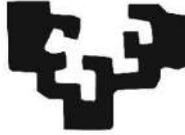


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**Caracterización celular y funcional del receptor
para colágeno DDR1 en la respuesta del
microambiente hepático al cáncer de colon
metastásico**

Irene Romayor Arredondo

Leioa, 2020

Directoras:

Beatriz Arteta Ruiz

Elvira Olaso Montero

Índice

Resumen	1
I. Introducción	5
I.1 Cáncer	7
I.1.1 Concepto	7
I.1.2 Incidencia y mortalidad	9
I.1.3 Cáncer colorrectal (CCR).....	12
I.1.3.1 Patogénesis del cáncer colorrectal (CCR)	13
I.2 Metástasis.....	16
I.2.1 Concepto	16
I.2.2 Microambiente tumoral (MAT)	19
I.2.2.1 El hígado como órgano proclive a la metástasis	20
I.2.2.1.1 Microambiente tumoral (MAT) hepático	23
I.2.2.1.1.1 Células endoteliales del sinusoides hepático (LSECs)	24
I.2.2.1.1.2 Células de Kupffer (KCs)	26
I.2.2.1.1.3 Células estrelladas hepáticas (HSCs)	28
I.2.2.1.1.4 Hepatocitos	30
I.2.2.1.1.5 Matriz extracelular (MEC) hepática.....	32
I.3 Receptores tirosina quinasa (RTKs)	34
I.3.1 Concepto	34
I.3.2 Receptores con dominio discoidina (DDR)	35
I.3.2.1 DDR1 y metástasis	39
I.3.2.1.1 DDR1 y transición epitelio-mesenquimal (TEM)	40
I.3.2.1.2 DDR1 y respuesta inflamatoria.....	41
I.3.2.1.3 DDR1, migración e invasión.....	42
I.3.2.1.4 DDR1 y proliferación.....	44
I.3.2.1.5 DDR1 y angiogénesis	45
I.3.2.1.6 DDR1 y quimiorresistencia	46
II. Hipótesis y objetivos	49
III. Materiales y métodos	53
III.1 Células primarias hepáticas	55

III.1.1 Aislamiento	55
III.1.2 Cultivo	56
III.2 Líneas celulares	57
III.2.1 Células de CCR.....	57
III.2.2 Células no tumorales	59
III.3 Extracción de ARN.....	60
III.4 Extracción de proteína	60
III.5 Obtención de secretomas	60
III.6 Tratamientos.....	61
III.6.1 Modelo <i>in vitro</i> de interacción celular sinusoide-tumor	61
III.6.1.1 Activación de las SCs con factores tumorales solubles.....	61
III.6.1.2 Activación de las células de CCR C26 con factores sinusoidales solubles	61
III.6.2 Activación de DDR1.....	62
III.6.3 Bloqueo de DDR1	62
III.6.4 Combinación de tratamientos	63
III.6.4.1 Bloqueo de DDR1 en SCs activadas por tumor (-TA)	63
III.6.4.2 Tratamiento de células C26 activadas por sinusoide (-SA).....	64
III.7 PCR	66
III.7.1 Convencional.....	66
III.7.2 Cuantitativa.....	66
III.8 Western blot	68
III.9 Inmuncitofluorescencia	71
III.10 Inmunohistoquímica	72
III.11 Zimografía	73
III.12 Ensayo de apoptosis mediante citometría de flujo	73
III.13 Viabilidad y proliferación celular	74
III.14 Migración e invasión celular	74
III.15 Transfección y silenciamiento de DDR1.....	76
III.16 Desarrollo <i>in vivo</i> de metástasis hepáticas	77

III.17 Análisis estadístico	78
IV. Capítulo 1	79
IV.1 Introducción	81
IV.2 Resultados.....	82
IV.2.1 Los cultivos primarios de SCs presentan un nivel de pureza adecuado y responden al secretoma tumoral.....	82
IV.2.2 El secretoma sinusoidal promueve las capacidades tumorales de las células de CCR C26	87
IV.2.3 Las SCs expresan DDR1 en estado basal	89
IV.2.4 El colágeno tipo I promueve la fosforilación del DDR1 en las KCs y las HSCs.....	91
IV.2.5 Las células de CCR expresan DDR1 en estado basal.....	92
IV.2.6 El colágeno tipo I promueve la fosforilación del DDR1 en las células de CCR	94
IV.2.7 El tejido humano hepático con metástasis de CCR presenta niveles de expresión de DDR1 y α -SMA mayores que el tejido sano adyacente	95
IV.3 Resumen.....	99
V. Capítulo 2	101
V.1 Introducción	103
V.2 Resultados.....	104
V.2.1 El DDR1-IN-1 bloquea la fosforilación del DDR1 en las células 3T3 y J774A.1	104
V.2.2 El DDR1-IN-1 bloquea la fosforilación del DDR1 en las KCs y HSCs en estado basal (- \emptyset), y en las LSECs y HSCs activadas por tumor (-TA).....	107
V.2.3 El DDR1-IN-1 inhibe la secreción de MMPs en las KCs y las HSCs en estado basal (- \emptyset) y activadas por tumor (-TA)	112
V.2.4 El bloqueo del DDR1 en las LSECs y las HSCs activadas por tumor (-TA) inhibe la fosforilación del DDR1 tumoral	116
V.2.5 El bloqueo del DDR1 en las LSECs activadas por tumor (-TA) y en las HSCs en estado basal (- \emptyset) inhibe la secreción de MMPs por el tumor	120
V.2.6 El bloqueo del DDR1 en las SCs en estado basal (- \emptyset) y activadas por tumor (-TA) inhibe la proliferación, migración e invasión tumoral.....	124

V.3 Resumen	128
VI. Capítulo 3	129
VI.1 Introducción.....	131
VI.2 Resultados.....	132
VI.2.1 El DDR1-IN-1 bloquea la fosforilación del DDR1 en las células de CCR HT29 a través de las vías de señalización celular PI3K/AKT y MAPK/ERK....	132
VI.2.2 El bloqueo del DDR1 reduce la adhesión, proliferación, migración e invasión <i>in vitro</i> de las células de CCR HT29	135
VI.2.3 El silenciamiento de la expresión del DDR1 reduce la invasión <i>in vitro</i> de las células de CCR C26.....	136
VI.2.4 El silenciamiento de la expresión del DDR1 reduce el desarrollo <i>in vivo</i> de metástasis hepáticas de células de CCR C26.....	140
VI.3 Resumen	142
VII. Discusión	143
VIII. Conclusiones	143
IX. Bibliografía	143

Índice de Figuras

Figura 1. Características que definen a la célula tumoral. Adaptado de Hanahan D y cols. ⁸	8
Figura 2. Datos de incidencia (I) y mortalidad (M) del cáncer a escala mundial, representados como porcentaje de casos por continente al año. Fuente: GLOBOCAN 2018 ¹¹	10
Figura 3. Evolución del CCR dividida en cinco estadios representativos de la secuencia adenoma-carcinoma. Durante el estadio 0, denominado cáncer in situ, las células tumorales se encuentran únicamente en la mucosa del colon. Los estadios I y II corresponden al desarrollo de un adenoma temprano, caracterizado por una proliferación tumoral local (del tejido muscular y otros tejidos que rodean el colon), sin afectación de los ganglios o nódulos linfáticos. En el estadio III, referido al adenoma tardío, se produce invasión ganglionar. Finalmente, en el estadio IV las células tumorales llegan al sistema circulatorio y el carcinoma se disemina o se dispersa a otros tejidos y órganos. Es decir, las células de cáncer invaden o se adhieren a estructuras anatómicas alejadas del colon, proceso definido como metástasis. Fuente: unión internacional para el control del cáncer (UICC), clasificación de tumores malignos o estadificación TNM ¹⁷	15
Figura 4. Fases de la cascada metastásica ³⁵	17
Figura 5. Lobulillo hepático. Estructura hexagonal formada por filas de hepatocitos y delimitada por tríadas portales (arteria hepática, vena porta y conducto biliar). La sangre es drenada desde la vena porta y la arteria hepática hasta los sinusoides, y de ahí a la vena centrolobulillar. En los sinusoides residen las LSECs, KCs y HSCs ⁵⁵	22
Figura 6. Cultivo primario de LSECs murinas a una confluencia del 80-90%. Tiempo de incubación de 2 horas tras el proceso de extracción. Se observan otros tipos celulares del sinusoides hepático, mayoritariamente HSCs. Las LSECs tienen morfología aplanada y triangular, y no poseen zonas citoplasmáticas refringentes (flechas negras). Imágenes representativas de microscopía óptica de contraste de fases. Barra de escala, 20 μm	24
Figura 7. Cultivo primario de KCs murinas a una confluencia del 50-60%. Tiempo de incubación de 2 horas tras el proceso de extracción. Se observan células con morfología redondeada (y alargada en algunas ocasiones), que muestran una superficie rugosa, debido a sus microvellosidades (flechas negras). Algunas también presentan prolongaciones o lamelipodios (flechas blancas). Dichas estructuras son necesarias para desempeñar su función fagocítica ⁶⁷ . Imágenes representativas de microscopía óptica de contraste de fases. Barra de escala, 20 μm	26

Figura 8. Cultivo primario de HSCs murinas a una confluencia del 80%. Tiempo de incubación de 24 horas tras el proceso de extracción. Se observan células con morfología estrellada y con multitud de vesículas refringentes en el citoplasma (flechas negras). Estas estructuras son inclusiones lipídicas, donde se almacena la vitamina A. Las HSCs contienen el 95% de los depósitos de retinoides del cuerpo ⁷⁵. Imágenes representativas de microscopía óptica de contraste de fases. Barra de escala, 20 μm28

Figura 9. Cultivo primario de hepatocitos murinos a una confluencia del 90%. Tiempo de incubación de 20 horas tras el proceso de extracción. Se observan células poliédricas con dos grandes núcleos y nucleolos bien desarrollados en la mayoría de ellas (flechas negras). Además, se aprecian microvellosidades en la superficie celular (cabezas de flecha negra) que aumentan la superficie disponible para el intercambio de sustancias entre el hepatocito y el plasma ⁹⁰. Presentan también acúmulos de glucógeno e inclusiones lipídicas dispersas por el citoplasma (flechas blancas). Imágenes representativas de microscopía óptica de contraste de fases. Barra de escala, 20 μm30

Figura 10. MAT hepático. Las células hepáticas pueden inhibir el crecimiento metastásico gracias al efecto citotóxico llevado a cabo por las LSECs y las poblaciones inmunes, sobre todo por los linfocitos y las KCs (A), o desarrollar un fenotipo activado en respuesta a los factores tumorales. Se genera entonces un MAT hepático, caracterizado por procesos inflamatorios, angiogénicos y de degradación y acumulación de los componentes de la MEC (mayoritariamente colágeno), en el cual el estroma del hígado, principalmente las SCs (LSECs, KCs y HSCs) y los hepatocitos, se asocia con el tumor promoviendo la metástasis (B)33

Figura 11. Estructura proteica de los DDRs, compuesta de tres regiones principales: extracelular, donde se encuentra el dominio discoidina; transmembrana e intracelular, formada por la región yuxtamembrana, la tirosina quinasa y el carboxilo terminal. El DDR1 posee cinco isoformas (a y b son las más abundantes). El DDR2 tiene una isoforma ^{121,122}36

Figura 12. Contribución del DDR1 a las características de la célula tumoral. Adaptado de Henriët E y cols. ¹²⁷39

Figura 13. Cultivos de células primarias hepáticas. Hepatocitos (A), LSECs (B), KCs (C) y HSCs (D) a un 90%, 80%, 50% y 80% de confluencia, respectivamente. Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases. Barra de escala, 40μm57

Figura 14. Cultivos de células de CCR metastásico. C26 (A), MCA38 (B) y HT29 (C) a un 60% de confluencia. Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases. Barra de escala, 40μm.....58

Figura 15. Cultivos de células no tumorales. Fibroblastos 3T3 (A) y macrófagos J774A.1 (B) a un 90% de confluencia. Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases obtenidas de la ATCC. Barra de escala, 100µm.....	59
Figura 16. Activación de DDR1 de SCs, células de CCR, fibroblastos 3T3 y macrófagos J774A.1 con Col I. * DDR1 activado	62
Figura 17. Bloqueo de DDR1 de SCs, células de CCR HT29, fibroblastos 3T3 y macrófagos J774A.1 con DDR1-IN-1. * DDR1 bloqueado	63
Figura 18. Proteína y secretomas o MCs de las SCs resultantes de la interacción con el tumor. Control (-∅), activadas por tumor (-TA), sin inhibidor (-) y con inhibidor (+)	64
Figura 19. Proteína y secretomas o MCs de las células de CCR C26 resultantes de la interacción con el sinusoide hepático. Control (-∅), activadas por sinusoide (-SA), sin inhibidor (-) y con inhibidor (+).....	65
Figura 20. Determinación de las capacidades migratoria e invasiva de SCs (A) y células de CCR C26 (B). Las células se sembraron sobre insertos porosos (0.8µm), que fueron introducidos en pocillos (2cm ²) con células C26 o los secretomas correspondientes, respectivamente.	75
Figura 21. Pureza de los cultivos primarios de SCs hepáticas. Western blot de los marcadores CD146, F4/80 y GFAP (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media ±SD (n=3). ***P < 0.001.....	82
Figura 22. Capacidad de respuesta de las SCs hepáticas al tumor metastásico (I). Cuantificación de la expresión de genes pro-metastásicos en LSECs (A), KCs (B) y HSCs (C) tras la activación con el secretoma de células de CCR C26 (TA) durante 1 hora (COX2, IL6, IL10, PDGF, VEGF) y 24 horas (COL1A1). El valor 1 corresponde a la expresión génica de las células en estado basal (SCs-∅). Resultados presentados como la media ±SD (n=3). *P < 0.1, **P < 0.01	84
Figura 23. Capacidad de respuesta de las SCs hepáticas al tumor metastásico (II). Western blot de MMP14 y TIMP2 en LSECs, KCs y HSCs tras la activación con el secretoma de células de CCR C26 durante 24 horas (TA) (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media ±SD (n=2). *P < 0.1, **P < 0.01, ***P < 0.001	85
Figura 24. Capacidad de respuesta de las SCs hepáticas al tumor metastásico (III). Cuantificación del número de LSECs y HSCs capaces de migrar e invadir a través de Col I (1%), hacia células de CCR C26 durante 40 horas (A). Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia. Barra de escala, 50µm (B). Resultados presentados como la media ±SD (n=3). *P < 0.1, ***P < 0.001	86
Figura 25. Capacidad de respuesta de las células de CCR C26 al sinusoide (I). Cuantificación de la expresión de los genes pro-metastásicos COX2, IL6, IL10, PDGF, VEGF y COL1A1 en células C26 tras la activación con el secretoma de LSECs (A), KCs (B) y HSCs (C) durante 24 horas (SA). El valor 1 corresponde a la	

expresión génica de las células en estado basal (C26-Ø). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). *P < 0.1, **P < 0.01, ***P < 0.001.....88

Figura 26. Capacidad de respuesta de las células de CCR C26 al senoide (II). Western blot de MMP14 y TIMP2 en células C26 tras la activación con el secretoma de LSECs, KCs y HSCs durante 24 horas (SA) (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=2). *P < 0.1, **P < 0.01, ***P < 0.001.....89

Figura 27. Expresión de DDR1 en las SCs hepáticas. Western blot de DDR1. La muestra de hepatocitos se empleó como control positivo (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). ***P < 0.001.....90

Figura 28. Sub-localización de DDR1 en las SCs hepáticas. Inmunocitofluorescencia de DDR1 (rojo), actina (verde) y núcleo (azul). Imágenes representativas de microscopía confocal de fluorescencia. Barra de escala, 10 μ m. Recuadros con magnificación 2X.....91

Figura 29. Activación de DDR1 en las SCs hepáticas incubadas con Col I (10nM). Western blot de PDDR1 y DDR1 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). *P < 0.1.....92

Figura 30. Expresión de DDR1 en células de CCR. Western blot de DDR1 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3).....93

Figura 31. Sub-localización de DDR1 en células de CCR. Inmunocitofluorescencia de DDR1 (rojo), actina (verde) y núcleo (azul). Imágenes representativas de microscopía confocal de fluorescencia. Barra de escala, 10 μ m. Recuadros con magnificación 2X.....94

Figura 32. Activación de DDR1 en células de CCR incubadas con Col I (10nM). Western blot de PDDR1 y DDR1 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). **P < 0.01, ***P < 0.001..95

Figura 33. Análisis inmunohistoquímico de DDR1 y α -SMA en tejido humano hepático sano y con metástasis hepática de CCR. ET: región extra-tumoral e IT: región intra-tumoral, separadas por la línea discontinua. Imágenes representativas de microscopía óptica. Barra de escala, 100 μ m (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como valores totales (n=46). ***P < 0.001.....96

Figura 34. Análisis inmunohistoquímico de DDR1 (A) y α -SMA (B) en tejido humano con metástasis hepática de CCR (muestra 12). Secciones de la región extra-tumoral (ET) separada de la región intra-tumoral (IT) por la línea discontinua. Las células que presentan mayor marcaje de DDR1 son grandes y algunas de ellas binucleadas, por lo que podrían corresponder a los hepatocitos (flechas negras). Además, hay células positivas para DDR1 con la misma

morfología fusiforme y distribución que las células positivas para α -SMA (cabezas de flecha negras). Imágenes representativas de microscopía óptica. Barra de escala, 100 μ m	97
Figura 35. Análisis inmunohistoquímico de DDR1 (A) y α -SMA (B) en tejido humano con metástasis hepática de CCR (muestra 12). Secciones de la región intra-tumoral (IT) separada de la región extra-tumoral (ET) por la línea discontinua. Las células tumorales tienen un marcaje de DDR1 apical (flechas negras). Hay células positivas para DDR1 con la misma morfología fusiforme y distribución que las células positivas para α -SMA (cabezas de flecha negras). Imágenes representativas de microscopía óptica. Barra de escala, 100 μ m	98
Figura 36. Activación de DDR1 en células 3T3 y J774A.1 incubadas con Col I (10nM). Western blot de PDDR1 y DDR1 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). *P < 0.1, **P < 0.01	105
Figura 37. Análisis de células 3T3 y J774A.1 apoptóticas tras la incubación con el inhibidor DDR1-IN-1 (0, 50, 100nM). Anexina V-/Yoduro de propidio-: células vivas; Anexina V+/Yoduro de propidio- y Anexina V+/Yoduro de propidio+: células en apoptosis temprana y tardía, respectivamente; Anexina V-/Yoduro de propidio+: células muertas (A, B). Proporción total de células 3T3 y J774A.1 apoptóticas (C, D). Resultados presentados como la media \pm SD (n=2)	106
Figura 38. Bloqueo de DDR1 en células 3T3 y J774A.1 incubadas con el inhibidor DDR1-IN-1 (0-100nM). Western blot de PDDR1 y DDR1 (A, B). Cuantificación de la expresión proteica (C, D) (n=1)	107
Figura 39. Bloqueo de DDR1 en las SCs hepáticas en estado basal (- \emptyset) e incubadas con el MC de células de CCR C26 durante una noche (-TA), tratadas o no con el inhibidor DDR1-IN-1 (70nM). Western blot de CASP3 (n=2)	108
Figura 40. Bloqueo de DDR1 en las LSECs en estado basal (- \emptyset) e incubadas con el MC de células de CCR C26 durante una noche (-TA), tratadas o no con el inhibidor DDR1-IN-1 (70nM). Western blot de PDDR1 y DDR1 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). */#P < 0.1	109
Figura 41. Bloqueo de DDR1 en las KCs en estado basal (- \emptyset) e incubadas con el MC de células de CCR C26 durante una noche (-TA), tratadas o no con el inhibidor DDR1-IN-1 (70nM). Western blot de PDDR1 y DDR1 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). *P < 0.1, **P < 0.01	110
Figura 42. Bloqueo de DDR1 en las HSCs en estado basal (- \emptyset) e incubadas con el MC de células de CCR C26 durante una noche (-TA), tratadas o no con el inhibidor DDR1-IN-1 (70nM). Western blot de PDDR1 y DDR1 (A). Cuantificación	

de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). **P < 0.01, ###P < 0.001111

Figura 43. Secreción de MMPs por las LSECs en estado basal (- \emptyset) e incubadas con el MC de células de CCR C26 durante una noche (-TA), tratadas o no con el inhibidor DDR1-IN-1 (70nM). Zimografía de MMP2 y MMP9 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3)113

Figura 44. Secreción de MMPs por las KCs en estado basal (- \emptyset) e incubadas con el MC de células de CCR C26 durante una noche (-TA), tratadas o no con el inhibidor DDR1-IN-1 (70nM). Zimografía de MMP2 y MMP9 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=2). */#P < 0.1, **P < 0.01.....114

Figura 45. Secreción de MMPs por las HSCs en estado basal (- \emptyset) e incubadas con el MC de células de CCR C26 durante una noche (-TA), tratadas o no con el inhibidor DDR1-IN-1 (70nM). Zimografía de MMP2 y MMP9 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). */#P < 0.1, **P < 0.01, ***/###P < 0.001115

Figura 46. Efecto del bloqueo del DDR1 de las LSECs en la fosforilación del DDR1 de células de CCR C26. Las células C26 se incubaron en estado basal (- \emptyset) o con el MC de las LSECs durante 24 horas (-SA). El MC de las LSECs fue obtenido de células en estado basal (- \emptyset) y activadas por tumor durante una noche (-TA), sin (-) y con (+) el tratamiento con DDR1-IN-1. Western blot de PDDR1 y DDR1 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). */#P < 0.1.....117

Figura 47. Efecto del bloqueo del DDR1 de las KCs en la fosforilación del DDR1 de células de CCR C26. Las células C26 se incubaron en estado basal (- \emptyset) o con el MC de las KCs durante 24 horas (-SA). El MC de las KCs fue obtenido de células en estado basal (- \emptyset) y activadas por tumor durante una noche (-TA), sin (-) y con (+) el tratamiento con DDR1-IN-1. Western blot de PDDR1 y DDR1 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3).....118

Figura 48. Efecto del bloqueo del DDR1 de las HSCs en la fosforilación del DDR1 de células de CCR C26. Las células C26 se incubaron en estado basal (- \emptyset) o con el MC de las HSCs durante 24 horas (-SA). El MC de las HSCs fue obtenido de células en estado basal (- \emptyset) y activadas por tumor durante una noche (-TA), sin (-) y con (+) el tratamiento con DDR1-IN-1. Western blot de PDDR1 y DDR1 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). */#P < 0.1.....119

Figura 49. Efecto del bloqueo del DDR1 de las LSECs en la secreción de MMPs por células de CCR C26. Las células C26 se incubaron en estado basal (- \emptyset) o con

el MC de las LSECs durante 24 horas (-SA). El MC de las LSECs fue obtenido de células en estado basal (-∅) y activadas por tumor durante una noche (-TA), sin (-) y con (+) el tratamiento con DDR1-IN-1. Zimografía de MMP2 y MMP9 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media ±SD (n=3). #P < 0.1, **P < 0.01	121
Figura 50. Efecto del bloqueo del DDR1 de las KCs en la secreción de MMPs por células de CCR C26. Las células C26 se incubaron en estado basal (-∅) o con el MC de las KCs durante 24 horas (-SA). El MC de las KCs fue obtenido de células en estado basal (-∅) y activadas por tumor durante una noche (-TA), sin (-) y con (+) el tratamiento con DDR1-IN-1. Zimografía de MMP2 y MMP9 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media ±SD (n=3)	122
Figura 51. Efecto del bloqueo del DDR1 de las HSCs en la secreción de MMPs por células de CCR C26. Las células C26 se incubaron en estado basal (-∅) o con el MC de las HSCs durante 24 horas (-SA). El MC de las HSCs fue obtenido de células en estado basal (-∅) y activadas por tumor durante una noche (-TA), sin (-) y con (+) el tratamiento con DDR1-IN-1. Zimografía de MMP2 y MMP9 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media ±SD (n=3). */#P < 0.1, **P < 0.01	123
Figura 52. Efecto del bloqueo del DDR1 de las LSECs en la proliferación, migración e invasión a través de Col I (1%) de células de CCR C26. Las células C26 se incubaron en estado basal (-∅) o con el MC de las LSECs durante 24 o 48 horas (-SA). El MC de las LSECs fue obtenido de células en estado basal (-∅) y activadas por tumor durante una noche (-TA), sin (-) y con (+) el tratamiento con DDR1-IN-1. Proliferación tras 48 horas (A), migración e invasión tras 24 horas (B). Imágenes de microscopía óptica representativas de la migración e invasión. Barra de escala, 50µm (C). Resultados presentados como la media ±SD (n=3). #P < 0.1, **P < 0.01	125
Figura 53. Efecto del bloqueo del DDR1 de las KCs en la proliferación, migración e invasión a través de Col I (1%) de células de CCR C26. Las células C26 se incubaron en estado basal (-∅) o con el MC de las KCs durante 24 o 48 horas (-SA). El MC de las KCs fue obtenido de células en estado basal (-∅) y activadas por tumor durante una noche (-TA), sin (-) y con (+) el tratamiento con DDR1-IN-1. Proliferación tras 48 horas (A), migración e invasión tras 24 horas (B). Imágenes de microscopía óptica representativas de la migración e invasión. Barra de escala, 50µm (C). Resultados presentados como la media ±SD (n=3). */#P < 0.1, **P < 0.01	126
Figura 54. Efecto del bloqueo del DDR1 de las HSCs en la proliferación, migración e invasión a través de Col I (1%) de células de CCR C26. Las células C26 se incubaron en estado basal (-∅) o con el MC de las HSCs durante 24 o 48 horas (-	

SA). El MC de las HSCs fue obtenido de células en estado basal (-Ø) y activadas por tumor durante una noche (-TA), sin (-) y con (+) el tratamiento con DDR1-IN-1. Proliferación tras 48 horas (A), migración e invasión tras 24 horas (B). Imágenes de microscopía óptica representativas de la migración. Barra de escala, 50µm (C). Resultados presentados como la media ±SD (n=3) */#P < 0.1, **P < 0.01.....	127
Figura 55. Análisis de células de CCR HT29 apoptóticas tras la incubación con el inhibidor DDR1-IN-1 (0, 50, 100, 200nM). Anexina V-/Yoduro de propidio-: células vivas; Anexina V+/Yoduro de propidio- y Anexina V+/Yoduro de propidio+: células en apoptosis temprana y tardía, respectivamente; Anexina V-/Yoduro de propidio+: células muertas (A). Proporción total de células apoptóticas (B). Resultados presentados como la media ±SD (n=2)	133
Figura 56. Bloqueo de DDR1 en células de CCR HT29 incubadas con el inhibidor DDR1-IN-1 (0-200nM). Western blot de PDDR1 y DDR1 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B) (n=1)	134
Figura 57. Expresión de proteínas de señalización en células de CCR HT29 incubadas con el inhibidor DDR1-IN-1 (200nM). Western blot de PAKT, AKT, PERK y ERK (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media ±SD (n=3). **P < 0.01	135
Figura 58. Expresión de proteínas relacionadas con adhesión, proliferación, migración e invasión en células de CCR HT29 incubadas con el inhibidor DDR1-IN-1 (200nM). Western blot de ICAM1, VCAM1, Ki67 y MMP9 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media ±SD (n=3). *P < 0.1, **P < 0.01, ***P < 0.001	136
Figura 59. Silenciamiento de DDR1 en células de CCR C26. PCR convencional (A) y Western blot de DDR1 (C). Cuantificación de la expresión génica (B) y proteica (D). Resultados presentados como la media ±SD (n=3). **P < 0.01	137
Figura 60. Cultivos de células de CCR C26. Imágenes representativas de microscopía óptica de contraste de fases de células C26 salvajes (A), siØ (B) y siDDR1 (C) a un 60% de confluencia. Barra de escala, 50µm	138
Figura 61. Caracterización de células de CCR C26 siDDR1. Proliferación (A) e invasión a través de Col I (1%) (B) de células C26 salvajes, siØ y siDDR1. Imágenes de fluorescencia representativas de la migración. Barra de escala, 50µm (C). Resultados presentados como la media ±SD (n=3). ***P < 0.001.....	139
Figura 62. Análisis histológico del crecimiento metastásico de CCR en tejido hepático murino. Cuantificación del número de focos metastásicos (A) y del área hepática ocupada por tumor (B). Imágenes representativas de microscopía óptica de tejido hepático de ratones inoculados con células C26 salvajes (C, n=3), siØ (D, n=3) y siDDR1 (E, n=6). Barra de escala, 200µm. T: tumor, E: estroma,	

separados por la línea discontinua. Resultados presentados como la media \pm SD.
*P < 0.1, **P < 0.01 141

Índice de Tablas

Tabla I. Tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad a escala mundial. Datos representados en porcentaje y número de casos al año.....	11
Tabla II. Cebadores para PCR convencional. Nombre y secuencia (5' \rightarrow 3')	66
Tabla III. Cebadores para PCR cuantitativa. Nombre y secuencia (5' \rightarrow 3')	67
Tabla IV. Anticuerpos para Western blot. Nombre, dilución y casa comercial	69

Glosario

α -SMA: alfa actina de músculo liso

ADN: ácido desoxirribonucleico

AKT: proteína quinasa B

ARN: ácido ribonucleico

ARNsh: ácido ribonucleico de horquilla corta

ATCC: colección americana de cultivos tipo

CASP3: caspasa 3

CCR: cáncer colorrectal

CD146/MCAM: molécula de adhesión celular de melanoma

COL1A1: colágeno tipo I alfa I

Col I: colágeno tipo I

COX2: ciclooxigenasa 2

DDR: receptor dominio discoidina

ERK: quinasa extracelular regulada por señal

F4/80: Receptor hormonal 1 con mucina, similar al factor de crecimiento epidérmico, EGF

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa

GFAP: proteína ácida fibrilar glial

HSC: célula estrellada hepática

ICAM1: molécula de adhesión intercelular 1

IL: interleuquina

KC: célula de Kupffer

Ki67: antígeno de proliferación celular Ki67

LSEC: célula endotelial de los sinusoides hepáticos

MAT: microambiente tumoral

MC: medio condicionado

MEC: matriz extracelular

MIF: factor de inhibición de la migración en macrófagos

MMP: metaloproteinasas de matriz

OMS: organización mundial de la salud

PBS: tampón fosfato salino
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

RFP: proteína de fluorescencia roja
RPS15: proteína ribosómica S15
RTK: receptor tirosina quinasa

SA: activado por sinusoide
SBF: suero bovino fetal
SC: célula sinusoidal
SD: desviación estándar

TA: activado por tumor
TEM: transición epitelio-mesenquimal
TIMP: inhibidor tisular de metaloproteinasas
TNF α : factor de necrosis tumoral alfa

UICC: unión internacional para el control del cáncer

VCAM1: molécula de adhesión celular vascular 1
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

Resumen

El receptor con dominio discoidina 1 (DDR1) es un tipo de receptor transmembrana cuyo ligando principal es el colágeno, componente mayoritario de la matriz extracelular (MEC). La sobre-expresión del DDR1 está asociada con la progresión tumoral y la metástasis de diferentes tipos de carcinomas, incluido el cáncer colorrectal (CCR). Por ello, el empleo de inhibidores de su actividad en las células tumorales ha surgido como nueva herramienta en la terapia anti-cancerígena. La elevada mortalidad derivada del CCR se debe, en la mayoría de los casos, a la aparición de metástasis hepáticas, cuya generación y supervivencia dependen de las interacciones entre las células de CCR y los elementos del estroma hepático, lo que conforma el llamado microambiente tumoral (MAT). En el hígado, las poblaciones celulares residentes en los capilares hepáticos, o células sinusoidales (SCs), constituidas mayoritariamente por células endoteliales (LSECs), células de Kupffer (KCs) y células estrelladas (HSCs), son las primeras en interactuar con el tumor y desempeñan funciones esenciales que definirán el comportamiento de la metástasis. Sin embargo, la expresión y función del DDR1 en las SCs hepáticas, así como su implicación en el desarrollo de metástasis hepáticas de CCR se desconocen.

En el presente estudio, en primer lugar, diseñamos un modelo *in vitro* de comunicación entre las SCs hepáticas y las células de CCR metastásico. En dicho modelo, las SCs son capaces de responder a los factores tumorales modificando la expresión de diferentes marcadores pro-inflamatorios, pro-angiogénicos y relacionados con la remodelación de la MEC. Asimismo, los factores sinusoidales activan una respuesta pro-metastásica en las células de CCR.

A continuación, evaluamos la expresión y fosforilación del DDR1 en las SCs hepáticas, y en tres líneas celulares de CCR metastásico, dos de ellas murinas (C26 y MCA38) y una humana (HT29). Tanto las SCs como las células tumorales presentan el receptor, siendo funcional en todas ellas, a excepción de las LSECs.

También, al examinar la presencia del DDR1 en muestras humanas de tejido hepático con metástasis de CCR, observamos que el nivel de expresión del receptor aumenta significativamente, respecto al tejido hepático sano adyacente. Dicho incremento no sólo se detecta en las células tumorales, sino también en células del estroma hepático.

En tercer lugar, para determinar la función del DDR1 en las SCs hepáticas, en condiciones fisiológicas y tras su interacción con el tumor, inhibimos la fosforilación del receptor usando un bloqueante químico de la actividad quinasa del DDR1. El análisis funcional tras el uso del inhibidor muestra que el DDR1 regula la secreción de MMPs en las KCs y las HSCs en condiciones basales de cultivo, lo cual representaría la situación en el hígado sano; así como en las HSCs activadas por el secretoma tumoral, lo que equivaldría al hígado metastatizado.

Además, empleando los secretomas sinusoidales como fuente de factores pro-metastásicos para las células de CCR, descubrimos que el DDR1 sinusoidal ejerce un efecto en la fosforilación y producción de MMPs tumorales, y también modula su potencial proliferativo, migratorio e invasivo a través de colágeno.

Por último, el bloqueo de la fosforilación del DDR1 en las células de CCR reduce su expresión de moléculas de adhesión y de re-estructuración de la MEC *in vitro*. Igualmente, el silenciamiento del DDR1 en el tumor disminuye a la mitad su capacidad de generar metástasis hepáticas *in vivo*.

En conjunto, estos resultados demuestran la importancia, no sólo del DDR1 tumoral, sino también del expresado por las células del estroma hepático, fundamentalmente por las HSCs, en el desarrollo metastásico del CCR.

I. Introducción

I.1 Cáncer

I.1.1 Concepto

El cáncer es una enfermedad que actualmente supone la segunda causa de muerte a nivel mundial. Consiste en una serie de eventos secuenciales que se definen como la transformación de las células sanas en células tumorales. El desarrollo tumoral podría equipararse a un proceso evolutivo, ya que la transición de células normales a cancerosas radica básicamente en la acumulación sucesiva de cambios o mutaciones genéticas, lo cual deriva en la adquisición de una serie de alteraciones fisiológicas que permitirán a las células de cáncer adaptarse a determinados ambientes ¹. Aunque se han descrito más de cien tipos y subtipos de cáncer distintos, existen características comunes a todas las células tumorales: autosuficiencia de señales proliferativas, evasión de los factores que inhiben el crecimiento, evasión de la muerte celular programada o apoptosis, potencial replicativo ilimitado o inmortalidad, inducción y mantenimiento de la formación de vasos sanguíneos o angiogénesis, y capacidad de invasión y generación de metástasis en los tejidos ².

Dichos aspectos definen las capacidades funcionales mínimas de un crecimiento celular maligno, es decir, permiten la supervivencia, proliferación y diseminación del cáncer. Las células tumorales obtienen estas propiedades gracias a dos características importantes: la inestabilidad del genoma, lo cual ocasiona mutaciones dando lugar a un genotipo tumoral ^{3,4}; y la modulación de los procesos inflamatorios, lo que contribuye a la formación de un ambiente rico en factores que promueven el desarrollo cancerígeno ⁵⁻⁷. Además, el crecimiento continuado y descontrolado de la masa tumoral se mantiene mediante la reprogramación del metabolismo energético y la regulación de la respuesta inmune, lo que permite obtener la energía suficiente que demanda el proceso y evitar el efecto citotóxico del sistema inmunitario, respectivamente.

Por tanto, la adquisición de las facultades que definen a la célula de cáncer (Fig.1) tiene lugar gracias a diferentes mecanismos celulares y en determinados momentos de la progresión tumoral ⁸.

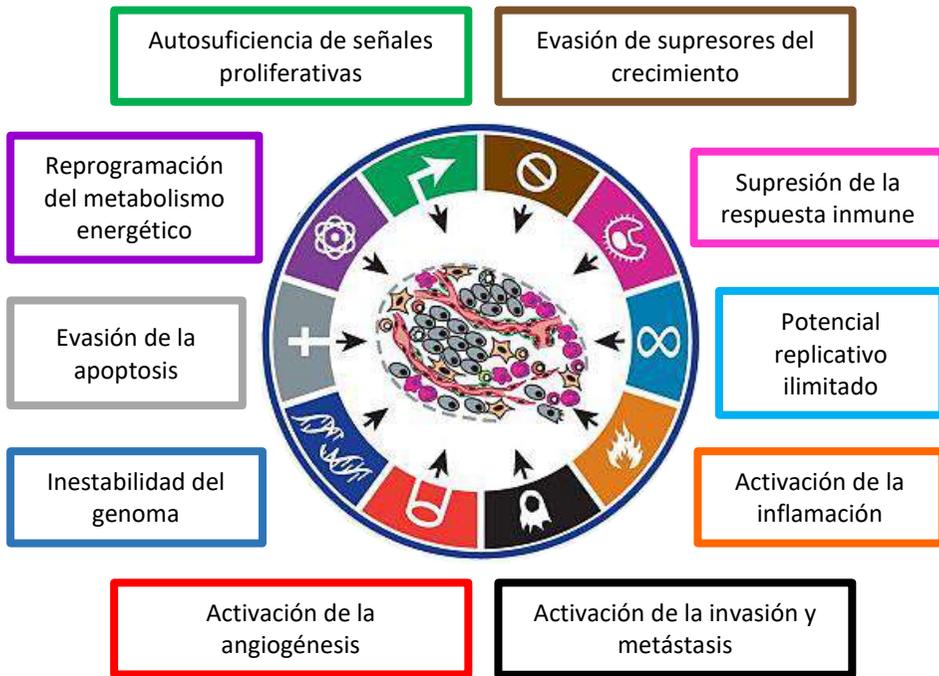


Figura 1. Características que definen a la célula tumoral. Adaptado de Hanahan D y cols.
8

Por otro lado, es importante resaltar que la masa tumoral no está constituida únicamente por células de cáncer, sino que también se compone de múltiples tipos celulares no cancerígenos y de un elemento no celular, la matriz extracelular (MEC). Entre las poblaciones de células no tumorales asociadas al cáncer, generalmente hay células endoteliales, células del sistema inmune, fibroblastos, pericitos y, en ocasiones, adipocitos. En cuanto al constituyente no celular, la MEC, se trata de una estructura macromolecular tridimensional formada por diferentes proteínas fibrosas, proteoglicanos y glicoproteínas,

mayoritariamente colágeno, que representa la proteína más abundante del organismo en mamíferos. Los componentes de la MEC son sintetizados y secretados por las propias células, y se organizan en el espacio intercelular configurando una red compleja y dinámica ⁹.

Ambos elementos, es decir, las células no cancerígenas y la MEC, definen el llamado estroma tumoral, el cual participa activamente en el proceso cancerígeno, contribuyendo a la expresión y el desarrollo de muchas de las propiedades distintivas de las células de cáncer. Por tanto, las células cancerosas y su estroma adyacente conforman un tejido tumoral estructural y funcionalmente complejo, cuyos integrantes, mediante diferentes factores y moléculas de señalización o comunicación celular, son capaces de interactuar entre sí, coordinándose para crecer, mantenerse y propagarse ¹⁰.

1.1.2 Incidencia y mortalidad

Según el último informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS), realizado con datos procedentes de 185 países y referentes a 36 tipos de cáncer, en el año 2018 se registraron alrededor de 18.1 millones de nuevos casos de cáncer a nivel global, con una tasa de mortalidad de más del 50%, lo que representa unos 9.6 millones de fallecimientos en total. Esto significa que una de cada seis muertes en el mundo es debida al desarrollo de un tumor maligno.

Tanto la incidencia como la mortalidad del cáncer varían geográficamente (Fig.2), así como dependiendo del sexo y del tipo de tumor en cuestión (Tabla I). En cuanto a los datos en función de la distribución geográfica, correspondientes al año 2018, se estima que aproximadamente la mitad de casos y muertes ocurrieron en Asia, sobre todo debido a que dicho continente representa casi el 60% de la población global. Europa y África, por otra parte, tienen un número similar de habitantes, ya que cada región supone alrededor de un 10-14% de la

población mundial. Sin embargo, en Europa se dieron sobre un 20% de nuevos casos y fallecimientos debidos al cáncer, mientras que en África se contabilizaron alrededor de un 6%. Esta variación en la incidencia y mortalidad de la enfermedad según el territorio puede ser debida a la edad media de sus habitantes, siendo en Europa mucho más elevada, unos 40 años, comparándola con África, apenas 18 años. Además, la falta de datos correspondientes a muchos países africanos altera estas estadísticas. Por su parte, en el continente americano, con una densidad de población de aproximadamente el 15% y cuya edad media se sitúa en torno a los 35 años, valores similares a los registrados en el continente europeo, la incidencia y mortalidad del cáncer también fueron parecidas a los datos observados en Europa, con un 21% de casos y casi un 15% de muertes. Por último, Oceanía se trata de la región donde se recogieron los valores más bajos, con alrededor de un 1% de casos y defunciones, lo cual se debe a que este continente sólo representa el 0.5-1% de la población global ¹¹.

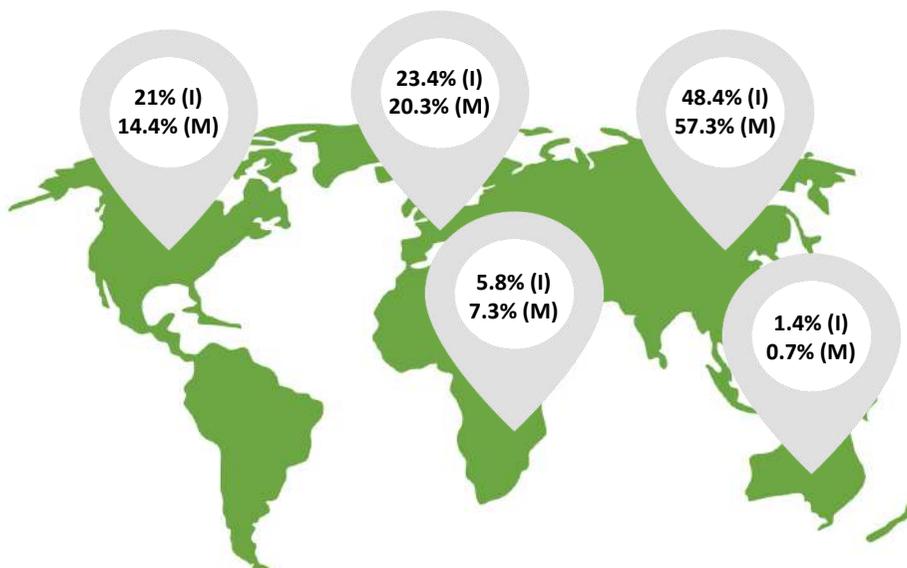


Figura 2. Datos de incidencia (I) y mortalidad (M) del cáncer a escala mundial, representados como porcentaje de casos por continente al año. Fuente: GLOBOCAN 2018 ¹¹

En lo referente a la variabilidad en la incidencia y mortalidad del cáncer a escala mundial dependiendo del sexo y del tipo de tumor, entre los diferentes tumores malignos que existen, el de pulmón, el de próstata y el cáncer colorrectal (CCR) fueron los más diagnosticados en hombres durante el año 2018. En mujeres, por otro lado, los tipos de cáncer más frecuentes fueron el de mama, el carcinoma de cuello uterino y el CCR. En relación con los datos de mortalidad registrados durante ese mismo año en ambos sexos, el cáncer pulmonar fue responsable de más de 1.76 millones de fallecimientos, seguido del CCR, el cáncer de estómago y el hepatocarcinoma, que causaron unas 862.000, 783.000 y 782.000 muertes, respectivamente ¹¹.

Tabla I. Tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad a escala mundial. Datos representados en porcentaje y número de casos al año

Tipo de cáncer	Incidencia % (nº casos/año)	Mortalidad % (nº casos/año)
Pulmón	11.6 (2.093.876)	18.4 (1.761.007)
Mama	11.6 (2.088.849)	6.6 (626.679)
Colorrectal	10 (1.800.877)	9 (861.663)
Próstata	7.1 (1.276.106)	3.8 (358.989)
Estómago	5.7 (1.033.701)	8.2 (782.685)
Hígado	4.7 (841.080)	8.2 (781.631)
Cuello uterino	3.2 (569.847)	3.3 (311.365)

Fuente: GLOBOCAN 2018 ¹¹

Prosiguiendo con los valores universales de incidencia y mortalidad de la enfermedad, la OMS calcula que, en el periodo de tiempo de 6 años entre los dos últimos informes realizados al respecto, entre los años 2012 y 2018, el número de casos y fallecimientos por cáncer aumentaron un 28% y un 17%, respectivamente. Aunque determinar los motivos es complicado, el componente genético, el envejecimiento y el crecimiento demográfico, así como los hábitos de vida y la exposición a determinados agentes externos, son las principales razones por las que las cifras de casos y muertes debidas al cáncer han aumentado tan rápidamente a lo largo de los últimos años. Mientras que sólo una pequeña proporción, alrededor de un 5%, de todos los tipos de tumores tienen un carácter hereditario, el consumo de alcohol y tabaco, la falta de actividad física y no seguir una dieta equilibrada constituyen algunos de los factores de riesgo más extendidos mundialmente ^{12,13}. Es decir, los estudios llevados a cabo hasta el momento concluyen que el cáncer es una enfermedad de carácter multifactorial, debida al efecto combinado de elementos genéticos y ambientales.

I.1.3 Cáncer colorrectal (CCR)

El CCR es una clase de neoplasia maligna gastrointestinal originada en el colon o el recto que, aunque son estructuras anatómicamente diferentes, se agrupan debido a sus similitudes estructurales y biológicas. El CCR constituye el tercer tipo de cáncer más común y el segundo más mortal, aunque, además de por las causas ya comentadas, las curvas de supervivencia varían según la fase en la que se encuentre el tumor en el momento del diagnóstico ¹⁴.

Por lo general, cuando el diagnóstico es temprano, la supervivencia es aproximadamente del 80-90% durante los 5 primeros años, disminuyendo a menos de un 10-20% cuando el cáncer se disemina a otros órganos, es decir,

cuando las células tumorales metastatizan. El CCR puede ser asintomático durante largos periodos de tiempo, manifestándose signos detectables sólo cuando el tumor ha avanzado demasiado, lo cual deriva en una mala prognosis. Por esta razón, el pronóstico precoz, al igual que en otros tipos de cáncer, es esencial para evitar el desarrollo y la diseminación de la enfermedad ¹⁵.

I.1.3.1 Patogénesis del cáncer colorrectal (CCR)

El adenocarcinoma es la clase de neoplasia colorrectal más típica, ya que ocurre en el 95% de los casos, seguido de otros tipos de crecimientos malignos menos frecuentes, como los tumores carcinoides, los del estroma gastrointestinal, los linfomas y los sarcomas ¹⁶.

El adenocarcinoma colorrectal se desarrolla en una serie de fases consecutivas bien caracterizadas a nivel histológico, denominadas la secuencia adenoma-carcinoma (Fig.3) ¹⁷. En condiciones fisiológicas, las células madre intestinales localizadas en el revestimiento interno del colon o mucosa glandular, más concretamente en las invaginaciones o criptas, proliferan para renovar y mantener la regeneración homeostática del tejido epitelial ¹⁸. Sin embargo, la elevada tasa mitótica de estas células hace más probable la aparición de mutaciones durante la replicación del ADN. Asimismo, factores ambientales como la dieta, el estilo de vida o la microbiota del intestino, pueden influir en esta acumulación progresiva de alteraciones genéticas durante el proceso de división de las células del epitelio colorrectal ¹⁹.

Como consecuencia, estas células madre altamente proliferativas pierden su organización y forman pólipos que evolucionan a los denominados adenomas tempranos ²⁰. Generalmente, dichos adenomas constituyen neoplasias benignas, es decir, masas de células con elevada capacidad de división, pero con un crecimiento localizado en el colon. De hecho, debido a la heterogeneidad de

su biología molecular, sólo un 10% de los adenomas tempranos desarrollan un fenotipo agresivo, invadiendo los tejidos próximos al colon y dando lugar a adenomas tardíos capaces de generar un CCR. Además, dentro de este 10%, los adenomas tempranos pueden tardar años en transformarse en un CCR, por ello, gracias a los programas de detección precoz, este tipo de tumor es uno de los más prevenibles ²¹⁻²⁴.

Por tanto, la patogénesis del CCR se inicia debido al cúmulo sucesivo de mutaciones genéticas en las células madre de las criptas del colon, lo cual influye en su comportamiento. Así, estas células podrán crecer sin control, es decir, de manera independiente a las señales regulatorias procedentes de su nicho, transformándose de este modo en células tumorales. Por otra parte, durante la secuencia adenoma-carcinoma también se requiere que las células cancerígenas posean ciertas facultades que alteren las características del ambiente que les rodea, generando un estroma tumoral que facilite la progresión del cáncer. De esta manera, conforme el CCR evoluciona, el estroma tumoral experimenta numerosos cambios, generándose un microambiente extremadamente complejo, que potenciará el desarrollo cancerígeno.

Algunas de las propiedades estromales que las células tumorales deben modular son la composición y la estructuración de la MEC. Durante el crecimiento del cáncer, la MEC sufre una intensa remodelación, con eventos continuos de síntesis y degradación enzimática. En el CCR, la MEC se caracteriza por poseer una naturaleza rígida, a causa de su acumulación o desmoplasia, y del incremento de la síntesis y entrecruzamiento de las fibras de colágeno ^{25,26}. La rigidez de la MEC influye a su vez en el comportamiento de las células de CCR, sobre todo en su potencial invasivo. Varios estudios realizados por Tang X y cols., en diferentes líneas celulares de CCR humano, demuestran que las células tumorales cultivadas en un medio matricial rígido modifican su fenotipo epitelial a otro con mayores capacidades migratorias e invasivas ^{27,28}.

Estos resultados ponen de manifiesto la relevancia de la MEC durante la progresión del CCR. A medida que el tumor avanza, las alteraciones que se producen en la matriz permitirán a las células tumorales invadir y colonizar nuevos nichos progresivamente, desde los tejidos adyacentes al colon, llegando a los sistemas linfático y circulatorio, hasta diseminarse y crecer en otros tejidos y órganos distantes o, lo que es lo mismo, adquiriendo la capacidad de generar metástasis ²⁹.

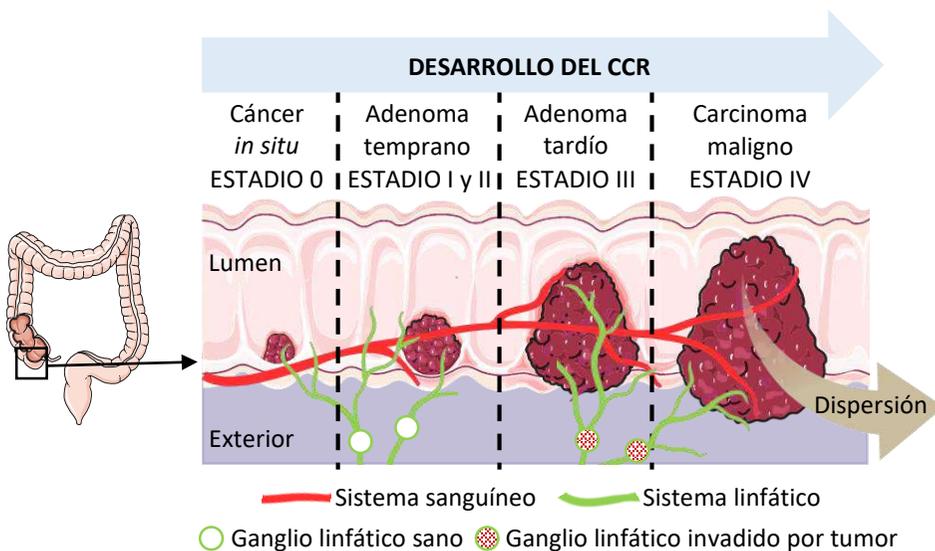


Figura 3. Evolución del CCR dividida en cinco estadios representativos de la secuencia adenoma-carcinoma. Durante el estadio 0, denominado cáncer *in situ*, las células tumorales se encuentran únicamente en la mucosa del colon. Los estadios I y II corresponden al desarrollo de un adenoma temprano, caracterizado por una proliferación tumoral local (del tejido muscular y otros tejidos que rodean el colon), sin afectación de los ganglios o nódulos linfáticos. En el estadio III, referido al adenoma tardío, se produce invasión ganglionar. Finalmente, en el estadio IV las células tumorales llegan al sistema circulatorio y el carcinoma se disemina o se dispersa a otros tejidos y órganos. Es decir, las células de cáncer invaden o se adhieren a estructuras anatómicas alejadas del colon, proceso definido como metástasis. Fuente: unión internacional para el control del cáncer (UICC), clasificación de tumores malignos o estadificación TNM ¹⁷

I.2 Metástasis

I.2.1 Concepto

La metástasis es la principal causa de muerte de los pacientes con cáncer. De hecho, se estima que alrededor del 90% de los fallecimientos por esta enfermedad son debidos al crecimiento metastásico. De ahí que un tumor se describa como maligno en base a su capacidad para metastatizar^{30,31}. El término se define como el proceso por el cual las células cancerosas se desprenden del tumor primario e infiltran, invaden y colonizan nuevos nichos en tejidos y órganos alejados de su lugar de origen. El resultado de la metástasis, por lo tanto, es la adaptación de la célula de cáncer a un nuevo ambiente. Para ello, las células cancerígenas deben adquirir unas propiedades que les permitan, no sólo separarse del tumor primario, sino también sobrevivir, invadir y proliferar para generar una nueva masa tumoral en otra región anatómica. Todo este proceso ocurre durante la denominada cascada metastásica³²⁻³⁴.

La cascada metastásica consiste en una serie de eventos secuenciales y relacionados entre sí, cuya finalidad es la diseminación del cáncer desde la masa tumoral originaria hasta otros órganos diana. Se trata de una sucesión de acontecimientos complejos, en los que participan factores inherentes a las células cancerígenas y un conjunto de interacciones entre las células malignas y diferentes elementos del organismo. La cascada metastásica está integrada por varias etapas progresivas que implican: (a) la disgregación de la célula tumoral del cáncer primario, (b) la progresión e invasión del tejido adyacente, (c) la penetración en los vasos linfáticos y sanguíneos o intravasación, (d) la evasión del sistema inmune, (e) la extravasación desde los capilares sanguíneos, (f) la invasión y adaptación a las condiciones del nuevo ambiente y (g) la supervivencia y expansión para generar una nueva masa tumoral (Fig.4)³⁵.

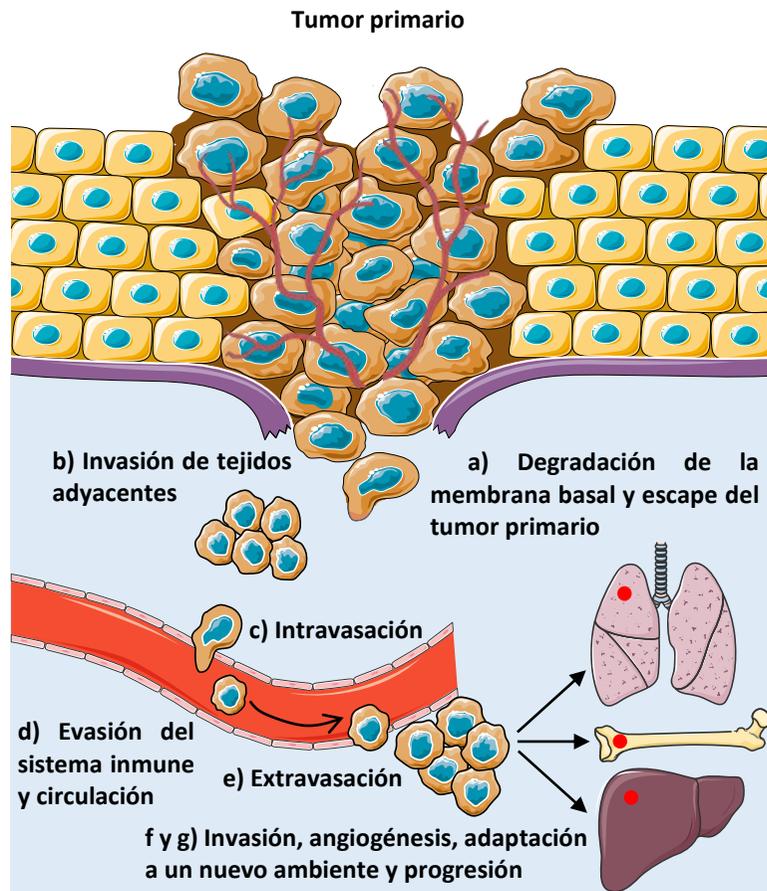


Figura 4. Fases de la cascada metastásica ³⁵

Como se ha mencionado, una vez que la cascada metastásica concluye y la metástasis se establece como tal, la tasa de mortalidad de los pacientes con cáncer aumenta drásticamente, sobre un 90%. Por ello, la efectividad en el tratamiento de esta enfermedad depende en gran medida de la capacidad para interceptar, y tal vez incluso revertir, el proceso de metástasis ^{36,37}.

La razón principal de la caída de las curvas de supervivencia en los pacientes con metástasis, es que los agentes terapéuticos empleados actualmente en clínica resultan poco efectivos en muchos de los casos.

Mientras que los tumores primarios pueden ser eliminados quirúrgicamente o mediante terapia, las células cancerígenas capaces de diseminarse constan de una serie de propiedades que, en la mayoría de las ocasiones, les hacen resistentes a los tratamientos actuales. Una de las características más importantes consiste en la heterogeneidad biológica presente en la masa tumoral que conforma la metástasis, la cual contiene subpoblaciones de células que difieren entre sí en sus propiedades angiogénicas, invasivas y proliferativas³⁸. Además, dicha diversidad fenotípica ocurre también entre pacientes con el mismo tipo de cáncer primario y/o crecimiento metastásico. De este modo, esta versatilidad provoca que algunas poblaciones de células metastásicas posean o adquieran quimiorresistencia, protegiéndose del efecto citotóxico ejercido por los fármacos anti-tumorales existentes³⁹.

La elevada mortalidad que genera y las dificultades para combatir la metástasis, han desembocado en el incremento del número de investigaciones relacionadas con el proceso metastásico dentro del ámbito oncológico. Curiosamente, numerosos estudios han demostrado que completar con éxito las etapas finales de la cascada metastásica resulta complejo y poco frecuente. Evadir los mecanismos de defensa del organismo, sobrevivir y colonizar nuevos ambientes constituyen fases críticas difíciles de culminar. Por ello, la metástasis se define como un proceso altamente ineficiente. De hecho, se calcula que menos de un 0.01 % de las células tumorales que entran al sistema circulatorio llegan a generar tumores secundarios en órganos distantes⁴⁰.

Se cree que la razón por la que la metástasis tiene una baja eficacia es que la mayoría de las células cancerígenas son eliminadas en los vasos linfáticos y sanguíneos, bien por el sistema inmunitario o a consecuencia de las fuerzas hemodinámicas. Asimismo, la extravasación desde el sistema circulatorio y la infiltración en un nuevo tejido mediante la degradación de la MEC, suponen factores limitantes durante el desarrollo metastásico⁴¹⁻⁴³.

Por último, la adaptación de las células tumorales a un ambiente desconocido también representa un reto que restringe enormemente la colonización definitiva del nuevo órgano ⁴⁴. Esto quiere decir que, al igual que en el tumor primario, las células cancerígenas metastásicas deben ser capaces de interactuar con los elementos que conforman el microambiente secundario, creando un nuevo estroma tumoral, lo cual determinará el éxito del proceso metastásico ⁴⁵.

1.2.2 Microambiente tumoral (MAT)

El MAT se define como el entorno o el estroma adyacente a las células de cáncer, con las cuales establece una estrecha relación y que decide el comportamiento del tumor, bien sea primario o una metástasis ⁴⁶.

Esto significa que, cuando las células tumorales metastásicas llegan al órgano diana, deben configurar un MAT específico y complejo que influirá en la proliferación y la supervivencia del tumor a lo largo del proceso de metástasis ⁴⁷⁻⁴⁹. Puesto que cada órgano tiene poblaciones celulares específicas y una MEC con una composición y estructura determinadas, las células de cáncer interactúan y se adaptan de manera diferente en función de las características del microambiente. De todos modos, la infiltración e implantación de las células tumorales metastásicas en un ambiente concreto no ocurre al azar.

A lo largo de los años, el estudio de la metástasis ha evidenciado que existen pautas que establecen la distribución de las células metastásicas en un determinado órgano, en función del tipo de tumor primario del que provengan. Actualmente, hay dos hipótesis para explicar este hecho: la teoría órgano-trópica y la teoría mecánica o hemodinámica. La primera, propuesta por Stephen Paget en 1889, sugiere que la compatibilidad entre las células tumorales y el órgano secundario define el establecimiento de la metástasis en

un determinado nicho ⁵⁰. La segunda, expuesta por James Ewing en 1928, defiende que la propagación de las células tumorales hasta el órgano diana depende únicamente del tamaño de las vías de drenaje linfático y/o sanguíneo. De esta manera, las células cancerosas no alcanzan el torrente arterial, sino que quedan retenidas fundamentalmente en los capilares pulmonares o hepáticos, de ahí el alto porcentaje de metástasis que aparecen en dichos órganos ⁵¹. Sin embargo, esta hipótesis no explica el crecimiento de metástasis en otras estructuras anatómicas como, por ejemplo, el cerebro, las glándulas endocrinas o los órganos genitales ⁵². Aunque existen defensores de una u otra teoría, lo cierto es que ambas hipótesis podrían complementarse, ayudándonos a comprender el concepto de MAT.

Lo que sí está demostrado es que, dentro de ese patrón de distribución específica de metástasis dependiendo de su origen, el hígado constituye una de las regiones anatómicas más susceptibles. De hecho, representa el órgano más común donde metastatizan células de todos los tipos de cáncer del aparato gastrointestinal, sobre todo de adenocarcinoma pancreático y de CCR. Su arquitectura única, su heterogeneidad genética y funcional, su elevado flujo sanguíneo y el reducido diámetro de sus capilares, así como su diversa composición celular, son algunas de las propiedades que lo convierten en un nicho favorable para el desarrollo metastásico ⁵³.

I.2.2.1 El hígado como órgano proclive a la metástasis

El hígado es el órgano más voluminoso del organismo. Anatómicamente, está dividido en dos lóbulos (izquierdo y derecho) y recubierto por una cápsula de tejido conectivo fibroso, denominada cápsula de Glisson. Tiene funciones vitales y únicas relacionadas con el metabolismo, como la regulación de los niveles de glucosa en sangre mediante el almacenamiento y la degradación de glucógeno,

la desintoxicación y excreción de metabolitos de deshecho, y la biosíntesis de la mayoría de las proteínas plasmáticas y lípidos. También juega un importante papel durante la digestión, mediante la síntesis y secreción de la bilis a través de la vesícula biliar, proceso necesario para la absorción de grasas y vitaminas ⁵⁴. Además, es un órgano muy irrigado, caracterizado por un flujo sanguíneo doble, proveniente mayoritariamente de la vena porta (70%) y en menor medida de la arteria hepática (30%). Por otro lado, el microambiente hepático está formado por multitud de poblaciones celulares únicas. Dichas poblaciones están agrupadas en: *i*, células del parénquima, constituidas principalmente por hepatocitos y en segundo lugar por colangiocitos; y *ii*, células no parenquimatosas, que incluyen las células dendríticas, linfocitos asociados al hígado, fibroblastos portales y las células de los capilares hepáticos o células sinusoidales (SCs), que engloban a las células endoteliales (LSECs), las células de Kupffer (KCs) y las células estrelladas hepáticas (HSCs).

Estos componentes se organizan en una unidad estructural y funcional única denominada lobulillo hepático. Se trata de una estructura más o menos hexagonal que mide de 1 a 2 mm de diámetro y que está compuesta por filas o trabéculas de hepatocitos distribuidos de forma radial, separados por un sistema interconectado de capilares hepáticos o sinusoides fenestrados. El sinusoides es un sistema microvascular, cuya función es conducir la sangre proveniente de la vena porta y la arteria hepática, localizadas en los extremos del lobulillo junto al conducto biliar, hasta la vena centrolobulillar. En los sinusoides residen las SCs, un conjunto de diferentes tipos celulares hepáticos especializados: las LSECs recubren los sinusoides, las KCs o macrófagos hepáticos se localizan en el lumen sinusoidal y las HSCs se encuentran en el espacio de Disse, una región perisinusoidal ubicada entre las LSECs y los hepatocitos (Fig.5) ⁵⁵.

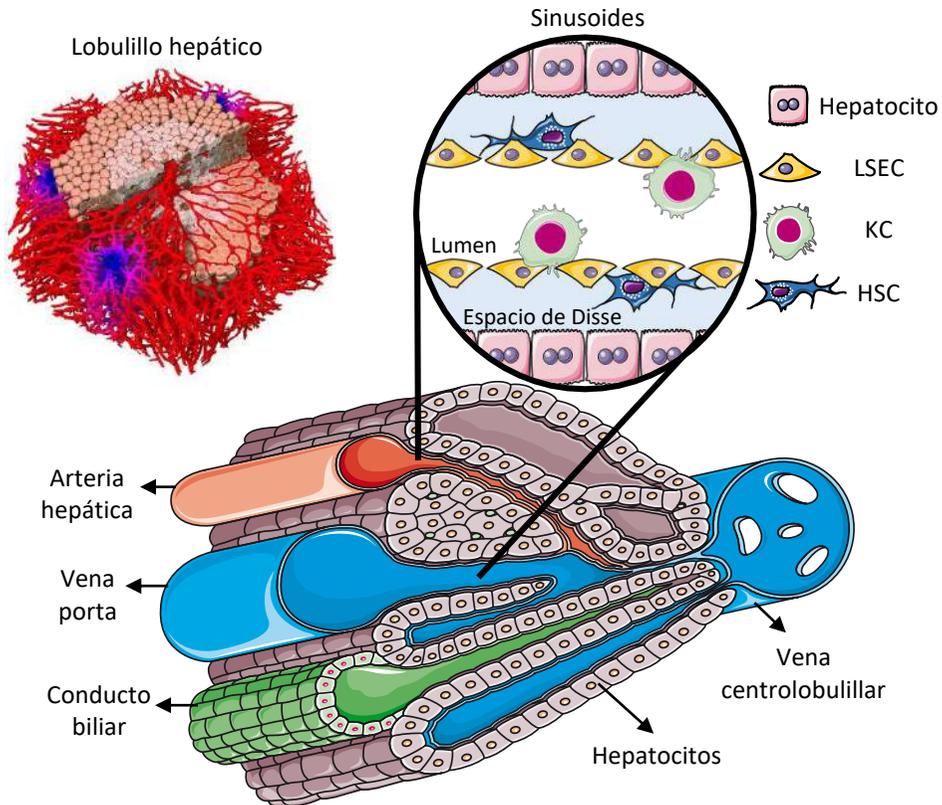


Figura 5. Lobulillo hepático. Estructura hexagonal formada por filas de hepatocitos y delimitada por tríadas portales (arteria hepática, vena porta y conducto biliar). La sangre es drenada desde la vena porta y la arteria hepática hasta los sinusoides, y de ahí a la vena centrolobulillar. En los sinusoides residen las LSECs, KCs y HSCs ⁵⁵

Algunas de las características que hacen tan distintiva la biología hepática, son las responsables de que el hígado sea uno de los órganos más propensos al crecimiento metastásico, especialmente de las células de CCR ⁵⁶. Por un lado, además de desde el estómago, el páncreas, el bazo y otras regiones del intestino, la vena porta drena sangre desde el colon hasta el hígado, lo cual podría explicar el hecho de que la mitad de metástasis hepáticas se generan a consecuencia del CCR. Además, las células del endotelio sinusoidal hepático pueden promover la adhesión y la invasión de las células tumorales. Las propiedades regenerativas y la supresión inmunitaria regional típicas del hígado,

también pueden ser aspectos beneficiosos para la progresión metastásica ^{57,58}. Así, la combinación de la hipótesis órgano-trópica y la teoría hemodinámica podría aplicarse para entender la elevada proporción de metástasis hepáticas derivadas del CCR.

I.2.2.1.1 Microambiente tumoral (MAT) hepático

El sistema microvascular sinusoidal es de suma importancia durante la metástasis hepática, ya que a través de los sinusoides se produce la entrada de las células de CCR metastásico al hígado, de manera que las SCs (LSECs, KCs y HSCs) están íntimamente relacionadas con el desarrollo del nicho pro- y pre-metastásico, al ser las células hepáticas que primero interactúan con el tumor. En este contexto, estas poblaciones celulares reaccionan al tumor y responden de diferente modo, inhibiendo o promoviendo la metástasis en el hígado. En el caso de que las células metastásicas consigan penetrar en el tejido del hígado, junto con las SCs, los hepatocitos y la MEC, conformarán un MAT hepático o estroma tumoral único, esencial para el establecimiento, la progresión y la supervivencia de la metástasis ⁵⁹. Además, diferentes estudios han revelado que las células del tumor primario, incluido el CCR, son capaces de modificar el ambiente del órgano secundario, mediante la liberación de diferentes factores de señalización, creando un nicho adecuado antes del inicio de la cascada metastásica, lo que después permitirá y facilitará la colonización tumoral ⁶⁰.

Estos aspectos demuestran la gran relevancia del estroma tumoral asociado en la generación del MAT hepático y, por tanto, durante el avance de la metástasis. Por ello, definir los elementos que conforman el tejido hepático, así como entender los mecanismos que están implicados en la configuración del MAT del hígado, ayudarán al desarrollo de nuevas terapias para la prevención y el tratamiento de las metástasis hepáticas de CCR.

I.2.2.1.1.1 Células endoteliales del sinusoides hepático (LSECs)

Las LSECs conforman la pared de los sinusoides hepáticos. Poseen una morfología triangular aplanada (Fig.6) y suponen alrededor del 50% de las SCs del hígado. Presentan fenestraciones y brechas intercelulares, conformando un endotelio selectivo, discontinuo y sin lámina basal, que facilita el intercambio de sustancias entre el sinusoides y el espacio de Disse, flanqueado por hepatocitos y donde están las HSCs. De hecho, en mamíferos, el endotelio hepático es el más permeable del organismo. En condiciones fisiológicas, las LSECs regulan el tono vascular del hígado y el mantenimiento de la quiescencia de las HSCs, inhibiendo la vasoconstricción y la acumulación de tejido conjuntivo o fibrosis hepática. También, tienen una elevada capacidad endocítica y actividad lisosomal, lo que les permite eliminar sustancias tóxicas de la sangre ⁶¹.

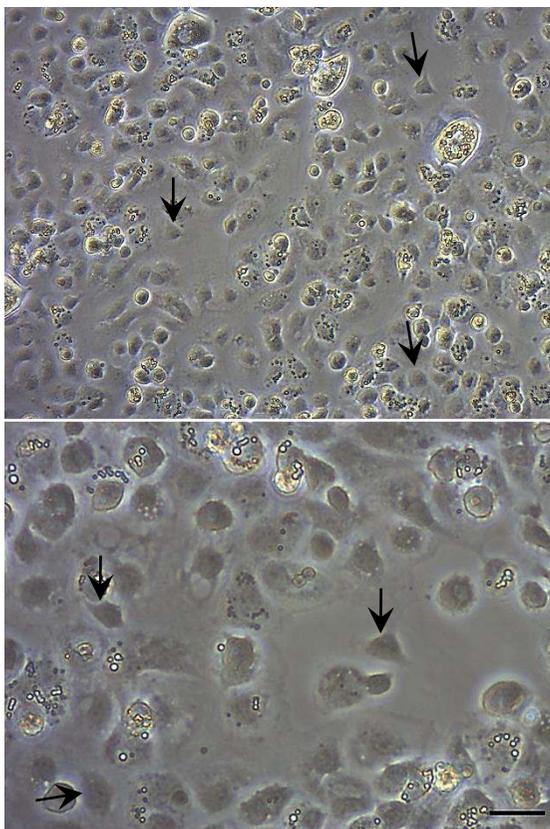


Figura 6. Cultivo primario de LSECs murinas a una confluencia del 80-90%. Tiempo de incubación de 2 horas tras el proceso de extracción. Se observan otros tipos celulares del sinusoides hepático, mayoritariamente HSCs. Las LSECs tienen morfología aplanada y triangular, y no poseen zonas citoplasmáticas refringentes (flechas negras). Imágenes representativas de microscopía óptica de contraste de fases. Barra de escala, 20 μm

Las LSECs desempeñan un papel crucial durante la metástasis hepática, inhibiendo o favoreciendo su crecimiento.

Por una parte, cuando las células de CCR llegan a los sinusoides, las LSECs junto con los linfocitos hepáticos y las KCs se activan, ejerciendo un efecto citotóxico sobre el tumor a través de varios mecanismos. Por un lado, las poblaciones inmunes locales eliminan las células tumorales mediante citólisis enzimática (linfocitos) o fagocitosis (KCs), fundamentalmente. Además, estos tres tipos celulares del sinusoides son capaces de secretar diferentes sustancias en respuesta a la reducción del flujo sanguíneo o isquemia y a la inflamación, que pueden tener un efecto anti-tumoral directo o activar células del sistema inmune localizadas fuera del hígado, que se sumarán a la respuesta inflamatoria local ⁶².

En cambio, por otra parte, la respuesta inflamatoria crónica generada por las células tumorales puede activar la sobre-expresión de moléculas de adhesión en las LSECs. Esto favorece la unión de las células de CCR al endotelio del hígado y la migración trans-endotelial hasta el espacio de Disse, escapando así del sistema inmune sinusoidal e invadiendo el tejido hepático ⁶³. Además, la adhesión de las células de CCR al endotelio hepático estimula la secreción de moléculas pro-inflamatorias en las LSECs, como COX2 e IL10, lo que se correlaciona con una reducción de la capacidad citotóxica linfocítica ⁶⁴. La unión entre las células de CCR y el endotelio también contribuye a la formación de vasos sanguíneos o angiogénesis, proceso mediado por las LSECs y que constituye una propiedad necesaria para la supervivencia y la progresión tumoral ^{65,66}.

I.2.2.1.1.2 Células de Kupffer (KCs)

Las KCs constituyen una población única de macrófagos residentes del hígado, que representa aproximadamente el 30% del total de SCs. Poseen una morfología redondeada o semilunar, con una superficie celular que presenta numerosas microvellosidades e invaginaciones (Fig.7). La mayoría de las KCs están situadas en el lumen del sinusoides, unidas a las LSECs, y emiten prolongaciones citoplasmáticas al espacio de Disse, de manera que contactan directamente con los hepatocitos y las HSCs⁶⁷. En términos de metabolismo, las KCs son uno de los tipos celulares hepáticos más activos. Sus funciones principales son la eliminación de partículas extrañas de la sangre mediante fagocitosis, el metabolismo de las lipoproteínas y la activación de la respuesta inmune⁶⁸.

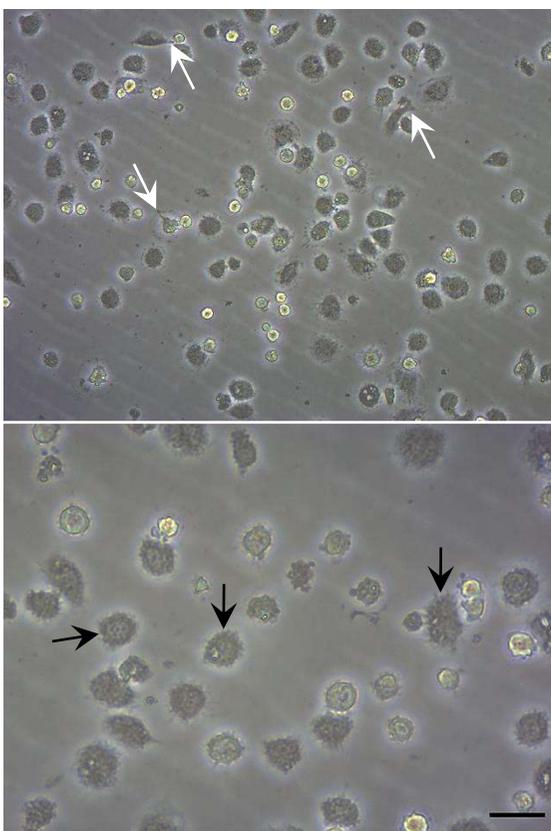


Figura 7. Cultivo primario de KCs murinas a una confluencia del 50-60%. Tiempo de incubación de 2 horas tras el proceso de extracción. Se observan células con morfología redondeada (y alargada en algunas ocasiones), que muestran una superficie rugosa, debido a sus microvellosidades (flechas negras). Algunas también presentan prolongaciones o lamelipodios (flechas blancas). Dichas estructuras son necesarias para desempeñar su función fagocítica⁶⁷. Imágenes representativas de microscopía óptica de contraste de fases. Barra de escala, 20 μ m

Al igual que las LSECs, las KCs tienen funciones esenciales que pueden frenar o promover el desarrollo metastásico en el hígado. La interacción de las KCs con las células tumorales metastásicas puede provocar, por tanto, diferentes respuestas, que dependen de la fase del proceso metastásico, la carga de antígeno tumoral y la interacción con otras células del sistema inmune.

Por un lado, la activación de las KCs, junto con los linfocitos hepáticos, desencadena una respuesta citotóxica contra las células de CCR durante la llegada del tumor al sinusoides. De esta manera, las KCs son capaces de secretar especies reactivas de oxígeno, citoquinas citotóxicas y proteasas, además de fagocitar a las células cancerígenas. Numerosos estudios sugieren que dicho efecto anti-tumoral tiene lugar mayoritariamente 24 horas después del contacto de las células cancerígenas con las KCs ⁶⁹⁻⁷¹.

Sin embargo, por otro lado, la comunicación entre las KCs y el tumor puede tener el efecto contrario. La unión de las células tumorales a las KCs provoca la sobre-expresión de moléculas de adhesión en la membrana de las LSECs, lo que facilita la extravasación de las células de CCR y su entrada al espacio de Disse, además de activar una respuesta pro-inflamatoria y pro-angiogénica mediada por las LSECs ⁷². Asimismo, las KCs pueden secretar citoquinas pro-inflamatorias, como COX2 y TNF α , factores de crecimiento y de supervivencia, y enzimas de degradación de la MEC o metaloproteinasas (MMPs), generando un ambiente que estimula la invasión, la proliferación y la angiogénesis tumoral, promoviendo por tanto el proceso de metástasis ⁷³. De este modo, las células de CCR que sobreviven al ataque del sistema inmune, pueden beneficiarse de su asociación con las KCs. Este cambio en la respuesta de las KCs parece estar relacionado con la cantidad de células tumorales que llegan al hígado. Cuando el número de células cancerosas es bajo, las KCs desempeñan una función anti-cancerígena; mientras que cuando aumenta el número de células de cáncer, su capacidad fagocítica se ve saturada, favoreciendo la colonización del CCR ⁷⁴.

I.2.2.1.1.3 Células estrelladas hepáticas (HSCs)

Las HSCs (células de Ito o lipocitos hepáticos) tienen un origen mesenquimal y representan el 20% de las SCs ⁷⁵. Se caracterizan por la presencia de prolongaciones citoplasmáticas (Fig.8), que sirven para la detección de señales quimiotácticas, transmitidas al aparato mecánico de la célula para generar una fuerza contráctil ⁷⁶. Se localizan en el espacio de Disse, una región perisinusoidal ocupada por fibras reticulares y plasma sanguíneo, entre los hepatocitos y las LSECs. Sus funciones consisten en el almacenamiento y el metabolismo de la vitamina A o retinol, el mantenimiento de la composición de la MEC y la estructuración del sinusoides. Debido a su localización y capacidad contráctil, algunos estudios consideran que las HSCs regulan ciertos aspectos de la fisiología del endotelio sinusoidal, actuando como pericitos ^{77,78}.

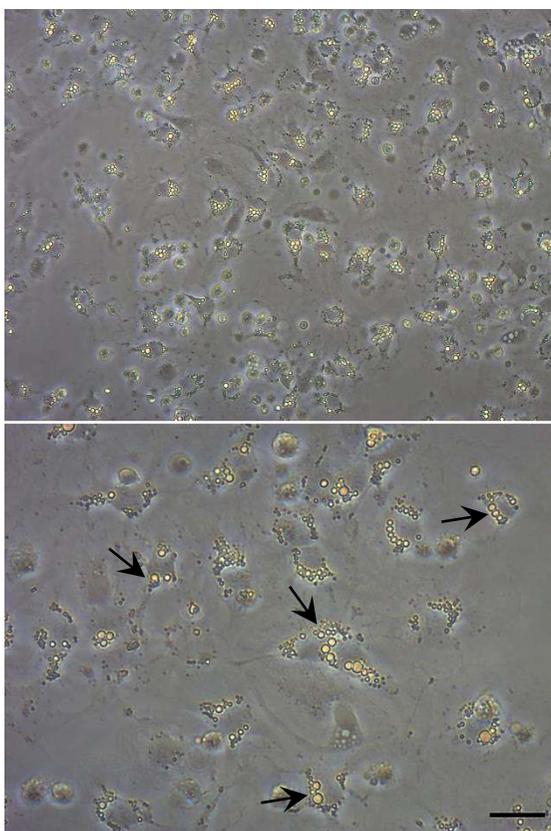


Figura 8. Cultivo primario de HSCs murinas a una confluencia del 80%. Tiempo de incubación de 24 horas tras el proceso de extracción. Se observan células con morfología estrellada y con multitud de vesículas refringentes en el citoplasma (flechas negras). Estas estructuras son inclusiones lipídicas, donde se almacena la vitamina A. Las HSCs contienen el 95% de los depósitos de retinoides del cuerpo ⁷⁵. Imágenes representativas de microscopía óptica de contraste de fases. Barra de escala, 20 μ m

Las HSCs intervienen en multitud de patologías del hígado, incluida la metástasis hepática, donde llevan a cabo importantes funciones.

En respuesta a factores derivados del tumor, las HSCs se activan y alteran su fenotipo. La activación se inicia por la estimulación paracrina de las HSCs mediada por otros tipos celulares del hígado, sobre todo por los hepatocitos, las LSECs y las KCs. En este proceso, las HSCs se transdiferencian de un fenotipo quiescente muy especializado a un fenotipo miofibroblástico, convirtiéndose en unas células altamente proliferativas, fibrogénicas y contráctiles. De esta manera, las HSCs reducen considerablemente su capacidad de almacenar vitamina A e incrementan su tasa proliferativa, la síntesis de la mayoría de componentes de la MEC (colágeno tipos I, III, IV y VI, laminina, fibronectina, ácido hialurónico, etc.) en el espacio de Disse, la síntesis y secreción de MMPs, citoquinas y factores de crecimiento, y la regulación del flujo sanguíneo sinusoidal ⁷⁹. Además, esta transformación es continua, así que los cambios fenotípicos que experimentan las HSCs al principio de su activación pueden diferir en términos de crecimiento, señalización, inflamación y potencial apoptótico conforme la metástasis avanza ⁸⁰⁻⁸⁵.

De este modo, las células de CCR que interaccionan con las HSCs desencadenan una respuesta que provoca una remodelación de la MEC del hígado, caracterizada por eventos de degradación, y fases de síntesis y acumulación de sus componentes, principalmente de colágeno. Asimismo, las HSCs también participan en la infiltración de poblaciones inmunes, generando un ambiente inflamatorio, y en el reclutamiento de LSECs, lo que permite la formación de vasos sanguíneos. Todo ello, origina una re-ordenación o re-estructuración del tejido hepático, que favorece la captación de células estromales, transformándose en un nicho beneficioso para el asentamiento, proliferación, supervivencia y quimiorresistencia del tumor metastásico ⁸⁶⁻⁸⁹.

I.2.2.1.1.4 Hepatocitos

Los hepatocitos son células grandes con una morfología poliédrica, que conforman el parénquima del hígado y constituyen aproximadamente un 70-80% del total de tipos celulares que componen el tejido hepático. Se disponen en láminas de una célula de espesor, separadas por los sinusoides. En un organismo adulto, muchas de estas células (aproximadamente un 25%) son binucleadas y tetraploides, con uno o más nucleolos (Fig.9). Los hepatocitos llevan a cabo múltiples funciones, muchas de ellas relacionadas con la digestión y el metabolismo, como la desintoxicación de la sangre, la síntesis y degradación de ácidos grasos, carbohidratos y proteínas, el almacenaje de lípidos en inclusiones citoplasmáticas y de glucosa en forma de glucógeno, y la síntesis y secreción de la bilis, entre otras ⁹⁰.

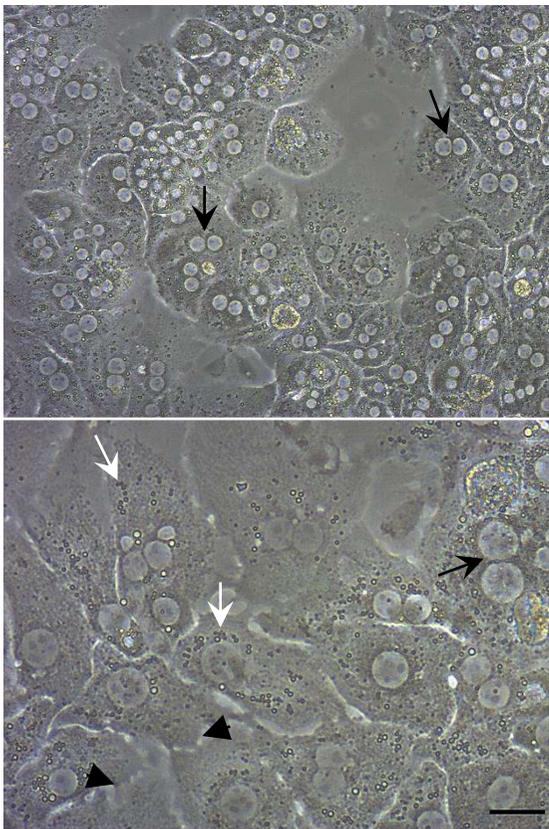


Figura 9. Cultivo primario de hepatocitos murinos a una confluencia del 90%. Tiempo de incubación de 20 horas tras el proceso de extracción. Se observan células poliédricas con dos grandes núcleos y nucleolos bien desarrollados en la mayoría de ellas (flechas negras). Además, se aprecian microvellosidades en la superficie celular (cabezas de flecha negra) que aumentan la superficie disponible para el intercambio de sustancias entre el hepatocito y el plasma ⁹⁰. Presentan también acúmulos de glucógeno e inclusiones lipídicas dispersas por el citoplasma (flechas blancas). Imágenes representativas de microscopía óptica de contraste de fases. Barra de escala, 20 μ m

Los hepatocitos juegan un papel importante durante la metástasis hepática, pudiendo intervenir en diferentes momentos del proceso.

Por un lado, esta población celular participa en la formación y el establecimiento del nicho pro-metastásico para el crecimiento de las células tumorales. Un estudio reciente sugiere que células metastásicas de adenocarcinoma ducal pancreático son capaces de activar los hepatocitos a través de la vía de señalización IL6/STAT3. Esta activación estimula la respuesta inflamatoria, así como la fibrosis hepática o alteración de la composición de la MEC por la acumulación de colágeno, ambas características promovidas por los hepatocitos, que facilitarán la colonización tumoral del hígado ⁹¹. Asimismo, células de CCR murino son capaces de inducir la apoptosis en los hepatocitos activando la ruta de señalización Fas en estas células, creando un nicho adecuado para la invasión del hígado y la expansión tumoral ^{92,93}.

Por otro lado, una vez que las células de CCR alcanzan los capilares hepáticos, pueden unirse a los hepatocitos mediante diferentes moléculas de adhesión. Esto permite la retención de las células cancerígenas en los sinusoides, además del aumento de la expresión de genes relacionados con la supervivencia, la migración y la proliferación tumoral ^{94,95}. Igualmente, además de inducir la expresión de factores metastásicos en las células de CCR mediante contacto directo, los hepatocitos pueden secretar multitud de factores de crecimiento y otras moléculas, estimulando la invasión y la progresión del tumor ⁹⁶.

En resumen, el hígado presenta una gran diversidad de tipos celulares implicados en la progresión metastásica. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de investigaciones al respecto, la relevancia clínica de las interacciones entre las células tumorales y las diferentes poblaciones celulares hepáticas aún no está del todo clara ⁹⁷.

I.2.2.1.1.5 Matriz extracelular (MEC) hepática

Además del constituyente celular, los cambios experimentados por la MEC del hígado durante la metástasis hepática también influyen de manera decisiva en el proceso, proporcionando un entorno biomecánico y bioquímico crucial para el desarrollo metastásico. Dichos cambios derivan normalmente de alteraciones en el balance entre la síntesis y la acumulación de los constituyentes de la matriz, así como en la actividad de las enzimas de degradación de la MEC o MMPS y sus inhibidores tisulares (TIMPs) ⁹⁸.

Generalmente, a lo largo de la progresión metastásica en el hígado, se produce una remodelación de la MEC basada en el incremento de la secreción de MMPs en las células de CCR, lo que hace posible la degradación de los componentes de la matriz y la invasión tumoral del tejido hepático. Sin embargo, las células de CCR también estimulan la activación de los TIMPs y los eventos de acumulación de MEC, sobre todo de su elemento fundamental, el colágeno ⁹⁹. Esto desemboca en la formación de una matriz rígida, que impulsará el potencial proliferativo, invasivo y la quimiorresistencia de las células tumorales ¹⁰⁰.

La re-estructuración de la MEC no sólo es llevada a cabo por las células de CCR, sino que, en respuesta a factores derivados del tumor, las células hepáticas, mayoritariamente las KCs ⁷³ y las HSCs ⁸⁶, son capaces de modificar la arquitectura matricial del hígado, fundamentalmente alterando la composición de colágeno de la MEC ^{101,102}. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales se producen estos cambios en la MEC no se conocen con exactitud.

En conjunto, la comunicación entre las células de CCR y los componentes del hígado conforman un MAT hepático complejo, donde se generan un torbellino de señales, principalmente citoquinas, factores de crecimiento y elementos de la MEC, que ejercen un determinado efecto en cada tipo celular hepático (Fig.10).

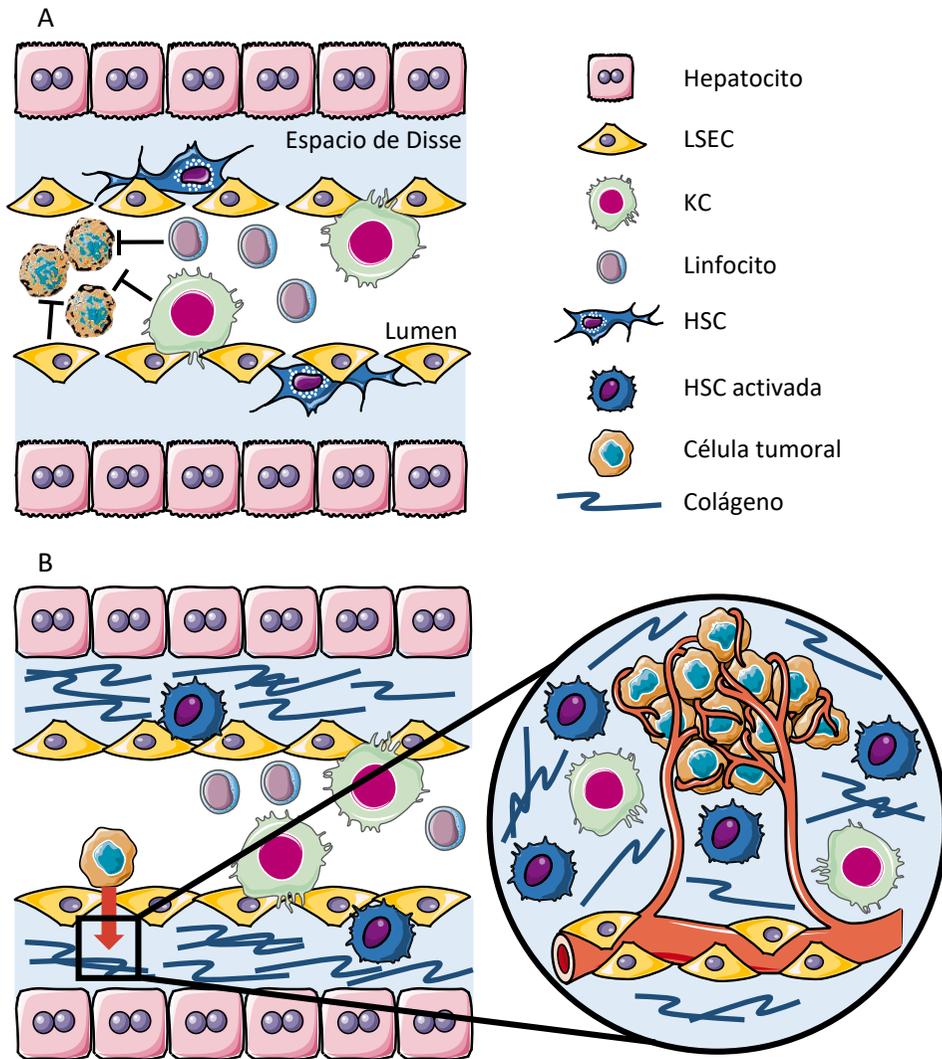


Figura 10. MAT hepático. Las células hepáticas pueden inhibir el crecimiento metastásico gracias al efecto citotóxico llevado a cabo por las LSECs y las poblaciones inmunes, sobre todo por los linfocitos y las KCs (A), o desarrollar un fenotipo activado en respuesta a los factores tumorales. Se genera entonces un MAT hepático, caracterizado por procesos inflamatorios, angiogénicos y de degradación y acumulación de los componentes de la MEC (mayoritariamente colágeno), en el cual el estroma del hígado, principalmente las SCs (LSECs, KCs y HSCs) y los hepatocitos, se asocia con el tumor promoviendo la metástasis (B)

En el MAT hepático, las interacciones intercelulares y con la MEC que coordinan el mantenimiento de la metástasis están mediadas por receptores celulares localizados en la membrana plasmática¹⁰³. De todos los tipos de receptores que existen, los llamados receptores tirosina quinasa (RTKs) son uno de los más estudiados, debido a su implicación en muchos procesos celulares, y a la desregulación de su actividad en el desarrollo cancerígeno y la progresión metastásica. Durante el crecimiento tumoral, las mutaciones que afectan a los RTKs a menudo desembocan en una transformación celular, que puede alterar sus capacidades proliferativas, migratorias o de supervivencia, entre otras¹⁰⁴.

I.3 Receptores tirosina quinasa (RTKs)

I.3.1 Concepto

Los RTKs son un tipo de receptores de membrana celular implicados en las interacciones célula-célula y célula-MEC, que participan en la regulación de una gran variedad de procesos celulares, como la proliferación, la migración, la apoptosis, la supervivencia y el metabolismo. Los RTKs se caracterizan por presentar una estructura proteica formada por tres zonas: un dominio extracelular, una hélice transmembrana y un dominio intracelular, que contiene una región regulatoria yuxtamembrana, un dominio tirosina quinasa y un extremo carboxilo terminal¹⁰⁵.

El mecanismo de activación de los RTKs consiste en la unión de un ligando o molécula extracelular de señalización específica, generalmente un factor de crecimiento, al dominio extracelular. Esta unión provoca cambios conformacionales en el receptor que dan lugar a la autofosforilación del dominio tirosina quinasa intracelular, permitiendo el reclutamiento de múltiples proteínas intracelulares, que desencadenarán la activación de una vía de

señalización específica. Multitud de estudios han demostrado alteraciones genéticas que derivan en la desregulación funcional de los RTKs durante el cáncer. De hecho, dichos receptores constituyen las principales dianas terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad ^{106,107}.

Actualmente se han descrito un total de 58 RTKs en humanos, agrupados en 20 subfamilias en función de la composición de su dominio extracelular. Dentro de esta clasificación se encuentran los RTKs con dominio discoidina (DDR) ¹⁰⁸.

1.3.2 Receptores con dominio discoidina (DDRs)

Los DDRs son un tipo de RTKs que poseen un dominio extracelular homólogo a la discoidina I, una lectina presente en la ameba *Dictyostelium discoideum* implicada en el mantenimiento de su morfología celular, su organización esquelética y en eventos de agregación celular ¹⁰⁹. Como otros RTKs, los DDRs participan en múltiples procesos celulares y tisulares, incluidos la diferenciación, la migración, la adhesión, la invasión, la regulación del desarrollo, la remodelación de la MEC, la angiogénesis y la respuesta inflamatoria ¹¹⁰⁻¹¹⁵.

La particularidad de estos receptores es que, a diferencia del resto de RTKs, el ligando de los DDRs es el colágeno, principal componente de la MEC. Este descubrimiento supuso la primera evidencia de interacción directa entre un RTK y la MEC. Hasta ese momento, se creía que la comunicación entre los elementos de la matriz y los RTKs se producía indirectamente, a través de factores de crecimiento; y que la señalización del colágeno únicamente tenía lugar a través de las integrinas y el receptor de plaquetas. Además, otra distinción de estos receptores es que la activación de los DDRs tras la unión del colágeno genera una fosforilación lenta y mantenida en el tiempo, que puede durar varias horas, algo que contrasta con los demás RTKs, los cuales se fosforilan con pocos segundos o minutos de estimulación y se desactivan rápidamente ¹¹⁶⁻¹²⁰.

Dentro de la subfamilia de los DDRs, se han definido dos miembros, DDR1 y DDR2. En humanos, el gen DDR1 tiene 17 exones que, mediante *splicing* alternativo, genera cinco isoformas (a-e) que difieren en su región intracelular o citoplasmática. Las isoformas a, b y c son funcionales; mientras que la d y la e son incapaces de fosforilarse, por falta del complejo tirosina quinasa o su disfuncionalidad, respectivamente. El gen DDR2 consta de 19 exones que codifican para una única isoforma (Fig.11) ^{121,122}.

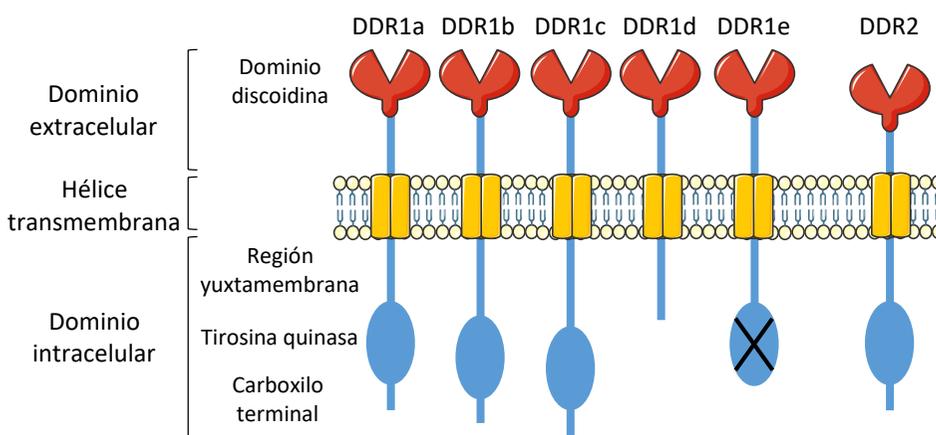


Figura 11. Estructura proteica de los DDRs, compuesta de tres regiones principales: extracelular, donde se encuentra el dominio discoidina; transmembrana e intracelular, formada por la región yuxtamembrana, la tirosina quinasa y el carboxilo terminal. El DDR1 posee cinco isoformas (a y b son las más abundantes). El DDR2 tiene una isoforma ^{121,122}

Como ya se ha mencionado, los DDRs se activan mediante colágeno, siempre y cuando esta proteína esté dispuesta en su estructura de triple hélice. Ambos receptores pueden unirse al colágeno que se organiza formando fibras o colágeno fibrilar, fundamentalmente los tipos I, II y III; así como al colágeno no fibrilar, aunque en este caso la afinidad varía. Por ejemplo, el colágeno tipo IV es específico del DDR1 y el tipo X del DDR2 ¹²³.

En condiciones fisiológicas, los DDRs se expresan en muchos tejidos y órganos, tanto durante el desarrollo embrionario como en organismos adultos. Por un lado, la expresión del DDR1 se ha descrito principalmente en células epiteliales, sobre todo del colon, el páncreas, el riñón, el pulmón, la glándula mamaria y el cerebro. Por otro lado, la expresión del DDR2 se ha observado fundamentalmente en fibroblastos y condrocitos, además de en órganos como el colon, las glándulas suprarrenales y el ovario. Asimismo, la expresión de ambos DDRs también ha sido descrita en diferentes poblaciones celulares del sistema inmune, como monocitos, linfocitos y neutrófilos.

Respecto a los niveles de expresión de los DDRs en el colon y el hígado, se sabe que el tejido colorrectal presenta una expresión elevada de ambos, siendo superior la del DDR1 comparándola con el DDR2. En cambio, el nivel de expresión de los DDRs es baja y similar en el tejido hepático. Aun así, no existe un análisis detallado de la expresión de dichos receptores por tipo celular en estos órganos ^{124,125}. Por lo general, las células muestran mayoritariamente uno de los dos DDRs y una baja expresión del otro, aunque también pueden tener poca cantidad de ambos. Se cree que esto se debe a que la expresión conjunta de los DDRs podría provocar un exceso de actividad o a la inducción de un fenotipo perjudicial. Además, recientemente se ha sugerido que los dos receptores podrían estar asociados, aunque se desconocen los efectos de dicha interacción ¹²⁶. Por tanto, las evidencias indican que la expresión de estos receptores está estrechamente controlada.

De hecho, la desregulación funcional de los DDRs está relacionada con muchos tipos de cáncer, incluyendo el CCR. Diferentes estudios han revelado la participación de estos receptores en muchas etapas del proceso cancerígeno, como en la autosuficiencia de señales proliferativas, la evasión de la apoptosis, la supresión de la respuesta inmune, la activación de la inflamación y la angiogénesis, y en las fases de invasión y metástasis ¹²⁷.

Si tenemos en cuenta que las modificaciones estructurales que sufre la MEC durante la progresión tumoral afectan fundamentalmente a la composición y distribución del colágeno fibrilar, principal ligando de los DDRs, la relación de estos receptores con el proceso canceroso y metastásico parece del todo lógica.

Estas alteraciones en la cantidad y estructura del colágeno matricial son moduladas tanto por las células cancerígenas como por las células del estroma tumoral asociado, bien durante el crecimiento del tumor primario, o en la conformación de la metástasis. De este modo, el componente celular del MAT configura la MEC mediante la degradación, o la síntesis y acumulación de colágeno, sobre todo de tipo I. A su vez, el colágeno matricial es capaz de modificar el comportamiento celular, desencadenando diferentes vías de señalización intracelular relacionadas con la proliferación, la regulación de la inflamación, la invasión y metástasis, el crecimiento y la integridad de los vasos sanguíneos, y la supervivencia celular. Así, el sistema de comunicación bidireccional establecido entre las células del MAT y el colágeno de la MEC, permite a las células tumorales coordinar multitud de propiedades y procesos biológicos, que van variando en función de las necesidades de la masa tumoral. Estas interacciones se llevan a cabo y se regulan mediante diferentes elementos celulares, dentro de los cuales se incluyen los DDRs ¹²⁸.

Por tanto, en la configuración del MAT, la expresión y actividad de los DDRs es crucial, no sólo en las células de cáncer, sino también en las células del estroma tumoral. En relación con esto, los DDRs se encuentran sobre-expresados en la mayoría de las células tumorales, por lo que el uso de inhibidores que bloquean su fosforilación, como dasatinib, imatinib, y nilotinib, está surgiendo como nueva herramienta terapéutica en el tratamiento contra esta enfermedad ¹²⁹⁻¹³². Sin embargo, apenas existe información sobre la expresión de estos receptores en las células del estroma tumoral asociado y mucho menos sobre su implicación en el desarrollo cancerígeno y la metástasis.

Considerando que el DDR1 es más abundante que el DDR2 en las células del colon y que interviene en muchas de las características que definen a la célula tumoral (Fig.12) ¹²⁷, su expresión y actividad en las células de CCR podrían estar relacionadas con su capacidad metastásica. Además, ya que el DDR1 también se encuentra en algunas células del estroma hepático, este receptor podría influir en el crecimiento de metástasis en este órgano.

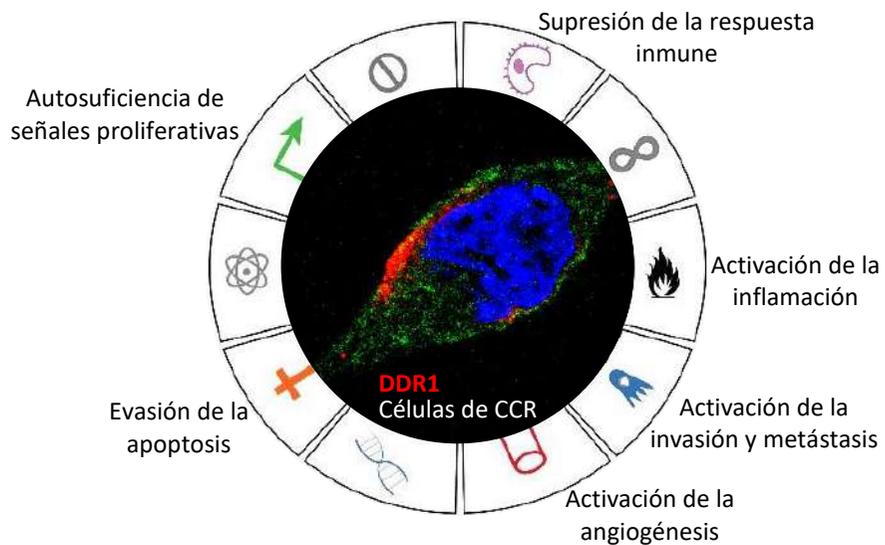


Figura 12. Contribución del DDR1 a las características de la célula tumoral. Adaptado de Henriët E y cols. ¹²⁷

I.3.2.1 DDR1 y metástasis

Dentro de todas las propiedades de la célula cancerígena controladas por el DDR1, hay una que está íntimamente relacionada con la metástasis, la denominada transición epitelio-mesenquimal (TEM). Este proceso define el potencial invasivo de las células de cáncer que conforman la masa tumoral de origen y, por tanto, determina su capacidad metastásica.

Asimismo, al igual que en el tumor primario, el DDR1 desempeña muchas funciones que afectan a las propiedades metastásicas de las células cancerosas y del microambiente en el órgano secundario. Concretamente, el DDR1 está relacionado con la regulación de la respuesta inflamatoria, la migración e invasión, la proliferación, la angiogénesis y la quimiorresistencia.

I.3.2.1.1 DDR1 y transición epitelio-mesenquimal (TEM)

La TEM consiste en un cambio fenotípico reversible, de características epiteliales a mesenquimales, que permite a las células cancerígenas desprenderse del tumor primario, potenciando así sus facultades invasivas y metastásicas ¹³³. Algunos estudios han establecido una relación inversa entre la expresión del DDR1 y la TEM en células tumorales de mama ¹³⁴ y de ovario ¹³⁵. Otros autores, por el contrario, proponen que la expresión del DDR1 induce la pérdida de características epiteliales y la aparición de propiedades mesenquimales en varios tipos de cáncer. Por ejemplo, la interacción entre el DDR1 y las integrinas estimula la TEM en células de carcinoma pancreático ¹³⁶. Además, la expresión del DDR1 se correlaciona con la aparición de marcadores de la TEM en tumor gástrico ¹³⁷ y con la activación de esta transformación fenotípica en células de osteosarcoma ¹³⁸ y de CCR ¹³⁹. Del mismo modo, la inhibición del DDR1 conlleva la reducción de la expresión de marcadores mesenquimales en células de cáncer renal ¹⁴⁰.

El proceso de TEM en el tumor de origen puede ser provocado por factores derivados del estroma. Por ejemplo, las células endoteliales del colon promueven la metástasis de las células de CCR, al activar la TEM en el tumor mediante la secreción de fibronectina, una proteína de la MEC ¹⁴¹.

Por otra parte, aunque normalmente la TEM se da en las células de cáncer primario, existen casos donde la TEM se convierte en un factor clave durante la

entrada de las células tumorales al órgano secundario, como ocurre en el hígado. Según Hu CT y cols., las células de CCR son capaces de sobrevivir en los sinusoides hepáticos, donde proliferan para generar pequeñas masas tumorales. Es decir, en la microvasculatura del hígado, las células de CCR se encuentran en un estado pro-metastásico. En este entorno, las LSECs pueden activar la TEM de las células cancerígenas mediante la secreción del factor de inhibición de la migración en macrófagos (MIF), facilitando su extravasación y su acceso al tejido hepático ¹⁴².

Estos estudios evidencian, por tanto, la importancia del estroma durante la TEM del cáncer, en particular la del endotelio, tanto en el ambiente primario como en el secundario. Sin embargo, mientras la expresión del DDR1 en el tumor se asocia generalmente con la estimulación de esta transformación fenotípica, se desconoce si la presencia y actividad del receptor en el estroma influyen en este proceso.

I.3.2.1.2 DDR1 y respuesta inflamatoria

Durante las primeras fases de la metástasis hepática, las poblaciones inmunes, principalmente las KCs y los linfocitos hepáticos, crean un ambiente pro-inflamatorio con el objetivo de suprimir el crecimiento tumoral. No obstante, los factores derivados de las células cancerígenas pueden activar a estas células del sistema inmunitario hepático, además de a las LSECs y HSCs, creándose una respuesta inflamatoria crónica que promueva la progresión metastásica ¹⁴³.

Por un lado, el reclutamiento de células inmunes hacia el tumor requiere su infiltración a través de la MEC ¹⁴⁴ y, puesto que el DDR1 se expresa en muchos de estos tipos celulares, especialmente en linfocitos T ^{114,145,146}, se ha sugerido que el receptor podría estar asociado con la captación de dichas poblaciones. Por otro lado, el DDR1 también podría estar involucrado en la secreción de

moléculas pro-inflamatorias, es decir, podría participar en la activación de la respuesta inmune. A este respecto, la activación del DDR1 en macrófagos humanos estimula la producción de citoquinas inflamatorias, como las interleuquinas IL1 β e IL8 ¹⁴⁷. De manera similar, la unión del DDR1 con el colágeno matricial regula la secreción de óxido nítrico, importante modulador de la respuesta inmune, en una línea celular de macrófagos murinos ¹⁴⁸. Sin embargo, se desconoce si las KCs, población mayoritaria y única de macrófagos hepáticos, expresan el DDR1, y que implicaciones podría tener en la configuración de un ambiente inflamatorio durante la metástasis hepática.

Igualmente, las LSECs y las HSCs participan en la inmunorregulación del hígado. Estas células pueden amplificar la respuesta inmune mediante la secreción de diferentes citoquinas, promoviendo la infiltración de monocitos y neutrófilos ¹⁴⁹. Aunque se ignora, como en las KCs, la expresión y activación del DDR1 en las LSECs y las HSCs podría estimular sus facultades pro-inflamatorias.

I.3.2.1.3 DDR1, migración e invasión

Al igual que ocurre en el proceso de TEM, el DDR1 puede inhibir o estimular la capacidad migratoria de las células tumorales.

Por una parte, la sobre-expresión de DDR1a en células de cáncer hepático reduce su migración hacia componentes de la MEC, en concreto el colágeno tipo I y la fibronectina ¹⁵⁰. También, el DDR1 presente en varias líneas celulares de carcinoma mamario disminuye su tasa migratoria al interactuar con la fosfoproteína DARPP32 ¹⁵¹.

Por otra parte, el DDR1 puede activar la migración y la invasión de células de glioma ¹⁵², hepatocarcinoma ¹⁵³ y de cáncer gástrico ¹⁵⁴. La habilidad de invadir y diseminarse a otros tejidos es una capacidad característica de las células

metastásicas que determina su nivel de agresividad. Dicha propiedad requiere de la interacción con la MEC, de manera que la activación de receptores y proteasas permite re-estructurar la matriz, evento crucial para la entrada de las células tumorales en nuevos ambientes. Además, la capacidad del DDR1 para unirse al colágeno tipo IV, característico de la membrana basal, y al tipo I, típico de la MEC, podría significar su participación en la transición de un carcinoma *in situ* a uno invasivo.

Numerosas investigaciones han propuesto la colaboración entre el DDR1 y las MMPs en muchos tipos de cáncer, principalmente las MMP2 y MMP9^{152,153,155-157}. Así, la función pro-invasiva del DDR1 parece estar relacionada con una sobre-expresión de MMPs, de modo que este receptor podría contribuir a la degradación y remodelación de los componentes de la MEC, facilitando la invasión tumoral a través de la misma. La interacción entre el DDR1 y las MMPs no sólo resulta en la modificación de la expresión y producción de las enzimas proteolíticas de matriz, sino que también las MMPs pueden alterar ciertas propiedades del receptor. Respecto a esto, HL Fu y cols. han descrito que varias enzimas colagenasas de matriz, las MMP14, MMP15 y MMP16 regulan la conformación y activación del DDR1 en células de carcinoma mamario, sugiriendo una comunicación en sentido inverso entre la MEC y el tumor¹⁵⁸.

En cuanto al DDR1 presente en el tejido hepático, se desconoce su papel durante la migración e invasión del CCR. Únicamente se ha planteado que la activación del DDR2, el otro tipo de receptor discoidina, promueve la expresión de MMP2 en las HSCs, estimulándose la remodelación de la MEC mediante la degradación de colágeno matricial y favoreciéndose la entrada de las células de CCR en el hígado^{112,113}. Dada la función principal de las HSCs en la re-estructuración de la matriz mediante la degradación, y la síntesis y acumulación de sus componentes⁷⁹, así como la elevada tasa de secreción de MMPs de las KCs⁷³, estas poblaciones celulares del hígado podrían participar activamente en la migración

y la invasión de las células de CCR por mediación del DDR1, si expresasen claro está este receptor.

Otro aspecto a tener en cuenta es que el reclutamiento de células estromales por parte de las células tumorales contribuye a la progresión metastásica⁸. Esto quiere decir que factores derivados del tumor podrían inducir la migración de las SCs hepáticas, es decir, de las LSECs, KCs y HSCs, mediante la activación de su DDR1, considerando que estas células del hígado lo expresarían. En relación con esto, existen estudios que indican que la capacidad migratoria e invasiva de las células del sistema inmune y los fibroblastos podría estar regulada por el DDR1^{114,159}.

Todo ello significa que, en caso de estar presente en las SCs hepáticas, el DDR1 podría participar en la remodelación de la MEC en el hígado metastatizado, promoviendo la captación de estas células hacia el tumor. Esta infiltración de células estromales potenciaría además la respuesta inflamatoria, proliferativa, angiogénica y de supervivencia, favoreciendo el desarrollo metastásico.

I.3.2.1.4 DDR1 y proliferación

Estudios *in vitro* e *in vivo* han establecido que el DDR1 promueve la proliferación tumoral mediante la activación de diferentes vías de señalización en células de cáncer de esófago¹⁶⁰, glioma¹⁶¹ y adenocarcinoma pancreático¹⁶², entre otros. Sin embargo, la activación del DDR1 también puede suponer un factor pro-apoptótico. Por ejemplo, un estudio ha demostrado que la fosforilación del DDR1 mediada por colágeno tipo I induce la apoptosis en células de cáncer de mama¹⁶³. Siguiendo esta línea de investigación, recientemente Saby C y cols. han señalado que altos niveles de expresión de DDR1 se correlacionan con la activación de la apoptosis y la reducción de la tasa proliferativa en células de carcinoma mamario invasivo¹⁶⁴. Esto indica que, de manera similar a lo que

sucede durante la TEM, la migración y la invasión, el papel del DDR1 en el crecimiento tumoral parece depender del tipo de célula cancerígena en cuestión.

La implicación del DDR1 hepático en la proliferación de las células de CCR se desconoce. De hecho, aunque existen múltiples análisis de la función del DDR1 tumoral, apenas hay estudios que relacionen el DDR1 expresado en el tejido del órgano metastatizado con la tasa proliferativa de las células de cáncer. En este sentido, actualmente se ha establecido que las células del estroma mamario son capaces de remodelar la matriz del MAT mediante la deposición de colágeno matricial, todo ello regulado por el DDR1. De esta manera, dicha reestructuración llevada a cabo por el estroma, promueve el crecimiento de las células de cáncer de mama ¹⁶⁵. De igual modo, si las células del estroma hepático expresaran DDR1, podrían modular la proliferación tumoral del CCR a través del mismo.

I.3.2.1.5 DDR1 y angiogénesis

La formación de vasos sanguíneos a partir de los existentes (angiogénesis) o *de novo* (vasculogénesis) proporciona nutrientes y oxígeno a las células tumorales permitiendo su progresión y supervivencia, por lo que estos procesos constituyen factores clave para el desarrollo metastásico. Las células de cáncer secretan multitud de sustancias, principalmente el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que estimulan la proliferación y la infiltración de las células endoteliales hacia el tumor, encargadas de la formación de la vasculatura. Recientemente, se ha propuesto que el DDR1 podría modular la secreción de VEGF en células de cáncer gástrico, regulando por tanto la formación de vasos sanguíneos ¹⁵⁴.

En el hígado, son las LSECs las que mayoritariamente intervienen en la angiogénesis y vasculogénesis. No obstante, las HSCs, localizadas sobre el endotelio, contribuyen a dichos procesos mediante la estabilización y el mantenimiento de la vasculatura gracias a su capacidad contráctil ^{77,78}. Durante su activación, las HSCs sobre-expresan el receptor para VEGF, lo que sugiere que podrían participar, junto con las LSECs, en la respuesta angiogénica hepática promovida por los factores tumorales ¹⁶⁶. De todos modos, no existen estudios que describan la implicación del DDR1 estromal en la vascularización del hígado.

Para la formación de los vasos sanguíneos, las LSECs deben ser capaces de degradar la membrana basal y la MEC con el fin de abrirse paso a través del estroma. Para ello, estas células generan unas estructuras denominadas invadosomas, extensiones celulares capaces de unirse y degradar los componentes de la MEC ¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Sin embargo, se desconoce el papel del DDR1 endotelial en el desarrollo de estas estructuras necesarias para la angiogénesis.

Al igual que en las LSECs, los invadosomas son característicos de las células tumorales, ya que les facilitan el paso a través de las barreras anatómicas durante la invasión. En este contexto, la expresión del DDR1 se asocia con la formación de invadosomas en muchos tipos de cáncer, como el carcinoma mamario, el adenocarcinoma pulmonar, el hepatoma y la leucemia ¹⁷⁰.

I.3.2.1.6 DDR1 y quimiorresistencia

Varias investigaciones han demostrado que la expresión del DDR1 está relacionada con un aumento de la quimiorresistencia del tumor a diferentes medicamentos. El DDR1 es capaz de activar distintas vías de señalización que se traducen en un aumento de la supervivencia de células de cáncer de próstata ¹⁵⁶, de mama ¹⁷¹ y de colon ¹⁷², entre otros. Por ejemplo, el silenciamiento de la expresión del DDR1 en células de carcinoma ovárico incrementa su sensibilidad

y apoptosis tras el tratamiento con cisplatino ¹⁷³. Asimismo, la inhibición del DDR1 en células de adenocarcinoma ductal pancreático aumenta la efectividad de la terapia citotóxica anti-tumoral ¹⁷⁴. Incluso, Hur H y cols. han definido al DDR1 como marcador pronóstico en pacientes con tumor gástrico que previamente habían recibido un tratamiento adyuvante, correlacionando la expresión de este receptor con una tasa de supervivencia baja ¹⁷⁵.

Por otra parte, está ampliamente aceptado que uno de los mecanismos de adquisición de resistencia a fármacos es el mediado por el propio MAT ¹⁷⁶. En relación con esto, el principal tipo celular estromal que contribuye a la quimiorresistencia del tumor son los fibroblastos asociados al cáncer.

Por un lado, los fibroblastos del estroma tumoral pueden secretar diversos factores de crecimiento, que promueven la metástasis y la supervivencia de las células cancerígenas frente a tratamientos anti-tumorales, como se ha observado en tumores primarios de colon ¹⁷⁷ y de hígado ¹⁷⁸. Por otro lado, además de las células del tumor, los fibroblastos son el tipo celular estromal con mayor capacidad para producir proteínas de matriz, especialmente colágeno, las cuales juegan un importante papel incrementando la quimiorresistencia de las células cancerígenas. Un estudio reciente ha demostrado que la síntesis de colágeno y fibronectina, no sólo por las células tumorales, sino también por las células estromales, principalmente los fibroblastos, aumenta la supervivencia de células de cáncer de esófago ¹⁷⁹. Igualmente, la activación de fibroblastos por células de carcinoma mamario ¹⁸⁰ y de CCR ¹⁸¹ favorece la resistencia del tumor a diferentes fármacos, gracias a la secreción de proteínas de la MEC.

Estos estudios revelan la importancia del colágeno en la quimiorresistencia del cáncer. Dado que es el principal ligando del DDR1, la expresión de este receptor en el estroma del órgano secundario, al igual que en el tumor primario, podría regular la supervivencia de las células tumorales tras el tratamiento anti-cancerígeno.

En conjunto, el MAT del hígado representa un factor determinante en la evolución de la metástasis hepática de CCR. La implicación del MAT en la progresión metastásica radica en la comunicación bidireccional entre las células tumorales y el estroma, constituido por diferentes poblaciones celulares y MEC. En este entorno dinámico, la matriz constituye el componente estromal mayoritario y desempeña una función estructural esencial para el mantenimiento de la integridad celular y tisular. Durante la metástasis, las interacciones, no sólo de las células tumorales, sino también de las estromales con la MEC modifican sus propiedades físicas y químicas, con el fin de conformar un nicho favorable para el crecimiento de las células cancerígenas. El colágeno fibrilar, la proteína más abundante de la MEC, sufre multitud de cambios que afectan a su cantidad, distribución y disposición, y que están asociados con el crecimiento metastásico. De este modo, la unión mediada por receptores, como el DDR1, entre las células cancerígenas y estromales, y las fibras de colágeno regula la progresión tumoral y constituye uno de los factores pronósticos de esta enfermedad.

De ahí, la importancia de la expresión y actividad del DDR1 tumoral y también del DDR1 presente en el estroma hepático a lo largo de la cascada metastásica de las células de CCR.

II. Hipótesis y objetivos

La **hipótesis** que planteamos en este trabajo es que la expresión y actividad del DDR1 en las SCs hepáticas y en las células de CCR metastásico, podría influir en la conformación de un ambiente pro-metastásico en el hígado, promoviendo la entrada y el crecimiento del tumor.

Para comprobar dicha hipótesis, proponemos los siguientes **objetivos**:

1. Desarrollar un modelo *in vitro* de interacción entre las tres poblaciones de SCs hepáticas (LSECs, KCs y HSCs) y las células de CCR metastásico.
2. Determinar la expresión, sub-localización y actividad del DDR1 en las SCs hepáticas y en tres líneas celulares de CCR metastásico.
3. Dilucidar el papel del DDR1 sinusoidal en una serie de propiedades estromales y tumorales relacionadas con la metástasis, durante la comunicación entre las SCs hepáticas y las células de CCR metastásico.
4. Evaluar la implicación del DDR1 tumoral en la capacidad metastásica *in vitro* y en el desarrollo de metástasis hepáticas de CCR *in vivo*.

III. Materiales y métodos

III.1 Células primarias hepáticas

III.1.1 Aislamiento

Para la obtención de células primarias hepáticas se emplearon ratones de la cepa BALB/c, con la aprobación del Comité de Ética de Experimentación Animal. El aislamiento de las poblaciones celulares del hígado (hepatocitos, LSECs, KCs y HSCs) se llevó a cabo siguiendo el protocolo establecido por Smedsrød y Pertoft en 1985¹⁸², con pequeñas modificaciones. En primer lugar, para eliminar la sangre, el hígado fue perfundido (solución de perfusión: 3.5M NaCl, 0.2M KCl, 0.2M HEPES y 3.75M NaOH; Sigma-Aldrich, Estados Unidos) a través de la vena cava, a una velocidad de 4ml/minuto durante 5 minutos. A continuación, para el proceso de digestión enzimática del órgano, se procedió a una segunda perfusión con una solución (0.7M NaCl, 67mM KCl, 1M HEPES, 54mM CaCl₂·H₂O y 16.5M NaOH; Sigma-Aldrich) al 0.02% de colagenasa tipo IV (Sigma-Aldrich), a 7ml/minuto durante 8 minutos. Tras extraer el hígado, éste fue disgregado sobre una placa Petri (Sarstedt, Alemania) mediante movimientos lineales rápidos con ayuda de unas pinzas quirúrgicas. De esta manera, se desprendió la cápsula de Glisson (envoltura fibrosa que recubre el hígado) y se obtuvo una suspensión celular, que fue centrifugada dos veces a 33 g durante 2 minutos a 4°C. Como resultante se obtuvo un precipitado compuesto por células del parénquima hepático, alrededor de un 90% correspondiente a hepatocitos y de donde se extrajo este tipo celular, y un sobrenadante enriquecido en células no parenquimatosas. Éste último fue sometido a una centrifugación isopícnica mediante un gradiente de densidades (50%, 31% y 24%) con Percoll (MP Biomedicals, Estados Unidos) para obtener las SCs. Las LSECs fueron recogidas de la fase inferior y las HSCs de la superior. Las KCs fueron aisladas gracias a su capacidad para adherirse rápidamente al plástico, realizando un lavado con medio de cultivo 15 minutos tras la siembra.

III.1.2 Cultivo

Las células primarias hepáticas (Fig.13) fueron cultivadas en medio RPMI-1640, suplementado con penicilina (100U/ml), estreptomicina (100µg/ml), anfotericina B (0.25µg/ml) y gentamicina (50µg/ml) (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), e incubadas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂.

Por un lado, se cultivaron en placas de 24 pocillos (Sarstedt) 1.5×10^5 hepatocitos/cm² con medio en ausencia de suero bovino fetal (SBF) durante 15-20 horas hasta su uso. Este periodo permite que los hepatocitos se adhieran completamente al plástico y preserven sus funciones¹⁸³. Por otro lado, las LSECs y las KCs se mantuvieron con una concentración del 5% de SBF (Thermo Fisher Scientific). Las LSECs se sembraron a una densidad de 8×10^5 células/cm² sobre placas de 48 pocillos (Sarstedt) pre-tratadas con colágeno tipo I (Col I) (Thermo Fisher Scientific) al 1% durante 30 minutos, mientras que las KCs se cultivaron directamente sobre plástico en placas Petri, a una concentración de 2×10^5 células/cm². Con la finalidad de que las células se recuperasen tras el proceso de extracción y aislamiento, y se adhiriesen correctamente, ambos tipos celulares se incubaron durante 3 horas. Este tiempo de incubación permite que se mantengan las características funcionales celulares, como la expresión del receptor de manosa en las LSECs⁶⁴ y la capacidad secretora de las KCs¹⁸⁴. Después, las LSECs y las KCs se usaron en diferentes experimentos. Por último, las HSCs se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 4×10^5 células/cm² y se mantuvieron a una concentración del 0.5% de SBF durante un día y del 5% a lo largo del segundo día. Bajo estas condiciones, las HSCs se adhirieron completamente al plástico, apenas proliferaron, mantuvieron sus inclusiones lipídicas y expresaron el marcador α -actina de músculo liso (α -SMA), considerándose un fenotipo transitorio entre el estado quiescente y el activado^{185,186}. Las HSCs se usaron a partir del tercer día en diferentes experimentos.

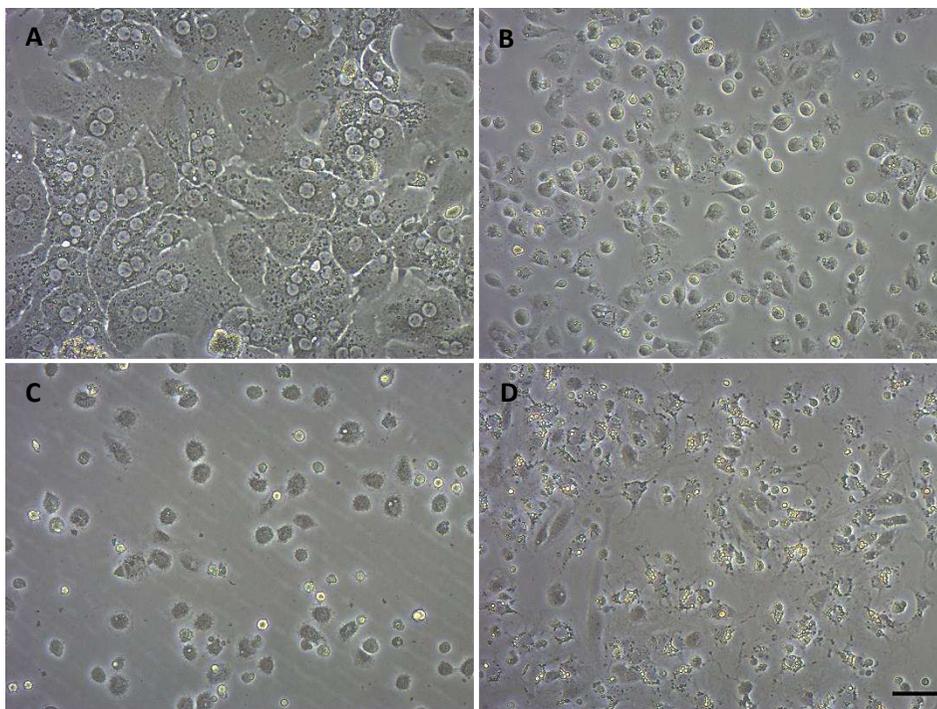


Figura 13. Cultivos de células primarias hepáticas. Hepatocitos (A), LSECs (B), KCs (C) y HSCs (D) a un 90%, 80%, 50% y 80% de confluencia, respectivamente. Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases. Barra de escala, 40 μ m

III.2 Líneas celulares

III.2.1 Células de CCR

Las líneas celulares murinas (C26 y MCA38) y humana (HT29) de CCR metastásico (Fig.14) fueron obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Estados Unidos). Las células C26 y MCA38 fueron cultivadas en medio RPMI-1640 y el medio McCoy's (Thermo Fisher Scientific) fue utilizado para las células HT29, ambos suplementados con SBF al 10%, penicilina (100U/ml), estreptomycin (100 μ g/ml) y anfotericina B (0.25 μ g/ml). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂.

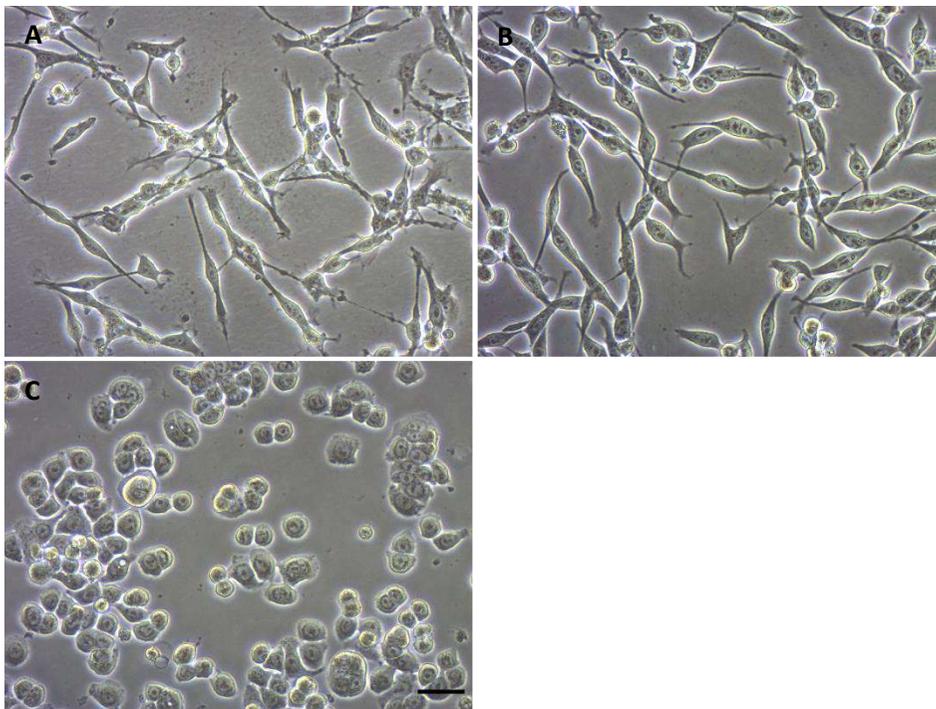


Figura 14. Cultivos de células de CCR metastásico. C26 (A), MCA38 (B) y HT29 (C) a un 60% de confluencia. Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases. Barra de escala, 40 μ m

Para el sub-cultivo, al alcanzarse el 90% de confluencia, el medio fue sustituido por tampón fosfato salino (PBS) 1X para eliminar los restos de suero. Después, las células C26 se trataron con PBS 1X-EDTA 4mM (PanReac AppliChem, Estados Unidos), y las células MCA38 y HT29 se incubaron con tripsina-EDTA 0.05% (Thermo Fisher Scientific), en ambos casos durante aproximadamente 5 minutos a 37°C y al 5% de CO₂, hasta despegar la mono-capa celular del plástico. La suspensión celular obtenida fue centrifugada a 250 g durante 5 minutos a 4°C y el precipitado resultante fue re-suspendido homogéneamente en medio de cultivo completo, llevándose a una dilución 1:10. Finalmente, 1 ml de dicha suspensión celular se sembró en frascos de cultivo T75 (Sarstedt). Las células fueron desechadas tras 10 pases y sustituidas por nuevos lotes.

III.2.2 Células no tumorales

Las líneas celulares murinas de fibroblastos (3T3) y macrófagos (J774A.1) (Fig.15) fueron obtenidas de la ATCC. Las células fueron cultivadas en medio RPMI-1640, suplementado con SBF al 10%, penicilina (100U/ml), estreptomycin (100µg/ml) y anfotericina B (0.25µg/ml). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂.

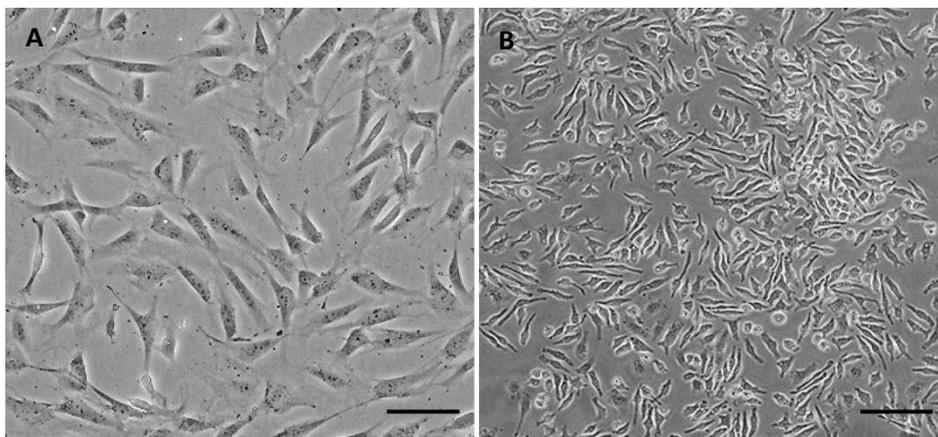


Figura 15. Cultivos de células no tumorales. Fibroblastos 3T3 (A) y macrófagos J774A.1 (B) a un 90% de confluencia. Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases obtenidas de la ATCC. Barra de escala, 100µm

El sub-cultivo de fibroblastos 3T3 se llevó a cabo del mismo modo que en las células de CCR MCA38 y HT29 (apartado anterior). Sin embargo, los macrófagos J774A.1, al ser células más sensibles al efecto tóxico de la tripsina y a la fuerza rotatoria, fueron despegados del plástico mediante un raspador (Thermo Fisher Scientific) y no se centrifugaron. Las células fueron desechadas tras 10 pases y sustituidas por nuevos lotes.

III.3 Extracción de ARN

Las células se lavaron dos veces con PBS 1X frío. La lisis celular y la extracción de ARN total se realizaron usando el *Kit* de Purificación de ARN de Norgen (Norgen Biotek Corporation, Canadá). Después, se comprobó la concentración y la pureza de las muestras mediante un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Finalmente, las muestras se almacenaron a -20°C para su posterior uso.

III.4 Extracción de proteína

Las células se lavaron dos veces con PBS 1X frío. La lisis celular y la extracción de proteína se realizaron usando la solución Laemmli (BIO-RAD, Estados Unidos) 1X al 1% de beta-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), a una concentración aproximada de 100µl/10⁶ células. Seguidamente, las muestras se homogeneizaron pasándolas 5 veces arriba y abajo por una jeringa con un diámetro interior de 20g (Sigma-Aldrich). La cuantificación de la proteína total se realizó mediante la técnica de turbidimetría con ácido tricloroacético (TCA, Fluka Biochemika, Suiza) y midiendo la absorbancia del medio a 570 nm mediante un espectrofotómetro Synergy HT (Biotek, Estados Unidos) ¹⁸⁷. Finalmente, las muestras se almacenaron a -20°C para su posterior uso.

III.5 Obtención de secretomas

Los secretomas celulares se obtuvieron como medios condicionados (MCs) de las células incubadas durante 24 horas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ en medio de cultivo al 5% de SBF (SCs) o sin suero (células de CCR C26). En el caso de las SCs, al ser incapaces de proliferar y debido al cultivo de densidades

celulares óptimas para la experimentación, sacrificando el menor número de ratones, las LSECs y HSCs se sembraron a una confluencia del 80%, y las KCs del 50%. Las células C26, por su parte, se cultivaron a una confluencia del 90%. Finalmente, los MCs fueron centrifugados a 1200 g durante 5 minutos y a 4°C para eliminar los restos celulares y almacenados a -20°C para su posterior uso.

III.6 Tratamientos

III.6.1 Modelo *in vitro* de interacción celular sinusoide-tumor

Para el diseño de un modelo *in vitro* de comunicación entre las SCs hepáticas y las células de CCR, las SCs fueron incubadas con factores solubles tumorales, y las células de CCR C26 fueron cultivadas con factores solubles sinusoidales.

III.6.1.1 Activación de las SCs con factores tumorales solubles

Las SCs se incubaron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ con el secretoma de las células de CCR C26 diluido 1:2 con medio de cultivo y a una concentración final del 5% de SBF durante 1 hora, para la extracción de ARN, o durante 24 horas, para la extracción de ARN y proteína. Estas células se denominaron SCs activadas por tumor (SCs-TA).

III.6.1.2 Activación de las células de CCR C26 con factores sinusoidales solubles

Las células de CCR C26 se incubaron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ con el secretoma de cada una de las SCs (LSECs, KCs y HSCs) diluido 1:2 con medio de cultivo y a una concentración final del 2.5% de SBF durante 24 horas, para la extracción de ARN y proteína. Estas células se consideraron C26 activadas por sinusoide (C26-SA).

III.6.2 Activación de DDR1

La fosforilación del DDR1 se activó incubando las células a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ durante 3 horas con Col I 10nM en medio de cultivo. En el caso de las SCs, el medio fue suplementado con SBF al 5%. Las células de CCR, los fibroblastos 3T3 y los macrófagos J774A.1 fueron cultivados en placas de 24 pocillos a una concentración de 7.5x10⁴ células/cm² en ausencia de suero, al 0.5% y al 1% de SBF, respectivamente (Fig.16).



Figura 16. Activación de DDR1 de SCs, células de CCR, fibroblastos 3T3 y macrófagos J774A.1 con Col I. * DDR1 activado

III.6.3 Bloqueo de DDR1

La fosforilación del DDR1 se bloqueó incubando las células a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ con el compuesto químico inhibidor DDR1-IN-1 (Tocris Bioscience, Reino Unido), altamente específico y contrastado ^{188,189}, en medio de cultivo. Las líneas celulares no tumorales 3T3 y J774A.1 se emplearon para determinar la concentración del inhibidor químico capaz de bloquear la fosforilación del DDR1, sin causar alteración de la morfología celular y/o apoptosis. Después, dicha concentración fue usada para tratar las SCs.

Las células 3T3, J774A.1 y HT29 se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 7.5x10⁴ células/cm² al 0.5%, al 1% y sin SBF, respectivamente, y se incubaron durante 3 horas para permitir su adherencia al plástico. Después, las células fueron pre-tratadas durante 1 hora con concentraciones crecientes del

compuesto bloqueante DDR1-IN-1 (células no tumorales: 0, 5, 10, 50, 80, 100nM y células tumorales: 0, 50, 100, 200nM), y tratadas posteriormente con medio de cultivo fresco con 10µg/ml de Col I y la concentración correspondiente de DDR1-IN-1 durante 2 horas. Se eligieron 100nM y 200nM como las concentraciones máximas de DDR1-IN-1 en células no tumorales y tumorales, respectivamente, ya que a partir de dichas cantidades comenzó a aparecer daño celular (alteración de la morfología). Tras comprobar la toxicidad y la efectividad de las diferentes concentraciones del compuesto DDR1-IN-1 empleadas, el bloqueo de la fosforilación del DDR1 en las SCs se realizó incubando las células con medio al 5% de SBF y 70nM de DDR1-IN-1 (Fig.17). Además de por los resultados preliminares obtenidos con las líneas celulares no tumorales 3T3 y J774A.1, se eligió 70nM como concentración máxima de DDR1-IN-1 porque dosis superiores provocaron la muerte de las SCs.

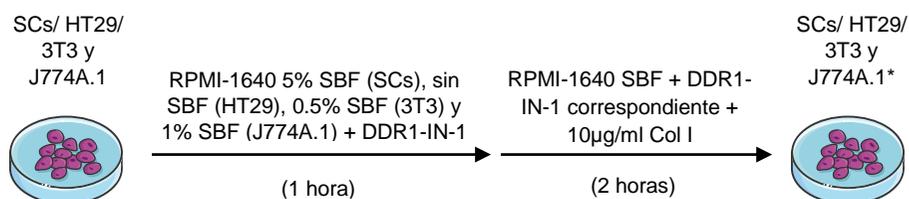


Figura 17. Bloqueo de DDR1 de SCs, células de CCR HT29, fibroblastos 3T3 y macrófagos J774A.1 con DDR1-IN-1. * DDR1 bloqueado

III.6.4 Combinación de tratamientos

III.6.4.1 Bloqueo de DDR1 en SCs activadas por tumor (-TA)

Con el fin de dilucidar la implicación del DDR1 sinusoidal en la respuesta de las SCs al tumor, se extrajeron lisados proteicos y secretomas de SCs, expuestas a Col I, combinando los tratamientos de activación con factores tumorales en primer lugar y posterior bloqueo del DDR1.

Por un lado, para conseguir los lisados proteicos, se obtuvieron SCs-TA, incubándolas con factores tumorales tal como se ha explicado, durante una noche. Después, se procedió al bloqueo del DDR1 como ya se ha descrito, resultando en los siguientes 4 grupos: SCs control (SCs-∅) tratadas (+) o no (-) con el inhibidor y SCs-TA tratadas (+) o no (-) con el inhibidor.

Por otro lado, para la obtención de los secretomas, se prosiguió el tratamiento en los 4 grupos de SCs. De esta manera, el medio fue sustituido por medio de cultivo fresco al 5% de SBF durante 24 horas, resultando en el consiguiente secretoma (Fig.18).

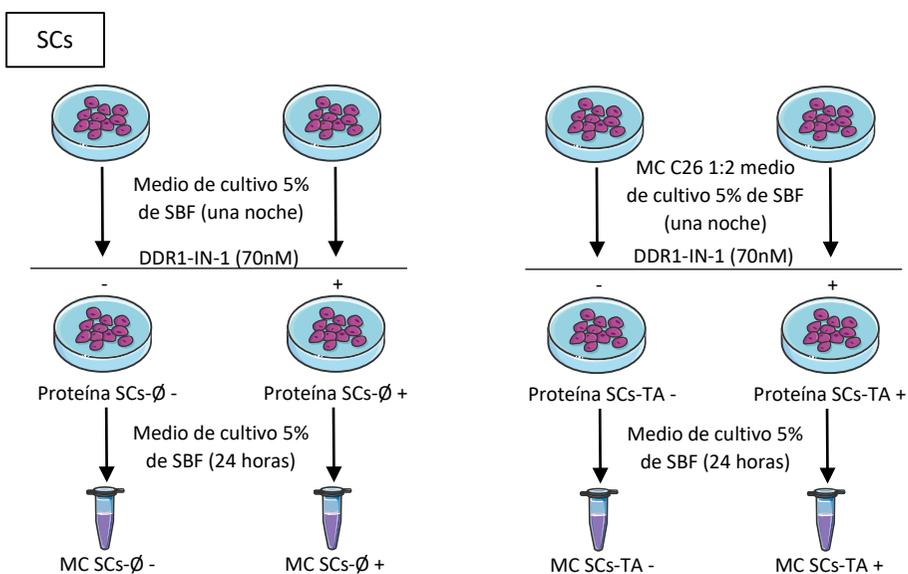


Figura 18. Proteína y secretomas o MCs de las SCs resultantes de la interacción con el tumor. Control (-∅), activadas por tumor (-TA), sin inhibidor (-) y con inhibidor (+)

III.6.4.2 Tratamiento de células C26 activadas por sinusoide (-SA)

Para analizar el papel del DDR1 sinusoidal en la respuesta de las células del tumor a los factores de las SCs, se extrajeron lisados proteicos y secretomas de

células de CCR C26, expuestas a Col I, tratadas con los secretomas de las SCs resultantes de la combinación de tratamientos del apartado anterior.

Para conseguir los lisados proteicos, se obtuvieron células C26-SA, incubándolas con factores sinusoidales durante 24 horas como se ha comentado previamente. Se definieron los 5 grupos siguientes: C26 basales, C26 activadas por sinusoide control (C26 SA- \emptyset) sin (-) o con (+) la inhibición del DDR1 sinusoidal y C26 activadas por sinusoide activado por tumor (C26 SA-TA) sin (-) o con (+) la inhibición del DDR1 sinusoidal.

Para la obtención de los secretomas, se continuó el tratamiento en los 5 grupos de células C26, sustituyendo el medio por medio de cultivo fresco sin suero durante 24 horas, resultando en el consiguiente secretoma (Fig.19).

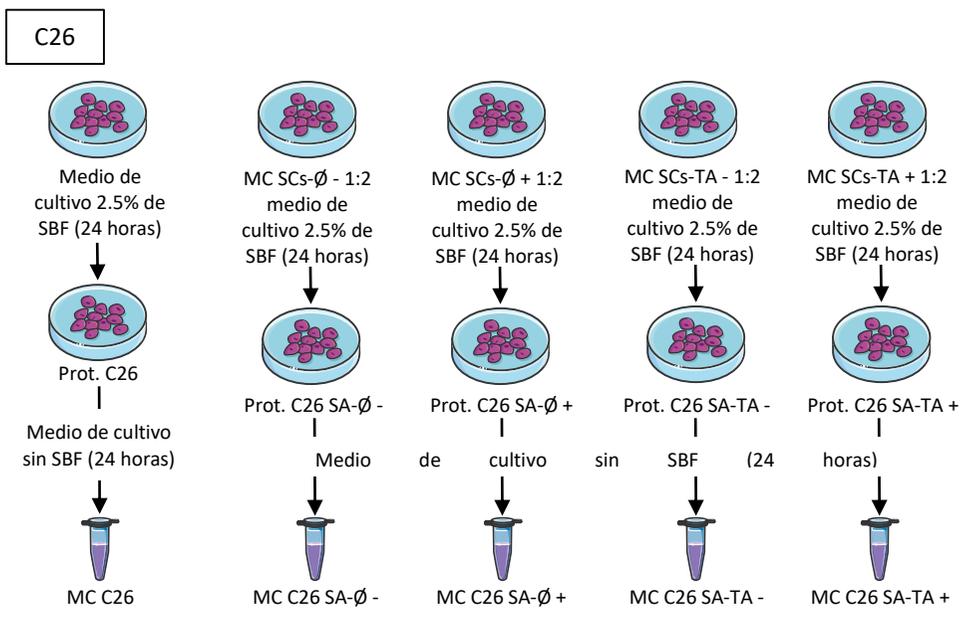


Figura 19. Proteína y secretomas o MCs de las células de CCR C26 resultantes de la interacción con el sinusoide hepático. Control (\emptyset), activadas por sinusoide (-SA), sin inhibidor (-) y con inhibidor (+)

III.7 PCR

III.7.1 Convencional

La cantidad de ADN se amplificó utilizando el *Kit* AmpliTaq^R ADN Polimerasa (Thermo Fisher Scientific) y cebadores específicos (Tabla II) en un termociclador (BIO-RAD). Después, se cargaron un total de 250ng de muestra (diluida en solución de carga TrackItTM Cyan/Orange, Thermo Fisher Scientific) por pocillo en geles al 1% de agarosa (Sigma-Aldrich). La electroforesis se llevó a cabo durante 1 hora a 90mV. Finalmente, las bandas se visualizaron en el equipo de quimioluminiscencia SynGene. El programa FIJI-ImageJ se empleó para cuantificar la expresión génica, usando RPS15 como gen constitutivo.

Tabla II. Cebadores para PCR convencional. Nombre y secuencia (5' → 3')

Nombre	Secuencia (adelante)	Secuencia (reversa)
DDR1		
<i>Receptor dominio discoidina 1</i>	GCGTCTGTCTGCGGGTAGAG	ACGGCCTCAGATAAATACATTGTCT
RPS15		
<i>Proteína ribosómica S15</i>	AGACGAGTTTCAGTGTTGCC	AGACCACAGCCTCAGACAAG

III.7.2 Cuantitativa

1µg de ARN se transcribió inversamente a ADNc utilizando el *Kit* de Transcripción Inversa iScriptTM (BIO-RAD) en un termociclador (BIO-RAD). Finalmente, el ADNc se cuantificó usando el *Kit* Universal SYBR[®] Green iTaqTM (BIO-RAD) y cebadores específicos (Tabla III) en un termociclador ABI 7900HT

(Thermo Fisher Scientific). El programa ABI Prism SDS2.0 se empleó para cuantificar la expresión génica, usando GAPDH como gen constitutivo.

Tabla III. Cebadores para PCR cuantitativa. Nombre y secuencia (5' → 3')

Nombre	Secuencia (adelante)	Secuencia (reversa)
COX2 <i>Ciclooxigenasa 2</i>	TGCACTATGGTTACAAAAGCTGG	TCGGAAGCTCCTTATTTCCCTT
IL6 <i>Interleuquina 6</i>	TCTATACCACTTCACAAGTCGGA	GAATTGCCATTGCACAACCTTTT
IL10 <i>Interleuquina 10</i>	ACAGCCGGGAAGACAATAACT	GCAGCTCTAGGAGCATGTGG
PDGF <i>Factor de crecimiento derivado de plaquetas</i>	TGAGAACCAGCAGAGGCATTT	GCCACCATGCTGATTTCCAG
VEGF <i>Factor de crecimiento endotelial vascular</i>	TGTACCTCCACCATGCCAAG	ACTTGATCACTTCATGGGACTTCT
COL1A1 <i>Colágeno tipo I alfa 1</i>	TGGGCATCTGGTTTAGCCTT	TGACTGTCTTGCCCCAAGTT
GAPDH <i>Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa</i>	GTATGACTCCACTCACGGCAA	CTTCCCATTCTCGGCCTTG

III.8 Western blot

Las muestras proteicas se calentaron a 100°C durante 5 minutos para desnaturalizar la proteína. Se cargaron 10µg y 20µg de lisados proteicos de células primarias y líneas celulares, respectivamente. La electroforesis se llevó a cabo en geles de acrilamida (BIO-RAD) al 15% (para detectar CD146, F4/80, GFAP, MMP14, TIMP2, CASP3, PAKT, AKT, PERK y ERK), al 10% (para detectar DDR1 y PDDR1) y al 7.5% (para detectar ICAM1, VCAM1, Ki67 y MMP9), durante 90 minutos a 90mV. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD) mediante transferencia húmeda durante 3 horas y 30 minutos a 385 mA a 4°C. Para comprobar la eficacia de la transferencia, las membranas fueron teñidas con una solución al 0.1% de Ponceau S (Sigma-Aldrich). Después, las membranas fueron incubadas en agitación con solución de bloqueo, compuesta por TBS-T (20nM Tris pH 7.5, 500nM NaCl, 0.1% Tritón X-100; Thermo Fisher Scientific) al 5% de leche en polvo, durante 1 hora a temperatura ambiente; seguida de los anticuerpos primarios específicos durante la noche a 4°C y los correspondientes anticuerpos secundarios biotinilados durante 1 hora a temperatura ambiente (Tabla IV), todos diluidos en solución de bloqueo. Por último, las membranas se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente con estreptavidina-HRP (1:500) para detectar CD146, F4/80, GFAP, MMP14, TIMP2, CASP3, ICAM1, VCAM1, Ki67, MMP9, PAKT, AKT, PERK, ERK, GAPDH y α -Tubulina, y con el *Kit* Ultra-Sensitivo ABC Peroxidasa en el caso de DDR1 y PDDR1, ambos reactivos de Thermo Fisher Scientific. Las bandas se visualizaron mediante el sustrato de HRP para Western Luminata™ Crescendo (Millipore, Estados Unidos) en el equipo de quimioluminiscencia SynGene. El programa FIJI-ImageJ se empleó para cuantificar la expresión proteica, usando GAPDH o α -Tubulina como proteína constitutiva.

Tabla IV. Anticuerpos para Western blot. Nombre, dilución y casa comercial

Nombre	Dilución	Casa comercial
anti-CD146 <i>Molécula de adhesión celular de melanoma (MCAM)</i>	1:1000	Abcam (Estados Unidos)
anti-F4/80 <i>Receptor hormonal 1 con mucina, similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF)</i>	1:1000	BIO-RAD
anti-GFAP <i>Proteína ácida fibrilar glial</i>	1:2000	Abcam
anti-MMP14 <i>Metaloproteinasa de matriz 14</i>	1:1000	Thermo Fisher Scientific
anti-TIMP2 <i>Inhibidor tisular de la metaloproteinasa de matriz 2</i>	1:750	Thermo Fisher Scientific
anti-DDR1 <i>Receptor dominio discoidina 1</i>	1:1000	GeneTex (Estados Unidos)
anti-PDDR1 <i>Receptor dominio discoidina 1 fosforilado</i>	1:500	St John's Laboratory (Reino Unido)
anti-CASP3 <i>Caspasa 3</i>	1:1000	Cell Signaling Technology (Estados Unidos)
anti-ICAM1 <i>Molécula de adhesión intercelular 1</i>	1:1000	Thermo Fisher Scientific

Nombre	Dilución	Casa comercial
anti-VCAM1		
<i>Molécula de adhesión celular vascular 1</i>	1:1000	R&D Systems (Estados Unidos)
anti-Ki67		
<i>Antígeno de proliferación celular Ki67</i>	1:1000	Abcam
anti-MMP9		
<i>Metaloproteínasa de matriz 9</i>	1:1000	Abcam
anti-AKT		
<i>Proteína quinasa B</i>	1:1000	St John's Laboratory
anti-PAKT		
<i>Proteína quinasa B fosforilada</i>	1:500	St John's Laboratory
anti-ERK		
<i>Quinasa extracelular regulada por señal</i>	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-PERK		
<i>Quinasa extracelular regulada por señal fosforilada</i>	1:500	St John's Laboratory
anti-GAPDH		
<i>Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa</i>	1:1000	BIO-RAD
anti-α-Tubulina		
<i>Alfa-tubulina</i>	1:1000	Abcam

Nombre	Dilución	Casa comercial
Cabra anti-Conejo	1:1500	Thermo Fisher Scientific
Cabra anti-Rata	1:2000	Thermo Fisher Scientific
Conejo anti-Ratón	1:2000	Thermo Fisher Scientific

III.9 Inmuncitofluorescencia

Alrededor de 10^5 células se sembraron en medio de cultivo al 5% de SBF (SCs) y sin suero (células de CCR) sobre cubreobjetos de 13mm de diámetro (Sarstedt) y se fijaron con una solución de PBS 1X al 4% de paraformaldehído (PanReac AppliChem) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, las células se lavaron tres veces con PBS 1X y, para bloquear las interacciones proteicas no específicas, se incubaron con una solución de PBS 1X al 3% de albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich), durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo primario anti-DDR1 (Cloud-Clone Corporation, Estados Unidos) a una dilución 1:200 durante la noche a 4°C, seguido del anticuerpo secundario fluorescente Cabra anti-Conejo Cy3 (Abcam) a una dilución 1:2000 durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad, ambos diluidos en solución de bloqueo. Las fibras de actina se tiñeron con Faloidina-iFluor 488 (1:100) y los núcleos celulares se marcaron con Hoechst 33342 (1:1000), ambos reactivos de Abcam. Finalmente, las células se observaron con un microscopio confocal Zeiss LSM800 (Carl Zeiss Incorporated, Alemania).

III.10 Inmunohistoquímica

Las biopsias de hígado humano se obtuvieron de 19 pacientes con de 1 a 3 metástasis hepáticas, intervenidos en la Unidad de Cirugía Hepática del Hospital de Cruces (Barakaldo, Vizcaya, España). Las muestras fueron procesadas en forma de *arrays* de tejido por la empresa Pharmakine-Pharmatech (Parque Tecnológico de Derio, Vizcaya, España), siguiendo los protocolos pertinentes y con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica.

Un total de 46 secciones de cortes en parafina de tejido hepático sano alejado de la metástasis (n=27) y de tejido con metástasis hepática de CCR (n=19) se incubaron durante 10 minutos a 90°C con una solución para la recuperación antigénica (R&D Systems, Estados Unidos). La actividad de la enzima peroxidasa endógena se bloqueó mediante una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente en PBS 1X al 3% de peróxido de hidrógeno (H₂O₂, PanReac AppliChem). Para evitar un marcaje inespecífico se llevó a cabo un segundo bloqueo con PBS 1X al 0,4% de Tritón X-100 y al 5% de SBF durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, las muestras fueron incubadas con anti-DDR1 (Tabla IV) y con anti- α -SMA (Dako, Estados Unidos), ambos a una dilución 1:200, durante la noche a 4°C, seguido de los anticuerpos secundarios biotinilados correspondientes (Tabla IV), durante 1 hora a temperatura ambiente, todos diluidos en la segunda solución de bloqueo empleada. La detección se realizó mediante estreptavidina-HRP (1:500) durante 30 minutos a temperatura ambiente y la posterior adición del sustrato DAB (Thermo Fisher Scientific) durante 2 minutos. Las secciones fueron contra-teñidas con hematoxilina, deshidratadas en gradiente de alcoholes y montadas con medio de montaje Sub-X (Leica Biosystems, Alemania). El programa FIJI-ImageJ se empleó para cuantificar la expresión proteica.

III.11 Zimografía

Los secretomas fueron relativizados a la cantidad de proteína total, calculada como se ha descrito, con la solución de carga para zimografía (BIO-RAD). La electroforesis se llevó a cabo en geles al 10% de acrilamida, con un grosor de 0.75mm y al 1% de gelatina tipo A de piel de cerdo (Sigma-Aldrich), durante 1 hora a 120mV. A continuación, los geles fueron lavados dos veces durante 30 minutos a temperatura ambiente con Tritón X-100 al 2.5%, incubados en solución de incubación (5mM CaCl₂, 50mM Tris-HCl, 0.02% NaN₃, 0.007% ZnCl₂; Thermo Fisher Scientific) durante 20 horas en una estufa a 37°C, y teñidos en Azul de Coomassie (BIO-RAD) al 0.5% durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación. Finalmente, los geles fueron lavados con agua destilada durante 5 minutos y en solución de equilibrio (3% glicerol, 10% ácido acético, 40% metanol; Sigma-Aldrich) durante 15-30 minutos a temperatura ambiente. Las bandas se visualizaron en el equipo de quimioluminiscencia SynGene. El programa FIJI-ImageJ se empleó para cuantificar la expresión proteica.

III.12 Ensayo de apoptosis mediante citometría de flujo

Para establecer la proporción de células apoptóticas tras el tratamiento con el inhibidor DDR1-IN-1, se utilizó un *Kit* para la detección de muerte celular por apoptosis con anexina V, yoduro de propidio y el fluorocromo Alexa Fluor™ 488 (Thermo Fisher Scientific). La anexina V es una proteína capaz de unirse a la fosfatidilserina, marcador de apoptosis celular, y el yoduro de propidio es un compuesto que puede atravesar la membrana de las células necróticas e intercalarse en su ADN. Tras la exposición a las concentraciones del compuesto DDR1-IN-1, las células (10⁶ células/ml) fueron incubadas con los componentes

del *Kit* durante 15 minutos a temperatura ambiente. De este modo, las células emitieron fluorescencia verde (anexina V + fluorocromo) o naranja (yoduro de propidio) en función de su viabilidad. Después, las células se analizaron mediante citometría de flujo con un citómetro analizador Beckman Coulter Gallios, midiendo la emisión de fluorescencia a 530 y 575 nm, y usando 480 nm como longitud de onda de excitación. En total, se distinguieron 4 grupos de células: anexina V-/yoduro de propidio- (células no fluorescentes: vivas), anexina V+/yoduro de propidio- (células verdes: apoptóticas tempranas), anexina V+/yoduro de propidio+ (células verdes y naranjas: apoptóticas tardías) y anexina V-/yoduro de propidio+ (células naranjas: necróticas o muertas). Los datos se procesaron usando el programa Flowing (Centro de Biotecnología de Turku, Finlandia).

III.13 Viabilidad y proliferación celular

La proliferación celular fue analizada usando la solución PrestoBlue™ (Thermo Fisher Scientific), un reactivo capaz de modificar el color del medio en función de la actividad reductora resultante del metabolismo de las células viables. Un total de 5×10^4 células/ml se sembraron en placas de 96 pocillos (Sarstedt) y fueron incubadas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ con los correspondientes tratamientos durante 24 y/o 48 horas. Seguidamente, las células se incubaron durante 3 horas con PrestoBlue™ y la absorbancia del medio fue medida a 570 y 620 nm mediante un espectrofotómetro Synergy HT.

III.14 Migración e invasión celular

Un total de 2×10^4 células se sembraron en medio de cultivo al 5% de SBF (SCs) y sin suero (células de CCR C26), sobre insertos con un diámetro de poro de 0.8µm

(Corning Inc., Estados Unidos) y que habían sido previamente tratados con Col I al 1% durante 30 minutos. Estos insertos fueron colocados sobre pocillos de 2cm^2 . En el caso de las SCs, los pocillos contenían 2×10^5 células de CCR C26/ml, en medio de cultivo sin suero. En cambio, en el caso de las células C26, los pocillos contenían $800\mu\text{l}$ del tratamiento correspondiente en forma de secretomas.

De este modo, el potencial migratorio se analizó utilizando las células tumorales o los secretomas como factores quimiotácticos en el pocillo, mientras que el potencial invasivo se calculó en base a la capacidad celular para degradar el colágeno del inserto y atravesar los poros.

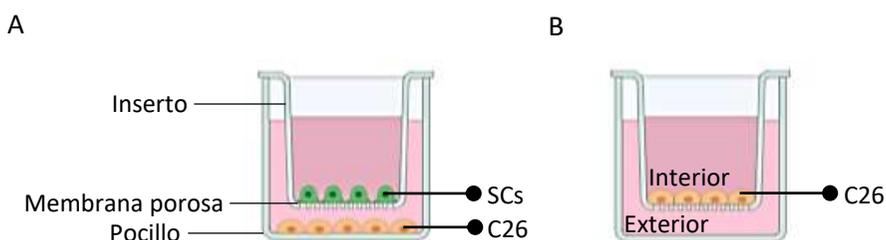


Figura 20. Determinación de las capacidades migratoria e invasiva de SCs (A) y células de CCR C26 (B). Las células se sembraron sobre insertos porosos ($0.8\mu\text{m}$), que fueron introducidos en pocillos (2cm^2) con células C26 o los secretomas correspondientes, respectivamente.

Tras 40 (SCs) o 24 (C26) horas de incubación, los insertos se lavaron con PBS 1X durante 5 minutos y se eliminaron las células que no migraron (parte interna del inserto) con un bastoncillo de algodón. A continuación, las células que migraron a la parte externa del inserto, es decir, que atravesaron los poros, fueron fijadas con una solución de PBS 1X al 4% de paraformaldehído durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los tiempos de incubación empleados no permitieron que una cantidad significativa de células alcanzasen el pocillo de la placa.

Tras tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X, los insertos con SCs y con células C26 (en algunos casos) fueron recortados con un bisturí y colocados sobre un portaobjetos con medio de montaje Fluoromount-G™ con DAPI (Thermo Fisher Scientific). Los núcleos de estas células fueron observados con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioskop (Carl Zeiss Incorporated) y cuantificados con el programa FIJI-ImageJ (10 campos a 20x aumentos por muestra).

Por otro lado, los insertos con células C26 (en otros casos) fueron teñidos con una solución al 1% de cristal violeta (Sigma-Aldrich). El número de células fue cuantificado usando el programa FIJI-ImageJ (10 campos a 20x aumentos por muestra). Posteriormente, los insertos fueron desteñidos con una solución al 33% de ácido acético, en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, el medio resultante de este proceso se traspasó a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 590 nm mediante un espectrofotómetro Synergy HT. Finalmente, los datos obtenidos mediante ambos métodos de cuantificación fueron contrastados.

III.15 Transfección y silenciamiento de DDR1

Para el desarrollo de una línea estable de células de CCR C26 con la expresión del DDR1 silenciada, se utilizaron 4 ARNsh (ARN de horquilla corta) específicos capaces de interactuar con la secuencia génica del DDR1 (siDDR1). Además, a modo de control, se utilizó un ARNsh no específico (siØ). Estos ARNsh fueron insertados en vectores de clonación plasmídico con las secuencias génicas para la expresión de fluorescencia roja (RFP) y la resistencia al antibiótico de selección, en este caso, la puromicina (OriGene Technologies, Estados Unidos).

En primer lugar, el plásmido fue amplificado empleando bacterias de la especie *Escherichia coli*. Seguidamente, los plásmidos se transfectaron en las células tumorales C26 usando el *Kit* Lipofectamine™ 3000 (Thermo Fisher Scientific). Para ello, utilizando placas de 24 pocillos, se sembraron un total de 2×10^5 células C26 por pocillo (confluencia del 85-90%) con medio de cultivo Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) en ausencia de suero. Después, para permitir la completa adherencia de las células al plástico, éstas se incubaron durante 3 horas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. A continuación, tras incubar el reactivo Lipofectamine™ con el ADN plasmídico durante 15 minutos a temperatura ambiente, la mezcla se añadió al medio de cultivo celular, a una concentración de 500ng de ADN plasmídico por pocillo. Posteriormente, las células C26 se incubaron durante 48 horas a 37°C y al 5% de CO₂ en el medio de transfección. Finalmente, tras observar (microscopio de fluorescencia Zeiss Apotome, Carl Zeiss Incorporated) que alrededor del 50% de las células mostraban fluorescencia roja, éstas se sembraron en frascos de cultivo T25 (Sarstedt) con medio de cultivo RPMI al 10% de SBF con 0.7 µg/ml de puromicina (Sigma-Aldrich). Dicha concentración de antibiótico, permitió seleccionar aquellas células supervivientes y portadoras, por tanto, de la secuencia con el silenciamiento del DDR1.

III.16 Desarrollo *in vivo* de metástasis hepáticas

Un total de 10^6 células tumorales C26/ml/animal se inyectaron vía intra-esplénica en ratones singénicos de la cepa BALB/c (salvajes: n=3, siØ: n=3, siDDR1: n=6). Después de 14 días, se extrajeron los hígados para su análisis histológico. Tras deshidratar e incluir los órganos en parafina, se hicieron bloques para obtener cortes con un microtomo. Secciones de 7 µm de grosor se rehidrataron y se tiñeron con hematoxilina/eosina en un Shandon Varistain 24-

4 (GMI - Trusted Laboratory Solutions, Estados Unidos). Finalmente, las muestras se montaron con medio de montaje Sub-X y se analizaron con un microscopio óptico. El programa FIJI-ImageJ se empleó para calcular el número total de focos metastásicos y el área del tejido hepático ocupada por tumor.

III.17 Análisis estadístico

Cada experimento se llevó a cabo independientemente por duplicado o triplicado. Los valores obtenidos fueron relativizados con sus correspondientes controles y los resultados se presentan como el valor de la media \pm la desviación estándar (SD). El análisis estadístico se llevó a cabo usando el programa GraphPad Prism (versión 5.0), empleando los test estadísticos *t de Student* y ANOVA, y considerándose significativos los valores de $P \leq 0.1$ para todas las comparaciones. Dichas comparaciones se realizaron respecto al grupo control (*) o bien entre los diferentes grupos de tratamiento (#).

IV. Capítulo 1

Modelo *in vitro* de interacción celular sinusoide-tumor.
Expresión y activación de DDR1 en SCs hepáticas y en
líneas celulares de CCR metastásico

IV.1 Introducción

Aunque la expresión y actividad del DDR1 en líneas celulares murinas y humanas de CCR metastásico está ampliamente estudiada ¹²⁵, la expresión de dicho receptor en el tejido hepático no está completamente caracterizada. Actualmente, está establecido que los hepatocitos, tipo celular mayoritario que conforma el parénquima del hígado, y los colangiocitos, células que recubren los conductos biliares, expresan DDR1 en condiciones fisiológicas ^{150,190,191}, como muchas otras células epiteliales del organismo ¹²⁵. Sin embargo, hasta el momento, de entre las diferentes poblaciones de SCs hepáticas, la expresión de DDR1 únicamente ha sido descrita a nivel de ARNm en las HSCs ¹⁹². No existen análisis proteicos detallados que demuestren que las LSECs, las KCs y las HSCs presenten este receptor. Por estas razones, los objetivos principales de este bloque son:

1. Desarrollar un modelo *in vitro* de cultivo puro de SCs hepáticas, capaces de responder al secretoma tumoral y de activar a las células de CCR metastásico C26.
2. Determinar la expresión, la sub-localización y la activación del DDR1 a nivel proteico en las SCs hepáticas.
3. Determinar la expresión, la sub-localización y la activación del DDR1 a nivel proteico en diferentes líneas celulares de CCR metastásico.
4. Analizar la expresión del DDR1 a nivel proteico en muestras humanas de tejido hepático con metástasis de CCR.

IV.2 Resultados

IV.2.1 Los cultivos primarios de SCs presentan un nivel de pureza adecuado y responden al secretoma tumoral

Primero, tras el proceso de extracción y aislamiento, se examinó el nivel de pureza de los cultivos primarios de SCs hepáticas. Para ello, la expresión proteica de los marcadores CD146, F4/80 y GFAP, específicos de las LSECs, KCs y HSCs, respectivamente, fue analizada por Western blot.

Los cultivos de los tres tipos de SCs aisladas del hígado murino mostraron una pureza de en torno a un 90-95%, considerándose este valor suficiente para su utilización en los experimentos posteriores (Fig.21).

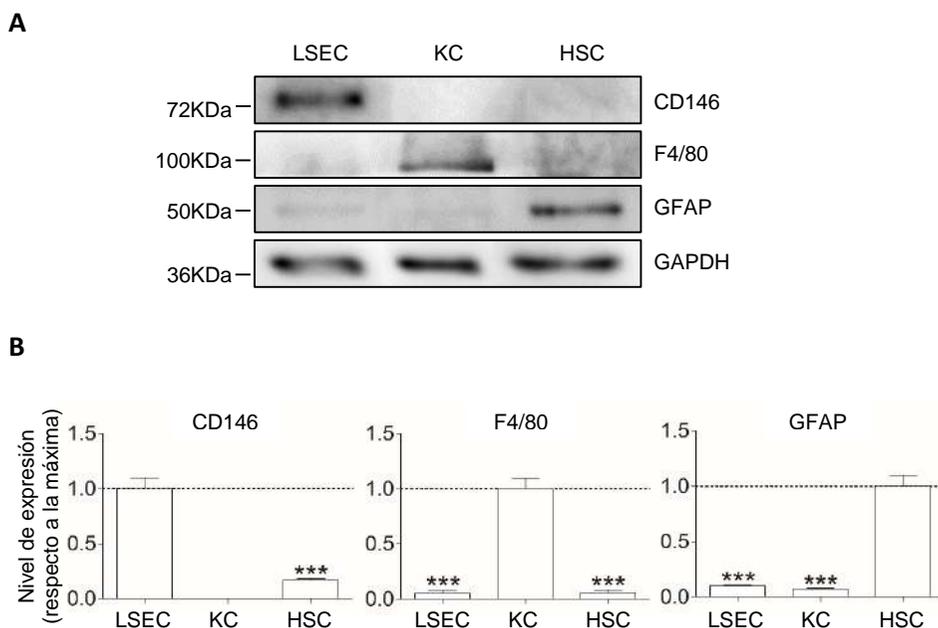


Figura 21. Pureza de los cultivos primarios de SCs hepáticas. Western blot de los marcadores CD146, F4/80 y GFAP (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). ***P < 0.001

Una vez determinado el nivel de pureza de los cultivos primarios de SCs hepáticas, se comenzó con el desarrollo del modelo *in vitro* de interacción celular entre el sinusoides y el tumor, basado en la reacción de las SCs a los factores tumorales secretados por las células de CCR metastásico C26, y en el efecto de los factores sinusoidales en varias propiedades del tumor.

En primer lugar, se comprobó la capacidad de las poblaciones de SCs hepáticas de responder a los factores tumorales solubles. Con este propósito, las SCs se incubaron con el secretoma tumoral durante 1 o 24 horas, obteniéndose SCs en dos estadios diferentes de activación por tumor (SCs-TA), y se compararon con las SCs cultivadas en medio basal o control (SCs-∅).

Por un lado, tras 1 hora de activación tumoral de las SCs, se evaluó por PCR cuantitativa la expresión de una serie de genes asociados principalmente con la creación de un ambiente inflamatorio, dado que es uno de los primeros acontecimientos que ocurren durante la metástasis, tras la llegada de las células tumorales al sinusoides. Como se muestra en la figura 22, el secretoma tumoral causó una estimulación de la respuesta inmune en las LSECs y las HSCs, incrementándose una media de 3 veces la expresión de COX2, IL6 e IL10, factores relacionados con la inmunomodulación. Asimismo, la expresión génica de COX2, un marcador pro-inflamatorio clásico, aumentó unas 7 veces en las KCs-TA, comparándolas con las KCs-∅. Curiosamente, el gen de la citoquina IL6 no se detectó en las KCs, y la expresión génica de la citoquina IL10 no se modificó en respuesta al tumor. Además, el secretoma tumoral promovió la capacidad angiogénica en las LSECs, aumentando alrededor de 8 veces la expresión de PDGF y VEGF, dos factores de crecimiento involucrados en la formación de nuevos vasos sanguíneos. En cambio, mientras no se observaron diferencias en la expresión de dichos marcadores pro-angiogénicos en las KCs, el nivel de expresión génica de PDGF y VEGF se redujo casi por completo en las HSCs-TA, respecto a las HSCs-∅.

Por otro lado, tras 24 horas de activación tumoral de las SCs, se cuantificó la expresión génica de colágeno tipo I (COL1A1), principal componente de la MEC implicado en la respuesta fibrogénica durante el desarrollo metastásico. En comparación con la respuesta inmune, los procesos de re-estructuración de la matriz se producen de forma tardía, de ahí la elección de un periodo de tiempo mayor para el tratamiento de las SCs con el secretoma tumoral. Como se ve en la figura 22, las LSECs no mostraron expresión génica de COL1A1, y las KCs no alteraron los niveles de colágeno en respuesta al tumor. Sin embargo, el secretoma tumoral provocó un aumento pronunciado en los niveles de COL1A1 en las HSCs, con valores de expresión génica 8 veces superiores a las HSCs-Ø.

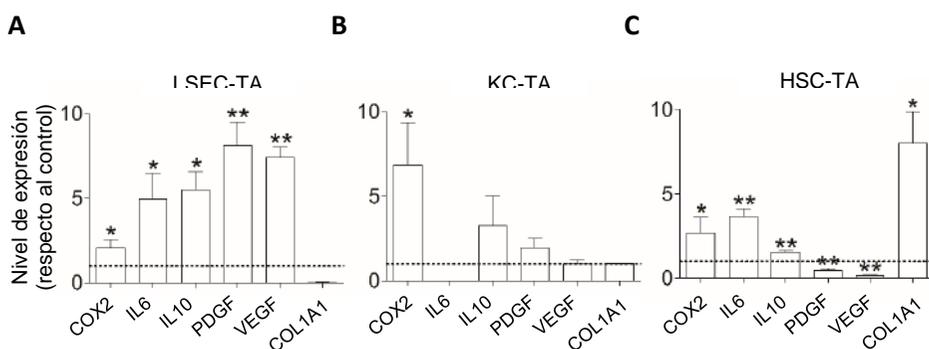


Figura 22. Capacidad de respuesta de las SCs hepáticas al tumor metastásico (I). Cuantificación de la expresión de genes pro-metastásicos en LSECs (A), KCs (B) y HSCs (C) tras la activación con el secretoma de células de CCR C26 (TA) durante 1 hora (COX2, IL6, IL10, PDGF, VEGF) y 24 horas (COL1A1). El valor 1 corresponde a la expresión génica de las células en estado basal (SCs-Ø). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). *P < 0.1, **P < 0.01

A continuación, siguiendo con el modelo de comunicación entre las SCs y las células C26, se examinó mediante Western blot la expresión de dos proteínas relacionadas con la remodelación de la MEC, evento clave durante el avance metastásico, la enzima proteolítica MMP14 y uno de sus inhibidores, el TIMP2.

Para ello, por la misma razón que para la detección de colágeno, las SCs también fueron incubadas con el secretoma tumoral durante 24 horas.

El secretoma tumoral provocó un aumento significativo de los niveles proteicos de MMP14 en las LSECs y las HSCs, elevando 1.3 veces y más del doble su expresión, respectivamente, comparándolas con las células en estado basal. Por el contrario, el secretoma tumoral redujo significativamente la expresión de MMP14 en las KCs, bajando casi 1.4 veces sus niveles, respecto a su control correspondiente. Finalmente, el secretoma tumoral no causó alteración alguna en la expresión de TIMP2 en las tres poblaciones de SCs hepáticas (Fig.23).

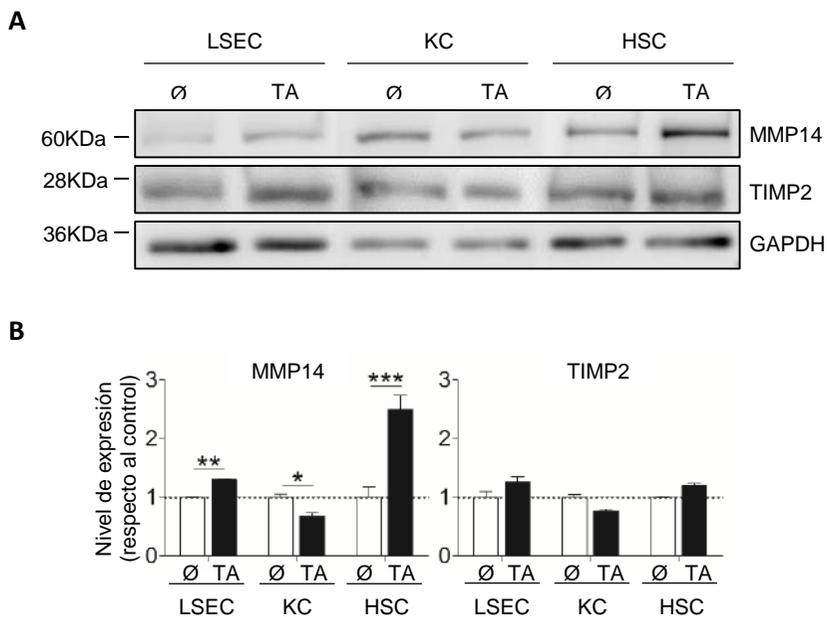


Figura 23. Capacidad de respuesta de las SCs hepáticas al tumor metastásico (II). Western blot de MMP14 y TIMP2 en LSECs, KCs y HSCs tras la activación con el secretoma de células de CCR C26 durante 24 horas (TA) (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=2). *P < 0.1, **P < 0.01, ***P < 0.001

Por último, se estudió el potencial migratorio e invasivo a través de colágeno de las SCs, tras 40 horas en co-cultivo indirecto con las células C26. Para llevarlo a cabo, se cuantificó el número de SCs capaces de migrar hacia el tumor y de degradar una matriz de colágeno tipo I, empleando las células C26 como fuente de factores quimiotácticos.

Como se aprecia en la figura 24, el secretoma tumoral también activó significativamente la migración e invasión de las LSECs y las HSCs, principalmente de éstas últimas, las cuales migraron hacia el tumor, atravesando la matriz de colágeno, aproximadamente 3 veces más que el control. Por otra parte, no se detectaron KCs con capacidades migratorias e invasivas.

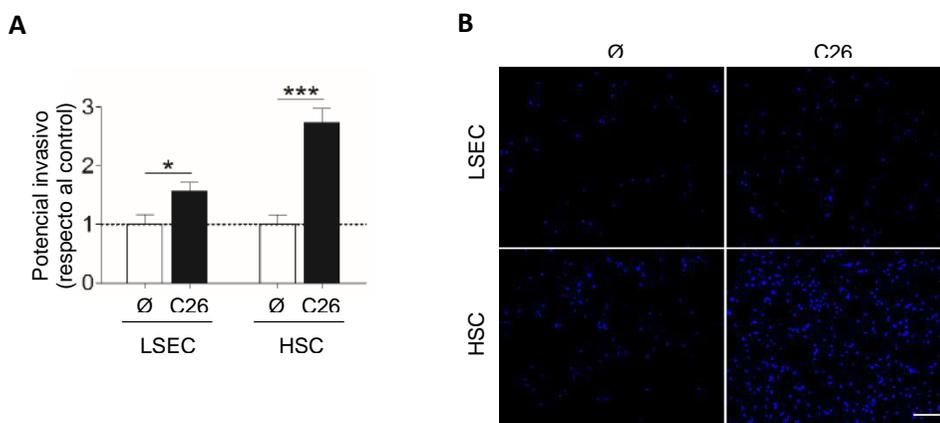


Figura 24. Capacidad de respuesta de las SCs hepáticas al tumor metastásico (III). Cuantificación del número de LSECs y HSCs capaces de migrar e invadir a través de Col I (1%), hacia células de CCR C26 durante 40 horas (A). Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia. Barra de escala, 50µm (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). *P < 0.1, ***P < 0.001

IV.2.2 El secretoma sinusoidal promueve las capacidades tumorales de las células de CCR C26

En segundo lugar, siguiendo con el modelo *in vitro* de interacción entre las SCs y las células C26, se constató el efecto de los factores sinusoidales solubles en diferentes propiedades tumorales. Con este fin, las células C26 se incubaron con el secretoma sinusoidal durante 24 horas, obteniéndose células C26 activadas por sinusoide (C26-SA), que fueron comparadas con las células C26 cultivadas en medio basal o control (C26-Ø).

La elección de dicho periodo de incubación de las células C26 con el secretoma sinusoidal se realizó en base a resultados preliminares que mostraron cambios más evidentes en las características tumorales a las 24 horas, respecto a los observados tras 1 hora de tratamiento.

Por un lado, tras la activación sinusoidal de las células C26, se analizó mediante PCR cuantitativa la expresión de los mismos genes que en las SCs (Fig.22), ya que los factores sinusoidales también son considerados pro-metastásicos. Como se muestra en la figura 25, por una parte, llama la atención la reducción de la expresión de PDGF, considerado un factor proliferativo tumoral, en las células C26-SA comparadas con las células C26-Ø. Por otra parte, sorprendentemente los secretomas sinusoidales no modificaron la expresión tumoral de la citoquina IL10, así como los secretomas de las LSECs y las HSCs no alteraron la expresión de IL6. Sin embargo, sí se detectó una estimulación sinusoidal en los niveles tumorales del marcador de inflamación COX2, sobre todo en respuesta al secretoma de las LSECs, aumentando unas 15 veces su expresión respecto al control. Igualmente, el secretoma de las KCs causó un incremento significativo, 5 veces superior, en la expresión tumoral de la citoquina pro-inflamatoria IL6. Además, los secretomas de las LSECs y las KCS favorecieron la respuesta angiogénica del tumor, aumentando entre 2 y 3 veces la expresión de VEGF. En

cambio, el secretoma de las HSCs no provocó ningún cambio en los niveles génicos tumorales de VEGF. Por último, cabe destacar la potenciación de la capacidad tumoral de producir colágeno tras la incubación con el secretoma sinusoidal, principalmente tras el tratamiento con el secretoma de las HSCs, incrementándose los niveles de expresión de COL1A1 unas 6 veces en comparación con las células tumorales en estado basal.

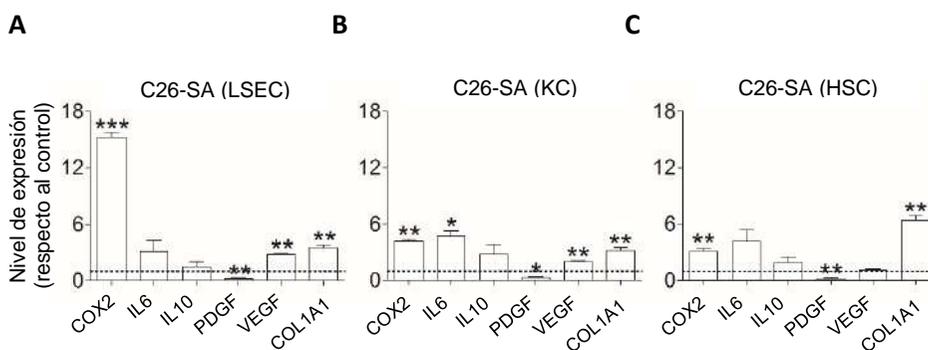


Figura 25. Capacidad de respuesta de las células de CCR C26 al sinusoides (I). Cuantificación de la expresión de los genes pro-metastásicos COX2, IL6, IL10, PDGF, VEGF y COL1A1 en células C26 tras la activación con el secretoma de LSECs (A), KCs (B) y HSCs (C) durante 24 horas (SA). El valor 1 corresponde a la expresión génica de las células en estado basal (C26-Ø). Resultados presentados como la media ±SD (n=3). *P < 0.1, **P < 0.01, ***P < 0.001

Finalmente, continuando con el patrón de análisis llevado a cabo en las SCs y para terminar el establecimiento del modelo *in vitro*, se determinó el efecto del secretoma sinusoidal en la expresión proteica tumoral de MMP14 y TIMP2 mediante Western blot.

Los secretomas de las KCs y las HSCs aumentaron significativamente la expresión tumoral de MMP14 y TIMP2, comparadas con la registrada en las células tumorales en condiciones basales. Concretamente, los mayores cambios se produjeron en las células C26 tras el cultivo con el secretoma de las HSCs,

aumentando casi el doble la expresión de ambas proteínas. En cambio, el secretoma de las LSECs no modificó la expresión de MMP14 y TIMP2 en las células C26, respecto a las células C26- \emptyset (Fig.26).

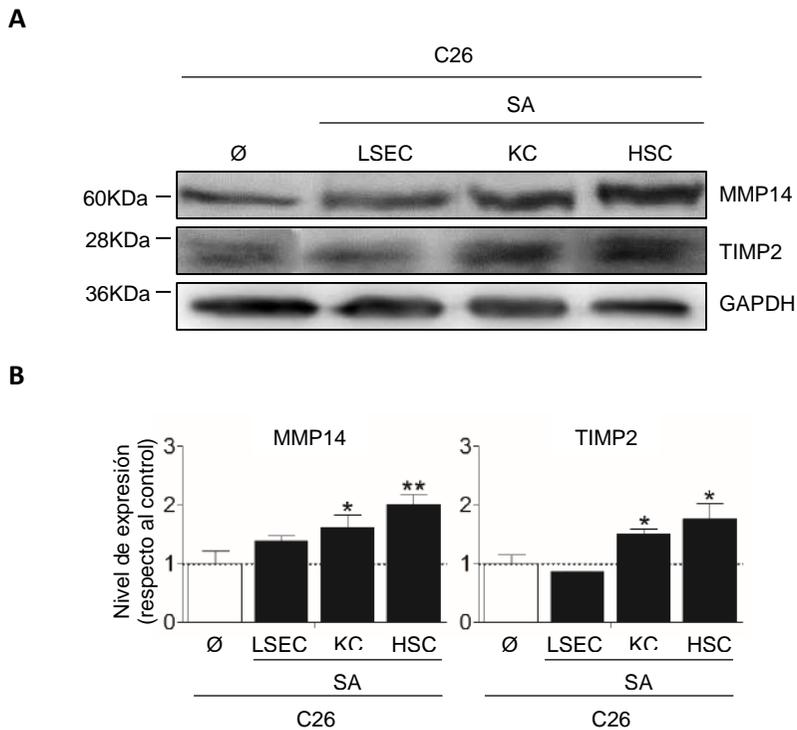


Figura 26. Capacidad de respuesta de las células de CCR C26 al sinusoide (II). Western blot de MMP14 y TIMP2 en células C26 tras la activación con el secretoma de LSECs, KCs y HSCs durante 24 horas (SA) (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=2). *P < 0.1, **P < 0.01, ***P < 0.001

IV.2.3 Las SCs expresan DDR1 en estado basal

Después de constituir el modelo de interrelación celular, se evaluó la expresión proteica y la sub-localización del DDR1 en las SCs en condiciones basales mediante Western blot e inmunocitofluorescencia.

Empleando los lisados proteicos de hepatocitos como control positivo, se observó que las tres poblaciones de SCs hepáticas expresaron una banda de aproximadamente 125KDa correspondiente al DDR1. De entre las diferentes células hepáticas analizadas, las HSCs mostraron la mayor expresión de DDR1. De hecho, las HSCs presentaron aproximadamente un 80% más de receptor en comparación con las LSECs y las KCs (Fig.27).

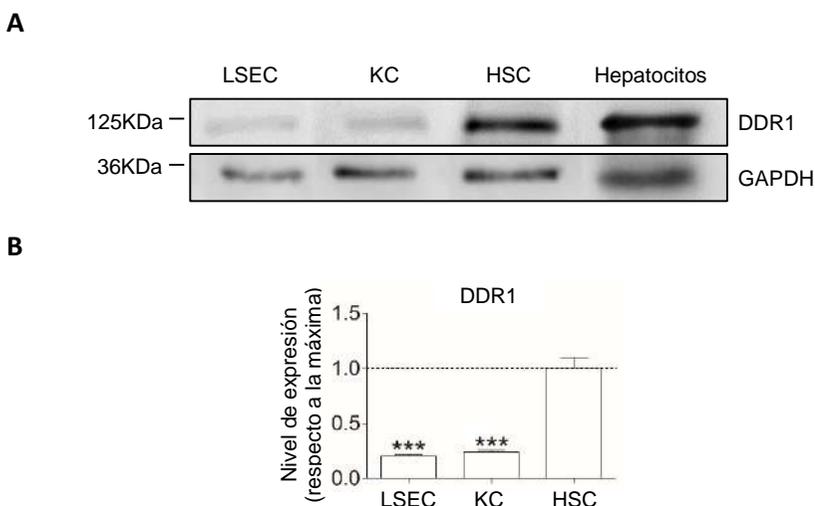


Figura 27. Expresión de DDR1 en las SCs hepáticas. Western blot de DDR1. La muestra de hepatocitos se empleó como control positivo (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). ***P < 0.001

Tal y como se muestra en la figura 28, los datos de expresión proteica del receptor obtenidos en el Western blot (Fig.27) se corroboraron mediante inmunocitofluorescencia. El DDR1 se localizó principalmente en el citoplasma y la membrana plasmática de las HSCs, con una clara distribución alrededor del núcleo celular. Una menor expresión se detectó en las LSECs y las KCs, con una presencia mayoritariamente citoplasmática y perinuclear en las LSECs y, tanto de membrana como de citoplasma en las KCs.

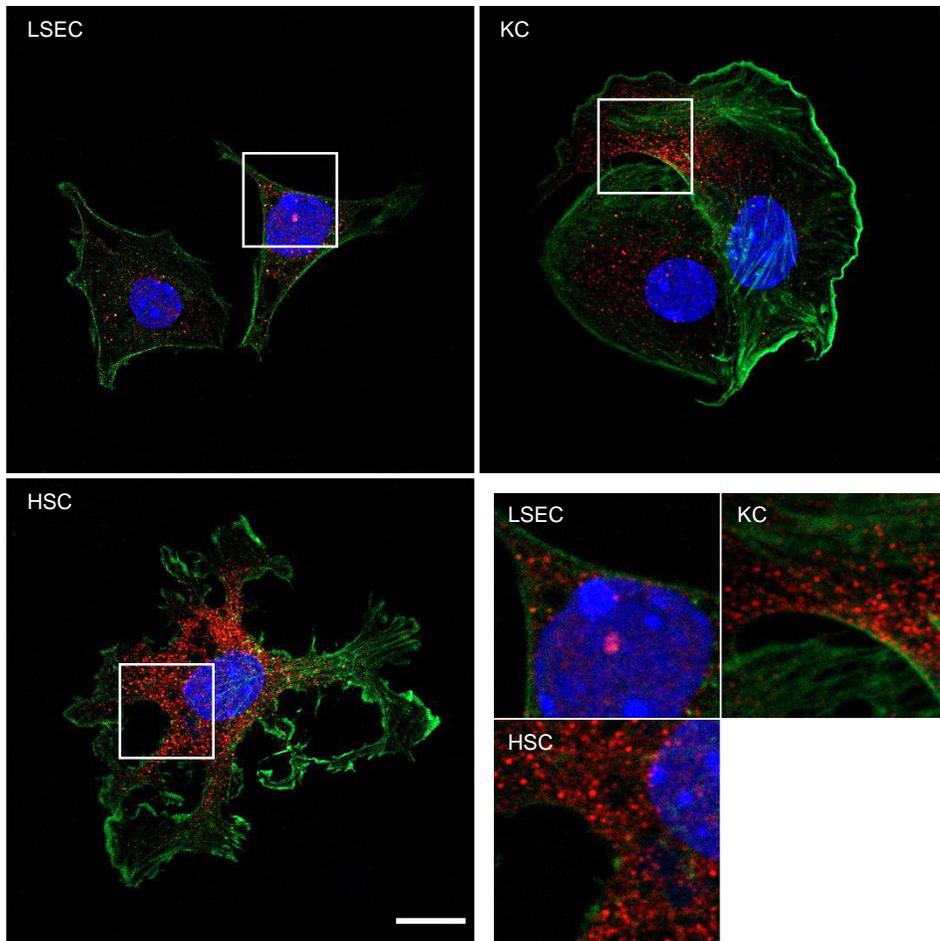


Figura 28. Sub-localización de DDR1 en las SCs hepáticas. Inmuncitofluorescencia de DDR1 (rojo), actina (verde) y núcleo (azul). Imágenes representativas de microscopía confocal de fluorescencia. Barra de escala, 10 μ m. Recuadros con magnificación 2X

IV.2.4 El colágeno tipo I promueve la fosforilación del DDR1 en las KCs y las HSCs

Tras verificar la expresión del DDR1 en las SCs en estado basal, se estudió la fosforilación del receptor. Para llevarlo a cabo, las células fueron incubadas durante 3 horas con colágeno tipo I, uno de los ligandos del DDR1. Después, se

determinó la expresión proteica de PDDR1 respecto al DDR1 total en las SCs mediante Western blot.

El colágeno indujo significativamente la fosforilación del DDR1 en las KCs y en las HSCs, aumentando 1.5 y 1.7 veces la expresión de PDDR1/DDR1 en comparación con el control, respectivamente. En cambio, el colágeno añadido al medio no modificó el grado de fosforilación del DDR1 en las LSECs (Fig.29).

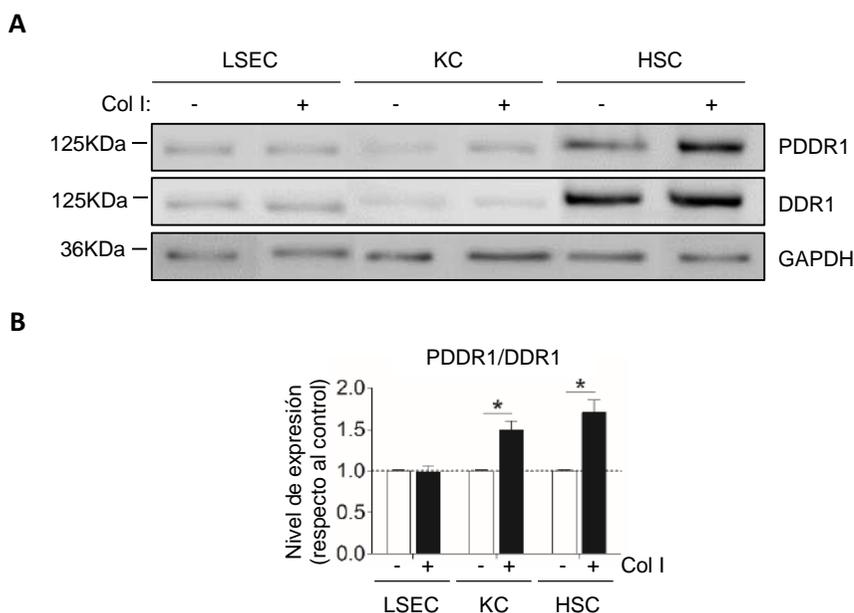


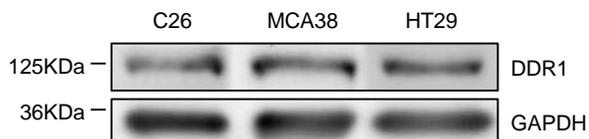
Figura 29. Activación de DDR1 en las SCs hepáticas incubadas con Col I (10nM). Western blot de PDDR1 y DDR1 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). *P < 0.1

IV.2.5 Las células de CCR expresan DDR1 en estado basal

Como en el caso de las SCs hepáticas, se analizó la expresión y la sub-localización de DDR1 por Western blot e inmunocitofluorescencia en tres líneas celulares de CCR metastásico, dos de ellas murinas (C26 y MCA38) y una humana (HT29), en condiciones basales.

Según los resultados mostrados en la figura 30, al igual que en las SCs, las tres líneas celulares de CCR expresaron DDR1, representado por una banda de aproximadamente 125KDa. Las células tumorales mostraron un nivel de expresión similar de receptor, sin diferencias remarcables.

A



B

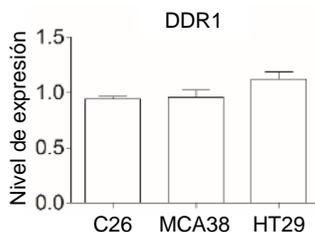


Figura 30. Expresión de DDR1 en células de CCR. Western blot de DDR1 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3)

Las imágenes de microscopía confocal confirmaron los datos obtenidos mediante Western blot, es decir, un nivel de expresión proteica de DDR1 semejante en las tres líneas celulares de CCR. Así mismo, mostraron que, de manera similar a lo observado en las SCs hepáticas, el receptor presentó una localización fundamentalmente citoplasmática y rodeando el núcleo, sobre todo en las células C26 y MCA38. Además, las células HT29 expresaron DDR1 en algunas regiones de la membrana plasmática, sobre todo en las zonas de contacto o interacción célula-célula (Fig.31).

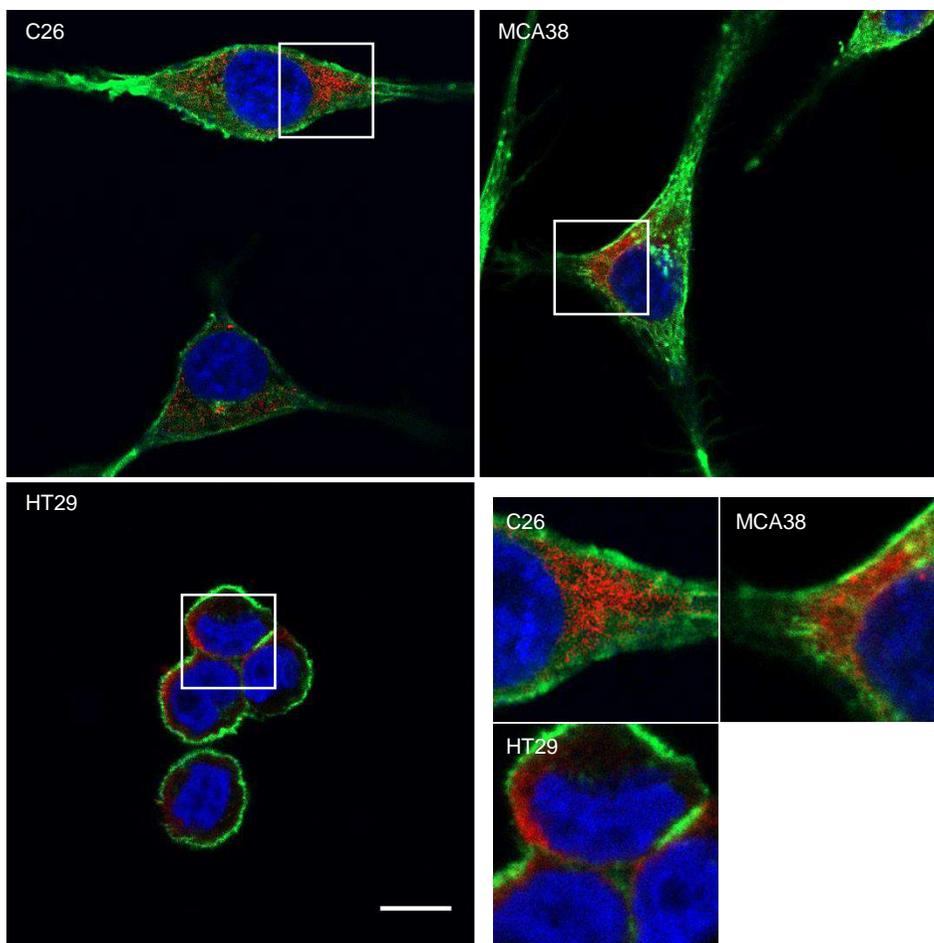


Figura 31. Sub-localización de DDR1 en células de CCR. Inmunocitofluorescencia de DDR1 (rojo), actina (verde) y núcleo (azul). Imágenes representativas de microscopía confocal de fluorescencia. Barra de escala, 10µm. Recuadros con magnificación 2X

IV.2.6 El colágeno tipo I promueve la fosforilación del DDR1 en las células de CCR

Al igual que en las SCs, se comprobó la fosforilación del DDR1 en las células de CCR metastásico, incubándolas con colágeno tipo I durante 3 horas y analizando la expresión proteica de PDDR1 respecto al DDR1 total por Western blot.

La expresión de PDDR1/DDR1 aumentó significativamente tras la incubación de las células de CCR con colágeno, incrementándose una media de 1.5 veces con respecto al control (Fig.32). Estos valores de fosforilación del receptor de las células tumorales en respuesta al colágeno extracelular fueron parecidos a los obtenidos tras la activación de DDR1 en las KCs y las HSCs, siendo el aumento algo más pronunciado en estas últimas (Fig.29).

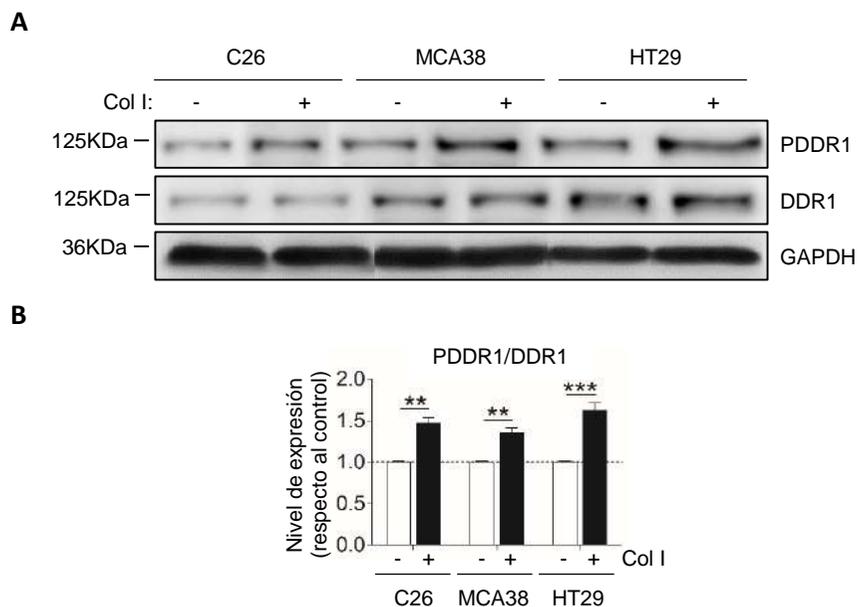


Figura 32. Activación de DDR1 en células de CCR incubadas con Col I (10nM). Western blot de PDDR1 y DDR1 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). **P < 0.01, ***P < 0.001

IV.2.7 El tejido humano hepático con metástasis de CCR presenta niveles de expresión de DDR1 y α -SMA mayores que el tejido sano adyacente

Tras corroborar la presencia y actividad del DDR1 en las SCs hepáticas y en las células de CCR metastásico, se examinó la expresión del receptor mediante

inmunohistoquímica en un total de 46 muestras de tejido humano hepático sano y con metástasis de CCR provenientes de 19 pacientes. También, puesto que, según los resultados obtenidos, las HSCs mostraron la mayor expresión de DDR1 respecto a las LSECs y las KCs (Figs.27 y 28), y ya que este tipo celular hepático, al desarrollar un fenotipo activado, representa una parte importante de los fibroblastos asociados al tumor y constituye un marcador pronóstico en algunos CCR humanos, se realizó un análisis de la expresión de α -SMA (marcador de HSCs activadas).

Según los resultados mostrados en la figura 33, los niveles de expresión de DDR1 y α -SMA aumentaron significativamente un 30% y un 50% respectivamente, en las muestras de tejido hepático con metástasis de CCR, comparándolas con el tejido sano adyacente.

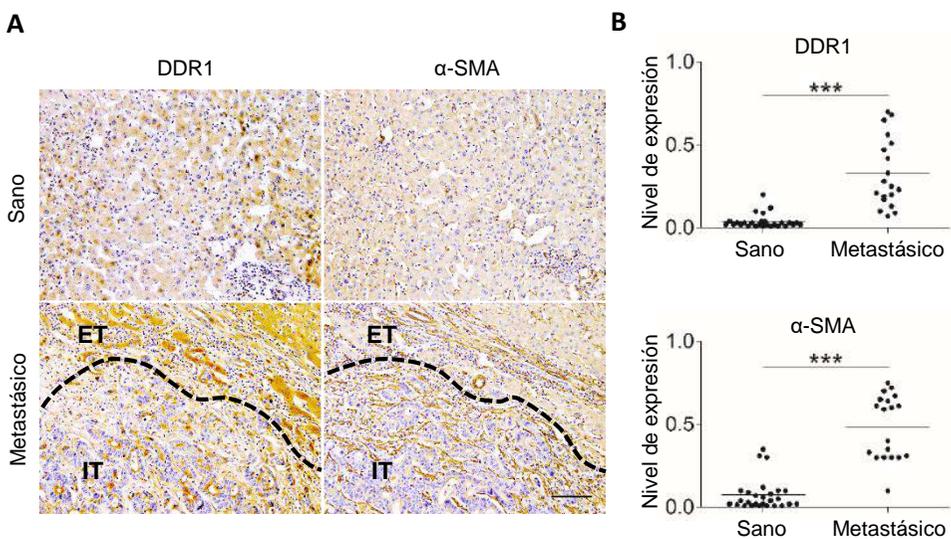


Figura 33. Análisis inmunohistoquímico de DDR1 y α -SMA en tejido humano hepático sano y con metástasis hepática de CCR. ET: región extra-tumoral e IT: región intra-tumoral, separadas por la línea discontinua. Imágenes representativas de microscopía óptica. Barra de escala, 100 μ m (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como valores totales (n=46). ***P < 0.001

A continuación, a fin de dilucidar qué tipos celulares del hígado metastásico, a parte de las células tumorales, expresaron mayor cantidad de DDR1, se estudiaron imágenes a mayor aumento de la expresión de DDR1 y α -SMA en el tejido hepático con metástasis de CCR de las zonas extra e intra-tumoral.

Además de en las células tumorales, la mayor expresión de DDR1 en el tejido hepático metastásico correspondería a hepatocitos y células que podrían ser HSCs activadas, ya que presentan una morfología y distribución similar a las células positivas para α -SMA (Figs. 34 y 35). Estos resultados coinciden con los obtenidos en el análisis de los cultivos murinos de SCs hepáticas y células de CCR metastásico.

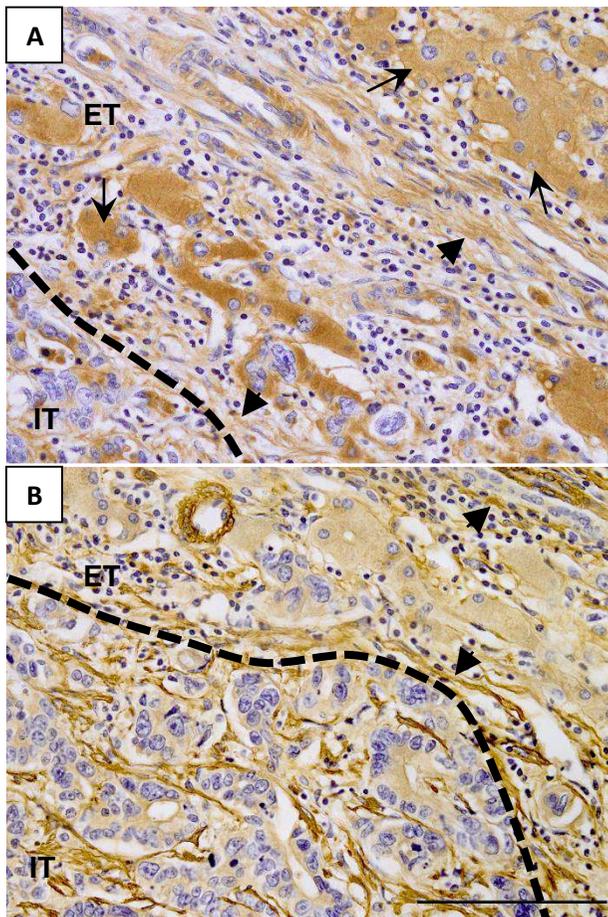


Figura 34. Análisis inmunohistoquímico de DDR1 (A) y α -SMA (B) en tejido humano con metástasis hepática de CCR (muestra 12). Secciones de la región extra-tumoral (ET) separada de la región intra-tumoral (IT) por la línea discontinua. Las células que presentan mayor marcaje de DDR1 son grandes y algunas de ellas binucleadas, por lo que podrían corresponder a los hepatocitos (flechas negras). Además, hay células positivas para DDR1 con la misma morfología fusiforme y distribución que las células positivas para α -SMA (cabezas de flecha negras). Imágenes representativas de microscopía óptica. Barra de escala, 100 μ m

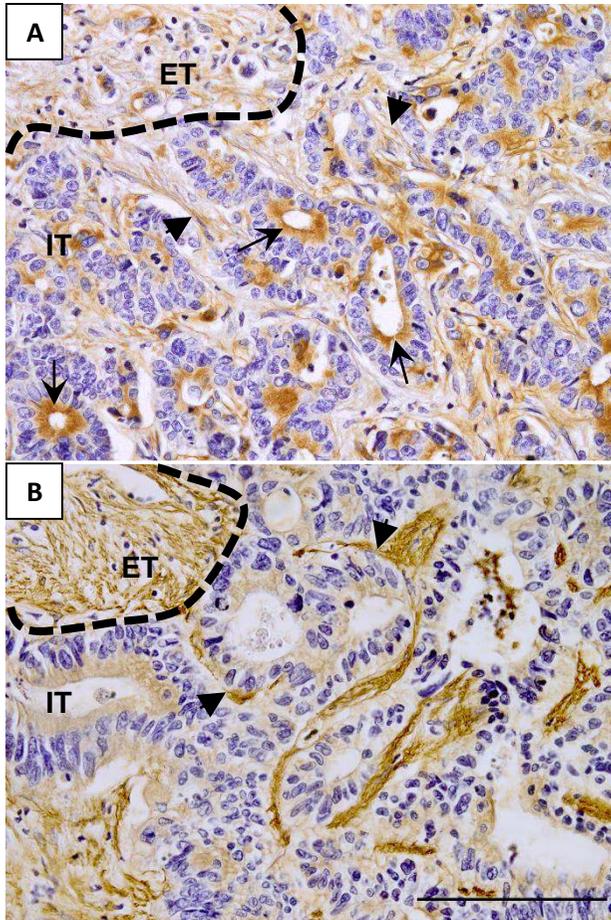


Figura 35. Análisis inmunohistoquímico de DDR1 (A) y α -SMA (B) en tejido humano con metástasis hepática de CCR (muestra 12). Secciones de la región intra-tumoral (IT) separada de la región extra-tumoral (ET) por la línea discontinua. Las células tumorales tienen un marcaje de DDR1 apical (flechas negras). Hay células positivas para DDR1 con la misma morfología fusiforme y distribución que las células positivas para α -SMA (cabezas de flecha negras). Imágenes representativas de microscopía óptica. Barra de escala, 100 μ m

IV.3 Resumen

En este primer capítulo mostramos un modelo eficaz *in vitro* de interacción celular entre el sinusoides hepático y el tumor de colon metastásico, donde la comunicación ocasiona, en su conjunto, una respuesta pro-metastásica tanto en las SCs aisladas del hígado murino como en la línea celular de CCR C26. Además, las SCs presentan DDR1 en el citoplasma y la membrana plasmática, siendo su nivel de expresión unas 4 veces mayor en las HSCs, comparado con la expresión detectada en las LSECs y las KCs. Según esto, la expresión del DDR1 en el sinusoides del hígado podría depender del tipo celular hepático en cuestión. Por otro lado, el DDR1 sinusoidal presente en las HSCs y las KCs es funcional, puesto que se activa mediante fosforilación en respuesta al colágeno tipo I extracelular, sobre todo en las HSCs. Sin embargo, el DDR1 endotelial parece ser incapaz de activarse tras la incubación con colágeno en las condiciones de tratamiento empleadas.

De igual modo, el DDR1 es funcional y aparece en las regiones citoplasmática y de membrana de células murinas y humanas de CCR metastásico, sin detectarse diferencias importantes entre los tipos celulares estudiados.

En el tejido humano, analizamos la presencia del DDR1 en el hígado con metástasis de CCR, es decir, en un contexto de comunicación y coordinación entre las células del estroma hepático y el tumor. Vemos que la expresión del DDR1 aumenta significativamente en el tejido hepático metastásico, al compararla con el tejido sano adyacente. Este incremento no sólo se debe al detectado en las células de CCR, sino también en el estroma del hígado, principalmente en células que podrían corresponder con hepatocitos y HSCs.

A la vista de estos resultados, el siguiente propósito será determinar el papel del DDR1 sinusoidal en la interacción entre las SCs hepáticas y el tumor de colon metastásico.

V. Capítulo 2

Implicación del DDR1 sinusoidal en diferentes propiedades pro-metastásicas durante la interacción entre las SCs hepáticas y las células de CCR

V.1 Introducción

Diversos estudios sugieren la participación del DDR1 en multitud de propiedades y procesos de las células de CCR, incluidos la invasión y la metástasis hepática ^{127,139,172}. Sin embargo, aunque las SCs hepáticas son las primeras en interactuar con el tumor ⁵⁹ y expresan DDR1, tal como hemos visto en el capítulo anterior, no se conoce el papel del DDR1 sinusoidal durante la colonización y el desarrollo del CCR metastásico en el hígado. Debido a las múltiples funciones que este receptor desempeña ^{111,114,127}, parece factible que el DDR1 sinusoidal pueda regular procesos celulares que tengan que ver con la interacción entre las SCs y el CCR metastásico. Es por esto que los objetivos de la siguiente sección son:

1. Bloquear *in vitro* la fosforilación del DDR1 en las SCs hepáticas, utilizando el compuesto inhibidor DDR1-IN-1, y líneas celulares de fibroblastos y macrófagos murinos como modelo preliminar.
2. Evaluar el efecto del DDR1-IN-1 en la fosforilación del DDR1 y en la secreción de MMPs por las SCs hepáticas durante su interacción con las células de CCR metastásico C26.
3. Dilucidar el efecto del bloqueo del DDR1 sinusoidal en la fosforilación del receptor, en la secreción de MMPs y en los procesos de proliferación, migración e invasión de células de CCR metastásico C26 durante su interacción con las SCs hepáticas.

V.2 Resultados

V.2.1 El DDR1-IN-1 bloquea la fosforilación del DDR1 en las células 3T3 y J774A.1

En primer lugar, se utilizó el compuesto químico DDR1-IN-1 para bloquear la fosforilación del DDR1, debido a su elevada especificidad comparado con algunos inhibidores más genéricos, como el dasatinib, imatinib, y nilotinib, con un espectro de acción más amplio al bloquear la actividad de otros RTKs, incluyendo el otro receptor de la subfamilia con dominio discoidina, el DDR2, expresado por las HSCs.

Con el propósito de establecer una concentración de DDR1-IN-1 adecuada para el tratamiento de las SCs hepáticas, es decir, la cantidad de DDR1-IN-1 capaz de ejercer el máximo efecto sin provocar la muerte celular, se llevaron a cabo ensayos previos usando las líneas celulares murinas de fibroblastos 3T3 y macrófagos J774A.1. Estas células se emplearon porque representan a dos poblaciones celulares presentes en el sinusoide hepático y en el estroma tumoral en general. Por un lado, se comprobó que las células expresaban el receptor y que era capaz de fosforilarse tras la incubación con colágeno tipo I. Para ello, se analizó la expresión proteica de PDDR1 respecto al DDR1 total mediante Western blot.

Como se observa en la figura 36, las células 3T3 y J774A.1 expresaron DDR1 como una banda de 125KDa, capaz de fosforilarse en respuesta al colágeno, aumentando casi 1.5 y más de 2 veces, respectivamente, la expresión de PDDR1/DDR1, en comparación con las células control.

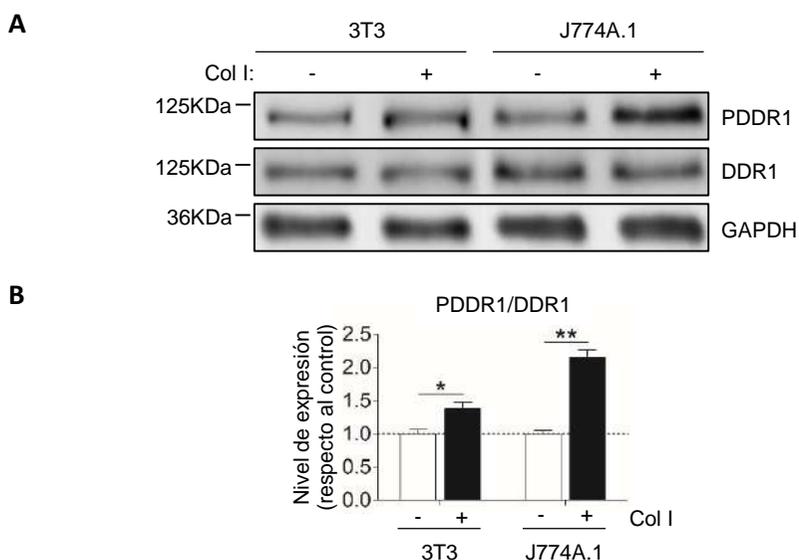


Figura 36. Activación de DDR1 en células 3T3 y J774A.1 incubadas con Col I (10nM). Western blot de PDDR1 y DDR1 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). *P < 0.1, **P < 0.01

Después, se determinó la toxicidad del compuesto DDR1-IN-1, incubando las células 3T3 y J774A.1 con concentraciones crecientes del mismo y calculando la cantidad de células apoptóticas mediante citometría de flujo. Para ello, las células se tiñeron con los marcadores anexina V y yoduro de propidio, diferenciándose las células apoptóticas y las necróticas o muertas, respectivamente. No se usaron cantidades superiores a 100nM de DDR1-IN-1, ya que provocaron alteraciones en la morfología celular, como por ejemplo la aparición de fibras de estrés.

Como se ve en la figura 37, las dosis de DDR1-IN-1 utilizadas para el tratamiento de las células 3T3 y J774A.1 no causaron apoptosis, al no variar el número total de células apoptóticas respecto a las células no tratadas.

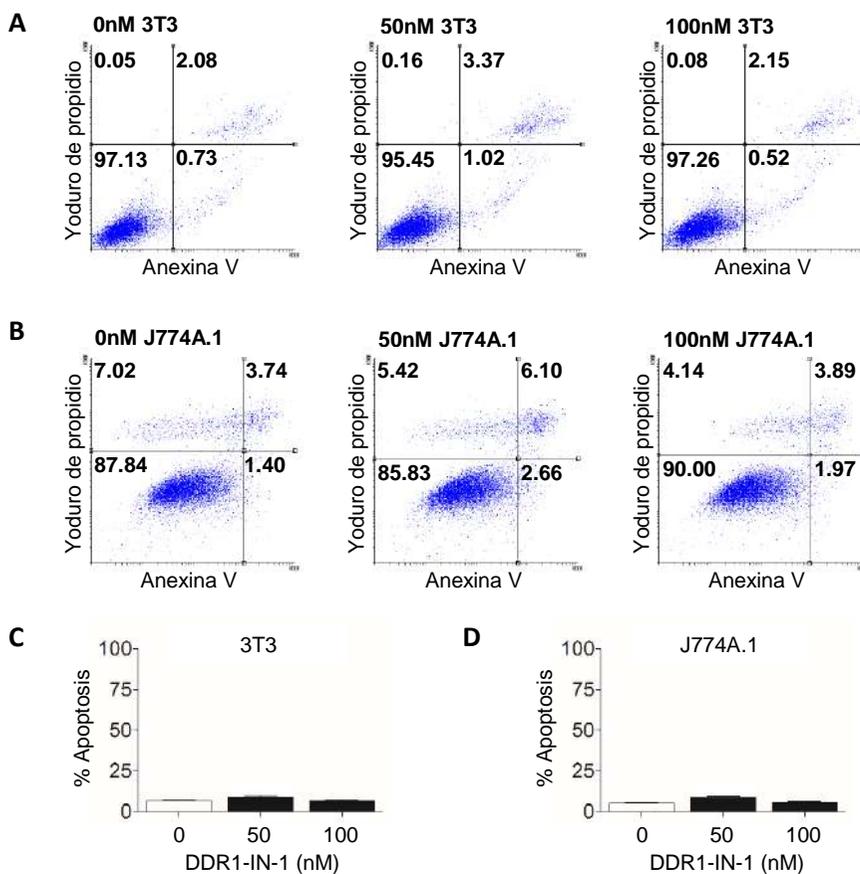


Figura 37. Análisis de células 3T3 y J774A.1 apoptóticas tras la incubación con el inhibidor DDR1-IN-1 (0, 50, 100nM). Anexina V-/Yoduro de propidio-: células vivas; Anexina V+/Yoduro de propidio- y Anexina V+/Yoduro de propidio+: células en apoptosis temprana y tardía, respectivamente; Anexina V-/Yoduro de propidio+: células muertas (A, B). Proporción total de células 3T3 y J774A.1 apoptóticas (C, D). Resultados presentados como la media \pm SD (n=2)

Seguidamente, se analizó la eficacia del compuesto DDR1-IN-1 en la inhibición de la fosforilación del DDR1. Para esto, se examinó la expresión proteica de PDDR1 respecto al DDR1 total mediante Western blot en las células 3T3 y J774A.1 tratadas con el DDR1-IN-1 (0-100nM).

Las concentraciones de DDR1-IN-1 entre 70 y 100nM fueron las más efectivas, ya que redujeron sobre un 40% la fosforilación del DDR1 en las células 3T3 y J774A.1, comparadas con las células no tratadas (Fig.38).

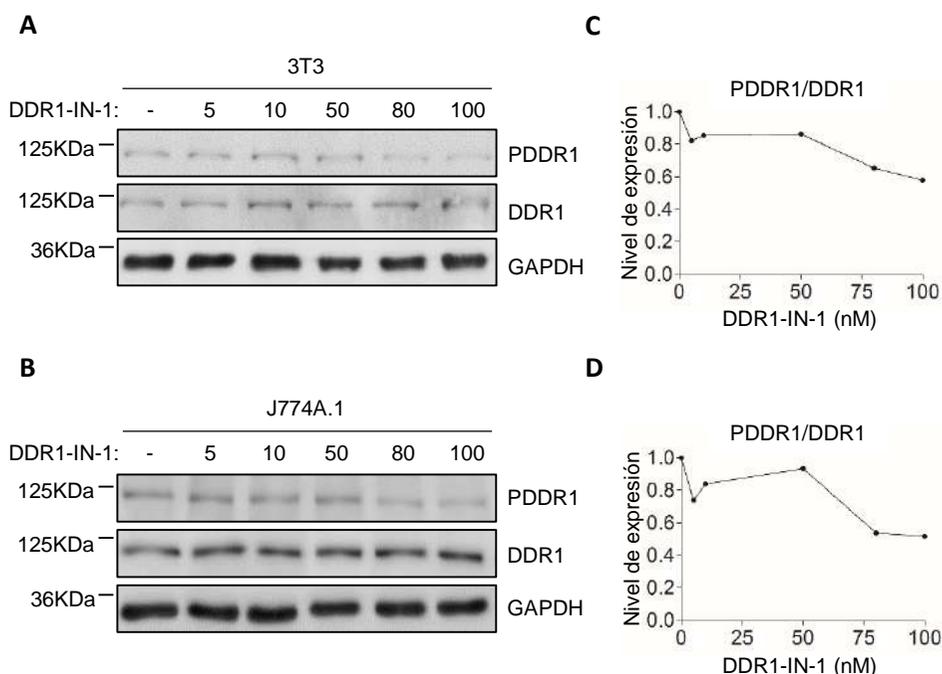


Figura 38. Bloqueo de DDR1 en células 3T3 y J774A.1 incubadas con el inhibidor DDR1-IN-1 (0-100nM). Western blot de PDDR1 y DDR1 (A, B). Cuantificación de la expresión proteica (C, D) (n=1)

V.2.2 El DDR1-IN-1 bloquea la fosforilación del DDR1 en las KCs y HSCs en estado basal (-Ø), y en las LSECs y HSCs activadas por tumor (-TA)

A la vista de los resultados obtenidos en el apartado anterior, se decidió utilizar la concentración de 70nM de DDR1-IN-1 para la inhibición de la fosforilación del DDR1 en las SCs hepáticas.

De este modo, una vez diseñado el modelo *in vitro* de comunicación celular sinusoide-tumor (Capítulo 1), y tras definir 70nM como la cantidad máxima de DDR1-IN-1 para el tratamiento de las SCs hepáticas, el siguiente objetivo fue estudiar el efecto del DDR1-IN-1 en la fosforilación del DDR1 y en la secreción de MMPs por las SCs durante su interacción con las células de CCR C26.

Para llevarlo a cabo, las SCs se cultivaron en estado basal (SCs-∅), o se incubaron con el secretoma o MC tumoral durante una noche (SCs-TA), y después se trataron con la dosis de 70nM de DDR1-IN-1. Previamente, se confirmó que dicha concentración de DDR1-IN-1 no fuera nociva para las SCs, analizando la expresión proteica de CASP3, una enzima relacionada con el proceso de apoptosis, mediante Western blot. El ensayo de apoptosis con anexina V/yoduro de propidio no pudo usarse para el análisis de las SCs, ya que el protocolo en sí causaba la muerte celular.

Las SCs-∅ y las SCs-TA, tratadas o no con el DDR1-IN-1, expresaron la forma inactiva de la enzima o Pro-CASP3, representada por una banda de unos 30KDa. Puesto que no se detectó la presencia de la CASP3 funcional después de ninguna de las condiciones de tratamiento (Fig.39), se concluyó que la dosis de 70nM de DDR1-IN-1 no provocó apoptosis en las SCs.

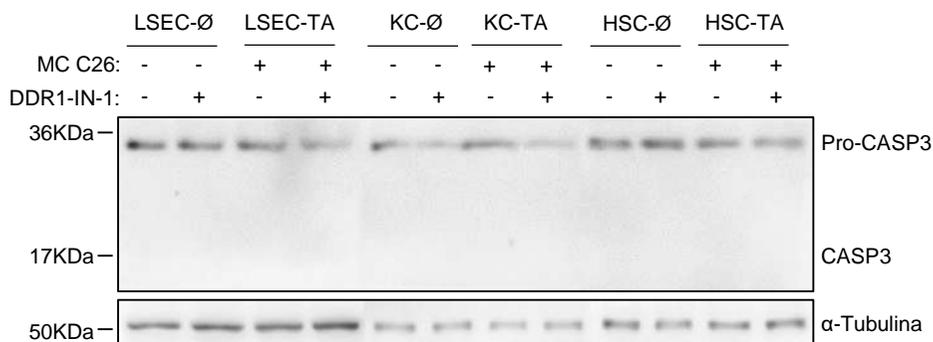


Figura 39. Bloqueo de DDR1 en las SCs hepáticas en estado basal (-∅) e incubadas con el MC de células de CCR C26 durante una noche (-TA), tratadas o no con el inhibidor DDR1-IN-1 (70nM). Western blot de CASP3 (n=2)

A continuación, se analizó el efecto del DDR1-IN-1 en la fosforilación del DDR1 de las SCs durante su interacción con el tumor. Para ello, se evaluó la expresión proteica de PDDR1 respecto al DDR1 total mediante Western blot, en las LSECs, KCs y HSCs, tanto $-\emptyset$ como -TA, tratadas o no con el DDR1-IN-1.

Como se aprecia en la figura 40, el DDR1-IN-1 no ejerció ningún efecto en la fosforilación del DDR1 de las LSECs- \emptyset . Sin embargo, el DDR1-IN-1 inhibió significativamente la fosforilación del receptor en las LSECs-TA, disminuyendo la expresión de PDDR1/DDR1 casi un 50% en comparación con las LSECs- \emptyset y un 70% respecto a las LSECs-TA no tratadas con DDR1-IN-1.

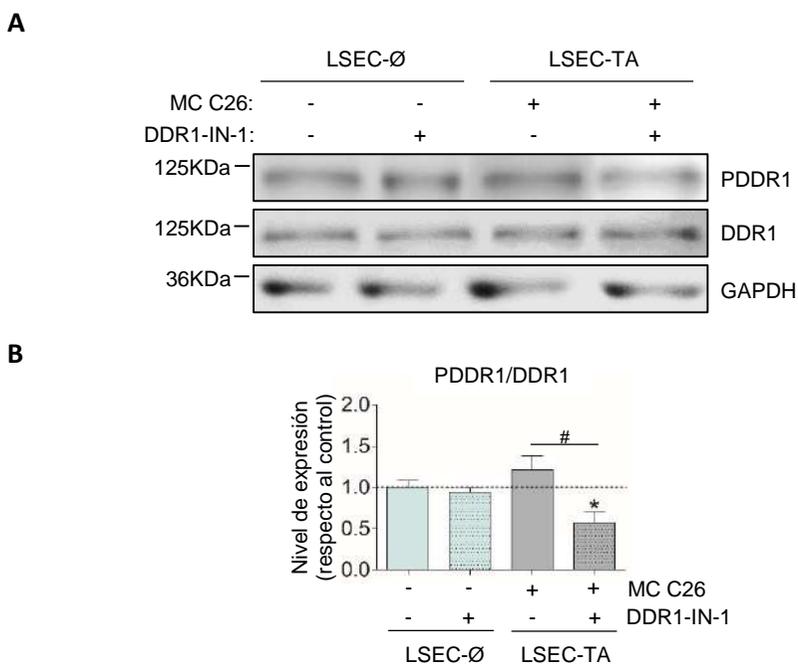
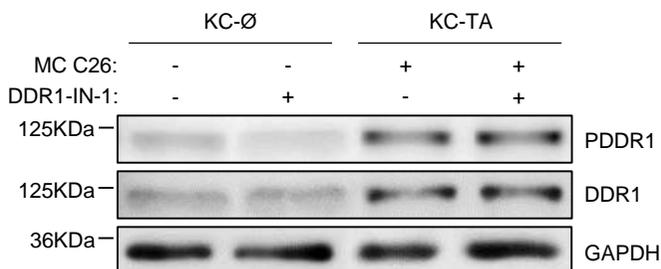


Figura 40. Bloqueo de DDR1 en las LSECs en estado basal ($-\emptyset$) e incubadas con el MC de células de CCR C26 durante una noche (-TA), tratadas o no con el inhibidor DDR1-IN-1 (70nM). Western blot de PDDR1 y DDR1 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). */#P < 0.1

Por su parte, como se ve en la figura 41, el secretoma tumoral incrementó significativamente el nivel de expresión y de fosforilación del DDR1 en las KCs, aumentando aproximadamente un 40% ambos valores, en comparación con las KCs-∅.

Por otro lado, el DDR1-IN-1 disminuyó la fosforilación del DDR1 de las KCs-∅, reduciendo significativamente un 30% la expresión de PDDR1/DDR1 respecto a las KCs-∅ no tratadas. En cambio, el DDR1-IN-1 no tuvo efecto en la fosforilación del receptor de las KCs-TA, manteniéndose los niveles de actividad del DDR1.

A



B

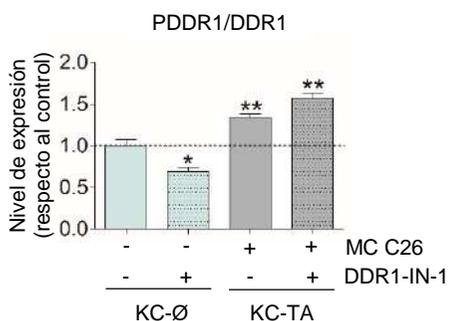
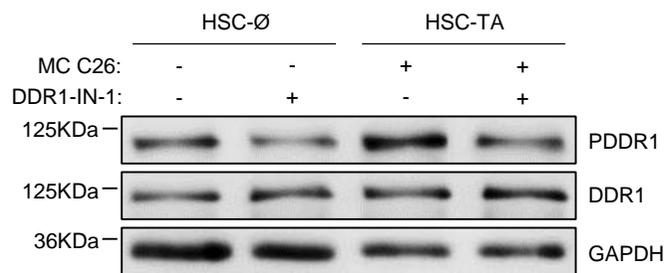


Figura 41. Bloqueo de DDR1 en las KCs en estado basal (-∅) e incubadas con el MC de células de CCR C26 durante una noche (-TA), tratadas o no con el inhibidor DDR1-IN-1 (70nM). Western blot de PDDR1 y DDR1 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media ±SD (n=3). *P < 0.1, **P < 0.01

Por otra parte, como se observa en la figura 42, el secretoma tumoral activó significativamente la fosforilación del DDR1 en las HSCs, incrementándose la expresión de PDDR1/DDR1 un 40% respecto a las HSCs- \emptyset .

Además, el DDR1-IN-1 bloqueó la fosforilación del DDR1 en las HSCs- \emptyset , reduciendo significativamente la expresión de PDDR1/DDR1 un 50%, en comparación con las HSCs- \emptyset no tratadas. Asimismo, el DDR1-IN-1 inhibió la fosforilación del DDR1 en las HSCs-TA, provocando una bajada significativa en la expresión de PDDR1/DDR1 del 30% respecto a las HSCs- \emptyset y del 70% respecto a las HSCs-TA no tratadas con DDR1-IN-1.

A



B

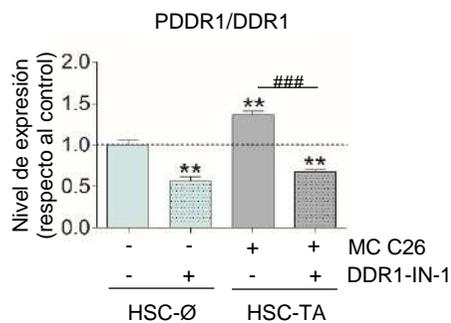


Figura 42. Bloqueo de DDR1 en las HSCs en estado basal (- \emptyset) e incubadas con el MC de células de CCR C26 durante una noche (-TA), tratadas o no con el inhibidor DDR1-IN-1 (70nM). Western blot de PDDR1 y DDR1 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). **P < 0.01, ###P < 0.001

V.2.3 El DDR1-IN-1 inhibe la secreción de MMPs en las KCs y las HSCs en estado basal (-Ø) y activadas por tumor (-TA)

El estudio continuó examinando el efecto del DDR1-IN-1 en la secreción de MMPs por las SCs durante su interacción con el tumor. Se decidió evaluar la producción de MMP2 y MMP9, ya que constituyen dos de las enzimas proteolíticas de matriz más importantes durante los procesos de degradación de la MEC, típicos del avance metastásico. Además, su síntesis se ha relacionado con la expresión de DDR1. Estas MMPs presentan actividad enzimática gelatinasa y colagenasa, es decir, son capaces de degradar colágeno desnaturalizado y en su estructura de triple hélice. Concretamente, la MMP2 es específica de los colágenos tipo IV, V, VII y X; y la MMP9 de los colágenos tipo I, IV y V.

Para realizar este análisis, las SCs se cultivaron en estado basal (SCs-Ø), o se incubaron con el secretoma o MC tumoral durante una noche (SCs-TA), y después se trataron con la dosis de 70nM de DDR1-IN-1. Seguidamente, tras 24 horas adicionales de cultivo en medio basal, se extrajeron los secretomas, y la cantidad de MMP2 y MMP9 producida por las SCs-Ø y SCs-TA, tratadas o no con DDR1-IN-1, fue detectada por zimografía.

Tal como se aprecia en la figura 43, el secretoma de las LSECs presentó dos bandas de unos 70KDa correspondientes a las formas inactiva (Pro-) y activa de la MMP2, además de una única banda de 90KDa, referente a la Pro-MMP9. No se registraron cambios en los niveles de expresión de MMPs presentes en el secretoma de las LSECs bajo ninguna de las condiciones de tratamiento empleadas.

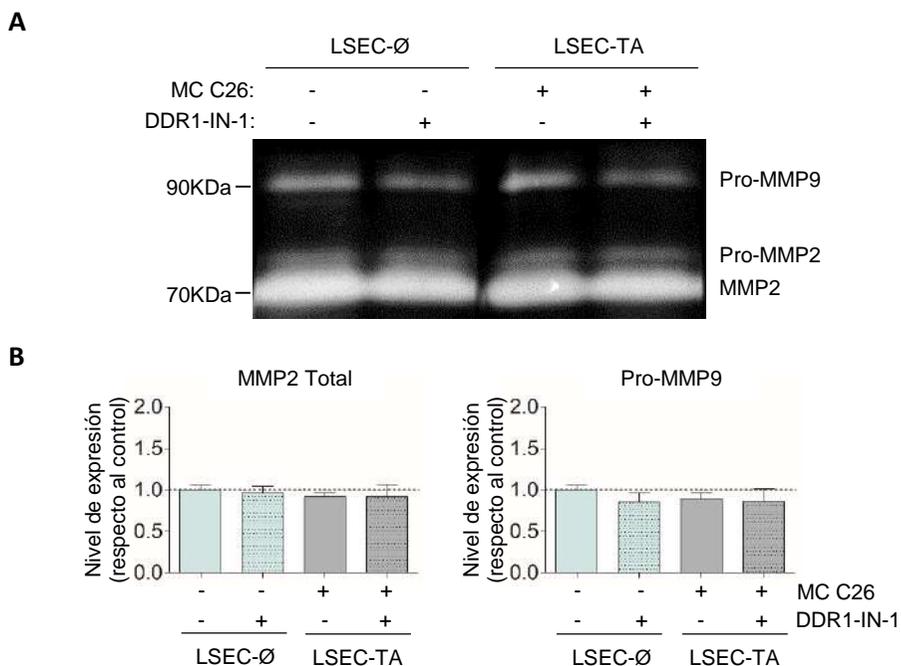


Figura 43. Secreción de MMPs por las LSECs en estado basal (-∅) e incubadas con el MC de células de CCR C26 durante una noche (-TA), tratadas o no con el inhibidor DDR1-IN-1 (70nM). Zimografía de MMP2 y MMP9 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3)

Por otra parte, según los resultados mostrados en la figura 44, las KCs secretaron ambas formas, inactiva y activa, de las MMPs. Al comparar los niveles de expresión de MMPs totales en el secretoma de las KCs, no se vieron diferencias reseñables en función del tratamiento. Sin embargo, al distinguir entre las formas inactiva y activa de las MMPs, sí se detectaron cambios significativos dependiendo de las condiciones de cultivo.

El DDR1-IN-1 inhibió un 25% la secreción de la forma activa de ambas MMPs por las KCs-∅, respecto a las KCs-∅ no tratadas. De igual modo, el DDR1-IN-1 bloqueó un 50% la producción de la MMP9 activa por las KCs-TA, comparadas con las KCs-∅ y las KCs-TA sin DDR1-IN-1 (indicado bajo las bandas).

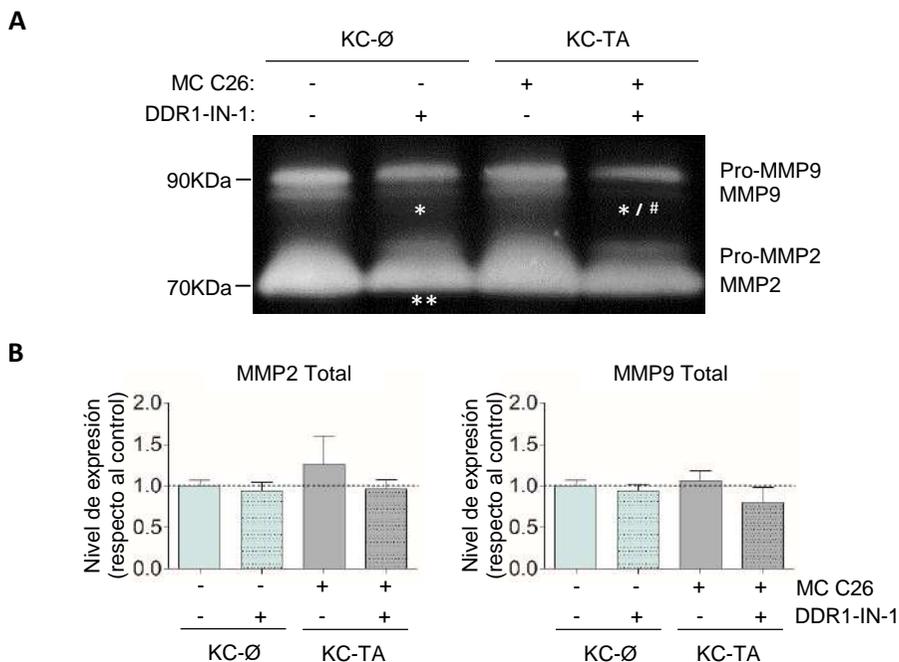


Figura 44. Secreción de MMPs por las KCs en estado basal (-∅) e incubadas con el MC de células de CCR C26 durante una noche (-TA), tratadas o no con el inhibidor DDR1-IN-1 (70nM). Zimografía de MMP2 y MMP9 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=2). */#P < 0.1, **P < 0.01

En cuanto al secretoma de las HSCs (Fig.45), se registraron ambas formas de la MMP2 y únicamente la Pro-MMP9.

Por un lado, el secretoma tumoral estimuló la producción de MMPs por las HSCs, provocando un aumento significativo del 30% en la MMP2 total y del 90% en la Pro-MMP9, respecto a las HSCs-∅.

Por otro lado, el DDR1-IN-1 inhibió significativamente la secreción de MMPs por las HSCs, respecto a las células sin tratar. Por una parte, el DDR1-IN-1 redujo un 25% la expresión de ambas MMPs en el secretoma de las HSCs-∅. Por otra parte, el DDR1-IN-1 disminuyó un 30% la cantidad de MMP2 total y más de un 90% la expresión de Pro-MMP9 en el secretoma de las HSCs-TA.

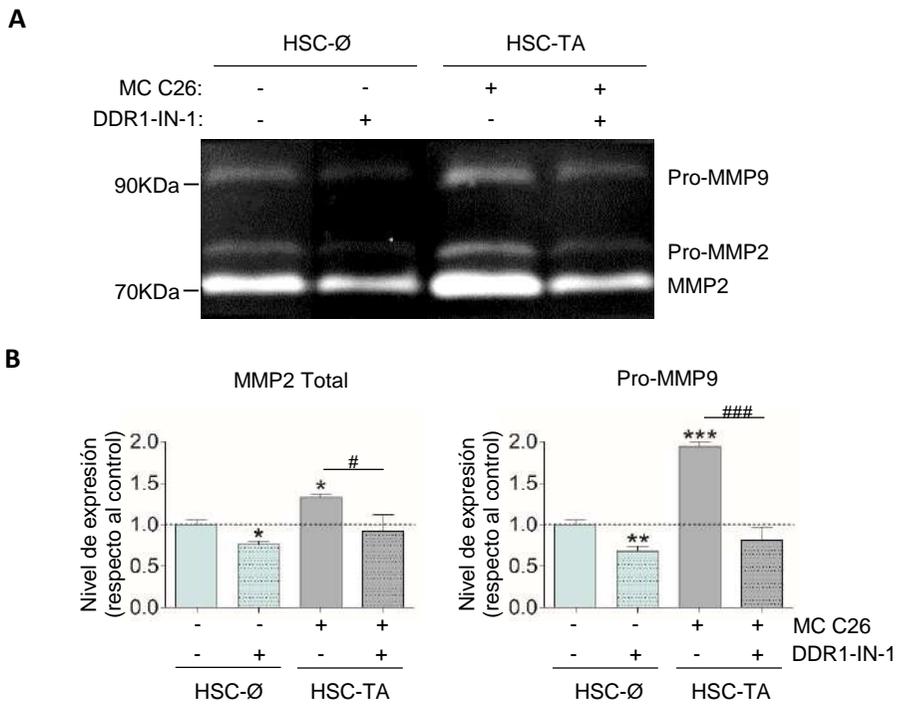


Figura 45. Secreción de MMPs por las HSCs en estado basal (-Ø) e incubadas con el MC de células de CCR C26 durante una noche (-TA), tratadas o no con el inhibidor DDR1-IN-1 (70nM). Zimografía de MMP2 y MMP9 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). */#P < 0.1, **P < 0.01, ***/###P < 0.001

V.2.4 El bloqueo del DDR1 en las LSECs y las HSCs activadas por tumor (-TA) inhibe la fosforilación del DDR1 tumoral

Tras describir el efecto del DDR1-IN-1 en la fosforilación del DDR1 y en la secreción de MMPs por las SCs durante su interacción el tumor, el siguiente objetivo fue determinar cómo afectó el bloqueo del DDR1 sinusoidal a la fosforilación del receptor, la secreción de MMPs y a la proliferación, migración e invasión de las células de CCR C26 durante su interacción con las SCs hepáticas.

Para llevarlo a cabo, se empleó el modelo *in vitro* de comunicación celular sinusoide-tumor (Capítulo 1). De este modo, las células C26 se cultivaron en estado basal (C26-∅), o se incubaron con el secretoma o MC sinusoidal durante 24 horas (C26-SA). El secretoma sinusoidal empleado fue el correspondiente a las LSECs, KCs y HSCs, tanto -∅ como -TA, tratadas o no con DDR1-IN-1.

En primer lugar, se determinó el efecto del bloqueo del DDR1 sinusoidal en la fosforilación del DDR1 tumoral. Para ello, se examinó la expresión proteica de PDDR1 respecto al DDR1 total por Western blot.

Como se ve en la figura 46, el secretoma de las LSECs-∅ no provocó ningún efecto reseñable en la fosforilación del DDR1 de las células C26. En cambio, el secretoma de las LSECs-TA aumentó significativamente un 40% la expresión de PDDR1/DDR1 tumoral, respecto a las células C26 en estado basal.

Por otra parte, el secretoma de las LSECs-TA con el DDR1 bloqueado, inhibió la fosforilación del DDR1 tumoral, reduciendo significativamente casi un 50% la expresión de PDDR1/DDR1, respecto a las células C26 tratadas con el secretoma de las LSECs-TA con el DDR1 activo.

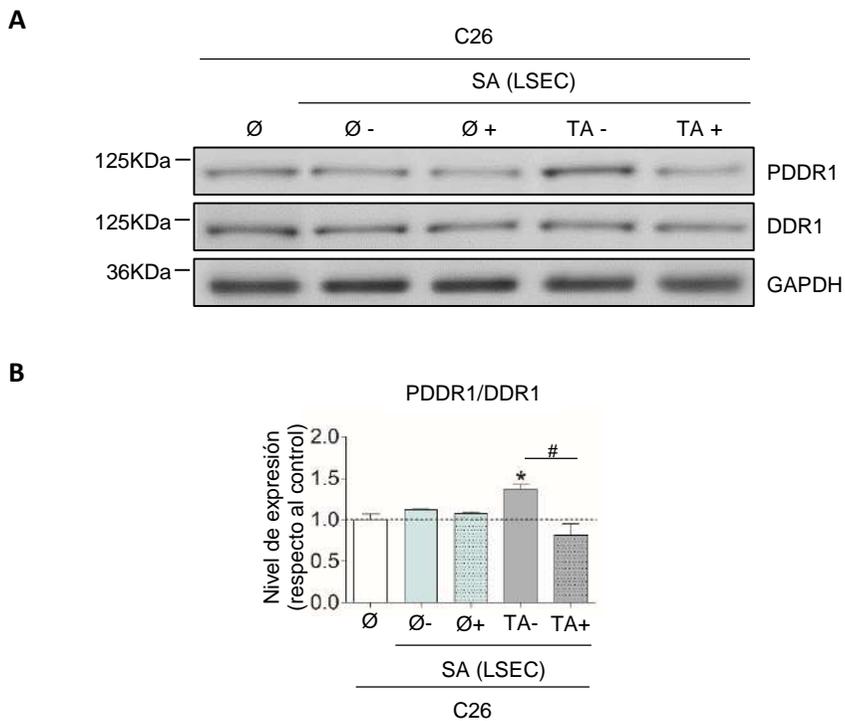


Figura 46. Efecto del bloqueo del DDR1 de las LSECs en la fosforilación del DDR1 de células de CCR C26. Las células C26 se incubaron en estado basal (-∅) o con el MC de las LSECs durante 24 horas (-SA). El MC de las LSECs fue obtenido de células en estado basal (-∅) y activadas por tumor durante una noche (-TA), sin (-) y con (+) el tratamiento con DDR1-IN-1. Western blot de PDDR1 y DDR1 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). */#P < 0.1

A continuación, el secretoma de las KCs no tuvo ningún efecto en la fosforilación del DDR1 tumoral. En este sentido, no se produjeron cambios en los valores de expresión de PDDR1/DDR1 de las células C26 tras la exposición a ninguna de las condiciones de tratamiento, respecto a los datos obtenidos en las células C26 en estado basal (Fig.47).

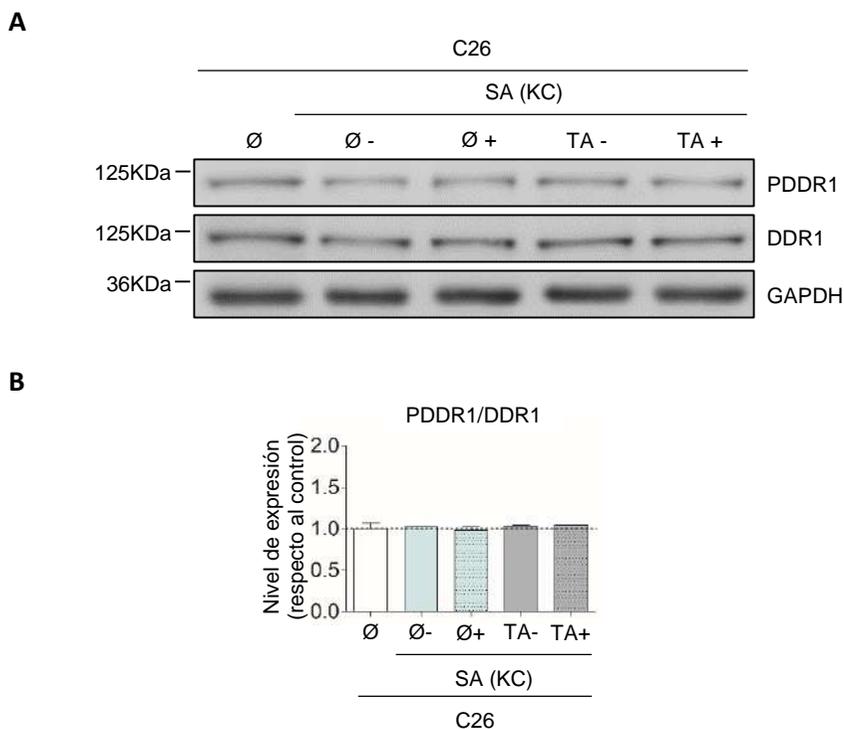


Figura 47. Efecto del bloqueo del DDR1 de las KCs en la fosforilación del DDR1 de células de CCR C26. Las células C26 se incubaron en estado basal (-Ø) o con el MC de las KCs durante 24 horas (-SA). El MC de las KCs fue obtenido de células en estado basal (-Ø) y activadas por tumor durante una noche (-TA), sin (-) y con (+) el tratamiento con DDR1-IN-1. Western blot de PDDR1 y DDR1 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3)

Por último, como puede verse en la figura 48, el secretoma de las HSCs-TA estimuló la fosforilación del DDR1 tumoral, aumentando significativamente un 50% la expresión de PDDR1/DDR1, respecto a las células C26 tratadas con el secretoma de las HSCs-Ø.

En cambio, el secretoma de las HSCs-TA con el DDR1 bloqueado, inhibió la fosforilación del DDR1 tumoral, disminuyendo significativamente casi un 60% la expresión de PDDR1/DDR1, respecto a las células C26 tratadas con el secretoma de las HSCs-TA con el DDR1 activo.

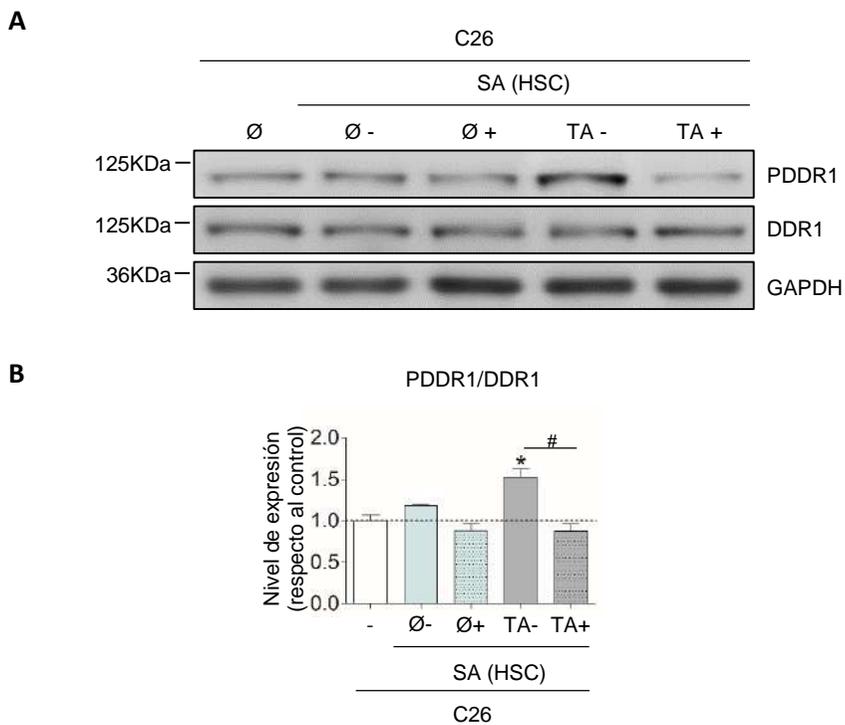


Figura 48. Efecto del bloqueo del DDR1 de las HSCs en la fosforilación del DDR1 de células de CCR C26. Las células C26 se incubaron en estado basal (-∅) o con el MC de las HSCs durante 24 horas (-SA). El MC de las HSCs fue obtenido de células en estado basal (-∅) y activadas por tumor durante una noche (-TA), sin (-) y con (+) el tratamiento con DDR1-IN-1. Western blot de PDDR1 y DDR1 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). */#P < 0.1

V.2.5 El bloqueo del DDR1 en las LSECs activadas por tumor (-TA) y en las HSCs en estado basal (-∅) inhibe la secreción de MMPs por el tumor

En segundo lugar, se prosiguió el análisis evaluando el efecto del bloqueo del DDR1 sinusoidal en la secreción de MMPs por el tumor.

Para ello, las células C26 se cultivaron en estado basal (C26-∅), o se incubaron con el secretoma o MC sinusoidal durante 24 horas (C26-SA). El secretoma sinusoidal empleado fue el correspondiente a las LSECs, KCs y HSCs, tanto -∅ como -TA, tratadas o no con DDR1-IN-1. Después, tras 24 horas adicionales de cultivo en medio basal, se extrajeron los secretomas, y la cantidad de MMP2 y MMP9 producida por las células C26-∅ y C26-SA fue detectada por zimografía.

Según lo que se muestra en la figura 49, sólo se detectó la forma activa de la MMP2, como una banda de unos 70KDa, en el secretoma de las células C26 tratadas con el secretoma de las LSECs.

Por un lado, el secretoma de las LSECs-∅ no tuvo ningún efecto significativo en la secreción de MMP2 por las células C26. Sin embargo, el secretoma de las LSECs-TA causó un aumento significativo de más del doble en la producción de MMP2 tumoral, respecto a los niveles detectados en el secretoma de las células C26 en estado basal.

Por otro lado, el tratamiento con el secretoma de las LSECs-TA con el DDR1 bloqueado, inhibió la secreción de MMP2 tumoral, reduciendo significativamente un 25% su expresión, comparada con los valores observados tras el cultivo de las células tumorales con el secretoma de las LSECs-TA con el DDR1 activo.

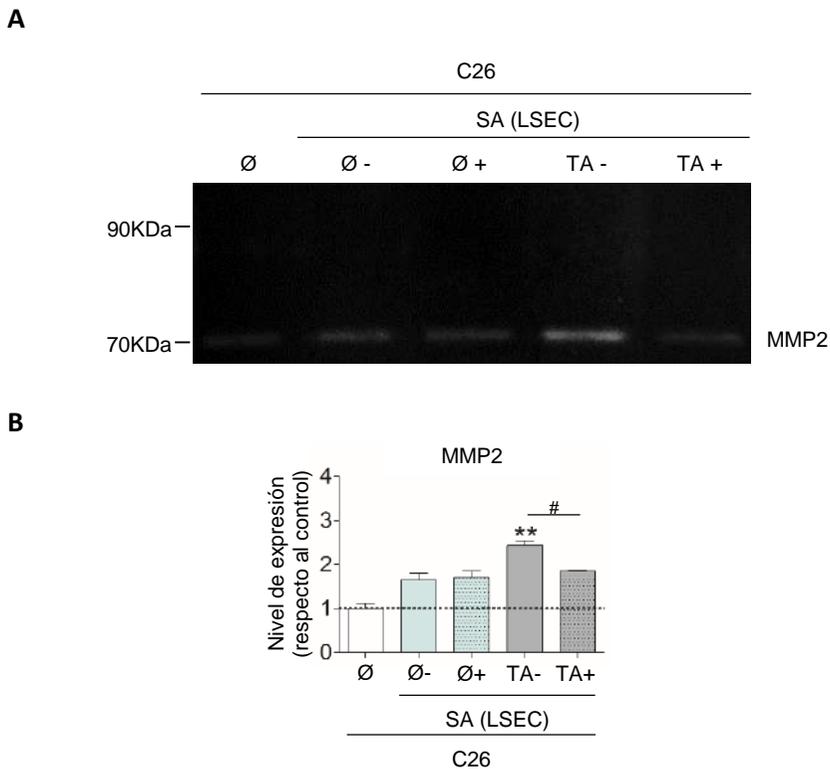
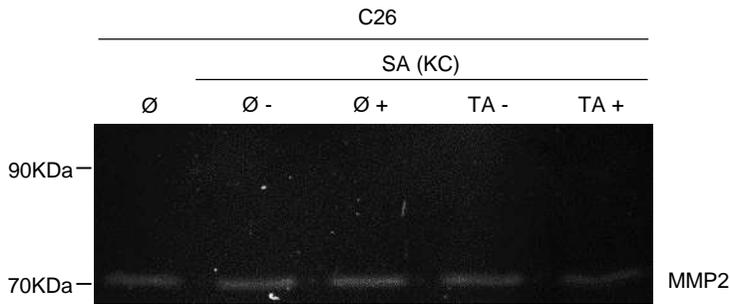


Figura 49. Efecto del bloqueo del DDR1 de las LSECs en la secreción de MMPs por células de CCR C26. Las células C26 se incubaron en estado basal (-∅) o con el MC de las LSECs durante 24 horas (-SA). El MC de las LSECs fue obtenido de células en estado basal (-∅) y activadas por tumor durante una noche (-TA), sin (-) y con (+) el tratamiento con DDR1-IN-1. Zimografía de MMP2 y MMP9 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). #P < 0.1, **P < 0.01

Seguidamente, únicamente se registró la presencia de la MMP2 activa en el secretoma de las células C26 incubadas con el secretoma de las KCs. En este caso, no se apreciaron alteraciones significativas en la expresión de MMP2 en el secretoma tumoral bajo ninguna de las condiciones de tratamiento (Fig.50).

A



B

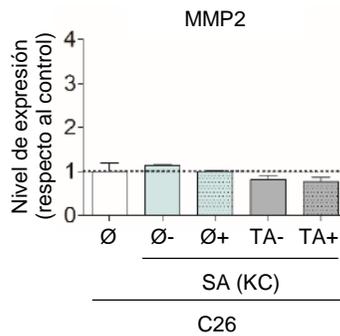


Figura 50. Efecto del bloqueo del DDR1 de las KCs en la secreción de MMPs por células de CCR C26. Las células C26 se incubaron en estado basal (-Ø) o con el MC de las KCs durante 24 horas (-SA). El MC de las KCs fue obtenido de células en estado basal (-Ø) y activadas por tumor durante una noche (-TA), sin (-) y con (+) el tratamiento con DDR1-IN-1. Zimografía de MMP2 y MMP9 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media ±SD (n=3)

Para terminar, como se ve en la figura 51, sólo se detectó la forma activa de la MMP2 en el secretoma de las células C26 incubadas con el secretoma de las HSCs.

Por una parte, el secretoma de las HSCs correspondiente a las diferentes condiciones de tratamiento incrementó significativamente la secreción de MMP2 tumoral.

Si bien, dicha subida fue más acusada en las células C26 tratadas con el secretoma de las HSCs con el DDR1 activo, con valores de producción de MMP2 3.5 veces superiores a los de las células C26 en estado basal. Igualmente, el secretoma de las HSCs con el DDR1 bloqueado aumentó entre el doble y el triple la secreción de MMP2 por las células C26.

Aunque el secretoma de las HSCs estimuló la producción de MMP2 tumoral, cabe desatacar que el secretoma de las HSCs- \emptyset con el DDR1 bloqueado redujo significativamente un 30% la secreción de MMP2 tumoral, respecto al tratamiento con el secretoma de las HSCs- \emptyset con el DDR1 activo.

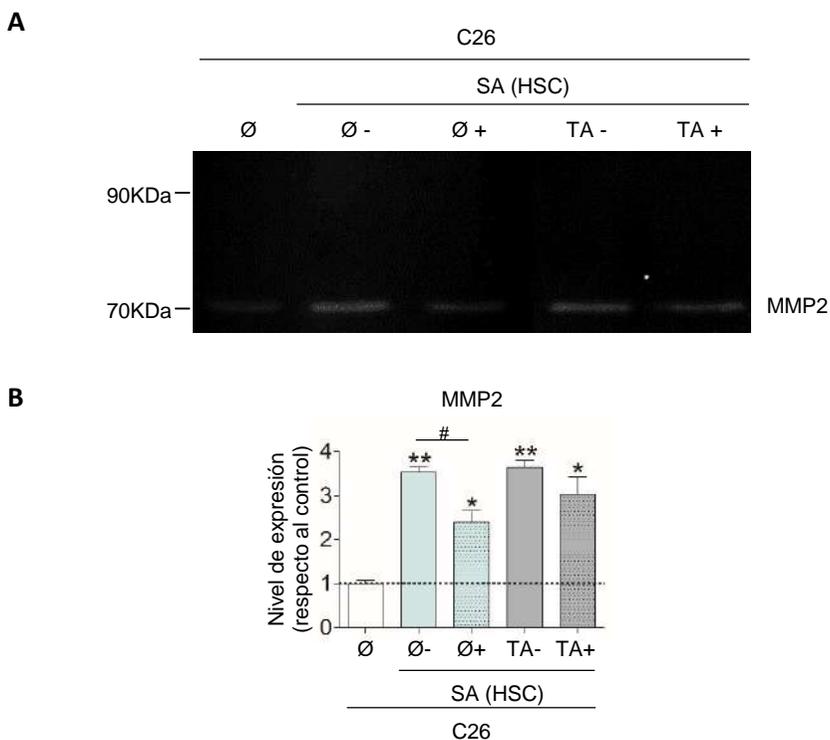


Figura 51. Efecto del bloqueo del DDR1 de las HSCs en la secreción de MMPs por células de CCR C26. Las células C26 se incubaron en estado basal (- \emptyset) o con el MC de las HSCs durante 24 horas (-SA). El MC de las HSCs fue obtenido de células en estado basal (- \emptyset) y activadas por tumor durante una noche (-TA), sin (-) y con (+) el tratamiento con DDR1-IN-1. Zimografía de MMP2 y MMP9 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). */#P < 0.1, **P < 0.01

V.2.6 El bloqueo del DDR1 en las SCs en estado basal (-Ø) y activadas por tumor (-TA) inhibe la proliferación, migración e invasión tumoral

Finalmente, en tercer y último lugar, se examinó el efecto del bloqueo del DDR1 sinusoidal en diferentes procesos celulares relacionados con el desarrollo metastásico tumoral, concretamente, en la proliferación, la migración y la invasión a través de colágeno tipo I.

Para esto, las células C26 se cultivaron en estado basal (C26-Ø), o se incubaron con el secretoma o MC sinusoidal durante 24 o 48 horas (C26-SA). El secretoma sinusoidal empleado fue el correspondiente a las LSECs, KCs y HSCs, tanto -Ø como -TA, tratadas o no con DDR1-IN-1. De esta forma, los diferentes secretomas sinusoidales se emplearon como fuente de factores proliferativos (incubación de 48 horas) o quimiotácticos (incubación de 24 horas) para el tratamiento de las células C26.

Por un lado, tal como se aprecia en la figura 52A, el secretoma de las LSECs-Ø no provocó cambios en los valores de proliferación tumoral, respecto a los observados en las células C26 en estado basal. En cambio, el secretoma de las LSECs-TA estimuló significativamente un 20% la proliferación tumoral, en comparación con las células C26 en estado basal.

Por otra parte, el secretoma de las LSECs-TA con el DDR1 bloqueado redujo significativamente un 20% los niveles de crecimiento tumoral, respecto a los valores obtenidos tras el tratamiento con el secretoma de las LSECs-TA con el DDR1 activo.

Por otro lado, como se muestra en la figura 52B y C, aunque el secretoma de las LSECs ocasionó una cierta subida en la migración e invasión tumoral, no se detectaron cambios significativos respecto a las células C26 en estado basal.

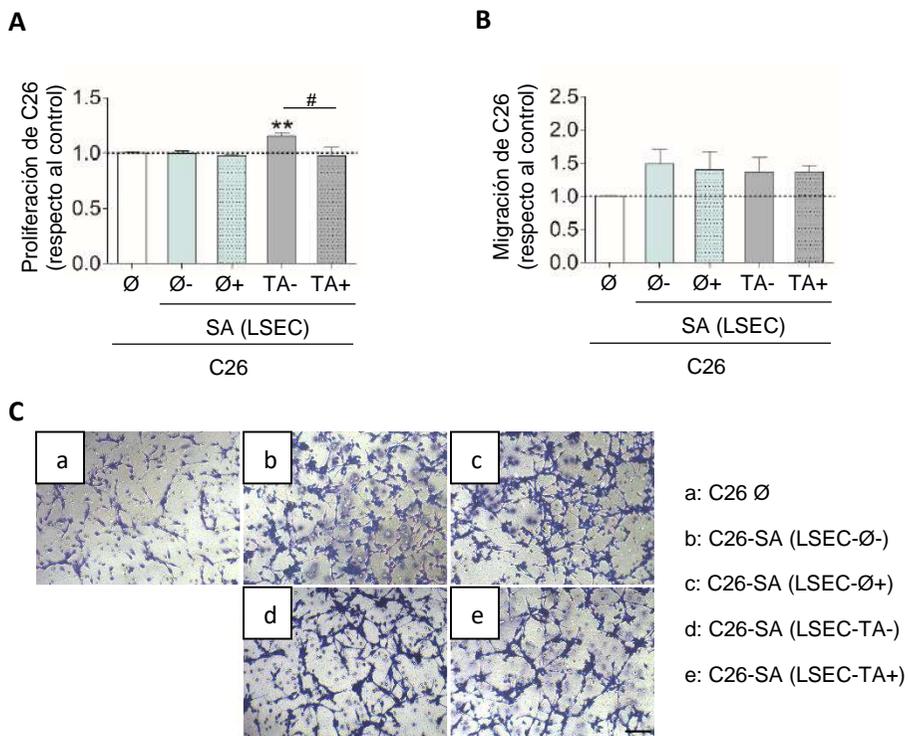


Figura 52. Efecto del bloqueo del DDR1 de las LSECs en la proliferación, migración e invasión a través de Col I (1%) de células de CCR C26. Las células C26 se incubaron en estado basal (-Ø) o con el MC de las LSECs durante 24 o 48 horas (-SA). El MC de las LSECs fue obtenido de células en estado basal (-Ø) y activadas por tumor durante una noche (-TA), sin (-) y con (+) el tratamiento con DDR1-IN-1. Proliferación tras 48 horas (A), migración e invasión tras 24 horas (B). Imágenes de microscopía óptica representativas de la migración e invasión. Barra de escala, 50µm (C). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). #P < 0.1, **P < 0.01

A continuación, se vio que el secretoma de las KCs-Ø no alteró la proliferación tumoral, respecto a las células C26 en estado basal. Sin embargo, el secretoma de las KCs-TA incrementó significativamente un 20% el número de células tumorales, en comparación con las células C26 en estado basal. Este incremento fue restablecido a los niveles basales como resultado del cultivo del tumor con el secretoma de las KCs-TA con el DDR1 bloqueado (Fig.53A).

En cuanto a los datos de migración e invasión, el secretoma de las KCs con el DDR1 activo aumentó significativamente un 25% estas capacidades tumorales, respecto a las células C26 en estado basal. En cambio, el secretoma de las KCs con el DDR1 bloqueado disminuyó el potencial migratorio e invasivo tumoral hasta valores basales (Fig.53B y C).

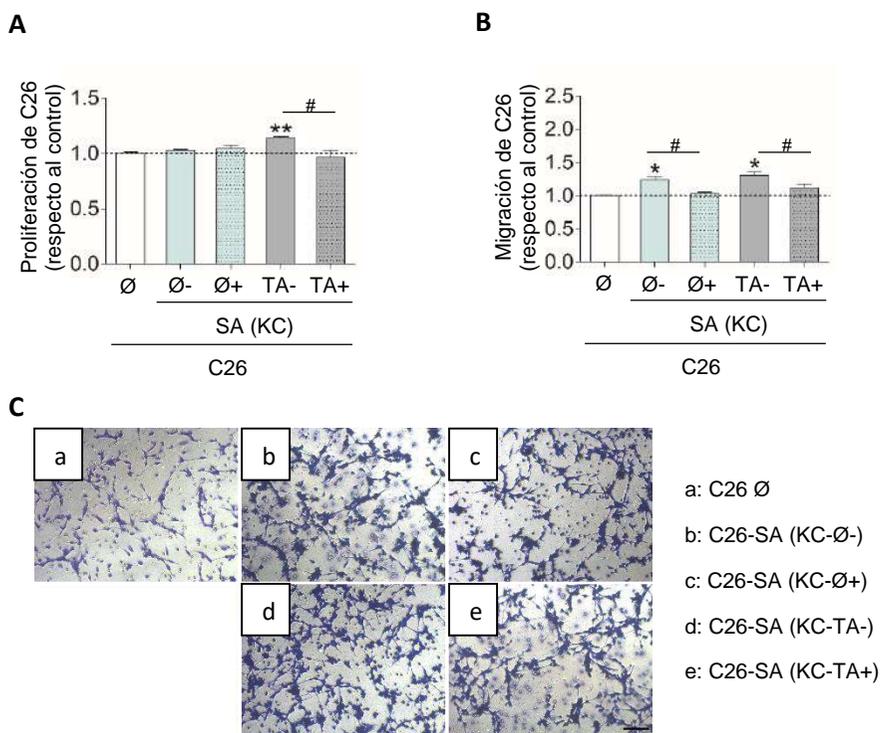


Figura 53. Efecto del bloqueo del DDR1 de las KCs en la proliferación, migración e invasión a través de Col I (1%) de células de CCR C26. Las células C26 se incubaron en estado basal (-∅) o con el MC de las KCs durante 24 o 48 horas (-SA). El MC de las KCs fue obtenido de células en estado basal (-∅) y activadas por tumor durante una noche (-TA), sin (-) y con (+) el tratamiento con DDR1-IN-1. Proliferación tras 48 horas (A), migración e invasión tras 24 horas (B). Imágenes de microscopía óptica representativas de la migración e invasión. Barra de escala, 50µm (C). Resultados presentados como la media ±SD (n=3). */#P < 0.1, **P < 0.01

En último lugar, el secretoma de las HSCs con el DDR1 activo estimuló significativamente sobre un 20% la proliferación tumoral, respecto a las células C26 en estado basal. Por el contrario, el secretoma de las HSCs con el DDR1 bloqueado revirtió el crecimiento tumoral hasta niveles basales (Fig.54A).

Además, el secretoma de las HSCs con el DDR1 activo subió una media del 65% la migración e invasión tumoral, en comparación con las células C26 en estado basal. Sin embargo, este aumento bajó a valores basales tras el tratamiento del tumor con el secretoma de las HSCs- \emptyset con el DDR1 bloqueado (Fig.54B y C).

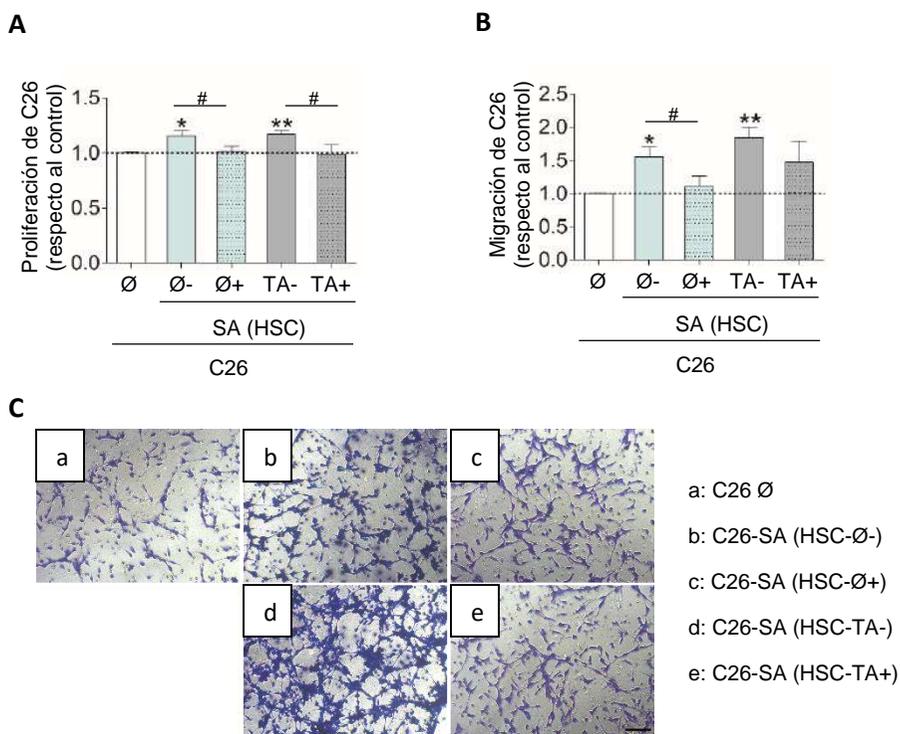


Figura 54. Efecto del bloqueo del DDR1 de las HSCs en la proliferación, migración e invasión a través de Col I (1%) de células de CCR C26. Las células C26 se incubaron en estado basal (\emptyset) o con el MC de las HSCs durante 24 o 48 horas (-SA). El MC de las HSCs fue obtenido de células en estado basal (\emptyset) y activadas por tumor durante una noche (-TA), sin (-) y con (+) el tratamiento con DDR1-IN-1. Proliferación tras 48 horas (A), migración e invasión tras 24 horas (B). Imágenes de microscopía óptica representativas de la migración. Barra de escala, 50 μ m (C). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3) */#P < 0.1, **P < 0.01

V.3 Resumen

Según los resultados obtenidos en este capítulo, tras el cultivo basal de las SCs hepáticas, el compuesto DDR1-IN-1 es capaz de bloquear la fosforilación del DDR1 en las KCs y en las HSCs, lo que se correlaciona con una inhibición de su secreción de MMPs. En cambio, el DDR1-IN-1 no causa ningún efecto en el DDR1 ni en la síntesis de MMPs por las LSECs.

Por otra parte, tras el tratamiento de las SCs con el secretoma tumoral, la fosforilación del DDR1 aumenta en las KCs y en las HSCs, sin mostrar signos de actividad en las LSECs. En estas circunstancias, el DDR1-IN-1 bloquea la fosforilación del DDR1 en las LSECs y en las HSCs, pero únicamente coincide con una inhibición de la síntesis de MMPs por las HSCs. Sorprendentemente, aunque el DDR1-IN-1 no altera la fosforilación del DDR1 de las KCs, sí inhibe su producción de MMP9.

En cuanto a la respuesta del tumor al secretoma sinusoidal, la fosforilación del DDR1 y la secreción de MMP2 tumoral se incrementan tras el tratamiento con los secretomas de las LSECs y las HSCs activadas previamente por el tumor. En cambio, el bloqueo del DDR1 en estas SCs inhibe la fosforilación del receptor y la secreción de MMP2 por el tumor.

Además, el secretoma de las SCs, principalmente de las estimuladas por el tumor, potencia las capacidades proliferativas, migratorias e invasivas tumorales. Sin embargo, el bloqueo del DDR1 en las SCs inhibe dichas propiedades tumorales.

Teniendo en cuenta estos resultados obtenidos al bloquear el DDR1 sinusoidal, el siguiente objetivo será silenciar el DDR1 tumoral y evaluar su implicación en la capacidad metastásica *in vitro* e *in vivo* de las células de CCR.

VI. Capítulo 3

Implicación del DDR1 tumoral en el desarrollo metastásico
de las células de CCR

VI.1 Introducción

La participación del DDR1 tumoral en la progresión metastásica de las células de CCR ha supuesto la elección de dicho receptor como posible diana terapéutica en el tratamiento de esta enfermedad. En este sentido, estudios recientes demuestran los efectos anti-metastásicos derivados de la inhibición del DDR1 en las células tumorales de colon ¹²⁹⁻¹³². Con el fin de ampliar dichas investigaciones y, los objetivos de este apartado son:

1. Bloquear *in vitro* la fosforilación del DDR1 en las células humanas de CCR metastásico HT29 utilizando el compuesto inhibidor DDR1-IN-1. Analizar el efecto de este bloqueo en la expresión de mediadores secundarios relacionados con los procesos de adhesión, proliferación, migración e invasión tumoral.
2. Silenciar *in vitro* la expresión del DDR1 en las células murinas de CCR metastásico C26 y examinar el efecto de este silenciamiento en la proliferación e invasión tumoral.
3. Estudiar el papel del DDR1 tumoral en el desarrollo *in vivo* de metástasis hepáticas de CCR murino.

VI.2 Resultados

VI.2.1 El DDR1-IN-1 bloquea la fosforilación del DDR1 en las células de CCR HT29 a través de las vías de señalización celular PI3K/AKT y MAPK/ERK

Al igual que en el caso de los fibroblastos 3T3, los macrófagos J774A.1 y las SCs hepáticas murinas, se usó el compuesto químico DDR1-IN-1 para bloquear la fosforilación del DDR1 en las células humanas de CCR metastásico HT29.

En primer lugar, se estableció una concentración apropiada de DDR1-IN-1 para el tratamiento de las células tumorales. Es decir, la dosis de DDR1-IN-1 con el máximo efecto inhibitorio, pero sin resultar tóxica.

Por un lado, se determinó la toxicidad del compuesto DDR1-IN-1, incubando las células tumorales con concentraciones crecientes del mismo y calculando la proporción de células apoptóticas mediante citometría de flujo. Para ello, las células se tiñeron con los marcadores anexina V y yoduro de propidio, diferenciándose las células apoptóticas y las necróticas o muertas, respectivamente. No se utilizaron concentraciones superiores a 200nM de DDR1-IN-1, puesto que causaron alteraciones en la morfología celular.

Como se aprecia en la figura 55, las dosis de DDR1-IN-1 empleadas no resultaron nocivas para las células tumorales, ya que no se observaron cambios significativos en el número total de células apoptóticas respecto a las células no tratadas.

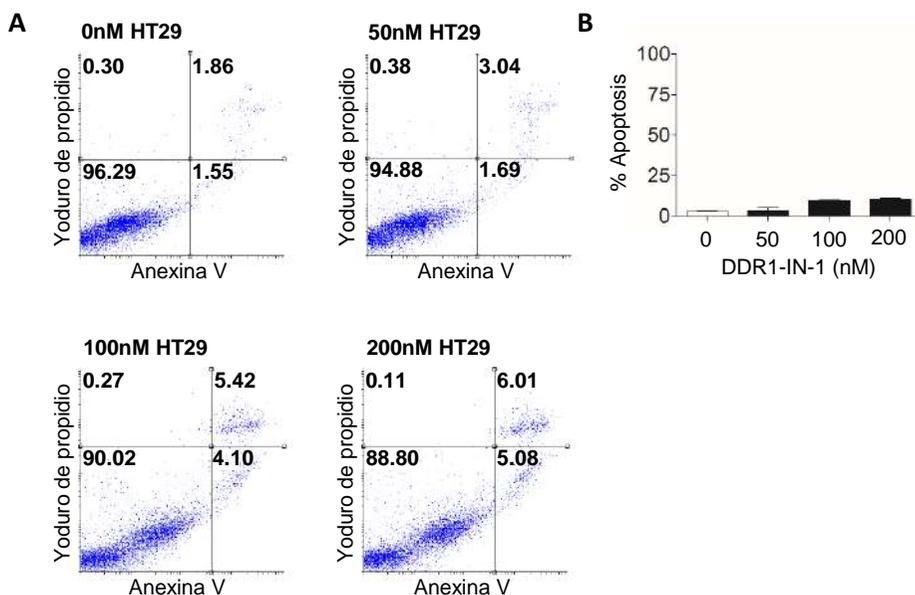


Figura 55. Análisis de células de CCR HT29 apoptóticas tras la incubación con el inhibidor DDR1-IN-1 (0, 50, 100, 200nM). Anexina V-/Yoduro de propidio-: células vivas; Anexina V+/Yoduro de propidio- y Anexina V+/Yoduro de propidio+: células en apoptosis temprana y tardía, respectivamente; Anexina V-/Yoduro de propidio+: células muertas (A). Proporción total de células apoptóticas (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=2)

Por otro lado, se evaluó la eficacia del compuesto DDR1-IN-1 en la inhibición de la fosforilación del DDR1 tumoral, analizando la expresión proteica de PDDR1 respecto al DDR1 total mediante Western blot en las células HT29 tratadas con el DDR1-IN-1 (0-200nM).

La concentración de DDR1-IN-1 de 200nM, además de no provocar apoptosis (Fig.55), resultó la más efectiva, ya que disminuyó aproximadamente un 60% la fosforilación del DDR1 en las células tumorales, comparadas con las células no tratadas (Fig.56). Por estas razones, dicha cantidad de DDR1-IN-1 fue la empleada para el bloqueo de la fosforilación del receptor en las células HT29.

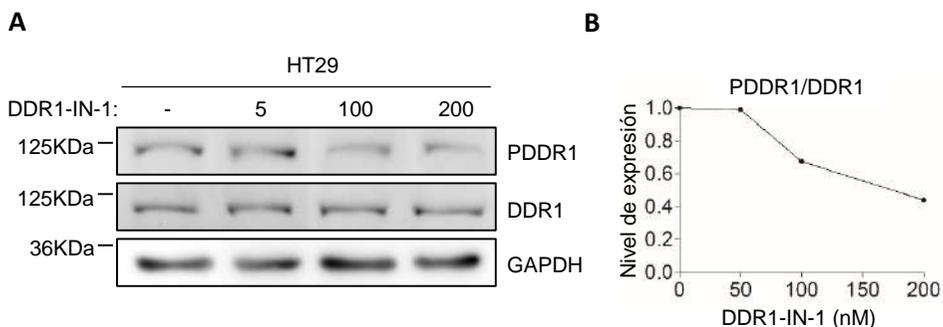


Figura 56. Bloqueo de DDR1 en células de CCR HT29 incubadas con el inhibidor DDR1-IN-1 (0-200nM). Western blot de PDDR1 y DDR1 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B) (n=1)

Por último, se examinaron las posibles vías de señalización participantes en la inhibición química de la fosforilación del DDR1 tumoral. Para ello, se estudiaron dos de las principales rutas de señalización o comunicación celular, PI3K/AKT y MAPK/ERK. Con este propósito, tras el tratamiento de las células HT29 con la dosis de 200nM de DDR1-IN-1, se analizó la expresión proteica de PAKT respecto a la AKT total y de PERK respecto a la ERK total mediante Western blot.

Tal como se observa en la figura 57, la inhibición de la fosforilación del DDR1 se correlacionó con un descenso significativo en la fosforilación de AKT y ERK en las células tumorales. En este sentido, las células HT29 tratadas con el DDR1-IN-1 redujeron en torno a un 60% la expresión tanto de PAKT/AKT como de PERK/ERK, en comparación con las células no tratadas.

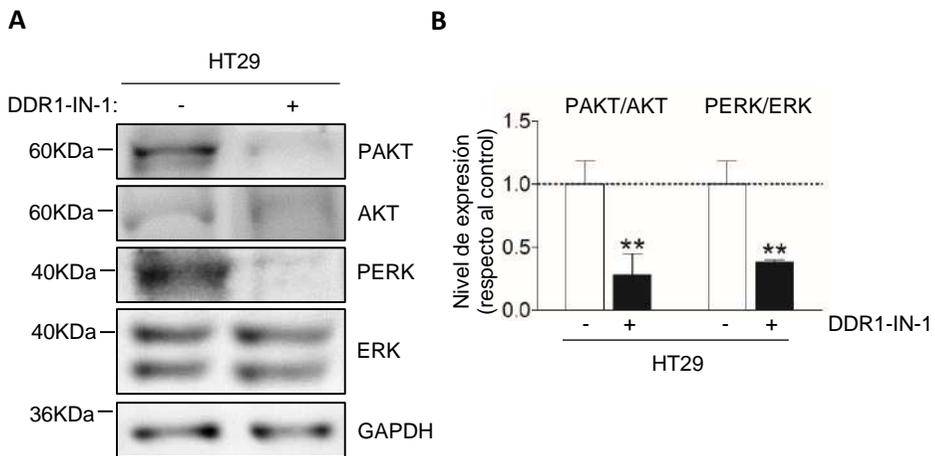


Figura 57. Expresión de proteínas de señalización en células de CCR HT29 incubadas con el inhibidor DDR1-IN-1 (200nM). Western blot de PAKT, AKT, PERK y ERK (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). **P < 0.01

VI.2.2 El bloqueo del DDR1 reduce la adhesión, proliferación, migración e invasión *in vitro* de las células de CCR HT29

A continuación, se evaluó el efecto del bloqueo del DDR1 en la expresión de factores involucrados en la adhesión, la proliferación, la migración y la invasión tumoral, propiedades íntimamente relacionadas con la progresión metastásica. Para ello, una vez bloqueada la fosforilación del DDR1 en las células HT29, se determinó la expresión proteica de una serie de proteínas implicadas en estos procesos celulares mediante Western blot.

Según los resultados mostrados en la figura 58, la inhibición de la fosforilación del DDR1 en las células tumorales coincidió con una reducción significativa de la expresión de proteínas relacionadas con la adhesión celular, disminuyendo un 40% y un 70% la expresión de ICAM1 y VCAM1, respectivamente, comparándolas con las células tumorales con el receptor activo.

Del mismo modo, el bloqueo del DDR1 tumoral provocó una bajada significativa del 70%, respecto a las células tumorales control, en el nivel de expresión de la MMP9, proteína implicada en la migración e invasión celular, así como en la remodelación de la MEC. Por el contrario, el bloqueo del receptor no causó cambios en la expresión tumoral de Ki67, marcador de proliferación celular, en relación con los niveles detectados en las células HT29 control.

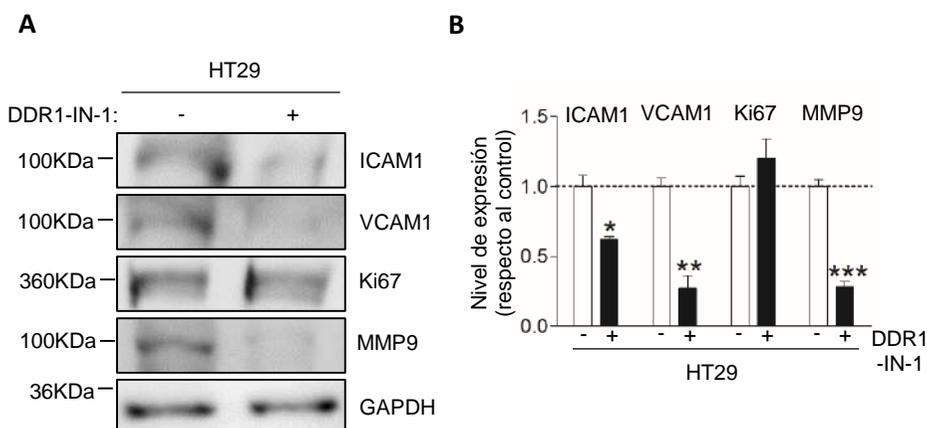


Figura 58. Expresión de proteínas relacionadas con adhesión, proliferación, migración e invasión en células de CCR HT29 incubadas con el inhibidor DDR1-IN-1 (200nM). Western blot de ICAM1, VCAM1, Ki67 y MMP9 (A). Cuantificación de la expresión proteica (B). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). *P < 0.1, **P < 0.01, ***P < 0.001

VI.2.3 El silenciamiento de la expresión del DDR1 reduce la invasión *in vitro* de las células de CCR C26

Tras describir las consecuencias del bloqueo del DDR1 tumoral en algunas características relacionadas con la metástasis, se estudió el efecto del silenciamiento de la expresión del DDR1 en la proliferación e invasión de las células murinas de CCR metastásico C26.

Con esta intención, por un lado, las células tumorales se transfectaron con una secuencia de ARNsh no específica y otra capaz de interactuar con la secuencia génica del DDR1, obteniéndose las líneas celulares estables C26 siØ y siDDR1, respectivamente. Después, la especificidad y efectividad del silenciamiento fue analizada a nivel genético y proteico mediante PCR convencional y Western blot.

En primer lugar, no hubo cambios en la expresión del DDR1 de las células C26 siØ respecto a las células no transfectadas o salvajes, por lo que se validó que el protocolo de silenciamiento en sí no interfirió en la expresión del receptor. Además, el silenciamiento del DDR1 resultó en una reducción significativa de la expresión génica y proteica del receptor de aproximadamente el 70% y 60%, respectivamente, en las células C26 siDDR1 comparadas con las células C26 salvajes y siØ (Fig.59).

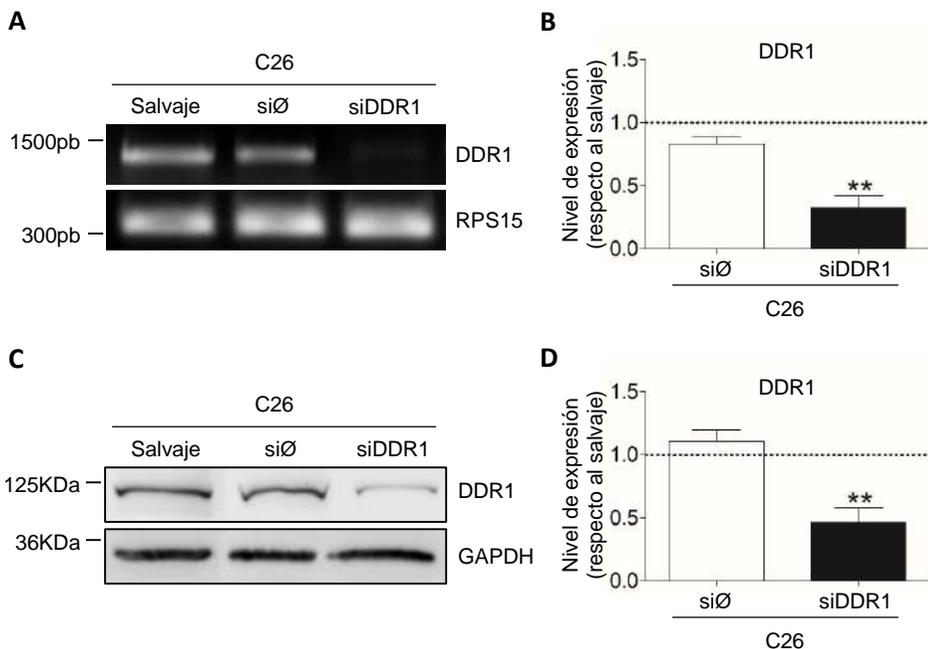


Figura 59. Silenciamiento de DDR1 en células de CCR C26. PCR convencional (A) y Western blot de DDR1 (C). Cuantificación de la expresión génica (B) y proteica (D). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). **P < 0.01

Posteriormente, las células C26 siDDR1 fueron descritas morfológica y funcionalmente, comparándolas con las células tumorales salvajes y si \emptyset .

En cuanto a las características morfológicas, como se aprecia en la figura 60, las células C26 siDDR1 mostraron una menor cantidad de prolongaciones citoplasmáticas, en relación con lo observado en las células C26 salvajes y si \emptyset .

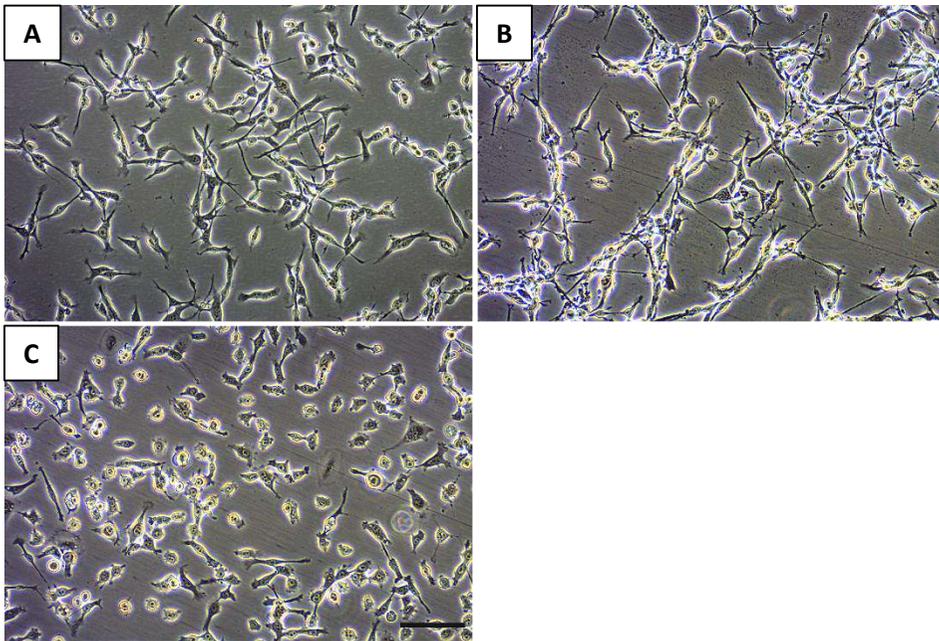


Figura 60. Cultivos de células de CCR C26. Imágenes representativas de microscopía óptica de contraste de fases de células C26 salvajes (A), si \emptyset (B) y siDDR1 (C) a un 60% de confluencia. Barra de escala, 50 μ m

Para el análisis funcional, se detallaron los procesos de proliferación e invasión celular a través de colágeno tipo I. En este caso, la invasión se definió como la capacidad de las células tumorales de atravesar una matriz de colágeno, sin ningún tipo de factor quimiotáctico como elemento atrayente.

En comparación con las células C26 salvajes y si \emptyset , las células C26 siDDR1 presentaron una disminución significativa del 60% en su potencial invasivo a través de colágeno, mientras que no se apreciaron cambios en la proliferación tumoral tras las 24 o 48 horas de cultivo (Fig.61).

Estos resultados fueron similares a los observados tras la inhibición química de la fosforilación del DDR1 en las células humanas de CCR HT29, en las que el bloqueo del receptor afectó a la adhesión, migración e invasión celular, pero no al crecimiento tumoral (Fig.58).

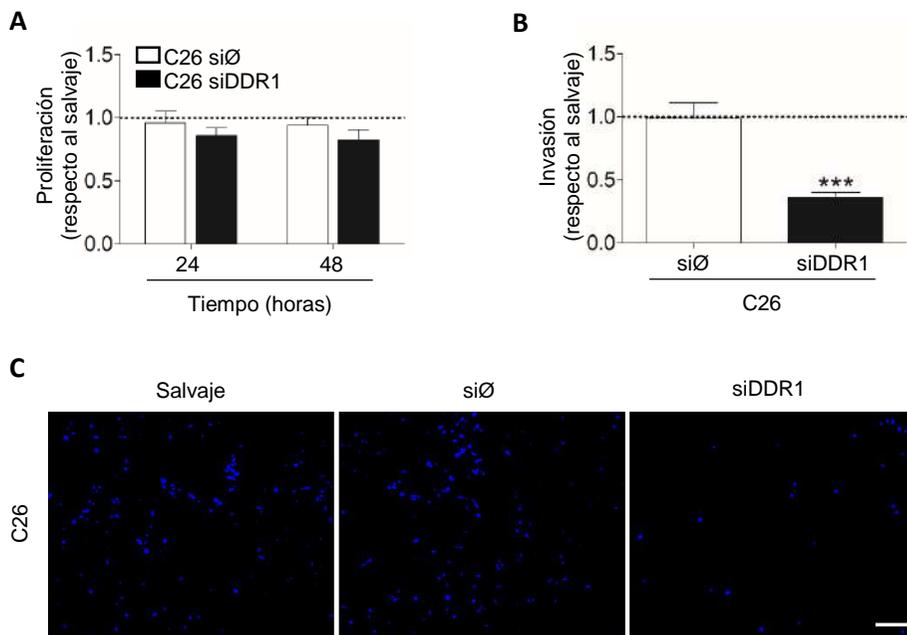


Figura 61. Caracterización de células de CCR C26 siDDR1. Proliferación (A) e invasión a través de Col I (1%) (B) de células C26 salvajes, si \emptyset y siDDR1. Imágenes de fluorescencia representativas de la migración. Barra de escala, 50 μ m (C). Resultados presentados como la media \pm SD (n=3). ***P < 0.001

VI.2.4 El silenciamiento de la expresión del DDR1 reduce el desarrollo *in vivo* de metástasis hepáticas de células de CCR C26

Finalmente, se examinó el papel del DDR1 tumoral en el crecimiento *in vivo* de metástasis hepáticas de CCR. Para ello, se inyectaron células de CCR C26 salvajes, siØ y siDDR1 en ratones singénicos BALB/c y, pasados 14 días, se extrajeron los hígados para su análisis histológico.

Dicho análisis se basó en la cuantificación de dos parámetros utilizados para describir las dimensiones de la metástasis: el número total de focos metastásicos y el porcentaje de área hepática ocupada por tumor.

Como se observa en la figura 62, el número de focos metastásicos se redujo significativamente en el tejido hepático de los ratones inoculados con las células tumorales transfectadas, comparados con los ratones inoculados con las células tumorales con fenotipo salvaje. Esta disminución en el número de metástasis hepáticas fue de un 50% y del 80%, en los hígados metastatizados con las células C26 siØ y siDDR1, respectivamente.

En lo referente al porcentaje de área hepática ocupada por tumor, este valor decreció significativamente a la mitad en aquellos ratones inyectados con células C26 siDDR1, comparados con los ratones inoculados con células C26 salvajes y siØ.

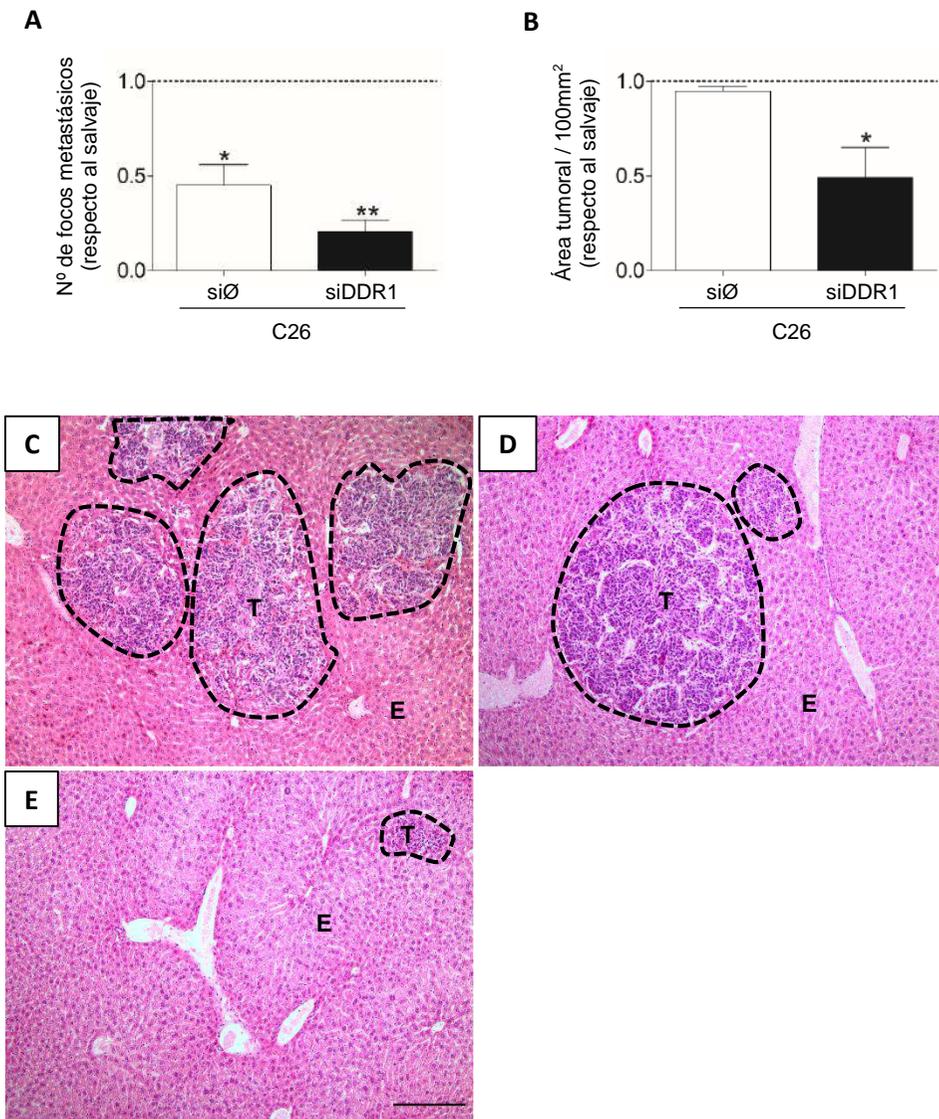


Figura 62. Análisis histológico del crecimiento metastásico de CCR en tejido hepático murino. Cuantificación del número de focos metastásicos (A) y del área hepática ocupada por tumor (B). Imágenes representativas de microscopía óptica de tejido hepático de ratones inoculados con células C26 salvajes (C, n=3), siØ (D, n=3) y siDDR1 (E, n=6). Barra de escala, 200µm. T: tumor, E: estroma, separados por la línea discontinua. Resultados presentados como la media \pm SD. *P < 0.1, **P < 0.01

VI.3 Resumen

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que la inhibición química de la fosforilación del DDR1 y el silenciamiento de la expresión del receptor en las células de CCR metastásico, provocan una importante disminución en la adhesión y en el potencial invasivo tumoral. Sin embargo, tanto el bloqueo de la fosforilación como el descenso de la expresión del DDR1 en las células cancerígenas parecen no tener efecto en la proliferación del tumor.

Conjuntamente, estas observaciones respaldan la caída del 50% en el desarrollo de metástasis hepáticas de CCR al silenciar el DDR1 tumoral, sugiriendo que este receptor podría jugar un importante papel durante el proceso metastásico.

VII. Discusión

Actualmente, el cáncer colorrectal (CCR) representa el segundo tipo de tumor maligno con mayor tasa de mortalidad a nivel mundial ¹¹. Este elevado índice de mortandad se debe a la diseminación de las células tumorales desde la región colorrectal hacia otros órganos, principalmente el hígado, generándose una metástasis ^{30,31}. En datos porcentuales, la metástasis hepática se desarrolla a partir de un CCR en más de la mitad de los casos, a causa sobre todo del drenaje sanguíneo existente entre el intestino y el hígado, que transporta las células cancerígenas desde el colon hasta los capilares o sinusoides hepáticos ^{56,57}. Por tanto, las células sinusoidales (SCs) hepáticas, que comprenden las células endoteliales (LSECs), las células de Kupffer (KCs) y las células estrelladas (HSCs), son las que primero interactúan con las células de CCR, inhibiendo o estimulando el crecimiento metastásico ^{58,59}.

De este modo, las relaciones establecidas entre las SCs hepáticas y el tumor metastásico regulan la conformación de un microambiente tumoral (MAT) hepático, que determinará el comportamiento de la metástasis, y cuya estructuración y funcionamiento se basan en la coordinación de sus elementos ¹⁹³. Por ello, la comunicación intercelular y con la matriz extracelular (MEC), a través de receptores celulares de membrana, es esencial para la construcción de un entorno favorable que potencie la supervivencia de la metástasis ¹⁰³.

Uno de los receptores más estudiados en el cáncer es el receptor con dominio discoidina 1 (DDR1), un tipo de tirosina quinasa (RTK) cuya peculiaridad consiste en que su ligando principal es el colágeno, proteína mayoritaria de la MEC. El colágeno constituye un factor clave en la configuración del MAT, ya que modula las propiedades metastásicas del tumor ¹¹⁶⁻¹²⁰. La expresión y actividad del DDR1 se encuentran desreguladas en muchos tumores metastásicos, incluyendo el CCR ¹³². En este sentido, dos estudios independientes realizados recientemente por Hu Y y cols. ¹³⁹ y por Jeitany M y cols. ¹³⁰, sugieren que la sobre-expresión del DDR1 activa las capacidades invasivas de células humanas de CCR.

Sin embargo, pese a la importancia del estroma del hígado durante la entrada y colonización de las células de CCR, la repercusión del DDR1 hepático en el proceso de metástasis se desconoce.

Considerando el papel relevante de las SCs en la metástasis hepática, su estudio está surgiendo como nueva herramienta que permita dilucidar los mecanismos moleculares que ocurren durante la conformación del MAT hepático ⁵⁶. Siguiendo este ejemplo, y dada la participación del DDR1 en la progresión de la metástasis, en el presente estudio validamos un modelo de comunicación celular *in vitro* entre las SCs del hígado y el CCR, y evaluamos la implicación del DDR1 hepático en el desarrollo metastásico. En primer lugar, la expresión de los marcadores CD146, F4/80 y GFAP, específicos de las LSECs ¹⁹⁴, KCs ¹⁹⁵ y HSCs ¹⁹⁶, respectivamente, prueba la pureza de los cultivos primarios de las tres poblaciones celulares sinusoidales. Además, la modificación en la expresión génica y proteica de una serie de moléculas implicadas en el funcionamiento del MAT, demuestra la capacidad de respuesta de las SCs hepáticas a los factores solubles derivados del tumor, y viceversa.

Por un lado, en nuestro modelo, los factores tumorales estimulan la expresión hepática de genes involucrados en la inmunomodulación, característica estrechamente relacionada con la progresión del CCR ¹⁹⁷. Referente a esto, el aumento de la expresión de COX2 en las SCs, fundamentalmente en las KCs, así como la activación tumoral de la expresión de IL6 en las LSECs y las HSCs, se asocia con la generación de un ambiente hepático inflamatorio, como ya se ha observado recientemente en otros modelos de interacción entre el hígado y el CCR ^{198,199}. Asimismo, el incremento de la expresión de IL10 en las LSECs y las HSCs provocado por el tumor, podría significar la supresión de la respuesta inmune llevada a cabo por los linfocitos hepáticos ²⁰⁰, lo cual ha sido descrito en LSECs ^{64,201} y HSCs ²⁰² activadas por factores tumorales derivados de CCR y de adenocarcinoma ductal pancreático, respectivamente.

Por otro lado, en respuesta al tumor de colon metastásico, apreciamos una sobre-expresión de los genes VEGF y PDGF, y de la proteína MMP14 en las LSECs, así como un aumento de su capacidad migratoria e invasiva a través de colágeno tipo I, lo que podría correlacionarse con una activación de la neovascularización hepática, necesaria para el mantenimiento de la masa tumoral. Según Gervaz P y cols., en el hígado, la formación de nuevos vasos sanguíneos está mayoritariamente regulada por el VEGF y es llevada a cabo por las LSECs ²⁰³. Además, otros estudios proponen la función esencial del PDGF en la angiogénesis, como molécula clave de interacción entre el endotelio y las HSCs ^{78,79,204}. En este sentido, Semela D y cols. describen que la secreción de PDGF por las LSECs durante la formación de los vasos sanguíneos promueve el reclutamiento de HSCs ²⁰⁵, debido a su capacidad para estructurar la vasculatura ²⁰⁶. Asimismo, la angiogénesis requiere la generación de invadosomas ^{168,169}, permitiendo a las LSECs abrirse paso a través de la MEC al activar su maquinaria enzimática proteolítica ^{207,208}. Entre las diferentes MMPs que hidrolizan la MEC, la MMP14 endotelial juega un importante papel, dada su facultad para degradar colágeno fibrilar, tal como demuestran Chun TH y cols. ²⁰⁹.

Por último, los factores tumorales también causan una subida en la expresión génica de COL1A1 y proteica de MMP14 en las HSCs, además de un incremento de su potencial migratorio e invasivo a través de colágeno tipo I. Esto podría relacionarse con una estimulación de los eventos de síntesis y degradación de la MEC del hígado, imprescindibles para la reorganización tisular típica de un crecimiento cancerígeno. Por una parte, está aceptado que la fibrosis hepática es un proceso caracterizado por la producción y acumulación de grandes cantidades de colágeno fibrilar, particularmente los tipos I y III ²¹⁰, llevado a cabo por las HSCs activadas por un daño crónico en el tejido hepático ²¹¹⁻²¹³, y que acelera significativamente la metástasis de CCR ^{214,215}. Por otra parte, también está asentado que las HSCs activadas aumentan la expresión de MMP14,

conduciendo a un incremento de la hidrólisis del colágeno y a una estimulación de su migración y la de otras poblaciones celulares a través de la MEC. Todo ello favorece, por tanto, la infiltración de las células tumorales y estromales, cuya cooperación es esencial para el establecimiento del MAT hepático ^{216–218}.

Prosiguiendo con nuestro modelo de interacción celular, los factores sinusoidales son capaces de potenciar las características metastásicas de las células de CCR. En primer lugar, corroborando la importancia del endotelio y los macrófagos sinusoidales en la creación de un ambiente hepático inflamatorio ^{61,149,198}, nuestros resultados muestran que los factores solubles de las SCs, fundamentalmente derivados de las LSECs y las KCs, desencadenan la sobre-expresión de las citoquinas pro-inflamatorias COX2 e IL6 en el tumor, íntimamente relacionadas con el crecimiento del CCR en el hígado ^{199,219,220}. Además, en consistencia con los resultados anteriores, las células tumorales también incrementan la expresión de VEGF tras su interacción con las LSECs y las KCs, lo que, como demuestran Raluca BA y cols., se traduce en una estimulación de la angiogénesis ²²¹. Peeters CF y cols. van más allá, al sugerir que el VEGF secretado por el CCR regula el comportamiento de las LSECs para transformar los sinusoides hepáticos en una vasculatura tortuosa e irregular, típica de la progresión metastásica ²²². En último lugar, en línea con lo observado hasta ahora, los factores solubles de las SCs hepáticas promueven la re-estructuración de la MEC, incrementando la expresión de COL1A1, MMP14 y TIMP2 tumoral, lo cual se asocia con un aumento de la inflamación, la proliferación, la angiogénesis, la invasión y la supervivencia del cáncer ^{218,223–225}. Aunque el TIMP2 se defina como un factor inhibidor de la MMP2 y la MMP14 y, por tanto, comúnmente se describa como un supresor de la invasión tumoral ^{226,227}, existe cierta controversia en lo que a su función se refiere. De hecho, multitud de estudios relacionan la sobre-expresión del TIMP2 en las células tumorales con la agresividad de muchos tipos de cáncer ^{228–230}, como el CCR ²³¹,

debido sobre todo a la acumulación de colágeno matricial a consecuencia del bloqueo de las MMPs. Asimismo, se ha sugerido que la malignidad tumoral derivada del incremento de la expresión del TIMP-2, no sólo se asocia con la regulación estructural de la MEC. Por ejemplo, Wang W y cols., proponen que la activación tumoral del TIMP2 también estimula la transformación fenotípica epitelio-mesenquimal (TEM) y la adhesión de las células de cáncer ²²⁵.

En conjunto, estos resultados demuestran la importancia de la comunicación entre las SCs y las células de CCR en la creación del MAT hepático. En este contexto, el tumor estimula la infiltración de las SCs hacia el tejido hepático metastásico, conformándose un nicho rico en factores pro-inflamatorios y pro-angiogénicos, y distinguido por una intensa remodelación de la MEC. Así, esta alteración del ambiente, orquestada por el CCR, proporcionará soporte químico y físico para la adhesión, la migración y la supervivencia tumoral, en definitiva, favorecerá la colonización del hígado por las células metastásicas de colon ^{232,233}.

A continuación, antes de examinar la implicación del DDR1 en la formación del MAT, determinamos la expresión del receptor en el hígado y en el tumor por separado. En primer lugar, verificamos que, en condiciones fisiológicas, las tres poblaciones celulares sinusoidales expresan DDR1, principalmente las HSCs, con un 80% más de receptor que las LSECs y las KCs. El DDR1 se localiza sobre todo en el citoplasma celular, aunque también se observa en la membrana plasmática de las KCs y las HSCs. Por un lado, la expresión de DDR1 ha sido mayoritariamente descrita en células epiteliales ¹²⁵, limitándose, por tanto, a los hepatocitos y colangiocitos del hígado ^{150,190,191}, de manera que nuestros resultados suponen la primera evidencia que demuestra que las SCs hepáticas expresan DDR1 a nivel proteico. En relación con nuestras observaciones, estudios previos han señalado que este receptor también está presente en células endoteliales ²³⁴, inmunes ^{114,145,146} y fibroblastos ²³⁵ de otros tejidos del organismo. Además, investigaciones anteriores realizadas por nuestro grupo

revelan que las HSCs primarias murinas ¹⁹² y la línea celular de HSCs humanas LX2 ²³⁶ expresan DDR1 a nivel génico. Por otro lado, aunque el DDR1 se defina como un receptor de membrana, la detección de una sub-localización citoplasmática se ha observado en otros tipos celulares ²³⁷ y en muchos RTKs ²³⁸, y se atribuye al tráfico vesicular a través de la célula al que están sometidos durante su activación y reciclaje.

En segundo lugar, varios estudios han establecido un aumento en la producción de colágeno matricial intra- y extra-tumoral durante la metástasis hepática ^{223,239}. Este hecho ha despertado el interés por determinar la expresión del DDR1 en diferentes líneas de CCR metastásico. En nuestro caso, las células C26, MCA38 y HT29 expresan DDR1 citoplasmático y en la membrana celular, como ya se había registrado en otras células tumorales de colon ^{130,139}. En lo referente a los niveles de expresión del receptor, los investigadores describen una sobre-expresión del DDR1 en muchos tipos de cáncer, incluido el CCR, y lo asocian con un aumento del desarrollo tumoral ^{125,130,132,139}. En concordancia con esto, nuestros resultados muestran que la expresión del DDR1 es un 30% mayor en el tejido hepático con metástasis de CCR que en el hígado sano. Curiosamente, este incremento de DDR1 en el tejido metastásico no sólo proviene de las células de CCR, sino que también se detecta en células que morfológicamente podrían corresponder con hepatocitos y células positivas para α -SMA, marcador específico de HSCs activadas ^{185,186}. Esta apreciación refuerza la elevada expresión de DDR1 registrada en las HSCs en condiciones basales, y sugiere que el receptor de este tipo celular sinusoidal podría ser un factor clave en la actividad hepática, tanto en el hígado sano como en el metastatizado.

Apoyando esta teoría, observamos que el DDR1 expresado por las KCs y las HSCs es funcional en estado fisiológico, ya que se fosforila en presencia de colágeno tipo I, algo totalmente desconocido hasta el momento. La razón de que el DDR1 presente en las LSECs no responda al colágeno, puede ser que el receptor no sea

funcional en estas células, o también que las condiciones de cultivo o el protocolo de fosforilación no sean los apropiados para activar al receptor. Por ello, sería conveniente realizar más ensayos a fin de aclarar los posibles motivos. Por otra parte, el DDR1 tumoral, como ya se había comprobado previamente^{116,117}, se activa *in vitro* tras la unión con su ligando principal. Esto significa que las SCs, a excepción de las LSECs, son capaces de interactuar con la MEC a través del DDR1 en el hígado sano. Por tanto, teniendo en cuenta que la acumulación de colágeno es un evento clásico en el hígado metastatizado^{223,239}, su síntesis y degradación podrían estar reguladas a través del DDR1 presente no sólo en las células de CCR, sino también en las SCs hepáticas.

Dado el mal pronóstico derivado de la sobre-expresión del DDR1 en muchos tipos de cáncer, el receptor ha sido propuesto como posible diana terapéutica en el tratamiento de la enfermedad. Esto ha desembocado en el uso de diversos inhibidores de su actividad, lo cual reduce la migración e invasión tumoral¹²⁹⁻¹³². Emulando estos estudios y a la vista de nuestros resultados, decidimos usar el compuesto DDR1-IN-1 para inhibir la fosforilación del DDR1 en las SCs hepáticas y examinar su implicación en la producción de metaloproteinasas de matriz (MMPs), concretamente de MMP2 y MMP9, dos de las MMPs más relevantes en la remodelación de la MEC durante la metástasis hepática²⁴⁰.

Por un lado, el bloqueo de la fosforilación del DDR1 en las KCs y las HSCs reduce su secreción de MMPs. Sin embargo, el inhibidor no tiene efecto en las LSECs, lo que coincide con la incapacidad del DDR1 endotelial para activarse en presencia de colágeno tipo I. Está asentado que la actividad del DDR1 regula el balance entre la síntesis y degradación de colágeno, que varía entre los diferentes órganos, y es crucial para la organización de la MEC y la preservación de la homeostasis tisular^{241,242}. Por tanto, nuestros resultados podrían significar que el DDR1 de las KCs y las HSCs modula el mantenimiento de la homeostasis del tejido hepático mediante el control de la secreción de MMPs.

Por otro lado, usando el bloqueante en nuestro modelo de comunicación entre las SCs hepáticas y el CCR metastásico, observamos que la producción de MMPs es dependiente de la activación del DDR1 únicamente en las HSCs. Estos resultados parecen razonables con lo obtenido hasta ahora, ya que las HSCs constituyen el tipo celular del sinusoides hepático con mayor expresión de DDR1 y cuya función principal es la re-estructuración de la MEC a través de las MMPs ^{79,210–213,216–218}. En las LSECs, aunque el tratamiento con los factores tumorales parece potenciar el efecto del inhibidor al disminuir la fosforilación del DDR1, no hay cambios en la secreción de MMPs. Esto puede deberse a que las interacciones entre las LSECs y el colágeno matricial durante la metástasis hepática estén mediadas por otros tipos de receptores, como las integrinas ^{73,243,244}, o el otro miembro de receptores discoidina, el DDR2. En relación con esto, nuestros estudios previos demuestran que las HSCs expresan DDR2, y que su actividad está directamente relacionada con la síntesis de MMP2 ¹¹². Por otra parte, aunque sólo se ha descrito en células de cáncer de mama, Gao H y cols. sugieren que la activación del DDR1 puede producirse de manera independiente a la unión del colágeno ²⁴⁵. También es posible que la concentración de inhibidor empleada en nuestro modelo no sea suficiente para causar un efecto visible en los parámetros analizados en los cultivos primarios de LSECs hepáticas. Sin embargo, cantidades superiores provocaban la muerte celular, por lo que el uso de otro bloqueante sería necesario para esclarecer las causas probables. Por último, en las KCs activadas por el secretoma tumoral existen discordancias, ya que el bloqueante no reduce la fosforilación del receptor, pero sí la síntesis de MMPs, por lo que el DDR1-IN-1, pese a su especificidad, podría estar inhibiendo otra molécula relacionada con la producción de enzimas proteolíticas de matriz.

Aun así, nuestro estudio pone de manifiesto la importancia del DDR1 expresado por las HSCs quiescentes en el hígado sano, así como por las HSCs activadas en el hígado metastatizado. Por otra parte, teniendo en cuenta estas observaciones

y considerando que el secretoma de las SCs actúa como fuente de factores prometastásicos para las células tumorales, decidimos evaluar el papel del DDR1 sinusoidal en la actividad del DDR1 en el CCR, además de en su secreción de MMP2 y en los procesos de proliferación, migración e invasión tumoral.

En primer lugar, la actividad del DDR1 de las células de CCR y su producción de MMP2, están reguladas por el DDR1 expresado en las LSECs activadas por los factores tumorales, generándose un bucle retroactivo. Esto nos indica que el DDR1 endotelial, aunque no regule la síntesis de MMPs en las propias LSECs, podría ser esencial para la invasión hepática de las células de CCR. De todas maneras, apreciamos una correlación entre el DDR1 endotelial y la proliferación del cáncer, pero no con el potencial invasivo tumoral, por lo que sospechamos que la activación de la síntesis de MMP2 en el CCR podría ser insuficiente para permitir su entrada en el tejido hepático. Con respecto a esto, Gerg M y cols. sostienen que la expresión de MMP9 es indispensable para la invasión del cáncer durante las primeras fases de la metástasis hepática, mientras que la actividad de MMP2 es esencial para el crecimiento y la expansión tumoral, respaldando nuestra hipótesis ²⁴⁶.

En segundo lugar, observamos resultados contradictorios tras el tratamiento de las células de CCR con el secretoma de las KCs. Por una parte, el DDR1 de las KCs no tiene efecto alguno en la fosforilación del DDR1 tumoral, ni tampoco en su secreción de MMP2. Esto concuerda con nuestra teoría de que el DDR1 expresado por los macrófagos hepáticos parece tener importancia en la regulación de la homeostasis del hígado, pero no tanto en la comunicación de las KCs con el CCR durante la metástasis hepática. En cambio, el DDR1 de las KCs sí está relacionado con las capacidades proliferativas e invasivas del tumor. En este sentido, el secretoma de las KCs promueve la proliferación, migración e invasión tumoral, algo ya establecido por otros autores ^{198,247}, y que coincide con el incremento de COL1A1 y MMP14 detectados en las células de CCR. Esto

implica que el DDR1 de las KCs podría participar en la expresión de otros factores que promuevan el crecimiento y la invasión de las células de cáncer, pero cuya activación es independiente del DDR1 tumoral. Además, defiende la hipótesis de que la MMP2 tumoral no es clave en las primeras fases de la metástasis hepática.

En último lugar y en coherencia con los datos anteriores, la fosforilación del DDR1, la secreción de MMP2, y las tasas proliferativas e invasivas de las células de CCR están controladas por el DDR1 expresado en las HSCs. Estos resultados refuerzan la posibilidad de que la expresión del receptor en las HSCs es decisiva durante la metástasis hepática de CCR. Según esto, la secreción de MMP2 tumoral, regulada retroactivamente por las células de CCR a través del DDR1 de las HSCs, como en las LSECs, provoca una re-organización de la MEC. En cambio, en esta ocasión los cambios en las propiedades tumorales son más bruscos y el DDR1 presente en las HSCs modula no sólo el crecimiento, sino también la invasión tumoral a través de la matriz, como ya habíamos demostrado anteriormente con el DDR2 ¹¹². Estas diferencias respecto al efecto del secretoma de las LSECs en el tumor, podrían deberse a que el secretoma de las HSCs no sólo activa la MMP2 tumoral, sino también alguna otra molécula. Por ejemplo, recientemente Sun X y cols. han descrito que el DDR1 del estroma tumoral mamario lleva a cabo funciones similares a través de la estimulación de IL6 ¹⁶⁵. En nuestro caso, no observemos cambios en la expresión de IL6 tumoral tras la incubación con los factores derivados de las LSECs y las HSCs. En cambio, sí detectamos un incremento significativo en la expresión de MMP14 tumoral tras el tratamiento con el secretoma de las HSCs, pero no con el secretoma de las LSECs, lo cual podría asociarse con la estimulación de la invasión tumoral.

Conjuntamente, demostramos que el DDR1 sinusoidal controla las propiedades proliferativas e invasivas de las células de CCR durante la metástasis hepática, sobre todo cuando las SCs están activadas por el tumor. Por ello, decidimos

comprobar cómo afecta la inhibición del DDR1 tumoral a las características de las células de CCR *in vitro*, además de examinar el efecto del silenciamiento del receptor en su desarrollo metastásico hepático *in vivo*.

Por un lado, coincidiendo con lo establecido anteriormente por nuestro grupo en células de melanoma, CCR y hepatocarcinoma²³⁶, y otras investigaciones en diferentes tipos de cáncer¹⁵¹⁻¹⁵³, el bloqueo de la fosforilación del DDR1 tumoral disminuye la adhesión y la progresión de las células de CCR metastásico *in vitro*. Por una parte, la inactivación del DDR1 reduce la expresión de ICAM1 y VCAM1, dos moléculas de adhesión intercelular ampliamente estudiadas y relacionadas con el proceso de trans migración durante la metástasis²⁴⁸⁻²⁵⁰. Respecto a esto, Franco C y cols. han sugerido una relación entre la expresión de DDR1 y VCAM1 en macrófagos²⁵¹. Por otra parte, la inhibición del DDR1 en las células de cáncer causa una caída en la expresión de MMP9 tumoral, factor clave en la remodelación de la MEC y en la invasión tumoral^{152,154,252}. Finalmente, nuestros datos plantean que la activación del DDR1 en el CCR se produce a través de dos de las vías de señalización celular más importantes, AKT y ERK, como ya se había observado en otras células tumorales^{146,253-255}.

Por otro lado, el silenciamiento del DDR1 en las células de CCR también reduce su potencial migratorio e invasivo a través de colágeno tipo I, apoyando los resultados obtenidos al bloquear la fosforilación del receptor en el tumor. Esto se traduce en un desarrollo metastásico hepático *in vivo* un 50% inferior, algo parecido a lo obtenido por Jin H y cols. en cáncer gástrico²⁵⁶ y por Valencia K y cols. en carcinoma pulmonar²⁵⁷.

Estos datos ponen de manifiesto el papel fundamental del DDR1 en la regulación de algunas de las cualidades que determinan el potencial metastásico y, por tanto, la agresividad de las células de CCR, lo que refuerza aún más la definición del DDR1 como posible diana terapéutica en el tratamiento contra la metástasis hepática.

En conclusión, la facultad del DDR1 para modificar la composición y estructuración de la MEC al unirse al colágeno matricial, lo convierte en un elemento celular cuya expresión y actividad repercuten significativamente en las propiedades del ambiente durante la conformación de la metástasis hepática. El presente estudio demuestra que el DDR1 es imprescindible para la invasión y colonización del CCR del tejido hepático. Sin embargo, estos procesos no sólo dependen de la funcionalidad de este receptor en las células tumorales, sino también en las células que residen en los sinusoides hepáticos, principalmente en las HSCs, puesto que representan las células hepáticas con mayor expresión de DDR1 y capacidad remodeladora de la MEC. En resumen, la inhibición conjunta del DDR1 en el tumor de colon y en las HSCs del hígado podría bloquear la progresión cancerígena, disminuyendo la tasa de mortalidad de los pacientes con CCR al evitar el crecimiento de metástasis hepáticas.

VIII. Conclusiones

1. Las SCs hepáticas (LSECs, KCs y HSCs) son capaces de responder a los factores tumorales, modificando la expresión de multitud de moléculas para generar un ambiente pro-inflamatorio, pro-angiogénico y sometido a una intensa remodelación de la MEC.
2. Los factores sinusoidales alteran las características de las células de CCR, promoviendo sus facultades pro-metastásicas.
3. En condiciones fisiológicas, las SCs hepáticas, principalmente las HSCs, expresan DDR1, el cual es funcional y controla la secreción de MMP2 y MMP9 en las KCs y las HSCs, por lo que este receptor podría ser esencial en el mantenimiento de la homeostasis del tejido hepático.
4. Durante la interacción con el CCR, el DDR1 aumenta su fosforilación en las KCs y las HSCs, pero únicamente regula la secreción de MMP2 y MMP9 en las HSCs, debido al papel esencial de estas células hepáticas en la remodelación de la MEC del hígado a lo largo de la metástasis.
5. El DDR1 sinusoidal, sobre todo de las SCs previamente activadas por el tumor, modula la fosforilación del DDR1, la producción de MMP2, y las capacidades proliferativas, migratorias e invasivas de las células de CCR, aumentando estas propiedades tumorales.
6. El DDR1 tumoral regula la adhesión, migración e invasión celular *in vitro* y el desarrollo de metástasis hepáticas *in vivo* de las células de CCR.

IX. Bibliografía

1. Nowell, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* (80- .). **194**, 23 LP – 28 (1976).
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
3. Negrini, S., Gorgoulis, V. G. & Halazonetis, T. D. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 220–228 (2010).
4. Salk, J. J., Fox, E. J. & Loeb, L. A. Mutational heterogeneity in human cancers: origin and consequences. *Annu. Rev. Pathol.* **5**, 51–75 (2010).
5. DeNardo, D. G., Andreu, P. & Coussens, L. M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 309–316 (2010).
6. Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883–899 (2010).
7. Qian, B.-Z. & Pollard, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**, 39–51 (2010).
8. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
9. Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C. & Karamanos, N. K. Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **97**, 4–27 (2016).
10. Werb, Z. & Lu, P. The Role of Stroma in Tumor Development. *Cancer J.* **21**, 250–253 (2015).
11. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).

12. Kulhánová, I. *et al.* Proportion of cancers attributable to major lifestyle and environmental risk factors in the Eastern Mediterranean region. *Int. J. Cancer* **146**, 646–656 (2020).
13. Bandara, P. & Carpenter, D. O. Causes of cancer: Perceptions vs. the scientific evidence. *Eur. J. Cancer* **124**, 214–216 (2020).
14. Arnold, M. *et al.* Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* **66**, 683 LP – 691 (2017).
15. Coppedè, F., Lopomo, A., Spisni, R. & Migliore, L. Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **20**, 943–956 (2014).
16. Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F. & Wang, H. L. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J. Gastrointest. Oncol.* **3**, 153–173 (2012).
17. Lucas, C., Barnich, N. & Nguyen, H. T. T. Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1310 (2017).
18. Clevers, H. The Intestinal Crypt, A Prototype Stem Cell Compartment. *Cell* **154**, 274–284 (2013).
19. Bishehsari, F., Mahdavinia, M., Vacca, M., Malekzadeh, R. & Mariani-Costantini, R. Epidemiological transition of colorectal cancer in developing countries: environmental factors, molecular pathways, and opportunities for prevention. *World J. Gastroenterol.* **20**, 6055–6072 (2014).
20. Zeki, S. S., Graham, T. A. & Wright, N. A. Stem cells and their implications for colorectal cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **8**, 90–100 (2011).
21. Grady, W. M. & Markowitz, S. D. The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential application to colorectal cancer

- screening. *Dig. Dis. Sci.* **60**, 762–772 (2015).
22. Luo, Y. *et al.* Differences in DNA methylation signatures reveal multiple pathways of progression from adenoma to colorectal cancer. *Gastroenterology* **147**, 418–29.e8 (2014).
 23. Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E. & Karin, M. Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology* **138**, 2101-2114.e5 (2010).
 24. Kuipers, E. J. *et al.* Colorectal cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, 15065 (2015).
 25. Brauchle, E. *et al.* Biomechanical and biomolecular characterization of extracellular matrix structures in human colon carcinomas. *Matrix Biol.* **68–69**, 180–193 (2018).
 26. Liu, C., Pei, H. & Tan, F. Matrix Stiffness and Colorectal Cancer. *Onco. Targets. Ther.* **13**, 2747–2755 (2020).
 27. Tang, X. *et al.* Mechanical force affects expression of an in vitro metastasis-like phenotype in HCT-8 cells. *Biophys. J.* **99**, 2460–2469 (2010).
 28. Tang, X. *et al.* A mechanically-induced colon cancer cell population shows increased metastatic potential. *Mol. Cancer* **13**, 131 (2014).
 29. Tauriello, D. V. F., Calon, A., Lonardo, E. & Batlle, E. Determinants of metastatic competency in colorectal cancer. *Mol. Oncol.* **11**, 97–119 (2017).
 30. Goldberger, N. E. & Hunter, K. W. A systems biology approach to defining metastatic biomarkers and signaling pathways. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **1**, 89–96 (2009).
 31. Chaffer, C. L. & Weinberg, R. A. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science (80-.)*. **331**, 1559 LP – 1564 (2011).

32. Seyfried, T. N. & Huysentruyt, L. C. On the origin of cancer metastasis. *Crit. Rev. Oncog.* **18**, 43–73 (2013).
33. Tarin, D. Cell and tissue interactions in carcinogenesis and metastasis and their clinical significance. *Semin. Cancer Biol.* **21**, 72–82 (2011).
34. Ha, N.-H. & Hunter, K. W. Using a systems biology approach to understand and study the mechanisms of metastasis. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **6**, 107–114 (2014).
35. Bacac, M. & Stamenkovic, I. Metastatic Cancer Cell. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **3**, 221–247 (2008).
36. Soffietti, R., Trevisan, E. & Rudà, R. Targeted therapy in brain metastasis. *Curr. Opin. Oncol.* **24**, (2012).
37. Steeg, P. S. Targeting metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 201–218 (2016).
38. Mehlen, P. & Puisieux, A. Metastasis: a question of life or death. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 449–458 (2006).
39. Bedard, P. L., Hansen, A. R., Ratain, M. J. & Siu, L. L. Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature* **501**, 355–364 (2013).
40. Luzzi, K. J. *et al.* Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am. J. Pathol.* **153**, 865–873 (1998).
41. Tarin, D. *et al.* Mechanisms of Human Tumor Metastasis Studied in Patients with Peritoneovenous Shunts. *Cancer Res.* **44**, 3584 LP – 3592 (1984).
42. Nagrath, S. *et al.* Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* **450**, 1235–1239 (2007).

43. Valastyan, S. & Weinberg, R. A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* **147**, 275–292 (2011).
44. Chambers, A. F., Groom, A. C. & MacDonald, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 563–572 (2002).
45. Pein, M. & Oskarsson, T. Microenvironment in metastasis: roadblocks and supportive niches. *Am. J. Physiol. Physiol.* **309**, C627–C638 (2015).
46. Klein-Goldberg, A., Maman, S. & Witz, I. P. The role played by the microenvironment in site-specific metastasis. *Cancer Lett.* **352**, 54–58 (2014).
47. Hui, L. & Chen, Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett.* **368**, 7–13 (2015).
48. Junttila, M. R. & de Sauvage, F. J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* **501**, 346–354 (2013).
49. Hanahan, D. & Coussens, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* **21**, 309–322 (2012).
50. Paget, S. THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. *Lancet* **133**, 571–573 (1889).
51. Ewing, J. Neoplastic Diseases: A Treatise on Tumours. *BJS (British J. Surgery)* **16**, 174–175 (1928).
52. Woodhouse, E. C., Chuaqui, R. F. & Liotta, L. A. General mechanisms of metastasis. *Cancer* **80**, 1529–1537 (1997).
53. Hess, K. R. *et al.* Metastatic patterns in adenocarcinoma. *Cancer* **106**, 1624–1633 (2006).

54. Tennant, B. C. & Center, S. A. Chapter 13 - Hepatic Function. in (eds. Kaneko, J. J., Harvey, J. W. & Bruss, M. L. B. T.-C. B. of D. A. (Sixth E.) 379–412 (Academic Press, 2008). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370491-7.00013-1>.
55. Ross, M. H. & Pawlina, W. *Histología: Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. (Panamericana, 2013).
56. Clark, A. M., Ma, B., Taylor, D. L., Griffith, L. & Wells, A. Liver metastases: Microenvironments and ex-vivo models. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **241**, 1639–1652 (2016).
57. Millette, S., Sicklick, J. K., Lowy, A. M. & Brodt, P. Molecular Pathways: Targeting the Microenvironment of Liver Metastases. *Clin. Cancer Res.* **23**, 6390–6399 (2017).
58. Turdean, S., Simona, G., Turcu, M., Voidăzan, S. & Anca, S. Liver metastases: Incidence and clinicopathological data. *Acta Medica Marisiensis* **58**, 254–258 (2012).
59. Braet, F. *et al.* The hepatic sinusoidal endothelial lining and colorectal liver metastases. *World J. Gastroenterol.* **13**, 821–825 (2007).
60. Mielgo, A. & Schmid, M. C. Liver Tropism in Cancer: The Hepatic Metastatic Niche. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **10**, (2020).
61. Poisson, J. *et al.* Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *J. Hepatol.* **66**, 212–227 (2017).
62. Vekemans, K. & Braet, F. Structural and functional aspects of the liver and liver sinusoidal cells in relation to colon carcinoma metastasis. *World J. Gastroenterol.* **11**, 5095–5102 (2005).
63. Glinskii, O. V *et al.* Mechanical entrapment is insufficient and intercellular

- adhesion is essential for metastatic cell arrest in distant organs. *Neoplasia* **7**, 522–527 (2005).
64. Arteta, B. *et al.* Colon carcinoma cell interaction with liver sinusoidal endothelium inhibits organ-specific antitumor immunity through interleukin-1-induced mannose receptor in mice. *Hepatology* **51**, 2172–2182 (2010).
 65. Banerjee, D. *et al.* Notch suppresses angiogenesis and progression of hepatic metastases. *Cancer Res.* **75**, 1592–1602 (2015).
 66. Benedicto, A. *et al.* Liver sinusoidal endothelial cell ICAM-1 mediated tumor/endothelial crosstalk drives the development of liver metastasis by initiating inflammatory and angiogenic responses. *Sci. Rep.* **9**, 13111 (2019).
 67. Fahimi, H. D. THE FINE STRUCTURAL LOCALIZATION OF ENDOGENOUS AND EXOGENOUS PEROXIDASE ACTIVITY IN KUPFFER CELLS OF RAT LIVER. *J. Cell Biol.* **47**, 247–262 (1970).
 68. Clària, J. & Titos, E. La célula de kupffer. *Gastroenterol. Hepatol.* **27**, 264–273 (2004).
 69. van der Bij, G. J., Oosterling, S. J., Meijer, S., Beelen, R. H. J. & van Egmond, M. Therapeutic potential of Kupffer cells in prevention of liver metastases outgrowth. *Immunobiology* **210**, 259–265 (2005).
 70. Timmers, M. *et al.* Interactions between rat colon carcinoma cells and Kupffer cells during the onset of hepatic metastasis. *Int. J. Cancer* **112**, 793–802 (2004).
 71. Matsumura, H. *et al.* Kupffer cells decrease metastasis of colon cancer cells to the liver in the early stage. *Int. J. Oncol.* **45**, 2303–2310 (2014).

72. Paschos, K. A., Majeed, A. W. & Bird, N. C. Natural history of hepatic metastases from colorectal cancer--pathobiological pathways with clinical significance. *World J. Gastroenterol.* **20**, 3719–3737 (2014).
73. Brodt, P. Role of the Microenvironment in Liver Metastasis: From Pre- to Prometastatic Niches. *Clin. Cancer Res.* **22**, 5971 LP – 5982 (2016).
74. Bayon, L. G. *et al.* Role of Kupffer cells in arresting circulating tumor cells and controlling metastatic growth in the liver. *Hepatology* **23**, 1224–1231 (1996).
75. Ross, M. H. & Pawlina, W. *Histología: Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular.* (Panamericana, 2013).
76. Melton, A. C. & Yee, H. F. Hepatic stellate cell protrusions couple platelet-derived growth factor-BB to chemotaxis. *Hepatology* **45**, 1446–1453 (2007).
77. Rockey, D. C. & Weisiger, R. A. Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal pressure and resistance. *Hepatology* **24**, 233–240 (1996).
78. Hellerbrand, C. Hepatic stellate cells—the pericytes in the liver. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* **465**, 775–778 (2013).
79. Friedman, S. L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol. Rev.* **88**, 125–172 (2008).
80. Dooley, S., Delvoux, B., Lahme, B., Mangasser-Stephan, K. & Gressner, A. M. Modulation of transforming growth factor β response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* **31**, 1094–1106 (2000).
81. Gong, W. *et al.* Transformation-dependent susceptibility of rat hepatic

- stellate cells to apoptosis induced by soluble fas ligand. *Hepatology* **28**, 492–502 (1998).
82. Gressner, A. M. Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int. Suppl.* **54**, S39-45 (1996).
83. Purps, O., Lahme, B., Gressner, A. M., Meindl-Beinker, N. M. & Dooley, S. Loss of TGF- β dependent growth control during HSC transdifferentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **353**, 841–847 (2007).
84. Roth-Eichhorn, S., Eberheim, A., Bode, H.-P. & Gressner, A. M. Transformation-dependent calcium influx by voltage-operated calcium channels in stellate cells of rat liver. *J. Hepatol.* **30**, 612–620 (1999).
85. Schnabl, B., Purbeck, C. A., Choi, Y. H., Hagedorn, C. H. & Brenner, D. Replicative senescence of activated human hepatic stellate cells is accompanied by a pronounced inflammatory but less fibrogenic phenotype. *Hepatology* **37**, 653–664 (2003).
86. Muhanna, N. *et al.* Activation of hepatic stellate cells after phagocytosis of lymphocytes: A novel pathway of fibrogenesis. *Hepatology* **48**, 963–977 (2008).
87. Zhao, W. *et al.* Hepatic stellate cells promote tumor progression by enhancement of immunosuppressive cells in an orthotopic liver tumor mouse model. *Lab. Investig.* **94**, 182–191 (2014).
88. Olaso, E. *et al.* Proangiogenic role of tumor-activated hepatic stellate cells in experimental melanoma metastasis. *Hepatology* **37**, 674–685 (2003).
89. Badiola, I., Olaso, E., Crende, O., Friedman, S. L. & Vidal-Vanaclocha, F. Discoidin domain receptor 2 deficiency predisposes hepatic tissue to

- colon carcinoma metastasis. *Gut* **61**, 1465 LP – 1472 (2012).
90. Ross, M. H. & Pawlina, W. *Histología: Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. (Panamericana, 2013).
91. Lee, J. W. *et al.* Hepatocytes direct the formation of a pro-metastatic niche in the liver. *Nature* **567**, 249–252 (2019).
92. Yoong, K. F., Afford, S. C., Randhawa, S., Hubscher, S. G. & Adams, D. H. Fas/Fas Ligand Interaction in Human Colorectal Hepatic Metastases: A Mechanism of Hepatocyte Destruction to Facilitate Local Tumor Invasion. *Am. J. Pathol.* **154**, 693–703 (1999).
93. Li, H. *et al.* Human and mouse colon cancer utilizes CD95 signaling for local growth and metastatic spread to liver. *Gastroenterology* **137**, 934-944.e9444 (2009).
94. Mook, O. R. F. *et al.* Interactions between colon cancer cells and hepatocytes in rats in relation to metastasis. *J. Cell. Mol. Med.* **12**, 2052–2061 (2008).
95. Mook, O. R. F. *et al.* Visualization of early events in tumor formation of eGFP-transfected rat colon cancer cells in liver. *Hepatology* **38**, 295–304 (2003).
96. Long, L., Nip, J. & Brodt, P. Paracrine Growth Stimulation by Hepatocyte-derived Insulin-like Growth Factor-1: A Regulatory Mechanism for Carcinoma Cells Metastatic to the Liver. *Cancer Res.* **54**, 3732 LP – 3737 (1994).
97. Kow, A. W. C. Hepatic metastasis from colorectal cancer. *J. Gastrointest. Oncol.* **10**, 1274–1298 (2019).
98. Hudson, S. V *et al.* Computational/experimental evaluation of liver

- metastasis post hepatic injury: interactions with macrophages and transitional ECM. *Sci. Rep.* **9**, 15077 (2019).
99. Cox, T. R. & Epler, J. T. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis. Model. Mech.* **4**, 165–178 (2011).
100. Conti, J. A. *et al.* The desmoplastic reaction surrounding hepatic colorectal adenocarcinoma metastases aids tumor growth and survival via alphav integrin ligation. *Clin. Cancer Res.* **14**, 6405–6413 (2008).
101. Afik, R. *et al.* Tumor macrophages are pivotal constructors of tumor collagenous matrix. *J. Exp. Med.* **213**, 2315–2331 (2016).
102. Rossetto, A. *et al.* Carcinogenesis and Metastasis in Liver: Cell Physiological Basis. *Cancers (Basel)*. **11**, 1731 (2019).
103. Brooks, S. A., Lomax-Browne, H. J., Carter, T. M., Kinch, C. E. & Hall, D. M. S. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem.* **112**, 3–25 (2010).
104. Regad, T. Targeting RTK Signaling Pathways in Cancer. *Cancers (Basel)*. **7**, 1758–1784 (2015).
105. Hubbard, S. R. Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **71**, 343–358 (1999).
106. Du, Z. & Lovly, C. M. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol. Cancer* **17**, 58 (2018).
107. Vogelstein, B. *et al.* Cancer genome landscapes. *Science* **339**, 1546–1558 (2013).
108. Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* **141**, 1117–1134 (2010).

109. Devine, J. M. & Williams, J. G. Characterization of sequence elements at the 5' end of a discoidin I gene isolated from *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res.* **10**, 1231–1241 (1982).
110. Olaso, E., Lin, H.-C., Wang, L.-H. & Friedman, S. L. Impaired dermal wound healing in discoidin domain receptor 2-deficient mice associated with defective extracellular matrix remodeling. *Fibrogenesis Tissue Repair* **4**, 5 (2011).
111. Guangpei, H., F., V. W. & P., B. M. Tyrosine Kinase Activity of Discoidin Domain Receptor 1 Is Necessary for Smooth Muscle Cell Migration and Matrix Metalloproteinase Expression. *Circ. Res.* **90**, 1147–1149 (2002).
112. Olaso, E. *et al.* DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *J. Clin. Invest.* **108**, 1369–1378 (2001).
113. Olaso, E. *et al.* Discoidin domain receptor 2 regulates fibroblast proliferation and migration through the extracellular matrix in association with transcriptional activation of matrix metalloproteinase-2. *J. Biol. Chem.* **277**, 3606–3613 (2002).
114. Hachehouche, L. N., Chetoui, N. & Aoudjit, F. Implication of discoidin domain receptor 1 in T cell migration in three-dimensional collagen. *Mol. Immunol.* **47**, 1866–1869 (2010).
115. Afonso, P. V, McCann, C. P., Kapnick, S. M. & Parent, C. A. Discoidin domain receptor 2 regulates neutrophil chemotaxis in 3D collagen matrices. *Blood* **121**, 1644–1650 (2013).
116. Shrivastava, A. *et al.* An Orphan Receptor Tyrosine Kinase Family Whose Members Serve as Nonintegrin Collagen Receptors. *Mol. Cell* **1**, 25–34 (1997).

117. Vogel, W., Gish, G. D., Alves, F. & Pawson, T. The Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinases Are Activated by Collagen. *Mol. Cell* **1**, 13–23 (1997).
118. Hynes, R. O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* **326**, 1216–1219 (2009).
119. Leitinger, B. & Hohenester, E. Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol.* **26**, 146–155 (2007).
120. Leitinger, B. Transmembrane Collagen Receptors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 265–290 (2011).
121. Alves, F. *et al.* Distinct structural characteristics of discoidin I subfamily receptor tyrosine kinases and complementary expression in human cancer. *Oncogene* **10**, 609–618 (1995).
122. ALVES, F. *et al.* Identification of two novel, kinase-deficient variants of discoidin domain receptor 1: differential expression in human colon cancer cell lines. *FASEB J.* **15**, 1321–1323 (2001).
123. Carafoli, F. & Hohenester, E. Collagen recognition and transmembrane signalling by discoidin domain receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1834**, 2187–2194 (2013).
124. Leitinger, B. Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **310**, 39–87 (2014).
125. The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/search/ddr1>.
126. Croissant, C. *et al.* DDR1 and DDR2 physical interaction leads to signaling interconnection but with possible distinct functions. *Cell Adh. Migr.* **12**, 324–334 (2018).
127. Henriët, E. *et al.* Multitasking discoidin domain receptors are involved in

- several and specific hallmarks of cancer. *Cell Adh. Migr.* **12**, 363–377 (2018).
128. Xu, S. *et al.* The role of collagen in cancer: from bench to bedside. *J. Transl. Med.* **17**, 309 (2019).
129. Valiathan, R. R., Marco, M., Leitinger, B., Kleer, C. G. & Fridman, R. Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* **31**, 295–321 (2012).
130. Jeitany, M. *et al.* Inhibition of DDR1-BCR signalling by nilotinib as a new therapeutic strategy for metastatic colorectal cancer. *EMBO Mol. Med.* **10**, e7918 (2018).
131. Sirvent, A., Lafitte, M. & Roche, S. DDR1 inhibition as a new therapeutic strategy for colorectal cancer. *Mol. Cell. Oncol.* **5**, e1465882–e1465882 (2018).
132. Lafitte, M., Sirvent, A. & Roche, S. Collagen Kinase Receptors as Potential Therapeutic Targets in Metastatic Colon Cancer. *Front. Oncol.* **10**, 125 (2020).
133. Thiery, J. P. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 442–454 (2002).
134. Koh, M. *et al.* Discoidin domain receptor 1 is a novel transcriptional target of ZEB1 in breast epithelial cells undergoing H-Ras-induced epithelial to mesenchymal transition. *Int. J. cancer* **136**, E508–E520 (2015).
135. Chung, V. Y., Tan, T. Z., Huang, R.-L., Lai, H.-C. & Huang, R. Y.-J. Loss of discoidin domain receptor 1 (DDR1) via CpG methylation during EMT in epithelial ovarian cancer. *Gene* **635**, 9–15 (2017).

136. Shintani, Y. *et al.* Collagen I-mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor 1. *J. Cell Biol.* **180**, 1277–1289 (2008).
137. Xie, R. *et al.* DDR1 enhances invasion and metastasis of gastric cancer via epithelial-mesenchymal transition. *Tumor Biol.* **37**, 12049–12059 (2016).
138. Wang, Z. *et al.* E2F1 silencing inhibits migration and invasion of osteosarcoma cells via regulating DDR1 expression. *Int. J. Oncol.* **51**, 1639–1650 (2017).
139. Hu, Y. *et al.* MiR-199a-5p Loss Up-Regulated DDR1 Aggravated Colorectal Cancer by Activating Epithelial-to-Mesenchymal Transition Related Signaling. *Dig. Dis. Sci.* **59**, 2163–2172 (2014).
140. Song, J. *et al.* Discoidin domain receptor 1 (DDR1), a promising biomarker, induces epithelial to mesenchymal transition in renal cancer cells. *Tumor Biol.* **37**, 11509–11521 (2016).
141. Ou, J. *et al.* Endothelial cell-derived fibronectin extra domain A promotes colorectal cancer metastasis via inducing epithelial–mesenchymal transition. *Carcinogenesis* **35**, 1661–1670 (2014).
142. Hu, C.-T. *et al.* MIF, secreted by human hepatic sinusoidal endothelial cells, promotes chemotaxis and outgrowth of colorectal cancer in liver prometastasis. *Oncotarget* **6**, 22410–22423 (2015).
143. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436–444 (2008).
144. Fridman, W. H., Zitvogel, L., Sautès-Fridman, C. & Kroemer, G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 717–734 (2017).

145. KAMOHARA, H., YAMASHIRO, S., GALLIGAN, C. & YOSHIMURA, T. Discoidin domain receptor 1 isoform-a (DDR1a) promotes migration of leukocytes in three-dimensional collagen lattices. *FASEB J.* **15**, 2724–2726 (2001).
146. El Azreq, M.-A. *et al.* Discoidin domain receptor 1 promotes Th17 cell migration by activating the RhoA/ROCK/MAPK/ERK signaling pathway. *Oncotarget* **7**, 44975–44990 (2016).
147. Matsuyama, W., Wang, L., Farrar, W. L., Faure, M. & Yoshimura, T. Activation of Discoidin Domain Receptor 1 Isoform b with Collagen Up-Regulates Chemokine Production in Human Macrophages: Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and NF- κ B. *J. Immunol.* **172**, 2332 LP – 2340 (2004).
148. Kim, S.-H. *et al.* Discoidin domain receptor 1 mediates collagen-induced nitric oxide production in J774A.1 murine macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 343–352 (2007).
149. Maher, J. J. Interactions between Hepatic Stellate Cells and the Immune System. *Semin Liver Dis* **21**, 417–426 (2001).
150. Song, S. *et al.* Discoidin domain receptor 1: isoform expression and potential functions in cirrhotic human liver. *Am. J. Pathol.* **178**, 1134–1144 (2011).
151. Hansen, C., Greengard, P., Nairn, A. C., Andersson, T. & Vogel, W. F. Phosphorylation of DARPP-32 regulates breast cancer cell migration downstream of the receptor tyrosine kinase DDR1. *Exp. Cell Res.* **312**, 4011–4018 (2006).
152. Ram, R. *et al.* Discoidin Domain Receptor-1a (DDR1a) Promotes Glioma Cell Invasion and Adhesion in Association with Matrix Metalloproteinase-

2. *J. Neurooncol.* **76**, 239–248 (2006).
153. Park, H. S. *et al.* Overexpression of discoidin domain receptor 1 increases the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells in association with matrix metalloproteinase. *Oncol. Rep.* **18**, 1435–1441 (2007).
154. Yuge, R. *et al.* Silencing of Discoidin Domain Receptor-1 (DDR1) Concurrently Inhibits Multiple Steps of Metastasis Cascade in Gastric Cancer. *Transl. Oncol.* **11**, 575–584 (2018).
155. Castro-Sanchez, L., Soto-Guzman, A., Guaderrama-Diaz, M., Cortes-Reynosa, P. & Salazar, E. P. Role of DDR1 in the gelatinases secretion induced by native type IV collagen in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis* **28**, 463–477 (2011).
156. Shimada, K. *et al.* Prostate cancer antigen-1 contributes to cell survival and invasion through discoidin receptor 1 in human prostate cancer. *Cancer Sci.* **99**, 39–45 (2008).
157. Miao, L. *et al.* Discoidin domain receptor 1 is associated with poor prognosis of non-small cell lung cancer and promotes cell invasion via epithelial-to-mesenchymal transition. *Med. Oncol.* **30**, 626 (2013).
158. Fu, H.-L. *et al.* Shedding of discoidin domain receptor 1 by membrane-type matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **288**, 12114–12129 (2013).
159. Huang, Y., Arora, P., McCulloch, C. A. & Vogel, W. F. The collagen receptor DDR1 regulates cell spreading and motility by associating with myosin IIA. *J. Cell Sci.* **122**, 1637 LP – 1646 (2009).
160. Nemoto, T., Ohashi, K., Akashi, T., Johnson, J. D. & Hirokawa, K. Overexpression of Protein Tyrosine Kinases in Human Esophageal Cancer. *Pathobiology* **65**, 195–203 (1997).

161. Yamanaka, R. *et al.* Identification of expressed genes characterizing long-term survival in malignant glioma patients. *Oncogene* **25**, 5994–6002 (2006).
162. Rudra-Ganguly, N. *et al.* Discoidin domain receptor 1 contributes to tumorigenesis through modulation of TGFBI expression. *PLoS One* **9**, e111515–e111515 (2014).
163. Assent, D. *et al.* A membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)-discoidin domain receptor 1 axis regulates collagen-induced apoptosis in breast cancer cells. *PLoS One* **10**, e0116006–e0116006 (2015).
164. Saby, C. *et al.* DDR1 and MT1-MMP Expression Levels Are Determinant for Triggering BIK-Mediated Apoptosis by 3D Type I Collagen Matrix in Invasive Basal-Like Breast Carcinoma Cells. *Front. Pharmacol.* **10**, 462 (2019).
165. Sun, X. *et al.* Tumor-extrinsic discoidin domain receptor 1 promotes mammary tumor growth by regulating adipose stromal interleukin 6 production in mice. *J. Biol. Chem.* **293**, 2841–2849 (2018).
166. Lee, J. S., Semela, D., Iredale, J. & Shah, V. H. Sinusoidal remodeling and angiogenesis: A new function for the liver-specific pericyte? *Hepatology* **45**, 817–825 (2007).
167. Rafii, S., Lyden, D., Benezra, R., Hattori, K. & Heissig, B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat. Rev. Cancer* **2**, 826–835 (2002).
168. Seano, G. *et al.* Endothelial podosome rosettes regulate vascular branching in tumour angiogenesis. *Nat. Cell Biol.* **16**, 931–938 (2014).
169. Seano, G., Daubon, T., Génot, E. & Primo, L. Podosomes as novel players

- in endothelial biology. *Eur. J. Cell Biol.* **93**, 405–412 (2014).
170. Di Martino, J. *et al.* 2D and 3D Matrices to Study Linear Invadosome Formation and Activity. *J. Vis. Exp.* 54911 (2017) doi:10.3791/54911.
171. Das, S. *et al.* Discoidin Domain Receptor 1 Receptor Tyrosine Kinase Induces Cyclooxygenase-2 and Promotes Chemoresistance through Nuclear Factor- κ B Pathway Activation. *Cancer Res.* **66**, 8123 LP – 8130 (2006).
172. Ongusaha, P. P. *et al.* p53 induction and activation of DDR1 kinase counteract p53-mediated apoptosis and influence p53 regulation through a positive feedback loop. *EMBO J.* **22**, 1289–1301 (2003).
173. Deng, Y. *et al.* Suppressing miR-199a-3p by promoter methylation contributes to tumor aggressiveness and cisplatin resistance of ovarian cancer through promoting DDR1 expression. *J. Ovarian Res.* **10**, 50 (2017).
174. Aguilera, K. Y. *et al.* Inhibition of Discoidin Domain Receptor 1 Reduces Collagen-mediated Tumorigenicity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Mol. Cancer Ther.* **16**, 2473–2485 (2017).
175. Hur, H. *et al.* Discoidin domain receptor 1 activity drives an aggressive phenotype in gastric carcinoma. *BMC Cancer* **17**, 87 (2017).
176. Valkenburg, K. C., de Groot, A. E. & Pienta, K. J. Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **15**, 366–381 (2018).
177. Hu, J. L. *et al.* CAFs secreted exosomes promote metastasis and chemotherapy resistance by enhancing cell stemness and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Mol. Cancer* **18**, 91 (2019).

178. Yu, G. *et al.* Hepatic stellate cells secreted hepatocyte growth factor contributes to the chemoresistance of hepatocellular carcinoma. *PLoS One* **8**, e73312–e73312 (2013).
179. Senthebane, D. A. *et al.* The Role of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: 3D Extracellular Matrices as Accomplices. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2861 (2018).
180. Cazet, A. S. *et al.* Targeting stromal remodeling and cancer stem cell plasticity overcomes chemoresistance in triple negative breast cancer. *Nat. Commun.* **9**, 2897 (2018).
181. Lotti, F. *et al.* Chemotherapy activates cancer-associated fibroblasts to maintain colorectal cancer-initiating cells by IL-17A. *J. Exp. Med.* **210**, 2851–2872 (2013).
182. Smedsrød, B. & Pertoft, H. Preparation of Pure Hepatocytes and Reticuloendothelial Cells in High Yield From a Single Rat Liver by Means of Percoll Centrifugation and Selective Adherence. *J. Leukoc. Biol.* **38**, 213–230 (1985).
183. Shen, L., Hillebrand, A., Wang, D. Q.-H. & Liu, M. Isolation and primary culture of rat hepatic cells. *J. Vis. Exp.* 3917 (2012) doi:10.3791/3917.
184. Bartolomé, N., Arteta, B., Martínez, M. J., Chico, Y. & Ochoa, B. Kupffer cell products and interleukin 1 β directly promote VLDL secretion and apoB mRNA up-regulation in rodent hepatocytes. *Innate Immun.* **14**, 255–266 (2008).
185. Carpino, G. *et al.* Alpha-SMA expression in hepatic stellate cells and quantitative analysis of hepatic fibrosis in cirrhosis and in recurrent chronic hepatitis after liver transplantation. *Dig. Liver Dis.* **37**, 349–356 (2005).

186. Olaso, E. *et al.* Tumor-dependent activation of rodent hepatic stellate cells during experimental melanoma metastasis. *Hepatology* **26**, 634–642 (1997).
187. Karlsson, J. O., Ostwald, K., Kabjorn, C. & Andersson, M. A Method for Protein Assay in Laemmli Buffer. *Anal. Biochem.* **219**, 144–146 (1994).
188. Kim, H.-G. *et al.* Discovery of a potent and selective DDR1 receptor tyrosine kinase inhibitor. *ACS Chem. Biol.* **8**, 2145–2150 (2013).
189. Canning, P. *et al.* Structural mechanisms determining inhibition of the collagen receptor DDR1 by selective and multi-targeted type II kinase inhibitors. *J. Mol. Biol.* **426**, 2457–2470 (2014).
190. Schuppan, D., Ashfaq-Khan, M., Yang, A. T. & Kim, Y. O. Liver fibrosis: Direct antifibrotic agents and targeted therapies. *Matrix Biol.* **68–69**, 435–451 (2018).
191. Moll, S. *et al.* DDR1 role in fibrosis and its pharmacological targeting. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1866**, 118474 (2019).
192. Badiola, I., Arteta, B., Basaldua, I., Fernando, V.-V. & Elvira, O. Implication of discoidin domain receptors in the activation of hepatic stellate cells during liver metastasis. *Cancer Res.* **67**, 2457 LP – 2457 (2007).
193. Van den Eynden, G. G. *et al.* The multifaceted role of the microenvironment in liver metastasis: biology and clinical implications. *Cancer Res.* **73**, 2031–2043 (2013).
194. Schrage, A. *et al.* Murine CD146 is widely expressed on endothelial cells and is recognized by the monoclonal antibody ME-9F1. *Histochem. Cell Biol.* **129**, 441–451 (2008).
195. Bourgoignon, M., Klippstein, R. & Al-Jamal, K. T. Kupffer Cell Isolation for

- Nanoparticle Toxicity Testing. *J. Vis. Exp.* e52989–e52989 (2015)
doi:10.3791/52989.
196. Gard, A. L., White, F. P. & Dutton, G. R. Extra-neural glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in perisinusoidal stellate cells of rat liver. *J. Neuroimmunol.* **8**, 359–375 (1985).
197. Ordemann, J. *et al.* Immunomodulatory changes in patients with colorectal cancer. *Int. J. Colorectal Dis.* **17**, 37–41 (2002).
198. García-Pérez, R. *et al.* Role of Kupffer cells in the progression of CRC liver metastases after the first stage of ALPPS. *Sci. Rep.* **8**, 8089 (2018).
199. Toyoshima, Y. *et al.* IL6 modulates the immune status of the tumor microenvironment to facilitate metastatic colonization of colorectal cancer cells. *Cancer Immunol. Res.* canimm.0766.2018 (2019)
doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0766.
200. Collison, L. W., Pillai, M. R., Chaturvedi, V. & Vignali, D. A. A. Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *J. Immunol.* **182**, 6121–6128 (2009).
201. Knolle, P. A. *et al.* IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules. *Clin. Exp. Immunol.* **114**, 427–433 (1998).
202. Fu, Y., Liu, S., Zeng, S. & Shen, H. The critical roles of activated stellate cells-mediated paracrine signaling, metabolism and onco-immunology in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol. Cancer* **17**, 62 (2018).
203. Gervaz, P. *et al.* Angiogenesis of liver metastases. *Dis. Colon Rectum* **43**, 980–986 (2000).

204. Annika, A., Alexandra, A. & Christer, B. Endothelial/Pericyte Interactions. *Circ. Res.* **97**, 512–523 (2005).
205. Semela, D. *et al.* Platelet-derived growth factor signaling through ephrin-b2 regulates hepatic vascular structure and function. *Gastroenterology* **135**, 671–679 (2008).
206. Kostallari, E. & Shah, V. H. Pericytes in the Liver. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1122**, 153–167 (2019).
207. S., P. M. Role of the Matrix Metalloproteinase and Plasminogen Activator–Plasmin Systems in Angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1104–1117 (2001).
208. Heissig, B., Hattori, K., Friedrich, M., Rafii, S. & Werb, Z. Angiogenesis: vascular remodeling of the extracellular matrix involves metalloproteinases. *Curr. Opin. Hematol.* **10**, (2003).
209. Chun, T.-H. *et al.* MT1-MMP–dependent neovessel formation within the confines of the three-dimensional extracellular matrix. *J. Cell Biol.* **167**, 757–767 (2004).
210. Friedman, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* **134**, 1655–1669 (2008).
211. Friedman, S. L. Mechanisms of Disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* **1**, 98–105 (2004).
212. Kang, N., Gores, G. J. & Shah, V. H. Hepatic stellate cells: partners in crime for liver metastases? *Hepatology* **54**, 707–713 (2011).
213. Tien, Y.-W., Wu, Y.-M., Lin, W.-C., Lee, H.-S. & Lee, P.-H. Pancreatic carcinoma cells stimulate proliferation and matrix synthesis of hepatic

- stellate cells. *J. Hepatol.* **51**, 307–314 (2009).
214. Kondo, T. *et al.* The impact of hepatic fibrosis on the incidence of liver metastasis from colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **115**, 34–39 (2016).
215. Hu, X. *et al.* Prediction of hepatic metastasis and relapse in colorectal cancers based on concordance analyses with liver fibrosis scores. *Clin. Transl. Med.* **9**, 13 (2020).
216. Knittel, T. *et al.* Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF- α ; and TGF- β ;1. *J. Hepatol.* **30**, 48–60 (1999).
217. Ikeda, K. *et al.* In Vitro Migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. *Hepatology* **29**, 1760–1767 (1999).
218. Duarte, S., Baber, J., Fujii, T. & Coito, A. J. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biol.* **44–46**, 147–156 (2015).
219. Smakman, N. *et al.* Cyclooxygenase-2 Is a Target of KRAS^{D12}, Which Facilitates the Outgrowth of Murine C26 Colorectal Liver Metastases. *Clin. Cancer Res.* **11**, 41 LP – 48 (2005).
220. Chen, W.-S. *et al.* Tumor invasiveness and liver metastasis of colon cancer cells correlated with cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and inhibited by a COX-2-selective inhibitor, etodolac. *Int. J. Cancer* **91**, 894–899 (2001).
221. Endothelial Cell Proliferation and Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Primary Colorectal Cancer and Corresponding Liver Metastases. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **16**, 4549–4553 (2015).

222. Peeters, C. F. *et al.* Colorectal liver metastasis-derived VEGF induces a conversion from a sinusoid to a vascular phenotype in peritumoral endothelial cells. *Cancer Res.* **64**, 1000 LP – 1001 (2004).
223. van Huizen, N. A. *et al.* Up-regulation of collagen proteins in colorectal liver metastasis compared with normal liver tissue. *J. Biol. Chem.* **294**, 281–289 (2019).
224. Devy, L. *et al.* Selective Inhibition of Matrix Metalloproteinase-14 Blocks Tumor Growth, Invasion, and Angiogenesis. *Cancer Res.* **69**, 1517 LP – 1526 (2009).
225. Wang, W. *et al.* TIMP2 is a Poor Prognostic Factor and Predicts Metastatic Biological Behavior in Gastric Cancer. *Sci. Rep.* **8**, 9629 (2018).
226. Honkavuori-Toivola, M., Talvensaaari-Mattila, A., Soini, Y., Turpeenniemi-Hujanen, T. & Santala, M. Immunoreactivity for TIMP-2 is associated with a favorable prognosis in endometrial carcinoma. *Tumor Biol.* **33**, 935–941 (2012).
227. GIANNOPOULOS, G. *et al.* The Expression of Matrix Metalloproteinases-2 and -9 and their Tissue Inhibitor 2 in Pancreatic Ductal and Ampullary Carcinoma and their Relation to Angiogenesis and Clinicopathological Parameters. *Anticancer Res.* **28**, 1875–1881 (2008).
228. Pietruszewska, W., Bojanowska-Poźniak, K. & Kobos, J. Matrix metalloproteinases MMP1, MMP2, MMP9 and their tissue inhibitors TIMP1, TIMP2, TIMP3 in head and neck cancer: an immunohistochemical study. *Otolaryngol. Pol.* **70**, (2016).
229. Pietruszewska, W., Kobos, J., Gryczyński, M., Durko, T. & Bojanowska-Poźniak, K. Analysis of TIMP-1, TIMP-2 and TIMP-3 expression as a prognostic factor of laryngeal cancer progression. *Otolaryngol. Pol.* **62**,

- 380–387 (2008).
230. Kawata, N. *et al.* Significant Relationship of Matrix Metalloproteinase 9 with Nuclear Grade and Prognostic Impact of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2 for Incidental Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Urology* **69**, 1049–1053 (2007).
231. Oberg, A., Höyhty, M., Tavelin, B., Stenling, R. & Lindmark, G. Limited value of preoperative serum analyses of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal cancer. *Anticancer Res.* **20**, 1085–1091 (2000).
232. Wu, Y. & Zhou, B. P. Inflammation: a driving force speeds cancer metastasis. *Cell Cycle* **8**, 3267–3273 (2009).
233. Eggert, T. & Greten, T. F. Tumor regulation of the tissue environment in the liver. *Pharmacol. Ther.* **173**, 47–57 (2017).
234. Roig, B. *et al.* Expression of the tyrosine kinase discoidin domain receptor 1 (DDR1) in human central nervous system myelin. *Brain Res.* **1336**, 22–29 (2010).
235. Sun, X. *et al.* LCB 03-0110, a Novel Pan-Discoidin Domain Receptor/c-Src Family Tyrosine Kinase Inhibitor, Suppresses Scar Formation by Inhibiting Fibroblast and Macrophage Activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **340**, 510 LP – 519 (2012).
236. Romayor, I., Badiola, I. & Olaso, E. Inhibition of DDR1 reduces invasive features of human A375 melanoma, HT29 colon carcinoma and SK-HEP hepatoma cells. *Cell Adh. Migr.* **14**, 69–81 (2020).
237. Corcoran, D. S. *et al.* DDR1 autophosphorylation is a result of aggregation into dense clusters. *Sci. Rep.* **9**, 17104 (2019).

238. Sanchita, M., Mathewos, T. & Angela, W.-N. Vesicular Trafficking of Tyrosine Kinase Receptors and Associated Proteins in the Regulation of Signaling and Vascular Function. *Circ. Res.* **98**, 743–756 (2006).
239. Yang, X. *et al.* Attenuated liver tumor formation in the absence of CCR2 with a concomitant reduction in the accumulation of hepatic stellate cells, macrophages and neovascularization. *Int. J. Cancer* **118**, 335–345 (2006).
240. Waas, E. T. *et al.* Matrix metalloproteinase 2 and 9 activity in patients with colorectal cancer liver metastasis. *BJS (British J. Surgery)* **90**, 1556–1564 (2003).
241. Coelho, N. M. & McCulloch, C. A. Mechanical signaling through the discoidin domain receptor 1 plays a central role in tissue fibrosis. *Cell Adh. Migr.* **12**, 348–362 (2018).
242. Karamanos, N. K., Theocharis, A. D., Neill, T. & Iozzo, R. V. Matrix modeling and remodeling: A biological interplay regulating tissue homeostasis and diseases. *Matrix Biol.* **75–76**, 1–11 (2019).
243. Enns, A. *et al.* Integrins can directly mediate metastatic tumor cell adhesion within the liver sinusoids. *J. Gastrointest. Surg.* **8**, 1049–1060 (2004).
244. Wu, L. Q. *et al.* Phenotypic and Functional Differences between Human Liver Cancer Endothelial Cells and Liver Sinusoidal Endothelial Cells. *J. Vasc. Res.* **45**, 78–86 (2008).
245. Gao, H. *et al.* Multi-organ Site Metastatic Reactivation Mediated by Non-canonical Discoidin Domain Receptor 1 Signaling. *Cell* **166**, 47–62 (2016).
246. Gerg, M. *et al.* Distinct Functionality of Tumor Cell–Derived Gelatinases during Formation of Liver Metastases. *Mol. Cancer Res.* **6**, 341 LP – 351

- (2008).
247. Kruse, J. *et al.* Macrophages promote tumour growth and liver metastasis in an orthotopic syngeneic mouse model of colon cancer. *Int. J. Colorectal Dis.* **28**, 1337–1349 (2013).
248. Benedicto, A., Romayor, I. & Arteta, B. Role of liver ICAM-1 in metastasis. *Oncol. Lett.* **14**, 3883–3892 (2017).
249. Benedicto, A. *et al.* Decreased expression of the $\beta(2)$ integrin on tumor cells is associated with a reduction in liver metastasis of colorectal cancer in mice. *BMC Cancer* **17**, 827 (2017).
250. Schlesinger, M. & Bendas, G. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)—An increasing insight into its role in tumorigenicity and metastasis. *Int. J. Cancer* **136**, 2504–2514 (2015).
251. Christopher, F. *et al.* Discoidin Domain Receptor 1 on Bone Marrow-Derived Cells Promotes Macrophage Accumulation During Atherogenesis. *Circ. Res.* **105**, 1141–1148 (2009).
252. Reel, B. *et al.* The Regulation of Matrix Metalloproteinase Expression and the Role of Discoidin Domain Receptor 1/2 Signalling in Zoledronate-treated PC3 Cells. *Journal of Cancer* vol. 6 1020–1029 (2015).
253. Ye, L. *et al.* Transmembrane-4 L-six family member-1 (TM4SF1) promotes non-small cell lung cancer proliferation, invasion and chemo-resistance through regulating the DDR1/Akt/ERK-mTOR axis. *Respir. Res.* **20**, 106 (2019).
254. Vehlow, A. & Cordes, N. DDR1 (discoidin domain receptor tyrosine kinase 1) drives glioblastoma therapy resistance by modulating autophagy. *Autophagy* **15**, 1487–1488 (2019).

255. Nam, H. *et al.* PGC1 α suppresses kidney cancer progression by inhibiting collagen-induced SNAIL expression. *Matrix Biol.* (2020) doi:<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2020.01.001>.
256. Jin, H. *et al.* Inhibition of Discoidin Domain Receptor 1 Prevents Stroma-Induced Peritoneal Metastasis in Gastric Carcinoma. *Mol. Cancer Res.* **16**, 1590 LP – 1600 (2018).
257. Valencia, K. *et al.* Inhibition of Collagen Receptor Discoidin Domain Receptor-1 (DDR1) Reduces Cell Survival, Homing, and Colonization in Lung Cancer Bone Metastasis. *Clin. Cancer Res.* **18**, 969 LP – 980 (2012).

