azul de Coomassie. Derecha, análisis de densitometría. Líneas celulares: HepG2, HuH7 y SNU387; * p<0.05; ** p<0.005, n=3.

Posteriormente se planteó corroborar la expresión de la proteína CLIC5 y delimitar su ubicación subcelular en las líneas celulares derivadas de CHC. Con la finalidad de cumplir este objetivo se realizaron inmunofluorescencias de cada una de las líneas celulares evaluadas por western blot. Para detectar a la proteína de interés se ocupó un anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo FITC el cual es visible en el canal verde del microscopio confocal. Para la tinción del núcleo se utilizó el colorante DAPI que da señal en color azul, y con la finalidad de ver la distribución del citoesqueleto de F-actina, se ocupó el colorante faloidina acoplado con TRITC que es visible como color rojo. En el caso específico de la tinción con faloidina, se observó un patrón de distribución diferencial entre las líneas celulares: para HepG2 y HuH7 la distribución de F-actina se observa de manera cortical, mientras que para la línea celular SNU387 se aprecian fibras de estrés, características que corroboran con la morfología y propiedades anteriormente descritas en la literatura (Fig. 9-11). Los resultados muestran claramente la expresión de la proteína CLIC5 en las tres líneas celulares derivadas de CHC, se puede observar un patrón de distribución nuclear y citoplasmático en las tres líneas, además de obtener muy poca colocalización entre el canal verde que indica señal positiva a la proteína CLIC5 y el canal rojo que indica la tinción con faloidina. Hasta ahora, no ha sido reportada la expresión de CLIC5 a nivel nuclear y en este punto se consideró que la localización nuclear que se observa podía deberse a la sumatoria de las secciones ópticas capturadas por el confocal en diferentes planos del eje Z, es decir son imágenes que representan la máxima proyección.

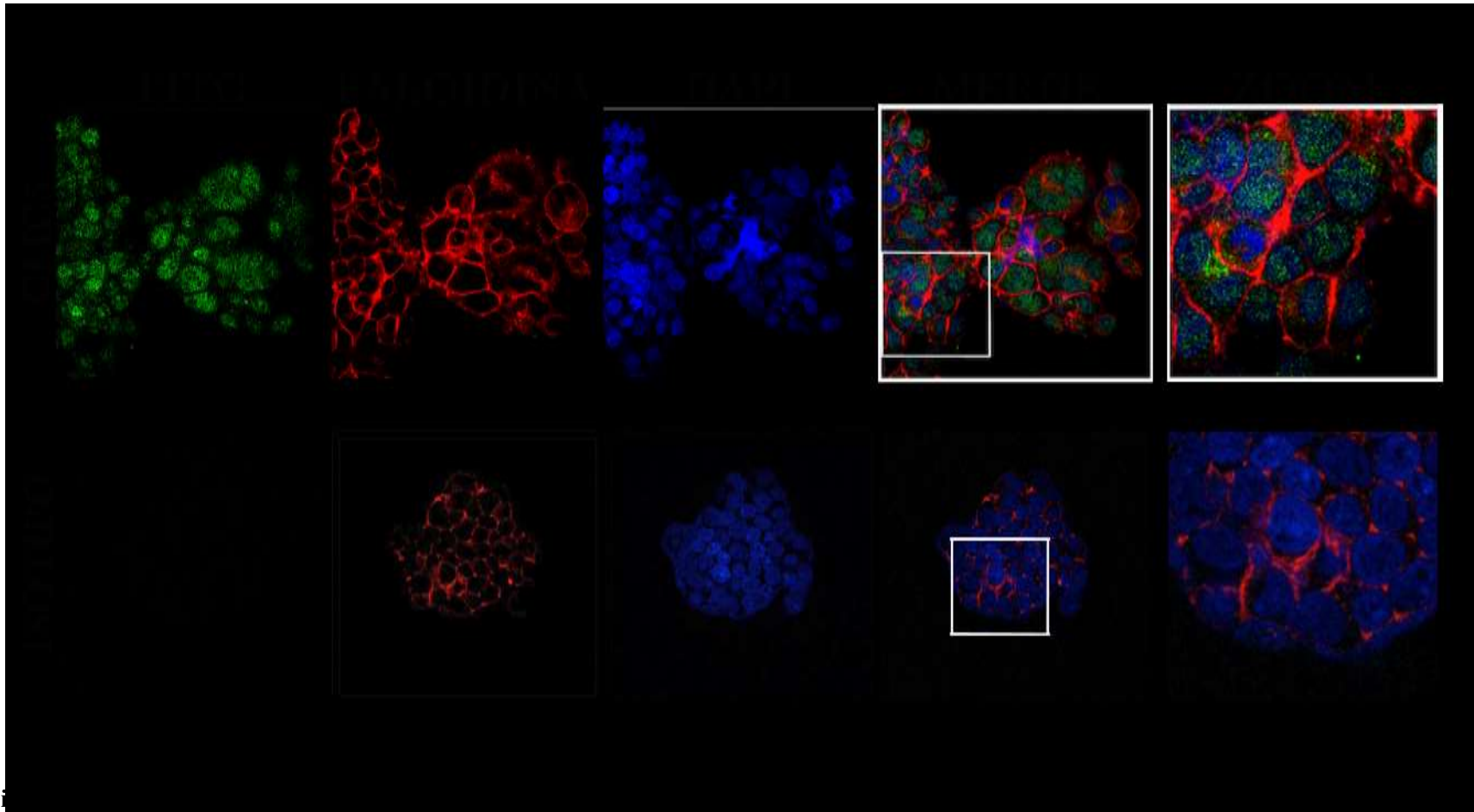


Fig. de isotipo. La primera columna es el canal verde que indica la expresión de la proteína CLIC5, la segunda columna es la tinción con faloidina en rojo que corresponde a la F-actina, la tercera columna es DAPI que corresponde a la tinción de los núcleos. En la penúltima columna se encuentra la sobreposición de las 3 imágenes capturadas anteriormente y la última columna muestra el acercamiento de la zona enmarcada en blanco de la sobreposición.

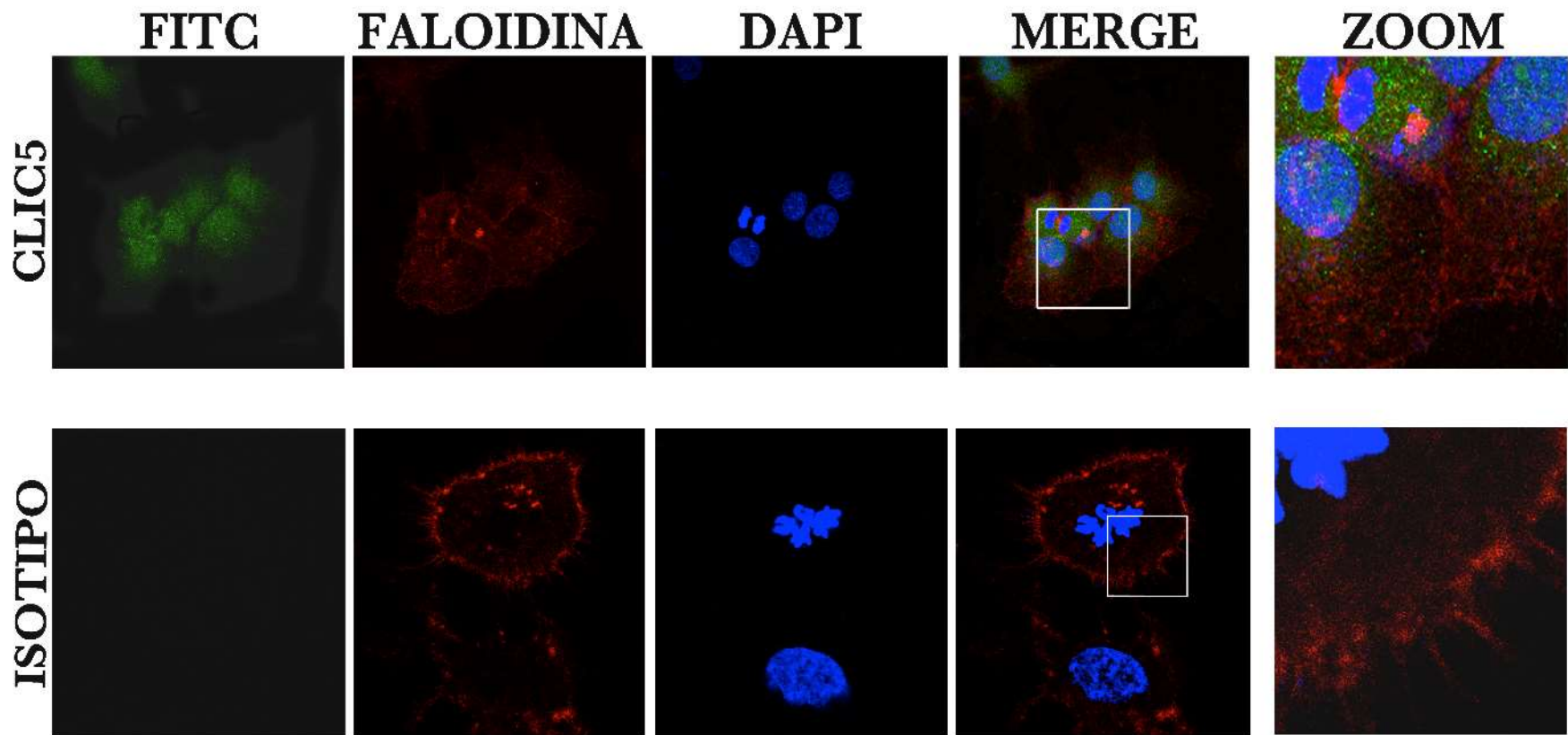


Figura 10. Expresión de CLIC5 en la línea celular humana HuH7. La hilera superior está teñida con el anticuerpo y la hilera inferior es el control de isotipo. La primera columna es el canal verde que indica la expresión de la proteína CLIC5, la segunda columna es la tinción con faloidina en rojo que corresponde a la F-actina, la tercera columna es DAPI que corresponde a la tinción de los núcleos. En la penúltima columna se encuentra la sobreposición de las 3 imágenes capturadas anteriormente y la última columna muestra el acercamiento de la zona enmarcada en blanco de la sobreposición.

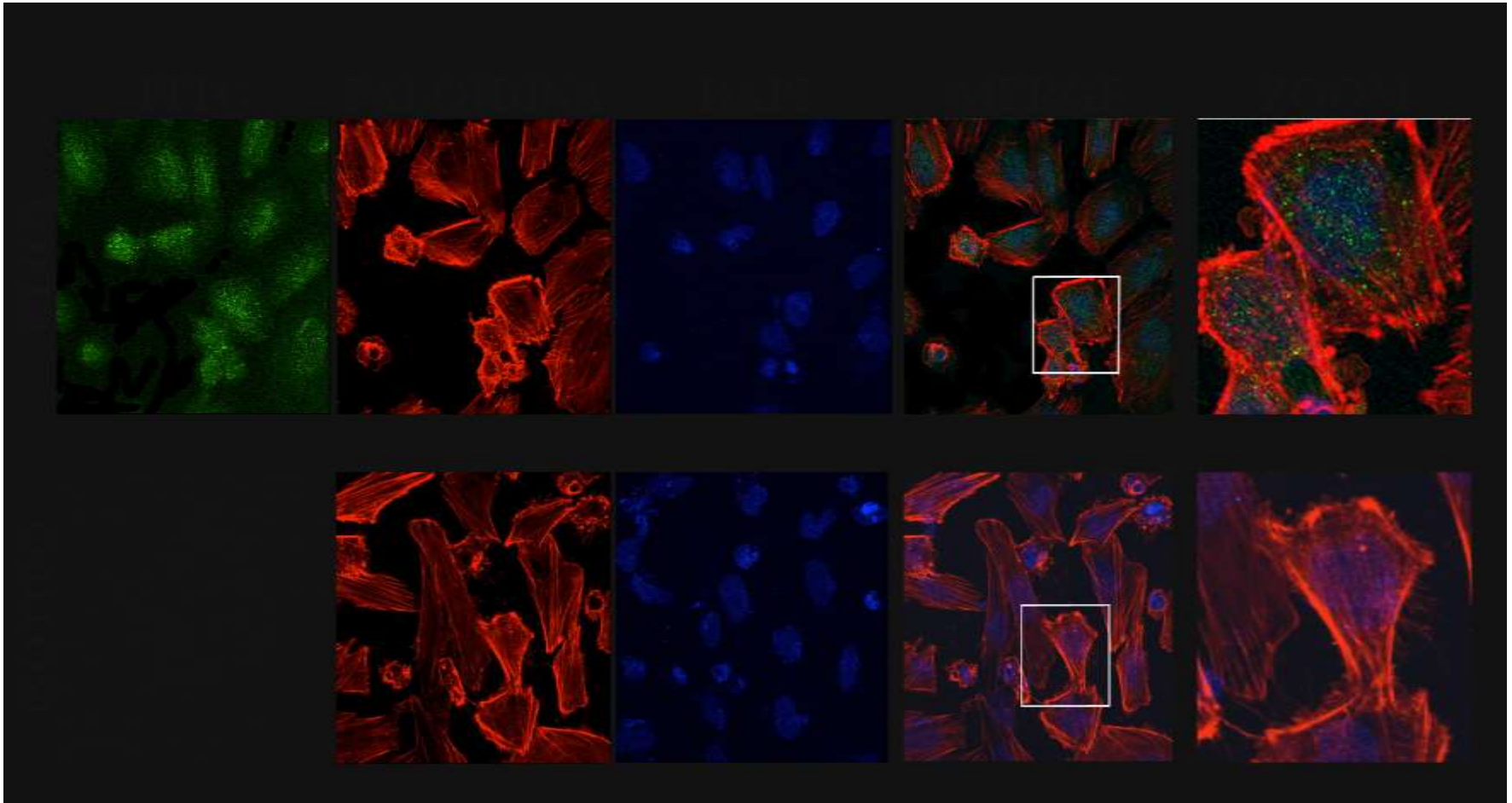


Figura 11. La expresión de CLIC5 en la línea celular humana SNU387. La hilera superior, muestras problemas y la hilera inferior es el control de isotipo. La primera columna es el canal verde que indica la expresión de la proteína CLIC5, la segunda columna es la tinción con faloidina en rojo que corresponde a la F-actina, la tercera columna es DAPI que corresponde a la tinción de los núcleos. En la penúltima columna se encuentra la sobreposición de las 3 imágenes capturadas anteriormente y la última columna muestra el acercamiento de la zona enmarcada en blanco de la sobreposición.

La proteína CLIC5 se expresa en el citoplasma y núcleo de líneas celulares humanas derivadas de carcinoma hepatocelular.

Con la finalidad de corroborar si la proteína CLIC5 se expresa en el compartimento nuclear en las tres líneas celulares derivadas de CHC, se procedió en primera instancia a realizar una predicción *in silico* para delimitar si la proteína posee en su secuencia algún sitio de localización nuclear por medio del servidor cNLS Mapper (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi). Este servidor tiene un algoritmo que permite predecir señales de localización nuclear (*NLS*; en inglés Nuclear Localization Signal) que tengan la capacidad de interactuar con importina- α . Se seleccionó este servidor debido a que anteriormente uno de los miembros de la familia de las CLIC's ha sido reportado con capacidad de interacción con esta importina (CLIC4) [177]. El servidor nos muestra la secuencia considerada canónica de CLIC5; es decir CLIC5B. En esta secuencia se resaltan en rojo a los aminoácidos de dos probables zonas que podrían funcionar como secuencias de localización nuclear bipartita con scores de: 5.6 y 5.5 respectivamente. Estos scores de acuerdo al logaritmo del cNLS Mapper predicen que CLIC5 pertenece al grupo de proteínas con capacidad de localizarse tanto en citoplasma como en núcleo; lo cual corrobora nuestros resultados observados en las imágenes de microscopía por inmunofluorescencia y con lo descrito en la literatura de la NLS en los integrantes de las CLICs así como su distribución subcelular en el núcleo de CLIC4, CLIC1 y CLIC3; este último pese a que no contenga la NLS descrita en los integrantes de CLICs (Fig. 12). Se realizó otro análisis con un servidor denominado NucPred, el cual nos muestra por medio de mapa de calor las zonas que podrían funcionar como NLS, nuevamente se obtienen las mismas secuencias predichas por el servidor cNLS obteniendo un score de 0.63. Realizando el análisis con el miembro de la familia más estudiado (CLIC4) en NucPred, el algoritmo arroja un score de 0.22 siendo menor a comparación del obtenido para CLIC5, no obstante, experimentalmente se ha comprobado que CLIC4 tiene la capacidad de translocarse al núcleo ante ciertos estímulos (Anexo 3).

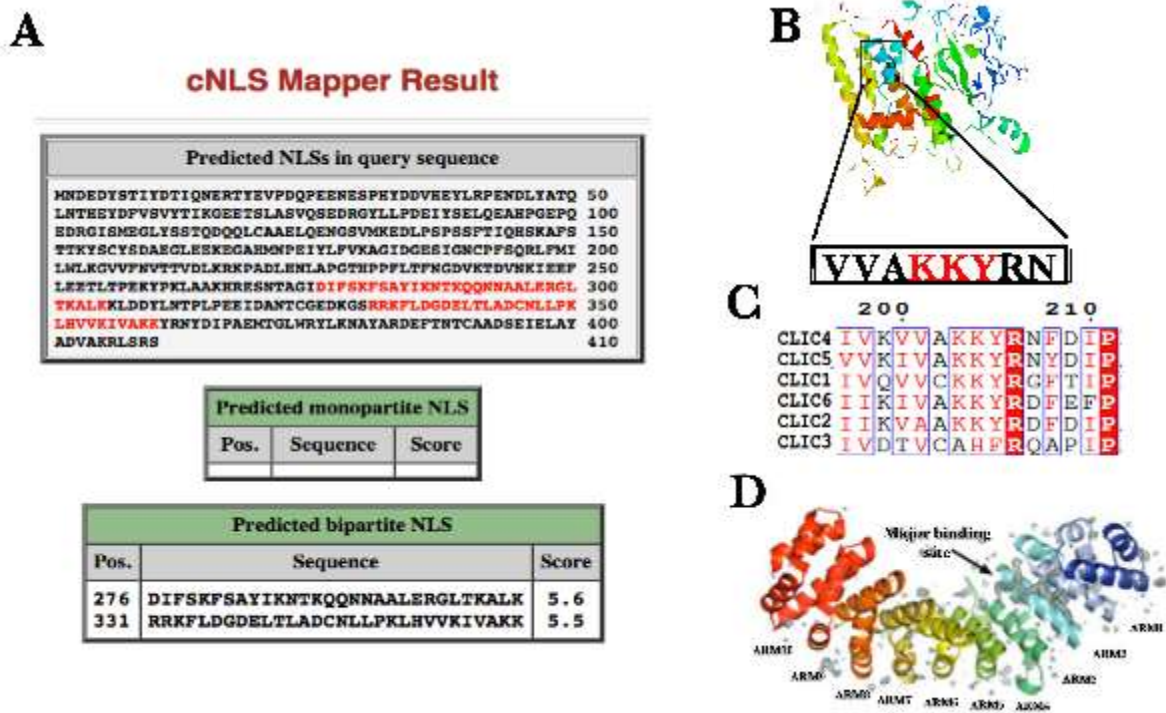
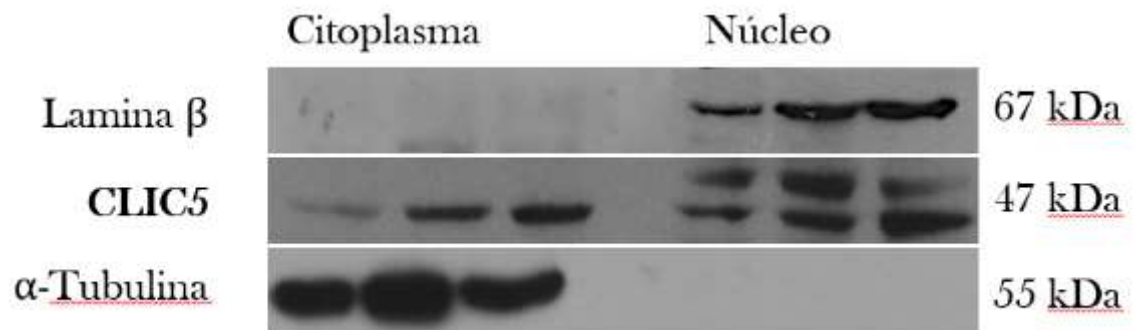
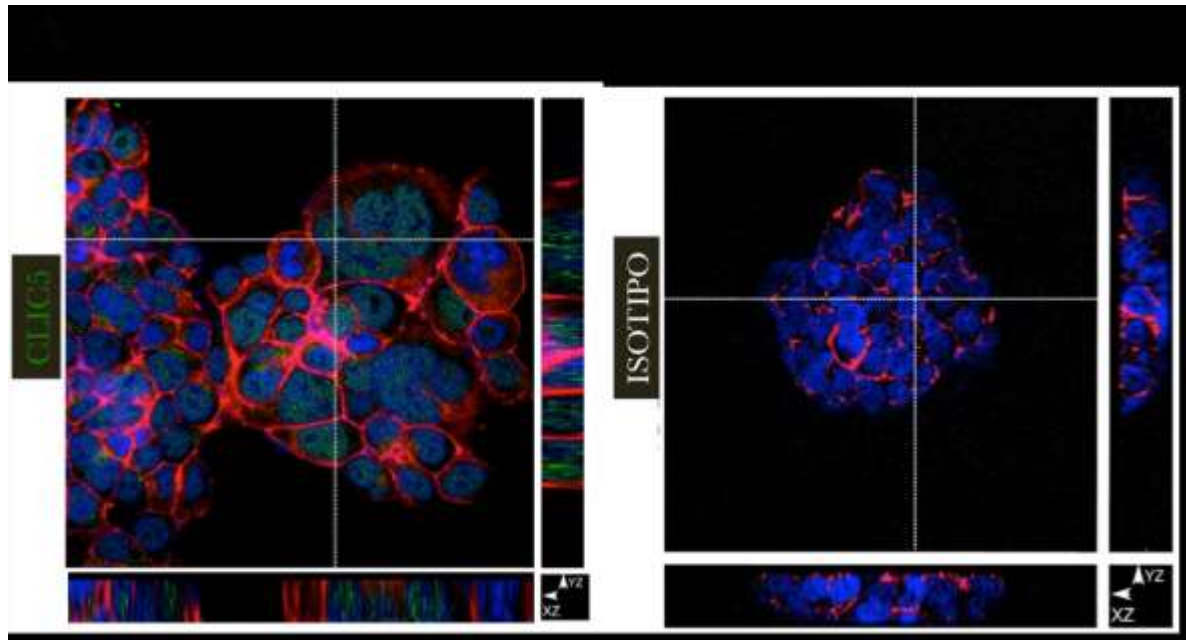
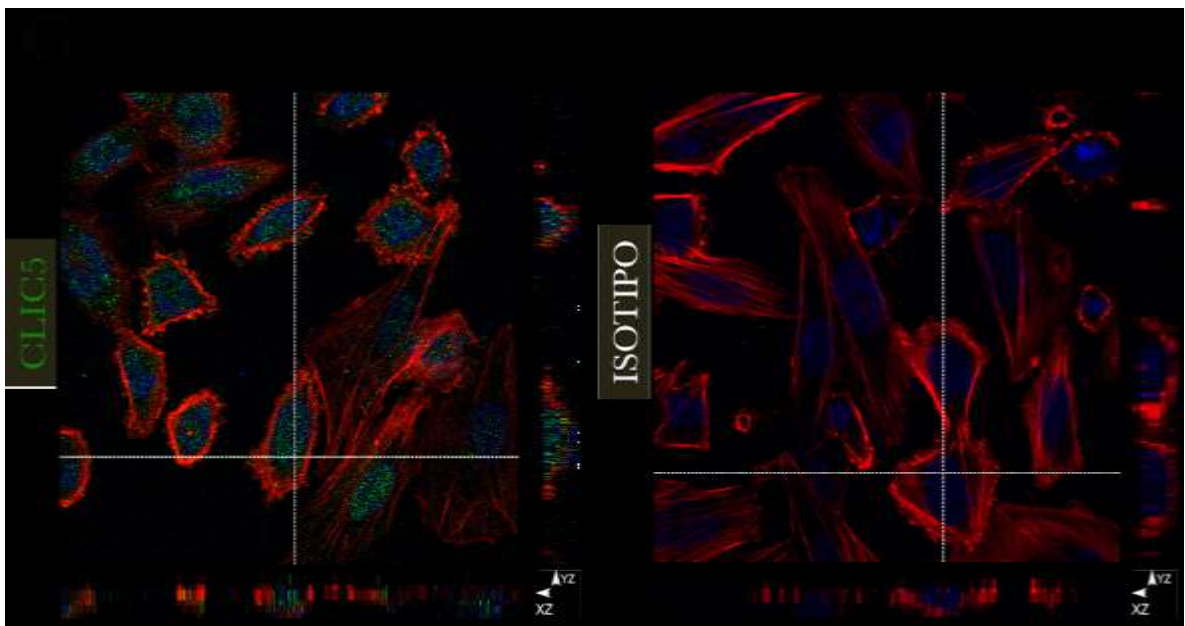
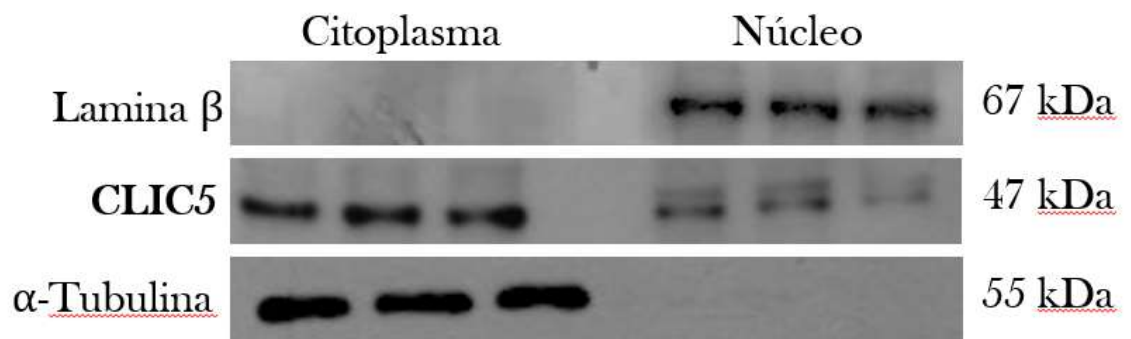
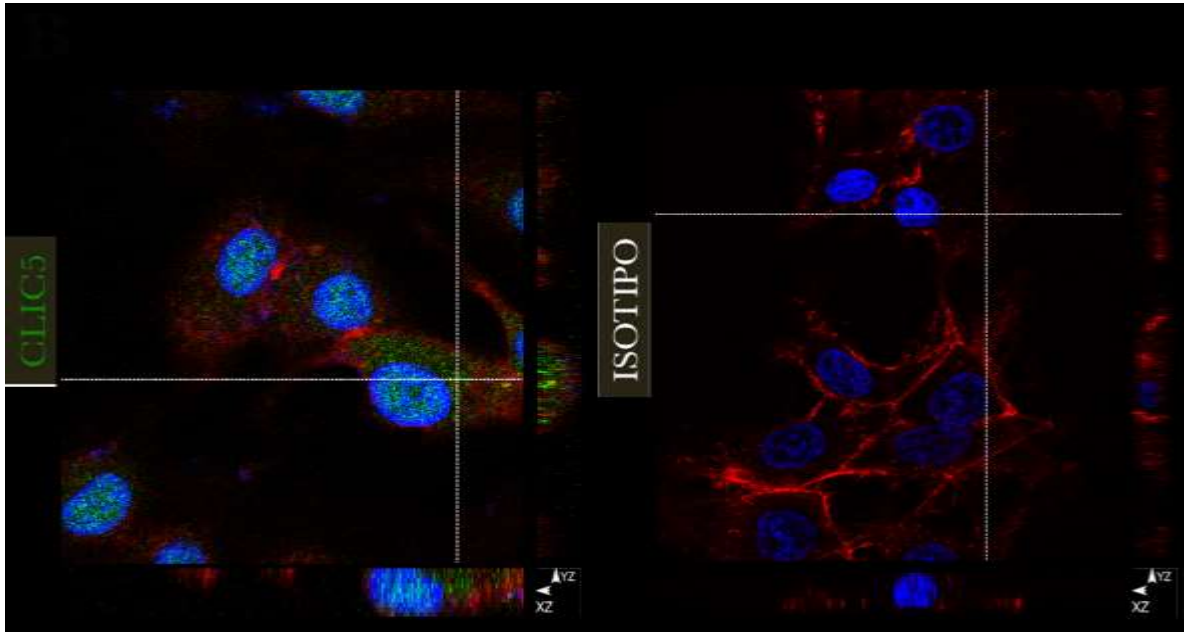


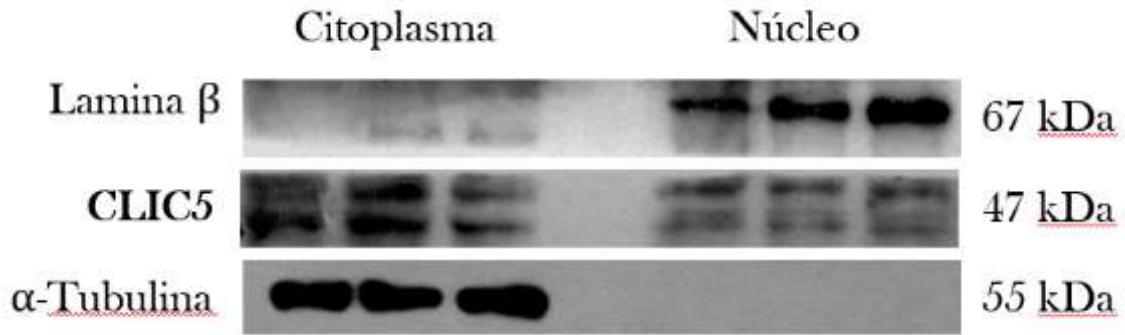
Figura 12. Predicción *in silico* de las regiones de localización nuclear de CLIC5B. **A)** En la parte superior se encuentra la secuencia que codifica para la proteína y en rojo las secuencias probables de localización nuclear, abajo se indica la secuencia, su posición en aminoácidos y el score respectivo a cada una (5.6, 5.5). **B)** Se muestra una estructura 3D de CLIC5B *in silico* predichos por I-TASSER, en azul claro se señala el sitio de NLS, enmarcada está la secuencia de localización nuclear VVAKKYRN, en rojo se indican los aminoácidos que son considerados como los esenciales para la interacción con importina- α . **C)** Alineamiento de integrantes de la familia CLIC, la NLS puede observarse conservada en todos los integrantes a excepción de CLIC3. **D)** Predicción de la interacción de la secuencia VVAKKYRN con ARM1 y 2 de la importina- α .

Además de la predicción *in silico*, para comprobar experimentalmente que CLIC5 se encuentra ubicada en los compartimentos celulares núcleo y citoplasma, se procedió a realizar una separación subcelular, obteniendo así la fracción nuclear y la fracción citoplasmática; las cuales fueron evaluadas por western blot ocupando sus respectivos controles de carga y de pureza de la muestra: Laminina- β para el núcleo y α -Tubulina para el citoplasma. Como se pueden observar en las imágenes de las tres líneas celulares, se observa señal de CLIC5 en ambos compartimentos celulares. Especialmente en el núcleo, se puede observar un doblete o doble banda en HepG2 y HuH7, no obstante, para SNU387 se observa este patrón en ambos compartimentos celulares. Otro análisis que se realizó para valorar la ubicación subcelular de CLIC5 fue por

inmunofluorescencia ocupando secciones ópticas en XY o YZ con la finalidad de delimitar si existía una verdadera localización de CLIC5 en la zona del canal rojo que corresponde a la tinción para el citoesqueleto de F-actina o en la del canal azul que corresponde a la tinción del núcleo. Las imágenes obtenidas por el microscopio confocal corroboran esta distribución, ya que se puede observar señal de CLIC5 en el núcleo, así como en el citoplasma (Fig. 13).







D

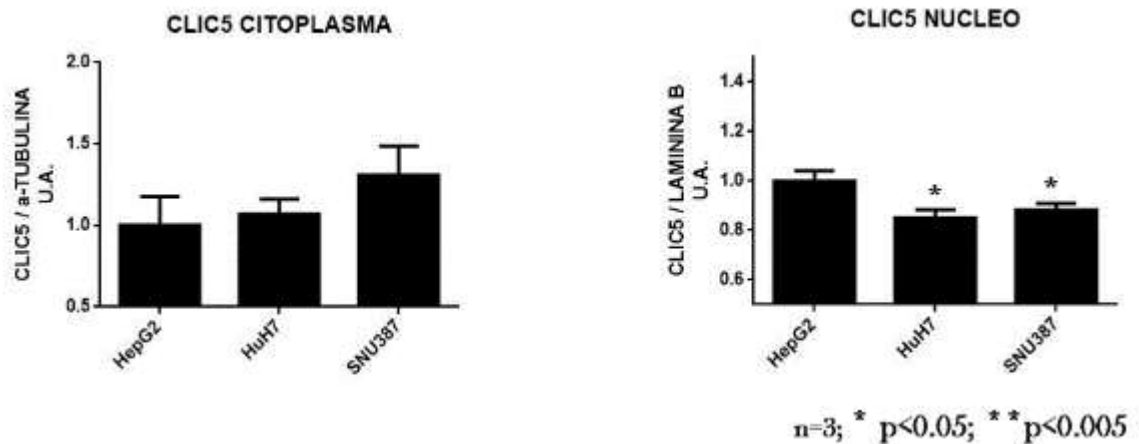


Figura 13. CLIC5 se expresa en el citoplasma y en el núcleo de las líneas celulares derivadas de CHC. **A)** Arriba, inmunofluorescencia representativa de la línea celular HepG2. Abajo, western blot de la fracción nuclear y citoplasmática de la línea celular HepG2 **B)** Arriba, inmunofluorescencia representativa de la línea celular HuH7. Abajo, western blot de la fracción nuclear y citoplasmática de la línea celular HuH7 **C)** Arriba inmunofluorescencia representativa de la línea celular SNU387. Abajo, western blot de la fracción nuclear y citoplasmática de la línea celular SNU387 **D)** Gráficas del análisis densitométrico de CLIC5 en las fracciones citoplasmática y nuclear de HepG2, HuH7 y SNU387. Se detectaron a las proteínas CLIC5, Lamina- β y α -Tubulina. Las inmunofluorescencias presentan cortes las secciones ópticas YZ, XZ de las muestras teñidas con anticuerpo (Verde), y Faloidina así como sus respectivos controles (Isotipos). n=3; * p < 0.05.

Actualmente, no se ha cristalizado la proteína CLIC5, ni se han estudiado las diferencias en su regulación traduccional o postraduccional así como la función de alguna de sus isoformas: A y B en particular. Aunado a lo anterior, otros servidores como UniProt de análisis de dominios proteicos solo mencionan a los dominios de glutatión-S-transferasa sin señalar los dominios transmembranales (TM1 y 2), el NLS, la secuencia de localización en aparato de Golgi o los probables sitios de fosforilación que podrían encontrarse en la secuencia; sin embargo, su estudio y validación experimental ha permitido delimitarles (Anexo 4). Se realizó el modelaje en 3-D *in silico* por medio del servidor I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) con la finalidad de obtener más información de la estructura de la proteína de interés: CLIC5B. El programa muestra varias opciones de estructuras tridimensionales, de las cuales se seleccionaron las dos que cumplen con la condición de tener un C-score más alto, para el modelo 1 un C-Score de -2.65 y para el modelo 2 un C-Score de -2.78 respectivamente (Fig. 14), I-TASSER además señala que CLIC5B tiene una relación más estrecha en alineación estructural con CLIC2 que se le denomina forma cristalizada B en el servidor (TM-score 0.570), CLIC4 (TM-score 0.568) y CLIC1 (TM-score 0.548), sin embargo, la identidad y el porcentaje de cobertura es mayor con CLIC4 (IDEN 0.754, Cov 0.585) a comparación de las otras dos proteínas CLIC2 (IDEN 0.631, Cov 0.576 y CLIC1 (IDEN 0.650, Cov 0.571) (Anexo 5). Se seleccionó el modelo 1 para analizar a mayor detalle, el I-TASSER indica además los sitios probables de interacción con ciertos ligandos, enlistándolos con un Score de mayor a menor; siendo los principales pertenecientes a glutatión, ácido ascórbico y L-gama-glutamyl-S-[2-(4-nitrofenil)-2-oxoetil]-L-cisteinglicina (Fig. 14). Finalmente, se procedió a evaluar la confiabilidad del modelo obtenido en el ITASSER por medio del gráfico de Ramachandran en el servidor RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>), obteniendo un 77% de residuos ubicados en regiones favorables, un 15% de residuos en regiones permitidas y un 8.1% de residuos en regiones con valores atípicos. Finalmente, el servidor nos provee una lista que desglosa los aminoácidos de la secuencia de CLIC5B que se encuentran ubicados en estas tres categorías (Anexo 6 y Lista 1).

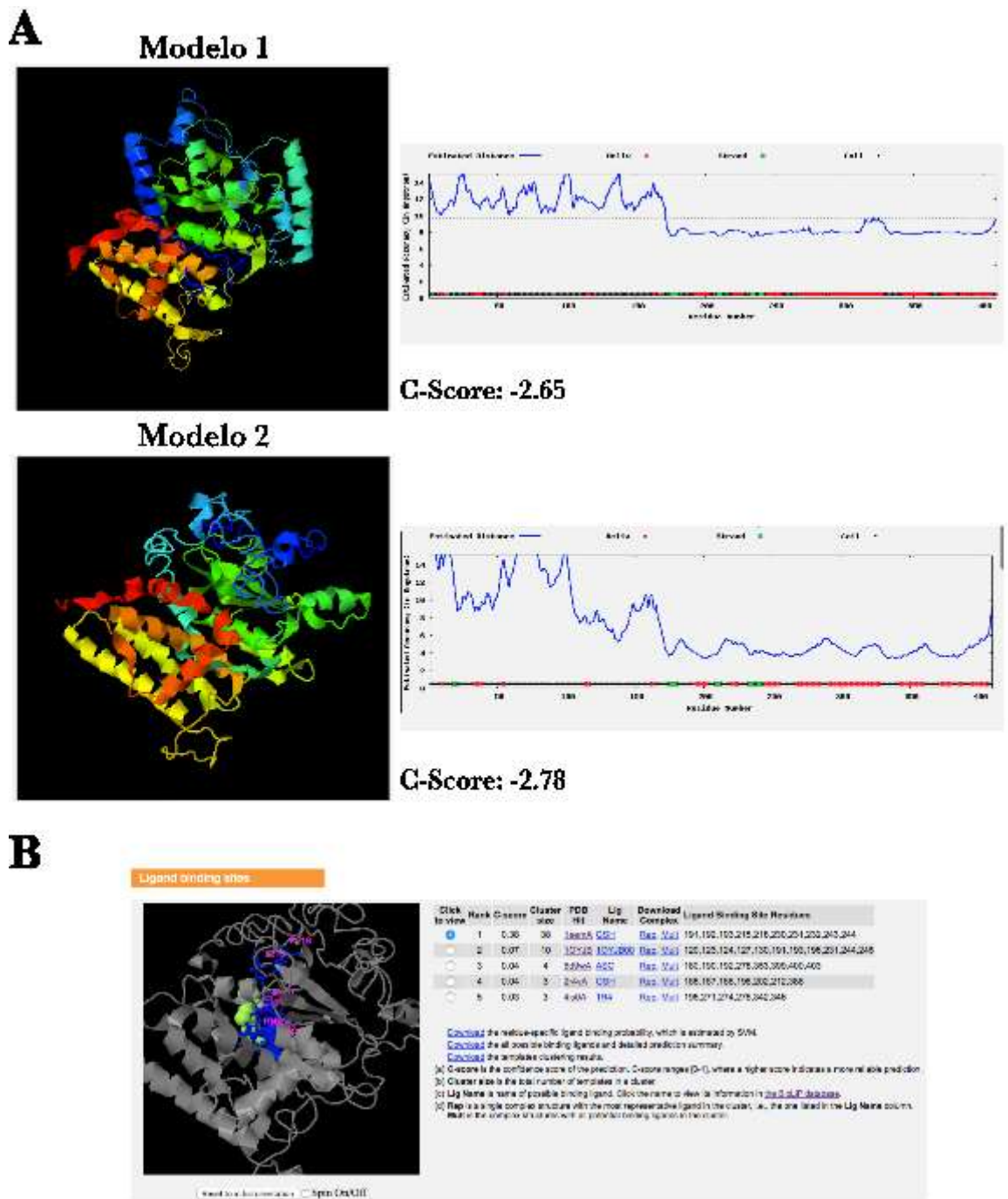


Figura 14. Predicción de la estructura CLIC5B en el servidor I-TASSER. A) Ambas estructuras tridimensionales obtuvieron C-scores de -2.78 y -2.65 respectivamente, a un lado se desglosan sus perfiles de error de estructura local. B) Predicción de sitios probables de interacción con diferentes ligandos arrojando información como PDB Hit, tipo de ligando y los residuos probables de unión a ligando. GSH: glutatión; 1QYJB00; ASC acido ascórbico; 1R4.

CLIC5 interacciona con proteínas del citoesqueleto *in vitro*.

En predicciones funcionales dadas por los programas String y cBioPortal basados en reportes previos experimentales donde se describe la interacción de CLIC5 con proteínas de citoesqueleto como Ezrina, Gelsolina, Podocalixina, Actina así como AKAP350, nos indica que CLIC5 tiende a tener interacciones tejido específicas con estas proteínas con importancia fisiológica. Anteriormente Torres-Mena en el 2010 en un modelo de hepatocarcinogénesis química describe no solo la sobreexpresión del gen CLIC5 en nódulos preneoplásicos persistentes, tumores tempranos y tardíos; además el este estudio predice que CLIC5 podría participar en la red biológica de actina relacionando su función con interacciones celulares de ensamblaje, organización celular, señalización, entre otras. No obstante, la posible participación de CLIC5 en la red de actina en el CHC no fue validada en dicho estudio. En el presente trabajo se decidió evaluar si CLIC5 interacciona con Ezrina, Podocalixina y Actina, proteínas que son consideradas con funcionalidad de andamiaje y cuya expresión es modificada en el CHC. Para ello se realizó co-inmunoprecipitación (Co-IP) en la línea celular HuH7. En primera instancia se realizaron Co-IPs contra Ezrina (Ezr), Podocalixina (Podxl) y Actina (Act), para ser reveladas posteriormente por western blot contra CLIC5, posteriormente se realizó Co-IP contra CLIC5 y se reveló por western blot contra Ezr y Podxl obteniendo señal positiva para todas estas combinaciones (Fig. 15). Por otra parte, debido a que obtuvimos que la proteína CLIC5 se encuentra en los compartimientos nuclear y citoplásmico, se realizó Co-IP contra Actina en ambas fracciones subcelulares y se reveló el western blot contra CLIC5, obteniendo señal en ambos compartimientos celulares (Figura 16).

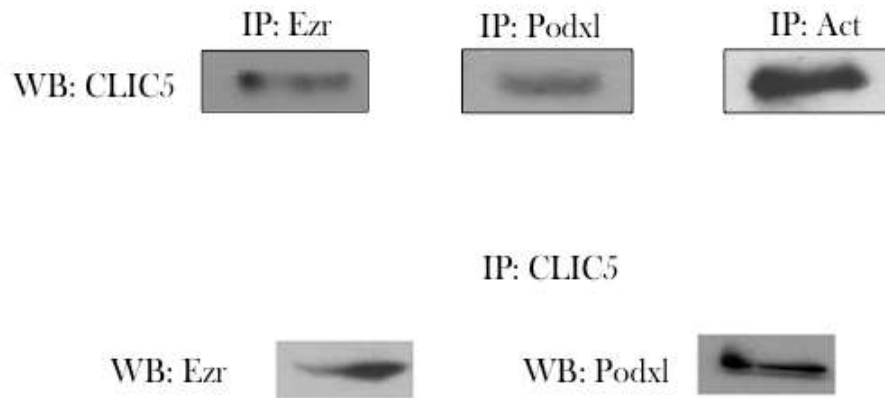


Figura 15. CLIC5 interacciona con proteínas de citoesqueleto (Ezrina, Podocalixina y Actina). Co-inmunoprecipitaciones de las proteínas Ezr, Podxl y Actina (Blots superiores) y CLIC5 (Blots inferiores) en la línea celular HuH7, el revelado fue realizado contra CLIC5 (Blots superiores) y Ezr y Podxl (Blots inferiores), respectivamente. Las coimmunoprecipitaciones se realizaron con la misma cantidad de proteína total para todos los experimentos. Pesos moleculares: Ezr 81 kDa, Podxl 55 kDa, CLIC5 47 kDa y Act 42 kDa.

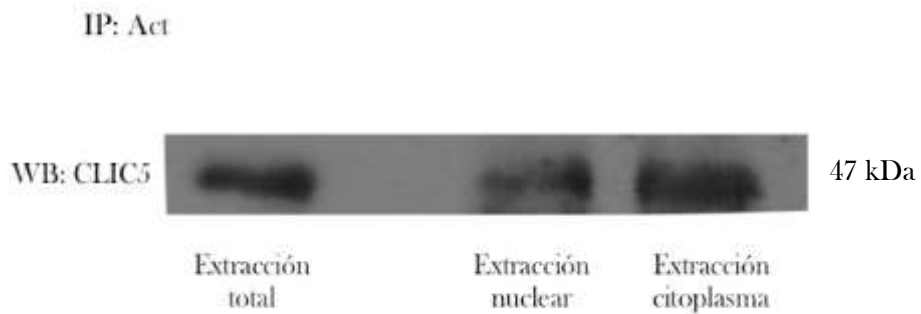


Figura 16. CLIC5 interacciona con Actina (Act) en núcleo y citoplasma. Coimmunoprecipitación contra actina en la línea celular HuH7 en ambas fracciones, el revelado fue realizado contra CLIC5 por medio de western blot.

CLIC5 se sobreexpresa durante la transición epitelio mesénquima.

Se ha demostrado que varias proteínas son modificadas durante la EMT y se consideran como la firma distintiva de este fenómeno biológico. Anteriormente se describió la correlación de sobreexpresión de la proteína CLIC5 y menor grado de diferenciación en las líneas celulares 3T3 que se inducen a diferenciarse a adipocitos. Por otra parte, en nuestro estudio se observa una correlación entre la agresividad de las

tres líneas celulares humanas derivadas de CHC y la expresión de CLIC5; así mismo este tipo de correlación la observamos en cBioportal y ONCOMINE; finalmente el miembro de la familia CLIC4 se ha visto involucrado en la vía de señalización TGF- β , una de las más importantes en el fenómeno de EMT; por lo cual, decidimos evaluar si existía una relación entre la expresión de CLIC5 con la EMT en CHC. En primera estancia se realizó una evaluación de la relación de E-cadherina/Vimentina en las tres líneas celulares HepG2, HuH7 y SNU387. Los resultados obtenidos corroboran lo reportado anteriormente en la literatura. Las líneas HepG2 y HuH7 expresan E-cadherina y poca Vimentina y se les ha incluido en el grupo de células pertenecientes a la firma de tipo epitelial (cita), mientras que SNU387 no expresan E-cadherina y sí Vimentina y pertenece al grupo de la firma mesenquimal (Fig. 17). Sin embargo, cabe resaltar que para HepG2 se puede observar una expresión mayor de E-cadherina a comparación de HuH7, lo que hace deducir que esta línea celular está más inclinada en mantener su estado epitelial mientras que HuH7 se encuentra en un punto intermedio entre el fenotipo epitelial y mesenquimal (Fig. 17).

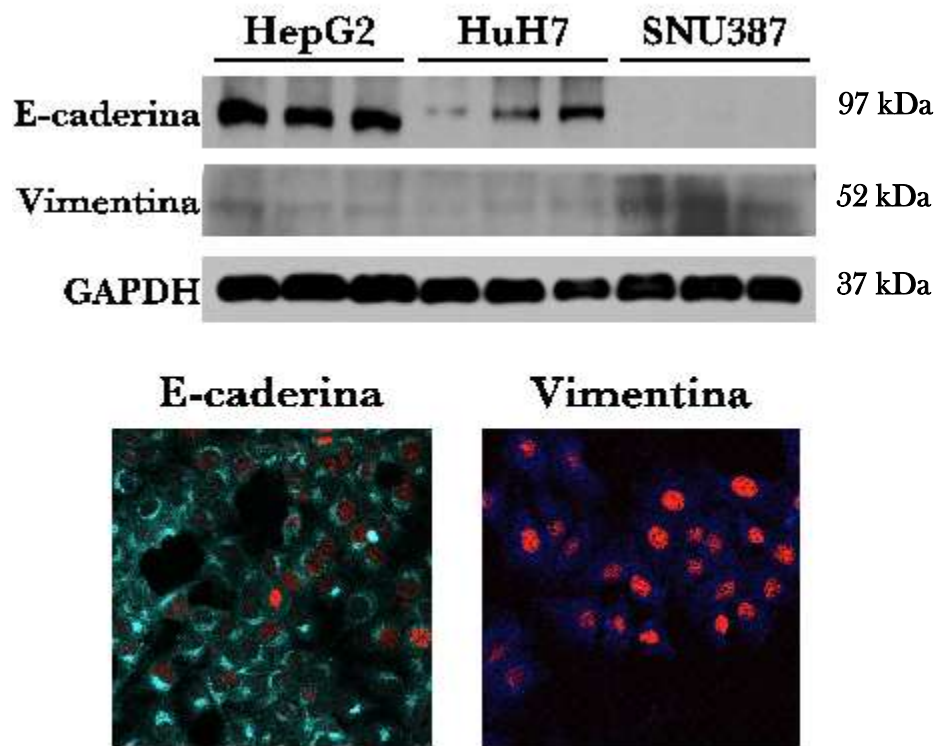


Figura 17. Patrón de expresión de los marcadores de EMT en las tres líneas celulares HepG2, HuH7 y SNU387. En la parte superior se muestran los western blots de E-cadherina y Vimentina, GAPDH se ocupó como control de carga. En la parte inferior se muestran imágenes

representativas de inmunofluorescencias de los marcadores de EMT en la línea celular HuH7. Rojo: Tinción nuclear; Cian: E-cadherina; Azul: Vimentina.

Con base en la relación anterior de E-cadherina/Vimentina, se optó por seleccionar a la línea celular HuH7 para someterla a tratamientos prolongados con TGF- β y llevarla a transición epitelio mesénquima *in vitro* con la finalidad de evaluar si existen cambios en la expresión de la proteína CLIC5 durante este proceso biológico. Primero se decidió evaluar si la EMT se estaba llevando a cabo por medio de los siguientes parámetros: a) modificación en la morfología celular, lo que se observa como un alargamiento de las células pasando de un estado epitelial a una de tipo mesenquimal. Esta modificación se evaluó como la relación entre los parámetros largo y ancho. Obteniendo para todos los puntos de evaluación (24, 48, 72 y 96 h respectivamente) valores estadísticamente significativos a comparación de las células control, aquellas células que no fueron sometidas a tratamientos con la citocina TGF- β (Fig. 18 A y B); b) cambio en la distribución de actina, modificándose la disposición cortical a formación de fibras de estrés (Fig. 18 C); y finalmente el c) cambio en la firma de marcadores de EMT que incluye la subexpresión de E-cadherina aunada a la sobreexpresión de Vimentina, a partir de las 24 h y manteniéndose hasta las 96 h (Fig. 18 D).

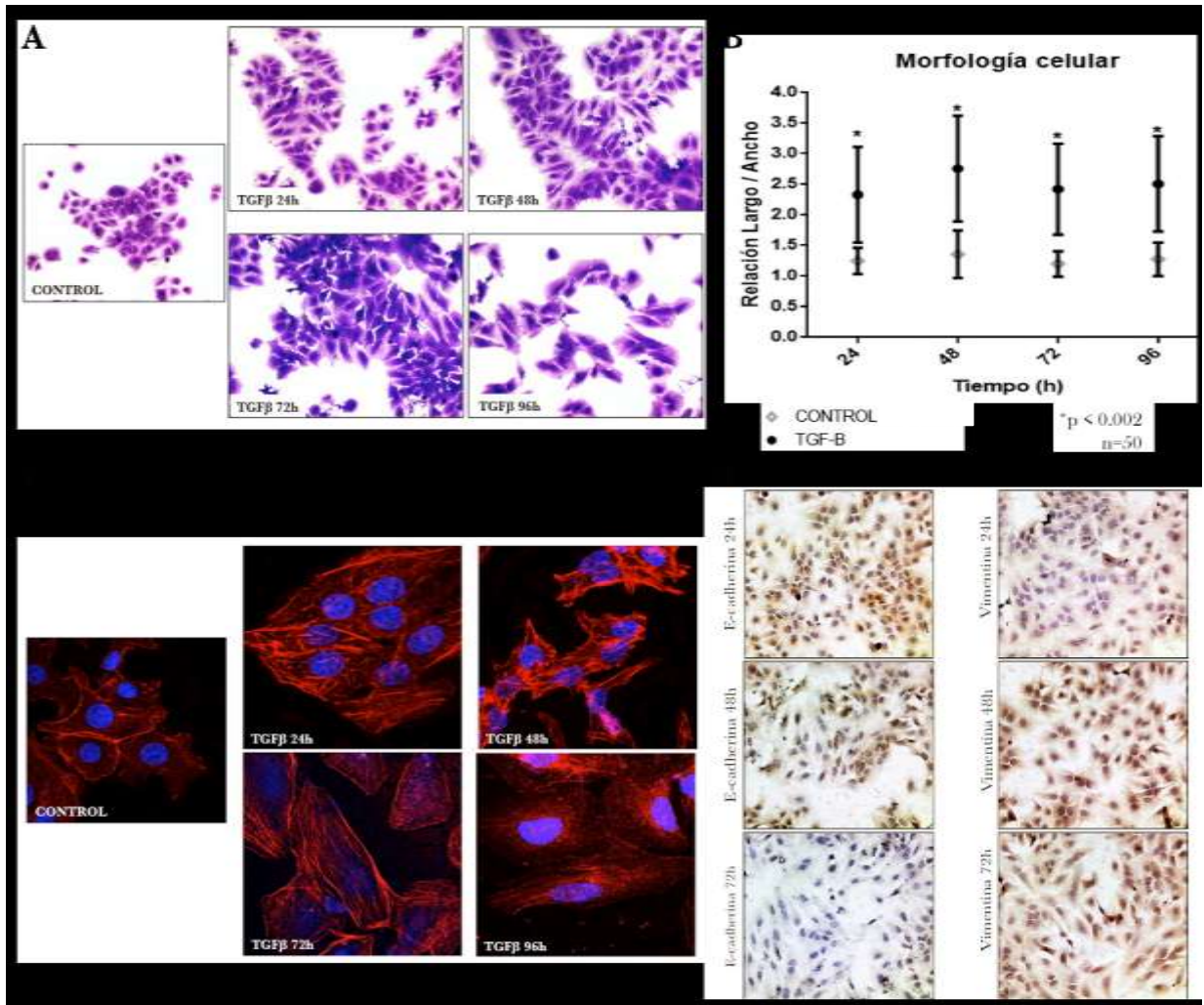


Figura 18. Evaluación de la EMT en la línea celular HuH7 a las 24, 48, 72 y 96 h. **A)** Bloque de imágenes que corresponde al cambio morfológico de células teñidas con cristal violeta sometidas a tratamientos de TGF- β . **B)** Gráfica del cambio morfológico en relación largo/ancho de células con y sin estímulo, valores estadísticamente significativos para todos los puntos. **C)** Panel de tinción con faloidina, se observa el reordenamiento de actina y la aparición de fibras de estrés de las 24 a las 96 h. **D)** Inmunohistoquímica que muestra los cambios de expresión de los marcadores E-cadherina y Vimentina en los diferentes tiempos de la EMT. * $p < 0.002$; $n = 50$.

Otra característica importante de la EMT por efecto de TGF- β en células tumorales es la capacidad de supervivencia y evasión del arresto celular; por lo cual, se evaluó la viabilidad celular. Se observa claramente en la gráfica que no hay una diferencia significativa entre aquellas células mantenidas en condiciones normales de crecimiento versus aquellas que fueron estimuladas con la citocina TGF- β hasta las 72 h; no obstante, a las 96 h se observó una leve disminución de la viabilidad pero

estadísticamente significativa en las células estimuladas con la citocina ($p < 0.05$) con relación al control (Fig. 19).

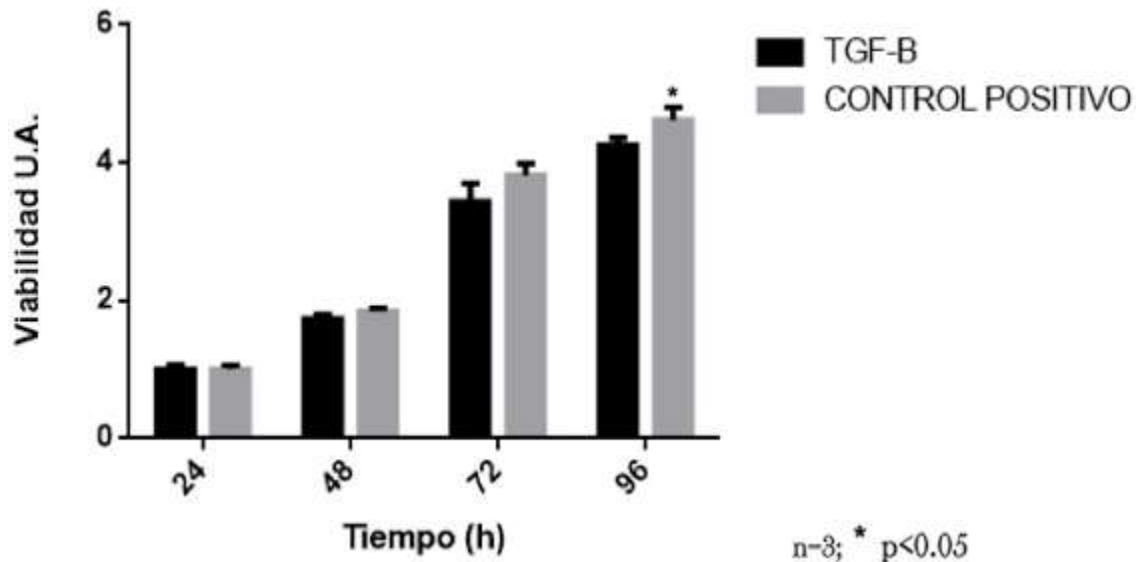


Figura 19. Evaluación de la viabilidad durante la EMT en las células HuH7. Se comparó entre aquellas células estimuladas con TGF- β desde las 24 a las 96 h con y sin estímulo (control positivo de viabilidad). $n=3$; * $p < 0.05$.

Finalmente, pero no menos importante durante la EMT se describe en varios linajes celulares la ganancia de la capacidad migratoria e invasiva, en varios estudios se ha reportado que TGF- β además de desencadenar la EMT, se encuentra involucrada con dichos procesos biológicos durante el progreso tumoral; por lo cual se evaluó la migración celular de HuH7 ante el estímulo con la citocina a las 24, 48 y 72 h por medio del ensayo de cierre de herida. Como se puede observar en la figura 20-A representativa del cierre de la herida ante el estímulo con TGF- β se da una migración más rápida en comparación con las células control; es decir sin la citocina. Aunado a lo anterior, el borde del cierre de la herida sufre un cambio morfológico donde se aprecia que las células tienen un alargamiento y un fenotipo mesenquimal a comparación del control que mantiene la morfología poligonal o denominada epitelial, corroborando estos resultados con lo descrito anteriormente por la literatura (Fig. 20).

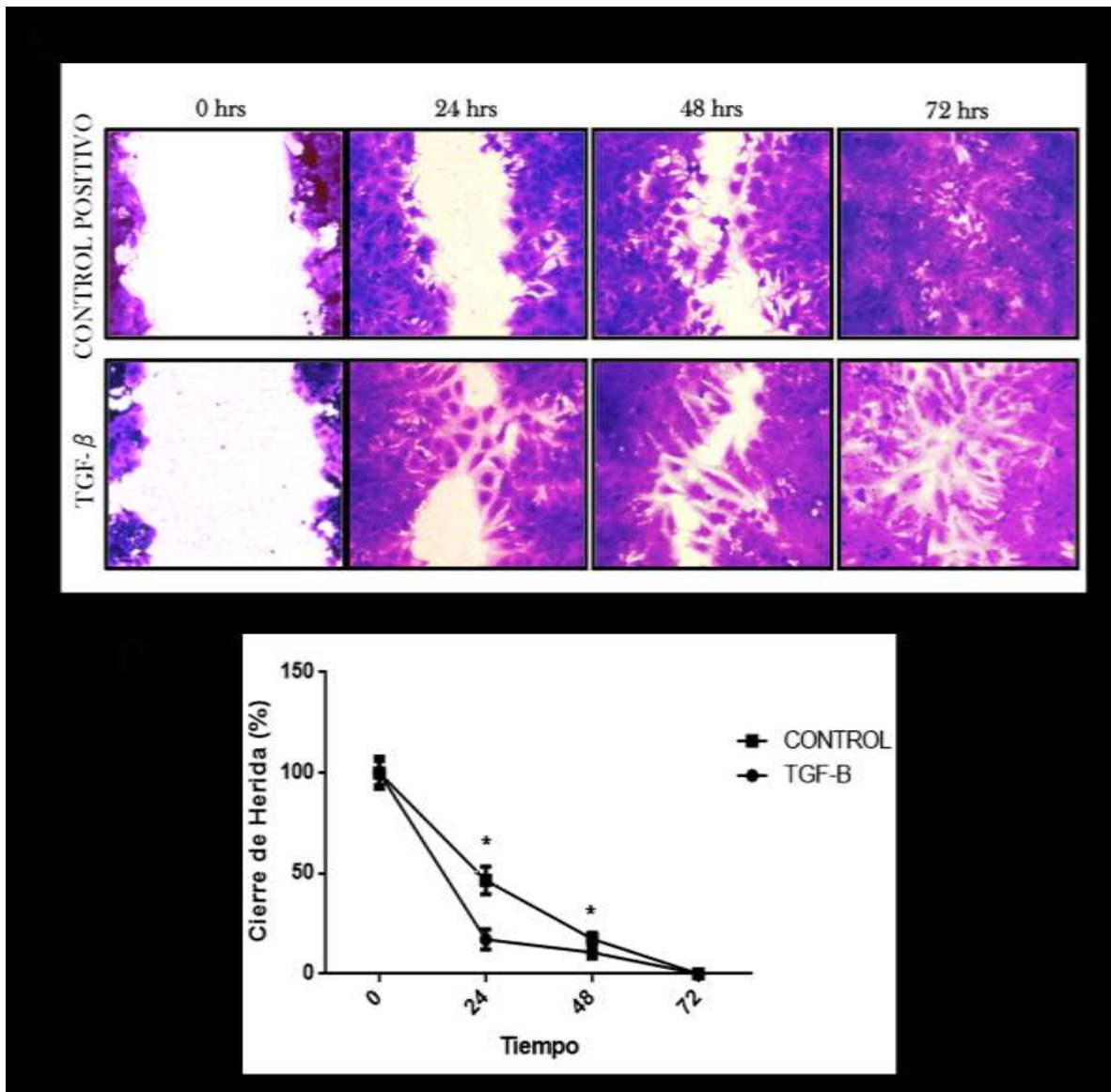


Figura 20. TGF- β induce la migración de la línea celular HuH7. **A)** Imágenes representativas del cierre de herida en los diferentes tiempos 0, 24, 48 y 72 h. Las células con tratamiento tienen una mayor capacidad de migración y un cambio a morfología mesenquimal a comparación de las células control. **B)** Gráfica del ensayo superior. n=4; * p<0.05.

Después de finalizar la valoración de la EMT en HuH7 se procedió a realizar la evaluación de la expresión de CLIC5 durante este proceso biológico. Se observó la sobreexpresión de la proteína desde las 24 h por medio de western blot (Fig. 21 A y C) y por medio de inmunofluorescencia se pudo apreciar un cambio en la distribución de la proteína CLIC5, de su ubicación celular en el compartimento nuclear al compartimento citoplasmático (Fig. 21).

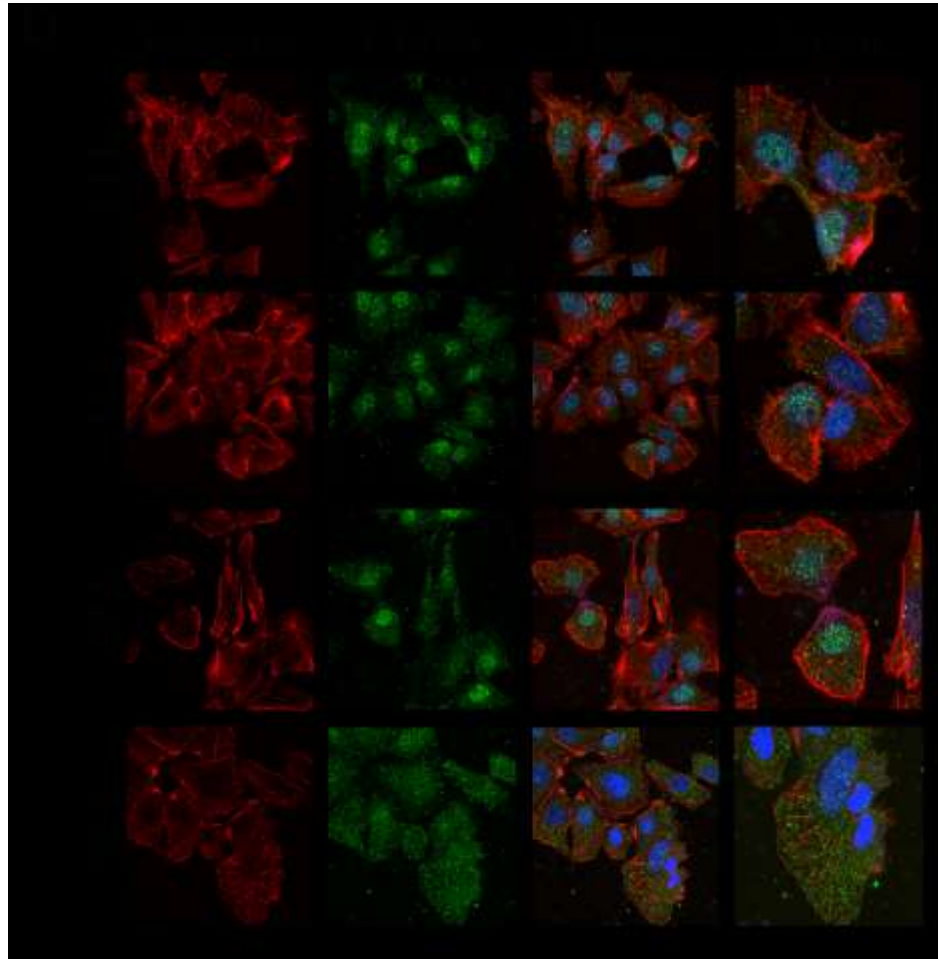
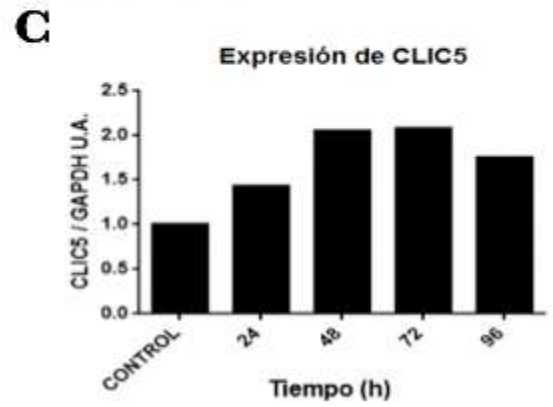
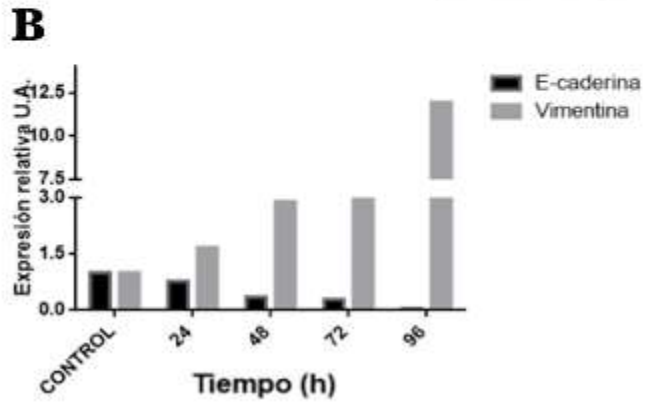
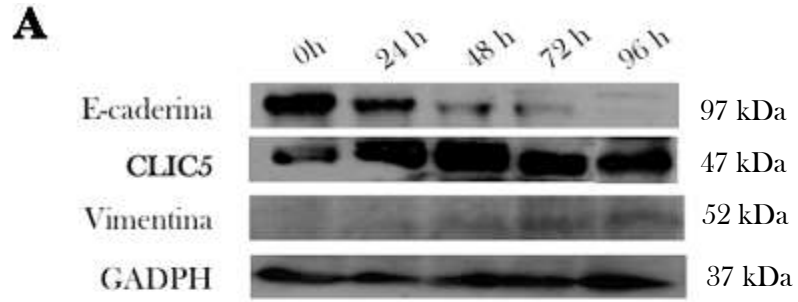


Figura 21. CLIC5 se sobreexpresa durante la EMT en HuH7. **A)** La sobreexpresión de CLIC5 evaluada por western blot con base a la relación E-cadherina/Vimentina. **B)** La gráfica del análisis densitométrico del cambio de los marcadores de la EMT. **C)** La gráfica del análisis densitométrico de CLIC5 durante la EMT. **D)** Análisis del cambio de distribución de CLIC5 en HuH7 por inmunofluorescencia. F-actina tinción contra faloidina, CLIC5 por FITC. Los ensayos se realizaron a las 24, 48, 72 y 96 h, respectivamente, n=2.

CLIC5 participa en los procesos de migración e invasión en la línea celular HuH7.

Debido a que la activación de la vía de TGF- β por medio de la citocina modifica a varios genes blanco durante la EMT, no es posible indicar que la sobreexpresión de CLIC5 está influyendo en los procesos biológicos de migración e invasión. Por lo cual, se procedió a realizar silenciamiento de la proteína CLIC5 por medio de partículas lentivirales que contenían un shRNA dirigido contra el mensajero de CLIC5, para determinar su papel en migración e invasión. Después de validar que hubo un silenciamiento mayor al 40% (valores de densitometría, shCLIC5: 0.5 vs Control: 1.0) de la proteína CLIC5, las células se mantuvieron seleccionadas por medio de puromicina y se les denominó shCLIC5 (Fig. 22 A y B). La primera evaluación fue viabilidad celular por medio de MTT en la cual se observó una disminución de aproximadamente el 20% en las células shCLIC5 a comparación de las células control; es decir, las células HuH7 no silenciadas (Fig. 22C). Por otra parte, cuando se realizó el ensayo de migración por medio de cierre de herida se obtuvo una disminución significativa en las células shCLIC5 a comparación de las células control, de echo la herida no llegó a cerrarse a pesar de que el experimento se dejó hasta las 94 h (Fig. 23). De la misma manera en el ensayo en las cámaras de Boyden se obtuvo una disminución en la migración (Fig. 24 A) así como en la invasión de las células shCLIC5 en comparación de las no silenciadas, siendo resultados estadísticamente significativos (Fig. 24 B).

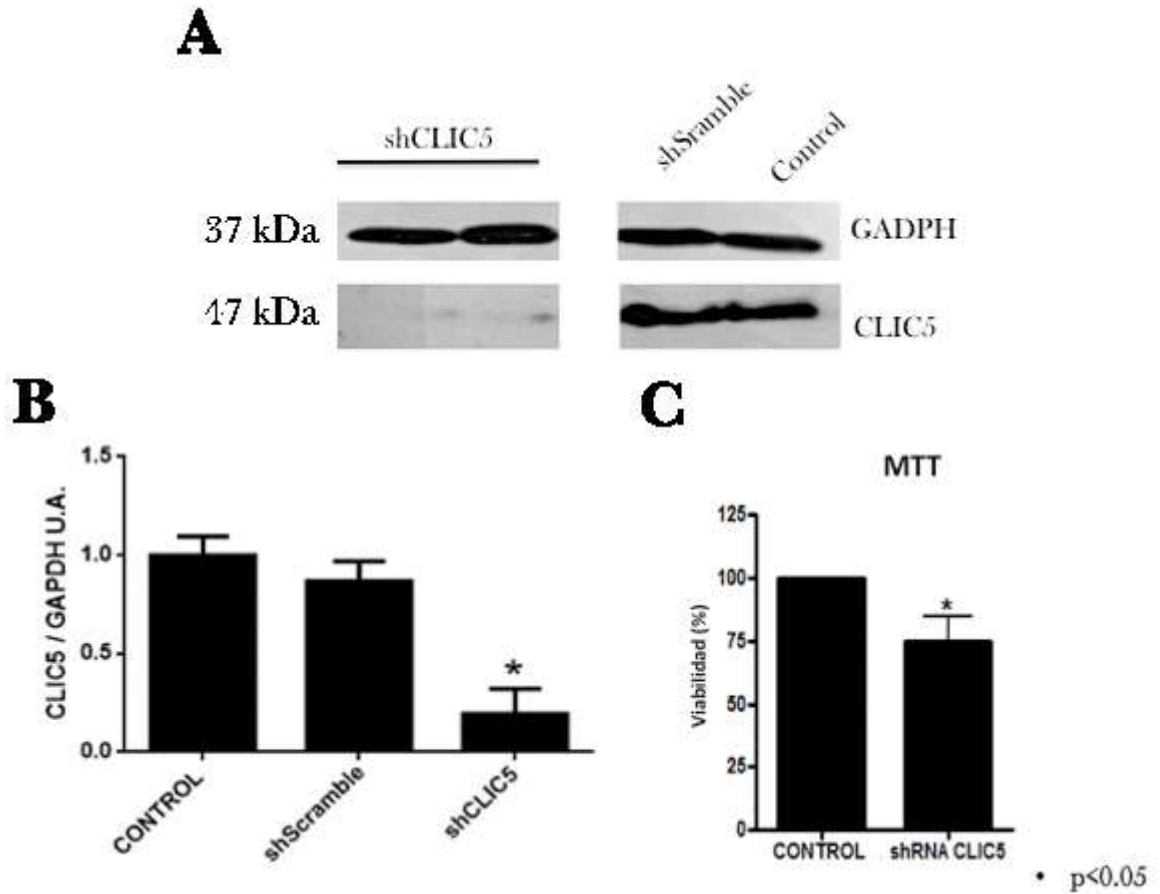


Figura 22. Silenciamiento de CLIC5 por shRNAs. A) Western blot representativo del silenciamiento específico de la proteína CLIC5 (shCLIC5), shScramble indica un shRNA no específico y control significa células no silenciadas. B) Gráfica de la evaluación densitométrica del western blot. C) Evaluación de viabilidad por MTT. n=3; * p<0.05.

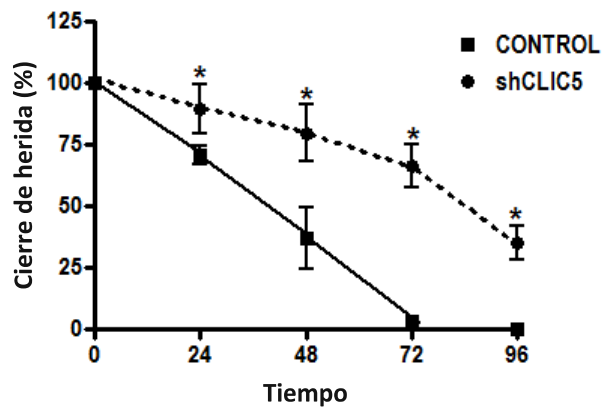
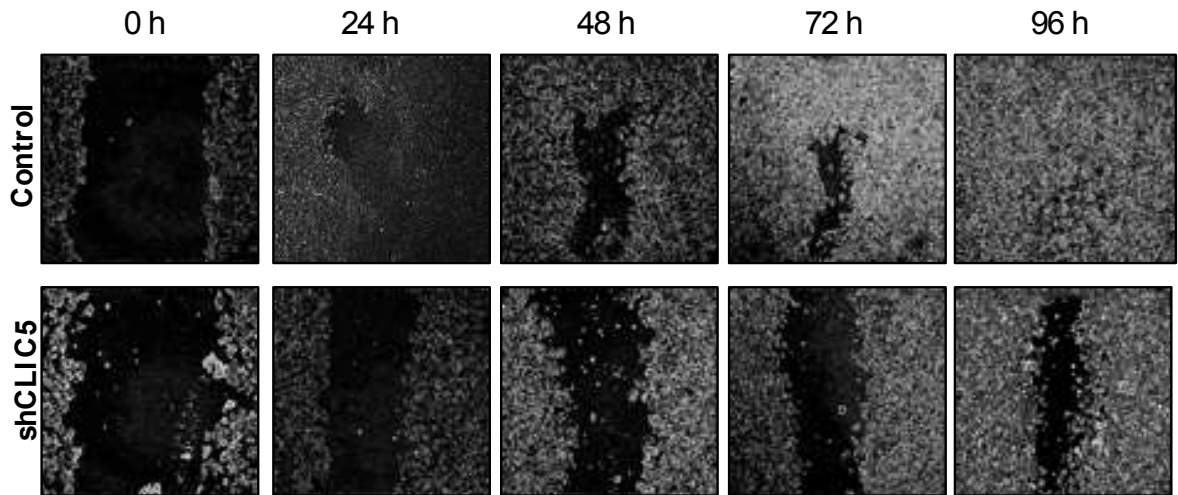


Figura 23. El silenciamiento de CLIC5 afecta la migración de las células HuH7. Arriba, imágenes representativas del ensayo de cierre de herida a las 0, 24, 48, 72 y 96 h. Abajo, gráfica representativa del ensayo de cierre de herida. n=4; *p<0.05.

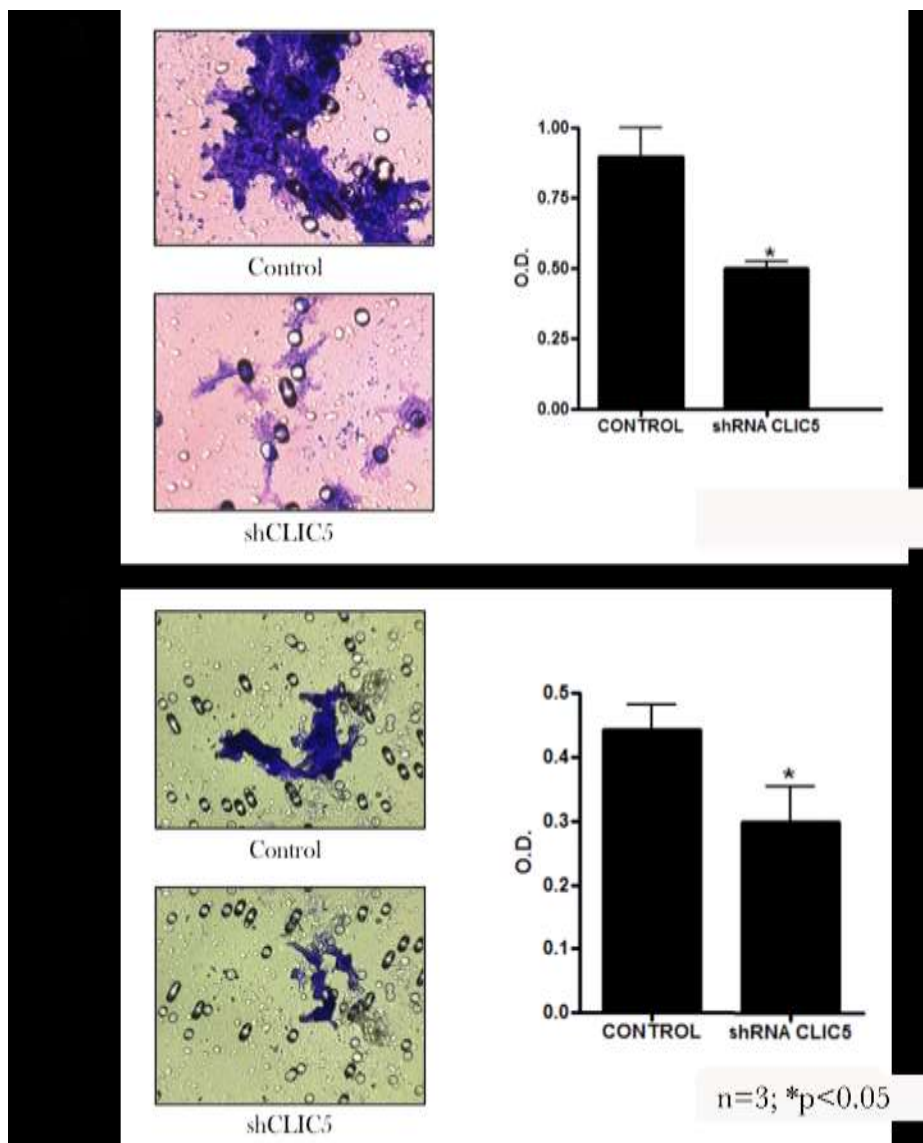


Figura 24. El silenciamiento de CLIC5 afecta la migración e invasión de las células HuH7. **A)** En la columna de la izquierda se encuentran las imágenes representativas de la migración de las células control en comparación con las células silenciadas (shCLIC5) en cámaras de Boyden; En la imagen de la derecha se encuentra la gráfica que representa el análisis colorimétrico del ensayo de migración. **B)** En la columna de la izquierda se encuentran las imágenes representativas de invasión de las células control en comparación con las células silenciadas (shCLIC5) en cámaras de Boyden con Matrigel®. En la imagen de la derecha se encuentra la gráfica que representa el análisis colorimétrico del ensayo de invasión. n=3; * p<0.05.

Finalmente, se evaluó este mismo patrón de sobreexpresión de CLIC5 en la línea celular HepG2 sometida a la EMT ante el tratamiento con TGF- β en los mismos puntos de tiempo (24, 48, 72 y 96 h); no obstante, no obtuvimos cambios significativos en la expresión de la proteína. Sin embargo, cabe resaltar que cuando las células son sometidas al tratamiento, pese a que se observó el aumento del marcador mesenquimal Vimentina

a la par de la disminución del marcador epitelial E-cadherina, la expresión de este último no logra ser abatida completamente como sucede en la línea celular HuH7 aún después de someter a las células HepG2 a tratamientos prolongados con TGF- β (Anexo 7).

DISCUSIÓN

Los datos obtenidos muestran que CLIC5 se encuentra sobreexpresado en el modelo animal de hepatocarcinogénesis química denominado MMHR, situación que se reproduce en el CHC del ser humano. Este trabajo es pionero al demostrar por primera vez la sobreexpresión de la proteína CLIC5 en muestras de pacientes diagnosticados con CHC, en otros trabajos solamente mencionan la sobreexpresión del gen en estudios de microarreglos de diferentes tumores (mama, rectal y CHC) sin llevar a cabo la validación de la expresión proteica [172, 173]. Además, nuestros resultados fueron confirmados con los datos de dos sitios que ponen a disposición varias bases de datos de microarreglos de pacientes diagnosticados con CHC (ONCOMINE y cBioPortal) (Fig. 6 y 7), puesto que en todas las bases de datos consultadas hubo una diferencia significativa entre la expresión de CLIC5 en pacientes con CHC y los sujetos control. No obstante, una de las desventajas de este tipo de análisis es que no brinda toda la información de cómo se llevó a cabo el estudio; por ejemplo no se aclara que tipo de sonda se ocupó en los diferentes estudios de microarreglos para evaluar a CLIC5 y si esta reconoce a las dos isoformas reportadas (A y B) o si se estudió solo una isoforma en los diferentes estudios. Otra desventaja es que los diferentes estudios de microarreglos no desglosan completamente todos los datos de los pacientes (Anexo 1), por lo cual esto no permite poder comparar otros parámetros para otros estudios. Probablemente estos detalles no considerados permitirían darnos resultados más detallados y finos en estos servidores ONCOMINE y cBioPortal. Un claro ejemplo de la importancia de las isoformas de CLIC5 en cáncer es lo descrito en leucemias donde reportan que la isoforma con modificación en la expresión es CLIC5A, mientras que la isoforma B no muestra cambios importantes en su expresión y por ende deciden descartar su estudio [178]; en el presente trabajo pese a que solamente se propone la isoforma B debido al peso observado en los western blots de lisado total y MC de las líneas celulares derivadas de CHC, el anticuerpo utilizado en este estudio tiene la capacidad de detectar ambas isoformas ya que reconoce la secuencia N-terminal que se encuentra presente en la isoforma A y B. Además, no se puede descartar ninguna isoforma debido a los antecedentes de la literatura nos dan pauta para

proponer que podríamos observar la isoforma A pero con modificaciones postraduccionales que hagan tener ese patrón de migración. Es por ello que se propone para estudios posteriores el diseño de sondas que delimiten ambas isoformas, además no descartar su estudio con la finalidad de ahondar en la participación de ambas isoformas de CLIC5 en los tumores de hígado; esta propuesta es debido a que en los diseños actuales no se diferencia entre ambas isoformas, por ejemplo, existe un modelo de ratón “knockout” que no expresa CLIC5A y CLIC5B, por lo que no se ha podido estudiar exhaustivamente como la ausencia de cada una de las isoformas afecta de manera independiente la función de los diferentes órganos en un organismo sano. Finalmente, si bien los microarreglos proveen robusta información del comportamiento y cambios genéticos que ocurren en el CHC es importante validar la correlación de la expresión a nivel de RNA y proteína, existen varias modificaciones postraduccionales que podrían interferir en la síntesis de la proteína, su comportamiento y su función dependiendo del contexto celular, especialmente en condiciones patológicas como en el cáncer. Por lo cual nosotros proponemos que es importante profundizar más en el estudio de la proteína CLIC5.

Otra aportación de esta tesis fue describir la localización subcelular de CLIC5 a nivel citoplasmático y nuclear en algunas células que se encuentran en el tumor en las biopsias de los tumores. Al validar la expresión proteica de CLIC5 en líneas celulares derivadas de CHC humano (HepG2, HuH7 y SNU387) pudimos observar nuevamente este patrón de distribución subcelular además de identificarla en medio extracelular cuando las células fueron incubadas en condiciones de ayuno. En estas líneas celulares, asumimos que detectamos la isoforma CLIC5B debido al peso observado en la señal de los western blots (aproximadamente 47 kDa), ya que para CLIC5A se describe un peso diferente (aproximadamente 28 kDa), no obstante para poder aclarar este punto proponemos un análisis de secuenciación (Fig 8). Si bien el estudio con líneas celulares ha aportado mucha información y nos permite realizar estudios *in vitro* de manera más práctica que *in vivo*; es importante recordar que el comportamiento celular es diferente, por lo cual hasta este punto aún no descartamos la probable participación de la isoforma A en CHC. Pese a que solamente se ha reportado a CLIC5 ubicada en el citoplasma,

aparato de Golgi [170], mitocondria [171] y membrana en función a su participación como proteína de andamiaje o como proteína soluble asociada a citoesqueleto [111, 152] otras CLICs se han encontrado expresadas ubicuamente en la célula; incluyendo el compartimento nuclear. Por ejemplo, en macrófagos activados con lipopolisacárido (LPS); la translocación de CLIC1 al núcleo y a la membrana celular es importante en la activación del inflamosoma NLRP3 y la señalización de IL1 β [179]. Por otra parte en líneas celulares de seres humanos mielomonocíticas se describió que CLIC1 nuclear en condiciones basales presenta dos secuencias putativas de NLS en las posiciones 49-51 y 192-195 respectivamente; además de poseer otros sitios con probables modificaciones postraduccionales como N-glicosilación en asparagina 42, fosforilación en treonina 48, 49 y 77, serina 27 y 163 así como probables sitios de N-nitrosilación; todas estas modificaciones postraduccionales podrían afectar su localización citoplasmática/membranal/nuclear. Para el caso de CLIC4, la proteína más estudiada de la familia, se ha descrito su translocación al núcleo ante la activación de la vía de señalización TGF- β ; Shukla indica que la expresión y translocación nuclear de CLIC4 es afectada directamente por el estímulo con TGF- β en miofibroblastos [180]. En queratinocitos se ha descrito que CLIC4 tiene capacidad de translocarse al núcleo gracias a su unión con la proteína Schnurri; interacción que afecta el mantenimiento de la fosforilación y por lo tanto la ubicación nuclear de las Smads; factores transcripcionales que regulan la activación de genes blanco río debajo de la vía de TGF- β y a su vez esta vía actúa como loop (rizo, bucle) positivo en la sobreexpresión de CLIC4 [180, 181]. Otro estudio indica que ante el contexto de estrés celular, específicamente el estado redox, CLIC4 se transloca al núcleo ante una S-nitrosilación afectando así la diferenciación y apoptosis de queratinocitos [182, 183]. Finalmente en un estudio *in silico* bioinformático donde se resalta la importancia de la NLS presente en la mayoría de los integrantes de la familia de CLIC's; se predice la importancia aminoácidos KKY para la interacción con la importina- α [177], sin embargo en el caso específico de CLIC4 la secuencia no se encuentra completamente expuesta o disponible en condiciones normales, por lo cual no se descarta que la proteína sufra algún tipo de modificación postraducciona l o bien se asocie a otras proteínas para translocarse al núcleo [181, 182]. En este trabajo, las predicciones en dos servidores arrojaron que CLIC5 cuenta con

mayor probabilidad de ser translocada al núcleo por sí sola (en base al score obtenido) a comparación de CLIC4 (Anexo 3). Esto coincide con el hecho de que se ha demostrado que para la translocación nuclear de CLIC4, ésta depende de su unión a Schnurri o de la N-nitrosilación y predice que probablemente CLIC5 no necesite de otra proteína o este tipo de modificación para su translocación nuclear. Resulta interesante en este punto mencionar a CLIC3. Este integrante de la familia CLIC's no presenta la secuencia de NLS no obstante se ha reportado su localización nuclear la cual depende directamente de la capacidad de interactuar en el dominio carboxilo terminal de la MAP cinasa ERK7 regulando así su actividad, localización y función de esta cinasa [184]. Debido a las diversas funciones que presentan los miembros de la familia de CLIC's dependiendo del contexto celular, tejido, así como ubicación subcelular (núcleo [149, 184], citoplasma [154], membrana [165, 185], mitocondria [171], aparato de Golgi [170], vesículas [127]), estudiar la participación de CLIC5 en el núcleo resulta de gran interés; por lo que se propone que podría estar influyendo en procesos biológicos importantes como otras CLIC's: apoptosis crecimiento celular, diferenciación o bien en vías de señalización. Gracias al silenciamiento por shRNA en HuH7 pudimos tener un acercamiento de la participación de CLIC5 en algunos procesos biológicos como migración e invasión; no obstante, podrían evaluarse otras funciones tanto en HuH7 como en diferentes líneas celulares derivadas de CHC con la finalidad de si presenta esta misma tendencia o los procesos biológicos en los que participa CLIC5 son diferentes entre las líneas celulares. Además, por otro lado realizar una construcción que nos permita sobreexpresar la proteína asociándola a una etiqueta con la finalidad de rastrear a detalle su ubicación subcelular en diferentes contextos celulares: líneas celulares derivadas de CHC así como en líneas celulares hepáticas catalogadas normales como las THLE-3, y poder complementar los resultados observados con el silenciamiento de CLIC5 así como otras funciones como el ensayo de tumorigenicidad.

Por otra parte, es interesante el resultado del doblete que observamos en la evaluación de proteína nuclear en las tres líneas celulares (HepG2, HuH7 y SNU387) (fig. 13). Este mismo patrón se observó anteriormente en un trabajo con cardiomiocitos por Ponnalagu y colaboradores [171]; no obstante, no discuten en ese estudio a que se

debe este patrón de migración. Una hipótesis es que el doblete que se observa en este trabajo, se deba probablemente a algún tipo de modificación postraduccional, debido a que la secuencia en la sección N-terminal presenta al menos tres sitios de fosforilación que se encuentran conservados en la familia CLIC's (Anexo 5); además que para CLIC4, se ha reportado la modificación de S-nitrosilación vía TNF- α en la posición de cisteína 234 que también se encuentra conservada en los integrantes de la familia (zona N-terminal); por lo cual algún tipo de modificación postraduccional podría dar un patrón de migración diferencial. Una manera de corroborar esta propuesta sería por medio de un análisis en gel de dos dimensiones procesado para western blot con el anticuerpo contra CLIC5, así se podría determinar si aparecen diferentes "spots" o puntos que indiquen no solo diferentes pesos moleculares sino puntos isoeléctricos los cuales al ser analizados por espectrometría de masas, permitiría obtener información de modificaciones postraducionales en las proteínas. Finalmente, con la información obtenida sería posible diseñar experimentos ocupando diferentes inhibidores de cinasas o transferasas y observar si existe algún cambio o desaparición del doblete por medio de western blot.

La ubicación extracelular de CLIC5 resulta de gran interés debido a que podría ser considerada como un biomarcador. Para poder corroborar esta hipótesis se tendría que evaluar su presencia en el suero de pacientes diagnosticados con CHC bajo los parámetros de sensibilidad y especificidad, así como su correlación al tiempo de aparición de la enfermedad. En cuanto a la expresión extracelular que se encontró en este trabajo, no hay reporte alguno en ningún tipo de órgano o línea celular estudiada hasta el momento; no obstante, se ha descrito a CLIC5B expresada en vesículas intracelulares de osteoclastos de pollo; siendo probablemente importante para la reabsorción del hueso [166]. Otro miembro de la familia, CLIC1 se ha descrito en vesículas extracelulares provenientes de líneas celulares de glioblastoma siendo importante dicha localización para la evasión de la muerte celular [126, 127]. En otro estudio en muestras de sangre de pacientes diagnosticados con linfoma se identificó también a CLIC1 y se le ha propuesto como un biomarcador de pronóstico para este tipo de cáncer [127] así como de ovario [99, 123]. En el caso de CLIC3, se ha descrito expresada en endosomas tardíos de células

de cáncer de mama; su participación ahí es importante debido a que regula el reciclaje de la metaloproteasa MT1-MMP influyendo así en la invasión y metástasis del tumor [139]. Por otra parte, el miembro de la familia p64, que pertenece a bovino se encuentra en vesículas secretoras y se reportó en un estudio que se asocia a p59(fyn); una tirosina cinasa que pertenece a la familia de Src involucrada en una gran gama de eventos de señalización intracelular [186]. Ya se había descrito a CLIC5 en diferentes compartimentos celulares dependiendo del tipo celular o tejido, pero es hasta este estudio que se describe por primera vez, en núcleo y de manera extracelular. Pese a que se desconoce en este momento el mecanismo de secreción de CLIC5, así como la importancia de su presencia en los diferentes compartimentos celulares, el presente estudio da pauta para poder ahondar en la importancia de su ubicación y así postular posibles funciones en el CHC, basándonos en la información de los diferentes miembros de la familia de las CLIC's (apoptosis, su relación con estrés oxidativo, señalización, entre otras) [134, 163, 183] (Anexo 4).

Gracias al análisis *in silico* se propone una estructura tridimensional de la proteína CLIC5B con base en la predicción del programa I-TASSER (Fig. 14); el cual confirma la alta homología que presenta esta proteína con CLIC4 y CLIC1, ahora a nivel de estructura tridimensional. También predice que CLIC5 conserva la estructura de una glutatión-S-transferasa, por lo que podría tener esta función; así como posibles sitios de unión a tres diferentes ligandos; no obstante, dichas funciones no han sido confirmadas experimentalmente (Anexo 5), solamente para el caso de CLIC2 se le ha relacionado con actividad no convencional de tipo glutatión-transferasa. En varios servidores aún no se visualizan los dominios reportados experimentalmente en CLIC5 y en los miembros de la familia de CLIC's tales como el NLS, la secuencia de localización del aparato de Golgi, la región de unión a Ezrina activa, los probables sitios de modificaciones postraduccionales de nitrosilación, y fosforilación así como los dominios de unión a Src (Anexo 5). No obstante, muchos autores discuten sobre la importancia de que el dominio C-terminal está altamente conservado en todos los integrantes de la familia de CLIC's, siendo la zona donde se ubican los sitios anteriormente descritos; esto podría indicar la importancia de conservar el dominio C-terminal con base en la función proteica,

probablemente la ausencia de algún CLIC de la familia podría inducir una compensación por otro miembro de la familia más cercano debido a su alto grado de homología. Esto se demostró en un estudio enfocado en el glomérulo renal en donde el modelo animal se eliminó la expresión de CLIC5, y los autores muestran que existe una compensación por parte de CLIC4 en la función de CLIC5 para la activación de la familia ERM para el mantenimiento de la arquitectura de las células pertenecientes al glomérulo renal. Cuando ambas proteínas se encuentran ausentes, se presentan cambios en la expresión de ciertas proteínas de citoesqueleto que se asocian a CLIC5, depleción de la fosforilación de ERM, proteinuria, deposición de matriz extracelular y proliferación de las células glomerulares del riñón [163, 187]. La zona N-terminal es el sitio que permite diferenciar entre las CLIC's y de hecho, en esta zona la secuencia es diferente entre las isoformas de la proteína CLIC5, en este dominio se delimitó la interacción de CLIC5B con Src en osteoblastos de pollo [166]; lo que refuerza la importancia de ahondar en el estudio de ambas isoformas de CLIC5. Además, la secuencia que corresponde al dominio N-terminal podría afectar en la estructura completa de CLIC5A y CLIC5B así como su disposición espacial dentro de la célula; por ejemplo en UNIPROT se menciona que los cambios de conformación del dominio N-terminal expone las superficies hidrófobas que podrían desencadenar la inserción de la proteína en membrana y como se marcó anteriormente un cambio conformacional de CLIC4 permite o inhibe la S-nitrosilación [188]. En base a todo lo mencionado anteriormente, nosotros proponemos que sería de gran interés cristalizar a la proteína en sus diferentes isoformas (A y B). Pese a que las únicas diferencias que encuentran en la secuencia de aminoácidos entre la isoforma canónica (B) y la isoforma A es la ausencia de los aminoácidos de las posiciones 1-159 y la modificación de 160-180 AEGLEEKEGAHMNPEIYLFVK → MTDSATANGDDRDPEIELFVK, la estructura tridimensional así como la disposición de los diferentes dominios en sus respectivas conformaciones terciarias podría indicarnos realmente en que compartimentos celulares es viable encontrarlas, así como las probables asociaciones proteicas en las que participan. Por otro lado, la existencia de ambas isoformas podría deberse a redundancia o compensación de las funciones celulares que ejerce cada una y la expresión de estas podría depender del contexto en el que se encuentre el tejido o la célula. Aunque no se tiene aún algún reporte de que

depende la expresión de una u otra isoforma de CLIC5, esta podría deberse a la regulación que existe a nivel del promotor; cabe resaltar que hasta el momento no hay algún reporte de cómo se lleva esta a cabo.

Existen pocos estudios de CLIC5 en relación a función de canal específico de cloro; de hecho un estudio *in situ* indica que la proteína tiene baja afinidad a cloro a comparación de algunos cationes; en este estudio su análisis se enfoca en la isoforma A y concluyen que su probable función de canal está estrechamente relacionado a su interacción con Actina [112]. Además, desde su descubrimiento en placenta [152], se ha visto que esta proteína interacciona con varias proteínas asociadas a andamiaje, a estructuras celulares y relacionadas a la regulación del citoesqueleto en los estereocilios del oído interno [164, 165], en células del glomérulo renal [153, 154] y en el espermatozoide [185]. La información previa de Torres-Mena [174], la información en la literatura y resultados obtenidos por medio de servidores predicen posibles interacciones proteicas como String, nuestro equipo de trabajo decidió seleccionar y evaluar si las proteínas Ezrina, Podocalixina y Actina tenían capacidad de interactuar con CLIC5 (Fig. 15). El acercamiento por medio de coimmunoprecipitaciones arrojó resultados positivos, este es el primer reporte de este tipo de interacción en células tumorales de CHC, en hígado sano esta interacción no se da en las células hepáticas debido a que en condiciones basales no se encuentra expresado CLIC5 ni Ezrina. Nosotros proponemos que para profundizar en la información del tipo de interacciones que suceden en esta condición patológica sería mejor el análisis por espectrometría de masas; es previsible que con este estudio podríamos obtener información más robusta sobre los complejos proteicos que se están llevando a cabo en la célula. E incluso a nivel de los diferentes compartimentos en donde se encontró CLIC5 en primera instancia núcleo y citoplasma, así como en otros organelos celulares en donde se ha reportado la ubicación de CLIC5 como mitocondria, aparato de Golgi y vesículas. Al obtener la información de que proteínas interactúan con CLIC5 se podría comprobar por medio de inmunoprecipitaciones así como otros ensayos por ejemplo: colocalización por inmunofluorescencias o transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) experimento que nos ayudaría a demostrar interacción celular que hay entre las proteínas

ya que esta herramienta solo permite tener resultados positivos si la proximidad las moléculas se encuentra dentro del rango de 10-100 Å. Con base en la información obtenida podríamos predecir en que otras funciones celulares en que participa CLIC5, aunado a delimitar si las interacciones son dependientes de algún tipo de estímulo o factor extracelular. Un resultado controversial obtenido, fue no observar una buena colocalización en las inmunofluorescencias de CLIC5 y la tinción con faloidina; no obstante, en las co-inmunoprecipitaciones se obtuvo señal positiva. Dicho resultado se debe probablemente a que el anticuerpo contra actina reconoce a todas las isoformas de actina (α , β y γ) incluyendo aquella ubicada a nivel nuclear, mientras que la tinción con faloidina solo reconoce a F-actina. Para poder discernir si existe alguna afinidad con algún tipo específico de actina se proponen ensayos como los de polimerización *in vitro*, hidrólisis de ATP activada por F-actina, así como la participación de CLIC5 y otras proteínas de unión a actina en la polimerización /despolimerización y finalmente la cuantificación de la relación G-actina /F-actina con CLIC5.

La interacción con actina nos abre un gran espectro de funciones en las que CLIC5 podría estar involucrada (Fig. 16) ya que actina participa en una gran variedad de ellas, por ejemplo en el citoplasma o citoesqueleto el mantenimiento de estructuras celulares, formación de organelos que participan en motilidad y/o movilidad, en señalización, o tráfico de otras proteínas, en endocitosis, en exocitosis, en secreción, entre otros; para el caso de la interacción nuclear incluye la transcripción y la regulación de la transcripción (al unirse con las RNA polimerasas I, II y III), al procesamiento y a la exportación de RNA, al movimiento intranuclear y al mantenimiento de estructuras [189, 190]. En cuanto a la participación nuclear se pueden tomar ciertos ejemplos con base en otras proteínas ubicadas en citoplasma que están relacionadas a la función de citoesqueleto y que se han descrito a nivel nuclear. Se ha reportado por ejemplo Miosina VI, miembro de la familia de Miosinas que se expresa en el citoplasma y ejerce funciones importantes en el citoesqueleto; en ensayos *in vitro* también se le ha determinado que se asocia con la ARN polimerasa II y con la transcripción activa de genes. Es una proteína que juega papeles muy importantes tanto en citoplasma como en núcleo (Vreugde et al., 2006, de Lanerolle et al., 2005; Grummt, 2006; Hofmann et al., 2006a; Percipalle and

Farrants, 2006). Además, en cuanto a función de movimiento intranuclear, se ha descrito que ciertas proteínas ocupan a actina para poder moverse al núcleo debido a que carecen de NLS en su secuencia proteica [191]; un ejemplo son las proteínas de la cápside del virus del herpes 1 (SV-1). Feierbach en 2006 se demostraron que este virus del herpes induce la formación de filamentos de actina nuclear y que esta es necesaria para el ensamblaje y posterior exportación de las cápsides virales, a través de un complejo Actina-Miosina V [192]. Por lo cual CLIC5 podría estar también facilitando el transporte de ciertas proteínas al núcleo, cabe señalar que para el caso de las otras proteínas que se reportan en el presente trabajo, Ezrina y Podocalixina; hasta el momento no se ha descrito localización nuclear ni algún tipo de participación en el núcleo.

En 2010 Courcouman describió un estudio que denominó las firmas temprana y tardía de TGF- β donde reporta los cambios de expresión genética durante el desarrollo del CHC con base en la vía de señalización de TGF- β . En dicho trabajo se describe en la firma tardía en base a un modelo animal que tiene afectada la vía de señalización en correspondencia a un mayor grado de dediferenciación, metástasis, recurrencia y mal pronóstico en biopsias de pacientes y sujetos control así como la presencia de características mesenquimales en líneas celulares y su correlación de mayor capacidad de invasión y metástasis; mientras que, en la firma temprana, a un menor grado de dediferenciación se asocia un buen pronóstico, menor probabilidad de recurrencia y metástasis comparando pacientes y sujetos control así como el mantenimiento de características epiteliales en las líneas celulares evaluadas. Si bien este trabajo reporta una gran cantidad de genes modificados; solamente se indican cambios de expresión en las proteínas CLIC1 y CLIC4 [108]; pero no muestran información acerca de CLIC5. Mientras que, en el presente trabajo, CLIC5 aumenta tras la exposición de las células con la citocina además está en mayores concentraciones en células que pertenecen a la firma tardía de TGF- β , como SNU387, cuando se le compara con HepG2 que es de firma temprana. Una posible explicación es que no se informa la isoforma de CLIC5 que se reconoce en estos microarreglos, podría ser diferente a la encontrada en este trabajo; así como los parámetros que eligen para el análisis de sus microarreglos. A pesar de ello, los datos de otras bases indican la tendencia de su sobreexpresión en pacientes

diagnosticados con CHC (Fig. 7) (Anexo 2); confirmando la evaluación que realizamos en nuestro equipo de trabajo en muestras de pacientes por medio de inmunohistoquímica (Fig. 6). Durante la EMT inducida *in vitro* en la línea celular HuH7 observamos un aumento de CLIC5 (Fig. 21), no obstante, no obtuvimos el mismo cambio en la línea celular HepG2 (Anexo 7). Es importante resaltar que para HepG2 no hay una transición completa hacia la firma mesenquimal debido a que hasta los 10 días con el estímulo de la citocina se puede observar que hay expresión remanente de E-cadherina aún ante la ganancia de expresión de Vimentina; mientras que en la línea celular HuH7 si se observó una clara correlación entre sobreexpresión de CLIC5 y la completa EMT a lo largo de los días de tratamiento con TGF- β . En este estudio se delimitó que la expresión de CLIC5 podría estar influenciada por el grado de desdiferenciación y agresividad que ganan las células tumorales, pero también resultaría interesante evaluar si CLIC5 podría influenciar directa o indirectamente sobre la EMT, así como si tiene la capacidad de inducirla como consecuencia de su sobreexpresión; además se podrían estudiar otros factores que afecten la expresión de la proteína, como la hipoxia, inflamación, estrés oxidativo u otras citocinas (HGF, PDGF, IL-6, etc). También podría estudiarse cuales vías de señalización se encuentran afectadas ante los cambios de expresión de CLIC5, por medio de microarreglos que muestran cambios en la fosforilación en los integrantes de las vías (PamChip de Tirosinas cinasas o Serinas/Treoninas cinasas). Además en este trabajo se detectó un cambio en la distribución subcelular de CLIC5 (Fig. 21) lo cual nos señala que la proteína con base en estímulos externos, podría sufrir modificaciones que la reubiquen en otros compartimientos celulares, en el presente trabajo no logramos describir la importancia o el impacto funcional de este fenómeno biológico pero nos permite abrir una ventana para estudiar los mecanismos de cambio subcelular, las modificaciones postraduccionales que influyen en CLIC5 y la asociación a otras proteínas en los diferentes compartimientos. Finalmente es importante resaltar que, pese a tener resultados significativos no implica que solamente CLIC5 esté influyendo en la migración e invasión celular; el ensayo de silenciamiento del gen permitió excluir de este efecto los otros genes probablemente alterados ante TGF- β .

Al silenciar la expresión de CLIC5 (silenciamiento parcial, 40%), obtuvimos

diferencia en la viabilidad celular lo cual sugiere que la proteína afecta la proliferación (Fig. 22); sin embargo no delimitamos bajo que mecanismo o vía de señalización la expresión de CLIC5 regula este proceso. Probablemente la disminución de la viabilidad celular no sea tan alta debido a que otras proteínas que se encuentran sobreexpresadas podrían rescatar este tipo de habilidad, existiendo redundancia; este mismo patrón de disminución de viabilidad celular se observa en otros estudios cuando se silencia CLIC1 y CLIC4 en CHC [132, 133, 151]. En el caso de los estudios de funcionalidad de migración e invasión en las células silenciadas para CLIC5 observamos una reducción significativa, lo que correlaciona que su sobreexpresión sea un indicador de un mal pronóstico para el paciente y preferentemente en etapas tardías del CHC donde se lleva a cabo la transición epitelio mesénquima, migración invasión y metástasis de las células tumorales. También proponemos que no se da una completa pérdida de la migración e invasión debido a que otras proteínas; ya sean integrantes o no de la familia de las CLIC's pudiese estar compensando la acción de CLIC5. Por ejemplo, un estudio reporta la disminución de la migración e invasión en otras líneas celulares derivadas de CHC ante el silenciamiento de CLIC1 [133]. Además en otros estudios indican que CLIC1 también juega un papel importante en otros procesos importantes en el cáncer como la apoptosis y en la metástasis linfática [134]. A pesar de que no se indagó sobre la forma en que CLIC5 participa en estos otros fenómenos biológicos, no descartamos su participación en otras situaciones como estrés oxidativo, hipoxia, angiogénesis, entre otras; sería interesante demostrar si CLIC5 afecta otras funciones como se ha demostrado para CLIC1 en los últimos estudios [132, 133]. Además, aún queda mucho que ahondar en la evaluación de los demás miembros de la familia de CLIC's y su probable participación en CHC.

A manera de resumen podemos concluir que en este trabajo se reporta por primera vez la sobreexpresión de CLIC5 en el CHC así como su ubicación en diferentes compartimentos subcelulares. Proponemos la hipótesis de que CLIC5 podría funcionar como un oncogen en el CHC debido a que observamos que el silenciamiento de su expresión proteica afecta la proliferación, migración e invasión en líneas celulares; otros experimentos como el de tumorigenicidad ayudarían a corroborar nuestra propuesta.

También sugerimos que esta proteína probablemente al tener una estrecha relación con varias proteínas de citoesqueleto tales como: actina, ezrina y podocalixina; podría ser esta la forma en que interviene en la capacidad de migración e invasión, debido a que estas proteínas mencionadas anteriormente se han visto involucradas a dichos procesos biológicos en varios tumores de forma independiente y en algunos casos cuando interaccionan entre ellas. Por primera vez también el presente trabajo describe que la proteína está involucrada en el proceso de transición epitelio mesénquima, el cual se ha reportado como el principal mecanismo para la migración e invasión celular en CHC. Con la finalidad de ahondar sobre la participación de CLIC5 en CHC, resultaría interesante delimitar a CLIC5 en todos los sitios subcelulares así como si su capacidad de interaccionar con otras proteínas depende de su ubicación, función o contexto celular.

CONCLUSIONES

- CLIC5 podría funcionar como oncoproteína, ya que se encuentra sobreexpresada en el CHC además su silenciamiento disminuye la proliferación, la migración y la invasión celular.
- CLIC5 codifica para dos isoformas A y B, lo que sugiere que podría existir una expresión diferencial dependiendo del tipo y contexto celular; probablemente esto se debe a que ejerce funciones diferentes en base a sus probables interacciones proteicas.
- El análisis bioinformático reafirma los dominios descritos para la familia de las CLICs se encuentran conservados en CLIC5, además de indicar dos secuencias con capacidad de interacción con la importina- α .
- La ubicación subcelular así como la interacción de CLIC5 con otras proteínas podría estar asociada a diferentes funciones en el CHC.
- La sobreexpresión de CLIC5 y en especial su ubicación extracelular permite sugerirla como un biomarcador de progresión y mal pronóstico del CHC.
- CLIC5 podría influir en otros procesos biológicos además de la EMT, migración e invasión; como lo ha demostrado sus otros familiares cercanos CLIC1 y CLIC4 en el CHC y otros tipos de cáncer.

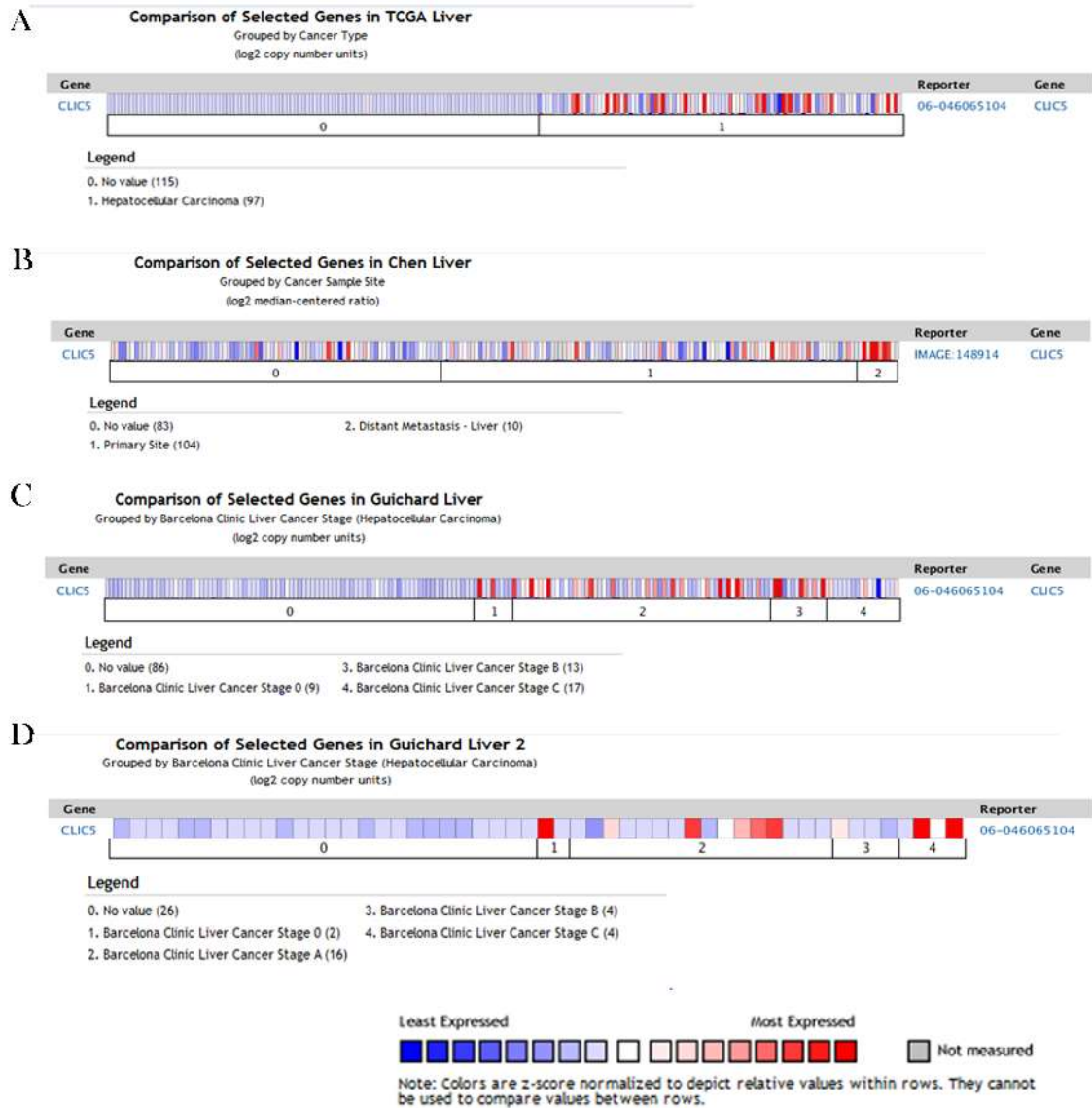
PERSPECTIVAS

- ❖ Delimitar las diferencias funcionales que podrían existir entre CLIC5A y CLIC5B en CHC.
- ❖ Identificar otras proteínas que interactúan con CLIC5 en el CHC.
- ❖ Validar la función de oncogen de CLIC5 por medio de ensayos de tumorigénesis.
- ❖ Validar a CLIC5 como biomarcador sanguíneo de diagnóstico y pronóstico en CHC.
- ❖ Definir si CLIC5 participa en alguna cascada de señalización.
- ❖ Caracterizar que otros estímulos extracelulares que disparan o regulan la expresión de CLIC5.
- ❖ Delimitar su función a nivel nuclear y citoplasma.
- ❖ Identificar el mecanismo por el cual CLIC5 se secreta fuera de la célula y si esto afecta a la comunicación celular del tumor con otros tejidos no tumorales y con otros órganos.

ANEXOS



Anexo 1. Información desglosada de pacientes de la base de datos Inserm, 2015 de cBioportal. A) Se indica las mutaciones que se reportan en esta base de datos, así como los sitios con cambio en aminoácidos (AA). B) Se desglosa la información de los pacientes CHC1154T y CHC1714T respectivamente. En la parte superior, concierne al paciente CHC1154T se pueden observar los datos generales, la denominación de la muestra, un esquema de las mutaciones que se presentan en los diferentes cromosomas y las tablas de información de otros datos. En la parte inferior, concierne al paciente CHC1714T, se desglosa los datos generales, la denominación de la muestra y el esquema de mutaciones que se presentan en los diferentes cromosomas.



Anexo 2. Mapas de calor que desglosan la información obtenida en el servidor ONCOMINE, se presentan todas las bases de datos ocupadas en este estudio. Cada casilla representa un paciente y es posible acceder a los datos del mismo. A) Información obtenida de la base de datos TCGA Liver; 0–Hígados control (n=115), 1–Hígados con CHC (n=97). B) Información obtenida de la base de datos Chen Liver; 0–Hígados control (n=83), 1–Tumor primario (n=104), 2–Tumores metastastásicos (n=10); C) Información obtenida de la base de datos Guichard Liver; 0–Hígado control (n=86), 1–Estadio 0 de Clasificación de Barcelona (n=9), 2–Estadio A de Clasificación de Barcelona (n=13), 3–Estadio B de Clasificación de Barcelona (n=13), 4–Estadio C de Clasificación de Barcelona (n=17). Abajo se indica la guía de color Least Expressed (Subexpresión en azul), Most Expressed (Sobreexpresión en rojo).

A

cNLS Mapper Result

Predicted NLSs in query sequence		
MALSMPLNGLKEEDKEPLIELFVKAGSDGESIGNCPFSQRLFMIWLKGV	50	
VFSVTTVDLKRKPADLQNLAPGTHPPFITFNSEVKTDVNKIEEFLEEVL	100	
PPKYLKLSPKHPESNTAGMDIFAKFSAYIKNSRPEANEALERGLLKTLOK	150	
LDEYLN SPLPDEIDENSMEDIKFKSTRKFLDGNEMTLADCNLLPKLHIVKV	200	
VAKKYRNFDIPKEMTGIWRYLTNAYSRDEF TNTCPSDKEVEIAYS DVAKR	250	
LTK	253	

Predicted monopartite NLS		
Pos.	Sequence	Score

Predicted bipartite NLS		
Pos.	Sequence	Score

B

NucPred

The NucPred score for your sequence is 0.22 (see [score help](#) below)

1	MALSMPLNGLKEEDKEPLIELFVKAGSDGESIGNCPFSQRLFMIWLKGV	50
51	VFSVTTVDLKRKPADLQNLAPGTHPPFITFNSEVKTDVNKIEEFLEEVL	100
101	PPKYLKLSPKHPESNTAGMDIFAKFSAYIKNSRPEANEALERGLLKTLOK	150
151	LDEYLN SPLPDEIDENSMEDIKFKSTRKFLDGNEMTLADCNLLPKLHIVKV	200
201	VAKKYRNFDIPKEMTGIWRYLTNAYSRDEF TNTCPSDKEVEIAYS DVAKR	250
251	LTK	253

Positively and negatively influencing subsequences are coloured according to the following scale:

(non-nuclear) negative  positive (nuclear)

Anexo 3. Análisis *in silico* de la probable localización nuclear a través de la identificación de la secuencia de localización nuclear (NLS) en CLIC4. A) Análisis con el servidor cNLS Mapper; se obtuvo resultado negativo para CLIC4 arrojando cero secuencias de interacción con importina- α . B) Análisis con el servidor NucPred, la secuencia se presenta con base en el mapa de calor para indicar la zona donde podría localizarse la NLS, el score obtenido es bajo para CLIC4 (score: 0.22).

CLI C4

```

CLIC4 .....
CLIC5_B .....
CLIC1 .....
CLIC6 MABAAEPEGVAPGPGQPPEVPAPLAERPGEPGAAGGEAEGPEGSEGAEEAPRGAAAVKEA
CLIC2 .....
CLIC3 .....
consensus>70 .....

```

CLI C4

```

CLIC4 .....
CLIC5_B .....
CLIC1 .....
CLIC6 GGGGPDARGPEAEARGTRGAHGETEAEEGAPEGAEVPPGGGEETSGAQQVEGASPRGAQQGE
CLIC2 .....
CLIC3 .....
consensus>70 .....

```

CLI C4

```

CLIC4 .....
CLIC5_B .....
CLIC1 .....
CLIC6 PRGEAQREPEDSAAPERQEEAEQRPEVPEGSASGEAGDSVDAEGPLGDNIEAEGPAGDSV
CLIC2 .....
CLIC3 .....
consensus>70 .....

```

CLI C4

```

CLIC4 .....
CLIC5_B .....
CLIC1 .....
CLIC6 EAEGRVGDSVDAEGPAGDSVDAEGPLGDNIQAEGPAGDSVDAEGRVGDSVDAEGPAGDSV
CLIC2 .....
CLIC3 .....
consensus>70 .....

```

CLI C4

```

CLIC4 .....
CLIC5_B .....
CLIC1 .....
CLIC6 DAEGRVGDSVEAGDPAGDGVVEAGVPAGDSVEAEGPAGDSMDAEGPA.....GRARRV
CLIC2 .....
CLIC3 .....
consensus>70 .....

```

CLI C4

```

CLIC4 .....
CLIC5_B PDQPEENESPHYDDVHEYLRPENDLYAT.....QLNTHEYDF...VSVYTIKGEETS
CLIC1 .....
CLIC6 SGEPQQSGD.....GSLSPQAEAEVAAGESAGRSPGELAWDAAEEAEVPGVKGSEEA
CLIC2 .....
CLIC3 .....
consensus>70 .....

```

CLI C4

```

CLIC4 .....
CLIC5_B LASVQSEDRGYLLPDEIYSELQEAHPGEPQEDRGISMEGLYSS.....T...
CLIC1 .....
CLIC6 APGDARADAG...EDRVGDGPQQEPGEDEERRERSPEGPREEEAAGGEEESPSSPHGE
CLIC2 .....
CLIC3 .....
consensus>70 .....

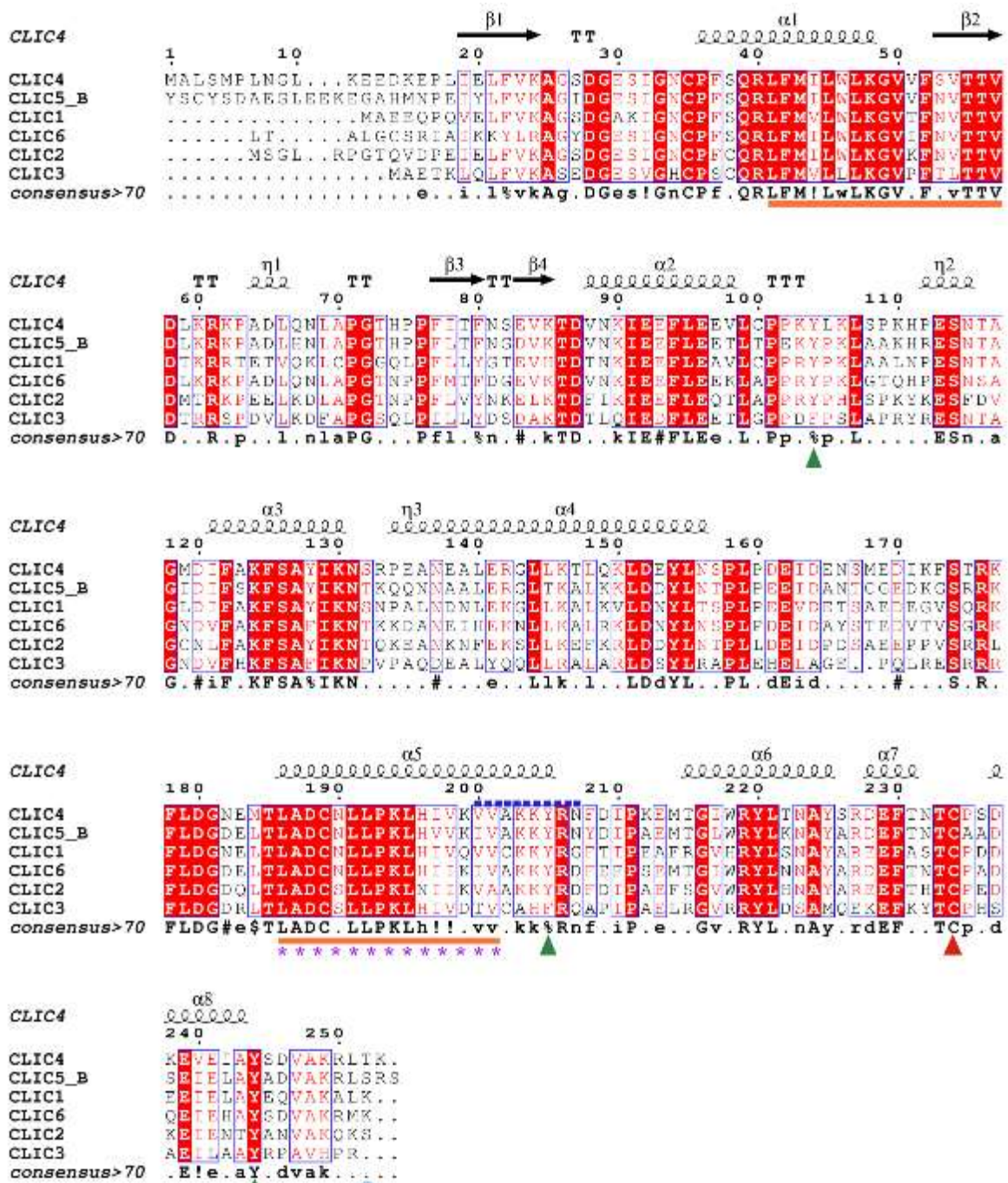
```

CLI C4

```

CLIC4 .....
CLIC5_B .....
CLIC1 .....
CLIC6 ASRGAAEPEAQL.SNHLAEEGPAEGSGEAAARVNGRREDGEASEPRALGQEHDTLQVVKV
CLIC2 .....
CLIC3 .....
consensus>70 .....

```



Anexo 4. Alineamiento de los integrantes de la familia CLIC5. Se toma como plantilla CLIC4 debido a que es la proteína más estudiada. En naranja se señala los dominios transmembranales descritos como TM1 y TM2; en punteado azul oscuro se resalta la secuencia de NLS; con asteriscos morados se resalta el sitio de localización para aparato de Golgi; en verde se resaltan el sitio de unión a SH2 de Src; punta de flecha roja se indica la Cisteína (C) en la cual se ha visto S-nitrosilación para CLIC4; puntas flechas verdes son sitios de tirosina conservados (Y); círculo azul claro se resaltan el sitio de fosforilación descrito.

A

Top 10 Identified structural analogs in PDB

Click to view	Rank	PDB Hit	TM-score	RMSD ^a	IDEN ^b	Cov	Alignment
<input checked="" type="radio"/>	1	3o3tA	0.570	0.77	0.631	0.576	Download
<input type="radio"/>	2	2d2zB	0.568	1.48	0.754	0.585	Download
<input type="radio"/>	3	2r5gA	0.548	1.69	0.650	0.571	Download
<input type="radio"/>	4	3kjqA	0.519	1.93	0.514	0.541	Download
<input type="radio"/>	5	1k0oB	0.515	0.65	0.662	0.519	Download
<input type="radio"/>	6	2yv9A	0.502	2.37	0.233	0.541	Download
<input type="radio"/>	7	2yv7A	0.494	2.01	0.321	0.522	Download
<input type="radio"/>	8	5ei8A	0.491	1.77	0.241	0.515	Download
<input type="radio"/>	9	5d9tA	0.490	1.51	0.258	0.510	Download
<input type="radio"/>	10	2n5fA	0.469	2.32	0.270	0.512	Download

B

3O3T

Crystal Structure Analysis of M32A mutant of human CLIC1

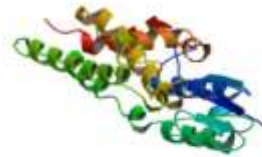
DOI: 10.2210/pdb3o3t/pdb Entry 3O3T supersedes 3MA4

Classification: [TRANSPORT PROTEIN](#)

Deposited: 2010-07-28 Released: 2010-08-11

Deposition author(s): [Farrusotti, S.](#), [Achilina, L.A.](#), [Adamson, B.J.](#), [Fernandes, M.A.](#), [Stevches, S.](#), [Dirx, H.W.](#)Organism: [Homo sapiens](#)Expression System: [Escherichia coli](#)

Mutation(s): 1

Structural Biology Knowledgebase: 3O3T (>16 annotations) [SIBOL.org](#)Display Files [Download Files](#)

2D2Z

Crystal structure of Soluble Form Of CLIC4

DOI: 10.2210/pdb2d2z/pdb

Classification: [TRANSPORT PROTEIN](#)

Deposited: 2005-09-21 Released: 2006-05-16

Deposition author(s): [Li, Y.F.](#), [Li, D.F.](#), [Wang, D.C.](#)Organism: [Homo sapiens](#)Expression System: [Escherichia coli](#) BL21(DE3)Structural Biology Knowledgebase: 2D2Z (>16 annotations) [SIBOL.org](#)

2R5G

Structure of human CLIC2, crystal form B

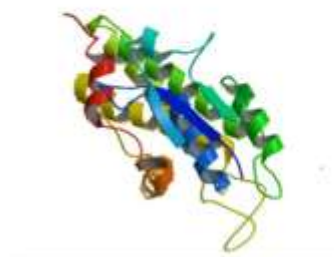
DOI: 10.2210/pdb2r5g/pdb

Classification: [TRANSPORT PROTEIN](#)

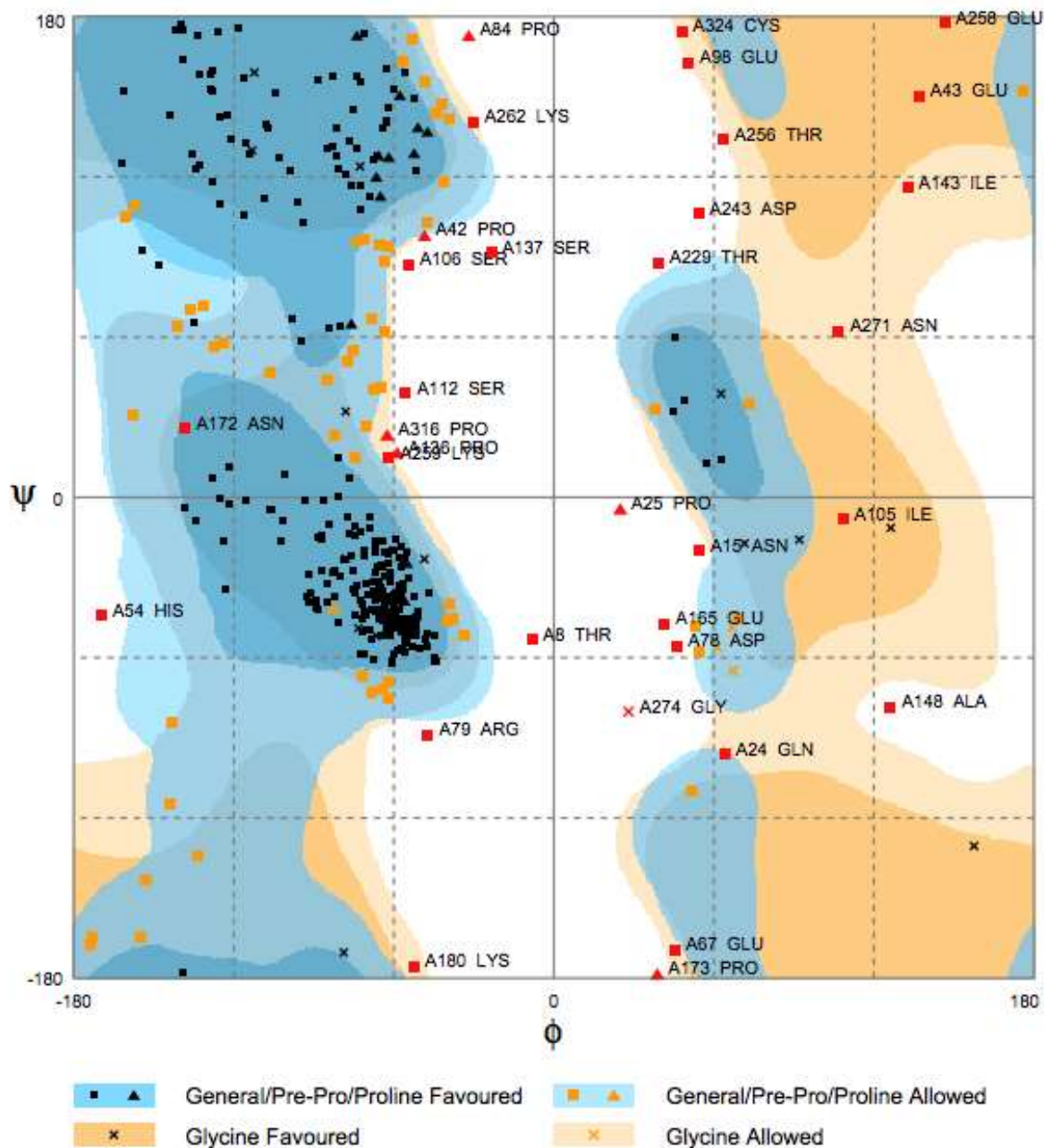
Deposited: 2007-09-03 Released: 2007-11-13

Deposition author(s): [Gorman, M.A.](#), [Hansen, G.](#), [Cromer, B.A.](#), [Parker, M.W.](#)Organism: [Homo sapiens](#)Expression System: [Escherichia coli](#) BL21(DE3)Structural Biology Knowledgebase: 2R5G (>16 annotations) [SIBOL.org](#)

C



Anexo 5. Proteínas que estructuralmente son más cercanas a la probable estructura tridimensional de CLIC5. A) Se enlista las proteínas con mayor Score por su clave en base la librería de PDB; siendo la primera CLIC1 (3O3T), la segunda CLIC4 (2D2Z) y la tercera CLIC2 (2R5G). No obstante, la identidad (IDEN) y cobertura (Cov) son mayores para CLIC4. B) Se enlistan las tres proteínas con mejor Score, con características que se han descrito en la literatura y de manera *in silico* a la izquierda; a la derecha se observa representación de la estructura tridimensional.



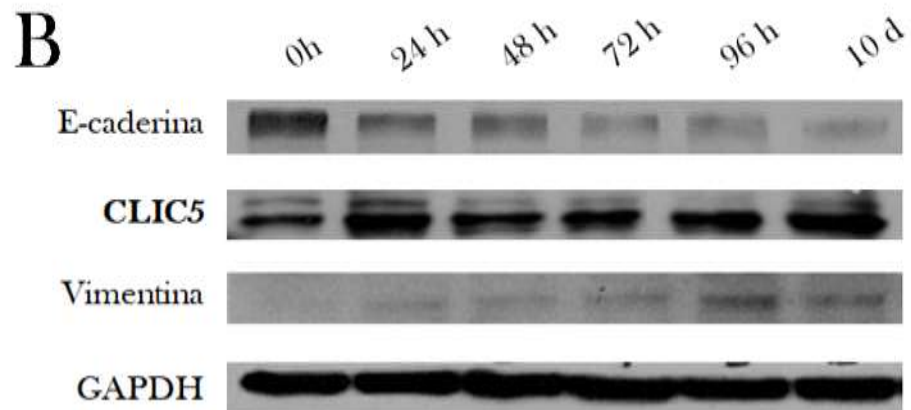
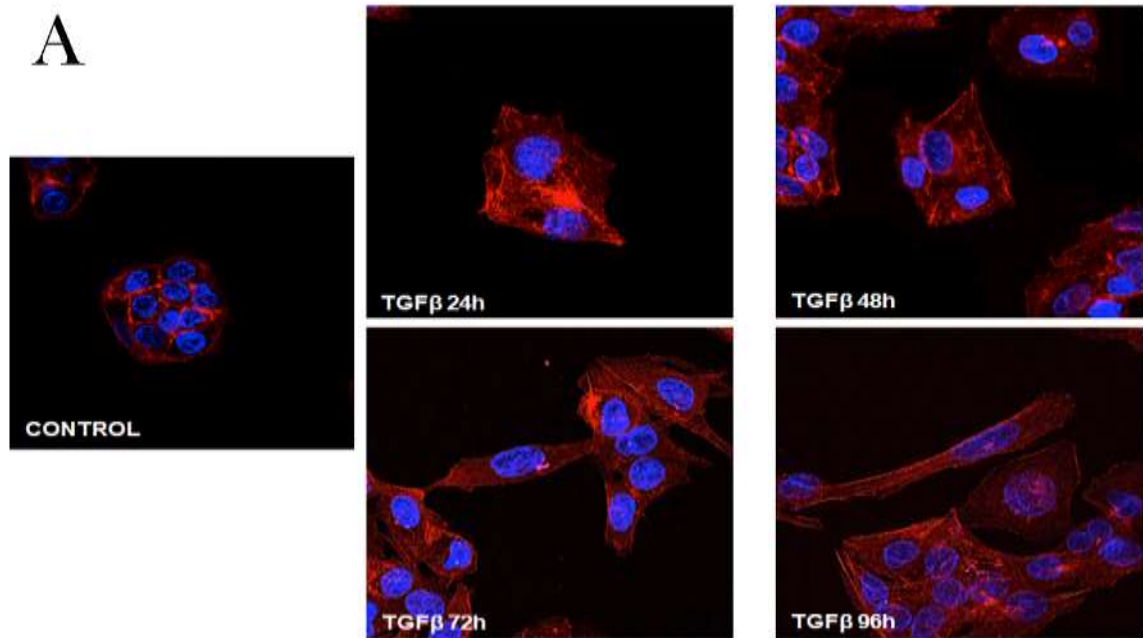
Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 314 (77.0%)
 Number of residues in allowed region (~2.0% expected) : 61 (15.0%)
 Number of residues in outlier region : 33 (8.1%)

Anexo 6. Gráfico de Ramachandran obtenido en el servidor SAVES.

Lista 1. Evaluación de los residuos del análisis del gráfico de Ramachandran

Residue [A 4 :GLU] (-84.74, 43.79) in Allowed region
Residue [A 6 :TYR] (-152.96,-143.22) in Allowed region
Residue [A 7 :SER] (-173.45,-164.42) in Allowed region
Residue [A 12 :THR] (53.30, -48.03) in Allowed region
Residue [A 14 :GLN] (-81.94, 23.20) in Allowed region
Residue [A 17 :ARG] (-70.71, 26.37) in Allowed region
Residue [A 18 :THR] (-75.21, 54.81) in Allowed region
Residue [A 19 :TYR] (-70.82, 96.54) in Allowed region
Residue [A 22 :PRO] (-74.43, 96.07) in Allowed region
Residue [A 28 :ASN] (-74.39, 14.76) in Allowed region
Residue [A 46 :LEU] (-62.26, -69.04) in Allowed region
Residue [A 52 :ASN] (-123.69, 57.90) in Allowed region
Residue [A 53 :THR] (-63.38, 61.91) in Allowed region
Residue [A 56 :TYR] (-173.55,-167.52) in Allowed region
Residue [A 60 :SER] (-141.43, 63.80) in Allowed region
Residue [A 63 :THR] (-143.90,-114.52) in Allowed region
Residue [A 65 :LYS] (-68.08, 66.55) in Allowed region
Residue [A 70 :SER] (-61.77, -75.41) in Allowed region
Residue [A 80 :GLY] (67.30, -64.90) in Allowed region
Residue [A 83 :LEU] (-52.85, 171.83) in Allowed region
Residue [A 85 :ASP] (51.87,-109.94) in Allowed region
Residue [A 94 :ALA] (-77.08, 50.66) in Allowed region
Residue [A 100 :GLN] (-64.89, 41.21) in Allowed region
Residue [A 103 :ARG] (-37.89, -45.74) in Allowed region
Residue [A 104 :GLY] (61.11, -56.00) in Allowed region
Residue [A 108 :GLU] (37.65, 32.83) in Allowed region
Residue [A 111 :TYR] (72.90, 35.25) in Allowed region
Residue [A 113 :SER] (-39.16, -45.75) in Allowed region
Residue [A 135 :LEU] (175.60, 152.20) in Allowed region
Residue [A 138 :PRO] (-82.55, -41.22) in Allowed region
Residue [A 141 :PHE] (-63.68, 88.54) in Allowed region
Residue [A 145 :HIS] (-143.45, -84.41) in Allowed region
Residue [A 146 :SER] (-155.39,-164.45) in Allowed region
Residue [A 156 :CYS] (-127.16, 56.74) in Allowed region
Residue [A 164 :GLU] (-67.60, 40.67) in Allowed region
Residue [A 169 :ALA] (-62.24, 93.79) in Allowed region
Residue [A 170 :HIS] (-131.73, 71.51) in Allowed region
Residue [A 171 :MET] (-48.32, 155.38) in Allowed region
Residue [A 187 :SER] (-56.82, 163.15) in Allowed region
Residue [A 190 :ASN] (-47.24, 102.58) in Allowed region
Residue [A 191 :CYS] (-156.84, 109.25) in Allowed region
Residue [A 206 :VAL] (-44.06, 143.84) in Allowed region
Residue [A 211 :THR] (-160.60, 104.87) in Allowed region
Residue [A 215 :LEU] (68.74, -45.26) in Allowed region
Residue [A 217 :ARG] (-158.00, 30.93) in Allowed region
Residue [A 218 :LYS] (-41.61, 118.33) in Allowed region
Residue [A 228 :GLY] (65.20, -95.35) in Allowed region
Residue [A 244 :VAL] (-39.07, -39.65) in Allowed region
Residue [A 253 :GLU] (-68.63, -73.11) in Allowed region

Residue [A 255 :LEU] (-106.41, 46.82) in Allowed region
Residue [A 263 :LEU] (-64.31, -71.87) in Allowed region
Residue [A 273 :ALA] (-133.70,-133.88) in Allowed region
Residue [A 275 :ILE] (-33.52, -51.48) in Allowed region
Residue [A 319 :ILE] (-136.01, 70.47) in Allowed region
Residue [A 323 :THR] (54.39, -57.75) in Allowed region
Residue [A 325 :GLY] (66.93, -48.75) in Allowed region
Residue [A 327 :ASP] (-65.23, 94.66) in Allowed region
Residue [A 332 :ARG] (-41.80, 147.08) in Allowed region
Residue [A 393 :ASP] (-39.64, -46.02) in Allowed region
Residue [A 402 :ASP] (-71.64, -66.62) in Allowed region
Residue [A 409 :ARG] (-39.50, 141.56) in Allowed region
Residue [A 8 :THR] (-8.28, -53.34) in Outlier region
Residue [A 15 :ASN] (54.47, -20.04) in Outlier region
Residue [A 24 :GLN] (64.13, -96.09) in Outlier region
Residue [A 25 :PRO] (24.89, -4.26) in Outlier region
Residue [A 42 :PRO] (-48.49, 98.08) in Outlier region
Residue [A 43 :GLU] (136.94, 150.24) in Outlier region
Residue [A 54 :HIS] (-169.64, -44.08) in Outlier region
Residue [A 67 :GLU] (45.25,-169.53) in Outlier region
Residue [A 78 :ASP] (46.26, -55.65) in Outlier region
Residue [A 79 :ARG] (-47.22, -88.88) in Outlier region
Residue [A 84 :PRO] (-31.92, 172.97) in Outlier region
Residue [A 98 :GLU] (50.56, 162.77) in Outlier region
Residue [A 105 :ILE] (108.50, -8.01) in Outlier region
Residue [A 106 :SER] (-54.48, 87.32) in Outlier region
Residue [A 112 :SER] (-55.52, 39.06) in Outlier region
Residue [A 136 :PRO] (-58.70, 16.83) in Outlier region
Residue [A 137 :SER] (-23.59, 91.80) in Outlier region
Residue [A 143 :ILE] (132.64, 116.00) in Outlier region
Residue [A 148 :ALA] (126.27, -78.40) in Outlier region
Residue [A 165 :GLU] (41.55, -47.28) in Outlier region
Residue [A 172 :ASN] (-138.24, 25.71) in Outlier region
Residue [A 173 :PRO] (38.77,-178.35) in Outlier region
Residue [A 180 :LYS] (-52.49,-175.61) in Outlier region
Residue [A 229 :THR] (39.32, 87.99) in Outlier region
Residue [A 243 :ASP] (54.21, 106.31) in Outlier region
Residue [A 256 :THR] (63.50, 133.93) in Outlier region
Residue [A 258 :GLU] (146.44, 177.55) in Outlier region
Residue [A 259 :LYS] (-61.86, 14.64) in Outlier region
Residue [A 262 :LYS] (-30.19, 140.45) in Outlier region
Residue [A 271 :ASN] (106.85, 62.11) in Outlier region
Residue [A 274 :GLY] (28.02, -80.21) in Outlier region
Residue [A 316 :PRO] (-62.51, 23.46) in Outlier region
Residue [A 324 :CYS] (47.92, 174.42) in Outlier region



Anexo 7. La expresión de CLIC5 no se observa afectada durante la EMT parcial en la línea celular HepG2. A) Imagen representativa de tinción con faloidina (F-actina) de las células HepG2 estimuladas a diferentes tiempos con la citocina TGF-β; se observa cambio de la distribución cortical hacia la formación de fibras de estrés desde las 24 h. B) Imagen representativa de western blot donde se evalúan los marcadores de la EMT: E-cadherina y Vimentina respectivamente; a la par de realizar la evaluación de CLIC5 en diferentes tiempos: 24, 48, 72, 96 h y 10 d (n=4).

BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., *Molecular biology of the cell. Cancer*. Garland Science, 2008: p. 5.
2. UK, C.R., *What is cancer? How cancers grow*. 2017.
3. WHO, O., *The top 10 causes of death*. Media centre, 2015.
4. Akhtar, N. and J.G. Bansal, *Risk factors of Lung Cancer in nonsmoker*. *Curr Probl Cancer*, 2017. **41**(5): p. 328-339.
5. Hughes, L.A.E., et al., *Lifestyle, Diet, and Colorectal Cancer Risk According to (Epi)genetic Instability: Current Evidence and Future Directions of Molecular Pathological Epidemiology*. *Curr Colorectal Cancer Rep*, 2017. **13**(6): p. 455-469.
6. Jirik, V., et al., *Air Pollution and Potential Health Risk in Ostrava Region - a Review*. *Cent Eur J Public Health*, 2016. **24 Suppl**: p. S4-S17.
7. Santibanez-Andrade, M., et al., *Air pollution and genomic instability: The role of particulate matter in lung carcinogenesis*. *Environ Pollut*, 2017. **229**: p. 412-422.
8. Rodgers, K.M., et al., *Environmental chemicals and breast cancer: An updated review of epidemiological literature informed by biological mechanisms*. *Environ Res*, 2018. **160**: p. 152-182.
9. WHO, O., *Cancer. Reducing the cancer burden*. 2017.
10. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
11. GLOBOCAN, 2012.
12. NIH, C.I., *Steps to Find a Clinical Trial*. June 2016.
13. Steeg, P.S. and D. Theodorescu, *Metastasis: a therapeutic target for cancer*. *Nat Clin Pract Oncol*, 2008. **5**(4): p. 206-19.
14. Steeg, P.S., *Targeting metastasis*. *Nat Rev Cancer*, 2016. **16**(4): p. 201-18.
15. Leber, M.F. and T. Efferth, *Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review)*. *Int J Oncol*, 2009. **34**(4): p. 881-95.
16. Keller, E.T., *Overview of metastasis and metastases*. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2002. **2**(6): p. 567-9.

17. Wu, J.S., et al., *The role of tumor microenvironment in collective tumor cell invasion*. Future Oncol, 2017. **13**(11): p. 991-1002.
18. Gaggioli, C., et al., *Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(12): p. 1392-400.
19. Hallou, A., J. Jennings, and A.J. Kabla, *Tumour heterogeneity promotes collective invasion and cancer metastatic dissemination*. R Soc Open Sci, 2017. **4**(8): p. 161007.
20. Khalil, A.A. and P. Friedl, *Determinants of leader cells in collective cell migration*. Integr Biol (Camb), 2010. **2**(11-12): p. 568-74.
21. Clark, A.G. and D.M. Vignjevic, *Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment*. Curr Opin Cell Biol, 2015. **36**: p. 13-22.
22. Pandya, P., J.L. Orgaz, and V. Sanz-Moreno, *Modes of invasion during tumour dissemination*. Mol Oncol, 2017. **11**(1): p. 5-27.
23. Wolf, K., et al., *Amoeboid shape change and contact guidance: T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases*. Blood, 2003. **102**(9): p. 3262-9.
24. Acloque, H., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1438-49.
25. Friedl, P. and K. Wolf, *Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model*. J Cell Biol, 2010. **188**(1): p. 11-9.
26. Friedl, P. and S. Alexander, *Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity*. Cell, 2011. **147**(5): p. 992-1009.
27. Krakhmal, N.V., et al., *Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms*. Acta Naturae, 2015. **7**(2): p. 17-28.
28. Gandalovicova, A., et al., *Cell polarity signaling in the plasticity of cancer cell invasiveness*. Oncotarget, 2016. **7**(18): p. 25022-49.
29. Brabek, J., et al., *The role of the tissue microenvironment in the regulation of cancer cell motility and invasion*. Cell Commun Signal, 2010. **8**: p. 22.

30. Acloque, H., J.P. Thiery, and M.A. Nieto, *The physiology and pathology of the EMT. Meeting on the epithelial-mesenchymal transition*. EMBO Rep, 2008. **9**(4): p. 322-6.
31. Thiery, J.P., [*Epithelial-mesenchymal transitions in cancer onset and progression*]. Bull Acad Natl Med, 2009. **193**(9): p. 1969-78; discussion 1978-9.
32. Ishikawa, Y., Y. Kato, and T. Kitagawa, *Problems in histological diagnosis of cancer associated with chemo- and/or radiotherapy*. J Cancer Res Clin Oncol, 1999. **125**(3-4): p. 239-44.
33. Mussi, C., et al., *The prognostic impact of dedifferentiation in retroperitoneal liposarcoma: a series of surgically treated patients at a single institution*. Cancer, 2008. **113**(7): p. 1657-65.
34. Park, W.Y., et al., *Three cases of adrenocortical tumors mistaken for hepatocellular carcinomas/diagnostic pitfalls and differential diagnosis*. Ann Diagn Pathol, 2017. **31**: p. 9-13.
35. Wallesch, M., et al., *Altered expression of E-Cadherin-related transcription factors indicates partial epithelial-mesenchymal transition in aggressive meningiomas*. J Neurol Sci, 2017. **380**: p. 112-121.
36. Venugopal, J., et al., *Ouabain promotes partial epithelial to mesenchymal transition (EMT) changes in human autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) cells*. Exp Cell Res, 2017. **355**(2): p. 142-152.
37. Malfettone, A., et al., *Transforming growth factor-beta-induced plasticity causes a migratory stemness phenotype in hepatocellular carcinoma*. Cancer Lett, 2017. **392**: p. 39-50.
38. Zhou, W., et al., *The lncRNA H19 mediates breast cancer cell plasticity during EMT and MET plasticity by differentially sponging miR-200b/c and let-7b*. Sci Signal, 2017. **10**(483).
39. Tang, H., et al., *AKT-ions with a TWIST between EMT and MET*. Oncotarget, 2016. **7**(38): p. 62767-62777.
40. Cicchini, C., et al., *Epigenetic control of EMT/MET dynamics: HNF4alpha impacts DNMT3s through miRs-29*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1849**(8): p. 919-29.

41. Barcellos-Hoff, M.H. and R.J. Akhurst, *Transforming growth factor-beta in breast cancer: too much, too late*. Breast Cancer Res, 2009. **11**(1): p. 202.
42. Ansieau, S., et al., *Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence*. Cancer Cell, 2008. **14**(1): p. 79-89.
43. Gal, A., et al., *Sustained TGF beta exposure suppresses Smad and non-Smad signalling in mammary epithelial cells, leading to EMT and inhibition of growth arrest and apoptosis*. Oncogene, 2008. **27**(9): p. 1218-30.
44. Liu, Y., et al., *Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence*. Development, 2008. **135**(3): p. 579-88.
45. Knutson, K.L., et al., *Immunoediting of cancers may lead to epithelial to mesenchymal transition*. J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1526-33.
46. Allan, D.S., et al., *TGF-beta affects development and differentiation of human natural killer cell subsets*. Eur J Immunol, 2010. **40**(8): p. 2289-95.
47. Kudo-Saito, C., et al., *Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells*. Cancer Cell, 2009. **15**(3): p. 195-206.
48. Diepenbruck, M. and G. Christofori, *Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe?* Curr Opin Cell Biol, 2016. **43**: p. 7-13.
49. Jolly, M.K., et al., *EMT and MET: necessary or permissive for metastasis?* Mol Oncol, 2017. **11**(7): p. 755-769.
50. Yang, F., et al., *Downregulated expression of hepatoma-derived growth factor inhibits migration and invasion of prostate cancer cells by suppressing epithelial-mesenchymal transition and MMP2, MMP9*. PLoS One, 2018. **13**(1): p. e0190725.
51. Wellner, U., et al., *The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(12): p. 1487-95.
52. Morel, A.P., et al., *Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition*. PLoS One, 2008. **3**(8): p. e2888.

53. Kong, D., et al., *Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins?* *Cancers* (Basel), 2011. **3**(1): p. 716-29.
54. Pirozzi, G., et al., *Epithelial to mesenchymal transition by TGFbeta-1 induction increases stemness characteristics in primary non small cell lung cancer cell line.* *PLoS One*, 2011. **6**(6): p. e21548.
55. Vos, M.C., et al., *MMP-14 and CD44 in Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) in ovarian cancer.* *J Ovarian Res*, 2016. **9**(1): p. 53.
56. Schizas, D., et al., *The Prognostic Value of CD44 Expression in Epithelial-Mesenchymal Transition: Preliminary Data from Patients with Gastric and Esophageal Cancer.* *In Vivo*, 2016. **30**(6): p. 939-944.
57. Liu, F., et al., *TGF-beta1 acts through miR-155 to down-regulate TP53INP1 in promoting epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes.* *Cancer Lett*, 2015. **359**(2): p. 288-98.
58. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease.* *Cell*, 2009. **139**(5): p. 871-90.
59. Singh, A. and J. Settleman, *EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer.* *Oncogene*, 2010. **29**(34): p. 4741-51.
60. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition.* *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(3): p. 178-96.
61. Bendris, N., et al., *Cyclin A2, Rho GTPases and EMT.* *Small GTPases*, 2012. **3**(4): p. 225-8.
62. Radisky, D.C., et al., *Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability.* *Nature*, 2005. **436**(7047): p. 123-7.
63. Mongroo, P.S. and A.K. Rustgi, *The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition.* *Cancer Biol Ther*, 2010. **10**(3): p. 219-22.
64. Illman, S.A., et al., *Epilysin (MMP-28) induces TGF-beta mediated epithelial to mesenchymal transition in lung carcinoma cells.* *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 18): p. 3856-65.
65. Shtutman, M., et al., *Cell adhesion molecule L1 disrupts E-cadherin-containing adherens junctions and increases scattering and motility of MCF7 breast carcinoma cells.* *Cancer Res*, 2006. **66**(23): p. 11370-80.

66. Xie, G., et al., *IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the generation of breast cancer stem-like cells analogous to mammosphere cultures*. Int J Oncol, 2012. **40**(4): p. 1171-9.
67. Wicki, A., et al., *Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton*. Cancer Cell, 2006. **9**(4): p. 261-72.
68. Xu, Q., et al., *EGF induces epithelial-mesenchymal transition and cancer stem-like cell properties in human oral cancer cells via promoting Warburg effect*. Oncotarget, 2017. **8**(6): p. 9557-9571.
69. Wakefield, L.M. and C.S. Hill, *Beyond TGFbeta: roles of other TGFbeta superfamily members in cancer*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(5): p. 328-41.
70. Wendt, M.K., T.M. Allington, and W.P. Schiemann, *Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by TGF-beta*. Future Oncol, 2009. **5**(8): p. 1145-68.
71. Stockis, J., O. Dedobbeleer, and S. Lucas, *Role of GARP in the activation of latent TGF-beta1*. Mol Biosyst, 2017. **13**(10): p. 1925-1935.
72. Katz, L.H., et al., *Targeting TGF-beta signaling in cancer*. Expert Opin Ther Targets, 2013. **17**(7): p. 743-60.
73. Nickel, J., P. Ten Dijke, and T.D. Mueller, *TGF-beta family co-receptor function and signaling*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2017.
74. Park, N.R., et al., *Synergistic effects of CD44 and TGF-beta1 through AKT/GSK-3beta/beta-catenin signaling during epithelial-mesenchymal transition in liver cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. **477**(4): p. 568-574.
75. Principe, D.R., et al., *TGFbeta engages MEK/ERK to differentially regulate benign and malignant pancreas cell function*. Oncogene, 2017. **36**(30): p. 4336-4348.
76. Hedrick, E. and S. Safe, *Transforming Growth Factor beta/NR4A1-Inducible Breast Cancer Cell Migration and Epithelial-to-Mesenchymal Transition Is p38alpha (Mitogen-Activated Protein Kinase 14) Dependent*. Mol Cell Biol, 2017. **37**(18).

77. Melzer, C., et al., *The role of TGF-beta and its crosstalk with RAC1/RAC1b signaling in breast and pancreas carcinoma*. Cell Commun Signal, 2017. **15**(1): p. 19.
78. Reichl, P., et al., *Axl activates autocrine transforming growth factor-beta signaling in hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2015. **61**(3): p. 930-41.
79. Tan, W.J., et al., *Calpain 1 regulates TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in human lung epithelial cells via PI3K/Akt signaling pathway*. Am J Transl Res, 2017. **9**(3): p. 1402-1409.
80. Neuzillet, C., et al., *Targeting the TGFbeta pathway for cancer therapy*. Pharmacol Ther, 2015. **147**: p. 22-31.
81. Kamato, D., et al., *Transforming growth factor-beta signalling: role and consequences of Smad linker region phosphorylation*. Cell Signal, 2013. **25**(10): p. 2017-24.
82. Colak, S. and P. Ten Dijke, *Targeting TGF-beta Signaling in Cancer*. Trends Cancer, 2017. **3**(1): p. 56-71.
83. Iliopoulos, D., et al., *Loss of miR-200 inhibition of Suz12 leads to polycomb-mediated repression required for the formation and maintenance of cancer stem cells*. Mol Cell, 2010. **39**(5): p. 761-72.
84. Masood, N. and A. Yasmin, *Entangling Relation of Micro RNA-let7, miRNA-200 and miRNA-125 with Various Cancers*. Pathol Oncol Res, 2017. **23**(4): p. 707-715.
85. Chivukula, R.R. and J.T. Mendell, *Abate and switch: miR-145 in stem cell differentiation*. Cell, 2009. **137**(4): p. 606-8.
86. Huang, J.S., et al., *Diverse cellular transformation capability of overexpressed genes in human hepatocellular carcinoma*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **315**(4): p. 950-8.
87. Megger, D.A., et al., *Proteomic differences between hepatocellular carcinoma and nontumorous liver tissue investigated by a combined gel-based and label-free quantitative proteomics study*. Mol Cell Proteomics, 2013. **12**(7): p. 2006-20.
88. Xie, Y., *Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma*. Adv Exp Med Biol, 2017. **1018**: p. 11-21.

89. Tayob, N., et al., *Evaluating screening approaches for hepatocellular carcinoma in a cohort of HCV related cirrhosis patients from the Veteran's Affairs Health Care System*. BMC Med Res Methodol, 2018. **18**(1): p. 1.
90. Said, A. and A. Ghufuran, *Epidemic of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma*. World J Clin Oncol, 2017. **8**(6): p. 429-436.
91. Gravitz, L., *Liver cancer*. Nature, 2014. **516**(7529): p. S1.
92. Castelli, G., E. Pelosi, and U. Testa, *Liver Cancer: Molecular Characterization, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells*. Cancers (Basel), 2017. **9**(9).
93. Jou, J. and A.M. Diehl, *Epithelial-mesenchymal transitions and hepatocarcinogenesis*. J Clin Invest, 2010. **120**(4): p. 1031-4.
94. van Zijl, F., et al., *Epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma*. Future Oncol, 2009. **5**(8): p. 1169-79.
95. Su, T.H., et al., *Sorafenib and its derivative SC-1 exhibit antifibrotic effects through signal transducer and activator of transcription 3 inhibition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(23): p. 7243-8.
96. Gu, F.M., et al., *Sorafenib inhibits growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by blocking STAT3*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(34): p. 3922-32.
97. Maheswaran, T. and S.M. Rushbrook, *Epithelial-mesenchymal transition and the liver: role in hepatocellular carcinoma and liver fibrosis*. J Gastroenterol Hepatol, 2012. **27**(3): p. 418-20.
98. Xie, G. and A.M. Diehl, *Evidence for and against epithelial-to-mesenchymal transition in the liver*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2013. **305**(12): p. G881-90.
99. Tang, H.Y., et al., *A xenograft mouse model coupled with in-depth plasma proteome analysis facilitates identification of novel serum biomarkers for human ovarian cancer*. J Proteome Res, 2012. **11**(2): p. 678-91.
100. Zhou, S.L., et al., *CXCR2/CXCL5 axis contributes to epithelial-mesenchymal transition of HCC cells through activating PI3K/Akt/GSK-3beta/Snail signaling*. Cancer Lett, 2015. **358**(2): p. 124-35.
101. Zhou, Z.J., et al., *HNRNPAB induces epithelial-mesenchymal transition and promotes metastasis of hepatocellular carcinoma by transcriptionally activating SNAIL*. Cancer Res, 2014. **74**(10): p. 2750-62.

102. van Zijl, F., et al., *Hepatic tumor-stroma crosstalk guides epithelial to mesenchymal transition at the tumor edge*. *Oncogene*, 2009. **28**(45): p. 4022-33.
103. Crosas-Molist, E., et al., *The NADPH oxidase NOX4 inhibits hepatocyte proliferation and liver cancer progression*. *Free Radic Biol Med*, 2014. **69**: p. 338-47.
104. Caja, L., et al., *Overactivation of the MEK/ERK pathway in liver tumor cells confers resistance to TGF- β -induced cell death through impairing up-regulation of the NADPH oxidase NOX4*. *Cancer Res*, 2009. **69**(19): p. 7595-602.
105. Caja, L., et al., *Dissecting the effect of targeting the epidermal growth factor receptor on TGF- β -induced-apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells*. *J Hepatol*, 2011. **55**(2): p. 351-8.
106. Gotzmann, J., et al., *Hepatocytes convert to a fibroblastoid phenotype through the cooperation of TGF- β 1 and Ha-Ras: steps towards invasiveness*. *J Cell Sci*, 2002. **115**(Pt 6): p. 1189-202.
107. Kaimori, A., et al., *Transforming growth factor- β 1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(30): p. 22089-101.
108. Coulouarn, C., V.M. Factor, and S.S. Thorgeirsson, *Transforming growth factor- β gene expression signature in mouse hepatocytes predicts clinical outcome in human cancer*. *Hepatology*, 2008. **47**(6): p. 2059-67.
109. Redhead, C.R., et al., *A ubiquitous 64-kDa protein is a component of a chloride channel of plasma and intracellular membranes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(9): p. 3716-20.
110. Suh, K.S., et al., *CLIC4, an intracellular chloride channel protein, is a novel molecular target for cancer therapy*. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2005. **10**(2): p. 105-9.
111. Sasaki, S., N. Yui, and Y. Noda, *Actin directly interacts with different membrane channel proteins and influences channel activities: AQP2 as a model*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1838**(2): p. 514-20.
112. Singh, H., M.A. Cousin, and R.H. Ashley, *Functional reconstitution of mammalian 'chloride intracellular channels' CLIC1, CLIC4 and CLIC5 reveals differential regulation by cytoskeletal actin*. *FEBS J*, 2007. **274**(24): p. 6306-16.

113. Board, P.G., et al., *CLIC-2 modulates cardiac ryanodine receptor Ca²⁺ release channels*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(8): p. 1599-612.
114. Friedli, M., et al., *Identification of a novel member of the CLIC family, CLIC6, mapping to 21q22.12*. Gene, 2003. **320**: p. 31-40.
115. Griffon, N., et al., *CLIC6, a member of the intracellular chloride channel family, interacts with dopamine D(2)-like receptors*. Brain Res Mol Brain Res, 2003. **117**(1): p. 47-57.
116. Edwards, J.C. and C.R. Kahl, *Chloride channels of intracellular membranes*. FEBS Lett, 2010. **584**(10): p. 2102-11.
117. Leanza, L., et al., *Intracellular ion channels and cancer*. Front Physiol, 2013. **4**: p. 227.
118. Suh, K.S. and S.H. Yuspa, *Intracellular chloride channels: critical mediators of cell viability and potential targets for cancer therapy*. Curr Pharm Des, 2005. **11**(21): p. 2753-64.
119. Ma, P.F., et al., *Function of chloride intracellular channel 1 in gastric cancer cells*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(24): p. 3070-80.
120. Petrova, D.T., et al., *Expression of chloride intracellular channel protein 1 (CLIC1) and tumor protein D52 (TPD52) as potential biomarkers for colorectal cancer*. Clin Biochem, 2008. **41**(14-15): p. 1224-36.
121. Chang, Y.H., et al., *Cell secretome analysis using hollow fiber culture system leads to the discovery of CLIC1 protein as a novel plasma marker for nasopharyngeal carcinoma*. J Proteome Res, 2009. **8**(12): p. 5465-74.
122. Wang, W., et al., *The expression and clinical significance of CLIC1 and HSP27 in lung adenocarcinoma*. Tumour Biol, 2011. **32**(6): p. 1199-208.
123. Tang, H.Y., et al., *Protein isoform-specific validation defines multiple chloride intracellular channel and tropomyosin isoforms as serological biomarkers of ovarian cancer*. J Proteomics, 2013. **89**: p. 165-78.
124. Ye, Y., et al., *CLIC1 a novel biomarker of intraperitoneal metastasis in serous epithelial ovarian cancer*. Tumour Biol, 2015. **36**(6): p. 4175-9.
125. Lomnytska, M.I., et al., *Impact of genomic stability on protein expression in endometrioid endometrial cancer*. Br J Cancer, 2012. **106**(7): p. 1297-305.

126. Wang, L., et al., *Elevated expression of chloride intracellular channel 1 is correlated with poor prognosis in human gliomas.* J Exp Clin Cancer Res, 2012. **31**: p. 44.
127. Setti, M., et al., *Extracellular vesicle-mediated transfer of CLIC1 protein is a novel mechanism for the regulation of glioblastoma growth.* Oncotarget, 2015. **6**(31): p. 31413-27.
128. Ding, Q., et al., *CLIC1 overexpression is associated with poor prognosis in gallbladder cancer.* Tumour Biol, 2015. **36**(1): p. 193-8.
129. Lu, J., et al., *Chloride intracellular channel 1 (CLIC1) is activated and functions as an oncogene in pancreatic cancer.* Med Oncol, 2015. **32**(6): p. 616.
130. Dehghan-Nayeri, N., et al., *Differential expression pattern of protein markers for predicting chemosensitivity of dexamethasone-based chemotherapy of B cell acute lymphoblastic leukemia.* Cancer Chemother Pharmacol, 2017. **80**(1): p. 177-185.
131. Li, R.K., et al., *[Effects of silencing chloride intracellular channel 1 gene expression on the proliferation and invasion of mouse hepatocellular carcinoma cell lines].* Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2010. **18**(2): p. 131-5.
132. Zhang, J., et al., *Clic1 plays a role in mouse hepatocarcinoma via modulating Annexin A7 and Gelsolin in vitro and in vivo.* Biomed Pharmacother, 2015. **69**: p. 416-9.
133. Wei, X., et al., *Chloride intracellular channel 1 participates in migration and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting maspin.* J Gastroenterol Hepatol, 2015. **30**(1): p. 208-16.
134. Song, M.Y., et al., *[Localization and expression of CLIC1 in hepatocarcinoma ascites cell lines with high or low potentials of lymphatic spread].* Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi, 2010. **39**(7): p. 463-6.
135. Li, R.K., et al., *Chloride intracellular channel 1 is an important factor in the lymphatic metastasis of hepatocarcinoma.* Biomed Pharmacother, 2012. **66**(3): p. 167-72.
136. Zhang, S., et al., *Chloride intracellular channel 1 is overexpression in hepatic tumor and correlates with a poor prognosis.* APMIS, 2013. **121**(11): p. 1047-53.

137. Dozynkiewicz, M.A., et al., *Rab25 and CLIC3 collaborate to promote integrin recycling from late endosomes/lysosomes and drive cancer progression*. Dev Cell, 2012. **22**(1): p. 131-45.
138. Seyhan, A.A., et al., *A genome-wide RNAi screen identifies novel targets of neratinib resistance leading to identification of potential drug resistant genetic markers*. Mol Biosyst, 2012. **8**(5): p. 1553-70.
139. Macpherson, I.R., et al., *CLIC3 controls recycling of late endosomal MT1-MMP and dictates invasion and metastasis in breast cancer*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 18): p. 3893-901.
140. Hernandez-Fernaud, J.R., et al., *Secreted CLIC3 drives cancer progression through its glutathione-dependent oxidoreductase activity*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14206.
141. Shukla, A., et al., *Elevating CLIC4 in Multiple Cell Types Reveals a TGF-Dependent Induction of a Dominant Negative Smad7 Splice Variant*. PLoS One, 2016. **11**(8): p. e0161410.
142. Kenny, T.C., et al., *Patient-derived Interstitial Fluids and Predisposition to Aggressive Sporadic Breast Cancer through Collagen Remodeling and Inactivation of p53*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(18): p. 5446-5459.
143. Okudela, K., et al., *Proteome analysis for downstream targets of oncogenic KRAS-the potential participation of CLIC4 in carcinogenesis in the lung*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e87193.
144. Yao, Q., et al., *CLIC4 mediates TGF-beta1-induced fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation in ovarian cancer*. Oncol Rep, 2009. **22**(3): p. 541-8.
145. Zou, Q., et al., *Association of chloride intracellular channel 4 and Indian hedgehog proteins with survival of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma*. Int J Exp Pathol, 2016. **97**(6): p. 422-429.
146. Xue, H., et al., *Knockdown of CLIC4 enhances ATP-induced HN4 cell apoptosis through mitochondrial and endoplasmic reticulum pathways*. Cell Biosci, 2016. **6**: p. 5.
147. Deng, Y.J., et al., *CLIC4, ERp29, and Smac/DIABLO derived from metastatic cancer stem-like cells stratify prognostic risks of colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(14): p. 3809-17.

148. Ronnov-Jessen, L., et al., *Differential expression of a chloride intracellular channel gene, CLIC4, in transforming growth factor-beta1-mediated conversion of fibroblasts to myofibroblasts.* Am J Pathol, 2002. **161**(2): p. 471-80.
149. Suh, K.S., et al., *CLIC4 is a tumor suppressor for cutaneous squamous cell cancer.* Carcinogenesis, 2012. **33**(5): p. 986-95.
150. Fernandez-Salas, E., et al., *mtCLIC/CLIC4, an organellar chloride channel protein, is increased by DNA damage and participates in the apoptotic response to p53.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(11): p. 3610-20.
151. Yu, Q.Y., et al., *SiRNA-Mediated Down-Regulation of CLIC4 Gene Inhibits Cell Proliferation and Accelerates Cell Apoptosis of Mouse Liver Cancer Hca-F and Hca-P Cells.* J Cell Biochem, 2017.
152. Berryman, M. and A. Bretscher, *Identification of a novel member of the chloride intracellular channel gene family (CLIC5) that associates with the actin cytoskeleton of placental microvilli.* Mol Biol Cell, 2000. **11**(5): p. 1509-21.
153. Wegner, B., et al., *CLIC5A, a component of the ezrin-podocalyxin complex in glomeruli, is a determinant of podocyte integrity.* Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **298**(6): p. F1492-503.
154. Pierchala, B.A., M.R. Munoz, and C.C. Tsui, *Proteomic analysis of the slit diaphragm complex: CLIC5 is a protein critical for podocyte morphology and function.* Kidney Int, 2010. **78**(9): p. 868-82.
155. Edwards, J.C., *What's a CLIC doing in the podocyte?* Kidney Int, 2010. **78**(9): p. 831-3.
156. Matsui, T., et al., *Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association.* J Cell Biol, 1998. **140**(3): p. 647-57.
157. Fouassier, L., et al., *Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein (EBP50), an estrogen-inducible scaffold protein, contributes to biliary epithelial cell proliferation.* Am J Pathol, 2009. **174**(3): p. 869-80.
158. Mrozowska, P.S. and M. Fukuda, *Regulation of podocalyxin trafficking by Rab small GTPases in 2D and 3D epithelial cell cultures.* J Cell Biol, 2016. **213**(3): p. 355-69.

159. Toyoda, H., et al., *Podocalyxin as a major pluripotent marker and novel keratan sulfate proteoglycan in human embryonic and induced pluripotent stem cells*. Glycoconj J, 2017. **34**(6): p. 817-823.
160. Meng, X., P. Ezzati, and J.A. Wilkins, *Requirement of podocalyxin in TGF-beta induced epithelial mesenchymal transition*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18715.
161. Taniuchi, K., et al., *Podocalyxin-like protein, linked to poor prognosis of pancreatic cancers, promotes cell invasion by binding to gelsolin*. Cancer Sci, 2016. **107**(10): p. 1430-1442.
162. Huang, L., et al., *Ezrin mediates both HGF/Met autocrine and non-autocrine signaling-induced metastasis in melanoma*. Int J Cancer, 2017.
163. Al-Momany, A., et al., *Clustered PI(4,5)P(2) accumulation and ezrin phosphorylation in response to CLIC5A*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 24): p. 5164-78.
164. Salles, F.T., et al., *CLIC5 stabilizes membrane-actin filament linkages at the base of hair cell stereocilia in a molecular complex with radixin, taperin, and myosin VI*. Cytoskeleton (Hoboken), 2014. **71**(1): p. 61-78.
165. Gagnon, L.H., et al., *The chloride intracellular channel protein CLIC5 is expressed at high levels in hair cell stereocilia and is essential for normal inner ear function*. J Neurosci, 2006. **26**(40): p. 10188-98.
166. Edwards, J.C., et al., *c-Src control of chloride channel support for osteoclast HCl transport and bone resorption*. J Biol Chem, 2006. **281**(38): p. 28011-22.
167. Li, F.N., et al., *Chloride intracellular channel 5 modulates adipocyte accumulation in skeletal muscle by inhibiting preadipocyte differentiation*. J Cell Biochem, 2010. **110**(4): p. 1013-21.
168. Li, F., et al., *The CLIC5 (chloride intracellular channel 5) involved in C2C12 myoblasts proliferation and differentiation*. Cell Biol Int, 2010. **34**(4): p. 379-84.
169. Bradford, E.M., et al., *CLIC5 mutant mice are resistant to diet-induced obesity and exhibit gastric hemorrhaging and increased susceptibility to torpor*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010. **298**(6): p. R1531-42.
170. Shanks, R.A., et al., *AKAP350 at the Golgi apparatus. II. Association of AKAP350 with a novel chloride intracellular channel (CLIC) family member*. J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 40973-80.

171. Ponnalagu, D., et al., *Molecular identity of cardiac mitochondrial chloride intracellular channel proteins*. *Mitochondrion*, 2016. **27**: p. 6-14.
172. Yau, C., et al., *An optimized five-gene multi-platform predictor of hormone receptor negative and triple negative breast cancer metastatic risk*. *Breast Cancer Res*, 2013. **15**(5): p. R103.
173. Supiot, S., et al., *Early dynamic transcriptomic changes during preoperative radiotherapy in patients with rectal cancer: a feasibility study*. *World J Gastroenterol*, 2013. **19**(21): p. 3249-54.
174. Torres-Mena J.E., S.-R., R., del Pozo-Yauner L., Villa-Treviño S., Pérez-Carreón J.I., *Liver cancer progression from dysplasia to neoplasia revealed by transcriptome analysis: Rearrangement of actin cytoskeleton as an early event*. EMBO Presentation, 2010.
175. J.E., T.-M., *Los perfiles de expresión genética contribuyen a la identificación de las lesiones nodulares con potencial preneoplásico en la hepatocarcinogénesis experimental*. 2016: p. 117.
176. T.N.J., F.-T., *Expresión de Ezr, CLIC5 y Podxl en la etapa de progresión del modelo modificado del hepatocito resistente*. Tesis Maestría, 2013: p. 66.
177. Mynott, A.V., et al., *Crystal structure of importin-alpha bound to a peptide bearing the nuclear localisation signal from chloride intracellular channel protein 4*. *FEBS J*, 2011. **278**(10): p. 1662-75.
178. Neveu, B., et al., *CLIC5: a novel ETV6 target gene in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Haematologica*, 2016. **101**(12): p. 1534-1543.
179. Domingo-Fernandez, R., et al., *The intracellular chloride channel proteins CLIC1 and CLIC4 induce IL-1beta transcription and activate the NLRP3 inflammasome*. *J Biol Chem*, 2017. **292**(29): p. 12077-12087.
180. Shukla, A., et al., *TGF-beta signalling is regulated by Schnurri-2-dependent nuclear translocation of CLIC4 and consequent stabilization of phospho-Smad2 and 3*. *Nat Cell Biol*, 2009. **11**(6): p. 777-84.
181. Shukla, A. and S.H. Yuspa, *CLIC4 and Schnurri-2: a dynamic duo in TGF-beta signaling with broader implications in cellular homeostasis and disease*. *Nucleus*, 2010. **1**(2): p. 144-9.

182. Malik, M., et al., *S-nitrosylation regulates nuclear translocation of chloride intracellular channel protein CLIC4*. J Biol Chem, 2010. **285**(31): p. 23818-28.
183. Malik, M., et al., *Inducible NOS-induced chloride intracellular channel 4 (CLIC4) nuclear translocation regulates macrophage deactivation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(16): p. 6130-5.
184. Qian, Z., et al., *Molecular cloning and characterization of a mitogen-activated protein kinase-associated intracellular chloride channel*. J Biol Chem, 1999. **274**(3): p. 1621-7.
185. Myers, K., et al., *Identification of chloride intracellular channel proteins in spermatozoa*. FEBS Lett, 2004. **566**(1-3): p. 136-40.
186. Edwards, J.C. and S. Kapadia, *Regulation of the bovine kidney microsomal chloride channel p64 by p59fyn, a Src family tyrosine kinase*. J Biol Chem, 2000. **275**(41): p. 31826-32.
187. Tavasoli, M., et al., *Both CLIC4 and CLIC5A activate ERM proteins in glomerular endothelium*. Am J Physiol Renal Physiol, 2016. **311**(5): p. F945-F957.
188. Uniprot, *CLIC5*. 2017.
189. Percipalle, P., *Co-transcriptional nuclear actin dynamics*. Nucleus, 2013. **4**(1): p. 43-52.
190. Visa, N. and P. Percipalle, *Nuclear functions of actin*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(4): p. a000620.
191. Kristo, I., et al., *Actin, actin-binding proteins, and actin-related proteins in the nucleus*. Histochem Cell Biol, 2016. **145**(4): p. 373-88.
192. Feierbach, B., et al., *Alpha-herpesvirus infection induces the formation of nuclear actin filaments*. PLoS Pathog, 2006. **2**(8): p. e85.