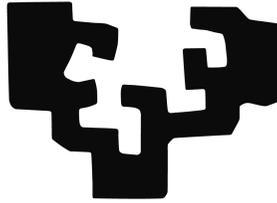


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**Papel de la ICAM-1, la COX-2 y el Receptor de
Manosa en la modulación de la respuesta estromal
durante la metástasis hepática por cáncer
colorrectal**

Alba Herrero Alonso

Leioa, 2020

Directores

Beatriz Arteta Ruiz Aitor Benedicto García

Si vemos sombras es que siempre hubo luz.

Agradecimientos

Tras estos cinco años llenos de buenos y malos momentos, toca cerrar un ciclo inolvidable. Llegué a Bilbao hace seis sin nada ni nadie y acabo con un hogar y una familia de la que siempre estaré agradecida.

Lo primero, quiero dar las gracias a mis directores, los Dres Beatriz Arteta y Aitor Benedicto, por todo el tiempo invertido, la paciencia en enseñarme y por hacer que este viaje fuera mas sencillo. También, dar las gracias a las Dras Elvira Olaso y Joana Marquez por estar siempre disponibles para ayudar a lo largo de estos años.

Por supuesto, quiero dar las gracias a mis dos compañeras de laboratorio que han hecho que los malos momentos se llevaran mejor y que los lunes costaran un poco menos. Iera, gracias por aguantarme estos años, por tener siempre una mano tendida y por saber escucharme cuando parecía que nada salía bien. Irene, has tenido y tienes una paciencia infinita conmigo, gracias por estar siempre ahí y por hacer que los 6 meses en Chile fueran inolvidables.

También quiero dar las gracias a mis compañeros de departamento: Miguel, Cris, Patri, Maria B, Ander, Sheila, Arantza, Maddalen, Maider, Igor, Lutxu, María C, Vero U, Patri G, Xandra y Noelia (espero no olvidarme a nadie). A pesar de que llegué tarde, me acogísteis en vuestra familia y he vivido con vosotros los mejores momentos de estos años.

Dentro del departamento no puedo olvidarme de Mari Jose y Txus, que siempre han estado disponibles para facilitar las cosas ni de Cristina, que sin ella, mis inmunos no hubieran sido lo mismo.

Pero estos años no todo ha sido la universidad y la ciencia, es imposible no dar las gracias al fútbol sala, tanto de aquí en Bilbao, como en Santander o en Pamplona, por darme rivales que se han convertido en amigas y por darme amigas que se han convertido en familia. Gracias en especial al Bilbo, que me acogió cuando llegue, a Imanol y Luis por ser los padres que no tenía cerca y a Di, Esti, Isa, Helen, Enara, Ido, Sandra y muchas más jugadoras del equipo por regalarme tantos buenos momentos. También gracias al ArtaRomo, a José, por confiar en mi, y a todo mi equipo, en especial Alaitz, Eztizen y Goi por hacer que el cambio mereciera la pena y acogerme desde el minuto 0 como una más. Especialmente dar las gracias a Evita por hacer las mañanas y los días más fáciles y por llevarme siempre la contraria para que el día a día no fuera tan aburrido. Por último, a Jess porque ha sido pilar imprescindible para que Bilbao fuera un hogar. Por los viajes (hasta Machu Picchu incluido), por los momentos MasterChef o por hacer nada y escucharme durante horas, gracias por aguantarme todos los días.

Felices las tres.

Otros miembros imprescindibles de mi familia son un valenciano, un gallego y una suiza. Gracias a Jordi, Adri y Laure por ser mi familia durante estos años y por hacer más acogedora una casa tan fría (y sin ascensor). Durante estos años ha merecido la pena cada escalón subido, porque no hay mejores compañeros de piso en el mundo entero.

Si en Bilbao he formado una familia, en León siempre la he tenido. Gracias a mis “cachondos” que me han acompañado en este viaje desde la E.S.O., a mi gente del pueblo, que llevan a mi lado desde que tengo recuerdo y a mis compañeras de universidad: Marta, Camino, Paloma y Rocio porque como dice el refrán: “mal de muchos....”

Y como no, volviendo al fútbol sala, gracias, a parte de mis fantásticas, Paula, Elsa, Alba porque hay amistades que aguantan tiempo y distancia. También dar las gracias a Trini, Jorge, Sandra, Jane, Garci, Maria, Martín y Bea que siempre me han apoyado y han estado a mi lado durante este viaje. En especial, gracias a Calata, a Tania y a Astu por ser siempre casa, por estar todo este tiempo, por apoyarme, venir a verme (a cualquier otra parte) y por todos los momentos compartidos.

Siempre en mi equipo.

Por último, gracias Anina, despues de 10 años aquí seguimos, gracias por tus “buenos” consejos, por hacer que en los días malos siempre encontrara el lado bueno y por estar siempre al otro lado. Fijo que se me olvida gente, asi que, gracias a todos lo que han formado parte de este viaje, ya sea el camino entero o solo un tramo. Siempre he dicho que lo mejor del fútbol sala ocurría cuando acababa el partido y tras estos años estoy aun más convencida.

Bendita pelotita.

Si antes le he dado las gracias a toda la familia que elegimos, ahora toca dar las gracias a la familia que viene de fábrica. Gracias a mis tios y primos (primeros y segundos) por acompañarme en este viaje, por sus animos y por escucharme. En especial, a Ivan, porque a pesar de hablar poco siempre ha sabido que decirme y siempre me ha ayudado en todo. Y por supuesto, Diego, mi referencia, se que ha sido duro pero gracias por estar todos estos años a mi lado, por hacer de padre o de hermano, dependiendo de lo que tocara.

Por último, y los más importantes, **GRACIAS** papá y mamá, por darme esta oportunidad, por permitirme que cumpliera uno de mis sueños y por enseñarme a no rendirme cuando parecía nada iba a ir bien. Gracias por estar siempre a mi lado, porque León y Bilbao nunca han estado tan cerca.

Índice

Resumen	1
Introducción	7
1. Incidencia y clasificación del cáncer colorrectal	9
2. El hígado.....	12
2.1 Morfología.....	12
2.2. Función.....	14
3. Desarrollo tumoral hepático	16
3.1. Formación del tumor primario e invasión.....	17
3.2. Intravasación y circulación de las células tumorales	20
3.3. Extravasación de las células tumorales al parénquima hepático.....	21
3.3.1. Importancia de la ICAM-1 en la adhesión tumoral	23
3.4. Formación del microambiente tumoral hepático	26
3.4.1. El papel de los fibroblastos en el TME.....	27
3.4.2. El papel de los macrófagos en el TME	30
3.5. Remodelación de la matriz extracelular	32
3.5.1. Desmoplasia.....	33
3.5.2. Degradación de la ECM: MMPs	34
3.6. Angiogénesis	35

4. Papel de la COX-2 en el desarrollo metastásico.....	39
5. El receptor de Manosa.....	44
Hipótesis y Objetivos	49
Materiales	53
1. Animales	55
2. Líneas celulares	55
2.1. Líneas tumorales	55
2.1.1. Carcinoma de colon murino C26.	55
2.2. Líneas no tumorales	56
2.2.1. Línea celular de fibroblastos.....	56
2.2.2. Línea celular de Macrófagos.....	56
3. Medios y reactivos de cultivo y mantenimiento celular	57
3.1. Medios de cultivo y mantenimiento celular	57
3.1.1. Medio de cultivo RPMI-1640.....	57
3.1.2. Medio de cultivo DMEM.....	57
3.1.3. Medio de cultivo DMEM F-12.....	58
3.2. Reactivos de cultivo y mantenimiento celular	58
3.2.1. Suero Bovino Fetal (SBF).....	58

3.2.2. Solución Antibiotico-Antimitótico 100X	59
3.2.3. L-Glutamina	59
3.2.4. EDTA 4mM.....	60
3.2.5. Tripsina-EDTA 0.05%.....	60
3.2.6. Colágeno Tipo I	60
3.2.7. Dimetilsulfóxido.....	61
3.2.8. Rascador Celular	61
4. Reactivos y soluciones para el aislamiento celular	62
4.1. Reactivos para el aislamiento celular.....	62
4.1.1. Colagenasa tipo IV	62
4.1.2. Albúmina de suero bovino (BSA).....	63
4.1.3. Gentamicina.....	63
4.1.4. EGTA	64
4.2. Soluciones para el aislamiento celular.....	64
4.2.1. Búfer salino de fosfato (PBS)	64
4.2.2. Búfer de Perfusión	65
4.2.3. Búfer de digestión	65
4.2.4. Gradiente de Percoll	66
5. Reactivos para otros procesos experimentales	67

5.1. Molécula de Adhesión Celular 1 en su forma soluble (sICAM-1).....	67
5.2. Celecoxib (CLX).....	67
5.3. Presto Blue™	67
6. Reactivos para lisados celulares.....	68
6.1. Búfer Laemmli 2X	68
6.2. β-Mercaptoetanol	68
6.3. Ácido Tricloroacético.....	69
7. Reactivos para electroforesis.....	69
7.1. Acrilamida/Bis-Acrilamida 37.5:1 30%.....	69
7.2. Dodecilsulfato sódico (SDS)	69
7.3. Tris (hidroximetil) aminometano	70
7.4. Persulfato de amonio.....	70
7.5. Tetrametiletilendiamina.....	71
8. Reactivos para análisis de inmunodetección.....	71
8.1. Reactivos comunes para Western Blot e Inmunohistoquímica	71
8.1.1. Tween-20.....	71
8.1.2. Triton X-100	72
8.1.3. Estreptavidina-HRP	72
8.1.4. Substrato para la detención de HRP.....	72

8.1.5. Metanol	73
8.2. Reactivos específicos de Western Blot	73
8.2.1. Marcador de peso molecular	73
8.2.2. Solución de tinción Ponceau S.....	74
8.3. Reactivos específicos de Inmunohistoquímica	74
8.3.1. Peróxido de Hidrógeno.....	74
8.3.2. Anticuerpos contra fragmentos F(ab') ₂	74
8.4. Reactivos específicos de ELISA.....	75
8.4.1. Kit específico para la actividad de COX-2 y la expresión de PGE ₂	75
8.4.2. Kit específico para la expresión de VEGF	76
9. Búferes para análisis de inmunodetección.....	76
9.1. Búferes específicos de Western Blot	76
9.1.1. Búfer de electroforesis	76
9.1.2. Búfer de transferencia.....	77
9.1.3. Búfer de lavado.....	77
9.1.4. Búfer de bloqueo.....	77
9.2. Búferes específicos de Inmunohistoquímica	78
9.2.1. Búfer de lavado.....	78
9.2.2. Búfer de bloqueo de la Peroxidasas.....	78

9.2.3. Búfer de BSA	78
9.2.4. Búfer de bloqueo F(ab') ₂	78
9.2.5. Búferes de recuperación antigénica.....	79
9.2.5.1. Búfer de citrato a pH ácido	79
9.2.5.2. Búfer de proteinasa K.....	80
10. Anticuerpos	81
10.1. Anticuerpos Primarios.....	81
10.1.1. Anti-Gliceraldehido-3 Fosfato Deshidrogenasa (GAPDH)	81
10.1.2. Anti-Molécula de Adhesión Intercelular (ICAM-1/CD54)	81
10.1.3. Anti-Ciclooxigenasa 2 (COX-2).....	82
10.1.4. Anti-FAP.....	82
10.1.5. Anti- α actina de músculo liso (α -SMA).....	82
10.1.6. Anti-F4/80.....	82
10.1.7. Anti- α L	83
10.1.8. Anti-Receptor de Manosa (MR).....	83
10.2. Anticuerpos secundarios.....	84
10.2.1. Conejo Anti-Ratón	84
10.2.2. Cabra Anti-Rata.....	84
10.2.3. Cabra Anti-Conejo	84

11. Reactivos y búferes para análisis zimográficos.....	85
11.1. Reactivos para análisis zimográficos.....	85
11.1.1. Glicerol.....	85
11.1.2. Gelatina.....	85
11.1.3. Azul Coomassie.....	85
11.2. Búferes para análisis zimográficos.....	86
11.2.1. Búfer de carga.....	86
11.2.2. Búfer de electroforesis.....	86
11.2.3. Búfer de lavado.....	86
11.2.4. Búfer de incubación.....	87
11.2.5. Búfer de tinción.....	87
11.2.6. Búfer de fijación a base de alcoholes.....	87
12. Fijadores.....	88
12.1. Solución de Zinc.....	88
12.2. Poli-L-Lisina.....	88
Métodos.....	91
1. Mantenimiento y cultivo de líneas celulares.....	93
2. Congelación de líneas celulares.....	94
3. Aislamiento, purificación y cultivo de células no parenquimales murinas.....	94

3.1. Digestión enzimática del hígado.	95
3.2. Aislamiento y cultivo de células no parenquimales.....	95
4. Tratamientos y obtención de medios condicionados	97
4.2. Preparación de medios condicionados de C26	97
4.2. Preparación de medios condicionados de HSCs	100
5. Extracción y cuantificación de proteínas	101
6. Western Blot	103
7. Inmunoensayos enzimáticos: ELISA	105
8. Análisis Zimográfico.....	106
9. Geles de Electroforesis	107
9.1. Gel para Western Blot 10% de Bis-Acrilamida	107
9.2. Gel para Zimografía	108
10. Ensayos de migración celular	110
10.1. Test de la Herida	110
10.2. Migración a través de Transwell	111
11. Proliferación celular.....	112
12. Desarrollo experimental de metástasis hepática ...	113
12.1. Bloqueo <i>in vivo</i> mediante anticuerpo del LFA-1 tumoral ..	114
12.2. Silenciamiento <i>in vivo</i> de ICAM-1	115

12.3. Inhibición de la COX-2 <i>in vivo</i>	116
12.4 Bloqueo <i>in vivo</i> mediante anticuerpo del MR endotelial ...	118
13. Análisis histológicos.....	120
13.1. Preparación de muestras	120
13.2. Hematoxilina-Eosina	120
13.3. Marcaje de colágeno fibrilar (Rojo Siria).....	121
14. Análisis inmunohistológicos.....	121
14.1 Marcaje alfa actina de músculo liso (α -SMA)	121
14.2. Marcaje de macrófagos F4/80	122
15. Procesamiento estadístico	123
Resultados	127
1. Estudio <i>in vivo</i> del papel de ICAM-1/LFA-1 desarrollo tumoral de C26.....	129
1.1. Estudio <i>in vivo</i> de la integrina LFA-1 en el desarrollo tumoral hepático de C26.....	130
1.1.1. Efecto de la integrina LFA-1 tumoral en la capacidad metastásica de C26.....	131
1.1.2. Efecto de la integrina LFA-1 tumoral en el reclutamiento de HSCs	133
1.1.3. Efecto de la integrina LFA-1 tumoral en la inducción de la respuesta desmoplásica	135

1.1.4. Efecto de la integrina LFA-1 tumoral en el reclutamiento de KCs	137
1.2. Estudio <i>in vivo</i> de la ICAM-1 endotelial en el desarrollo tumoral hepático de C26.....	139
1.2.1. Estudio del papel de la ICAM-1 endotelial hepática en la capacidad metastásica tumoral de C26.....	139
1.2.2. Estudio del papel de la ICAM-1 endotelial hepática en el reclutamiento de HSCs	140
1.2.3. Estudio del papel de la ICAM-1 endotelial hepática en la inducción de la respuesta desmoplásica	141
1.2.4. Estudio del papel de la ICAM-1 endotelial hepática en el reclutamiento de KCs.....	143
2. Estudio del papel de la COX-2 en el desarrollo tumoral hepático	144
2.1. Efecto del CLX sobre la expresión de COX-2 en células tumorales C26	144
2.2. Estudio del efecto de la sICAM-1 en la actividad de la COX-2 tumoral.....	145
2.2.1. Estudio de la activación tumoral por sICAM-1 en la actividad de la COX-2 y la producción de PGE ₂	146
2.2.3. Estudio de la capacidad proliferativa del tumor mediada por la COX-2 tras la activación por sICAM-1.....	147
2.2.4. Estudio de la capacidad migratoria del tumor mediada por la COX-2 tras la activación por sICAM-1.....	148

2.2.5. Estudio de la degradación de la ECM mediada por la COX-2 tras la activación por sICAM-1.....	149
2.2.6. Estudio de la respuesta angiogénica del tumor mediada por la COX-2 tras la activación por sICAM-1.....	150
3. Estudio <i>in vitro</i> del papel de las células estromales en el desarrollo tumoral.....	153
3.1 Estudio de la activación de células estromales en presencia del tumor.....	153
3.1.1. Activación de fibroblastos 3T3 por el tumor.....	153
3.1.2. Activación de macrófagos J774A.1 por el tumor.....	154
3.2. Estudio de la activación tumoral mediada por sICAM-1 sobre la capacidad migratoria de 3T3 y J774A.1.....	155
3.3. Estudio de la COX-2 producida por el tumor sobre las HSCs.....	157
3.3.1. Estudio de la capacidad moduladora de la COX-2 tumoral en el potencial migratorio de las HSCs.....	157
3.3.2 Estudio de la capacidad moduladora de la COX-2 tumoral en el potencial angiogénico de las HSCs.....	159
3.3.3. Estudio del papel de la COX-2 en la inducción de la capacidad migratoria tumoral mediada por las HSCs.....	160
4. Estudio <i>in vivo</i> del efecto modulador de la COX-2 tras la activación tumoral por sICAM-1 el desarrollo tumoral hepático de C26.....	163
4.1. Estudio <i>in vivo</i> de la capacidad metastásica tumoral de células C26 mediada por la COX-2 tras la activación por sICAM-1.....	163

4.2. Estudio <i>in vivo</i> del reclutamiento de HSCs mediado por la COX-2 tras la activación por sICAM-1	165
4.3. Estudio <i>in vivo</i> de la inducción de la respuesta desmoplásica mediada por la COX-2 tras la activación por sICAM-1	167
4.4. Estudio <i>in vivo</i> del reclutamiento de KCs mediado por la COX-2 tras la activación por sICAM-1	169
5. Estudio <i>in vivo</i> del papel del MR endotelial en el desarrollo tumoral hepático de C26.....	171
5.1. Estudio del papel del MR endotelial en la capacidad metastásica tumoral de C26	171
5.2. Estudio del papel del MR endotelial en el reclutamiento de HSCs.....	173
5.3. Estudio del papel del MR endotelial en la inducción de la respuesta desmoplásica	174
5.4. Estudio del papel del MR endotelial en el reclutamiento de KCs	175
Discusión	179
Conclusiones.....	197
Bibliografía	201

Índice de Figuras

Figura 1. Morfología y estructura hepática.....	16
Figura 2. Fases de la cascada metastásica.. ..	17
Figura 3. Mecanismo de transición endotelio-mesénquima (EMT).	¡Error! Marcador no definido.
Figura 4. Proceso de la transmigración tumoral hepática.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 5. Proceso de activación de HSCs.....	29
Figura 6. Proceso de activación de KCs y monocitos en TAMs.	32
Figura 7. Proceso de infiltración tumoral hepática.....	38
Figura 8. Estructura de las isoformas de la COX.....	40
Figura 9. Proceso de síntesis de PGE ₂	41
Figura 10. Estructura del celecoxib (CLX).....	43
Figura 11. Proceso de infiltración tumoral hepática modulado por la COX-2.	44
Figura 12. Estructura del receptor de Manosa.	46
Figura 13. Método de obtención de medio condicionado tumoral.....	97
Figura 14. Modelo de obtención del medio condicionado tumoral para los análisis ELISA de PGE ₂	99
Figura 15. Modelo de obtención de medios condicionados de HSCs para análisis de la capacidad migratoria.	101

Figura 16. Esquema representativo de los diferentes grupos experimentales en el desarrollo metastásico *in vivo* modulado por la deficiencia de la sub-unidad α L del LFA-1. 115

Figura 17. Esquema representativo de los dos grupos experimentales en el desarrollo metastásico *in vivo* modulado por el silenciamiento de ICAM-1. 116

Figura 18. Esquema representativo de los diferentes grupos experimentales en el desarrollo metastásico *in vivo* modulado por la COX-2 y la ICAM-1..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 19. Esquema representativo de los dos grupos experimentales en el desarrollo metastásico *in vivo* modulado por el bloqueo del MR 119

Figura 20. Efecto del bloqueo de la subunidad α L del LFA-1 en células tumorales C26 en la capacidad metastásica hepática *in vivo*. 132

Figura 21. Efecto del bloqueo de la subunidad α L del LFA-1 en células tumorales C26 en el reclutamiento de HSCs *in vivo*..... 134

Figura 22. Efecto del bloqueo de la subunidad α L del LFA-1 en células tumorales C26 en la respuesta desmoplásica *in vivo*..... 136

Figura 23. Efecto del bloqueo de la subunidad α L del LFA-1 en células tumorales C26 en el reclutamiento de KCs *in vivo*..... 138

Figura 24. Efecto del silenciamiento *in vivo* de la ICAM-1 endotelial sobre la capacidad metastásica hepática de las células tumorales C26.. 140

Figura 25. Efecto del silenciamiento *in vivo* de la ICAM-1 endotelial sobre el reclutamiento de HSCs durante el desarrollo metastásico de células C26..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 26. Efecto del silenciamiento *in vivo* de la ICAM-1 endotelial sobre la respuesta desmoplásica durante el desarrollo metastásico de células C26..... 142

Figura 27. Efecto del silenciamiento *in vivo* de la ICAM-1 endotelial sobre el reclutamiento de KCs durante el desarrollo metastásico de células C26..... 143

Figura 28. Análisis del efecto del CLX sobre la expresión de COX-2 en células tumorales C26..... 145

Figura 29. Efecto de la inhibición de la COX-2 tras la activación de ICAM-1 en la actividad de COX-2 y la expresión de PGE₂ en células tumorales C26..... 147

Figura 30. Efecto de la inhibición de la COX-2 tras la activación de ICAM-1 en la capacidad proliferativa de las células tumorales C26 a 24 horas 148

Figura 31. Efecto de la inhibición de la COX-2 tras la activación de ICAM-1 en la capacidad migratoria a 24 horas de las células tumorales C26..... 149

Figura 32. Efecto de la inhibición de COX-2 tras la activación de ICAM-1 en la degradación de la ECM por células tumorales C26 150

Figura 33. Efecto de la inhibición de la COX-2 modulada tras la activación de ICAM-1 en la expresión de VEGF por células tumorales C26..... 151

Figura 34. Expresión de FAP e ICAM-1 por 3T3 activados por C26-MC a 24, 48 y 72 horas 154

Figura 35. Expresión de MR e ICAM-1 por J774A.1 activados por C26-MC a 24, 48 y 72 horas. 155

Figura 36. Efecto la COX-2 modulada por la activación tumoral por sICAM-1 en la capacidad migratoria de líneas celulares 3T3 y J774A.1 157

Figura 37. Efecto de la inhibición de la COX-2 sobre la capacidad migratoria de las células HSCs mediada por la presencia de factores solubles derivados de células tumorales C26..... 158

Figura 38. Efecto de la inhibición de la COX-2 sobre la expresión de VEGF de las células HSCs mediada por la presencia de factores solubles derivados de células tumorales C26..... 159

Figura 39. Efecto de la inhibición de la COX-2 estromal sobre la capacidad migratoria del tumor mediada por la activación de HSCs.. 161

Figura 40. Efecto de la inhibición *in vivo* de la COX-2 tras la activación tumoral por sICAM-1 en células C26 sobre la capacidad metastásica hepática 164

Figura 41. Efecto de la inhibición *in vivo* de la COX-2 tras la activación tumoral por sICAM-1 en células C26 sobre el reclutamiento de HSCs. 166

Figura 42. Efecto de la inhibición *in vivo* de la COX-2 tras la activación tumoral por sICAM-1 en células C26 sobre la respuesta desmoplásica.. 168

Figura 43. Efecto de la inhibición *in vivo* de la COX-2 tras la activación tumoral por sICAM-1 en células C26 sobre el reclutamiento de KCs.. 170

Figura 44. Efecto del bloqueo *in vivo* del MR endotelial sobre la capacidad metastásica hepática de células tumorales C26 172

Figura 45. Efecto del bloqueo *in vivo* del MR endotelial sobre el reclutamiento de HSCs. 173

Figura 46. Efecto del bloqueo *in vivo* del MR endotelial sobre la respuesta desmoplásica.. 175

Figura 47. Efecto del bloqueo *in vivo* del MR endotelial sobre el reclutamiento de KCs. 176

Índice de Tablas

Tabla 1. Anticuerpos primarios y diluciones. 104

Tabla 2. Composición detallada del gel de resolución al 10%. 107

Tabla 3. Composición detallada del gel de concentración al 4%. 108

Tabla 4. Composición detallada del gel de resolución al 7.5%. 109

Tabla 5. Composición detallada del gel de concentración al 4%. 109

Abreviaturas (orden alfabético)

15-PGDH: 15-hidroxi prostaglandina deshidrogenasa.

AA: Ácido araquidónico.

AEEC: Asociación española contra el cáncer.

AMPc: Adenosin monofosfato cíclico.

ANG-2: Angiopeptina 2.

APS: Persulfato de amonio.

BSA: Albúmina de suero bovino.

CAFs: Fibroblastos asociados al cáncer.

CAMs: Moléculas de adhesión.

CCL2 o MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocito.

CCR: Cáncer colorrectal.

CCR2: Receptor de la proteína quimiotáctica de monocito.

CIM: Firma de metilación de islas CpG.

CIN: Inestabilidad cromosómica.

CLX : Celecoxib.

COX-1: Ciclooxygenasa 1.

COX-2: Ciclooxigenasa 2.

COX-3: Ciclooxigenasa 3.

COXs: Ciclooxigenasas.

CRD: Dominio rico en cisteína.

DAB: 3,3 diaminobenzidina.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

ECM: Matriz extracelular.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

EG-VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial derivado de la glándula endocrina.

EMT: Transición epitelio-mesénquima.

EP: Receptores prostanoideos E.

ERK1 y ERK2: Quinasas reguladoras de la señalización extracelular.

FAK: Quinasa de adhesión local.

FAP: Proteínas activadoras de fibroblastos.

FGF-2: Factor de crecimiento fibroblástico 2.

GAPDH: Gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa.

GM-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.

GPCR: Receptores transmembrana acoplados a proteínas G.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos.

HIER: Recuperación antigénica por calor.

HIF1 α : Factor 1 inducible por hipoxia.

HMGB1: Proteína de alta movilidad del grupo 1.

HSCs: Células estrelladas hepáticas.

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular.

IFN- γ : Interferon γ .

IgG: Inmunoglobulinas.

IL-1 β : Interleucina 1 β .

IL-1: Interleucina 1.

IL-10: Interleucina 10.

IL-13: Interleucina 13.

IL-18: Interleucina 18.

IL-4: Interleucina 4.

IL-6: Interleucina 6.

KCs: Células de Kupffer.

LFA-1: Antígeno 1 asociado a la función linfocitaria.

LIF: Factor inhibidor de la migración de leucocitos.

LPS: Lipopolisacáridos.

LSECs: Células endoteliales del sinusoides hepático.

MALT: Linfoma asociado a mucosas.

MAPK/PI3K: Proteínas quinasas de activación mitogénica/ fosfoinositol-3-quinasa.

M-CSF o CSF-1: Factor estimulador de colonias de macrófagos.

MMPs: Metaloproteasas.

MR: Receptor de manosa.

MSI: Inestabilidad de microsatélites.

MT-MMPs: Metaloproteasas transmembrana.

NAD: Nicotiamida adenina dinucleotida.

NK: Células asesinas naturales.

NO: Óxido nítrico.

NPCs: Células no parenquimales.

NSAIDs: Antiinflamatorios no esteroides.

OMS: Organización mundial de la salud.

PAR-2: Receptor activado por proteasa.

PBS: Búfer salino de fosfato.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PDGFR α : Receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PGES: Prostaglandina E sintasa.

PGs: Prostaglandinas.

PIER: Recuperación antigénica inducida por proteólisis.

PIGF: Factor de crecimiento placentario.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

SBF: Suero bovino fetal.

SDF-1 o CXCL12: Factor 1 derivado de las células estromales.

SDS: Dodecilsulfato sódico.

TAMs: Macrófagos asociados al cáncer.

TCA: Ácido tricloroacético.

TEMED: Tetrametiletilendiamina.

TF: Factor Tisular.

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β .

TIMPs: Inhibidores tisulares de las metaloproteasas.

TME: Microambiente tumoral.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral.

uPA: Activadores de plasminógeno tipo urikinasa.

VCAM-1: Molécula de adhesión vascular.

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular.

VEGFR: Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular.

WCRF: Fundación mundial de la investigación frente al cáncer.

α -SMA: α -actina de músculo liso.

Resumen

El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los cánceres con mayor prevalencia en la población mundial. Las células tumorales de CCR metastatizan principalmente en el hígado, siendo la causa del alto índice de mortalidad de esta patología. Las células tumorales circulan hasta los sinusoides hepáticos donde interaccionan con las células endoteliales del sinusoides hepático (LSECs) a través de la proteína ICAM-1, presente en el endotelio y la integrina LFA-1 tumoral. Dicha interacción favorece la transmigración tumoral y la expresión de moléculas pro-inflamatorias que promueven la formación de un microambiente tumoral (TME) pro-inflamatorio. Entre estas moléculas, la ciclooxigenasa 2 (COX-2), enzima limitante de la síntesis de PGE₂, juega un papel clave en diferentes estados inflamatorios. Además, esta interacción activa la expresión del receptor de manosa (MR), el cual está implicado en la formación de una respuesta inmunotolerante al tumor. Sin embargo, se desconoce el papel de la interacción ICAM-1/LFA-1, así como el de la COX-2 y el MR, en el reclutamiento de las poblaciones hepáticas estromales, células estrelladas hepáticas (HSCs) y células de Kupffer (KCs) y del aumento de la respuesta desmoplásica, componente clave en la formación de un microambiente pro-tumoral.

El primero de los objetivos de este trabajo ha sido analizar *in vivo* el papel de la interacción ICAM-1/LFA-1 en la capacidad metastásica tumoral del CCR, en el reclutamiento de HSCs y KCs junto con la respuesta desmoplásica. El bloqueo del LFA-1 tumoral o el silenciamiento de la ICAM-1 endotelial han reducido la capacidad pro-tumoral de las células de CCR, disminuyendo el reclutamiento de poblaciones hepáticas y la respuesta desmoplásica. Por el contrario, la activación de las células de CCR mediante ICAM-1 potencia el desarrollo tumoral, iniciando un circuito de retroalimentación positiva que favorece la metástasis hepática.

A continuación, se ha analizado A continuación, se ha analizado en modelos in vitro el efecto de la ICAM-1 sobre las células de CCR. Así, se ha observado que dicha proteína aumenta la expresión de COX-2 tumoral, así como la respuesta proliferativa, migratoria y angiogénica de las células del CCR. La activación de las células de CCR mediante ICAM-1 aumentó la secreción de factores promigratorios, favoreciendo el reclutamiento de poblaciones estromales. La inhibición de la COX-2 mediante celecoxib (CLX) revirtió los efectos potenciados por la activación de las células de CCR con ICAM-1. Adicionalmente, se ha comprobado que la COX-2 estromal media la secreción de factores que estimulan la migración de las células del CCR, indicando un diálogo cruzado entre estas poblaciones del microambiente tumoral.

En tercer lugar, Estudiado el incremento de la COX-2 tumoral tras la activación por ICAM-1 in vivo. Para ello se ha analizado el desarrollo metastásico, el reclutamiento intratumoral de HSCs y KCs y la acumulación de colágeno fibrilar. En concordancia con los observado en los ensayos in vitro, la pre-activación de las células de CCR con ICAM-1 ha incrementado la capacidad pro-tumoral de las células de CCR y la respuesta desmoplásica, junto con un aumento en el reclutamiento de HSCs y KCs. Confirmando los resultados in vitro, la inhibición de la COX-2 del huésped a través del tratamiento CLX ha revertido el incremento mediado por el pre-tratamiento con ICAM-1, reduciendo así la metástasis de CCR y la formación de un TME fibrótico y pro-tumoral.

Por último, se han realizado ensayos in vivo para estudiar la función del MR, cuya expresión aumenta tras la interacción de la ICAM-1 endotelial y la LFA-1 tumoral y es, en parte, dependiente de la COX-2. Los resultados han revelado que el proceso metastásico es dependiente del MR, al observar una reducción significativa en la capacidad metastática del CCR acompañado por

una reducción del reclutamiento de HSCs y KCs y una menor acumulación de colágeno fibrilar.

En conjunto, estos resultados resaltan la importancia de la ICAM-1, la COX-2 y el MR en el desarrollo tumoral hepático, modulando la formación de la respuesta tumoral y estromal mediada por las células tumorales CCR y las poblaciones hepáticas, HSCs y KCs. Por todo ello, la interacción ICAM-1, el MR hepático, y la actividad de la COX-2, podrían ser potenciales dianas terapéuticas susceptibles de ser consideradas para el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales.

Introducción

1. Incidencia y clasificación del cáncer colorrectal

La Organización Mundial de la Salud (OMS) califica al cáncer, como la primera o segunda causa de muerte entre la población menor de 70 años, en más de la mitad de los países analizados en su estudio (1). A nivel nacional, según datos recogidos en 2020 por la Asociación Española contra el Cáncer (AECC), el cáncer colorrectal (CCR) es el tumor más frecuente en la sociedad española con un total de 82 nuevos casos y 33 fallecidos por cada 100.000 habitantes al año. Según estos mismos datos, solo en el País Vasco durante el 2020 se han detectado más de 2.000 nuevos casos de CCR, con una media de 93 casos nuevos y 36 fallecidos por cada 100.000 habitantes.

Englobados dentro del CCR, se pueden establecer cuatro subtipos, a nivel clínico, en función de su origen y de su desarrollo patológico:

1- Los **tumores carcinoides**, también conocidos como tumores neuroendocrinos. Se generan en células dentro del sistema neuroendocrino, son de crecimiento lento y tienen tres principales áreas de origen: el intestino anterior, el medio y el posterior. Dentro de estas áreas, los principales órganos de incidencia son el apéndice, el recto, el íleon, pulmones, bronquios y estómago (2).

2- **Tumor del estroma gastrointestinal** es un tipo de sarcoma de tejido blando esporádico. En un alto porcentaje los tumores vasculares infiltran la cavidad abdominal y principalmente se producen en el estómago o en el intestino delgado y de forma poco común, en el colon (3).

3- **Linfoma asociado a mucosas (MALT, del inglés mucosa associated lymphoid tissue)** es el tercer tipo más común de linfoma de las células B no Hodking y primordialmente se produce en la zona gastrointestinal. Además, su desarrollo en zonas de colon y recto es poco común (4).

4- **Adenocarcinoma** es el tipo de cáncer de colon más común, producido por células epiteliales que recubren la cavidad interior del colon. Su pronóstico es de baja supervivencia ya que en menos del 25% de los casos es operable (5), con una tasa de recurrencia entre el 30%-50% (6). Además, su diseminación a otros órganos complica notablemente su pronóstico. De hecho, un porcentaje superior al 70% de las muertes están causada por metástasis en hígado (7,8). El origen del adenocarcinoma puede ser hereditario, con una incidencia del 30% sobre el total de casos o de origen esporádico, que representan el 70% del total. En este último grupo, se han encontrado tres tipos de mecanismos que conducen al desarrollo del tumor, por inestabilidad cromosómica (CIN, del inglés chromosomal instability), por inestabilidad de microsatélites (MSI, del inglés microsatellite instability) y por la firma de metilación de las islas CpG (CIM, del inglés CpG island methylation). A través de estos mecanismos, se producen cambios en el ADN que afectan a importantes vías de activación, como la vía de señalización de Wnt, la de las proteínas quinasas de activación mitogénica/ fosfoinositol-3-quinasa (MAPK/PI3K, del inglés mitogen-activated protein kinases/ phosphatidylinositol 3-kinase), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β del inglés transforming growth factor) o cambios en el gen TP53 que codifica la proteína tumoral 53 (P53) (9).

El hígado constituye un órgano preferente para la formación de metástasis, en múltiples tipos de tumores, debido no solo a su estructura única, sino también a su constante estado de inmunosupresión, necesario para sus diversas funciones como la biosíntesis de proteínas y la desintoxicación de la sangre portal (10). Además, existen otros factores que lo hacen susceptible a la metástasis, como la gran irrigación por medio de sus dos fuentes de sangre, 80% de sangre desoxigenada a través de la vena porta y el 20% restante de sangre oxigenada por la arteria hepática (11). Otro de los factores es la gran ramificación de los vasos portales hacia los sinusoides hepáticos. En este punto, la microcirculación se ralentiza y favorece la retención mecánica, así como una adhesión más firme de las células tumorales circulantes. Por último, la anatomía de la vasculatura hepática fenestrada favorece la extravasación de las células tumorales (12).

Entre los pacientes que sufren CCR, el 15 al 25% han desarrollado metástasis hepática cuando se les realiza el primer diagnóstico y aproximadamente el 50% la desarrollan en algún momento durante el avance de la enfermedad (13,14). Aunque en las últimas décadas el tratamiento ha mejorado sustancialmente, a día de hoy, la resección quirúrgica del hígado es el único tratamiento que ofrece un mayor tiempo de supervivencia frente a la metástasis hepática. Sin embargo, solo una minoría de los pacientes son aptos para dicha cirugía (15). Además, no todos los pacientes sometidos a la cirugía obtienen un mayor tiempo de supervivencia, ya que en el 30% de los casos se vuelve a generar metástasis y en un 15% de los casos, el paciente fallece en menos de un año después de la operación (14).

Todos estos datos indican una necesidad en la mejora de los tratamientos para hacer frente a la metástasis hepática por CCR. Por todo ello, numerosos estudios se han centrado en el análisis a nivel molecular y celular del desa-

rrollo de la metástasis hepática, con la finalidad de hallar posibles tratamientos que disminuyan o ralenticen dicho proceso. Desde hace unos años, se ha comenzado a investigar tanto el papel de las células tumorales como el de las células residentes del hígado, dada su implicación en el avance de la enfermedad.

Sobre esta línea de investigación se ha trabajado en esta tesis, en el estudio de los cambios producidos en la fisiología de las células residentes en el hígado y cómo influyen en el proceso metastásico. Además, se ha estudiado la importancia de los cambios en la expresión de diferentes moléculas durante esta patología con el fin de obtener posibles dianas terapéuticas que ayuden a la mejora de los tratamientos existentes.

En base a lo redactado anteriormente y como paso previo a la explicación del desarrollo metastásico en el hígado, es necesario incidir en ciertos aspectos a tener en cuenta sobre la morfología y la fisiología de este órgano.

2. El hígado

2.1 Morfología

El hígado está situado en la parte superior derecha de la cavidad abdominal, por debajo del diafragma, recubierto de una cápsula de tejido de colágeno y fibras elásticas (cápsula de Glisson). A nivel celular, está compuesto principalmente por hepatocitos, células con estructura poliédrica que conforman aproximadamente el 80% del total de las células hepáticas. Estas

células forman estructuras poligonales denominadas lobulillos hepáticos, los cuales constituyen las unidades básicas de funcionamiento del órgano (16).

Estas unidades están delineadas por tejido conectivo y en cada ángulo de dicha estructura se encuentra la denominada, triada portal, compuesta por una rama de la vena porta, otra de la arteria hepática y un conducto biliar interlobulillar. La sangre ingresa en el hígado a través de la vena porta y de la arteria hepática llegando a la periferia de los lobulillos hepáticos. Desde ahí entra en los sinusoides y se dirige hacia la vena centrolobulillar. Posteriormente esta vena drena en las venas hepáticas, las cuales desembocan en la vena cava inferior (17).

Además de los hepatocitos, existe otro gran grupo de células presentes en el hígado, denominadas células no parenquimales (NPCs, del inglés non-parenchymal cells), que componen aproximadamente el 20% restante de células hepáticas y son imprescindibles para las diversas funciones fisiológicas:

- **Células endoteliales del sinusoide hepático** (LSECs, del inglés liver sinusoidal endothelial cells), son uno de los tipos celulares presentes en los sinusoides hepáticos y conforman aproximadamente el 50% de las NPCs del hígado (18). Los sinusoides hepáticos son estructuras únicas en todo el cuerpo ya que su endotelio no posee lámina basal y las fenestras proporcionan canales abiertos entre la sangre sinusoidal y el espacio de Disse (19). Además, otra de las principales características de estas células endoteliales es el alto contenido de vesículas y lisosomas que indican una gran actividad endocítica y una alta implicación en el sistema inmune del hígado (20).

- **Células estrelladas hepáticas** (HSCs del inglés, hepatic stellate cells), también denominadas células perisinusoidales o células ITO, están localiza-

das en el espacio de Disse entre las LSECs y los hepatocitos (21). Representan menos del 1% del total de las NPCs del hígado (18). Son de origen mesenquimal y en condiciones fisiológicas participan en el almacenamiento y liberación de retinoides y lípidos, en la producción y la remodelación de la ECM y en la regulación del flujo sanguíneo hacia los sinusoides. En este estado basal, las células se encuentran quiescentes (22).

- **Células de Kupffer** (KCs del inglés kupffer cells), son macrófagos hepáticos localizados en el interior del sinusoides hepático y constituyen aproximadamente el 20% de las NPCs del hígado (18). Estas células forman la primera línea de defensa frente a partículas citotóxicas provenientes del tracto gastrointestinal (23). Además, las KCs juegan un papel importante tanto en procesos anti-inflamatorios como pro-inflamatorios y poseen una alta capacidad fagocítica de partículas y de diferentes tipos celulares (24).

- **Linfocitos**, células del sistema inmune localizadas tanto en el parénquima como en los sinusoides. Conforman el 25% restante de las células NPCs, tanto de las sub-poblaciones del sistema inmune innato, como las células asesinas naturales (NK, del inglés natural killer), como del sistema inmune adquirido, entre los que se encuentran, los linfocitos T y B. Todas estas subpoblaciones celulares, junto con otras NPCs son responsables de la respuesta inmune del hígado tanto a factores endógenos como exógenos (18).

2.2. Función

El hígado es el órgano encargado de diversas funciones para el correcto funcionamiento del organismo y tiene la capacidad de comportarse tanto

cómo un órgano exocrino cómo endocrino, según sea necesario. En relación a sus capacidades exocrinas los hepatocitos son los responsables de:

- a) Secretar bilis al conducto biliar de manera regulada por el sistema endocrino.
- b) Secretar bilirrubina, un componente tóxico formado a partir de eritrocitos.
- c) Recoger los anticuerpos producidos por las células de la lámina intestinal y conducirlos a través de los canales biliares hacia la luz del intestino donde controlan la flora bacteriana intestinal (25).

Por otro lado, los hepatocitos son capaces de llevar a cabo funciones típicamente endocrinas como:

- a) Sintetizar proteínas de la sangre como la albúmina y factores de coagulación sanguínea (protrombina y fibrinógeno).
- b) Almacenar grasas y carbohidratos, como la glucosa que por glucogénesis se convierte en glucógeno. Este glucógeno se convertirá nuevamente en glucosa mediante la glucogenolisis, cuando sea necesario.
- c) Eliminar de la sangre medicamentos y sustancias nocivas a medida que se filtra a través de los sinusoides hepáticos.
- d) Durante la etapa fetal, el hígado es el centro de hematopoyesis o producción de células sanguíneas (17).

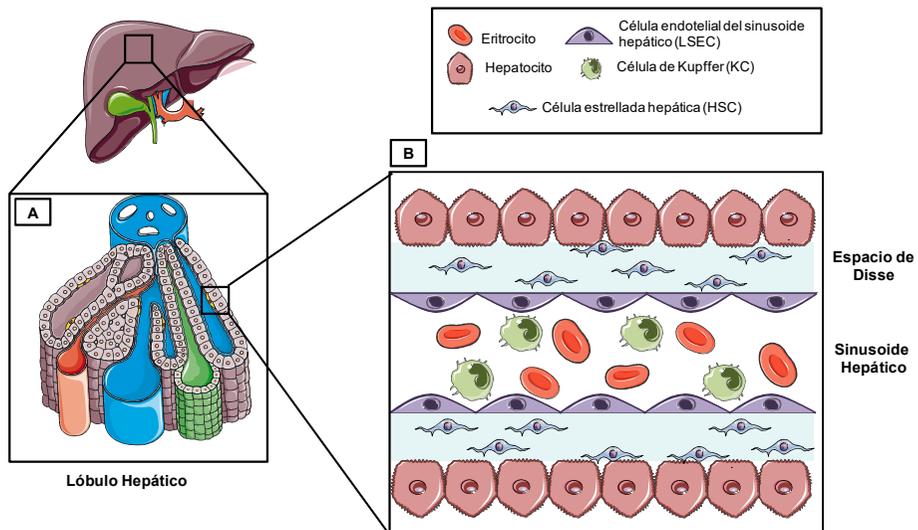


Figura 1. Morfología y estructura hepática. (A) Morfología del lóbulo hepático, formado por filas de hepatocitos (morado). En rojo la arteria hepática, en azul la vena centro lobulillar en la parte superior y la vena porta en la inferior y en verde el conducto biliar. (B) Composición celular del sinusoides hepáticos, conformado por LSECs, HSCs y KCs (26).

3. Desarrollo tumoral hepático

Como se ha indicado anteriormente, el adenocarcinoma de colon es un tipo de cáncer originado por la malignización de las células epiteliales en el colon y tiene como principal órgano metastásico el hígado. La metástasis, se define como un proceso de diseminación de células tumorales por todo el organismo, a través de los vasos sanguíneos y linfáticos (22).

Según la teoría de “la semilla y el suelo” desarrollada por Paget, S en 1989, la metástasis es un proceso complejo, selectivo y secuencial en el cual las células tumorales con capacidad metastásica (semillas) han de llegar a los órganos específicos, con un microambiente tumoral concreto que facilite el desarrollo metastásico (suelo) (27)

Este proceso puede dividirse en 5 fases: primero la **invasión** del órgano primario hasta llegar al sistema circulatorio o linfático. Después, la **intravasación** al torrente sanguíneo o linfático y su posterior **circulación** por él. Una vez llegado al órgano diana o secundario, las células tumorales han de **extra-vasarse** y **colonizar** dicho órgano (28).

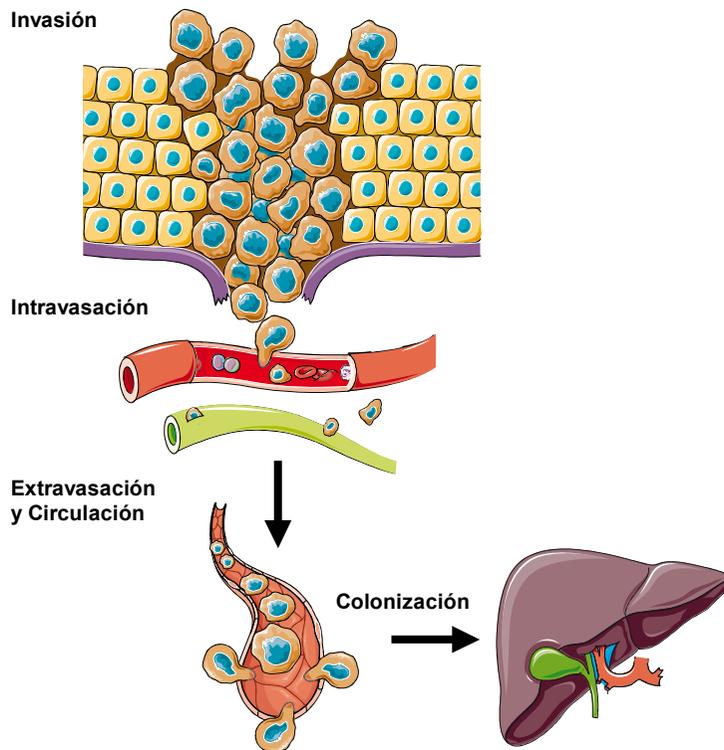


Figura 2. Fases de la cascada metastásica. Las 5 fases en las que se divide el proceso metastásico: invasión, intravasación, extravasación, circulación y colonización (29).

3.1. Formación del tumor primario e invasión

Uno de los primeros pasos para conferir capacidad metastásica a las células tumorales es la reprogramación celular de las células epiteliales hacia un

fenotipo mesenquimal, conocido como transición epitelio-mesénquima (EMT, del inglés epithelial-mesenchymal transition) (30). Esta transición consiste, entre otras características, en la pérdida de funciones fenotípicas de las células epiteliales, como la polaridad apical-basal, las uniones célula-célula y la adherencia a la membrana basal. Mientras que a su vez, se adquieren características adscritas a células de origen mesenquimal, como la migración e invasión (31).

El proceso EMT está inicialmente impulsado por varias vías de señalización, con interacciones entre ellas, que confieren una mayor capacidad invasora y migratoria a las células tumorales (32). Entre estas vías se encuentran: la vía del TGF- β (33), la vía de la subunidad α del factor 1 inducible por hipoxia (HIF1 α , del inglés hypoxia inducible factor 1 α) (34) y las vías de señalización Wnt y Notch (35). Además, la presencia de citoquinas como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α , del inglés tumor necrosis factor) (36) o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF del inglés, platelet-derived growth factor) (37) también favorece la transición epitelio-mesénquima. Todas estas vías se centran, entre otros procesos, en suprimir de forma directa o indirecta la transcripción de E-cadherina (molécula esencial de las uniones adherentes en la estabilidad célula-célula), junto con la activación de moléculas relacionadas con fenotipos mesenquimales, como son la vimentina y la N-cadherina (34,38). La sobreexpresión de vimentina y N-cadherina produce un reordenamiento del citoesqueleto, aumentando la producción de fibras de estrés, y favoreciendo la formación filopodios y lamelipodios que facilitan la motilidad de las células cancerosas (39).

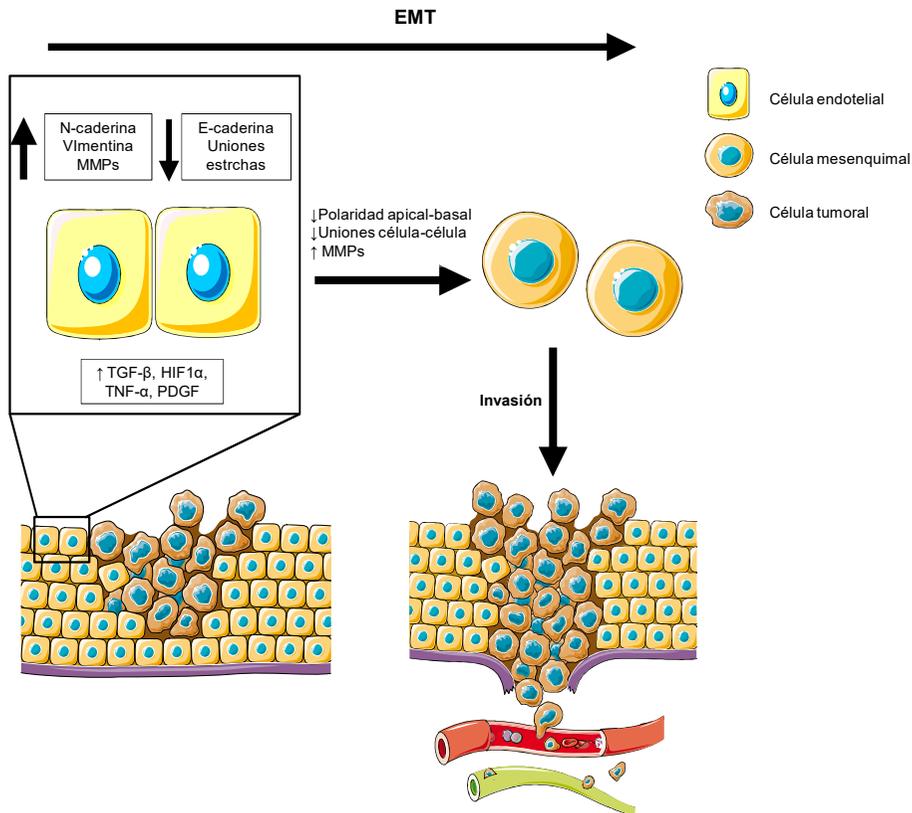


Figura 3. Mecanismo de transición endotelio-mesénquima (EMT). Esquema del proceso EMT de las células endoteliales. La activación de vías de señalización modulada por el aumento de expresión de factores como TGF-β, HIF1α, TNF-α y PDGF generan un aumento de N-caderina, vimentina y MMPs, así como una disminución de E-cadherina y de las uniones estrechas, que promueven la disminución de la polaridad apical-basal, las uniones entre células y un aumento de MMPs. Estos cambios facilitan la transición EMT y con ella la invasión del tejido primario por parte de estas células junto con las tumorales.

Durante el proceso EMT, las células tumorales también han activado factores de transcripción como Snail y SIP 1 que van a estimular la expresión de las metaloproteasas de matriz (MMPs, del inglés matrix metalloproteinases), unas enzimas con función endopeptidasa (40). Dichas moléculas son las principales encargadas de la degradación de diferentes componentes de la matriz extracelular (ECM, del inglés extracellular matrix), entre los que se encuentra el colágeno o la gelatina (41). Esta degradación de la ECM es neces-

ria para el proceso de invasión del tejido primario y así llegar a los vasos sanguíneos o los canales linfáticos para la intravasación (42).

3.2. Intravasación y circulación de las células tumorales

La segunda fase en la cascada metastásica es la intravasación, el proceso por el cual, las células tumorales entran en el torrente sanguíneo o linfático para su diseminación (43). Durante el EMT, las células pierden la capacidad de adhesión celular y en condiciones fisiológicas se activaría un proceso de muerte celular programado, denominado anoikis (44). Sin embargo, las células tumorales son capaces de evadir este proceso a través de un aumento en la producción de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 y una disminución de la expresión de proteínas pro-apoptóticas, como p21 (45).

Las células tumorales de CCR se intravasan tanto por un mecanismo activo como pasivo (46,47). Uno de los mecanismos de intravasación activo consiste en un incremento en la vía de señalización del factor transcripcional Notch, que genera un aumento de la capacidad de intravasación tumoral (48). Por otro lado, el mecanismo pasivo puede estar producido por la fragilidad de los vasos sanguíneo y la pérdida de uniones célula-célula y célula-matriz (49).

En lo que respecta a la propagación a través de los vasos linfáticos, las células tumorales llegan a los órganos distales, evitando el sistema inmune presente en la circulación sanguínea. Para facilitar la entrada de las células tumorales al sistema linfático, el diámetro de los vasos linfáticos aumenta alrededor del tumor. Además se activa un proceso de linfangiogénesis, es

decir, de formación de nuevos vasos linfáticos para facilitar la diseminación de las células tumorales hacia el hígado (50).

Por otro lado, en el torrente sanguíneo las células tumorales han de sobrevivir al sistema inmune, fuerzas hemodinámicas y colisiones con células dentro del vaso como eritrocitos o células endoteliales (51). Para ello, se rodean de plaquetas, que además van a favorecer su posterior extravasación en el hígado (52). Otro de los mecanismos de defensa de las células tumorales es la activación de la expresión del factor tisular (TF, del inglés tissue factor), que se une a factores de coagulación favoreciendo la coagulación sanguínea. Además, se estimula la expresión del receptor activado por proteasa 2 (PAR-2), que es capaz de controlar la respuesta inmune y anti-apoptótica (39).

3.3. Extravasación de las células tumorales al parénquima hepático

Una vez las células tumorales llegan al hígado, tras sobrevivir al ataque del sistema inmune y a las fuerzas mecánicas a las que son sometidas durante la circulación, es el momento de la diapédesis, es decir, la salida de las células de los vasos sanguíneos a través del endotelio vascular(52).

En los sinusoides hepáticos, debido a su reducido diámetro, la velocidad del flujo se ve disminuida. Al reducirse la velocidad se favorece la colonización del hígado ya que las células tumorales quedan atrapadas en los sinusoides y aumenta el tiempo de interacción entre las células tumorales y las LSECs (53). Además, esta retención de las células tumorales y el bloqueo de los sinusoides genera una respuesta inflamatoria por parte del hígado, que

desencadena tanto la activación de factores pro-tumorales como anti-tumorales (54).

Por un lado, el ambiente inflamatorio provoca la **respuesta anti-tumoral** por parte de las KCs presentes en los sinusoides. Además, tanto las LSECs que producen interferon γ (IFN- γ del inglés interferon gamma), especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés reactive oxygen species) y óxido nítrico (NO, del inglés nitric oxide) como las KCs que producen TNF- α , activan las vías apoptóticas de las células tumorales (55). Asimismo, las KCs en respuesta a este ambiente pro-inflamatorio, incrementan la producción de citoquinas y quimioquinas, capaces de activar a las NK y a los neutrófilos, atacando al tumor (56). Por ello, durante este proceso, las células tumorales secretan proteína de alta movilidad del grupo 1 (HMGB1, del inglés high-mobility group protein 1), que desencadena la apoptosis de macrófagos y monocitos, facilitando la evasión al sistema inmune (57).

Por otro lado, este ambiente inflamatorio favorece la **respuesta pro-tumoral**. La expresión de interleucinas como IL-6, IL-1, TNF- α , y la de factores de crecimiento como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, del inglés vascular endothelial growth factor) (58), junto con la retención de las células en el sinusoides, favorece la adhesión tumoral al endotelio hepático vascular y la migración transendotelial (11).

Numerosos estudios han demostrado que la extravasación de las células tumorales de CCR en el hígado sigue el mismo patrón que la adhesión de los leucocitos frente a una respuesta inflamatoria, a través de una serie de interacciones secuenciales receptor-ligando (59). Primero los leucocitos ruedan a través de uniones débiles, como selectinas, por el endotelio. Este proceso ralentiza el movimiento, permitiendo uniones más fuertes generadas

por las moléculas de adhesión (CAMs, del inglés celular adhesion molecules) (60). Este modelo se ha visto respaldado por un aumento de expresión de E-selectina durante los procesos inflamatorios, que favorece la retención y primera adhesión de los leucocitos al endotelio (61).

De igual manera, en la metástasis hepática, las LSECs aumentan la expresión de E-selectina, en respuesta al ambiente inflamatorio, mediando la unión a sus ligandos correspondientes de las células tumorales. Este proceso desencadena la expresión de las CAMs, específicamente de adhesión intercelular (ICAM-1, del inglés intercelular adhesion molecule 1) y vascular (VCAM-1, del inglés vascular cell adhesion molecule 1) por parte del endotelio, para estabilizar la adhesión durante el proceso de trans migración endotelial (39, 40). Estas uniones, tanto las débiles como las fuertes, van a favorecer la extravasación tumoral que generalmente se produce entre dos células endoteliales, con una rotura previa de sus uniones intercelulares (65). Sin embargo, en el hígado, la extravasación se produce también entre las fenestras generadas por la morfología de las LSECs, lo que facilita la invasión tumoral (66).

3.3.1. Importancia de la ICAM-1 en la adhesión tumoral

Como se ha explicado anteriormente, las CAMs median la adhesión receptor-ligando de las células tumorales de CCR en el hígado. Entre estas moléculas, la ICAM-1 juega un papel clave en este proceso. La ICAM-1 es una glicoproteína transmembrana perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas (67), con cinco dominios Ig extracelulares glicosilados, un dominio transmembrana y un dominio citosólico corto con dos residuos de tirosina (68). Se expresa a bajos niveles de forma constitutiva en células inmunes,

endoteliales y epiteliales (69) y su expresión se ve incrementada en presencia de moléculas pro-inflamatorias, como la IL-1, TNF- α , IFN- γ , y por lipopolisacáridos (LPS) (70,71).

En condiciones fisiológicas, la ICAM-1 participa en diversos procesos inmunes, como la infiltración de leucocitos, tras la interacción con el antígeno 1 asociado a la función linfocitaria (LFA-1, del inglés Lymphocyte function-associated antigen 1, también conocido como α L β 2 o CD11a/CD18) presente en dichos leucocitos (72). Esta integrina está compuesta por dos subunidades, una cadena α L y una β ₂, unidas de manera no covalente (73). Posee un largo dominio extracelular, un dominio transmembrana y un pequeño dominio citoplasmático. Entre sus múltiples funciones, las integrinas son capaces de generar una señalización bidireccional, tanto del interior de la célula hacia fuera como del exterior celular hacia dentro (74). Además, tienen un papel clave en la respuesta inmune a través de la migración y adhesión leucocitaria (75)

Una vez se produce esta interacción, se aumentan los niveles de calcio intercelular y se activan diferentes vías de señalización que favorecen la remodelación del citoesqueleto, alterando la capacidad contráctil de las células endoteliales y favoreciendo la diapédesis de los leucocitos (76). Además, la ICAM-1 actúa también como una molécula activadora de vías de transducción de señales, por medio de la activación de las vías de las quinasas reguladoras de la señalización extracelular (ERK1 y ERK2, del inglés extracellular signal-regulated kinases), estimulando la producción del factor de transcripción AP-1 que activa la expresión de factores de crecimiento, citoquinas y receptores de superficie, lo que desencadena un aumento en la expresión de ICAM-1 y el mantenimiento del microambiente inflamatorio (77).

Sin embargo, esta interacción no solo se produce entre células endoteliales y leucocitos. Estudios previos en nuestro grupo han descrito que la interacción ICAM-1/LFA-1 se produce entre las LSECs que expresan la molécula de adhesión y las células tumorales de CCR, C26, que expresan la integrina LFA-1. Esta interacción entre el tumor y el endotelio hepático favorece la infiltración de las células tumorales al hígado (78) y la generación de un microambiente pro-inflamatorio y pro-metastásico. Para ello, se incrementan factores como IL-1 β , TNF- α , interleucina 18 (IL-18), INF- γ y ciclooxigenasa 2 (COX-2), que desencadenan una red de retroalimentación positiva, manteniendo el estado inflamatorio (78–80).

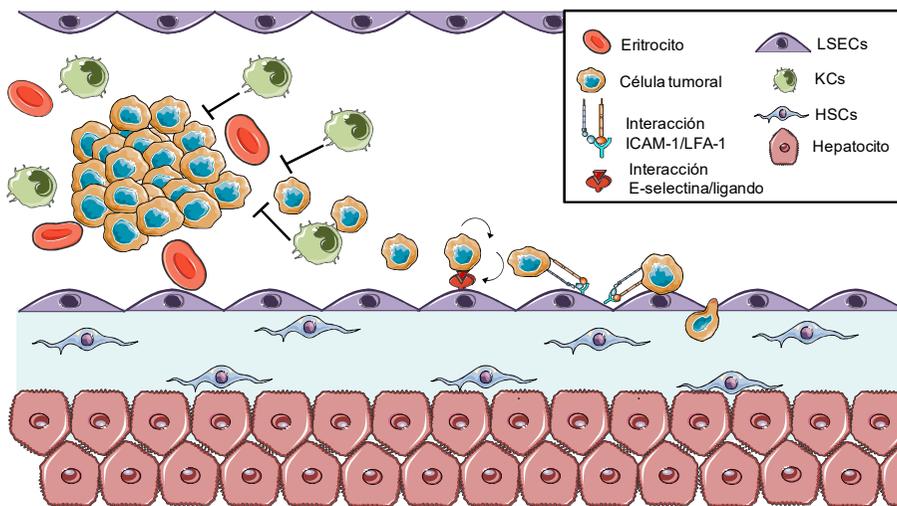


Figura 4. Proceso de la trans migración tumoral hepática. Las células tumorales llegan al sinusoide hepático, donde son eliminadas por las KCs. Sin embargo, la formación de un microambiente pro-inflamatorio genera cambios en las KCs que van a facilitar la evasión inmune de las células tumorales. Por último, estas células tumorales ruedan a través del endotelio, primero con uniones E-selectina/ligando y posteriormente con uniones más fuertes entre ICAM-1/LFA-1, lo que facilita la trans migración de las células tumorales al interior hepático.

3.4. Formación del microambiente tumoral hepático

Los tumores sólidos están formados tanto por componentes celulares como componentes acelulares, conformando un microambiente específico, denominado microambiente tumoral (TME, del inglés tumor microenvironment) (81). Este TME se ha ido componiendo, promovido por las células tumorales del tumor primario, como paso previo a la colonización del órgano secundario, para facilitar el posterior desarrollo tumoral (82). A través de la generación de señales y liberación de factores que modifican el parénquima del hígado, se ha generado un nicho más permisivo para el desarrollo metastásico (83).

Además, una vez que las células tumorales se infiltran en el hígado, promueven el reclutamiento y la activación de otros tipos celulares necesarios para completar la formación del TME hepático. Entre estos tipos celulares se encuentran células estromales, entre ellas células endoteliales, pericitos y fibroblastos (84). Otros tipos celulares que lo componen son los derivados de la médula ósea, incluyendo monocitos, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, células mieloides supresoras y células madre mesenquimales (85). Junto con este reclutamiento celular, las células tumorales activan la expresión de componentes extracelulares como son las citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, componentes de la ECM, hormonas y otras vesículas extracelulares (86,87). Tanto la interacción entre los componentes extracelulares con las células, como las interacciones célula a célula van a facilitar el desarrollo metastásico hepático (88).

Dentro del TME hepático, las HSCs y los fibroblastos reclutados junto con las KCs y monocitos reclutados y diferenciados en macrófagos, constituyen los principales tipos celulares no tumorales presentes en el TME. (89).

3.4.1. El papel de los fibroblastos en el TME

Dentro del TME, tanto la composición celular como acelular, genera que las HSCs y los fibroblastos reclutados, se activen y modifiquen su fenotipo constituyendo lo que se denominan fibroblastos asociados al cáncer (CAFs, del inglés cancer-associated fibroblasts) (90).

Según Heneberg, la activación se produce en una secuencia de tres pasos: (1) reclutamiento de los fibroblastos, (2) transformación de células normales a CAFs y (3) mantenimiento del fenotipo CAF en el TME (91). Los CAFs, conforman un grupo heterogéneo caracterizado principalmente por la expresión de vimentina, proteínas activadoras de fibroblastos (FAP, del inglés fibroblast activation protein) y α -actina de músculo liso (α -SMA, del inglés α -smooth muscle actin) (92).

Los CAFs tienen la capacidad de dar soporte a la progresión tumoral promoviendo el crecimiento y la supervivencia tumoral, la angiogénesis, la inflamación, la resistencia a fármacos y la invasión y metástasis tumoral (93). Para ello, estos fibroblastos, entre otros muchos cambios, aumentan la liberación paracrina de moléculas de señalización, como TGF- β y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, del inglés hepatocyte growth factor) que promueven la activación de la vía EMT en las células tumorales en el TME (91). Otra modificación clave es la remodelación de la ECM, uno de los principales procesos mediados por la acción de los CAFs. Se produce un aumento en la secreción de colágeno tipo I y II fibronectina (94) y de tenascina C (95), provocando una alteración en la composición de la ECM. Además, están implicados en la degradación de la ECM por medio de la secreción de MMPs, como MMP-1 (96), MMP-2 y MMP-9 (97).

Los CAFs también participan en el control de la respuesta inflamatoria y pro-tumoral a través de la secreción de diversas moléculas pro-inflamatorias, como PGE₂, factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés epidermal growth factor) o VEGF (98); quimioquinas, como el factor 1 derivado de células estromales (SDF-1 o CXCL-12, del inglés stromal cell-derived factor 1) (99) e interleucinas, como la IL-1 (100).

Por último, la implicación de los CAFs en procesos migratorios se produce a través de la reorganización de las fibras de fibronectina. Brevemente, el receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR α , del inglés platelet derived growth factor) está sobre-expresado en los CAFs y está involucrado en el alineamiento y reorganización de las fibras de fibronectina. La unión entre la integrina $\alpha 5\beta 1$ y la fibronectina activa, tras una fosforilación, a la quinasa de adhesión local (FAK, del inglés focal adhesion kinase) que activa a Src. Ambas vías, estimulan a su vez Akt, ERK1/2 y PI3K involucradas en la migración celular. Además la vía ERK1/2 induce la expresión de MMP-9, en la degradación de la ECM (101).

En concreto en el hígado, durante la formación del TME, las células tumorales junto con LSECs y KCs, interaccionan con las HSCs para fomentar su reclutamiento (102). Para ello, las células tumorales secretan factores con actividad paracrina como: PDGF, TGF- β , EGF y el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2, del inglés fibroblast growth factor 2). También, se producen cambios en la composición de la ECM capaces de promover el reclutamiento de fibroblastos (100).

Una vez reclutados en el TME, las HSCs se activan por diferentes vías, a través de la comunicación directa célula a célula o tras la interacción con

leucocitos a través de ICAM-1 o VCAM-1, como consecuencia de una sobreproducción de ROS (103).

Estudios previos en nuestro grupo han descrito que las HSCs están presentes en este TME antes del reclutamiento de las células endoteliales (104). Además, la migración de las HSCs esta modulada en gran medida por la interacción entre la ICAM-1/LFA-1, ya que tras su bloqueo, se observó disminución del porcentaje de α -SMA dentro del tumor (78,105).

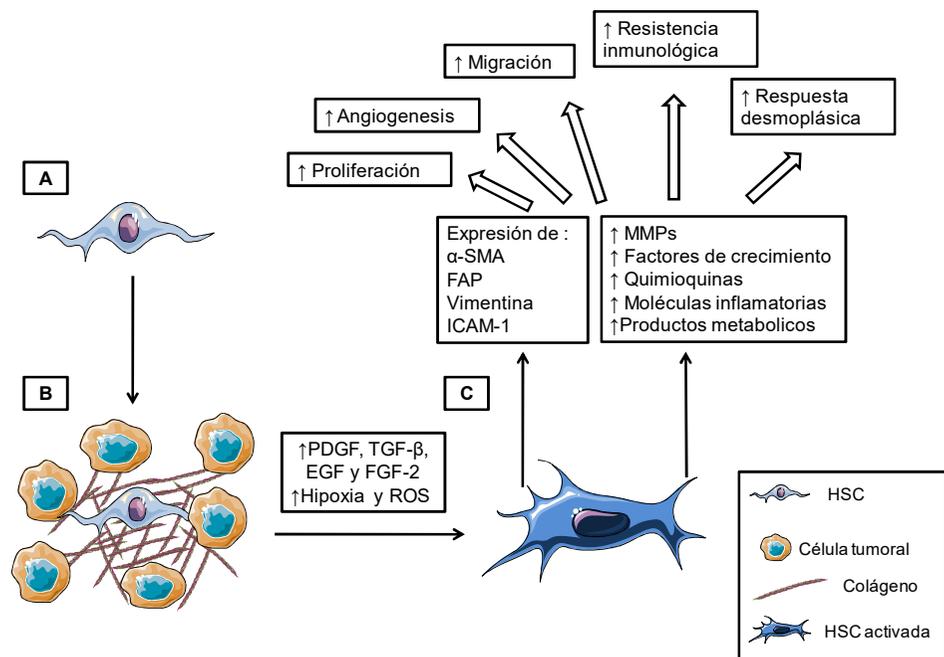


Figura 5. Proceso de activación de HSCs. (A) HSC quiescente sin contacto tumoral. (B) HSC en contacto con las células tumorales y como consecuencia, aumento de la expresión de PDGF, TGF- β , EGF y FGF-2 que junto con la producción de ROS y el estado de hipoxia, que desencadena la activación de las HSCs. (C) Las HSCs activadas facilitan el desarrollo tumoral promoviendo la proliferación, angiogénesis, migración, resistencia inmunológica y respuesta desmoplásica a través de la expresión de MMPs, factores de crecimiento, quimioquinas, moléculas inflamatorias y productos metabólicos.

3.4.2. El papel de los macrófagos en el TME

Dentro del TME, los macrófagos son la población inmune más abundante y durante el desarrollo metastásico tienen un papel dual (106). A medida que se está generando el TME, las células que lo componen activan a través de señales, el reclutamiento de macrófagos y de monocitos. Una vez se han infiltrado, los monocitos y macrófagos pasan a denominarse TAMs (del inglés, tumor associated macrophages) (107). Estos TAMs, son capaces de polarizarse a dos fenotipos diferentes, M1 o M2 dependiendo del microambiente que les rodea (108). Además, esta polarización dota a los macrófagos de una respuesta a estímulos diferente además de una expresión diferencial de citoquinas, quimioquinas, y receptores (106).

La polarización hacia el fenotipo M1 se desencadena en respuesta a señales que se activan en procesos de defensa frente a microorganismos, incluyendo bacterias, virus y protozoos. Además, posee un papel antitumoral al reconocer y eliminar a las células tumorales (109). Por otro lado, la polarización hacia un fenotipo M2 se activa en respuesta a señales que tienden a generar una inmunosupresión ya sea para favorecer la reparación tisular como para la progresión tumoral (110).

Aunque los TAMs puedan exhibir ambos fenotipos de polarización, se considera a los TAMs como macrófagos de tipo M2, debido a que constituyen un componente esencial afectando al crecimiento tumoral, la angiogénesis la regulación inmune, la capacidad metastásica y la quimioresistencia (111). Por todo ello, la acumulación de macrófagos de tipo M2 en el TME se correlaciona con una peor prognosis de la metástasis (107,112).

En el hígado, para que se produzca la infiltración y la polarización de los macrófagos, el TME secreta factores que activan el reclutamiento hacia el tumor tanto de monocitos precursores presentes en la circulación como de KCs residentes en el hígado (113). Entre estos factores se encuentra la proteína quimiotáctica de monocito (CCL2 o MCP-1, del inglés monocyte chemoattractant protein 1). Esta quimioquina, a través de la unión a su receptor específico (CCR2) expresado en la superficie de los macrófagos favorece el reclutamiento y la polarización hacia un fenotipo M2 (114).

Otros dos factores implicados en la polarización de los macrófagos son el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF o CSF-1, del inglés macrophage colony-stimulating factor) y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, del inglés granulocyte-macrophage colony-stimulating factor). Mientras que el aumento de los niveles de M-CSF en el TME induce la polarización hacia tipo M2, el incremento de GM-CSF se correlaciona con la polarización hacia el fenotipo M1 (115).

Además del aumento de CCL2 y de M-CSF en el TME, también se activa la expresión de otros factores que favorecen la polarización hacia macrófagos con fenotipo M2. Entre ellos, las interleucinas IL-1R, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, los factores de crecimiento TGF- β , VEGF y el factor inhibidor de la migración de leucocitos (LIF, del inglés leukocytes inhibitory factor) (110).

Según un estudio de Fu *et al.* en hepatocarcinoma, los TAMs durante la EMT secretan factores solubles como IL-1 β , IL-8, TNF- α y TGF- β que favorecen la transición a un fenotipo mesenquimático (116).

Otra de las funciones de los TAMs es la activación de la angiogénesis, al aumentar la expresión de VEGF y de MMP-9 que remodela la matriz y facilitan la formación *de novo* de vasos sanguíneos (117).

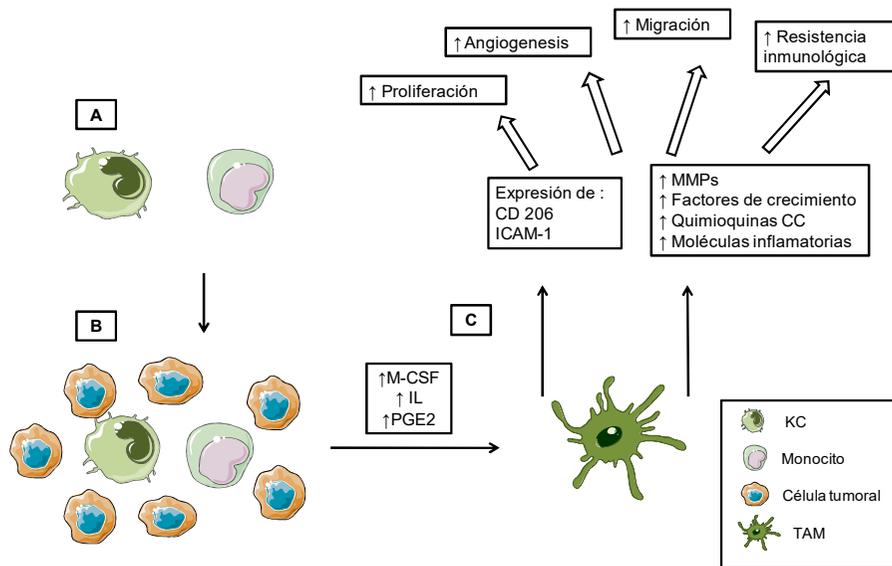


Figura 6. Proceso de activación de KCs y monocitos en TAMs. (A) KCs y monocitos en condiciones fisiológicas. **(B)** KCs y monocitos en contacto con las células tumorales y con ello aumento de la expresión de M-CSF, interleucinas y PGE₂, que genera una polarización hacia macrófago M2/TAM. **(C)** Estos TAMs a su vez facilitan el desarrollo tumoral promoviendo la proliferación, angiogénesis, migración y resistencia inmunológica a través de la expresión de MMPs, factores de crecimiento, quimioquinas y moléculas inflamatorias.

3.5. Remodelación de la matriz extracelular

La síntesis, degradación y remodelación de la ECM es uno de los procesos clave para facilitar la proliferación e invasión de células tumorales y la formación de nuevos vasos sanguíneos durante el desarrollo tumoral (118). Para ello, el TME, juega un papel clave en dicha remodelación, al generar CAFs y TAMs, los cuales son las principales células no tumorales implicadas en este proceso.

3.5.1. Desmoplasia

En condiciones fisiológicas, la ECM se encuentra en un constante proceso de remodelación. Durante este proceso de remodelación, se genera la acumulación de colágeno fibrilar (tipos I, III, IV y V), fibronectina, elastinas, hialuronano y lamininas, que constituyen tanto la ECM como la membrana basal. Simultáneamente, los fibroblastos aumentan la degradación de la ECM, a través de MMPs y activadores de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA, de sus siglas en inglés urokinase Plasminogen Activator) para mantener la homeostasis en la remodelación de la ECM (119).

Sin embargo, los CAFs, tienen la capacidad de aumentar la síntesis de la ECM, desregulando el “turnover” de la ECM, produciendo un aumento en la respuesta desmoplásica. Este aumento en la deposición de colágeno fibrilar induce una mayor rigidez de los tejidos y a la formación de un estroma fibrótico, que constituye una barrera física frente al sistema inmune y a un soporte físico para las interacciones celulares (120). Además, contribuye a un aumento del potencial metastásico del tumor, aumentando la proliferación tumoral, induciendo hacia un fenotipo más invasivo e incrementando la quimioresistencia de las células tumorales (121). Durante varios estudios clínicos, se ha observado que el incremento en la infiltración de fibroblastos/miofibroblastos en el TME y la consecuente acumulación de colágeno fibrilar se correlaciona con un peor pronóstico en pacientes con metástasis hepática por CCR (122).

3.5.2. Degradación de la ECM: MMPs

La degradación de la ECM es otro de los procesos clave en el desarrollo tumoral y está generado principalmente por la acción del TME. Esta degradación está mediada por las células tumorales, los CAFs y los TAMs a través de un aumento en la expresión de MMPs (111,123). Las MMPs son endopeptidasas dependientes de Zinc (Zn^{2+}), es decir, en su centro catalítico poseen una molécula de Zn^{2+} (124). La mayoría de las MMPs están constituidas por cuatro dominios, incluyendo, el dominio catalítico, el dominio bisagra, un pro-dominio N-terminal y un dominio C-terminal tipo hemopexina (125). Adicionalmente, las MMPs transmembrana (MT-MMPs) tienen un dominio transmembrana y algunos tipos de MMPs poseen una región de furina entre el pro-dominio y el dominio catalítico, involucrada en la activación de la enzima (126).

De forma general, las MMPs se expresan en forma de zimógeno, con una secuencia rica en cisteínas que, tras su rotura, por otras enzimas proteolíticas, deja libre el centro catalítico de Zn^{2+} , activando a las MMPs. Una vez activadas, su regulación viene condicionada por la acción de los inhibidores tisulares de las metaloproteasas endógenos (TIMPs, del inglés tissue inhibitors of metalloproteinases) que tras su unión bloquean el centro catalítico, impidiendo la actividad de las MMPs (127). La familia de las MMPs está compuesta por 28 miembros, de los cuales 23 están expresados en los tejidos del ser humano. Se clasifican en función del sustrato que degradan y la organización estructural de sus dominios, agrupándose en colagenasas, gelatinasas, estromelisininas, matrilisininas, MT-MMPs y otras MMPs (124).

Entre todos los tipos de MMPs, dentro del desarrollo tumoral, la subfamilia de gelatinasas compuestas por la MMP-2 o gelatinasa A y la MMP-9 o

gelatinasa B tienen una mayor relevancia dentro del desarrollo tumoral, debido a su capacidad de degradar la membrana basal (128). En cuanto a su estructura, poseen en tres repeticiones en tándem de fibronectina tipo II en el extremo N-terminal del dominio catalítico, necesarias para la unión de la gelatina (129).

Estas MMPs están involucradas en diferentes estadios del cáncer, como el crecimiento del tumor primario, la angiogénesis y la migración e invasión de las células tumorales durante el desarrollo tumoral (130). En diferentes tipos de cáncer, entre ellos el CCR, un aumento en la expresión de las gelatinasas está correlacionado con una mayor capacidad invasiva y metastásica (129).

3.6. Angiogénesis

Como se ha indicado anteriormente, para el desarrollo y crecimiento del tumor en el hígado, es necesaria la formación de un nuevo suministro sanguíneo a partir del lecho vascular ya existente. Este proceso se denomina angiogénesis y es generado, principalmente, por las células endoteliales y pericitos en continuo contacto con el tumor junto con la ECM (131). La angiogénesis se divide en diferentes fases: 1) la degradación de la membrana basal por acción de las proteasas, 2) la activación y la migración de las células endoteliales, 3) la proliferación de las células endoteliales y 4) la formación de las estructuras en forma de vasos y capilares (132).

A día de hoy se conocen numerosos factores de crecimiento implicados en la progresión de la angiogénesis tumoral entre los que se encuentra el VEGF. Tanto las proteínas VEGF como sus receptores juegan un papel central en múltiples vías de señalización, como son las implicadas en la migración,

supervivencia, división celular, diferenciación y permeabilidad vascular de las células endoteliales (133).

Esta familia de proteínas está formada por 6 isoformas de VEGF (de la A a la D en vertebrados), el factor de crecimiento placentario (PlGF, del inglés placental growth factor) y por el factor de crecimiento vascular endotelial derivado de la glándula endocrina (EG-VEGF, del inglés endocrine gland derived vascular endothelial growth factor), añadido recientemente a este grupo (134). Todas las isoformas están compuestas por polipéptidos anti-paralelos formando un homodimero con un nudo de cisteína unido por dos puentes disulfuro intermoleculares (135).

Por otro lado, se codifican tres tipos de receptores diferentes para el VEGF (VEGFR del 1 al 3), pertenecientes a la familia de los receptores tirosina quinasa. Están compuestos por un dominio extracelular compuesto por siete dominios de inmunoglobulinas G, un dominio transmembrana y un dominio intracelular tirosina quinasa, el cual en su extremo carboxilo posee una quinasa (136).

El receptor VEGFR-2, se expresa principalmente en células endoteliales que conforman los vasos sanguíneos y linfáticos. Posee una mayor afinidad por el VEGF-A, que es secretado principalmente por células endoteliales, aunque en condiciones de hipoxia, es producido por otros tipos celulares, entre ellos, células tumorales, fibroblastos y macrófagos. Esta interacción entre el VEGF-A y el receptor VEGFR-2, genera una auto-fosforilación en los residuos de tirosina y genera la activación de diferentes rutas que favorecen la proliferación, la supervivencia, la permeabilidad y la migración de las células endoteliales (137). Además de la vía VEGF/VEGFR, existen otras vías de señalización que favorecen la angiogénesis, como la vía PDGF/PDGFR, la vía

FGF/FGFR y la vía angiopoietina 2 (ANG-2)/TIE2. La vía PDGF/PDGFR está implicada en el crecimiento, supervivencia y motilidad de varios tipos celulares. La vía FGF/FGFR se asocia a un aumento en la proliferación y en la migración de las células endoteliales y la vía angiopoietina 2 (ANG-2)/TIE2 favorece la desestabilización vascular generando una vasculatura más resistente a terapias anti-angiogénicas (138).

Dentro del TME, como se ha indicado anteriormente, se genera un estado de hipoxia, y se incrementan los valores de HIF-1 α , lo que facilita su translocación al núcleo y la activación de la transcripción de mediadores proangiogénicos (139). En este estado, las células tumorales incrementan la secreción de PDGF, que va a generar un incremento a su vez de los niveles de VEGF producidos por los CAFs. El aumento de estos dos factores, junto con la activación de ICAM-1, estimula la vía p38/MAPK, que favorece la proliferación y migración de las células endoteliales, así como la migración y la reorganización de las HSCs (67,140). Por otro lado, los TAMs en respuesta al estado de hipoxia y a un aumento en la expresión de TNF- α , IL-6 y NO, mediado por la activación de ICAM-1 en KCs y LSECs, aumentan también la expresión de VEGF (67,141). La situación de hipoxia en el TME aumenta los niveles de COX-2, y por ende, de PGE₂, que estimula la secreción de VEGF por parte de las HSCs (104). Además, en múltiples tipos de cáncer, unos valores elevados de COX-2 se han asociado con un aumento de la angiogénesis (142).

Estudios previos de nuestro grupo han descrito que la interacción ICAM-1/LFA-1 estimula la secreción de VEGF por parte de las células tumorales. A su vez, las HSCs reactivas al tumor aumentan la síntesis de VEGF, lo que favorece la migración de las LSECs *in vitro*, así como la respuesta angiogénica intratumoral *in vivo* (78).

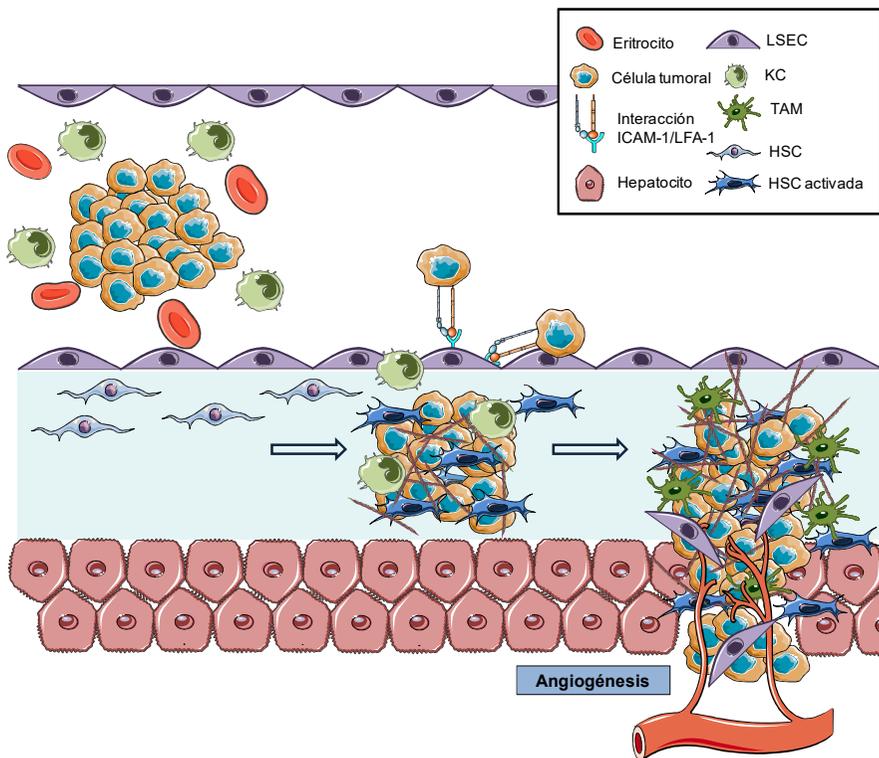


Figura 7. Proceso de infiltración tumoral hepática. Las células tumorales interactúan con las LSECs a través de la interacción ICAM-1/LFA-1. Esta interacción facilita la infiltración tumoral hepática. Una vez en el espacio de Disse, se genera un TME constituido por células tumorales HSCs y KCs activados y componentes acelulares como moléculas pro-inflamatorias y colágeno. Este TME aumenta de tamaño y migra hasta el interior del parénquima hepático. Por último, se forman vasos sanguíneos alrededor del tumor que permitan una mayor colonización del órgano.

4. Papel de la COX-2 en el desarrollo metastásico

Como se ha explicado anteriormente, durante la formación del TME y tras la infiltración de las células tumorales al hígado tras la interacción ICAM-1/LFA-1, se genera un microambiente pro-inflamatorio y pro-metastásico. Entre las diversas moléculas involucradas en este proceso se encuentra la COX-2. Esta enzima, es una de las tres isoformas que conforman la familia de las ciclooxigenasas (COXs), unas enzimas limitantes en la síntesis de prostaglandinas (PGs) (143). Las PGs se forman a partir del ácido araquidónico (AA, del inglés arachidonic acid) extraído de las membranas lipídicas, gracias a la acción de las fosfolipasas. Este ácido se oxida generando un metabolito inestable, PGG₂ que rápidamente se reduce a PGH₂, que va a ser el precursor común de todos los tipos de PGs. La reacción de estos dos metabolitos es catalizada por las COXs (144).

Las tres isoformas se denominan, COX-1, que se expresa en la mayoría de los tejidos y se mantiene a niveles estables, siendo responsable de los niveles basales de prostaglandina E₂ (PGE₂, del inglés prostaglandin E₂) para desarrollar las funciones fisiológicas básicas (145). La COX-2, la cual constituye una forma inducible por diferentes moléculas como citoquinas, factores de crecimiento y promotores tumorales (146). Por último, la COX-3, una isoforma idéntica a la COX-1 pero en su ARN mensajero está presente un intrón más y se encuentra sobre-expresada en el cerebro (147).

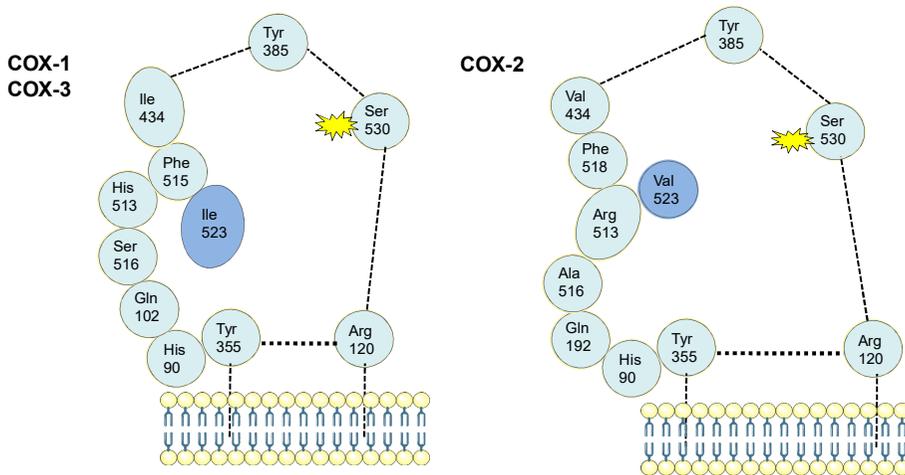


Figura 8. Estructura de las isoformas de la COX. (A) Estructura de la COX-1 y la COX-3. **(B)** Estructura de la COX-2.

La PGE₂ es la prostaglandina más abundante tanto en procesos inflamatorios fisiológicos como el dolor y la fiebre, como en procesos patológicos como en enfermedades autoinmunes, inflamatorias o en cáncer (148). Esta PG se produce a través de la acción de la enzima prostaglandina E sintasa (PGES, del inglés prostaglandin E synthase) y se degrada a través de la enzima 15-hidroxi prostaglandina deshidrogenasa (15-PGDH, del inglés 15-prostaglandin dehydrogenase) (149).

La actividad fisiológica de la PEG₂ está mediada por la activación de señalización en cascadas “downstream” vía unión con receptores prostanoideos E (EP). Estos receptores conforman una familia con cuatro isoformas, de la 1 a la 4 y pertenecen al grupo de los receptores transmembrana acoplados a proteínas G (GPCR, del inglés G-protein coupled receptors). Son capaces de modular los niveles de calcio (Ca²⁺), de adenosin monofosfato cíclico (AMPC) y de inositol fosfato que son mensajeros secundarios para la activación de múltiples vías de señalización (150). Numerosos estudios han observado niveles elevados de COX-2 durante el estado inflamatorio del CCR primario

(151,152) y su correlación con una peor prognosis (153). Estos datos sugieren que dicha enzima participa en la malignización del tumor primario (154). Además según Hull *et al.* en CCR humano se produce un aumento de la expresión de la COX-2 en metástasis hepáticas (155).

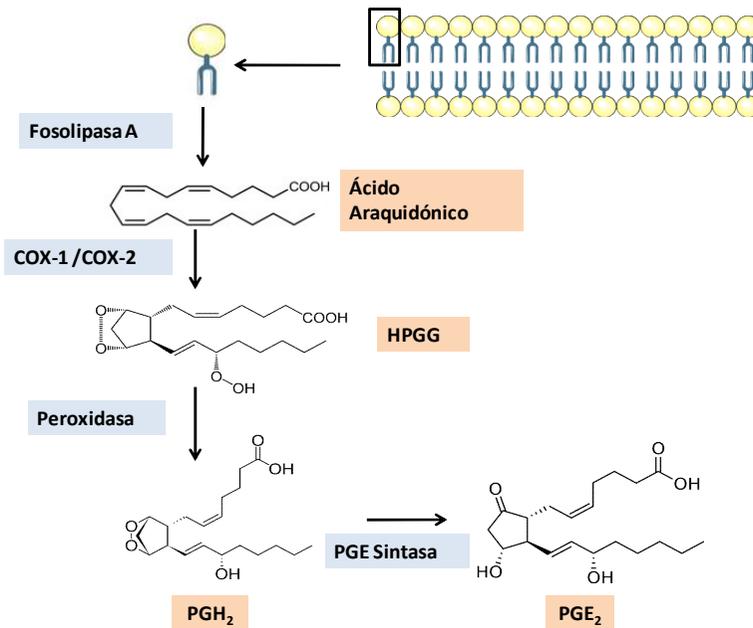


Figura 9. Proceso de síntesis de PGE₂. Por medio de la fosfolipasa A genera ácido AA a partir de las membranas lipídicas. Después, las COXs forman PGG₂, una molécula muy inestable que se reduce rápidamente en PGH₂. Por último, la PGE sintasa forma la PGE₂.

Todos estos estudios ponen en evidencia la importancia de la isoforma COX-2 en el desarrollo tumoral. En condiciones fisiológicas, los niveles endógenos de PGE₂ dependen de la ratio COX-2/PGES y 15-PGDH. Sin embargo, en numerosos tipos de cáncer, entre ellos el CCR, se ha observado que la enzima 15-PGDH se encuentra ubiquitinada, lo que produce una pérdida de su función y un aumento en los niveles de PGE₂ (156). Este aumento induce de forma directa la proliferación, supervivencia, migración e invasión de las células epiteliales junto con su implicación en la generación de un microam-

biente que estimule y favorezca la progresión metástática, por medio de la inhibición del sistema inmune y la inducción de la angiogénesis (157).

Por lo expuesto anteriormente, la inhibición de las enzimas COXs se ha propuesto como tratamiento antitumoral, reduciendo la síntesis de PGs. Para dicha inhibición, se han utilizado los antiinflamatorios no esteroides (NSAID, del inglés nonsteroidal anti-inflammatory drugs). Estos compuestos, impiden la entrada al centro activo de las COXs al AA, bloqueando de forma no competitiva e irreversible la producción de PGs, a través de la acetilación de un residuo de arginina en posición 120 (158,159).

Sin embargo, tras varios estudios se observó que la inhibición de la COX-1 causa efectos secundarios perjudiciales en el tracto gastrointestinal y renal (160), por lo que se empezó a estudiar y desarrollar inhibidores específicos de la COX-2, que tienen un efecto terapéutico y reducen los efectos secundarios.

El nuevo grupo de NSAIDs se desarrolló en base a las diferencias estructurales entre las dos isoformas. La COX-1 posee en la posición 523 un aminoácido de isoleucina, mientras que en la COX-2 el aminoácido es la valina, de menor tamaño. Esta diferencia provoca que el canal de entrada al centro activo de la COX sea de mayor tamaño en la COX-2 con respecto a la COX-1. Por tanto, el nuevo grupo de NSAIDs específicos de COX-2 posee un mayor tamaño para evitar uniones inespecíficas a la COX-1 (161).

Dentro de este nuevo grupo de NSAIDs específicos de la COX-2 se encuentra el celecoxib (CLX), uno de los primeros en ser desarrollado y de los más efectivos. Además, es uno de los inhibidores más utilizados, ya que tiene una especificidad de 375 a 1 de inhibir la COX-2 con respecto a la COX-1. El CLX,

está compuesto por 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il] benzenosulfamida. A través de los anillos metilfenil y benzenosulfamida se une a la COX-2 (159).

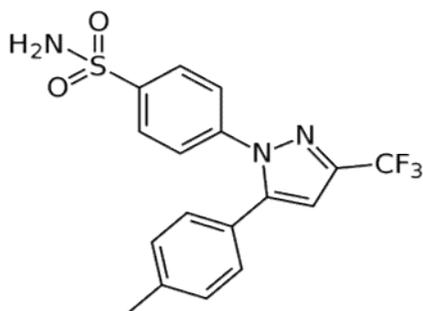


Figura 10. Estructura del celecoxib (CLX)

En estudios previos, nuestro grupo ha descrito que la COX-2 está implicada en la angiogénesis a través de la regulación en la expresión de VEGF por las HSCs (162). Además, en las primeras etapas de la metástasis hepática, se ha estudiado como la activación de la COX-2 y la sobreexpresión de PGE₂ por las células tumorales es inducida por la interacción entre la ICAM-1 de las LSEC y el LFA-1 de las tumorales. Esta activación de COX-2 genera a su vez un aumento en la expresión de proteínas pro-inflamatorias, entre ellas la IL-1 β que contribuyen a generar un estado de inflamación en el TME. Esta respuesta inflamatoria está asociada a un aumento en la expresión del receptor de manosa (MR, del inglés mannose receptor) en la superficie de las LSECs (80).

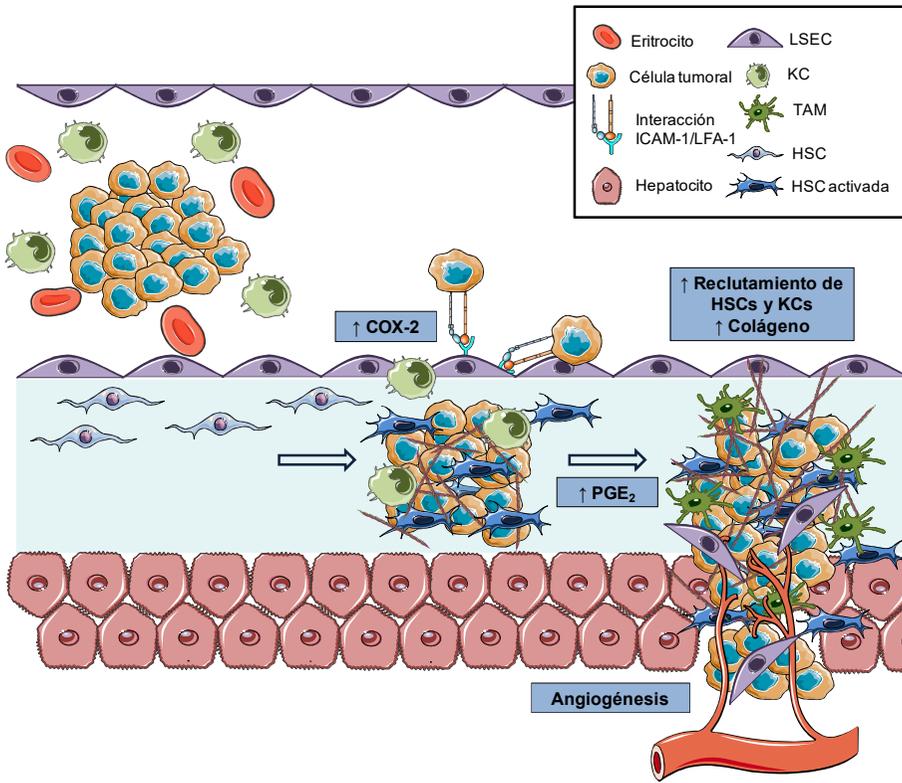


Figura 11. Proceso de infiltración tumoral hepática modulado por la COX-2. Las células tumorales interactúan con las LSECs a través de la interacción ICAM-1/LFA-1. Esta interacción además de facilitar la infiltración tumoral, aumenta la expresión de COX-2. Una vez en el espacio de Disse, se genera un TME inflamatorio, constituido por células tumorales HSCs y KCs activados y moléculas pro-inflamatorias como PGE₂ y otros componentes acelulares como colágeno. Este TME va a aumentar de tamaño y va a migrar hasta el interior del parénquima hepático. Por último, se forman vasos sanguíneos que permitan una mayor colonización del órgano.

5. El receptor de Manosa

El receptor de manosa (MR) o CD206, es uno de los cuatro miembros del sub-grupo con el mismo nombre, que pertenecen a su vez a la superfamilia de lectinas tipo C (163). Es una proteína transmembrana de tipo I, con tres dominios extracelulares y un tamaño de 180 kDa. Dentro del dominio extracelular, la zona más basal está a su vez, compuesta por ocho dominios de lectina tipo C, que son capaces de unirse a diversas moléculas tanto endóge-

nas como exógenas, entre ellas alérgenos, virus, monosacáridos y polisacáridos. A continuación, tiene un dominio de fibronectina tipo II, que tiene la capacidad de unirse a diferentes tipos de colágenos (164). Por último, en el extremo N-terminal, posee un dominio rico en cisteína (CRD, del inglés cysteine rich domain), dependiente de calcio, que actúa como un segundo dominio de lectina al que se unen azúcares sulfatados, entre ellos manosa, fucosa y N-actetilglucosamina (165). Además de los dominios extracelulares, presenta un pequeño dominio citoplasmático que permite la interacción con los mecanismos endocíticos y así introducir componentes extracelulares al interior de las células (166).

Este receptor se expresa en poblaciones específicas de macrófagos, células dendríticas y en células endoteliales no vasculares. Posee diversas funciones, como endocitosis, presentación antigénica o la inducción de la respuesta inmune (164).

En el hígado, el MR se expresa en la superficie de las KCs y de las LSECs en altas concentraciones (entre 20.000-25.000 receptores), con la función principal de llevar a cabo la endocitosis de las cadenas α del colágeno desnaturizado (167,168).

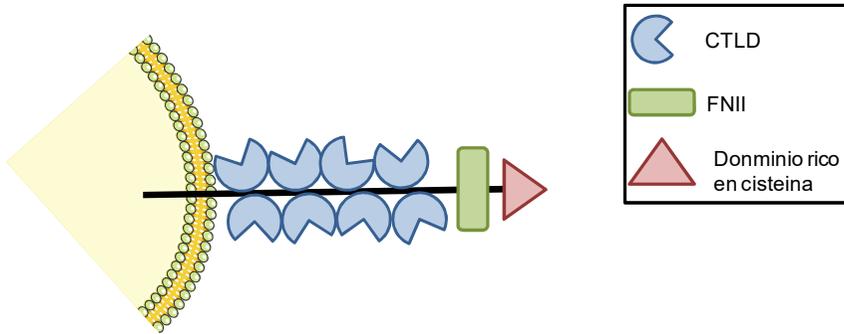


Figura 12. Estructura del receptor de Manosa. Estructura del MR compuesta por 3 dominios extracelulares. De basal a apical: 8 dominios de lectina tipo C, un dominio

Estudios previos en nuestro grupo han descrito que durante los primeros estadios de la metástasis hepática, se produce un aumento en la expresión del MR, mediada por un aumento en la expresión de IL-1 por parte de las LSECs. Este incremento, viene producido por la activación de la enzima COX-2, como se ha indicado anteriormente. Tanto el aumento en la producción de IL-1 como de PGE₂ genera un ambiente inflamatorio que induce a una disminución de la respuesta inmune hepática. Junto con los altos niveles de estas moléculas, la interacción entre las células tumorales con las LSECs reduce la capacidad antitumoral de los linfocitos presentes en el sinusoides hepático (80).

Hipótesis y Objetivos

Dado todo lo anterior, planteamos la siguiente **hipótesis**:

La interacción entre la ICAM-1 endotelial y la LFA-1 tumoral. El efecto de esta interacción junto con la regulación positiva de la actividad de la COX-2, promueve la formación de un microambiente tumoral y de una respuesta estromal, favoreciendo la progresión metastásica en el hígado. Además,

Para demostrar esta hipótesis se han propuesto los siguientes **objetivos**:

1- Estudio *in vitro* de la capacidad de activación tumoral de las células C26 sobre líneas no tumorales.

2- Estudio *in vivo* del efecto del bloqueo por separado de las moléculas que forman la interacción ICAM-1/LFA-1, en el desarrollo tumoral y en el reclutamiento de HSCs y KCs.

3- Estudio *in vitro* del papel de la COX-2 modulada por la activación de la ICAM-1 en células tumorales y estromales durante el desarrollo tumoral.

4- Estudio *in vivo* del papel de la COX-2 modulada por la activación de la ICAM-1 en el desarrollo tumoral hepático y en el reclutamiento de HSCs y KCs.

5- Estudio *in vivo* la implicación del MR en el desarrollo tumoral hepático y en el reclutamiento de HSCs y KCs.

Materiales

1. Animales

Para la experimentación realizada en esta tesis se han utilizado ratones macho de la cepa Balb/c singénicos con las células tumorales de carcinoma de colon C26 obtenidos de Charles River (Barcelona, España). Los animales se han mantenido bajo condiciones estándar con comida y bebida *ad libitum*, bajo el cuidado de personal cualificado en el Animalario perteneciente a la Universidad del País Vasco (EHU/UPV) en conformidad con las leyes nacionales e internacionales para el cuidado de animales experimentales.

2. Líneas celulares

2.1. Líneas tumorales

2.1.1. Carcinoma de colon murino C26.

La línea celular murina de carcinoma de colon CT26.WT, también conocida como CT26 y MCA26 (a partir de ahora denominada de forma abreviada C26), es singénica con la cepa de ratón Balb/c. Dicha línea celular se ha obtenido de la colección americana de células y tejidos, ATCC (Virginia, Estados Unidos). La línea celular se ha mantenido en RPMI-1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) suplementado con 100 unidades/ml de penicilina, 10 µg/ml de estreptomicina y 25 ng/ml de anfotericina al 10% de suero bovino fetal (SBF) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) a 37°C y una concentración de 5% de CO₂.

2.2. Líneas no tumorales

2.2.1. Línea celular de fibroblastos

La línea de fibroblastos murinos BALB/3T3 clon A31 (denominada a partir de ahora 3T3) es una línea celular singénica con la cepa de ratón Balb/c, y se ha obtenido de la colección americana de células y tejidos, ATCC. Las células se han mantenido en condiciones estándares de cultivo, con medio DMEM-F12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), suplementado con 100 unidades/ml de penicilina, 10 µg/ml de estreptomina y 25 ng/ml de anfotericina al 10% de SBF a 37°C y una concentración de 5% de CO₂.

2.2.2. Línea celular de Macrófagos

Los macrófagos murinos J774A.1 utilizados en todos los procesos experimentales son singénicos con la cepa de ratón Balb/c, y al igual que la línea celular de fibroblastos se han obtenido de la colección americana de células y tejidos, la ATCC. Esta línea celular se ha mantenido en medio DMEM (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) suplementado, 100 unidades/ml de penicilina, 10 µg/ml de estreptomina, 25 ng/ml de anfotericina y L-glutamina 3 mM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), al 10% de SBF a 37°C y una concentración de 5% de CO₂.

3. Medios y reactivos de cultivo y mantenimiento celular

3.1. Medios de cultivo y mantenimiento celular

3.1.1. Medio de cultivo RPMI-1640

El medio de cultivo RPMI-1640 es un medio de cultivo comercial utilizado para el mantenimiento y el tratamiento de las células, una vez suplementado con antibióticos y antimetabólicos. Originalmente este medio de cultivo fue desarrollado para el cultivo de células de leucemia humanas tanto en suspensión como en monocapa. Posteriormente, se modificó el medio para el cultivo de células de añadiendo L-glutamina, Rojo Fenol y sin HEPES. Este medio contiene altas concentraciones de vitaminas como inositol y colina pero no contiene proteínas, lípidos o factores de crecimiento. Por tanto, para usar el medio de cultivo RPMI-1640 en el mantenimiento celular se requiere una suplementación con algún tipo de suero ya sea bovino, de cabra o de caballo. Además, este medio contiene un buffer de bicarbonato de sodio (2.0 f/L) que requiere una concentración de CO₂ del 5-10% para mantener su pH fisiológico.

3.1.2. Medio de cultivo DMEM

El medio de cultivo DMEM (del inglés Dulbecco's modified Eagle medium) está modificado a partir del medio basal Eagle (BME, del inglés basal medium Eagle), conteniendo el cuádruple de aminoácidos y vitaminas. Este medio posee niveles de glucosa elevados, a 4500 mg/L. En particular, este medio que se ha utilizado no posee piruvato de sodio ni HEPES pero si contiene rojo

fenol, bicarbonato sódico y L-glutamina. Al igual que los otros medios de cultivo, es necesario suplementarlo con algún tipo de suero para su uso en cultivos celulares.

3.1.3. Medio de cultivo DMEM F-12

El medio de cultivo DMEM F-12 consiste en una mezcla 1:1 entre el medio DMEM y el medio Ham's F-12. Este medio es rico y complejo en aminoácidos y proteínas. El medio está modificado con L-glutamina a una concentración de 2.5mM, con HEPES concentrado a 15 mM, con piruvato de sodio a 0.5 mM y con bicarbonato sódico concentrado a 1200 g/ml. Esta concentración de bicarbonato requiere que el medio se mantenga al 5% de CO₂ para poder mantener el pH dentro de los rangos fisiológicos. Además, el medio contiene sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos y otros tipos moleculares como D-Glucosa, rojo fenol o ácido linoleico. Para el mantenimiento de líneas celulares en condiciones óptimas de crecimiento es necesario suplementar este medio con suero.

3.2. Reactivos de cultivo y mantenimiento celular

3.2.1. Suero Bovino Fetal (SBF)

El SBF es la parte líquida procedente de sangre coagulada en ausencia de células, fibrina o factores de coagulación. Sin embargo, sí que posee un gran porcentaje de factores nutricionales y compuestos macromoleculares que son esenciales para el crecimiento celular, como los azúcares, los lípidos, los aminoácidos y las hormonas. Los factores de crecimiento son moléculas

esenciales en el crecimiento y mantenimiento celular, entre ellos se encuentra la albúmina sérica bovina, que constituye el componente más abundante del suero. El suero bovino que se ha utilizado para suplementar los medios de cultivo celulares ha sido previamente inactivado (incubado a 56°C durante 30 minutos).

3.2.2. Solución Antibiótico-Antimitótico 100X

La solución antibiótico-antimitótica 100X (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) se ha utilizado en los medios de cultivo a una dilución 1 a 100 para prevenir la contaminación del cultivo por bacterias y hongos. Esta solución contiene 10.000 unidades/ml de penicilina, 10.000 unidades/ml de estreptomina y 25µg del antimitótico Fungizone®. Los antibióticos penicilina y estreptomina mantienen a las células en cultivo libres de bacterias, tanto Gram-positivas como G-negativas. La penicilina se extrae a partir del hongo *Penicillium* e interfiere en la correcta composición y volumen de la pared celular bacteriana. La estreptomina ha sido purificada a partir de *Streptomyces griseus* y actúa uniéndose a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano impidiendo la síntesis de proteínas. Por último, la anfotericina B Fungizone® impide el crecimiento de levaduras y hongos al aumentar la permeabilidad de su membrana plasmática.

3.2.3. L-Glutamina

La L-glutamina es un aminoácido requerido en el cultivo celular ya que participa en diversos procesos celulares clave, como en la formación de los nucleósidos de purina y pirimidina o en la producción de aminoácidos, en la

formación de glucosa y en la síntesis de proteínas. Aunque todos los medios de cultivo contienen L-glutamina, se ha añadido una concentración de 3mM al medio DMEM para facilitar el cultivo y el crecimiento celular óptimo de los macrófagos J774A.1.

3.2.4. EDTA 4mM

El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, del inglés ethylene-diamine-tetraaceticacid) (Merk, Alemania) es un compuesto químico utilizado como agente quelante, es decir, es un compuesto capaz de formar complejos con iones de metales pesados. Se ha durante el sub-cultivo de células C26 debido a su capacidad de romper los enlaces de Ca^{2+} de las células y facilitar que se despeguen de la superficie de los frascos de cultivo. Para su correcta utilización este compuesto se ha disuelto en PBS 1X a una concentración final de 4mM.

3.2.5. Tripsina-EDTA 0.05%

La Tripsina-EDTA 0.05% (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), es una mezcla de proteasas proveniente del páncreas porcino que se concentra hasta un 0.05% y además posee EDTA. Esta solución se ha empleado para levantar los fibroblastos murinos durante el proceso de sub-cultivo celular.

3.2.6. Colágeno Tipo I

El colágeno Tipo I (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) es un componente de la ECM de los tejidos conectivos y de diversos órganos inter-

nos. Además, actúa como sustrato en el cultivo de diferentes tipos celulares. Se extrae de los tendones de la cola de rata y se suministra en una disolución acuosa de 20mM de ácido acético, a una concentración proteica de 3mg/ml tras una previa esterilización mediante la filtración a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.22 μ m. El colágeno se ha utilizado como base de adhesión celular a una concentración de 30 μ g/ml en medio de cultivo.

3.2.7. Dimetilsulfóxido

El dimetilsulfóxido (DMSO, del inglés dimethylsulfoxide) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) es un disolvente polar aprótico que esterilizado se ha empleado en diversas reacciones químicas, como disolución de compuestos hidrófobos. Además, debido a su papel crio-protector, se ha usado para el proceso de congelación celular.

3.2.8. Rascador Celular

Para el sub-cultivo de los macrófagos J774A.1, se ha empleado un rascador especial, también denominado rascador celular (Corning Falcon, Alemania), que ha permitido levantar las células del frasco de cultivo sin dañarlas en exceso. El rascador tiene diferentes anchos de hoja y longitud dependiendo del tipo de cultivo y del tipo de superficie en la que se mantenga la línea celular. En este caso el rascador que se ha utilizado tiene un ancho de hoja de 1,8 cm y una longitud total de 25 cm.

4. Reactivos y soluciones para el aislamiento celular

4.1. Reactivos para el aislamiento celular

4.1.1. Colagenasa tipo IV

La colagenasa tipo IV (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) se ha obtenido de un cultivo de *Clostridium histolyticum* filtrado y se ha utilizado para la digestión del tejido hepático murino. Este compuesto contiene al menos 7 tipos diferentes de proteasas, además de colagenasa, con unos pesos moleculares de entre 68 y 130 kDa.

El lote utilizado en este proyecto contiene una actividad de digestión de colágeno de 440 U/mg sólido (considerando una unidad como la cantidad de colagenasa necesaria para liberar péptidos de colágeno equivalente a 1 μmol de leucina en 5 horas a pH 7.4 y 37°C en presencia de iones de calcio), también posee una actividad de hidrólisis de FALGPA de 2 unidades/mg de sólido (considerando una unidad como la cantidad necesaria para hidrolizar 1 μmol de furilaciloil-leu-glu-pro-ala por minuto a pH 7,5 y 25°C en presencia de iones de calcio), actividad caseinasa (142 U/mg de sólido donde 1 unidad de proteasa neutra hidroliza la caseína a 1 μmol de tirosina en 5 horas a pH 7.5 a 37°C y una actividad de degradación de clostripainas (1.3 U/mg de sólido) (endopeptidasas de cisteína) por cada unidad se hidroliza 1 μmol de BAEE por minuto a pH 7.6 a 25°C.

4.1.2. Albúmina de suero bovino (BSA)

La albúmina de suero bovino (BSA, del inglés bovine serum albumin) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) es una proteína ácida globular usada en numerosas aplicaciones biomédicas debido a su estabilidad y a una baja interferencia con las reacciones biológicas. El BSA se encuentra abundantemente en tejidos de mamíferos y fluidos corporales. Su principal función es regular la presión osmótica en la sangre. Proporciona grandes beneficios, como la protección contra el daño oxidativo y la estabilización de otros componentes del medio, como los ácidos grasos. Se ha usado en diversos procesos experimentales entre ellos, la obtención de la curva de calibración para la cuantificación de proteínas, para el búfer de digestión de colagenasa y el de perfusión durante el aislamiento de células primarias y para el búfer de dilución de los anticuerpos en los procesos inmunohistoquímicos.

4.1.3. Gentamicina

La gentamicina (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) es un antibiótico de amplio espectro, frente a la actividad bacteriana tanto de gram-positivas como Gram-negativas. Además, posee capacidad frente a los micoplasmas y tiene un rango amplio en respuesta a cambios de temperatura y pH. Este antibiótico parte de una solución stock de 50 mg/ml y se ha utilizado durante el cultivo celular de líneas primarias a una concentración 100 µg/ml.

4.1.4. EGTA

El ácido etilenglicol tetracético (EGTA, del inglés ethylene glycol tetraacetic acid) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) es un agente quelante selectivo para el Ca^{2+} que se ha utilizado para debilitar las uniones intercelulares más resistentes y permitir la separación de las células parenquimales, durante el aislamiento de HSCs.

4.2. Soluciones para el aislamiento celular

4.2.1. Búfer salino de fosfato (PBS)

El búfer salino de fosfato (PBS, del inglés phosphate buffer saline) a un pH 7.4 (fisiológico) es una solución búfer utilizada en múltiples procesos experimentales, debido a que posee una concentración de iones cloro, sodio y potasio similar a los presentes en el líquido extracelular de los mamíferos. Otras dos importantes características es que debido a los grupos fosfato es capaz de mantener un pH estable y además, posee una osmolaridad isotónica, es decir, que dispone de la misma concentración de solutos que en el interior celular, por lo que no existe ningún movimiento neto de agua. Todas estas propiedades permiten utilizar dicha solución en células sin que se produzca citotoxicidad alguna. El PBS se ha preparado a partir de 8g/L de NaCl (Fisher Chemical, Fisher Scientific, Estados Unidos), 0.2 g/L de KCl (Fisher Chemical, Fisher Scientific, Estados Unidos), 2.9 g/L de Na_2HPO_4 (Panreac, España) y 0.2 g/L de KH_2PO_4 (Panreac, España). Posteriormente, se ha ajustado el pH hasta 7.4 y se ha esterilizado por medio de esterilización por calor húmedo en autoclave a 120°C.

4.2.2. Búfer de Perfusión

El búfer de perfusión concentrado se ha utilizado en la obtención de células hepáticas está compuesto por: 207.5 g/l NaCl, 12.5 g KCl, 57.4 g/l HEPES 15% v/v (Alfa Aesar, Estados Unidos) en 75 ml de NaOH 1M (Panreac, España) en 1 litro de agua miliQ. A continuación, se ha filtrado a través de un filtro de 0.22 μm de poro y alicuotado en tubos de 40 ml almacenados a -20°C hasta su uso. Para obtener la solución de trabajo, la solución stock se ha diluido en agua destilada en una proporción de 1:25 tras lo cual se ha filtrado. Este búfer está libre de calcio para debilitar aquellas uniones intercelulares dependiente de este ion. Además, para el aislamiento de HSCs, este búfer de perfusión se ha suplementado con 23.3 mg/l de EGTA y una vez disuelto, el búfer se ha filtrado a través de filtros de 0.22 μm de diámetro de poro.

Para la obtención del búfer de suspensión celular tras la perfusión, se ha suplementado al búfer de perfusión con BSA 1% (m/v) diluido por precipitación, para dotar a las células de protección frente a las diversas centrifugaciones. Por último, antes de su uso, el búfer se ha filtrado de nuevo, a través de filtros de 0.22 μm de poro.

4.2.3. Búfer de digestión

El búfer de digestión que se ha utilizado en el aislamiento de células hepáticas consiste en un búfer base para la dilución de la colagenasa compuesto por: 4 g de NaCl, 0.5 g de KCl, 24 g de HEPES en 66 ml de NaOH 1M. A esta solución se le ha añadido de forma lenta y progresiva, para evitar la precipitación, una solución de 7 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, Estados

Unidos) en agua destilada. Para finalizar, la solución resultante se ha llevado a un volumen total de 100 ml, filtrado y almacenado a -20°C . La solución de trabajo se ha obtenido al diluir 1:10 de la solución stock en agua destilada suplementada con BSA al 1% (m/v). A esta solución de trabajo se le ha añadido una dilución de colagenasa a una concentración de 20 mg/100 ml (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Por último, se ha filtrado y se ha alicuotado en tantos tubos como ratones se hayan sacrificado.

4.2.4. Gradiente de Percoll

El Percoll (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suecia) es un medio de baja viscosidad isosmótico e inocuo para las poblaciones celulares que se utiliza para la separación de células, virus y partículas sub-celulares por medio de un gradiente de densidad tras la centrifugación a baja velocidad (20 a 1000 G), separándolas por su tamaño. Este compuesto consiste en partículas de sílice de entre 15 a 30 nm de diámetro recubiertas de polivinil pirrolidona dializable (PVP).

Para preparar los gradientes de densidad de Percoll, se ha partido de una solución de Percoll al 90% en PBS 10X (denominada Percoll 100%). A partir de esta solución stock, se han obtenido las fases de 50% y 25% utilizadas en la separación de poblaciones de LSECs. El gradiente isopícnico discontinuo se obtiene depositando cuidadosamente la fase de 25% Percoll sobre la de 50%.

Para el aislamiento de las HSCs, el gradiente de isopícnico se ha obtenido al depositar Percoll al 23% sobre una base de Percoll al 29%.

5. Reactivos para otros procesos experimentales

5.1. Molécula de Adhesión Celular 1 en su forma soluble (sICAM-1)

La fórmula soluble de la ICAM-1 (sICAM-1) (Sino Biological, China) es una proteína recombinante de rata que expresa el dominio extracelular de ICAM-1 junto con un marcaje de poli-histidina en la cadena C-terminal. Esta proteína se ha utilizado para activar *in vitro* las células tumorales a una concentración de 200 ng/ml.

5.2. Celecoxib (CLX)

El CLX (Pzifer, Estados Unidos) es un inhibidor preferente de la actividad de la COX-2 y ha sido utilizado tanto en ensayos *in vitro* como en ensayos *in vivo*.

5.3. Presto Blue™

El Presto Blue™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) es una solución basada en resazurina lista para su uso que penetra en las células y funciona como un indicador de viabilidad celular mediante el poder reductor que poseen las células vivas y así poder medir de forma cuantitativa la proliferación celular. Este compuesto se añade al medio en una dilución 1:10 y tras un periodo de incubación de entre 2 y 4 horas, la coloración azul inicial varía de color hacia un tono rosa, en función de la metabolización de resazurina. A mayor metabolización, coloración más rosa. Este compuesto se

puede medir tanto por absorbancia como por fluorescencia, excitándose a 535-560 nm y emitiendo a 590-615nm. Se ha usado en ensayos de viabilidad celular en respuesta a los diferentes tratamientos a los que se ha sometido a las células.

6. Reactivos para lisados celulares

6.1. Búfer Laemmli 2X

El búfer de lisis Laemmli (BioRad, Estados Unidos) es una solución acuosa basada en el método Laemmli de 1970 que se ha usado para la obtención de lisados de proteínas. Este búfer de gran poder reductor, está compuesto por Tris-HCl 65.8 mM a un pH 6.8, por glicerol al 26.3% (w/v) y por bromofenol azul al 0.01%.

6.2. β -Mercaptoetanol

El β -Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) es un compuesto químico utilizado para reducir los puentes di-sulfuro de las proteínas. Al reducir estos puentes di-sulfuro las proteínas se desnaturalizan y facilita que migren durante la electroforesis a través del gel de acuerdo con la longitud de la cadena de aminoácidos y no se vean influenciadas por su estructura secundaria. Para la obtención del búfer de lisado de proteínas se ha diluido a una concentración de 1% en búfer de lisado Laemmli 1X.

6.3. Ácido Tricloroacético

El ácido tricloroacético (TCA, del inglés trichloroacetic acid) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) es un ácido orgánico derivado del ácido acético en el cual se han sustituido tres átomos de hidrógeno por tres de cloro. Este ácido tiene la capacidad de precipitar las proteínas y se ha utilizado para la cuantificación de los lisados celulares obtenidos.

7. Reactivos para electroforesis

7.1. Acrilamida/Bis-Acrilamida 37.5:1 30%

El compuesto formado por acrilamida y bis-acrilamida en una ratio de 37.5:1 (Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) es una solución que se ha utilizado para la elaboración de los geles empleados en procesos de electroforesis. Dentro de este compuesto, la acrilamida es el reactivo soluble en agua y es la responsable de formar polímeros lineales mientras que la bis-acrilamida es determinante en la formación de estructuras reticulares consistentes en la unión de los polímeros lineales en cadenas tridimensionales componiendo una especie de red que confiere estabilidad al gel. La ratio entre ambos compuestos va a determinar el tamaño de poro de la red, ya que a mayor porcentaje de bis-acrilamida, menor tamaño de poro.

7.2. Dodecilsulfato sódico (SDS)

El dodecilsulfato sódico (SDS del inglés Sodium-dodecyl sulfate) (VWR, Estados Unidos) es una sal inorgánica compuesta por 12 átomos de carbono y

una terminación sulfato que posee capacidades anfipáticas, es decir, tiene un extremo hidrófobo y un extremo hidrofílico. Estas características permiten al SDS actuar como detergente en diferentes tipos de búferes, aunque principalmente se ha utilizado para la desnaturalización de las proteínas para la separación electroforética en los geles de poli-acrilamida.

7.3. Tris (hidroximetil) aminometano

El Tris, ((hidroximetil)aminometano) (Panreac, España) es un compuesto orgánico utilizado en técnicas bioquímicas y de biología molecular como componente de soluciones búfer de rango entre 7 y 9, similar al pH fisiológico, por lo que se ha utilizado frecuentemente en la estandarización de soluciones ácidas para análisis químicos, tanto en análisis de western blot como en análisis zimográficos.

7.4. Persulfato de amonio

El persulfato de amonio (APS, del inglés amonium persulphate) (BioRad, Estados Unidos) se usa como reactivo en bioquímica y en biología molecular en la preparación de geles de poli-acrilamida. El APS oxida los radicales libres en la solución acuosa mediante la utilización de agentes básicos que actúan como catalizadores. La oxidación de estos radicales libres es la causa de la polimerización de la bis-acrilamida formando un gel que, posteriormente, se utiliza para la separación de macromoléculas en función de su tamaño. En los experimentos se ha empleado a una concentración stock del 40%.

7.5. Tetrametiletilendiamina

El tetrametiletilendiamina o TEMED (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), es un agente básico que facilita la polimerización de los geles de poli-acrilamida. En presencia del APS, el TEMED es el responsable de la formación de radicales libres, produciendo así el inicio de la polimerización.

8. Reactivos para análisis de inmunodetección

8.1. Reactivos comunes para Western Blot e Inmuno-histoquímica

8.1.1. Tween-20

Tween-20 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) es un éster de polioxietileno sorbitol perteneciente a la familia de los polisorbatos. Es un detergente no iónico compuesto por 20 unidades de óxido de etileno, una unidad de sorbitol y una de ácido láurico, como ácido graso primario. Las sub-unidades de óxido de etileno son las responsables del carácter hidrofílico mientras que las cadenas hidrocarbonadas le confieren un ambiente hidrófobo. El sorbitol forma la columna vertebral en forma de anillo a la que se une los polímeros de óxido de etileno. El tween-20, al ser una molécula anfipática se ha utilizado como detergente en los múltiples lavados para la eliminación de productos entre un paso y otro dentro de los procesos de inmunohistoquímica a una concentración final de 0.05% (V/V) diluido en PBS 1X.

8.1.2. Triton X-100

El Triton X-100 (Fisher BioReagents, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) es otro de los detergentes no iónicos usado en numerosos procesos experimentales. Este detergente deriva del polioxietileno y contiene un grupo hidrofóbico alquifenilo. Este compuesto ha sido utilizado en el búfer TE para el desenmascaramiento antigénico y en el búfer de lavado de zimografía.

8.1.3. Estreptavidina-HRP

La estreptavidina (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) es una proteína tetramérica que se une a la biotina, con la cual se conjugan los anticuerpos secundarios. Esta molécula formada por cuatro dímeros se encuentra unida a una peroxidasa extraída del rábano picante (HRP, del inglés horseradish peroxidase) una enzima que cataliza la reacción de oxidación de un sustrato por el dióxido de hidrógeno (o agua oxigenada) cuyo resultado es un producto que revela la presencia de la proteína en la muestra.

8.1.4. Sustrato para la detención de HRP

Tanto en los procesos de inmunohistoquímica como de inmunodetección de proteínas ha sido necesario el uso de un cromógeno cuya oxidación catalizada por la HRP genere un producto con color que permita detectar la expresión de la proteína de interés.

Para el análisis de expresión de proteínas por western blot se ha utilizado el sustrato Luminata Crescendo™ (Merk Millipore, Estados Unidos), un com-

puesto pre-mezclado que genera una señal luminiscente al catalizarse la reacción de unión con la peroxidasa conjugada con la HRP.

Para el análisis inmunohistoquímico se ha utilizado la 3,3 diaminobenzidina (DAB). El cromógeno utilizado es parte del kit DAB Quanto (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) compuesto por dos reactivos, un sustrato DAB Quanto y el DAB que se une a la peroxidasa HRP (conjugada con la estreptavidina) y genera una reacción colorimétrica oscura e insoluble de forma rápida.

8.1.5. Metanol

El metanol (Panreac, España) se ha utilizado en diferentes pasos del western blot, del análisis zimográfico y de otros procesos experimentales en los que se ha requerido la acción de alcoholes más potentes que el etanol.

8.2. Reactivos específicos de Western Blot

8.2.1. Marcador de peso molecular

El marcador de peso molecular (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) es una mezcla comercial de nueve tipos de proteínas cuyo rango de tamaño va de 250 kDa a 10 kDa. Dicho marcador a la altura de 70 kDa y 25 kDa posee bandas de color rojo a diferencia del resto de bandas que son de color azul y la de 10 kDa de color verde. De esta forma, se ha podido dividir la membrana en función del peso molecular de nuestra proteína de interés.

8.2.2. Solución de tinción Ponceau S

Ponceau S (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) es una tinción con carga negativa que se une a las cargas positivas de los grupos aminos de las proteínas. El rojo Ponceau S es un método de tinción rápido y reversible que permite localizar las bandas de proteínas transferidas a una membrana sin efectos deletéreos en la inmunodetección de las proteínas. La solución de trabajo ha consistido en una solución al 0.1% (p/v) de Ponceau S y 5.0%(p/v) de ácido acético (Panreac, España) en agua destilada.

8.3. Reactivos específicos de Inmunohistoquímica

8.3.1. Peróxido de Hidrógeno

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Panreac, España) es un compuesto químico, muy polar e inestable del cual se ha partido a una concentración stock del 30% diluyendo 1:10 con PBS 1X hasta obtener la solución de trabajo al 3%. Esta solución se ha utilizado directamente en inmunohistoquímica para bloquear la peroxidasa endógena presente en el tejido analizado y así evitar la unión inespecífica de la estreptavidina-HRP.

8.3.2. Anticuerpos contra fragmentos $F(ab')_2$

El fragmento $F(ab')_2$ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) es una parte de la estructura de los anticuerpos que posee la capacidad de unión a antígenos pero no posee la fracción Fc. Se ha utilizado para eliminar la unión no específica entre los receptores Fc tisulares y los antígenos de los

anticuerpos secundarios, cuando el anticuerpo primario utilizado está desarrollado en la misma especie de la muestra.

8.4. Reactivos específicos de ELISA

Los procesos experimentales de inmunodetección de la actividad de la COX-2 y la expresión de PGE₂ y VEGF, a través de la técnica ELISA, se han llevado a cabo por medio de Kits específicos.

8.4.1. Kit específico para la actividad de COX-2 y la expresión de PGE₂

Este kit (Amersham pharmacia biotech, Reino Unido) está compuesto por diferentes búferes, entre ellos un búfer experimental, en el cual se han llevado a cabo todas las reacciones del ensayo ELISA y su concentración stock ha sido diluida 1:10 en PBS 1X obteniendo una concentración de trabajo de PBS 0.1 M a pH 7.5, BSA a un porcentaje de 0.9% (p/v) y kathon CG a 0.5% (p/v), un compuesto estabilizador de la HRP. Otro de los búferes que contiene es el de lavado, compuesto por PBS 1X con un porcentaje de Tween 20 del 0.05%. El último búfer que está presente en el kit, es el búfer del sustrato, formado por 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB), un cromógeno que da un color azul en la reacción catalizada por la HRP. El color de la solución cambia de azul a amarillo al reaccionar con una solución de ácido sulfúrico 1M, paso necesario para detener la reacción catalizada por la peroxidasa.

A parte de los búferes, el Kit contiene placas de 96 pocillos cubiertas con anti-ratón IgG para facilitar la unión de la PGE₂ al pocillo. Además, contiene PGE₂ a una concentración de 256 ng/ml en etanol para la realización de la

curva patrón. Por último, contiene anti-PGE₂ y anti-PGE₂ conjugado con HRP, para la unión a la placa y la detección de PGE₂, respectivamente.

8.4.2. Kit específico para la expresión de VEGF

El kit (R&D Systems, Estados Unidos) está compuesto por placas de 96 pocillos cubiertas con VEGF de ratón policlonal. Además contiene anti-VEGF concentrado conjugado con HRP y un búfer para diluir dicho anticuerpo. Para la curva patrón, el kit contiene VEGF a una concentración de 2.5 ng/ml.

El kit también contiene un búfer experimental, un búfer de lavado, dos búferes para la detección del VEGF, búfer A, con H₂O₂ y búfer B con un cromógeno (TMB) y, por último, un búfer para parar la reacción.

9. Búferes para análisis de inmunodetección

9.1. Búferes específicos de Western Blot

9.1.1. Búfer de electroforesis

El búfer de electroforesis de western blot consiste en una solución de carácter básico en presencia de SDS para desnaturalizar y rodear a las proteínas, favoreciendo que el tamaño de la molécula sea directamente proporcional a su longitud de aminoácidos y no interfieran las cargas de los aminoácidos. El búfer se ha realizado a una concentración stock de 10X y se ha diluido para su uso hasta una concentración de 1X a un volumen total de 1 litro. El búfer de electroforesis se ha formado a partir de 15.14 g Tris Base (250

mM), 71.125 g de glicina (Fisher Chemical, Fisher Scientific, Estados Unidos) (1.9 M) y 50 ml de SDS al 10% (1% p/v) llevado a un volumen final de 0.5 litros.

9.1.2. Búfer de transferencia

El búfer utilizado para la transferencia húmeda de las proteínas del gel a la membrana ha consistido en una mezcla de 12.5 ml de Tris-HCl 1M a un pH8.3 (60.55 g de Tris Base en 0.5 L), 10 g de glicina, 100 ml de Metanol y 0.5 g de SDS a un volumen final de 0.5 L.

9.1.3. Búfer de lavado

El búfer de lavado o TBS-T es una mezcla de búfer salino con tris y tween-20 que se ha utilizado en los lavados de las membranas entre diferentes pasos de western blot, para eliminar los excedentes de las incubaciones, tanto de bloqueo como de anticuerpos. Para elaborar el TBS-T se ha utilizado 10 ml una solución tamponada de Tris-HCl 1M a un pH7.5, más 50 ml de NaCl 5M (146.1 g de NaCl en 0.5 L) y 0.5 ml de Tween-20.

9.1.4. Búfer de bloqueo

Se ha utilizado para bloquear la membrana y evitar las uniones inespecíficas del anticuerpo durante el proceso de western blot. El búfer de bloqueo ha consistido en TBS-T al 5% de leche en polvo.

9.2. Búferes específicos de Inmunohistoquímica

9.2.1. Búfer de lavado

Durante los experimentos de inmunohistoquímica las muestras se han lavado en PBS 1X al 0.05 % de Tween-20.

9.2.2. Búfer de bloqueo de la Peroxidasas

Para el evitar la acción de la peroxidasas endógena, las muestras se han bloqueado con una solución de PBS 1X con agua oxigenada (H₂O₂) concentrada al 3%.

9.2.3. Búfer de BSA

Los anticuerpos utilizados durante el proceso inmunohistoquímico se han diluido en una solución de PBS 1X al 3% de BSA para prevenir las uniones inespecíficas entre anticuerpos, evitar los falsos negativos y además disminuir el ruido de fondo.

9.2.4. Búfer de bloqueo F(ab')₂

Como se ha explicado anteriormente, en determinados análisis inmunohistoquímicos, el anticuerpo está hecho en la misma especie que el corte analizado. Por ello, ha sido necesario el uso de este búfer de bloqueo para disminuir la unión inespecífica. Las secciones, se han incubado con una dilu-

ción de anticuerpos IgG con fragmentos F(ab) y F(ab')₂ diluido (1:500) en una solución de PBS 1X con Tween 0.05%.

9.2.5. Búferes de recuperación antigénica

Debido al procesamiento que sufren los hígados una vez extraídos muchas de las proteínas a analizar han formado puentes cruzados y uniones que dificultan las uniones específicas antígeno-anticuerpo. Para ello, como paso adicional en los procesos inmunohistoquímicos ha sido necesario la utilización de dos tipos diferentes de búferes de recuperación antigénica, el primero utilizando la técnica denominada recuperación antigénica inducida por calor (HIER, del inglés heat induced epitope retrieval) y el segundo utilizando otra técnica que utiliza enzimas de digestión y se denomina recuperación antigénica inducida por proteólisis (PIER, del inglés proteolytic induced epitope retrieval).

9.2.5.1. Búfer de citrato a pH ácido

Esta solución de recuperación antigénica se ha utilizado para el marcaje de α -SMA. La solución ha consistido en un búfer de citrato a un pH de 6 que al calentarse ha sido capaz de desenmascarar los antígenos de las muestras. La solución de trabajo se ha obtenido tras diluir 1:10 la solución stock. (DakoCytomation, Dinamarca).

9.2.5.2. Búfer de proteinasa K

Este búfer se ha utilizado en el marcaje inmunohistoquímico de la proteína F4/80. Está compuesto por dos soluciones: el búfer TE y la solución de proteinasa K, una proteinasa obtenida del hongo *Tritirachium álbum*, activa en presencia de Triton X-100 (1%) y capaz de degradar un gran número de proteínas incluso aquellas presentes en su estado nativo (Sigma Aldrich, Estados Unidos).

-Búfer TE: (50 mM de Tris Base, 1 mM de EDTA, 0.5% de Triton X-100 a pH 8). Esta solución ha estado constituida por 6.10 g de Tris, 0.37 g de EDTA y 5 ml de Triton X-100 en 1 L de agua destilada. Una vez se han disuelto todos los componentes se ha llevado a pH 8.

-Solución stock de Proteinasa K: (20X, 12 u/ml). Para este compuesto se han utilizado 8 mg de proteinasa K (30 u/mg), diluida en 10 ml de búfer TE a un pH de 8 y 10 ml de glicerol. Dicha solución se ha almacenado a -20°C hasta su uso.

La solución de trabajo se ha compuesto de 100µl de solución stock de proteinasa k por cada 1 ml de búfer TE.

10. Anticuerpos

10.1. Anticuerpos Primarios

10.1.1. Anti-Gliceraldehido-3 Fosfato Deshidrogenasa (GAPDH)

El anti-GAPDH (Bio-Rad, Estados Unidos) es un anticuerpo monoclonal que reconoce a la proteína multifuncional cuya principal función es la catálisis de la fosforilación oxidativa reversible del gliceraldehido-3 fosfato con la ayuda de un fosfato inorgánico y la nicotianmida adenina dinucleotida (NAD, del inglés, nicotinamide adenine dinucleotide). El GAPDH es una proteína de aproximadamente 36 kDa de peso molecular. Se ha utilizado como proteína constitutiva en los experimentos de western blot, ya que sus niveles de expresión se mantienen estables a pesar de los tratamientos o los tipos celulares.

10.1.2. Anti-Molécula de Adhesión Intercelular (ICAM-1/CD54)

El anticuerpo contra la ICAM-1 (eBiosence, Estados Unidos) es monoclonal y está hecho en rata para reaccionar ante la ICAM-1 o también denominado CD54 de un peso molecular aproximado de 90 kDa. Este anticuerpo se ha utilizado para su detección por western blot

10.1.3. Anti-Ciclooxigenasa 2 (COX-2)

El anticuerpo contra la COX-2 (Abcam, Reino Unido) es un anticuerpo monoclonal hecho en conejo que reconoce la enzima COX-2. La proteína posee un peso molecular aproximado de 70 kDa y ha sido detectada por análisis de western blot.

10.1.4. Anti-FAP

Es un anticuerpo policlonal hecho en conejo que reconoce a la proteína FAP (St. John's Laboratory, Reino Unido). Dicha proteína, posee un peso molecular de 170 kDa aproximadamente. Se ha utilizado en análisis de western blot.

10.1.5. Anti- α actina de músculo liso (α -SMA)

Anticuerpo monoclonal hecho en ratón frente a un decapeptido sintético N-terminal de α -SMA (DakoCytomation, Agilent Technologies, Estados Unidos). Dicha proteína tiene un peso molecular aproximado de 42 kDa. Este anticuerpo ha sido utilizado para detectar HSCs activadas en secciones de tejido hepático de ratón.

10.1.6. Anti-F4/80

Anticuerpo monoclonal hecho en rata para el reconocimiento del antígeno murino de F4/80 (Bio-Rad, Estados Unidos), una glicoproteína de superficie dentro de la familia EGF-TM7 de un tamaño aproximado de 160 kDa. Su

expresión es heterogénea y está modulada durante la maduración y la activación de los macrófagos. Entre los numerosos tipos celulares que expresan dicho antígeno se encuentran las células de Kupffer, las cuales han sido marcadas por medio de dicho anticuerpo en ensayos inmunohistoquímicos.

10.1.7. Anti- α L

Anticuerpo monoclonal hecho en rata que reacciona con la cadena α L o CD11a del LFA-1 (BD Biosences, Estados Unidos). Esta proteína tiene un tamaño de 180 kDa y se ha utilizado para el bloqueo *in vivo* de esta subunidad.

10.1.8. Anti-Receptor de Manosa (MR)

Es un anticuerpo monoclonal hecho en ratón anti-MR (Acris Antibodies, OriGene, Estados Unidos) que reconoce el MR o CD206, con un tamaño molecular de 175 kDa aproximadamente. Este anticuerpo es el clon MR5D3 que se caracteriza por no inhibir la unión del MR con sus ligandos carbohidratados, aunque si su internalización. Este anticuerpo se ha utilizado en análisis de western blot para el estudio de la expresión de CD206 en macrófagos y para el bloqueo *in vivo* del receptor de manosa.

10.2. Anticuerpos secundarios

10.2.1. Conejo Anti-Ratón

El anticuerpo de unión a ratón es un anticuerpo secundario biotinilado, que se une a las cadenas pesadas de la IgG de ratón. Este anticuerpo se ha utilizado para la detección de anticuerpos primarios en procesos de marcaje de proteínas. (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

10.2.2. Cabra Anti-Rata

El anticuerpo secundario biotinilado de anclaje a ratón reacciona con las cadenas pesadas de la IgG de rata y con las cadenas ligeras de la mayoría de inmunoglobulinas de rata. Sin embargo, no reacciona con otras proteínas no inmunoglobulinas del suero. Dicho anticuerpo ha sido necesario para el marcaje de proteínas en diversos procesos experimentales (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

10.2.3. Cabra Anti-Conejo

El anticuerpo secundario de unión a conejo se encuentra biotinilado y reconoce a la cadena IgG presente en anticuerpos de conejos, para la detección de proteínas unidas a un anticuerpo primario hecho en conejo. (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

11. Reactivos y búferes para análisis zimográficos

11.1. Reactivos para análisis zimográficos

11.1.1. Glicerol

El glicerol (Panreac, España) o glicerina es un alcohol compuesto por tres grupos hidroxilo, que se ha utilizado en numerosos procesos entre ellos para la elaboración de geles para ensayos zimográficos, en el búfer Laemmli de carga y en la solución de fijación a base de alcoholes.

11.1.2. Gelatina

La gelatina tipo A (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) ha sido obtenido de piel porcina por medio de una digestión ácida de la triple hélice del colágeno. Se ha utilizado para su degradación en los procedimientos zimográficos.

11.1.3. Azul Coomassie

El compuesto de tinción Azul Coomassie® (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) es el compuesto más común utilizado en la tinción de proteínas una vez se han separado en el gel de poli-acrilamida tras el proceso de electroforesis. Una vez que el compuesto se ha unido a la proteína tiene un máximo de absorción de 549 nm, mientras que si no ha habido unión a la proteína el máximo es de 555 nm. En cuanto a la intensidad de la tinción depende directamente del poder básico de la proteína teñida. Este compuesto ha sido empleado en la elaboración del búfer de tinción del gel durante los experi-

mentos de zimografía. De esta forma, las zonas del gel degradadas por las MMPs, donde hay una disminución de gelatina se observan al carecer del búfer de tinción.

11.2. Búferes para análisis zimográficos

11.2.1. Búfer de carga

Para que las muestras precipiten y sean visibles es necesario diluir las muestras en un búfer de carga. Para estos experimentos se ha utilizado un búfer basado en el método Laemmli, compuesto por Tris-HCl 6.25 mM a pH 6.8, 25% de glicerol, 4% de SDS y 0.01% de bromofenol azul. (Bio-Rad, USA).

11.2.2. Búfer de electroforesis

Durante la electroforesis ha sido necesario desnaturalizar las proteínas hasta su estructura primaria para una distribución real en relación a su peso molecular. Para ello se ha utilizado un búfer de electroforesis 1X con 3 g de Tris Base (250 mM), 14.36 g de glicina y 5 ml de SDS al 20% (1% p/v) a un volumen final de 1 litro. El búfer de electroforesis se ha reutilizado un máximo de tres veces.

11.2.3. Búfer de lavado

Después de la electroforesis, el gel se ha lavado con un búfer a base de Tritón X-100 al 2'5%. Para 400 ml de H₂O destilada.

11.2.4. Búfer de incubación

Para activar las MMPs ha sido necesario incubar el gel con un búfer específico que contiene para un volumen total de 200 mL: 1 ml de CaCl_2 , 10 ml de Tris-HCl 1M a un pH 8, 20 ml de NaN_3 al 0.2% y 40 μl de ZnCl_2 5 mM. Este búfer contiene varios cofactores indispensables para la activación de las MMPs, como son el calcio y el zinc.

11.2.5. Búfer de tinción

El búfer de tinción está compuesto por: 1 g de azul coomassie, 20 ml de ácido acético, 60 ml de iso-propanol y 120 ml de dH_2O . Este búfer se ha reutilizado durante varios experimentos.

11.2.6. Búfer de fijación a base de alcoholes

El último paso de la zimografía ha consistido en generar contraste en el gel para observar con mayor nitidez la actividad de las MMPs. Para ello se ha utilizado un búfer a base de alcoholes compuesto por: 3 ml de glicerol, 20 ml de ácido acético, 80 ml de metanol y 94 ml de dH_2O .

12. Fijadores

12.1. Solución de Zinc

Los hígados extraídos de los experimentos *in vivo* se han fijado utilizando una solución de zinc antes de embeberlos en parafina. En vez de una fijación con formalina se ha utilizado la de zinc debido a la estabilidad de los antígenos a la hora de realizar análisis inmunohistológicos. La solución de zinc está compuesta por: Tris buffer 0.1 M pH de 7.4, acetato de calcio al 0.05%, acetato de zinc al 0.5% y clorhídrico de zinc al 0.5%.

12.2. Poli-L-Lisina

Poli-L-Lisina es un polímero ácido con aminoácidos de carga positiva, que facilita la adhesión de las muestras de parafina o en congelado, a los portaobjetos y así evitar la pérdida de tejido durante el procesamiento histológico. La Poli-L-Lisina con la que se recubren los portaobjetos durante 5 minutos está diluida al 0,1% en agua des-ionizada (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

Métodos

1. Mantenimiento y cultivo de líneas celulares

Todas las líneas celulares se han mantenido en cultivo *in vitro* en “flasks” de 75 cm² con medio completo, consistente en medio de cultivo suplementado al 10% SBF con antibióticos y han sido incubadas a 37°C y al 5% de CO₂. Para las células carcinoma de colon murino C26 se ha utilizado el medio RPMI-1640, para la línea celular de macrófagos murinos J774A.1 el medio DMEM y para la línea celular de fibroblastos murinos 3T3, el medio DMEM F-12. Para su expansión y mantenimiento, las células han sido levantadas y cultivadas en nuevos T75 al alcanzar una confluencia entre el 85 y el 90% del frasco de cultivo. Para ello, se han incubado con PBS-EDTA 0.4mM o tripsina-EDTA 0.05% en el caso de las C26 y los 3T3 respectivamente, durante 3-5 minutos a 37°C y al 5% de CO₂. A continuación, la suspensión celular de las C26 se ha centrifugado a 200 G durante 5 min a 4°C, mientras que las 3T3 a 125 G durante 7 min a 4°C. Los pellets de C26 y 3T3 obtenidos se han resuspendido y sub-cultivado a una proporción de 1:10 y 1:5 en medio completo, respectivamente.

Los macrófagos murinos (J774A.1) confluentes se han levantado con el rascador celular en el medio de cultivo (DMEM) y la suspensión celular obtenida se ha diluido 1:5 en medio DMEM completo para mantener el cultivo.

Ninguna línea celular se ha cultivado durante más de 10 pases o expansiones, tras los cuales las células se han descartado y se han descongelado nuevos viales para evitar la pérdida de propiedades y posibles cambios celulares.

2. Congelación de líneas celulares

Para el almacenamiento de un stock de los diferentes tipos de líneas celulares utilizados, estas células se han congelado siguiendo un protocolo de criopreservación basado en unos porcentajes de DMSO al 10% en medio de cultivo completo, almacenado a 4°C hasta su uso en las líneas celulares.

Para la obtención de una suspensión celular en suero adecuada, las células en confluencia se han procesado según lo descrito en el apartado anterior. Todas las líneas celulares se han centrifugado y el sedimento obtenido se ha resuspendido en medio de cultivo completo a una concentración de 1×10^6 células/ml por cada vial de congelación. A continuación, a la suspensión celular se le ha añadido un volumen igual de la solución de criopreservación, diluyendo el porcentaje de DMSO hasta obtener uno final del 5% de DMSO en medio de cultivo completo.

Los viales se han congelado de dos formas diferentes: por medio de incubaciones secuenciales de temperatura (15 minutos a 4°C, 2 horas a -20°C, 12h a -80°C y almacenamiento en nitrógeno líquido) o por medio de Mr. Frosty Crio, en el cual los viales se han almacenado durante 24 horas a -80°C y se han pasado a nitrógeno líquido para largos periodos de almacenaje.

3. Aislamiento, purificación y cultivo de células no parenquimales murinas

Para el aislamiento y la purificación de las células no parenquimales murinas, en concreto, LSECs y HSCs se ha realizado un protocolo de múltiples

pasos basado en el método establecido por Smedsrød y Pertoft (Smedsrød & Pertoft, 1985).

3.1. Digestión enzimática del hígado.

Los ratones de la cepa Balb/c han sido sacrificados por medio de la técnica de dislocación cervical. A continuación, se ha abierto la cavidad intraperitoneal y se han desplazado los intestinos y el estómago para dejar expuesta la vena porta. Dicha vena ha sido cortada, canulada y perfundida a una velocidad de 7 ml por minuto con búfer de perfusión. A su vez, la vena cava ha sido cortada para favorecer la salida de la sangre junto con el búfer, permitiendo un lavado adecuado del órgano a un flujo fisiológico. Una vez se ha eliminado la sangre, el hígado ha sido perfundido y digerido con el búfer de colagenasa. Tras este proceso, se ha descartado la vesícula biliar para evitar su rotura y la liberación de su contenido enzimático y a continuación, se ha extraído el hígado a una placa de petri cubierta con búfer de perfusión complementado con BSA, donde se ha eliminado la cápsula de Glisson, como paso previo a su disgregación.

3.2. Aislamiento y cultivo de células no parenquimales

Para el aislamiento de las LSECs, la suspensión celular obtenida se ha centrifugado dos veces consecutivas a 54 G durante 2 minutos a 4°C, en las cuales se ha recogido ambas veces el sobrenadante y descartado los sedimentos enriquecidos en células parenquimales. Tras este paso, el sobrenadante se ha centrifugado de nuevo a 1000 G durante 10 minutos a 4°C. El pellet for-

mado ha sido re-suspendido en una solución de perfusión con BSA. Esta solución ha sido añadida a la parte superior de 25% de gradiente de Percoll y se ha centrifugado a 1000 G durante 30 minutos a 4°C sin aceleración ni deceleración para no romper el gradiente. Tras esta centrifugación se han obtenido dos bandas, entre el búfer de BSA y el Percoll al 25% una banda formada por materiales de desechos y una segunda banda entre el 25% y el 50% donde se encuentra la fracción de células no parenquimales. Tras recoger la banda entre las fases de Percoll, consistente en una población enriquecida en LSECs y KCs, se ha centrifugado a 1000 G durante 4°C. Por último, el pellet obtenido se ha resuspendido en medio RPMI y se ha cultivado e incubado en placa de petri durante 10 minutos a 37°C para eliminar las KCs por adhesión diferencial. Tras esta incubación, el medio se ha recogido y se ha lavado la placa con medio para recoger el resto de células no adheridas (LSEC) para volver a incubarlas otros 10 minutos en las mismas condiciones y así eliminar el mayor número posible de KCs. La suspensión celular resultante se ha llevado a una concentración de $1,6 \times 10^6$ células/ml en medio completo suplementado con gentamicina (100 µg/ml), en placas de cultivo cubiertas con colágeno tipo I. Tras 45 min de incubación, los cultivos celulares se han lavado e incubado durante 3 horas más, antes de su uso para la experimentación.

Por otro lado, el aislamiento de las HSCs se ha llevado a cabo utilizando el mismo procedimiento anterior con mínimas modificaciones, como la incorporación de EGTA al búfer de perfusión. Además, el gradiente de Percoll consta de una fase al 25% y otra al 23% de Percoll a diferencia del 25% y 50% de Percoll para la obtención de LSECs. La suspensión celular obtenida se ha llevado a una concentración de $1,8 \times 10^5$ células/ml en placas de 48 pocillos sin colágeno, añadiendo 250 µL de suspensión a cada pocillo. Las células se han mantenido en cultivo durante 24 h en medio de cultivo a bajas concentraciones de SBF (5%) antes de su uso en experimentación.

4. Tratamientos y obtención de medios condicionados

4.2. Preparación de medios condicionados de C26

Los medios condicionados obtenidos a partir de las células tumorales C26, a partir de ahora denominados C26-MC, se han utilizado para diferentes procedimientos experimentales. Para el proceso experimental de western blot en las líneas estromales 3T3 y J774A.1 se ha utilizado C26-MC obtenido tras el cultivo de C26 a una concentración de 5.2×10^4 cl/cm² en medio RPMI completo durante toda la noche. Tras este tiempo se ha remplazado el medio por RPMI al 1% SBF durante 24 horas. A continuación, se ha recolectado el medio, centrifugado a 1200 G durante 5 minutos y almacenado a -20°C hasta su uso.

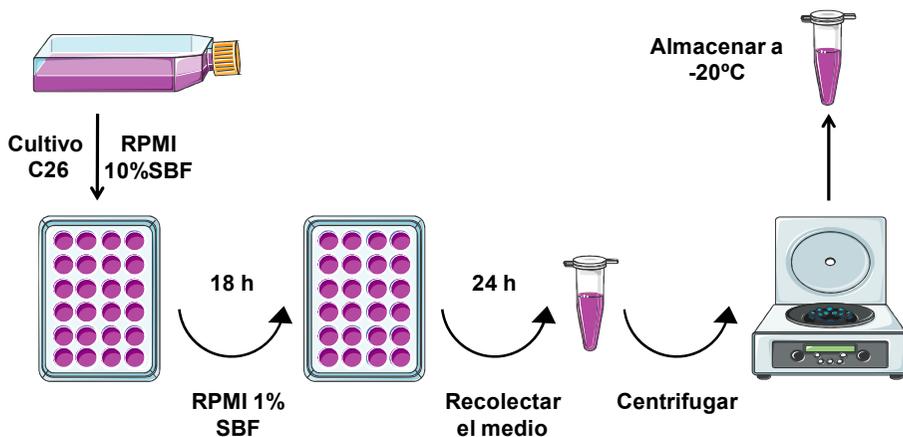


Figura 13. Método de obtención de medio condicionado tumoral.

Por otro lado, para los análisis de la actividad de la COX-2 y la expresión de PGE₂, se han obtenido seis grupos de medios condicionados: **1)** C26-MC de células en condiciones basales; **2)** C26-CM de células activadas con sICAM-1 (200 ng/ml); **3)** C26-CM de células pre-tratadas con 10 µM CLX ; **4)** C26-CM pre-tratadas con 10 µM CLX antes de la activación con sICAM-1 (200 ng/ml); **5)** C26-CM de células pre-tratadas con 20 µM CLX ; **6)** C26-CM pre-tratadas con 20 µM CLX antes de la activación con sICAM-1 (200 ng/ml).

Para obtener estos medios, las células tumorales se han cultivado a una concentración 5.2×10^4 cl/cm² en medio RPMI completo durante toda la noche. Al día siguiente, los tratamientos con CLX, a ambas concentraciones, se han añadido a los cultivos correspondientes durante 1 hora al 1% SBF. Tras este tiempo, se ha reemplazado el medio por RPMI al 1% SBF o por RPMI al 1% SBF con sICAM-1 durante 18 horas. Transcurrido este tiempo, se ha reemplazado el medio por RPMI durante 24 horas y se ha recolectado y procesado como se ha indicado anteriormente.

Para el estudio de la actividad de la COX-2 se ha realizado el mismo proceso pero con un paso previo a la recogida de medio, tratando a las células con ácido araquidónico 10 µM durante 30 minutos.

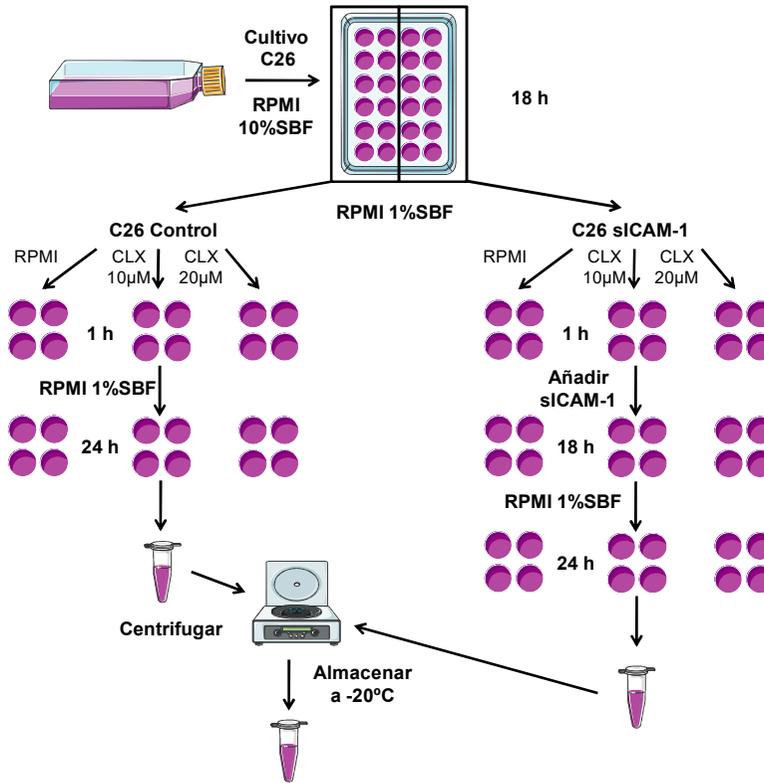


Figura 14. Modelo de obtención del medio condicionado tumoral para los análisis ELISA de PGE₂.

De esta misma manera, se ha obtenido el C26-MC utilizado para los experimentos ELISA de expresión de VEGF y para el análisis de MMPs por medio de zimografías, con la diferencia que sólo se ha utilizado el tratamiento de CLX de 20 µM.

Por último, para el estudio del papel tumoral en la migración y la expresión de VEGF de las HSCs, se han obtenido C26-MC control y C26-MC con CLX 20µM, siguiendo el mismo protocolo explicado anteriormente.

4.2. Preparación de medios condicionados de HSCs

Los medios condicionados de HSCs se han utilizado para estudios de migración tanto tumoral como de las propias HSCs. Estos medios se han dividido en varios grupos de tratamiento: **1)** HSCs: HSCs cultivadas en condiciones basales; **2)** HSCs cultivadas en presencia de C26-CM; **3)** HSCs pre-tratadas con CLX; **4)** HSCs pre-tratadas con CLX y activadas por C26-CM.

Para la obtención de estos medios se han cultivado HSCs a una concentración de 2.5×10^5 células/ml durante 18 horas en medio RPMI completo. Tras este tiempo, se ha añadido CLX a una concentración 20 μ M durante 1 hora en medio RPMI al 1% SBF. A continuación, se ha reemplazado el medio por RPMI al 1% SBF para los controles y con C26-MC diluido 1:2 en medio RPMI al 2% para los activados por el tumor, durante 18 horas. Por último, se ha cambiado el medio por RPMI al 1% SBF y tras 24 horas los medios condicionados se han procesado como se ha explicado anteriormente.

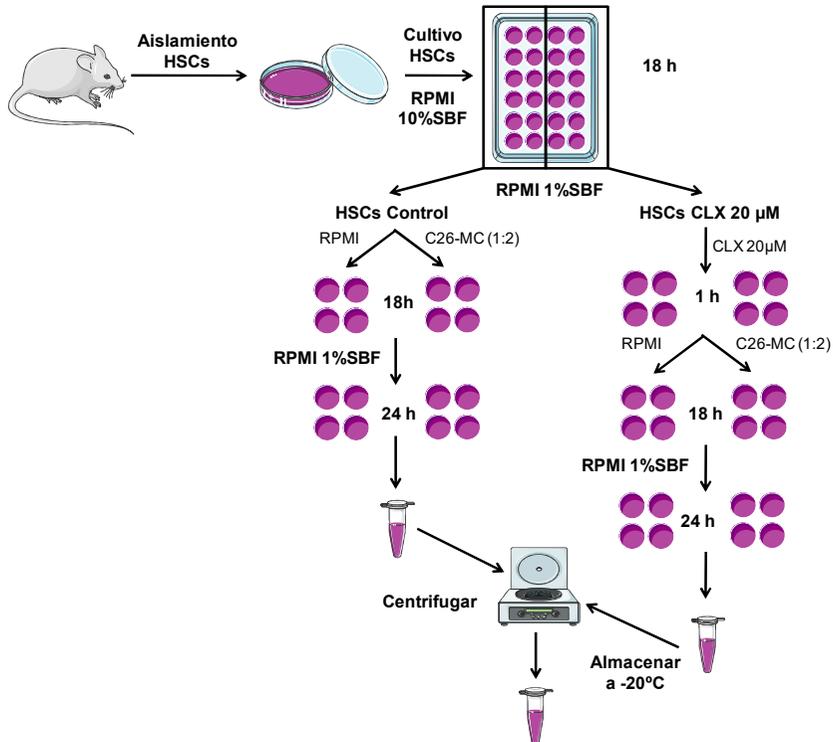


Figura 15. Modelo de obtención de medios condicionados de HSCs para análisis de la capacidad migratoria.

5. Extracción y cuantificación de proteínas

Para el estudio de expresión de proteínas por las diferentes líneas celulares en respuesta a diferentes tratamientos, se han extraído y cuantificado lisados celulares.

Para el análisis de la expresión de COX-2, las células se han cultivado en placas de 24 pocillos a una concentración de 3.95×10^4 cl/cm² en medio de cultivo completo. Se han cultivado durante tres horas antes de cambiar el medio para añadir medio completo con CLX 20 μM. Tras los tiempos de 8

horas y 24 horas, se ha retirado el medio los cultivos y se han lavado exhaustivamente con PBS 1X, para eliminar trazas de suero y desechos celulares.

El búfer de lisis utilizado para la extracción de proteína ha sido el Laemmli 2X que se ha diluido 1:2 con agua destilada y al cual, se ha añadido β -Mercaptoetanol al 1%. Con la mezcla ya elaborada, se ha cubierto cada pocillo entre 8 y 10 veces, para extraer la proteína, se ha recolectado y almacenado a -20°C hasta su cuantificación y su posterior uso.

Para la cuantificación de proteína el lisado celular se ha pasado a través de una jeringuilla de 1 ml un total de 10 veces, para fragmentar el ADN. Tras este proceso, el lisado celular se ha calentado durante 5 minutos a 95°C .

Primero se ha realizado una recta patrón, de rango de concentración de 0 a 1 mg/ml, con cantidades ascendentes de BSA diluido en agua destilada partiendo del stock de 1mg/ml y en Laemmli 2X al 1% de β -Mercaptoetanol (solución de extracción de proteínas). A su vez, las muestras de proteínas se han diluido 1:10 en agua destilada. Una vez se han preparado las muestras y las concentraciones de la recta patrón, se ha añadido TCA en concentración 1:4 a cada una de las muestras y se han incubado a temperatura ambiente, en agitación y oscuridad. Por último, tras un tiempo de 15 minutos se ha medido la absorbancia a 570 nm en el lector de placas Multiskan Ex (Thermo Electron Corporation, Alemania) y con los datos obtenidos se ha obtenido una recta patrón con su ecuación correspondiente. Los valores de absorbancia obtenidos de las muestras se han introducido en la ecuación de la recta patrón y se ha calculado la concentración de proteína de cada una de las muestras en valores de $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

6. Western Blot

Las proteínas expresadas por los cultivos celulares han sido analizadas y cuantificadas por medio de la técnica de western blot, que consiste en una electroforesis, una transferencia a una membrana y un posterior marcaje con anticuerpos específicos para GAPDH, COX-2, FAP, ICAM-1 y MR.

La primera parte de la técnica consiste en una electroforesis con geles de poli-acrilamida. En los pocillos formados en el gel, las proteínas a analizar se han cargado a una concentración de $20\mu\text{g}/\mu\text{L}$, a excepción de uno de ellos, en el que se ha cargado $4\mu\text{l}$ el marcador con el peso molecular. La electroforesis se ha realizado a voltaje constante de 100 V durante hora y media aproximadamente. Una vez acabada la electroforesis, el gel se ha incubado durante 10 minutos en el búfer de transferencia. A continuación, se ha preparado el “sándwich de transferencia” que consiste en colocar el gel entre capas consistentes de una esponja, los filtros y la membrana de nitrocelulosa, previamente empapados en búfer de transferencia. Tras colocar estos elementos en un compartimento especializado que permite la transferencia de las proteínas del gel a la membrana, se ha sometido al mismo a una corriente eléctrica circulante del polo negativo al polo positivo. La transferencia se ha realizado durante 3 horas a una intensidad constante de corriente eléctrica de 380 mA en búfer de transferencia. El proceso se ha realizado en cámara fría y en agitación para evitar el sobre-calentamiento del búfer y favorecer la transferencia de proteínas del gel a la membrana.

Finalizada la transferencia, la membrana se ha incubado con rojo Ponceau S. A continuación, se ha lavado con agua destilada y con TBS-T para eliminar los restos de la tinción y se ha bloqueado durante 1 hora en búfer de bloqueo. Tras este tiempo, se ha procedido a la incubación con el anticuerpo

primario específico para la proteína de interés, el cual se ha diluido en búfer de bloqueo a concentraciones determinadas para cada uno de ellos.

Anticuerpo	Dilución
GAPDH	1:1000
COX-2	1:500
FAP	1:1000
ICAM-1	1:1000
MR	1:1000

Tabla 1. Anticuerpos primarios y diluciones. Resumen de los anticuerpos primarios que se han utilizado en western blot junto con sus diluciones.

Tras una incubación a lo largo de la noche a 4°C, las membranas se han lavado tres veces con TBS-T durante 10 minutos cada lavado y se han incubado durante 2 horas con el anticuerpo secundario diluido en búfer de bloqueo a una dilución 1:1000 para todas las proteínas analizadas excepto para el GAPDH que se ha diluido el anticuerpo secundario 1:2000, para disminuir el ruido de fondo.

Tras otros tres lavados, las membranas se han incubado en HRP diluido 1:500 en búfer de bloqueo durante 30 minutos. Por último, se han lavado las membranas para eliminar el exceso de solución y se han incubado con el substrato Luminata™ Crescendo para revelar la marca obtenida tras todo el proceso. Dicha marca ha sido fotografiada con G:BOX (Syngene, India), una máquina especializada en la fotografía de geles y membranas para su posterior cuantificación a través del software FIJI-ImageJ™.

7. Inmunoensayos enzimáticos: ELISA

Para la inmunodetección de la actividad de la COX-2 y de la expresión de PEG₂ y VEGF liberada al medio por las células, tanto tumorales como en HSCs, se han realizado ensayos ELISA de tipo sándwich. Como paso previo para el análisis de expresión de PGE₂, el día anterior las placas de 96 necesarias para el experimento se han incubado toda la noche con 100 µL del anticuerpo de captura diluido en PBS a una concentración 0.4 µg/ml y se ha sellado la placa para evitar la evaporación.

Al día siguiente, las placas a utilizar se han lavado tres veces con el búfer de lavado. Para la realización de una curva de calibración, se ha diluido en tampón de ensayo de forma seriada la PGE₂ o de VEGF desde una concentración stock conocida y se han añadido 100 µl de cada dilución a su pocillo correspondiente. A su vez, se han añadido 100 µL de cada muestra a analizar y se ha sellado e incubado durante 2 horas. A continuación, se han realizado de nuevo 3 lavados con el búfer de lavado de 5 minutos cada uno, se ha añadido 100 µL de anticuerpo de detección conjugado con HRP y se ha incubado durante 2 horas. Tras este tiempo, se han realizado de nuevo los lavados y se han añadido 150 µL de la solución de sustrato, la cual se ha incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente en movimiento. Por último, la reacción se ha detenido al añadir 100 µL de una solución de 1M de ácido sulfúrico y se ha medido la absorbancia a 450 nm en el lector de placas Multiskan Ex (Thermo Electron Corporation, Alemania).

8. Análisis Zimográfico

La expresión de la MMP-2 ha sido cuantificada mediante técnicas zimográficas que permiten detectar la acción de MMPs en diferentes tipos de muestras. La zimografía es un proceso experimental que consiste en la electroforesis de un gel de poli-acrilamida suplementado con gelatina tipo A, la cual va a ser degradada por las MMPs presentes en los medios condicionados que se desplazan verticalmente a través del gel.

Los medios obtenidos según se ha descrito anteriormente, se han cargado en el gel en dilución 1:2 en búfer de zimografía. A continuación, se ha realizado la electroforesis en búfer de electroforesis durante 1 hora y media, aproximadamente, a un voltaje constante de 100 V. Una vez finalizada la electroforesis el gel se ha incubado en una solución al 5% de Triton X-100. Tras este paso, los geles se han embebido durante 24 horas en búfer de incubación, permitiendo la digestión de la gelatina presente en el gel de forma proporcional a la expresión de las enzimas en aquellas posiciones determinadas por su tamaño.

Al cabo de ese tiempo, el gel se ha teñido con un búfer consistente en una solución de Azul Comassie, que tiñe la gelatina de forma evidente permitiendo la observación de bandas claras en los lugares en la que ha sido digerida por las MMPs. Posteriormente, los geles se han desteñido parcialmente para aumentar el contraste y se han fijado en un búfer de equilibrio. Por último, los geles han sido fotografiados para su cuantificación en la máquina G:BOX (Syngene, India) y se han cuantificado a través de la utilización del software libre de análisis de imagen FIJI-ImageJ™.

9. Geles de Electroforesis

9.1. Gel para Western Blot 10% de Bis-Acrilamida

Los geles para la detección de proteínas por medio de la técnica de western blot se han realizado a una concentración final del 10% de bis-acrilamida. Los geles de electroforesis están compuestos por 2 partes, la parte inferior se le denomina gel de resolución y la parte superior, se le denomina gel de concentración. A continuación se detallan las composiciones de cada uno de ellos (tabla 2 y 3):

Gel de resolución 10%	
1 gel de 1.5 mm	
Bis-Acrilamida	3.32 ml
dH ₂ O	4 ml
Tris HCl 1 M pH 8.8	2.5 ml
SDS 10%	100 µl
APS 40%	50 µl
TEMED	10 µl

Tabla 2. Composición detallada del gel de resolución al 10%.

Gel de concentración 4%	
1 gel de 1.5 mm	
Bis-Acrilamida	1.32 ml
dH ₂ O	3 ml
Tris HCl 0.5 M pH 6.8	1.25 ml
SDS 10%	50 µl
APS 40%	24.4 µl
TEMED	10 µl

Tabla 3. Composición detallada del gel de concentración al 4%.

9.2. Gel para Zimografía

Para el estudio de las MMPs presentes en el medio, se han realizado geles de electroforesis para ensayos zimográficos. En este caso, la concentración de bis-acrilamida es del 7.5%. Los geles, al igual que para western blot, se dividen en dos partes, con la diferencia de que en el gel de resolución se ha añadido gelatina y en ambas partes se ha incorporado glicerol, para darle densidad al gel y obtener bandas más contrastadas. A continuación se detallan las composiciones de cada uno de ellos (tabla 3 y 4):

Gel de resolución 7.5%	
1 gel de 0.75 mm	
Bis-Acrilamida	875 μ l
dH ₂ O	290 μ l
Tris HCl 1.5 M pH 8,8	875 μ l
SDS 20%	17.5 μ l
Glicerol 66%	400 μ l
Gelatina 0.5%	1 ml
APS 40%	20 μ l
TEMED	5 μ l

Tabla 4. Composición detallada del gel de resolución al 7.5%.

Gel de concentración 4%	
1 gel de 0.75 mm	
Bis-Acrilamida	423 μ l
dH ₂ O	850 μ l
Tris HCl 0.5 M pH 6.8	640 μ l
SDS 10%	13 μ l
Glicerol 66%	570 μ l
APS 40%	15 μ l
TEMED	5 μ l

Tabla 5. Composición detallada del gel de concentración al 4%.

10. Ensayos de migración celular

10.1. Test de la Herida

El efecto de los factores solubles presentes en el medio sobre la capacidad migratoria de las células se ha analizado por medio del “Test de la herida”.

Por un lado, se ha estudiado la capacidad migratoria tumoral de las C26 en respuesta al CLX y a la ICAM-1. Para ello las células se han cultivado a una concentración de 10.5×10^4 cl/cm² durante toda la noche en medio de cultivo completo. Al día siguiente, se han tratado con mitomicina a una concentración de 1µg/ml durante 3 horas en medio al 1% SBF. A continuación, se ha retirado el medio y se ha realizado una la herida, línea recta vertical por el medio del pocillo, marcando un punto en la mitad de dicha línea. Después, se ha lavado con medio para retirar las células eliminadas y los cultivos celulares se han incubado con los tratamientos específicos a cada situación experimental al 1% de SBF. Los tratamientos se describen a continuación:

- **Control:** Tratamiento con medio al 1% de SBF.

- **CLX:** Tratamiento durante una hora de 20 µM.

- **sICAM-1:** Activación mediante 200 ng/ml de sICAM-1 durante 24 h.

- **CLX + sICAM-1:** 1 hora de incubación con 20 µM de CLX seguido de 23h de estimulación con 200 ng/ml sICAM-1.

Se han realizado fotografías a tiempo 0 y se han comparado con las realizadas tras 24 horas. Las imágenes se han procesado por medio del programa FIJI-ImageJ™, se ha calculado el área ocupada por cada herida y se han analizado los cambios producidos tras las 24 horas de incubación. Los datos obtenidos han permitido el cálculo de porcentaje de cierre de la herida para cada situación experimental.

Por otro lado se ha analizado la capacidad migratoria de las líneas 3T3 y J774A.1 en respuesta a factores solubles tumorales tras distintos tratamientos. Para ello, las células se han cultivado a una concentración de 5.2×10^4 cl/cm² en placas de 24 pocillos durante 24 horas en medio completo. Posteriormente, las líneas celulares se han tratado durante 2 horas con mitomicina a una concentración de 5 µg/ml para 3T3 y de 1 µg/ml para J774A.1, en medio al 1% de SBF. A continuación, se ha procedido al igual que se ha descrito anteriormente. Sin embargo, los tratamientos utilizados han sido los C26-MC obtenidos previamente.

10.2. Migración a través de Transwell

La capacidad migratoria a través de una fina capa de colágeno se ha cuantificado mediante insertos o cámaras de Boyden modificadas, consistentes en un pocillo cuya base está formada por una membrana con poros de 8 µm. Tras haber cubierto las membranas con una capa de colágeno tipo I, las células se han cultivado en la parte superior de los insertos a una concentración de 5.2×10^4 cl/cm² suplementadas al 5% de suero durante 2-3 horas, para permitir su adhesión. Transcurrido este tiempo, el medio de cultivo se ha sustituido por los tratamientos correspondientes a cada condición experi-

mental y se han incubado en condiciones estándar a diferentes tiempos según la línea celular.

Tras el tiempo de incubación, los insertos se han lavado suavemente con PBS 1X y se han retirado las células del compartimento superior. A continuación, los insertos se han fijado en formaldehído al 4% y teñido con cristal violeta al 0.05%. Finalmente, la membrana situada en la base de las cámaras se ha cortado y montado en portaobjetos. Para el análisis y cuantificación de células migradas, las membranas se han fotografiado mediante un microscopio óptico y se han analizado mediante el software FIJI-Image J™.

11. Proliferación celular

Para determinar el efecto de factores solubles de cultivos sobre la viabilidad celular se han realizado ensayos con PrestoBlue™.

En paralelo, se ha cultivado el tipo celular a analizar en concentraciones decrecientes 1:2 en un rango de 15.6×10^4 cl/cm² hasta 0, con el objetivo de obtener una recta patrón de la que extrapolar la absorbancia con el número de células. Por otro lado, las células a tratar se han cultivado a una concentración de 1.56×10^4 cl/cm² y se han incubado durante 24 horas en medio suplementado con 5% SBF, antes de establecer las diferentes condiciones experimentales.

Para el establecimiento de la curva estándar y la extrapolación del número inicial de células, tras 24 horas, se ha sustituido el medio por PrestoBlue™ diluido 1:10 en medio fresco y se ha dejado incubar 2 horas y media. Tras este tiempo, se ha cuantificado la absorbancia en el lector de placas Multies-

kan Ex (Thermo Electron Corporation, Alemania) a 570 y a 620 nm. A través de un procesamiento estadístico se ha obtenido una recta patrón y su ecuación para la extrapolación de la absorbancia en número de células.

En aquellos cultivos destinados a experimentación, se ha sustituido el medio con los tratamientos correspondientes a cada condición experimental. Tras 24 horas, los medios experimentales se han sustituido por una solución de PrestoBlue™ diluido 1:10 en medio fresco y se ha procedido de la misma manera que se ha descrito para la recta patrón.

12. Desarrollo experimental de metástasis hepática

El desarrollo experimental de metástasis hepáticas se ha llevado a cabo mediante inyección intraesplénica (i.s.) de las células tumorales de carcinoma de colon (C26) en ratones singénicos Balb/c. En primer lugar, los ratones Balb/c han sido anestesiados con 50 mg de Nembutal/kg por medio de inyección intraperitoneal (i.p). Una vez el ratón se ha encontrado bajo los efectos de la anestesia, se ha procedido a abrir la cavidad peritoneal mediante un pequeño corte en el lado izquierdo bajo las costillas. Seguidamente, se ha expuesto el polo inferior del bazo y se ha inoculado de forma lenta 100 μ L de una suspensión celular (2×10^5 cl/100 μ l) en PBS 1X estéril. Una vez que las células han sido inoculadas y se ha controlado el posible sangrado y una posible retracción de la suspensión celular tapando la zona de inyección con papel de filtro, los bazos han sido introducidos en su lugar y se ha suturado tanto el peritoneo como la piel con hilo de sutura estéril.

Tras 14 días los ratones se han sacrificado por medio de dislocación cervical. El hígado de cada uno de ellos se ha extraído y sumergido en medio de

fijación de zinc durante 12 horas. Tras este tiempo, se ha sustituido por alcohol 50%. Los hígados fijados se han sometido a un proceso de deshidratación y posteriormente se han embebido en parafina. Tras este proceso, se han obtenido los bloques de tejido para su procesamiento.

Dentro del desarrollo experimental de metástasis hepáticas, los ensayos se han dividido en cuatro, dependiendo de los tratamientos tanto previos como durante el desarrollo experimental en los ratones o en las células tumorales.

12.1. Bloqueo *in vivo* mediante anticuerpo del LFA-1 tumoral

Para el estudio del efecto de la integrina LFA-1 en el desarrollo metastásico, modulando la interacción ICAM-1/LFA-1, se ha realizado un ensayo bloqueando la sub-unidad α L de la LFA-1. Para este bloqueo, se ha utilizado un anticuerpo anti- α L, el cual se ha incubado durante 45 minutos con las células tumorales C26, como paso previo a su inyección a una concentración de $1\mu\text{g}/10^6$ células. Además, se ha estudiado el papel de la ICAM-1 en la activación tumoral por medio de sICAM-1. Para ello las células tumorales C26 se han pre-activado durante 18 horas con sICAM-1 a una concentración de 200 ng/ml. En total, en este proceso experimental se han obtenido tres grupos:

- **Grupo 1:** ratones inyectados con células C26 sin tratar, como control.

- **Grupo 2:** ratones inyectados con células C26 pre-activadas con sICAM-1.

- **Grupo 3:** ratones inyectados con células C26 pre-tratadas con anticuerpo bloqueante anti- α L del LFA-1.

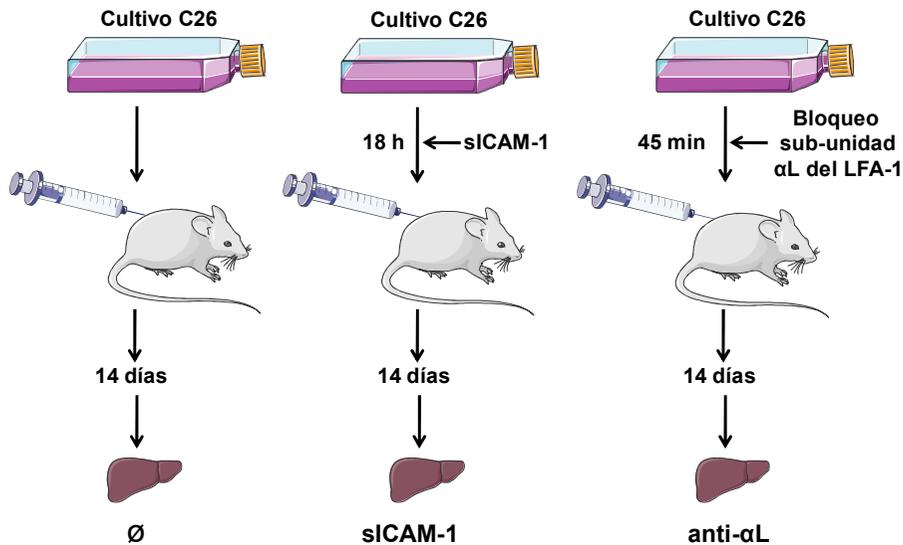


Figura 16. Esquema representativo de los diferentes grupos experimentales en el desarrollo metastásico *in vivo* modulado por la deficiencia de la sub-unidad α L del LFA-1.

12.2. Silenciamiento *in vivo* de ICAM-1

Para silenciar la ICAM-1 *in vivo* se ha utilizado un “stealth” siRNA debido a su mayor sensibilidad y estabilidad tanto en suero como en cultivos celulares. Para dicho silenciamiento, se han inoculado 2’5 mg/kg de siRNA ICAM-1 diluido en PBS 1X a través de la vena de la cola 48 y 24 horas antes de la inyección de células tumorales y 24 horas después. Además, al tercero y al sexto día después de la inyección de las células tumorales se ha administrado otra dosis de silenciamiento de forma intraperitoneal. En este proceso se han obtenido dos grupos experimentales:

- **Grupo 1:** animales inyectados con células C26 en ratones tratados con “stealth siRNA” inespecífico.

- **Grupo 2:** animales inyectados con células C26 en ratones tratados con “stealth siRNA” específico para la ICAM-1 endotelial.

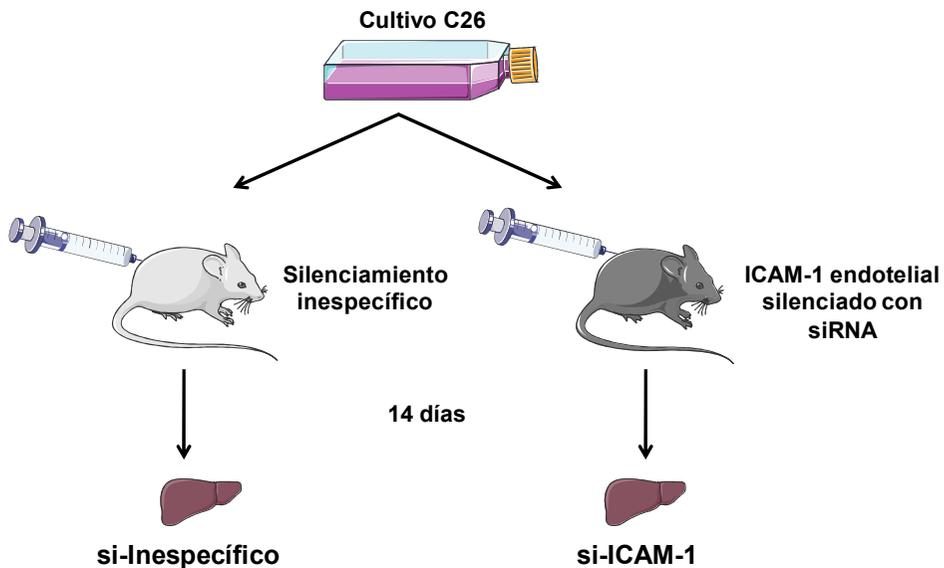


Figura 17. Esquema *representativo* de los dos grupos experimentales en el desarrollo metastásico *in vivo* modulado por el silenciamiento de ICAM-1.

12.3. Inhibición de la COX-2 *in vivo*

Por otro lado, para el análisis del efecto de la COX-2 sobre el desarrollo metastásico se ha realizado un ensayo con células tumorales control o pre-activadas con siICAM-1 a una concentración de 200 ng/ml durante 18 horas y con ratones control o tratados con dosis diaria de CLX por vía oral a una concentración de 100 µg/kg de ratón. Dado estos tratamientos, en este proceso se han establecido cuatro grupos experimentales:

- **Grupo 1:** animales inyectados con células C26 en ratones sin tratar, como control.

- **Grupo 2:** animales inyectados con células C26 en ratones con un tratamiento diario de CLX.

- **Grupo 3:** animales inyectados con células C26 pre-activadas con sICAM-1.

- **Grupo 4:** animales inyectados con células C26 pre-activadas con sICAM-1 y tratadas diariamente con CLX.

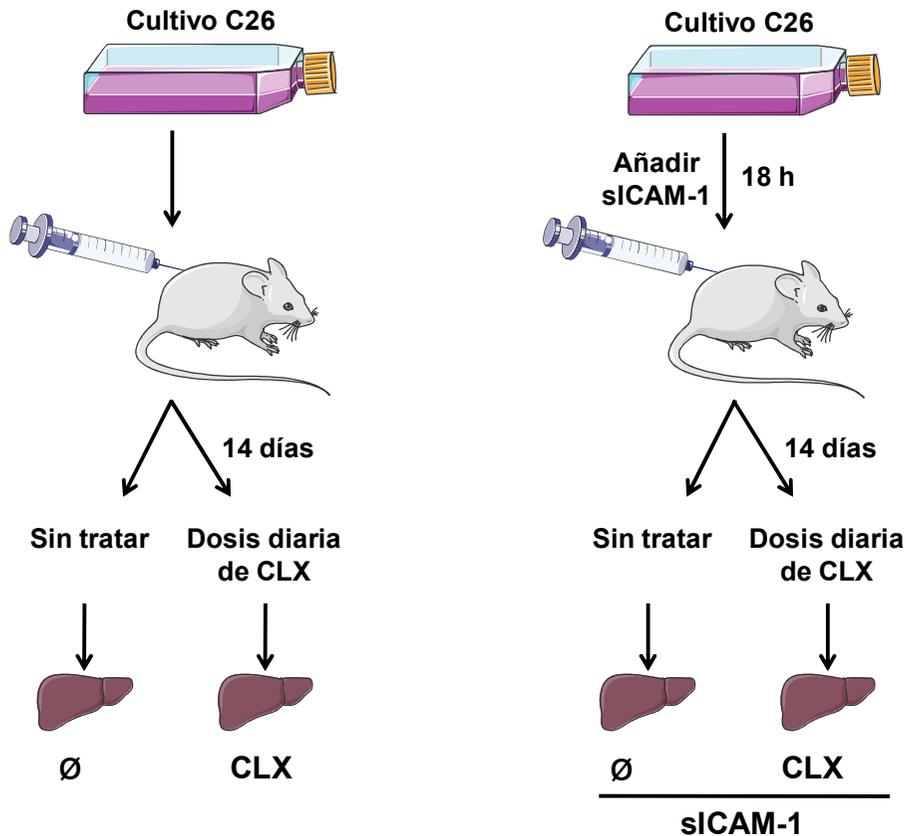


Figura 18. Esquema representativo de los diferentes grupos experimentales en el desarrollo metastásico *in vivo* modulado por la COX-2 y la ICAM-1.

12.4 Bloqueo *in vivo* mediante anticuerpo del MR endotelial

Para el estudio del efecto del bloqueo *in vivo* del MR se ha utilizado un anticuerpo primario hecho en ratón del receptor CD206 con el isotipo IgG2a. Primero al grupo de ratones tratamiento del silenciamiento del MR se les ha inoculado de forma intra-peritoneal 500 µg/kg del anticuerpo 30 minutos antes de inyectar en el bazo las células tumorales C26. Tras 24 y 48 horas después de la inyección, se ha tratado a los ratones con la misma dosis y por vía intra-peritoneal. Por otro lado, en el grupo de ratones control, el proceso

ha sido el mismo pero con la misma dosis pero se ha utilizado un anticuerpo inespecífico IgG2a. Debido a estos tratamientos, en este proceso se han establecido dos grupos experimentales:

- **Grupo 1:** animales inyectados con células C26 en ratones sin tratar, como control.
- **Grupo 2:** animales inyectados con células C26 en ratones bloqueando el MR con un anticuerpo.

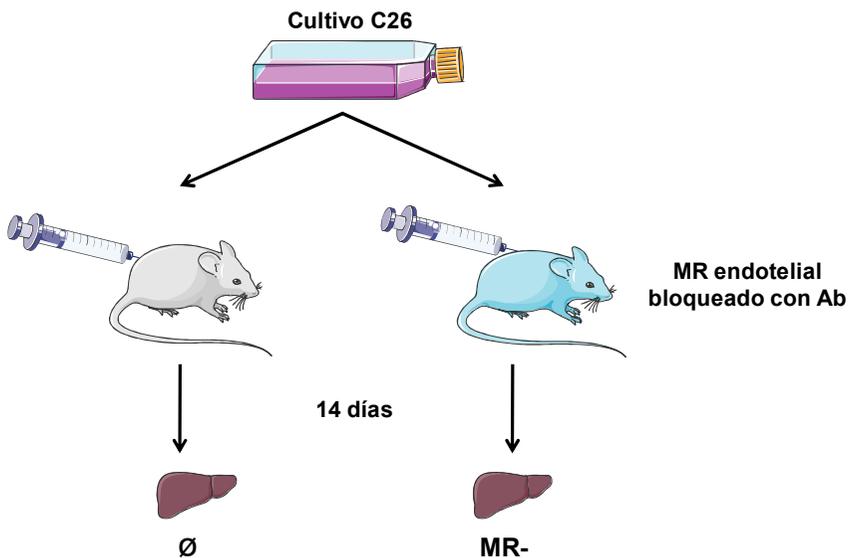


Figura 19. Esquema representativo de los dos grupos experimentales en el desarrollo metastásico *in vivo* modulado por el bloqueo del MR

13. Análisis histológicos

13.1. Preparación de muestras

Con las muestras de hígados embebidas en parafina se han realizado cortes de 6 micras de grosor con el micrótopo HM 235 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y se han depositado en portaobjetos poli-lisados durante 24 horas en una estufa a 37°C. A continuación, se han utilizado los diferentes cortes en análisis histológicos e inmunohistológicos.

13.2. Hematoxilina-Eosina

Para la cuantificación del desarrollo metastásico, se han analizado secciones de tejido hepático teñidas con hematoxilina-eosina. Las secciones se han sometido a un proceso de rehidratación mediante la inmersión en una serie de alcoholes a concentraciones decrecientes. Las muestras se han teñido en primer lugar con hematoxilina Gill (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) durante 2 minutos y 30 segundos y a continuación, con eosina (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) durante 25 segundos. Tras esta tinción las secciones se han deshidratado y se han montado para su visualización y análisis. Para la cuantificación se han analizado seis secciones de cada hígado con una distancia de 300 micras entre cada sección. El tejido hepático se ha visualizado mediante el microscopio óptico Zeiss (Alemania) y se han realizado fotografías de la sección total del hígado a un tamaño de 4X aumentos, para su posterior análisis mediante el software FIJI-ImageJ™.

13.3. Marcaje de colágeno fibrilar (Rojo Siria)

Se ha realizado la tinción de Rojo Siria para detectar la acumulación de colágeno fibrilar intratumoral. Las muestras se han re-hidratado por medio de una serie decreciente de alcoholes. A continuación se han incubado durante 30 minutos en una solución de “Fast Green”, diluido en una solución saturada de ácido pícrico. Posteriormente, tras un lavado en agua miliQ, se ha procedido al segundo paso de la tinción, con “Fast Red”, diluido en una solución de ácido pícrico saturada durante otros 30 minutos. Por último, tras un lavado final, las secciones se han sometido a un proceso de deshidratación sumergiendo las secciones en una serie creciente de alcoholes y se han montado. El porcentaje colágeno fibrilar, representado por fibras rojas sobre un fondo verde, se ha cuantificado por medio del software FIJI-ImageJ™.

14. Análisis inmunohistológicos

14.1 Marcaje alfa actina de músculo liso (α -SMA)

El marcaje de alfa actina de músculo liso (α -SMA) en cortes de hígado con se ha realizado a través de una técnica inmunohistoquímica con cuantificación colorimétrica. Los cortes de parafina se han deshidratado por medio de alcoholes decrecientes seriados. A continuación se han incubado durante 40 minutos en una solución de citrato a un pH ácido a una temperatura entre 90-95°C para desenmascarar los antígenos y facilitar el proceso de marcaje. Después se han atemperado 20 minutos en agua destilada, se han secado los portas, se han colocado en una cámara húmeda y se ha marcado la zona de tejido con un bolígrafo hidrofóbico para evitar que la muestra se seque. Durante 40 minutos se ha incubado al tejido con una solución de bloqueo de

PBS 1X al 3% de H₂O₂. El siguiente paso ha sido hacer tres lavados de 5 minutos cada uno con una solución de PBS 1X al 0,05% de Tween, para eliminar restos de la solución de bloqueo. Tras los lavados, las muestras se han incubado con otra solución de bloqueo compuesta por PBS 1X al 5% SBF durante 1 hora. Después de este bloqueo las muestras se han vuelto a lavar tres veces con la solución de lavado y se han incubado 30 minutos con la solución de bloqueo Fab. Una vez transcurrido el tiempo se han vuelto a realizar los lavados y se ha incubado durante toda la noche en cámara fría y húmeda con el anticuerpo para el marcaje de α -SMA diluido 1:500 en búfer de BSA. Al día siguiente, se han realizado otros tres lavados de 5 minutos y se ha incubado al tejido durante 1 hora con anticuerpo secundario biotinilizado diluido 1:1000 en solución de BSA. Transcurrido el tiempo, se ha vuelto a lavar el tejido tres veces durante 5 minutos cada una y se ha incubado 30 minutos con estreptavidina-HRP diluida 1:500 en búfer de BSA. A continuación, se ha vuelto a lavar las muestras tres veces de 5 minutos y se ha añadido el sustrato DAB durante 2 minutos. Por último, se han realizado tres lavados más S y se ha hecho una tinción de 1 minuto en hematoxilina para el contraste. A continuación, las muestras se han deshidratado por incubación seriada creciente de alcoholes y se han montado. Se han dejado secar 24 horas y se han analizado al microscopio óptico, mediante la captura de fotos de la superficie del tejido. Por medio del software FIJI-ImageJ™ se ha cuantificado el porcentaje de α -SMA.

14.2. Marcaje de macrófagos F4/80

Durante el desarrollo tumoral, las poblaciones de macrófagos se dirigen y se infiltran en el tumor. Para analizar el porcentaje de infiltración ha sido necesario el marcaje específico de macrófagos con la proteína F4/80.

Para este proceso, las muestras de tejidos se han deshidratado en concentraciones decrecientes de alcoholes. Los portas se han secado y rotulado la muestra con bolígrafo hidrofóbico y se han incubado durante 40 minutos en la solución de bloqueo al 3% de H₂O₂. A continuación se han incubado durante 30 minutos en un tampón de Tris-EDTA con proteinasa K para favorecer el desemascaramiento de los antígenos. Tras este tiempo, se han lavado tres veces las muestras con búfer de lavado y se han incubado durante 1 hora con búfer de bloqueo, PBS 1X al 5% SBF. Pasada la hora, se han repetido los lavados y se ha incubado a las muestras en cámara húmeda y fría durante toda la noche con una dilución 1:500 del anticuerpo F4/80 en búfer de BSA. Al día siguiente, las muestras se han lavado y se han incubado durante 1 hora en un anticuerpo secundario conjugado con biotina diluido 1:1000 en búfer de BSA. Al cabo de este tiempo, se ha vuelto a lavar el tejido y se ha incubado con HRP durante 30 minutos en una dilución 1:500 en solución de BSA. Para finalizar, las muestras se han lavado, se han incubado 2 minutos en DAB, se han contrastado con hematoxilina durante 1 minuto y se han vuelto a deshidratar por serie creciente de alcoholes para montarlas con DPX y poder analizarlas. Para ello se han realizado fotos de los tejidos y por medio del software FIJI-ImageJ™ se ha cuantificado el porcentaje de marcaje F4/80.

15. Procesamiento estadístico

Todos los valores obtenidos de los diversos ensayos experimentales han sido expresados en función de la media \pm desviación estándar (DE). Para el análisis estadístico de resultados no paramétricos de los resultados junto con la realización de las gráficas se ha utilizado el programa GraphPad Prism 5. Por otro lado, el test de análisis paramétrico “T de Student” se ha realizado

por medio del Microsoft Excel. Ambos análisis con un intervalo de confianza del 95% ($p. value < 0.05$).

Resultados

1. Estudio *in vivo* del papel de ICAM-1/LFA-1 desarrollo tumoral de C26

Como se ha explicado anteriormente, la intravasación al hígado de las células tumorales requiere de su interacción con las LSECs a través de moléculas de adhesión. En base a resultados previos, la unión entre la ICAM-1 presente en las células endoteliales y la LFA-1 expresada por las células tumorales C26 favorece la infiltración al hígado. Además, también se ha observado que tras la interacción ICAM-1/LFA-1, se incrementan los niveles de ICAM-1 en el microambiente tumoral, activando la capacidad tumoral de las células C26 (78,80).

El estudio de esta interacción *in vivo* se ha realizado desde dos puntos de vista, primero se ha bloqueado la subunidad α L de la integrina LFA-1 en las células C26, con un anticuerpo anti- α L como se ha explicado anteriormente en métodos. Posteriormente, se ha silenciado parcialmente la expresión de ICAM-1 endotelial en ratones, a través de si-ARN.

Para cada proceso experimental, se han utilizado cortes de hígado de 6 μ m de grosor. Estos cortes se han procesado de la manera adecuada a cada análisis y se han fotografiado a aumentos de 4X (para la capacidad metastásica) y a 10X (para el resto de análisis). Las imágenes se han analizado a través del software FIJI-ImageJ.

La capacidad metastásica de las células tumorales C26 se ha analizado a través de la tinción de hematoxilina-eosina. Para comprender el papel de las HSCs en la formación del TME y el desarrollo tumoral, se ha realizado el marcaje inmunohistoquímico de α -SMA. Además, sabiendo el papel clave de los HSCs en la deposición de colágeno, generada por un aumento de la respues-

ta desmoplásica, se ha realizado la tinción de Rojo Siria. Por último, para el estudio del papel de las KCs en la formación de TME y desarrollo tumoral, se ha realizado un análisis inmunohistoquímico de F4/80.

1.1. Estudio *in vivo* de la integrina LFA-1 en el desarrollo tumoral hepático de C26

Para el estudio de la integrina LFA-1 se han utilizado ratones Balb/c inyectados con células tumorales C26 control, pre-activadas con sICAM-1 (debido a su poder activador sobre las células tumorales) o pre-tratadas con anti- α L, como se ha explicado anteriormente en métodos.

1.1.1. Efecto de la integrina LFA-1 tumoral en la capacidad metastásica de C26.

El análisis del bloqueo de la sub-unidad α L esta integrina en el desarrollo metastásico ha disminuido el porcentaje de área tumoral con respecto al control aproximadamente al 50%. Además, la capacidad metastásica de las células tumorales C26 se ha incrementado en otro 50% al ser pre-activadas con sICAM-1 antes de su inyección (gráfica B).

Junto con este porcentaje de área total ocupada por el tumor, se han estudiado las diferencias en la media del número de focos de cada tratamiento, agrupados en cuatro rangos de tamaño de foco (gráfica C). Estos rangos se dividen en: rango 1 de 0 a 0.2 μ m, rango 2 de 0.2 μ m a 0.6 μ m, rango 3 de 0.6 μ m a 2 μ m y rango 4 de 2 μ m en adelante.

Los resultados han reflejado una disminución de la media del número de focos a medida que estos aumentan su tamaño en todos los tratamientos. Sin embargo, en las células tumorales C26 pre-activadas con sICAM-1, el número de focos ha sido superior en todos los rangos de tamaño, respecto al control. Por otro lado, el número de focos en el grupo de células pre-tratadas con anti- α L se han localizado siempre por debajo tanto del grupo sICAM-1 como control durante todos los rangos de tamaño de foco.

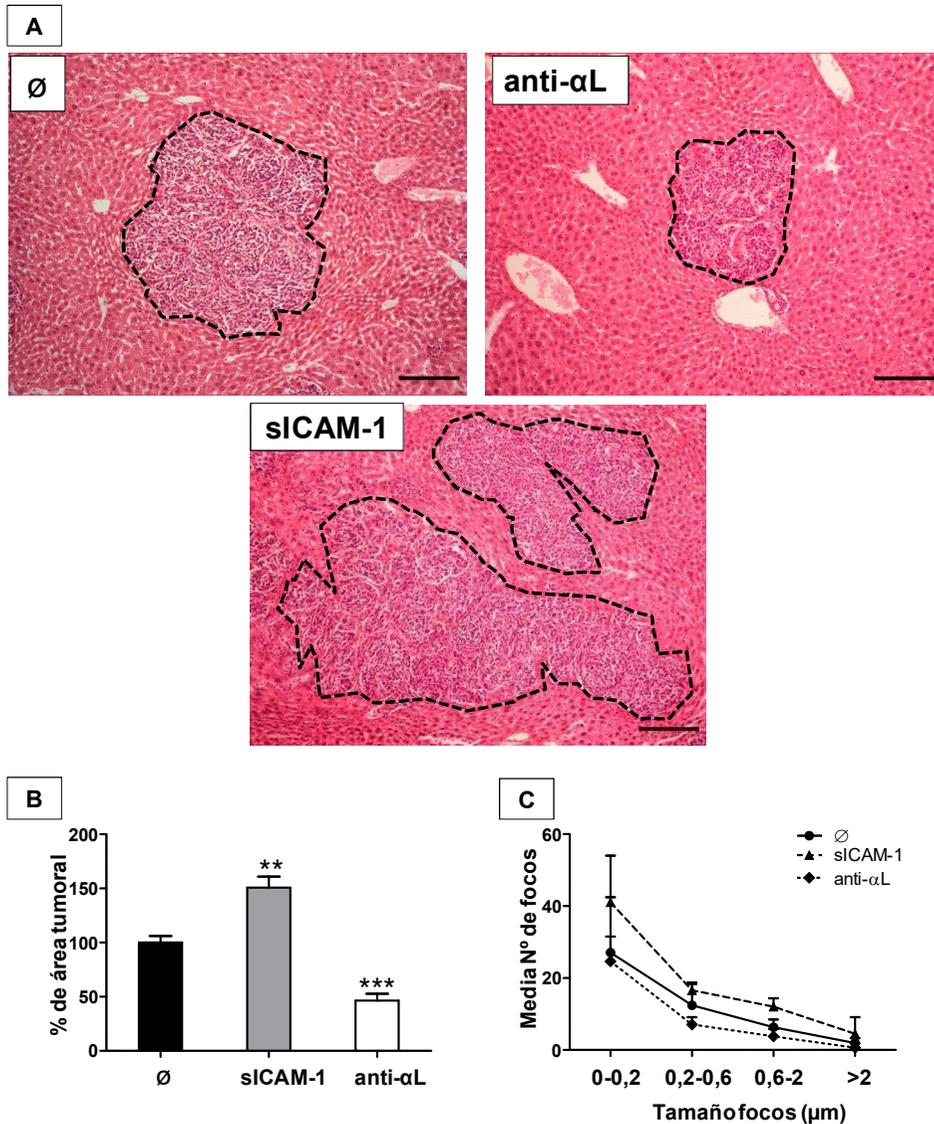


Figura 20. Efecto del bloqueo de la subunidad α L del LFA-1 en células tumorales C26 en la capacidad metastásica hepática *in vivo*. (A) Fotografías representativas a microscopía óptica de ratones inoculados con células C26 control, pre-activadas con sICAM-1 o pre-tratadas con anti- α L. (B) Cuantificación del porcentaje total de área tumoral respecto al control (100%) y (C) media del número de focos totales del tejido hepático por cada rango de tamaño. Resultados presentados como la media \pm DE. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$ significancia respecto el control. Barra de escala: 200 μ m.

1.1.2. Efecto de la integrina LFA-1 tumoral en el reclutamiento de HSCs

Una vez analizado el desarrollo tumoral hepático, se ha estudiado el papel de la integrina LFA-1 en el reclutamiento de HSCs dentro del TME. Los resultados se han representado como el porcentaje medio intratumoral de α -SMA total de cada tratamiento con respecto al área tumoral (gráfica B) y el porcentaje medio intratumoral de α -SMA en cada rango de tamaño de foco (gráfica C).

El porcentaje medio intratumoral de α -SMA total en los cortes del grupo de ratones siCAM-1 ha aumentado en torno a un 2% respecto al grupo de ratones control. Por otro lado, el porcentaje en el grupo de ratones anti- α L ha disminuido un 3% respecto al grupo control. Además, en la gráfica C, los resultados han mantenido la misma tendencia que lo observado en los porcentajes medios intratumorales. Los cortes de ratones con células pre-activadas con siCAM-1 han reflejado un porcentaje superior de α -SMA con respecto al control en todos los rangos de tamaño. Sin embargo, en los cortes de ratones anti- α L dicho porcentaje ha sido inferior al grupo control en todos los rangos de tamaño.

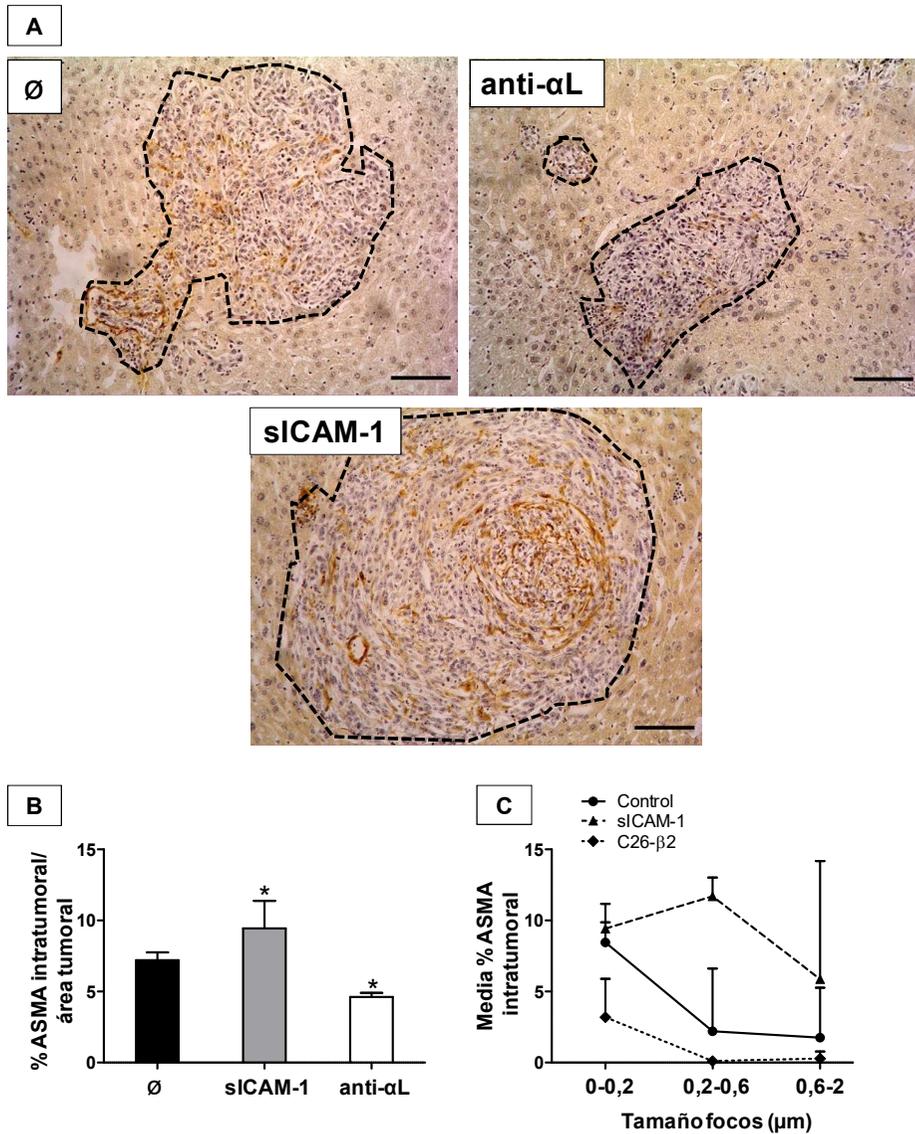


Figura 21. Efecto del bloqueo de la subunidad α L del LFA-1 en células tumorales C26 en el reclutamiento de HSCs *in vivo*. (A) Fotografías representativas del marcaje inmunohistoquímico de α -SMA a microscopía óptica de ratones inyectados con células C26 control, pre-activadas con sICAM-1 o pre-tratadas con anti- α L. (B) Cuantificación del porcentaje medio total de α -SMA intratumoral respecto al área tumoral y (C) media del porcentaje de α -SMA intratumoral por cada rango de tamaño. Resultados presentados como la media \pm DE. * $p < 0.05$ significancia respecto al control. Barra de escala: 100 μ m.

1.1.3. Efecto de la integrina LFA-1 tumoral en la inducción de la respuesta desmoplásica

Tras el análisis del reclutamiento de las HSCs, y sabiendo su implicación en la deposición de colágeno, se ha estudiado la respuesta desmoplásica a través de la tinción Rojo Siria. Los resultados se han dividido en el porcentaje medio intratumoral de colágeno total de cada tratamiento con respecto al área tumoral (gráfica B) y el porcentaje medio intratumoral de colágeno en cada rango de tamaño de foco (gráfica C).

Estos resultados han mantenido la misma tendencia que los anteriores, ya el porcentaje medio total de colágeno de los cortes del grupo de ratones sICAM-1 ha incrementado con respecto al grupo control. Además, siguiendo con esta tendencia, los cortes del grupo anti- α L han disminuido su porcentaje medio tanto respecto al grupo control como al grupo sICAM-1. En relación a la gráfica C, el porcentaje intratumoral de colágeno ha sido superior en los ratones del grupo sICAM-1 para todos los rangos de tamaño con respecto al grupo control. En cuanto al grupo de ratones anti- α L, el porcentaje medio de colágeno para cada rango de tamaño se ha mantenido por debajo del grupo control, siguiendo la misma tendencia que en resultados anteriores.

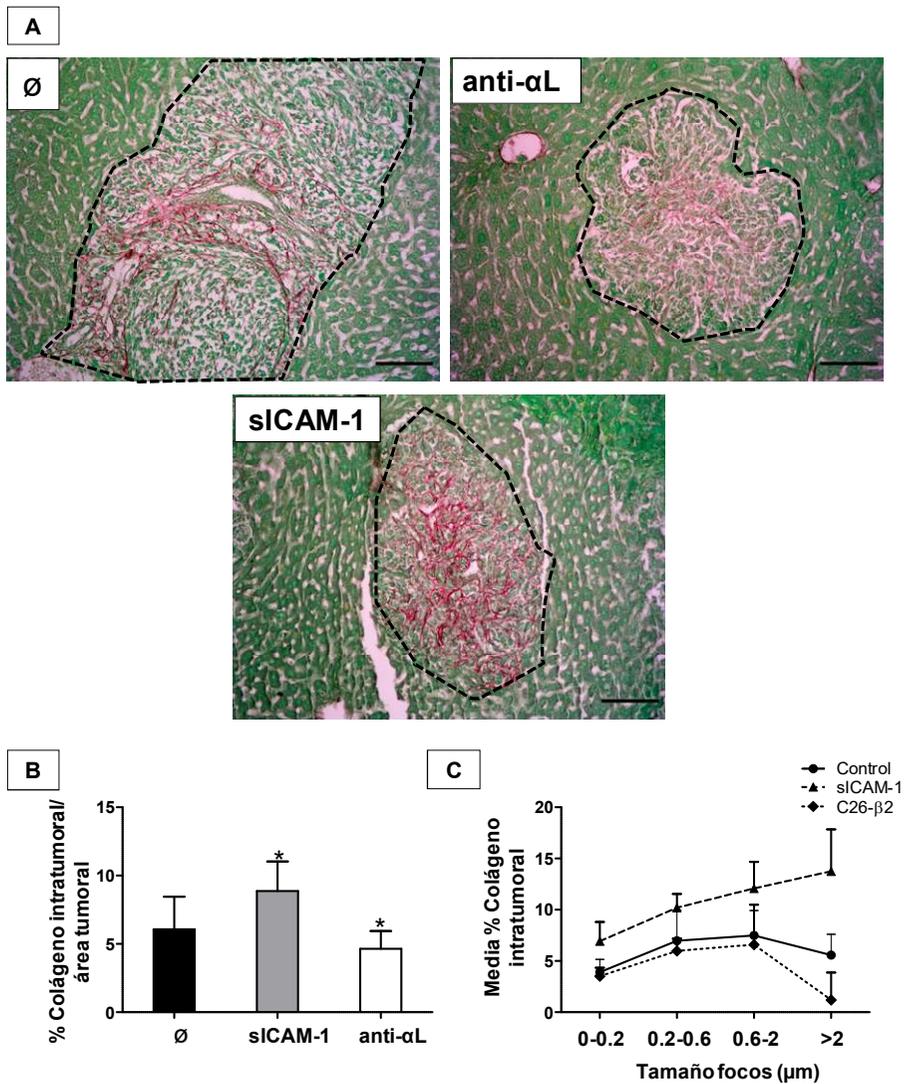


Figura 22. Efecto del bloqueo de la subunidad α L del LFA-1 en células tumorales C26 en la respuesta desmoplásica *in vivo*. (A) Fotografías representativas de la tinción Rojo Siria a microscopía óptica de ratones inyectados con células C26 control, pre-activadas con siCAM-1 o pre-tratadas con anti- α L. (B) Cuantificación del porcentaje medio de Rojo Siria intratumoral respecto al área tumoral y (C) media del porcentaje intratumoral de Rojo Siria por cada rango de tamaño. Resultados presentados como la media \pm DE. * $p < 0.05$ significancia respecto al control. Barra de escala: 100 μ m.

1.1.4. Efecto de la integrina LFA-1 tumoral en el reclutamiento de KCs

Por último, se ha estudiado el efecto de la integrina LFA-1 en el reclutamiento de las KCs, por medio de inmunohistoquímica para F4/80. Al igual que en análisis anteriores, los resultados obtenidos se han representado como el porcentaje medio intratumoral de F4/80 total de cada tratamiento con respecto al área tumoral (gráfica B) y el porcentaje medio intratumoral de F4/80 en cada rango de tamaño de foco (gráfica C).

Los resultados de la gráfica B han mostrado un ligero aumento del 3% de F4/80 en el grupo de ratones con células inyectadas C26 pre-activadas con sICAM-1 respecto al control y una disminución en torno al 5% de dicho porcentaje en el grupo de ratones anti- α L. Por otro lado, en la gráfica C se ha observado un aumento en el porcentaje de F4/80 en todos los rangos de tamaño en ratones con células pre-activadas con sICAM-1 respecto al control, excepto en el rango 0.2-0.6 μ m, donde el porcentaje ha sido similar. En cuanto al grupo de ratones anti- α L, el porcentaje de F4/80 por cada rango de tamaño ha sido inferior al control en todos llegando a ser 0 para áreas superiores de 2 μ m.

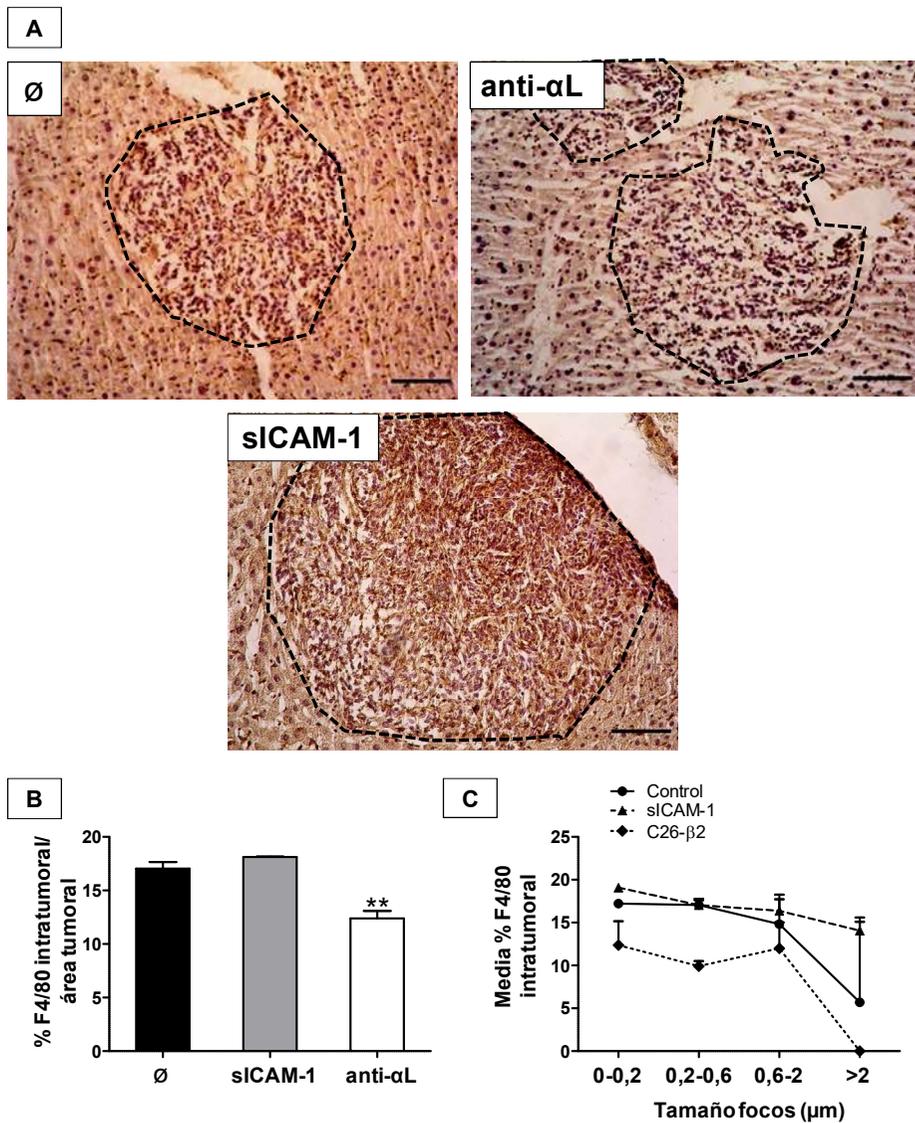


Figura 23. Efecto del bloqueo de la subunidad α L del LFA-1 en células tumorales C26 en el reclutamiento de KCs *in vivo* (A) Fotografías representativas del marcaje de F4/80 a microscopía óptica de ratones inyectados con células C26 control, pre-activadas con sICAM-1 o pre-tratadas con anti- α L. (B) Cuantificación del porcentaje medio de F4/80 intratumoral respecto al área tumoral (C) y media del porcentaje de F4/80 por cada rango de tamaño (C). Resultados presentados como la media \pm DE. ** $p < 0.01$ significancia respecto al control. Barra de escala: 100 μ m.

1.2. Estudio *in vivo* de la ICAM-1 endotelial en el desarrollo tumoral hepático de C26

Tras analizar los resultados obtenidos del papel de la integrina LFA-1 se ha estudiado el papel de la ICAM-1 endotelial hepática. Para ello, se han establecido dos grupos experimentales, un grupo control con ratones silenciados de forma inespecífica, a partir de ahora denominado si-inespecífico y un grupo con ratones silenciados parcialmente para la ICAM-1 endotelial, denominado a partir de ahora cómo si-ICAM-1. El proceso experimental se ha llevado a cabo según se ha descrito anteriormente en métodos. De igual manera que en el estudio de la LFA-1, se ha analizado la capacidad metastásica tumoral y la respuesta desmoplásica, a través de análisis histológicos y el reclutamiento de HSCs y KCs por las técnicas de inmunohistoquímica para marcaje de α -SMA y F4/80.

1.2.1. Estudio del papel de la ICAM-1 endotelial hepática en la capacidad metastásica tumoral de C26

Tras la tinción de hematoxilina-eosina de los dos grupos experimentales, los resultados se han reflejado cómo el porcentaje de área tumoral respecto al tratamiento control (gráfica B). Además, se ha analizado la media de número de focos por cada rango de tamaño pre-establecido (C), de igual manera que en análisis anteriores.

Los resultados han mostrado una disminución significativa de aproximadamente el 70% del área tumoral en los ratones si-ICAM-1 frente a los ratones si-inespecífico (gráfica B). Aún más, el número de focos por cada rango de tamaño pre-establecido ha sido siempre inferior en los ratones si-ICAM-1 con respecto a los ratones con si-inespecífico, siendo esta diferencia mayor

en los tumores de menor área y disminuyendo a medida que el tumor tiene un mayor área (gráfica C).

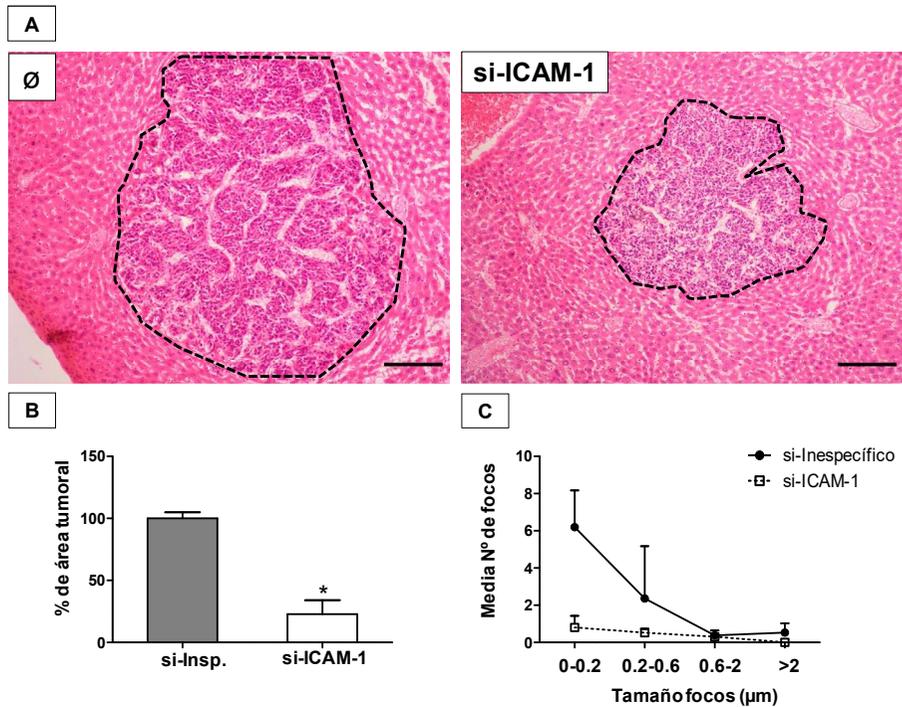


Figura 24. Efecto del silenciamiento *in vivo* de la ICAM-1 endotelial sobre la capacidad metastásica hepática de las células tumorales C26. (A) Fotografías representativas a microscopía óptica de ratones con si-Inespecífico o con si-ICAM-1 e inyectados con células C26. **(B)** Cuantificación del porcentaje total de área tumoral respecto al si-Inespecífico (100%) y **(C)** media del número de focos totales del tejido hepático por cada rango de tamaño. Resultados presentados como la media \pm DE. * $p < 0.05$ significancia respecto al control. Barra de escala: 200 μ m.

1.2.2. Estudio del papel de la ICAM-1 endotelial hepática en el reclutamiento de HSCs

Tras la capacidad metastásica, se ha analizado el reclutamiento de HSCs. El porcentaje medio de α -SMA intratumoral en el grupo de ratones si-ICAM-1 ha disminuido un 50% en comparación al grupo de ratones si-Inespecífico.

Además, esta disminución se ha observado también en los porcentajes de marca intratumorales en los diferentes rangos de tamaño, donde el grupo si-Inespecífico siempre tiene un mayor porcentaje con respecto al grupo de si-ICAM-1, para todos los rangos de tamaño

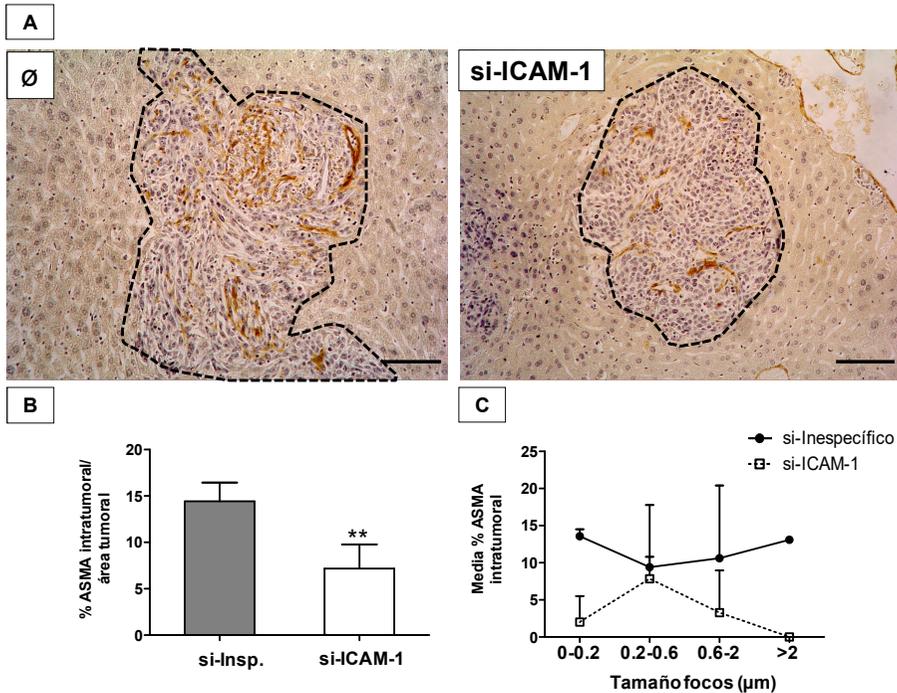


Figura 25. Efecto del silenciamiento *in vivo* de la ICAM-1 endotelial sobre el reclutamiento de HSCs durante el desarrollo metastásico de células C26. (A) Fotografías representativas a microscopía óptica de ratones con si-Inespecífico o con si-ICAM-1 e inyectados con células C26. **(B)** Cuantificación del porcentaje medio total de α -SMA intratumoral respecto al área tumoral. **(C)** Media del porcentaje de marca de α -SMA intratumoral por cada rango de tamaño. Resultados presentados como la media \pm DE. ** $p < 0.01$ significancia respecto al control. Barra de escala: 100 μ m.

1.2.3. Estudio del papel de la ICAM-1 endotelial hepática en la inducción de la respuesta desmoplásica

Siguiendo la misma tendencia se ha analizado la respuesta desmoplásica a través de la tinción de Rojo Siria. Los resultados obtenidos han revelado una

reducción significativa con respecto a la acumulación de colágeno fibrilar. Así, en los ratones tratados con si-ICAM-1, el porcentaje medio intratumoral ocupado por colágeno se ha reducido en un 50% en comparación con los ratones tratados con si-Inespecífico. El patrón se ha repetido al analizar los focos de diferente tamaño, observándose en todos ellos una tendencia a la baja tras el silenciamiento de la ICAM-1, exceptuando el rango de 0,6-2 μ m, donde no se apreció ningún foco de estas características en los ratones tratados con si-Inespecífico.

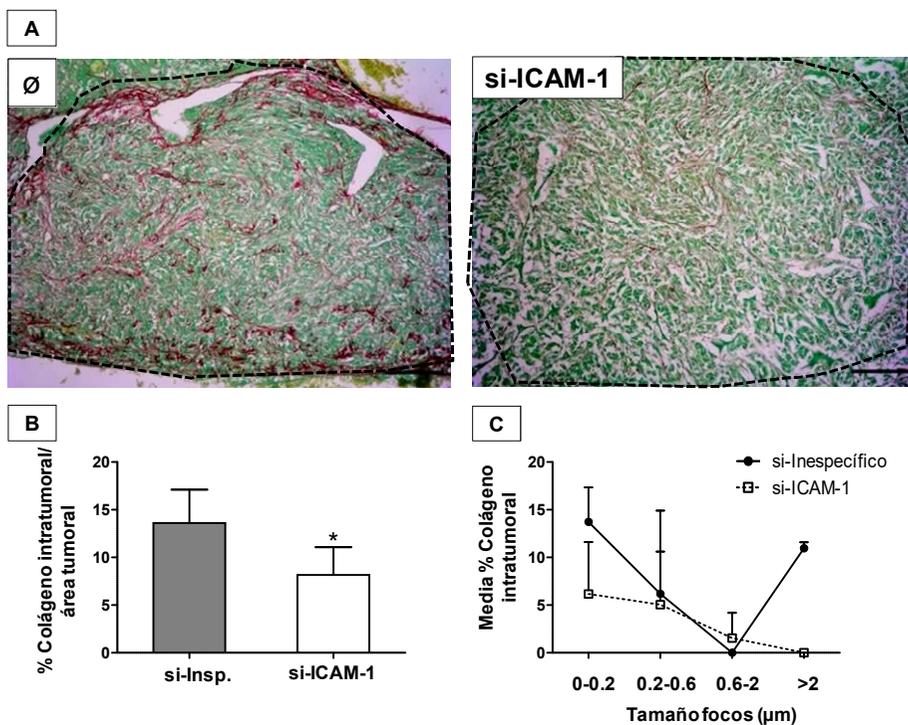


Figura 26. Efecto del silenciamiento *in vivo* de la ICAM-1 endotelial sobre la respuesta desmoplásica durante el desarrollo metastásico de células C26. **(A)** Fotografías representativas a microscopía óptica de ratones con si-Inespecífico o con si-ICAM-1 e inyectados con células C26. **(B)** Cuantificación del porcentaje medio intratumoral de colágeno depositado respecto al área tumoral. **(C)** Media del porcentaje intratumoral de colágeno por cada rango de tamaño. Resultados presentados como la media \pm DE. * $p < 0.05$ significancia respecto al control. Barra de escala: 100 μ m.

1.2.4. Estudio del papel de la ICAM-1 endotelial hepática en el reclutamiento de KCs

Los resultados de este análisis inmunohistoquímico han mostrado una disminución significativa de más del 50% en el porcentaje medio intratumoral de F4/80 en aquellos ratones con el silenciamiento si-ICAM-1 en comparación con los ratones si-Inespecífico (gráfica B). Además, esta disminución de marca intratumoral se ha mantenido durante los diferentes rangos de tamaño tumoral, siendo siempre inferior en ratones si-ICAM-1 con respecto a los ratones si-Inespecífico (gráfica C).

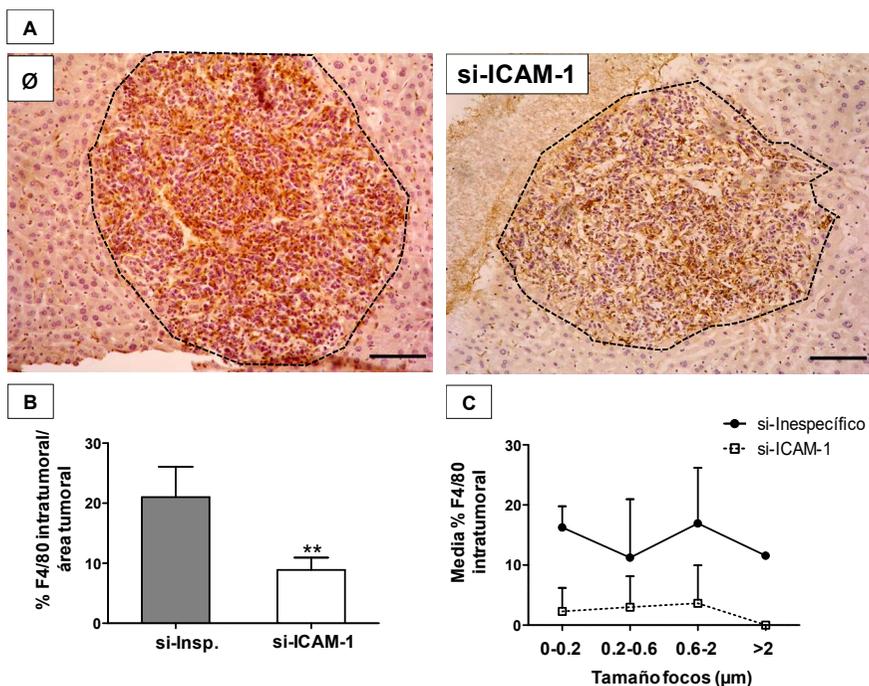


Figura 27. Efecto del silenciamiento *in vivo* de la ICAM-1 endotelial sobre el reclutamiento de KCs durante el desarrollo metastásico de células C26. **(A)** Fotografías representativas a microscopía óptica de ratones con si-Inespecífico o con si-ICAM-1 e inyectados con células C26. **(B)** Cuantificación del porcentaje medio intratumoral de F4/80 respecto al área tumoral en animales control y silenciados. **(C)** Media del porcentaje intratumoral de F4/80 por cada rango de tamaño. Resultados presentados como la media \pm DE. ** $p < 0.01$ significancia respecto al control. Barra de escala: 100 μ m.

2. Estudio del papel de la COX-2 en el desarrollo tumoral hepático

La interacción entre la ICAM-1 endotelial y la LFA-1 tumoral inicia una cascada pro-inflamatoria en el hígado, promoviendo la síntesis de diversos mediadores inflamatorios como IL-1 β , IL-6, PGE₂ and TNF- α (67).

Es conocido que el aumento de la PGE₂ tiene un papel clave en numerosos procesos pro-inflamatorios y pro-tumorales. Como se ha indicado anteriormente, la COX-2 es la enzima limitante de la producción de PGE₂ y actúa como mediador en la producción de proteínas inflamatorias (157). Además, esta enzima se encuentra en niveles elevados de expresión en pacientes de cáncer de colon o con metástasis hepáticas (155), por lo que ha sido objeto de múltiples estudios, centrados principalmente en su papel sobre las células tumorales. Sin embargo, este trabajo se ha enfocado en relacionar la expresión de la COX-2 con el reclutamiento de poblaciones estromales y la consecuente modulación del TME.

Para ello se han realizado diferentes análisis tanto *in vitro* como *in vivo*, en los cuales se ha utilizado el CLX y así estudiar el efecto de su inhibición en diferentes procesos.

2.1. Efecto del CLX sobre la expresión de COX-2 en células tumorales C26

Como estudio previo, se ha analizado el efecto del CLX sobre la expresión de COX-2 en células tumorales C26 por medio de la técnica western blot. Las células se han incubado durante 8 y 24 horas a una concentración de CLX 20 μ M. Los resultados han revelado una leve disminución de la expresión de

COX-2 pasadas 8 horas. Sin embargo, a 24 horas, la expresión de COX-2 se ha reducido al 70% con respecto al control.

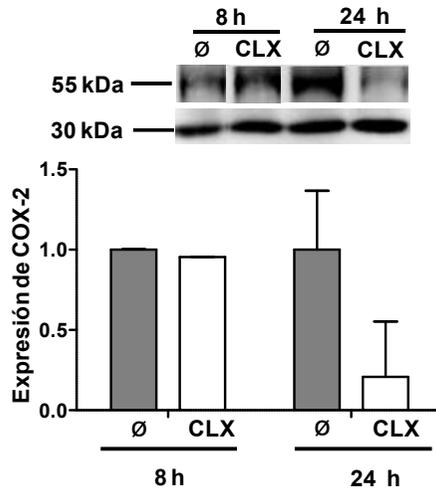


Figura 28. Análisis del efecto del CLX sobre la expresión de COX-2 en células tumorales C26. Fotografía representativa de la expresión proteica de COX-2 analizada por western blot en la parte superior de cada gráfica. En la parte inferior, gráfica de la cuantificación proteica respecto al control a cada tiempo de células no tratadas (valor=1). La proteína constitutiva utilizada ha sido GAPDH de 33 kDa. Resultados presentados como la expresión media \pm DE.

2.2. Estudio del efecto de la sICAM-1 en la actividad de la COX-2 tumoral

Conociendo el potencial pro-inflamatorio de la ICAM-1 se ha analizado su papel en la modulación de la COX-2 tumoral en diferentes procesos implicados en el desarrollo tumoral.

2.2.1. Estudio de la activación tumoral por sICAM-1 en la actividad de la COX-2 y la producción de PGE₂.

Debido al papel limitante de la COX-2 en la expresión de PGE₂, se ha analizado el poder inhibitorio del CLX a mediante la medición de la actividad de la COX-2 y la cuantificación de PGE₂ secretada por el tumor. Además, se ha analizado el poder modulador sobre esta enzima de la ICAM-1, tanto en la actividad de la COX-2 como en la expresión de PGE₂. Para ello se ha inhibido dicha enzima con CLX durante 1 hora con concentraciones de 10 y 20 μ M. Posteriormente se han incubado con medio control o con sICAM-1 (200 ng/ml) durante 18 horas y tras este tiempo se han recogido los medios para su posterior análisis a través de la técnica ELISA. Para el estudio de la actividad de la COX-2 se ha realizado el mismo proceso pero con un paso previo a la recogida de medio, tratando a las células con ácido araquidónico 10 μ M durante 30 minutos.

Como era de esperar, los resultados de la figura A han reflejado una disminución en la actividad de la COX-2 tras la inhibición con CLX de aproximadamente el 50%. Además, el CLX ha sido capaz de revertir el efecto pro-inflamatorio producido por la sICAM-1, que ha incrementado en más del doble la actividad de la COX-2 y sin embargo, en el tratamiento con CLX los valores han disminuido hasta los niveles control.

Por otro lado, los resultados de la expresión de PGE₂ (figura B), han sido similares a los anteriores. La inhibición de la COX-2 por parte del CLX, ha disminuido la expresión de esta molécula prácticamente al 50% en las células tumorales C26. Aún más, el CLX ha sido capaz de reducir la expresión de PGE₂ que había sido incrementada por la acción pro-inflamatoria de la sICAM-1.

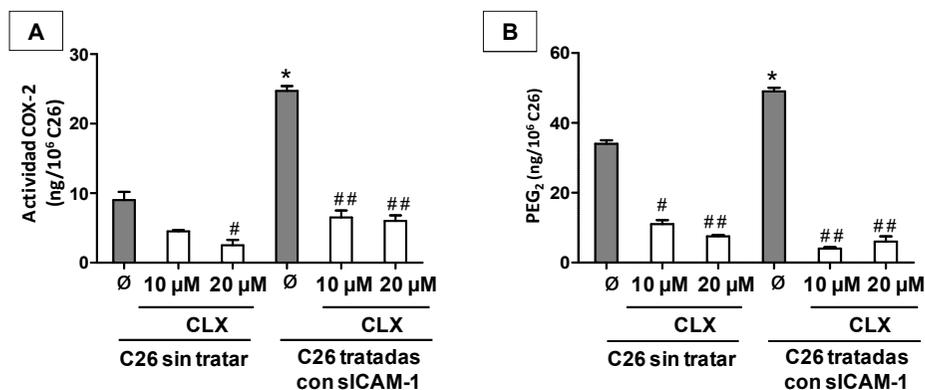


Figura 29. Efecto de la inhibición de la COX-2 tras la activación de ICAM-1 en la actividad de COX-2 y la expresión de PGE₂ en células tumorales C26. Análisis de la actividad de la COX-2 y la producción de PGE₂ por las células tumorales C26 en respuesta a la presencia de CLX y sICAM-1 a través de la técnica de análisis ELISA. Resultados presentados como media ±DE. *p<0.05 respecto al control. #p<0.05 y ## p<0.01 significancia de tratamientos con CLX, respecto a no tratados con CLX.

2.2.3. Estudio de la capacidad proliferativa del tumor mediada por la COX-2 tras la activación por sICAM-1

Uno de los sellos del cáncer es el incremento de la proliferación de las células tumorales. Por ello se ha estudiado *in vitro* del papel de COX-2 modulada por la expresión de ICAM-1 en la capacidad proliferativa de las C26. Las células se han tratado primero con 20 µM de CLX durante 1 hora. A continuación, se ha tratado con sICAM-1 a 200 ng/ml y tras 24 horas de incubación se ha medido la proliferación a través de PrestoBlue™.

Los resultados experimentales han revelado un aumento de la capacidad proliferativa de las células tumorales en más del 50% en presencia de sICAM-1. Sin embargo, este aumento se ha reducido hasta niveles control al tratar a las células tumorales con CLX, anulando así, el potencial activador de la ICAM-1.

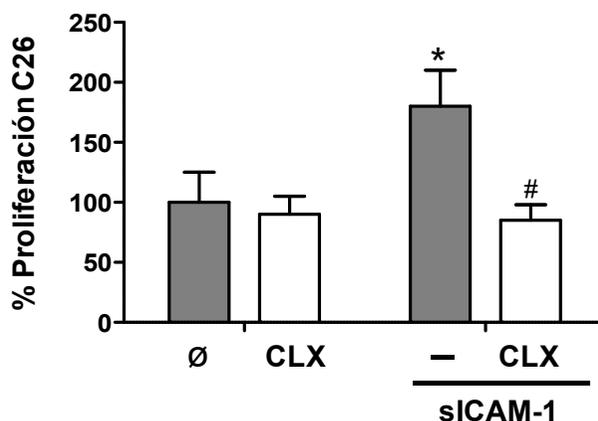


Figura 30. Efecto de la inhibición de la COX-2 tras la activación de ICAM-1 en la capacidad proliferativa de las células tumorales C26 a 24 horas. Ensayo de proliferación a 24 horas en células tumorales con diferentes tratamientos: control, con CLX y con sICAM-1 control o con previo tratamiento de CLX. Resultados presentados como media \pm DE. * $p < 0.05$ respecto al control. # $p < 0.05$ significancia de tratamientos con CLX, respecto a no tratados con CLX.

2.2.4. Estudio de la capacidad migratoria del tumor mediada por la COX-2 tras la activación por sICAM-1

Junto con la proliferación, la migración de las células tumorales es crucial para el desarrollo metastásico. Por ello, se ha estudiado *in vitro* el efecto de la COX-2 modulada por la expresión de ICAM-1 en la capacidad migratoria de las células tumorales C26.

Los resultados han mostrado un incremento significativo de la capacidad migratoria de las células tumorales C26 modulada por la presencia de sICAM-1. Este incremento se ha reducido tras la inhibición de la COX-2 por la acción del CLX. Sin embargo, la capacidad migratoria tumoral no se ha visto afectada significativamente tras la inhibición de la COX-2 en ausencia de sICAM-1.

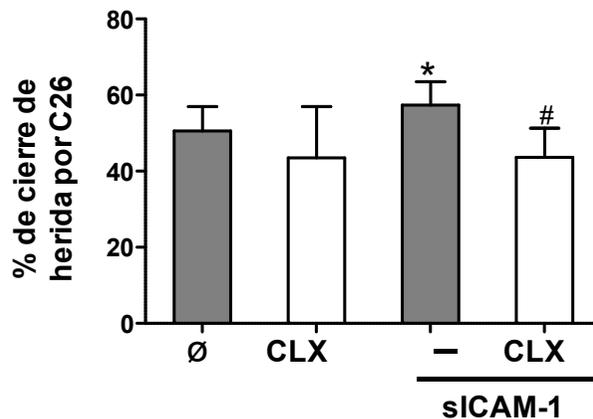


Figura 31. Efecto de la inhibición de la COX-2 tras la activación de ICAM-1 en la capacidad migratoria a 24 horas de las células tumorales C26. Ensayo de migración por test de la herida a 24 horas en células tumorales con tratamiento control, de CLX y con sICAM-1 control o con previo tratamiento de CLX. Resultados presentados como la media \pm DE. * $p < 0.05$ respecto al control. # $p < 0.05$ significancia de tratamientos con CLX, respecto a no tratados con CLX.

2.2.5. Estudio de la degradación de la ECM mediada por la COX-2 tras la activación por sICAM-1

La remodelación de la matriz extracelular es uno de los procesos necesarios para la migración tumoral. Tras observar que la activación mediada por la sICAM-1 aumenta la capacidad tumoral de las células C26 y que la COX-2 es responsable en parte de dicho aumento, se ha analizado el papel de dicha enzima en la habilidad de las C26 para digerir la ECM. Para ello, se han realizado análisis zimográficos, cuyo producto de degradación es la gelatina, y así estudiar las MMPs, en concreto, la MMP-2 y la MMP-9.

Los resultados obtenidos han mostrado como la activación tumoral por sICAM-1 estimula la secreción de MMP-2 en las células tumorales. Además, en relación con lo observado anteriormente, la inhibición con CLX ha dismi-

nuido la expresión de MMP-2 producida por el tumor, tanto en las C26 control como las activadas por sICAM-1.

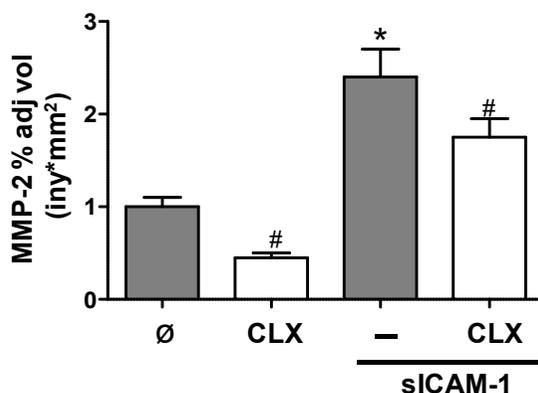


Figura 32. Efecto de la inhibición de COX-2 tras la activación de ICAM-1 en la degradación de la ECM por células tumorales C26. Análisis zimográfico de la actividad de la MMP-2 producida por células C26 en respuesta a la inhibición de la COX-2 y de la activación con sICAM-1. Resultados presentados como media \pm DE. * $p < 0.05$ respecto al control. # $p < 0.05$ significancia de tratamientos con CLX, respecto a no tratados con CLX.

2.2.6. Estudio de la respuesta angiogénica del tumor mediada por la COX-2 tras la activación por sICAM-1

El principal mediador de la respuesta angiogénica es el VEGF, el cual es expresado por diversos tipos celulares dentro del TME, entre ellos las células tumorales. Para estudiar el papel de la COX-2 modulada por la activación de la ICAM-1 en la expresión de VEGF tumoral se ha realizado por medio de la técnica de ELISA. Los C26-MC analizados (control o pre-activados con sICAM-1 y dentro de cada grupo tratados o sin tratar con CLX 20 μ M) se han obtenido siguiendo el protocolo establecido.

Los resultados han mostrado una disminución del 50%, aproximadamente, en los niveles de VEGF al inhibir la COX-2 en las células tumorales control. La expresión de esta molécula se ha incrementado significativamente en torno a un 20% al activar a las células tumorales con sICAM-1 debido al poder pro-angiogénico de la ICAM-1. Sin embargo, esta capacidad pro-angiogénica ha sido revertida por la inhibición de la COX-2 a través de la acción del CLX, bajando la expresión de VEGF hasta niveles control.

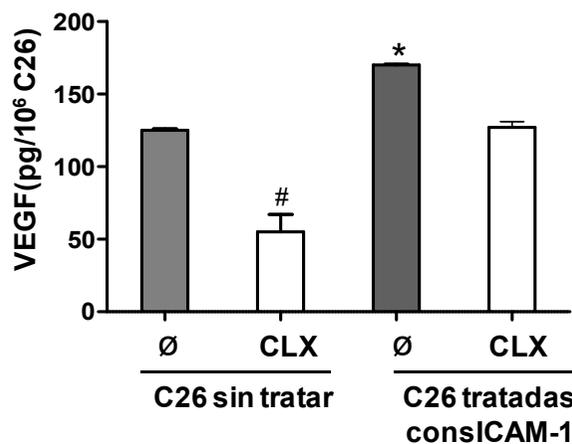


Figura 33. Efecto de la inhibición de la COX-2 modulada tras la activación de ICAM-1 en la expresión de VEGF por células tumorales C26. Análisis de la producción de VEGF por las células tumorales C26 en respuesta a la presencia de CLX y sICAM-1 a través de la técnica de análisis ELISA. Resultados presentados como media \pm DE. * $p < 0.05$ respecto al control. # $p < 0.05$ significancia de tratamientos con CLX, respecto a no tratados con CLX.

3. Estudio *in vitro* del papel de las células estromales en el desarrollo tumoral

Para que el TME favorezca el desarrollo tumoral no solo es necesaria la implicación de las células tumorales sino que el papel de las células estromales en el TME es imprescindible para generar un proceso pro-tumoral. Pero para que las células estromales ejerzan este papel es necesario su reclutamiento y activación por parte del tumor.

3.1 Estudio de la activación de células estromales en presencia del tumor

La activación por el tumor de las células estromales es un paso clave en la formación del TME. Debido a ello, se ha estudiado la capacidad de activación de las células tumorales C26 sobre las líneas celulares de fibroblastos y macrófagos murinos, 3T3 y J774A.1, respectivamente. Estas líneas celulares se han cultivado y tratado C26-MC durante 24, 48 y 72 horas. Tras estos tiempos, se han obtenido lisados proteicos, a través del método de Laemmli y se han cuantificado. Posteriormente, se ha realizado el análisis de proteínas por western blot.

3.1.1. Activación de fibroblastos 3T3 por el tumor

Los resultados de western blot reflejan los cambios de expresión de las proteínas FAP e ICAM-1 por 3T3 durante 24, 48 y 72 horas en presencia (TA C26) o ausencia de C26-MC (\emptyset). La expresión de FAP es uno de los marcadores de activación de CAFs (169) y los resultados han reflejado un aumento progresivo de esta expresión a partir de las 24 horas de cultivo con C26-MC

mientras que se en el cultivo control de 3T3 su expresión se ha mantenido prácticamente constante en el tiempo.

La ICAM-1 es otra de las proteínas que incrementa su expresión en los CAFs (170) y como ha observado en los resultados tanto en el grupo control como en el activado por C26-MC su expresión ha incrementado en el tiempo. Sin embargo, esta expresión es mayor en el cultivo de 3T3 con C26-MC (TA C26).

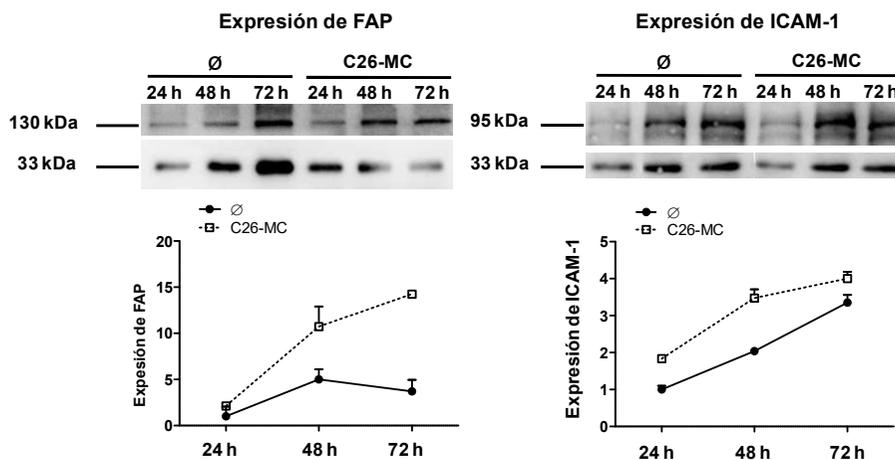


Figura 34. Expresión de FAP e ICAM-1 por 3T3 activados por C26-MC a 24, 48 y 72 horas. Fotografía representativa de la expresión proteica analizada por western blot en la parte superior de cada gráfica. Gráfica de la cuantificación proteica respecto al control de células no tratadas (valor=1). La proteína constitutiva utilizada ha sido GAPDH de 33 kDa. Resultados presentados como la expresión media \pm DE.

3.1.2. Activación de macrófagos J774A.1 por el tumor

Durante 24, 48 y 72 horas se han analizado los cambios de expresión de las proteínas MR e ICAM-1 producidas por macrófagos J774A.1 en presencia (TA C26) o ausencia (\emptyset) de C26-MC. Por un lado, tanto en las muestras control como en las TA C26 se ha observado un aumento de expresión tras 48 horas de cultivo, mientras que a las 72 horas la expresión ha retornado a los

niveles iniciales. Además, dentro de esta tendencia, las muestras TA C26 han aumentado su expresión a lo largo del tiempo desde las primeras 24 horas en comparación con el control de J774A.1 sin activar.

Por otro lado, la expresión de ICAM-1 ha seguido el mismo patrón que el MR, ya que ha incrementado de 24 a 48 horas y tras este tiempo ha vuelto a disminuir su expresión hasta valores iniciales. Sin embargo, en este caso, la expresión a las 24 horas de las TA C26 ha sido superior al control.

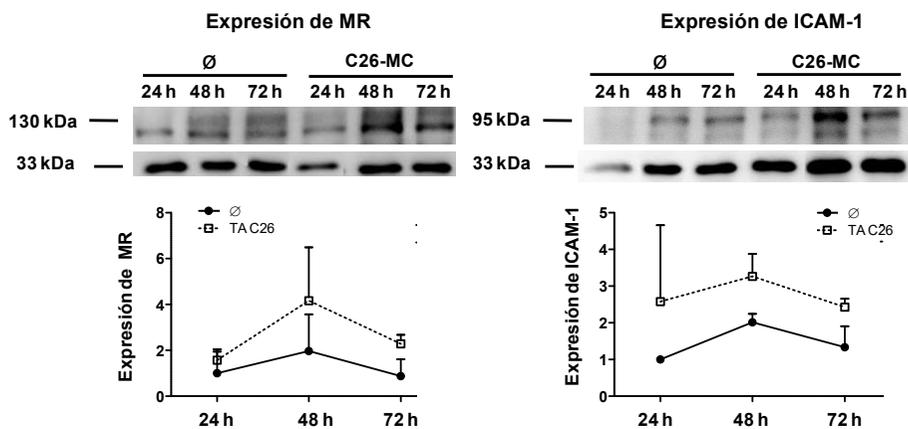


Figura 35. Expresión de MR e ICAM-1 por J774A.1 activados por C26-MC a 24, 48 y 72 horas. Fotografía representativa de la expresión proteica analizada por Western blot en la parte superior de cada gráfica. Gráfica de la cuantificación proteica respecto al control de células no tratadas (valor=1). La proteína constitutiva utilizada ha sido GAPDH de 33 kDa. Resultados presentados como la media \pm DE.

3.2. Estudio de la activación tumoral mediada por si-CAM-1 sobre la capacidad migratoria de 3T3 y J774A.1

Tras el estudio de la capacidad de activación tumoral sobre las líneas celulares inmortalizadas y sabiendo el papel de la ICAM-1 sobre la actividad de la COX-2 en la migración tumoral, se ha analizado este mismo efecto en la migración de las líneas celulares 3T3 y J774A.1.

Para este análisis se ha realizado el test de la herida, tratando durante 24 horas las líneas celulares con C26-MC, obtenidos previamente con o sin tratamiento de CLX y con o sin activación de sICAM-1, siguiendo el protocolo explicado anteriormente. Tras la incubación con los medios, se han procesado los cultivos como se ha explicado en métodos y se ha cuantificado el porcentaje de área de herida cerrada por las células.

Los resultados obtenidos tanto de 3T3 como de J774A.1 han reflejado diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes C26-MC. La presencia de los factores solubles producidos por las células tumorales (C26-MC) ha incrementado la capacidad migratoria con respecto al control (cultivo de 3T3 o J774A.1). Además, este aumento de la migración se ha visto incrementado al activar con sICAM-1 a las células tumorales, generando los niveles más altos de la capacidad migratoria de 3T3 y J774A.1. Sin embargo, al igual que en las células tumorales, la inhibición de la COX-2 ha revertido el efecto pro-migratorio generado por las células tumorales, disminuyendo el porcentaje de cierre de la herida por niveles inferiores al control. Aún más, este efecto de la inhibición de la COX-2 también ha afectado a las células tumorales activadas por sICAM-1 lo que ha generado una disminución hasta niveles control de la capacidad migratoria de las 3T3 y J774A.1.

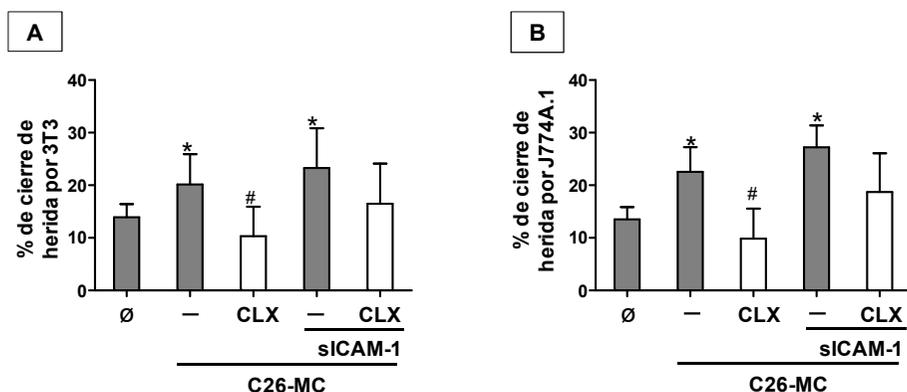


Figura 36. Efecto de la COX-2 modulada por la activación tumoral por sICAM-1 en la capacidad migratoria de líneas celulares 3T3 y J774A.1 Ensayo de migración por test de la herida en líneas celulares, 3T3 (gráfica A) y J774A.1 (gráfica B) incubadas con C26-MC con cuatro tratamientos diferentes, control, tratados con CLX, activados con sICAM-1 o tratados con CLX y después activados con sICAM-1. Resultados presentados como media ± DE. *p<0.05 respecto al control. #p<0.05 significancia de tratamientos con CLX, respecto a no tratados con CLX.

3.3. Estudio de la COX-2 producida por el tumor sobre las HSCs

Tras el estudio del efecto de la COX-2 en líneas celulares inmortalizadas y sabiendo el papel esencial de las HSCs en el TME, siendo la población estromal más abundante, se ha analizado *in vitro* el efecto modulador de la COX-2 en estas células en diversos procesos involucrados en el desarrollo metastásico.

3.3.1. Estudio de la capacidad moduladora de la COX-2 tumoral en el potencial migratorio de las HSCs

El primer proceso metastásico *in vitro* analizado ha sido el estudio de la capacidad migratoria de HSCs mediada por la COX-2 producida tanto por células tumorales como HSCs mediante su inhibición.

Primero como muestra la figura A, se ha estudiado el efecto de la COX-2 tumoral en la capacidad migratoria de las HSCs, a través de Transwell y tratando a las células con C26-MC control u obtenidos al tratar a las células tumorales con CLX 20 μ M durante 1 hora.

Los resultados obtenidos han reflejado un aumento de más del doble de la capacidad migratoria de las HSCs al estar en contacto con los factores solubles producidos por el tumor (C26-MC). Sin embargo, este incremento se ha reducido hasta niveles control al inhibir la COX-2 tumoral.

Por otro lado, en la figura B, se ha estudiado el efecto tumoral sobre la migración de las HSCs y el papel de la COX-2 expresada por las HSCs activadas por el tumor en la propia capacidad migratoria de de estas células estromales. Como muestra la gráfica, la capacidad migratoria de las HSCs ha incrementado un 50% en presencia de factores solubles producidos por el tumor. Sin embargo, este efecto pro-migratorio tumoral se ha revertido al inhibir a la COX-2 en las HSCs hasta niveles similares al control.

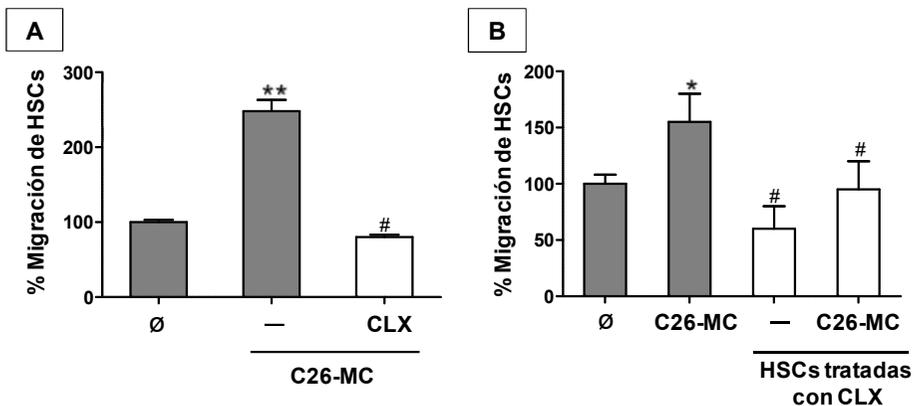


Figura 37. Efecto de la inhibición de la COX-2 sobre la capacidad migratoria de las células HSCs mediada por la presencia de factores solubles derivados de células tumorales C26. (A) Migración de HSCs en Transwell de 8 μ m de poro en respuesta a C26-MC control o tratado con CLX. **(B)** Migración de HSCs sin tratar o tratadas con CLX en Transwell de 8 μ m de poro en respuesta a C26-MC. Resultados presentados como media \pm DE. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto al control. # $p < 0.05$ significancia de tratamientos con CLX, respecto a no tratados con CLX.

3.3.2 Estudio de la capacidad moduladora de la COX-2 tumoral en el potencial angiogénico de las HSCs

Al igual que las células tumorales juegan un papel importante en la formación de nuevos vasos sanguíneos, las HSCs dentro del TME son una pieza clave para este proceso. Por ello, se ha analizado el potencial angiogénico de las HSCs modulado por la COX-2 tumoral, a través de la medición de VEGF por medio de la técnica ELISA. Para este análisis, los medios utilizados han sido: control o activado con C26-MC y dentro de cada grupo tratados o sin tratar con CLX 20 μ M y se han obtenido siguiendo el protocolo establecido.

Como se observa en la gráfica la expresión de VEGF al activar las HSCs con C26-MC se ha incrementado significativamente. Este incremento se ha reducido a la mitad, aproximadamente, al inhibir la COX-2, impidiendo el papel pro-angiogénico de las células tumorales C26 sobre las HSCs.

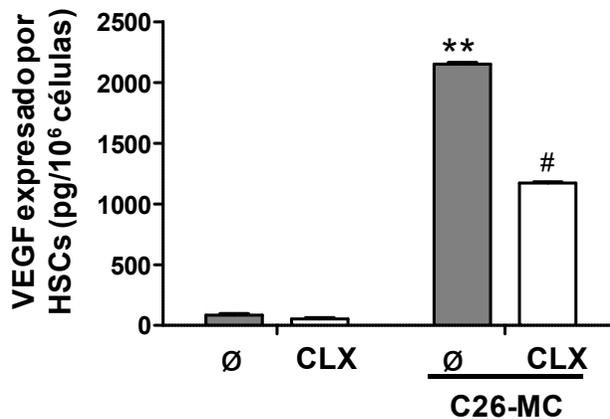


Figura 38. Efecto de la inhibición de la COX-2 sobre la expresión de VEGF de las células HSCs mediada por la presencia de factores solubles derivados de células tumorales C26. Medición mediante ELISA de la expresión de VEGF por las HSCs en presencia de C26 control o pre-activadas con sICAM-1 y tratadas o no con CLX. Resultados presentados como media \pm DE. ** $p < 0.01$ respecto al control. # $p < 0.05$ significancia de tratamientos con CLX, respecto a no tratados con CLX.

3.3.3. Estudio del papel de la COX-2 en la inducción de la capacidad migratoria tumoral mediada por las HSCs

Continuando con los resultados anteriores y sabiendo la importancia entre la relación tumor-estroma dentro del TME, se ha analizado el papel de la COX-2 sobre las HSCs activadas por el tumor en la capacidad migratoria tumoral. Para ello se ha realizado un ensayo de migración de células tumorales C26 a través de Transwell en presencia o ausencia de medio condicionado de HSCs. Los medios utilizados han consistido en: medio de HSCs cultivados en presencia o ausencia de CLX durante 1 hora y después con medio de cultivo o con C26-MC.

Los resultados han reflejado un efecto activador en la migración tumoral al estar en contacto con factores solubles secretados por HSCs. Este aumento ha sido aún más notorio cuando las HSCs han sido activadas por el tumor. Sin embargo, al inhibir la COX-2 en las HSCs, la migración tumoral ha disminuido a niveles por debajo del control tumoral incluso cuando las HSCs han estado en contacto con los factores solubles del tumor.

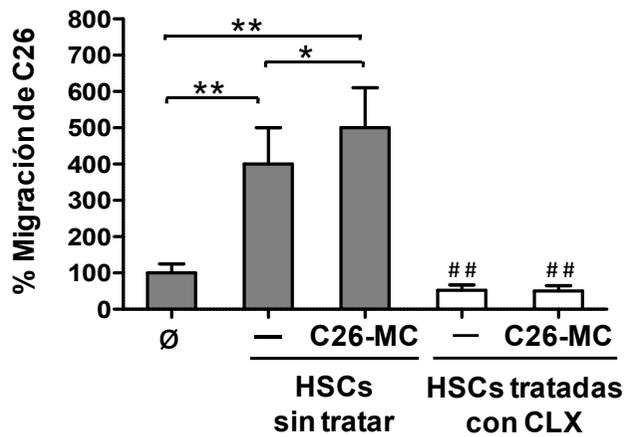


Figura 39. Efecto de la inhibición de la COX-2 estromal sobre la capacidad migratoria del tumor mediada por la activación de HSCs. Migración de C26 en cámaras de Boyden modificadas (8 μ m) en respuesta a MC de HSCs tratadas o sin tratar con CLX 20 μ M durante 1 hora previo a su activación por C26-MC durante 24 horas. Resultados representados como la media \pm DE. * p <0.05 y ** p <0.01 respecto al control. # p <0.05 y ## p <0.01 significancia de tratamientos con CLX, respecto a no tratados con CLX.

4. Estudio *in vivo* del efecto modulador de la COX-2 tras la activación tumoral por sICAM-1 el desarrollo tumoral hepático de C26

Tras los estudios *in vitro*, se ha analizado el papel de la COX-2 tras la activación tumoral mediado por la sICAM-1 durante el desarrollo tumoral *in vivo*. Para ello se han utilizado ratones Balb/c inyectados con células tumorales C26 como se ha explicado anteriormente en métodos. Tras este proceso, se han obtenido cuatro grupos experimentales: grupo control, grupo CLX, grupo sICAM-1 y grupo sICAM-1/CLX.

Para cada proceso experimental, se han utilizado cortes de hígado de 6 μm de grosor. Las muestras se han teñido con hematoxilina-eosina y Rojo Siria para analizar la capacidad metastática y la deposición de colágeno, respectivamente. Además se ha detectado α -SMA y F4/80 a través de procesos inmunohistoquímicos para el análisis del reclutamiento de HSCs y KCs, respectivamente. Estos cortes se han procesado de la manera adecuada a cada análisis y se han fotografiado a aumentos de 4X (para la capacidad metastática) y a 10X (para el resto de análisis). Las imágenes se han analizado a través del software FIJI-ImageJ.

4.1. Estudio *in vivo* de la capacidad metastática tumoral de células C26 mediada por la COX-2 tras la activación por sICAM-1

Los resultados observados en la gráfica B han revelado un incremento del área tumoral total en aquellos ratones inyectados con células tumorales previamente activadas por sICAM-1. Dicho incremento se ha visto reducido un 60% al inhibir la COX-2 tratando a los ratones con una dosis diaria de CLX.

Además, el grupo sICAM-1/CLX ha reducido el área metastásica aproximadamente un 75% con respecto al grupo de ratones sin tratar. Además, continuando con los análisis *in vivo* previos se ha estudiado el número de focos por cada rango de tamaño de focos (gráfica C) y se ha observado una disminución en los ratones tratados con CLX ya sea inyectados con células C26 pre-activadas como con células C26 sin pre-activar con respecto al control en todos los grupos de tamaño.

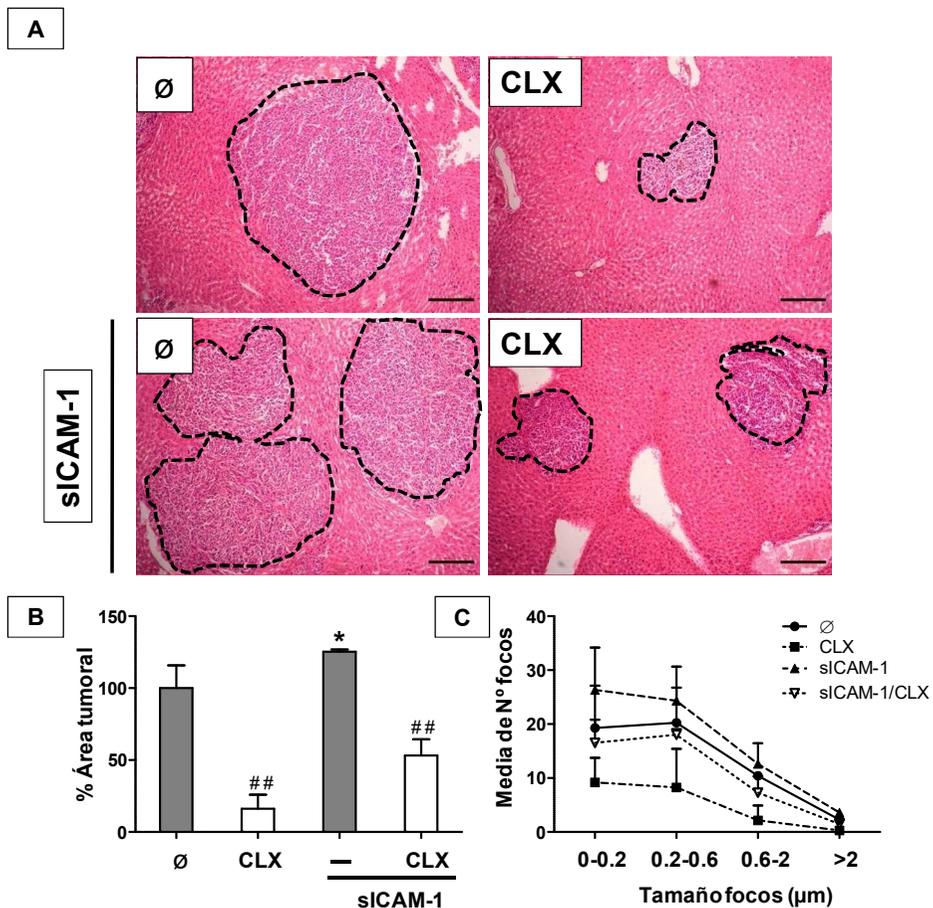


Figura 40. Efecto de la inhibición *in vivo* de la COX-2 tras la activación tumoral por sICAM-1 en células C26 sobre la capacidad metastásica hepática. (A) Fotografías representativas a microscopía óptica de ratones tratados o sin tratar con una dosis diaria de CLX e inyectados con células C26 control o pre-activadas con sICAM-1. (B) Cuantificación del porcentaje total de área tumoral respecto al control (100%) y (C) media del número de focos totales del tejido. Resultados presentados como la media \pm DE. * $p < 0.05$ significancia respecto al control. ## $p < 0.01$ significancia entre no tratados con CLX y tratados con CLX. Barra de escala: 200 μ m.

4.2. Estudio *in vivo* del reclutamiento de HSCs mediado por la COX-2 tras la activación por sICAM-1

Tras el estudio de la capacidad metastásica y siguiendo la línea de los anteriores resultados *in vivo*, se ha analizado el reclutamiento de HSCs a través de la cuantificación del porcentaje medio de α -SMA total con respecto al área tumoral (gráfica B), y el porcentaje medio intratumoral de α -SMA por cada rango de tamaño de foco (gráfica C).

Como se observa en la gráfica B se ha producido un incremento en los porcentajes totales de α -SMA intratumoral en el grupo de ratones sICAM-1 respecto al control. Sin embargo, dicho porcentaje se ha reducido el 75%, aproximadamente, al inhibir la COX-2 con dosis diarias de CLX. Además, el CLX también ha reducido el reclutamiento de HSCs en aquellos ratones inyectados con células C26 sin tratar a la mitad. De igual manera, en la gráfica de la derecha (gráfica C) se observa como el porcentaje de α -SMA intratumoral en ratones pre-activados ha sido superior respecto al control en todos los rangos de tamaño. En especial, en el rango de tamaño de foco mayor de 2 μ m, donde la diferencia de porcentaje de α -SMA intratumoral entre el grupo control y el grupo sICAM-1 aproximadamente un 3%. Además, tanto el grupo de ratones control como el grupo de ratones CLX ha mantenido su porcentaje intratumoral por debajo del control durante todos los rangos de tamaño de foco.

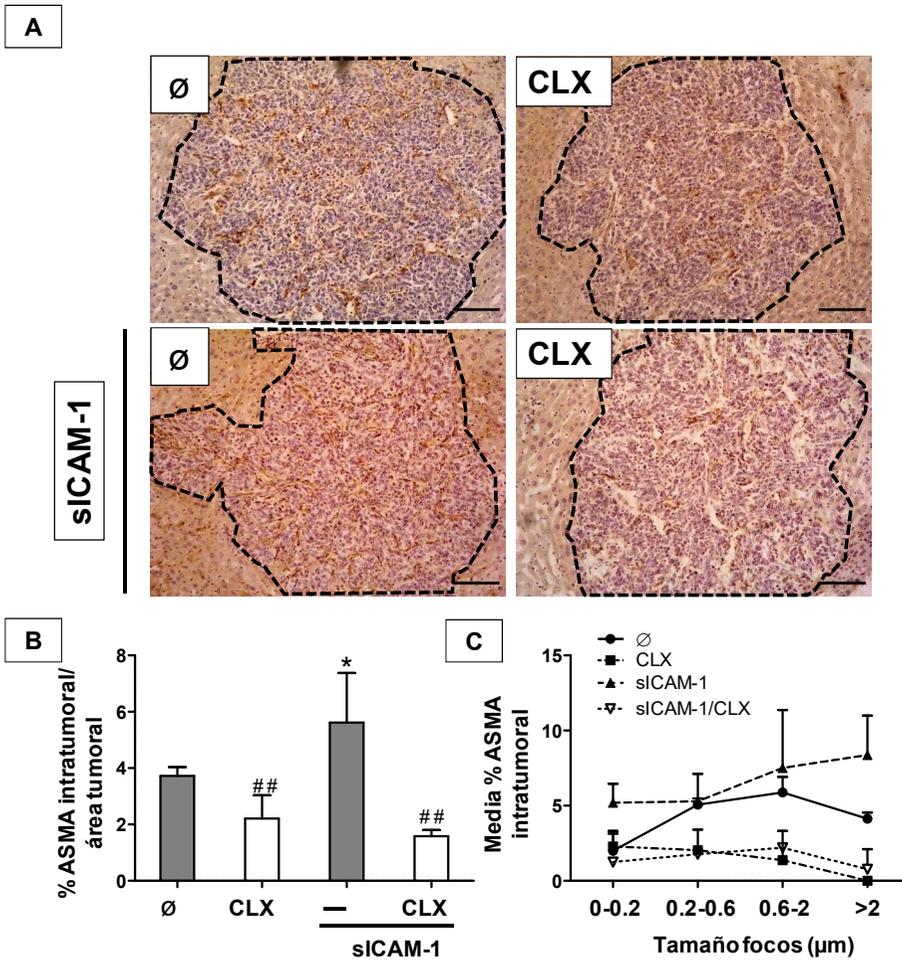


Figura 41. Efecto de la inhibición *in vivo* de la COX-2 tras la activación tumoral por siCAM-1 en células C26 sobre el reclutamiento de HSCs. (A) Fotografías representativas a microscopía óptica de ratones tratados o sin tratar con una dosis diaria de CLX e inyectados con células C26 control o pre-activadas con siCAM-1. **(B)** Cuantificación del porcentaje medio de α -SMA total intratumoral respecto al área tumoral y **(C)** media del porcentaje intratumoral de α -SMA en los diferentes rangos de tamaño de foco. Resultados presentados como la media \pm DE. * $p < 0.05$ significancia respecto al control y ## $p < 0.01$ significancia entre no tratados con CLX y tratados con CLX. Barra de escala: 100 μ m.

4.3. Estudio *in vivo* de la inducción de la respuesta desmoplásica mediada por la COX-2 tras la activación por sICAM-1

En la misma línea, tras analizar el reclutamiento de HSCs y sabiendo que son las principales células responsables de la respuesta desmoplásica, se ha analizado dicha respuesta con la tinción de Rojo Siria siguiendo el protocolo establecido. Los resultados se han mostrado como el porcentaje de colágeno intratumoral con respecto al área tumoral total (gráfica B) junto con el porcentaje intratumoral por cada rango de tamaño de foco (gráfica C).

Los resultados han mantenido la misma tendencia que la activación de HSCs, produciéndose un aumento de colágeno intratumoral en los ratones pre-activados con sICAM-1 con respecto al control, el cual, ha disminuido hasta niveles control al tratar los ratones con CLX. En cuanto a la gráfica de la derecha (C), se ha observado un mayor porcentaje de colágeno intratumoral en todos los rangos de tamaño los ratones del grupo sICAM-1 respecto al control, y como al tratarlos con CLX tanto el grupo control como el grupo sICAM-1/CLX el porcentaje de colágeno intratumoral ha disminuido.

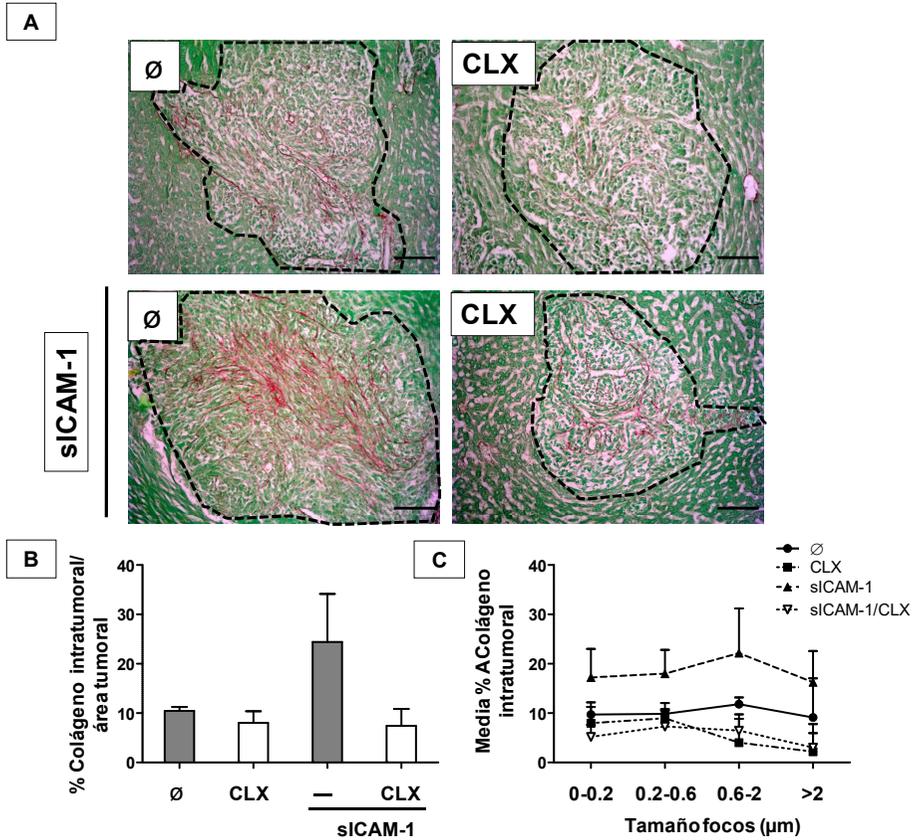


Figura 42. Efecto de la inhibición *in vivo* de la COX-2 tras la activación tumoral por sicAM-1 en células C26 sobre la respuesta desmoplásica. (A) Imágenes representativas a microscopía óptica de ratones tratados o sin tratar con una dosis diaria de CLX e inyectados con células C26 control o pre-activadas con sicAM-1. **(B)** Cuantificación del porcentaje medio de colágeno intratumoral respecto al área tumoral y **(C)** media del porcentaje intratumoral de colágeno en los diferentes rangos de tamaño de foco. Resultados presentados como la media \pm DE. * $p < 0.05$ respecto al control y # $p < 0.05$ significancia entre no tratados con CLX y tratados con CLX. Barra de escala: 100 μ m.

4.4. Estudio *in vivo* del reclutamiento de KCs mediado por la COX-2 tras la activación por sICAM-1

Por último, se ha analizado el reclutamiento de KCs. Los resultados se han presentado por cada grupo experimental el porcentaje intratumoral de F4/80 respecto al área tumoral total (gráfica B) y el porcentaje de F4/80 intratumoral por cada grupo experimental en cada rango de tamaño de foco (gráfica C).

Al igual que en la activación de HSCs, el porcentaje de F4/80 intratumoral ha disminuido en aquellos ratones inyectados con células tumorales pre-activadas con sICAM-1, con respecto al control. Mientras que dicho aumento se ha visto reducido hasta niveles control al tratar diariamente a los ratones con CLX, en el grupo de ratones sICAM-1/CLX. Además, el tratamiento diario de CLX ha reducido también el porcentaje intratumoral en ratones inyectados con células C26 sin tratar. Por otro lado, en la gráfica C, los resultados muestran como el porcentaje de marca intratumoral de F4/80 se ha incrementado en el grupo sICAM-1 con respecto al control en todos los rangos de tamaño. Además, tanto en el grupo de ratones CLX como el grupo sICAM-1/CLX el porcentaje intratumoral ha sido inferior al control en todos los rangos de tamaño, a excepción del grupo sICAM-1/CLX en el tamaño de foco de 0.6-2 donde el porcentaje intratumoral de F4/80 es ligeramente superior al control.

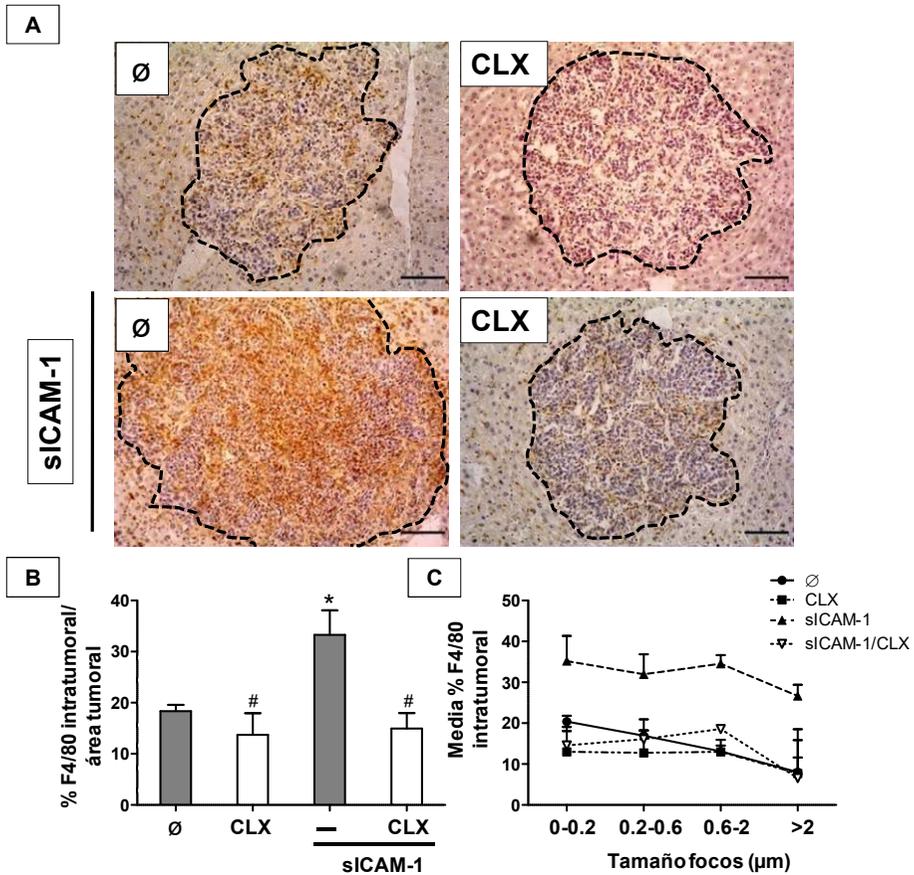


Figura 43. Efecto de la inhibición *in vivo* de la COX-2 tras la activación tumoral por sICAM-1 en células C26 sobre el reclutamiento de KCs. (A) Imágenes representativas a microscopía óptica de ratones tratados o sin tratar con una dosis diaria de CLX e inyectados con células C26 control o pre-activadas con sICAM-1. **(B)** Cuantificación del porcentaje de F4/80 intratumoral respecto al área tumoral en los distintos tratamientos y **(C)** media del porcentaje intratumoral de F4/80 en los diferentes rangos de tamaño de foco. Resultados presentados como la media \pm DE. * $p < 0.05$ respecto al control ## $p < 0.01$ significancia entre no tratados con CLX y tratados con CLX. Barra de escala: 100 μ m.

5. Estudio *in vivo* del papel del MR endotelial en el desarrollo tumoral hepático de C26

Por último, en base a estudios anteriores, la sobre-expresión de ICAM-1 y la activación de la COX-2 incrementa la expresión del MR endotelial, la cual favorece el escape del sistema inmune durante la infiltración tumoral hepática (80). Sin embargo, poco se sabe de su papel *in vivo* sobre las poblaciones no tumorales. Por ello se ha estudiado a través de un modelo *in vivo* como el bloqueo parcial de este receptor influye en la capacidad metastásica de las células tumorales y en la formación del TME. Para ello se ha realizado el bloqueo como se ha explicado anteriormente en métodos y se han obtenido dos grupos experimentales: grupo control y grupo MR-. Sobre los hígados extraídos se han realizado cortes de 6 μm de grosor y se han teñido con hematoxilina-eosina y Rojo Siria, para analizar la capacidad metastásica tumoral y la respuesta desmoplásica, respectivamente. Además, siguiendo la línea de estudio, se han realizado dos análisis inmunohistoquímico para observar por un lado el reclutamiento de HSCs por marcaje de α -SMA y por otro lado de KCs por marcaje de F4/80. Todos los cortes se han procesado de la manera adecuada para cada análisis y se han fotografiado a aumentos de 4X (para la capacidad metastásica) y a 10X (para el resto de procesos experimentales). Las imágenes se han analizado a través del software FIJI-ImageJ.

5.1. Estudio del papel del MR endotelial en la capacidad metastásica tumoral de C26

Los resultados obtenidos se han reflejado siguiendo el mismo patrón que en análisis anteriores, el porcentaje de área tumoral total con respecto al

área total del hígado (gráfica B) y el número de focos en función de los cuatro rangos de tamaño de foco establecidos (gráfica C).

Estos resultados han reflejado una disminución del área tumoral total de más del 50% al en los ratones MR- respecto al grupo control. Aunque en la gráfica C, en el tamaño de 0-0.2 μm hay un mayor número medio de focos en el grupo MR-, en el resto de tamaño de focos el número medio es inferior al grupo control.

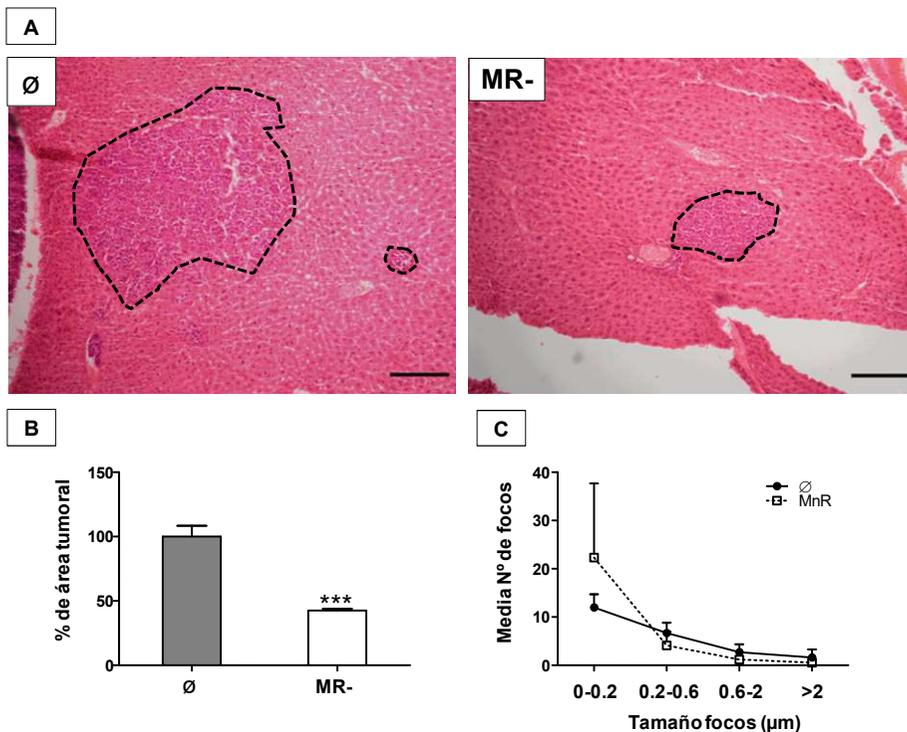


Figura 44. Efecto del bloqueo *in vivo* del MR endotelial sobre la capacidad metastásica hepática de células tumorales C26. (A) Fotografías representativas a microscopía óptica de ratones control o ratones MR-. **(B)** Cuantificación del porcentaje de área tumoral respecto al control (100%) y **(C)** media del número de focos totales del tejido. Resultados representados como la media \pm DE. *** $p < 0.001$ respecto al control. Barra de escala: 200 μm .

5.2. Estudio del papel del MR endotelial en el reclutamiento de HSCs

Como en análisis anteriores, se ha analizado el reclutamiento de HSCs y los resultados se han presentado como, el porcentaje de α -SMA intratumoral respecto al área tumoral total (gráfica B) y el porcentaje intratumoral de α -SMA por cada rango de tamaño de foco (gráfica C). El reclutamiento de HSCs ha disminuido un 6% al bloquear el MR en los ratones. Esta disminución de porcentaje intratumoral de α -SMA se ha mantenido en todos los rangos de tamaño de foco (gráfica C).

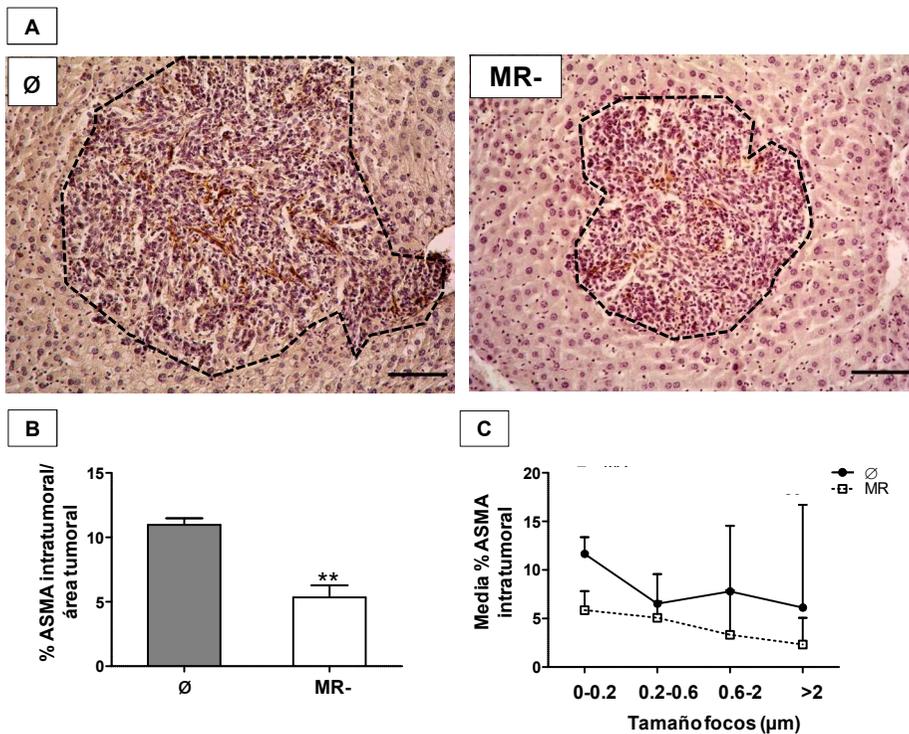


Figura 45. Efecto del bloqueo *in vivo* del MR endotelial sobre el reclutamiento de HSCs. (A) Fotografías representativas a microscopía óptica de ratones control o MR-. **(B)** Cuantificación del porcentaje medio de α -SMA intratumoral total respecto al área tumoral y **(C)** media del porcentaje intratumoral de α -SMA por cada rango de tamaño de foco. Resultados representados como la media \pm DE ** $p < 0.01$. Barra de escala: 100µm.

5.3. Estudio del papel del MR endotelial en la inducción de la respuesta desmoplásica

Siguiendo con los resultados analizados previamente, tras el estudio de la activación de las HSCs se ha estudiado la respuesta desmoplásica. Los resultados se han mostrado como el porcentaje de colágeno intratumoral con respecto al área tumoral total (gráfica B) junto con el porcentaje intratumoral por cada rango de tamaño de foco (gráfica C).

Los resultados han reflejado una disminución del porcentaje de colágeno intratumoral al silenciar el MR endotelial en los ratones, tanto en el porcentaje total intratumoral como en cada uno de los rangos de tamaño, a excepción del rango de tamaño de 0.6-2 μm donde el porcentaje de grupo control ha disminuido respecto al grupo MR-.

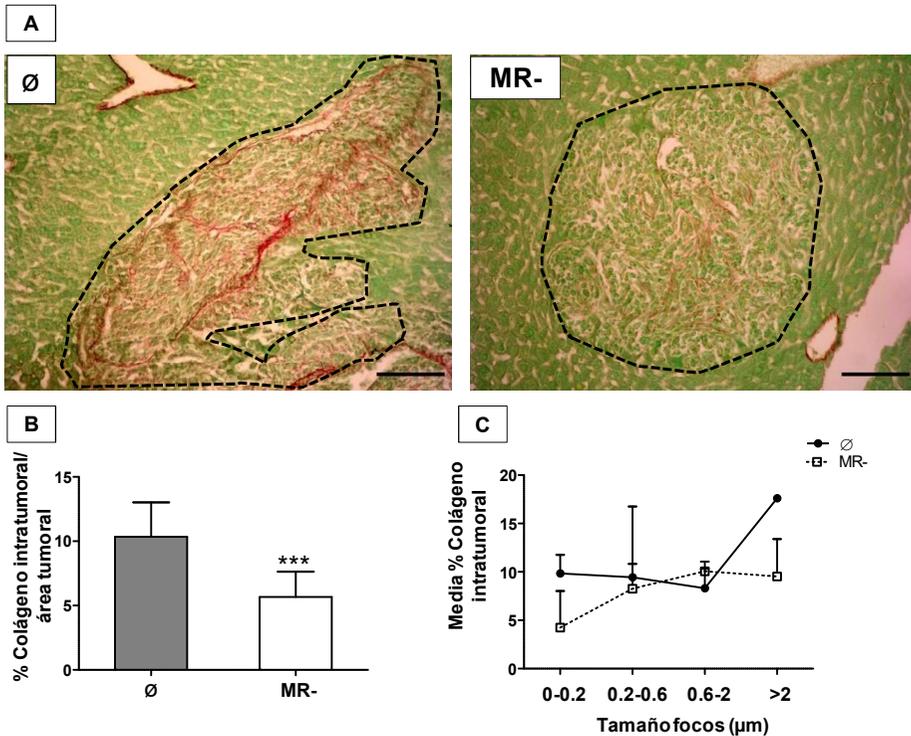


Figura 46. Efecto del bloqueo *in vivo* del MR endotelial sobre la respuesta desmoplásica. (A) Imágenes representativas a microscopía óptica de ratones control o MR-. **(B)** Cuantificación del porcentaje medio de colágeno intratumoral total respecto al área tumoral y **(C)** media del porcentaje intratumoral de colágeno en los diferentes rangos de tamaño de foco. Resultados presentados como la media \pm DE. *** $p < 0.005$ respecto al control. Barra de escala: 100 μ m.

5.4. Estudio del papel del MR endotelial en el reclutamiento de KCs

Por último, se ha estudiado el papel del MR en el reclutamiento de KCs cuantificando el porcentaje intratumoral de F4/80 por área tumoral total (gráfica B) y el porcentaje de F4/80 intratumoral por cada rango de tamaño de foco (gráfica C), a través del software FIJI-ImageJ™

. Estos resultados han mantenido la misma tendencia que el reclutamiento de HSCs, ya que se ha producido una reducción en el porcentaje medio

intratumoral de F4/80 en ratones MR-, tanto en porcentajes totales (gráfica B) como en porcentajes en función de cada rango de tamaño de foco (gráfica C).

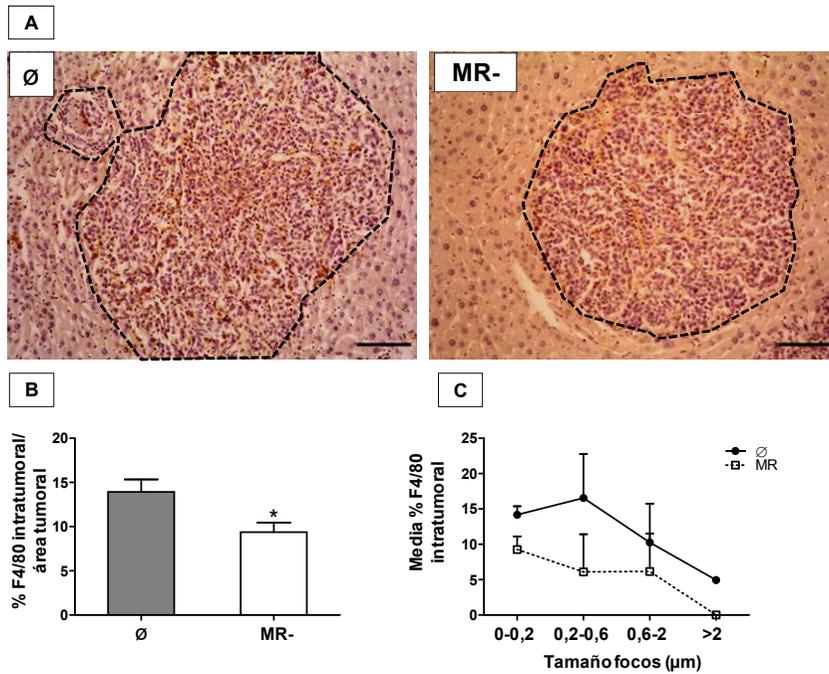


Figura 47. Efecto del bloqueo *in vivo* del MR endotelial sobre el reclutamiento de KCs. **(A)** Fotografías representativas a microscopía óptica de ratones control o MR-. **(B)** Cuantificación del porcentaje medio de F4/80 intratumoral total respecto al área tumoral y **(C)** media del porcentaje intratumoral de F4/80 por cada rango de tamaño de foco. Resultados representados como la media \pm DE * $p < 0.05$. Barra de escala: 100 µm

Discusión

El cáncer colorrectal (CCR) sigue siendo, a día de hoy, el tercer tipo de cáncer más común en todo el mundo, según datos de la fundación mundial de la investigación frente al cáncer (WCRF, del inglés World Cancer Research Foundation). El principal órgano de metástasis por CCR es el hígado, debido a su cercanía con el colon, una gran irrigación y un constante estado de inmunotolerancia evitando así una inflamación crónica (171). Entre el 25-30% de los pacientes diagnosticados con CCR desarrollan metástasis hepáticas durante el curso de la enfermedad, siendo la principal causa de muerte (14) ya que solo un 25% de estas metástasis son operables (172).

Una vez las células tumorales llegan a los sinusoides hepáticos, ruedan sobre su pared, a través de uniones de baja afinidad, por medio de selectinas expresadas por las LSCEs (173). Después, a través de integrinas y moléculas de adhesión se genera una unión mucho más estable (174), activando la expresión de factores que facilitan la transmigración, principalmente de tipo transcelular (54). Posteriormente, en el interior del parénquima hepático, el tumor inicia una remodelación del microambiente ayudado por el reclutamiento de poblaciones celulares del hospedador, tales como fibroblastos y macrófagos (175). Este reclutamiento junto con la formación de un ambiente inflamatorio (79) y fibrótico (176), favorece la colonización completa del hígado.

Según los resultados obtenidos por Benedicto A *et al.* la interacción entre la ICAM-1 endotelial y la LFA-1 tumoral favorece la infiltración de las células tumorales C26 al hígado y el desarrollo tumoral a través de múltiples procesos (78,105). Además, esta interacción desencadena una respuesta inflamatoria y un estado inmunotolerante local mediado por la actividad de la COX-2 y el MR (80). Sin embargo, hasta el momento no se ha analizado en pro-

fundidad el papel de esta interacción en el reclutamiento de KCs y HSCs, junto con la modulación de la respuesta desmoplásica, generada principalmente por HSCs activadas (121).

En consecuencia, este trabajo se ha centrado en aclarar el papel de la ICAM-1 endotelial, la COX-2 y el MR endotelial sobre las poblaciones hepáticas, HSCs y KCs, durante el desarrollo tumoral, para generar una visión más global y llegar a establecer nuevas vías de actuación frente a la metástasis hepática por CCR.

En 1999, Fujisaki *et al.* observaron por primera vez en células de CCR la expresión de LFA-1 (177). Años después, Arteta B. en su tesis doctoral (2001), no solo observó que las C26 expresaban LFA-1 sino que esta integrina era capaz de unirse a la ICAM-1 endotelial (178). Posteriormente, Benedicto A. en su tesis doctoral (2014) estudió esta interacción en las primeras fases del desarrollo metastásico, por medio de estudios con una línea tumoral deficiente de la subunidad β_2 de la LFA-1 (179).

En base a estos resultados, se ha estudiado *in vivo* el papel de la interacción ICAM-1/LFA-1 en el desarrollo metastásico hepático. Para ello se ha estudiado tanto la sub-unidad α_L del LFA-1 y como la ICAM-1 endotelial. La capacidad metastásica tumoral de las células C26 se ha reducido tras el bloqueo en las células C26 la sub-unidad α_L . Esta disminución metastásica se ha reflejado tanto en el área ocupada por el tumor como en el número medio de focos a diferentes rangos de tamaño. Este resultado obtenido concuerda con resultados previos en la tesis doctoral de Benedicto, A. donde se observó la reducción de la capacidad metastásica de las células C26 deficientes para la otra sub-unidad de la integrina LFA-1, la β_2 (179).

Además, la capacidad metastásica tumoral, tanto en el área ocupada por el tumor como en el número de focos medio, se ha incrementado al pre-activar las células C26 con sICAM1, debido a que su presencia genera un aumento en la expresión de la ICAM-1 endotelial (78). Este resultado podría estar relacionado con lo observado por Schellerer V.S *et al.* en su estudio, en el cual demostró que un aumento en la expresión de sICAM-1 está relacionado con un TME pro-inflamatorio en pacientes de CCR (180). Además, otro estudio llevado a cabo por Valcárcel M *et al.* reveló que esta activación por sICAM-1 también favorece la respuesta pro-inflamatoria y angiogénica, tras incrementar la expresión de COX-2 y con ella el incremento de citoquinas y factores de crecimiento (181).

La implicación de la ICAM-1 endotelial en la modulación del desarrollo metastásico hepático se ha observado *in vivo* por medio del silenciamiento parcial de dicha molécula. Este silenciamiento ha reducido la capacidad metastásica de las células tumorales C26, al disminuir tanto el área total ocupada por el tumor como el número medio de focos en el tejido hepático. Estos resultados se correlacionan con los observados en 2008 por Dianza C *et al.* en donde demostró que la inhibición de expresión de VCAM-1 e ICAM-1 redujo la capacidad de adhesión de las células tumorales HT29 al endotelio (182). Además, también están relacionados con resultados previos en nuestro grupo observados por Arteta B en su tesis doctoral (178) y Benedicto A *et al.* (78,105).

Como hemos comentado anteriormente, durante las primeras fases del desarrollo metastásico se produce una reacción inflamatoria e inmunotolerante directamente relacionada con la expresión de ICAM-1 hepática (67) junto con la interacción entre células tumorales y LSECs. Sin embargo, durante la colonización del hígado, las poblaciones residentes hepáticas como

HSCs y KCs activadas juegan un papel clave junto con las células tumorales en la formación del TME.

En concreto en el hígado, las KCs juegan un papel dual en la progresión metastásica ya que pueden actuar de manera pro-tumoral o anti-tumoral (183) y polarizarse hacia un fenotipo M1 o M2 (184). En cuanto al papel pro-tumoral, las KCs activadas por el tumor participan en la generación de una cascada pro-inflamatoria, incrementando la expresión de TNF- α e IL-1 β que activa la expresión de VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina, favoreciendo la adhesión y extravasación tumoral (79). Además, esta cascada pro-inflamatoria favorece la polarización de las KCs hacia un fenotipo M2 (185), el fenotipo más común de macrófagos presentes en el TME y englobados dentro del grupo de los TAMs (186).

Otra de las poblaciones hepáticas implicadas en el desarrollo tumoral son las HSCs, siendo las primeras en ser reclutadas al interior del TME tras la trans migración endotelial. Estas HSCs, son activadas hacia un fenotipo CAF (187) junto con fibroblastos circulantes reclutados (188,189). Para la activación en CAFs es necesario cambios en la expresión de factores solubles y en la ECM (190). Estos cambios conllevan un incremento de la capacidad invasiva y crecimiento tumoral, una disminución de la respuesta inmune hacia el tumor y un cambio en el estado metabólico tumoral, favoreciendo su desarrollo (191). Además, tal y como observaron Olaso E *et al.* en su modelo de metástasis hepática de melanoma, las HSCs fueron reclutadas para proporcionar una base estable para el proceso angiogénico al facilitar el reclutamiento de las células endoteliales angiogénicas (192).

Las HSCs junto con las KCs también incrementan la expresión de factores solubles que van a contribuir a la remodelación de la ECM hacia un estado más fibrótico (11) y así facilitar la progresión tumoral y la angiogénesis (193).

Por todo ello, en los últimos años múltiples estudios se han centrado en el estudio de las vías y moléculas que activan a las poblaciones celulares del hígado, concretamente, HSCs y KCs (194,195) durante la formación del TME y el desarrollo tumoral (196,197).

Para el análisis *in vivo* del reclutamiento de HSCs, se ha realizado la técnica de inmunohistoquímica para α -SMA (31,30), mientras que para el análisis del reclutamiento de KCs se ha llevado a cabo mediante la técnica de inmunohistoquímica para F4/80 (199,200). Tanto en el bloqueo de la sub-unidad α L del LFA-1 tumoral como en el silenciamiento parcial de la ICAM-1 endotelial, el reclutamiento de HSCs y de KCs ha disminuido, de igual manera en el porcentaje medio total intratumoral, como en el porcentaje medio intratumoral a diferentes tamaños de foco. Además, al pre-activar a las células tumorales C26 con sICAM-1 en el estudio *in vivo* de la sub-unidad α L el reclutamiento de HSCs y KCs ha incrementado significativamente tanto el porcentaje global como a diferentes tamaños de foco.

Estos resultados, los obtenidos del bloqueo de la sub-unidad α L de la LFA-1 tumoral y del silenciamiento parcial de la ICAM-1 endotelial, fortalecen la idea de que la interacción ICAM-1/LFA-1 está implicada en la capacidad metastática tumoral, afectando a diferentes procesos durante el desarrollo tumoral hepático, entre ellos la formación de un TME pro-tumoral.

A pesar de estos resultados anteriores, varios estudios asocian una mejor prognosis de la enfermedad a una mayor expresión de ICAM-1. Maeda K *et*

al. demostraron en pacientes de CCR con tumores primarios una mejor prognosis en aquellos con una alta expresión de ICAM-1 (201). Además, Tachimori A *et al.* observaron que la presencia de ICAM-1 en tumores redujo la capacidad metastásica en el hígado de las células CCR, a través de la activación de los linfocitos T citotóxicos o las células NK (202). Por último, el estudio de Yang M *et al.* determinó que la deficiencia de la ICAM-1 se asocia con una mayor infiltración de los macrófagos al TME junto con la diferenciación hacia TAMs y con una peor prognosis de la enfermedad (203). Sin embargo, estos estudios analizaron la ICAM-1 tumoral, el primero en el tejido hepático (201) y el segundo en línea tumoral inmortalizada LM-H3 (202), mientras que nuestros resultados se centran en la ICAM-1 endotelial. Por otro lado, el estudio de Yang M *et al.* fue realizado en ratones deficientes para la ICAM-1, mientras que nuestros resultados se han realizado en ratones silenciados parcialmente para la ICAM-1 endotelial. Estos resultados indican un doble papel de la ICAM-1 en el desarrollo tumoral, por lo que sería necesario un estudio en profundidad para conocer su correcta implicación en este proceso.

En la formación del TME, uno de los aspectos clave es la formación de un estado pro-inflamatorio. En este escenario, la COX-2 posee un papel esencial en su formación. Diferentes estudios demostraron que la actividad de esta enzima aumenta en las células tumorales de colon tanto durante la lesión primaria como en la metástasis hepática (154,204). Además, estudios previos de nuestro grupo, determinaron que la COX-2 es activada tras la interacción ICAM-1/LFA-1, reflejándose en un aumento de la producción de PGE₂ que estimula la secreción de IL-1 β por las LSECs. Este proceso desencadena un aumento de la expresión de ICAM-1 que favorece la adhesión y trans migración de las células tumorales circulantes (80). La expresión de la ICAM-1 forma un circuito de retroalimentación positiva con la expresión de la COX-2,

manteniendo la activación de las poblaciones presentes en los sinusoides y favoreciendo a la creación de un ambiente pro-inflamatorio y pro-angiogénico (80,181).

Sin embargo, la inhibición de la actividad de la COX-2 por medio del CLX, uno de los inhibidores específicos más utilizado debido a su alta especificidad (205–207), reduce el desarrollo tumoral en varios tipos de cáncer, entre ellos el CCR (208), cáncer de pulmón (209), de mama (210), de próstata (211) y hepático (212), a diferentes niveles de actuación. Nuestros resultados *in vitro* utilizando células tumorales C26 han demostrado que tanto la actividad de la COX-2 como la producción de PGE₂ disminuyen en presencia del CLX, un resultado esperable debido al papel limitante de la COX-2 en la producción de esta molécula (213,214). Por otro lado, también han revelado el papel activador inflamatorio de la sICAM-1 sobre las células tumorales, incrementando la actividad de COX-2 y la expresión de PGE₂. Estos resultados refuerzan la idea que Arteta B *et al.* expuso en su trabajo, en la relación entre la expresión de ICAM-1 y la COX-2 (80). Además, según determinó en su estudio Seok SM *et al.* la COX-2 modulada a través de la activación de la vía p38/MAPK es capaz de inducir la expresión de la ICAM-1 en las células del endotelio vascular en el cerebro, facilitando la formación de una respuesta inflamatoria (184).

Según Hanahan y Weinberg en su estudio sobre los sellos del cáncer, las células tumorales adquieren seis capacidades durante el desarrollo metastásico. Entre ellas se encuentran, la capacidad proliferativa, la capacidad migratoria y la capacidad de inducir una respuesta angiogénica (215). La capacidad proliferativa de las células tumorales es esencial durante las primeras fases del desarrollo tumoral, ya que las células han de hacer crecer el tamaño del tumor y así aumentar la secreción de factores dentro del TME (43). Además,

la capacidad migratoria es imprescindible para la invasión tumoral y por lo tanto el desarrollo tumoral (217). La activación por la sICAM-1 sobre las células tumorales C26 ha activado su capacidad proliferativa y migratoria. Sin embargo, este aumento de la capacidad proliferativa y migratoria se ha visto inhibido por la acción del CLX (218–220). Según Sonoshita M *et al.* esto puede ser debido a que la COX-2 activa la vía de señalización PI3K/Akt a través del receptor de prostaglandina E4, lo que estimula la proliferación y la motilidad de las células de CCR (221). Además, para que las células tumorales proliferen y migren es necesaria la degradación de la ECM (222,223). Para ello, las células tumorales expresan MMPs, que va a degradar el colágeno tipo IV (224,225). Al igual que resultados anteriores, la activación de las células tumorales C26 con sICAM-1 ha incrementado la expresión de MMP-2 mientras que la inhibición de la COX-2 la ha disminuido. Estos resultados se correlacionan con los observados por Leung E *et al.* donde determinó que la expresión de MMP-2 disminuye al tratar a las células tumorales de CCR con otro inhibidor específico de la COX-2, NS398, mientras que incrementa su expresión en presencia de PGE₂ (226), por lo que la expresión de MMP-2 podría estar en parte modulada por la activación de la COX-2.

Por último, se ha analizado la capacidad de inducción de una respuesta angiogenica. En este proceso, el VEGF ha demostrado ser una molécula clave que se encuentra sobre-expresada en el TME (228,229). La PGE₂ es, entre otros factores, responsable de este incremento en los niveles de dicho factor (230). Dentro de este TME, las células tumorales expresan VEGF y sus niveles se han incrementado tras la activación tumoral por la sICAM-1. Este aumento ha sido impedido por la inhibición de la COX-2, lo que nos podría indicar que una parte de la producción de VEGF está modulada por la actividad de COX-2 (51). Esta modulación, según Hu Het *al.* en su estudio sobre el adenocarcinoma pancreático ductal, podría estar generada a través de la activación de

los receptores EGFR, que activan la vía p38-MAPk, que a su vez activa el factor de transcripción Sp1 y este la expresión de COX-2 y de VEGF (227).

Estos resultados obtenidos han revelado que la interacción ICAM-1/LFA-1 podría ser la responsable de activar la capacidad proliferativa, migratoria y angiogénica del tumor, así como la degradación de la ECM, mediada por un aumento en la expresión de ICAM-1 que modula la actividad de la COX-2.

Como se ha indicado anteriormente, el TME está formado por células tumorales y estromales activadas. Pero para que las poblaciones estromales se activen es precisa la presencia de factores solubles derivados del tumor. En los resultados obtenidos, la presencia de factores solubles expresados por las células tumorales C26 ha activado a los fibroblastos hacia un fenotipo de CAFs al aumentar la expresión de ICAM-1(228–231) y FAP (232–234), dos proteínas que incrementan su expresión en el proceso de activación (123). Además, esta presencia de factores solubles también ha afectado a los macrófagos y su activación a TAMs aumentando la expresión del MR (235,236) y de ICAM-1 (237). Tras su activación, estas células estromales han adquirido propiedades pro-migratorias que han favorecido su reclutamiento a los focos tumorales incipientes en respuesta a los factores solubles expresados por las células tumorales (238,239). Este incremento de las capacidades migratorias ha sido aún mayor cuando las células han sido pre-activadas con sICAM-1, mientras que la inhibición de la COX-2 tumoral ha disminuido la capacidad migratoria de las células estromales. Estos resultados sugieren que el descenso de PGE₂ en el tumor, disminuye la producción de mediadores inflamatorios en el TME. Además, dio descenso, es capaz de disminuir la expresión de otros factores quimiotácticos que activan vías para potenciar la migración estromal, mientras que la ICAM-1, al incrementar la actividad de COX-2 y la producción de PGE₂ permite una mayor expresión de estos facto-

res quimiotácticos que incrementan la capacidad migratoria. En cuanto a la migración de los TAMs, está podría estar en parte mediada por la PGE₂ que a través del receptor EP4 activa la producción de CSF-1, que a su vez, activa la vía ERK1/2. Por otro lado, los CAFs, a través del mismo receptor EP4, activan la vía STAT3 y el eje CXCL12/CXCR4 que activa su migración (240).

En base a estos resultados y sabiendo que a) los fibroblastos conforman la principal población no tumoral del TME (191), b) los CAFs son los principales productores de COX-2 en el TME (241) y c) existe una correlación entre una mayor expresión de COX-2 con el número de CAFs en otros tipos de cáncer como el de mama (242), se ha analizado *in vitro* el papel de la COX-2 en la capacidad migratoria y angiogénica de las HSCs.

La migración de esta población hepática, como era de esperar sigue la tendencia mostrada en resultados previos, ya que ha incrementado en presencia a los factores solubles expresados por las células tumorales mientras que ha disminuido tras la inhibición de la COX-2. Según el estudio de Failli P *et al.* esta migración podría estar condicionada a la expresión de PDGF modulada por la expresión de PGE₂ que, a su vez, es inducida por la activación de la COX-2 (243). Además, la interacción tumor-estroma es esencial en el desarrollo tumoral (26,85) y es bidireccional, es decir, los factores solubles tumorales afectan a las HSCs y los factores solubles de las HSCs modulan al tumor (245). Nuestros resultados han revelado que la migración tumoral de C26 ha aumentado tras estar en contacto con los factores solubles secretados por las HSCs, favoreciendo la invasión más tardía de células tumorales presentes en la circulación tras su liberación continua del tumor primario. Aún más, la inhibición de la COX-2 en las HSCs ha reducido su potencial migratorio inducido por las células tumorales. Este potencial migratorio, podría estar mediado por una disminución de la expresión de TNF- α derivado de las

HSCs, reduciendo el potencial migratorio e invasivo de las células tumorales (246). Por último, la inhibición de la COX-2 en el tumor, se ha correlacionado con una disminución en la capacidad estimuladora tumoral sobre la producción de VEGF por las HSCs. Es decir, los factores solubles derivados del tumor, capaces de activar a las HSCs, dependen de la activación de la COX-2. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los estudios de Katoh *H et al.* y Zhao Y *et al.* donde observaron que la sobre-expresión de COX-2 activa la expresión de VEGF a través de la interacción CXCL12/CXCR4 (247) y de la vía de señalización p44/42 MAP(248).

Todos estos resultados se han visto reforzados por los resultados *in vivo* donde la inhibición de la COX-2 ha disminuido la capacidad metastásica tumoral de las células C26, tanto en el total de área de tejido ocupado por el tumor como en el número medio de focos a diferentes rangos de tamaño. Estos resultados se correlacionan con lo observado previamente para otros inhibidores de la COX-2, como el Etodolac (249) y el NS-398 (250), los cuales fueron capaces de reducir la metástasis hepática por células de cáncer de colon. Además, la activación con sICAM-1 de las células tumorales C26 inoculadas ha incrementado la capacidad metastásica tumoral reflejada en el área total tumoral y en el número medio de focos de distintos tamaños. Sin embargo, este efecto activador sobre el tumor ha sido revertido al inhibir la COX-2. Junto con la capacidad metastásica tumoral, la activación de las células C26 con sICAM-1 ha aumentado el reclutamiento de HSCs y KCs, tanto el total como en los diferentes rangos de tamaño de foco, mientras que la inhibición de la COX-2 ha sido capaz de reducirlo, siguiendo la misma tendencia que lo observado en resultados previos. Estos resultados están relacionados con las conclusiones obtenidas de los estudios en hepatocarcinoma de Hung WH *et al.* y de Xu Y *et al.* donde las HSCs poseen un papel inmunosupresor dentro del TME que favorece el desarrollo tumoral (251) y a que mo-

dulan la expresión de PGE₂ mediada por la actividad de la COX-2, promoviendo el desarrollo tumoral al reducir la respuesta inmune (252). Además, según lo observado por Dianzani C *et al.* el CLX redujo la expresión de ICAM-1 modulando la adhesión de las células tumorales de colon HT29 al endotelio (182).

El reclutamiento de HSCs y KCs tiene un efecto directo en la modulación de la respuesta desmoplásica durante el desarrollo tumoral. En el hígado, las HSCs se caracterizan por ser las principales productoras de colágeno en estados fibróticos (253). Por ello, a través de la tinción de Rojo Siria se ha analizado la respuesta desmoplásica (215), la cual está relacionada con una peor prognosis de la metástasis hepática (122).

De acuerdo con este papel, el mayor reclutamiento de HSCs promovido por la activación de la sICAM-1 sobre el tumor, se ha correlacionado con un aumento en el desarrollo del estado desmoplásico. Además, en los resultados donde se ha observado una disminución del reclutamiento de HSCs, tanto en el bloqueo de la sub-unidad αL del LFA, como en el silenciamiento parcial de la ICAM-1 endotelial y tras la inhibición de la COX-2, se relaciona con una menor deposición de colágeno durante la colonización tumoral del hígado.

Por último, tal y como observaron Arteta B *et al.* la sobre-expresión de ICAM-1 y la activación de la COX-2 incrementa la expresión del MR endotelial. Esto reduce la respuesta inmune hacia el tumor, favoreciendo el desarrollo tumoral (80). Aun cuando el MR se ha identificado típicamente en macrófagos, en el hígado el receptor muestra una mayor actividad funcional en las LSEC (254–256). Además, teniendo en cuenta que en el hígado hay una mayor presencia de endoteliales que de macrófagos y en base a resultados pre-

vios, se ha analizado *in vivo* el papel del silenciamiento del MR endotelial a través de un anticuerpo anti-MR

Los resultados han reflejado una disminución en la capacidad metastásica tumoral de las células C26 tras la neutralización del MR. Esta disminución podría estar mediada por una disminución de IL-1 β , al reducir el MR según lo observado por Mendoza L *et al.* en la metástasis hepática por células de melanoma (257) y por Arteta B *et al.* (80) en células de cáncer de colon. En cuanto al reclutamiento de las poblaciones estromales hepáticas por el tumor, tanto HSCs como KCs, también ha disminuido tras el bloqueo del MR endotelial. Estos resultados apoyan un papel de este receptor en diferentes etapas de la progresión tumoral. Además, el MR tiene la capacidad de actuar como receptor de las cadenas α de colágeno desnaturalizado (258,259), por lo que se ha sugerido su participación en actividades profibróticas en el hígado. En el presente trabajo, se ha demostrado una reducción de la respuesta desmoplásica tras el bloqueo del MR endotelial lo cual se correlaciona, además, con la disminución del reclutamiento de HSCs en el tumor. Estos resultados no solo refuerzan la idea propuesta por Arteta B *et al.* de que el MR endotelial media el desarrollo tumoral en metástasis hepática, al disminuir la respuesta inmune antitumoral (80) sino también al modular el reclutamiento de poblaciones estromales hepáticas y circulantes así como la formación de un TME fibrótico.

Teniendo en cuenta todo lo anterior se podría postular que la interacción entre la LFA-1 tumoral y la ICAM-1 endotelial no solo condiciona el desarrollo metastásico en el hígado en las primeras fases como la adhesión y la trans migración. Esta interacción también modula la capacidad proliferativa y migratoria de las células tumorales además de influir en el reclutamiento y activación estromal, que promueve la formación de un TME favorecedor del

desarrollo hepático tumoral. La interacción LFA-1/ICAM-1 induce una mayor actividad de la COX-2 confiriendo al TME un estado pro-inflamatorio y pro-angiogénico. En este contexto, el aumento de la actividad del MR endotelial modula el establecimiento de un estado fibrogénico ayudando aún más a la progresión tumoral. Por todo ello, se podría establecer tanto a la interacción ICAM-1/LFA-1, la COX-2 y el MR como posibles dianas terapéuticas para la reducción de la metástasis hepática por CCR.

Conclusiones

1. La interacción de la ICAM-1 con la subunidad α L de la integrina LFA-1 modula *in vivo* el desarrollo tumoral hepático de las células de carcinoma murino C26, favoreciendo el reclutamiento de poblaciones residentes hepáticas, tales como HSCs y KCs, así como la formación de una matriz fibrótica mediado por el incremento de la respuesta desmoplásica.

2. El silenciamiento *in vivo* de la ICAM-1 endotelial reduce el desarrollo tumoral hepático producido por las células tumorales C26 al mediar el reclutamiento de las poblaciones residentes hepáticas, HSCs y KCs, junto con una disminución de la respuesta desmoplásica reduciendo la formación de una matriz fibrótica .

3. La activación tumoral por sICAM-1 *in vitro* favorece la generación de una respuesta inflamatoria y angiogénica así como la formación de un TME pro-tumoral mediante la modulación de la COX-2 tumoral y estromal durante el desarrollo tumoral hepático.

4. La COX-2 activada por la sICAM-1 en el tumor favorece el desarrollo tumoral hepático de las células tumorales C26, activando el reclutamiento de las poblaciones hepáticas residentes, HSCs y KCs, así como la creación de un microambiente fibrogénico a través del aumento de la respuesta desmoplásica *in vivo*.

5. El bloqueo del MR *in vivo* reduce la capacidad metastásica tumoral de las células C26 y modula el reclutamiento de las poblaciones hepáticas estromales, HSCs y KCs junto con una disminución en la respuesta desmoplásica, evitando la formación de un microambiente fibrogénico.

Bibliografía

1. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends — An Update. 2016;25(January):16–28.
2. Robertson RG, Geiger WJ, Davis NB. Carcinoid tumors. *Am Fam Physician*. 2006;74(3):429–34.
3. Mehren M von, Joensuu H. Gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol*. 2018;36(2):136–43.
4. Hollie N, Asakrah S. MALT lymphoma of the colon: A clinicopathological review. *J Clin Pathol*. 2020;1–6.
5. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol*. 2019;14(2):89–103.
6. Young PE, Womeldorph CM, Johnson EK, Maykel JA, Brucher B, Stojadinovic A, et al. Early detection of colorectal cancer recurrence in patients undergoing surgery with curative intent: Current status and challenges. *J Cancer*. 2014;5(4):262–71.
7. Neo JH, Ager EI, Angus PW, Zhu J, Herath CB, Christophi C. Changes in the renin angiotensin system during the development of colorectal cancer liver metastases. *BMC Cancer*. 2010;10.
8. Munro MJ, Wickremesekera SK, Peng L, Tan ST, Itinteang T. Cancer stem cells in colorectal cancer: A review. *J Clin Pathol*. 2018;71(2):110–6.
9. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Dieste AP, Cerrada E, Yoldi MJR. Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18(1).
10. Valderrama-Treviño AI, Barrera-Mera B, Ceballos-Villalva JC, Montalvo-Javé EE. Hepatic metastasis from colorectal cancer. *Euroasian J Hepato-Gastroenterology*. 2017;7(2):166–75.
11. Van Den Eynden GG, Majeed AW, Illemann M, Vermeulen PB, Bird

- NC, Høyer-Hansen G, et al. The multifaceted role of the microenvironment in liver metastasis: Biology and clinical implications. *Cancer Res.* 2013;73:2031–43.
12. Arshad U, Sutton PA, Ashford MB, Treacher KE, Liptrott NJ, Rannard SP, et al. Critical considerations for targeting colorectal liver metastases with nanotechnology. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology.* 2020;12(2):1–23.
 13. Kow AWC. Hepatic metastasis from colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol.* 2019;10(6):1274–98.
 14. Chow FCL, Chok KSH. Colorectal liver metastases: An update on multidisciplinary approach. *World J Hepatol.* 2019;11(2):150–72.
 15. Hackl C, Neumann P, Gerken M, Loss M, Klinkhammer-Schalke M, Schlitt HJ. Treatment of colorectal liver metastases in Germany: A ten-year population-based analysis of 5772 cases of primary colorectal adenocarcinoma. *BMC Cancer.* 2014;14(1):1–10.
 16. Mescher A. Junqueira's Basic Histology: Text and atlas 14th edition. MC Graw Gill Education. 2016. 561 p.
 17. Singh I. Textbook of Human Histology. Textbook of Human Histology. 2011. 394 p.
 18. Racanelli V, Rehmann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology.* 2006;43(2 SUPPL. 1).
 19. Sørensen KK, Simon-santamaria J, Mccuskey RS. Liver Sinusoidal Endothelial Cells. 2015;5(October):1751–74.
 20. Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: A review. *Comp Hepatol.* 2002;1:1–17.
 21. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(7):397–411.
 22. Kierszenbaum, A.L, Tres L. Histología y Biología Celular: Introducción a

- la anatomía patológica. Elsevier Inc.; 2012. 700 p.
23. Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int.* 2006;26(10):1175–86.
 24. Dixon LJ, Barnes M, Tang H, Pritchard MT, Laura E, Clinic C. Kupffer Cells in the Liver. *Compr Physiol.* 2016;3(2):785–97.
 25. DiFiore's. Atlas of Histology with functional correlations. Vasa. 2008. 509 p.
 26. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol.* 2017;27(21):R1147–51.
 27. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet.* 1889;133(3421):571–3.
 28. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1).
 29. Eslami-S Z, Cortés-Hernández LE, Alix-Panabières C. The Metastatic Cascade as the Basis for Liquid Biopsy Development. *Front Oncol.* 2020;10(July):1–10.
 30. Ribatti D, Tamma R, Annese T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Transl Oncol.* 2020;13(6):100773.
 31. Mittal V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2018;13(1):395–412.
 32. Moustakas A, de Herreros AG. Epithelial–mesenchymal transition in cancer. *Mol Oncol.* 2017;11(7):715–7.
 33. Kahata K, Dadras MS, Kaoru Kahata, Mahsa Shahidi Dadras and AM. TGF- b Family Signaling in Epithelial Differentiation and Epithelial–Mesenchymal Transition. *Cold Spring Perspect Biol.* 2018;10:a022194:1–32.

34. Tam SY, Wu VWC, Law HKW. Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancers: HIF-1 α and Beyond. *Front Oncol.* 2020;10(April):1–11.
35. Anitha K Shenoy JL. Cancer cells remodel themselves and vasculature to overcome the endothelial barrier. *Cancer Lett.* 2016;308(2):534–44.
36. Li CW, Xia W, Huo L, Lim SO, Wu Y, Hsu JL, et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF- α requires NF- κ B-mediated transcriptional upregulation of Twist1. *Cancer Res.* 2012;72(5):1290–300.
37. Kong D, Wang Z, Sarkar SH, Li Y, Banerjee S, Saliganan A, et al. Platelet-Derived Growth Factor-D Overexpression Contributes to Epithelial-Mesenchymal Transition of PC3 Prostate Cancer Cells. *Stem Cells.* 2008;26(6):1425–35.
38. Ieda T, Tazawa H, Okabayashi H, Yano S, Shigeyasu K, Kuroda S, et al. Visualization of epithelial-mesenchymal transition in an inflammatory microenvironment–colorectal cancer network. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–11.
39. Van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W. Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res - Rev Mutat Res.* 2011;728(1–2):23–34.
40. Miyoshi A, Kitajima Y, Sumi K, Sato K, Hagiwara A, Koga Y, et al. Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer.* 2004;90(6):1265–73.
41. Scheau C, Badarau IA, Costache R, Caruntu C, Mihai GL, Didilescu AC, et al. The role of matrix metalloproteinases in the epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma. *Anal Cell Pathol.* 2019;2019.
42. Mysliwiec AG, Ornstein DL. Matrix metalloproteinases in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2002;1(4):208–19.
43. Zavyalova M V., Denisov E V., Tashireva LA, Savelieva OE, Kaigorodova

- E V., Krakhmal N V., et al. Intravasation as a Key Step in Cancer Metastasis. *Biochem.* 2019;84(7):762–72.
44. Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2013;1833(12):3481–98.
45. Kakavandi E, Shahbahrami R, Goudarzi H, Eslami G, Faghihloo E. Anoikis resistance and oncoviruses. *J Cell Biochem.* 2018;119(3):2484–91.
46. Adwan H, Elharouni D, Habashy D, Banna N, Georges R, Pervaiz A, et al. Early Metastasis in Colorectal Cancer Poses an Option for New Diagnostic and Treatment Strategies. In: Basbinar Y, Calibas-Kocal G, editors. *IntechOpen. Cancer Met.* IntechOpen; 2018.
47. Du B, Yang ZY, Zhong XY, Fang M, Yan YR, Qi GL, et al. Metastasis-associated protein 1 induces VEGF-C and facilitates lymphangiogenesis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2011;17(9):1219–2140.
48. Christofori G. Metastatic colon cancer cells negotiate the intravasation notch. *Cancer Cell.* 2011;19(1):6–8.
49. Bockhorn M, Jain RK, Munn LL. Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed? *Lancet Oncol.* 2007;8(5):444–8.
50. Huang C, Chen Y. Lymphangiogenesis and colorectal cancer. *Saudi Med J.* 2017;38(3):237–44.
51. Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson PC. The physics of cancer: The role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(7):512–22.
52. Gay LJ, Felding-habermann B. Contribution of Platelets to Tumor Metastasis Laurie. *Nat Rev Cancer.* 2019;11(2):123–34.
53. Wang HH, McIntosh AR, Hasinoff BB, Rector ES, Ahmed N, Nance DM,

- et al. B16 melanoma cell arrest in the mouse liver induces nitric oxide release and sinusoidal cytotoxicity: A natural hepatic defense against metastasis. *Cancer Res.* 2000;60(20):5862–9.
54. Wilkinson AL, Qurashi M, Shetty S. The Role of Sinusoidal Endothelial Cells in the Axis of Inflammation and Cancer Within the Liver. *Front Physiol.* 2020;11(August):1–25.
 55. Mielgo A, Schmid MC. Liver tropism in cancer: The hepatic metastatic niche. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2020;10(3).
 56. Braet F, Nagatsuma K, Saito M, Soon L, Wisse E, Matsuura T. The hepatic sinusoidal endothelial lining and colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol.* 2007;13(6):821–5.
 57. Luo Y, Ohmori H, Fujii K, Moriwaka Y, Sasahira T, Kurihara M, et al. HMGB1 attenuates anti-metastatic defence of the liver in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2010;46(4):791–9.
 58. Brodt P. Role of the Host Inflammatory Response in Colon Carcinoma Initiation, Progression and Liver Metastasis. 2010. p. 289–319.
 59. Sökeland G, Schumacher U. The functional role of integrins during intra- and extravasation within the metastatic cascade. *Mol Cancer.* 2019;18(1):1–19.
 60. Woodward J. Crossing the endothelium. *Cell Adh Migr.* 2008;2(3):151–2.
 61. Porquet N, Poirier A, Houle F, Pin AL, Gout S, Tremblay PL, et al. Survival advantages conferred to colon cancer cells by E-selectin-induced activation of the PI3K-NFκB survival axis downstream of Death receptor-3. *BMC Cancer.* 2011;11.
 62. Paschos KA, Canovas D, Bird NC. The engagement of selectins and their ligands in colorectal cancer liver metastases. *J Cell Mol Med.* 2010;14(1–2):165–74.
 63. Khatib AM, Fallavollita L, Wancewicz E V., Monia BP, Brodt P.

- Inhibition of hepatic endothelial E-selectin expression by C-raf antisense oligonucleotides blocks colorectal carcinoma liver metastasis. *Cancer Res.* 2002;62(19):5393–8.
64. Brodt P, Fallavollita L, Bresalier RS, Meterissian S, Norton CR, Wolitzky BA. Liver endothelial E-selectin mediates carcinoma cell adhesion and promotes liver metastasis. *Int J Cancer.* 1997;71(4):612–9.
 65. Leong HS, Robertson AE, Stoletov K, Leith SJ, Chin CA, Chien AE, et al. Invadopodia Are Required for Cancer Cell Extravasation and Are a Therapeutic Target for Metastasis. *Cell Rep.* 2014;8(5):1558–70.
 66. Na H, Liu X, Li X, Zhang X, Wang Y, Wang Z, et al. Novel roles of DC-SIGNR in colon cancer cell adhesion, migration, invasion, and liver metastasis. *J Hematol Oncol.* 2017;10(1):1–18.
 67. Benedicto A, Romayor I, Arteta B. Role of liver ICAM-1 in metastasis. *Oncol Lett.* 2017;14(4):3883–92.
 68. Bui TM, Wiesolek HL, Sumagin R. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *J Leukoc Biol.* 2020;(February):1–13.
 69. Kotteas EA, Boulas P, Gkiozos I, Tsagakouli S, Tsoukalas G, Syrigos KN. The Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) in lung cancer: Implications for disease progression and prognosis. *Anticancer Res.* 2014;34(9):4665–72.
 70. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol.* 1986;137(1):245–54.
 71. Pober JS, Bevilacqua MP, Mendrick DL, Lapierre LA, Fiers W, Gimbrone MA. Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J Immunol.* 1986;136(5):1680–7.
 72. Kukic P, Alvin Leung HT, Bemporad F, Aprile FA, Kumita JR, De Simone

- A, et al. Structure and dynamics of the integrin LFA-1 I-domain in the inactive state underlie its inside-out/outside-in signaling and allosteric mechanisms. *Structure*. 2015;23(4):745–53.
73. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*. 2002;110:673–87.
74. Lefort CT, Ley K. Neutrophil arrest by LFA-1 activation. *Front Immunol*. 2012;3(JUN):1–10.
75. Luo B, Carman C V, Springer TA. Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:619–47.
76. Yang L, Froio R., Sciuto T., Dvorak A., Alon R, Luscinskas F. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- α -activated vascular endothelium under flow. *Inmunobiology*. 2005;106(2):584–92.
77. Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(9):1379–86.
78. Benedicto A, Herrero A, Romayor I, Marquez J, Smedsrød B, Olaso E, 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*. 2019;9(1):1–12.
79. Auguste P, Fallavollita L, Wang N, Burnier J, Bikfalvi A, Brodt P. The host inflammatory response promotes liver metastasis by increasing tumor cell arrest and extravasation. *Am J Pathol*. 2007;170(5):1781–92.
80. Arteta B, Lasuen N, Lopategi A, Sveinbjörnsson B, Smedsrød B, Vidal-Vanaclocha F. Colon carcinoma cell interaction with liver sinusoidal endothelium inhibits organ-specific antitumor immunity through interleukin-1-induced mannose receptor in mice. *Hepatology*. 2010;51(6):2172–82.
81. Borsig L, Läubli H. Cell adhesion during tumorigenesis and metastasis.

- Encycl Cancer. 2018;1:307–14.
82. Liu Y, Cao X. Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer Cell*. 2016;30(5):668–81.
 83. Brodt P. Role of the microenvironment in liver metastasis: From pre- to prometastatic niches. *Clin Cancer Res*. 2016;22(24):5971–82.
 84. Baghban R, Roshangar L, Jahanban-Esfahlan R, Seidi K, Ebrahimi-Kalan A, Jaymand M, et al. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun Signal*. 2020;18(1):1–19.
 85. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*. 2012;21(3):309–22.
 86. Wu T, Dai Y. Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Lett*. 2017;387:61–8.
 87. Wang M, Zhao J, Zhang L, Wei F, Lian Y, Wu Y, et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer*. 2017;8(5):761–73.
 88. Liu J, Cho YB, Hong HK, Wu S, Ebert PJ, Bray SM, et al. Molecular dissection of CRC primary tumors and their matched liver metastases reveals critical role of immune microenvironment, EMT and angiogenesis in cancer metastasis. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–15.
 89. Williamson T, Sultanpuram N, Sendi H. The role of liver microenvironment in hepatic metastasis. *Clin Transl Med*. 2019;8(1).
 90. Baglieri J, Brenner DA, Kisseleva T. The role of fibrosis and liver-associated fibroblasts in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7).
 91. Heneberg P. Paracrine tumor signaling induces transdifferentiation of surrounding fibroblasts. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;97:303–11.
 92. Colangelo T, Polcaro G, Muccillo L, D'Agostino G, Rosato V, Ziccardi P,

- et al. Friend or foe?: The tumour microenvironment dilemma in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2017;1867(1):1–18.
93. Yamaguchi H, Sakai R. Direct interaction between carcinoma cells and cancer associated fibroblasts for the regulation of cancer invasion. *Cancers (Basel)*. 2015;7(4):2054–62.
 94. Erdogan B, Webb DJ. Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis. *Biochem Soc Trans*. 2017;45(1):229–36.
 95. Ni WD, Yang ZT, Cui CA, Cui Y, Fang LY, Xuan YH. Tenascin-C is a potential cancer-associated fibroblasts marker and predicts poor prognosis in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;486(3):607–12.
 96. Cui Q, Wang B, Li K, Sun H, Hai T, Zhang Y, et al. Upregulating MMP-1 in carcinoma-associated fibroblasts reduces the efficacy of taxotere on breast cancer synergized by collagen IV. *Oncol Lett*. 2018;16(3):3537–44.
 97. Chen R, Huang L, Hu K. Natural products remodel cancer-associated fibroblasts in desmoplastic tumors. *Acta Pharm Sin B*. 2020;
 98. Wang FT, Sun WEI, Zhang JT, Fan YZ. Cancer-associated fibroblast regulation of tumor neo-angiogenesis as a therapeutic target in cancer (Review). *Oncol Lett*. 2019;17(3):3055–65.
 99. Sugihara H, Ishimoto T, Yasuda T, Izumi D, Eto K, Sawayama H, et al. Cancer-associated fibroblast-derived CXCL12 causes tumor progression in adenocarcinoma of the esophagogastric junction. *Med Oncol*. 2015;32(6).
 100. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(May):392–401.
 101. Wang JP, Hielscher A. Fibronectin: How its aberrant expression in tumors may improve therapeutic targeting. *J Cancer*. 2017;8(4):674–82.

102. De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol.* 2003;200(4):429–47.
103. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(5):392–401.
104. Olaso E, Salado C, Egilegor E, Gutierrez V, Santisteban A, Sancho-Bru P, et al. Proangiogenic role of tumor-activated hepatic stellate cells in experimental melanoma metastasis. *Hepatology.* 2003;37(3):674–85.
105. Benedicto A, Marquez J, Herrero A, Olaso E, Kolaczowska E, Arteta B. 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.* 2017;17(1):1–17.
106. Thu Nguyen-Lefebvre A, Horuzsko A. Kupffer Cell Metabolism and Function. *J Enzymol Metab.* 2015;1(1):1–26.
107. Zhou J, Tang Z, Gao S, Li C, Feng Y, Zhou X. Tumor-Associated Macrophages: Recent Insights and Therapies. *Front Oncol.* 2020;10(February):1–13.
108. Jayasingam SD, Citartan M, Thang TH, Mat Zin AA, Ang KC, Ch'ng ES. Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice. *Front Oncol.* 2020;9(January):1–9.
109. Zheng X, Turkowski K, Mora J, Brüne B, Seeger W, Weigert A, et al. Redirecting tumor-associated macrophages to become tumoricidal effectors as a novel strategy for cancer therapy. *Oncotarget.* 2017;8(29):48436–52.
110. Rhee I. Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. *Arch Pharm Res.* 2016;39(11):1588–96.
111. Lin Y, Xu J, Lan H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: Biological roles and clinical therapeutic applications. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):1–16.

112. Grossman JG, Nywening TM, Belt BA, Panni RZ, Krasnick BA, DeNardo DG, et al. Recruitment of CCR2 + tumor associated macrophage to sites of liver metastasis confers a poor prognosis in human colorectal cancer. *Oncoimmunology*. 2018;7(9):1–11.
113. Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;66(1):1–9.
114. Li X, Yao W, Yuan Y, Chen P, Li B, Li J, et al. Targeting of tumour-infiltrating macrophages via CCL2/CCR2 signalling as a therapeutic strategy against hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2017;66(1):157–67.
115. Van Overmeire E, Stijlemans B, Heymann F, Keirsse J, Morias Y, Elkrim Y, et al. M-CSF and GM-CSF receptor signaling differentially regulate monocyte maturation and macrophage polarization in the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 2016;76(1):35–42.
116. Fu XT, Dai Z, Song K, Zhang ZJ, Zhou ZJ, Zhou SL, et al. Macrophage-secreted IL-8 induces epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells by activating the JAK2/STAT3/Snail pathway. *Int J Oncol*. 2015;46(2):587–96.
117. Chen Y, Song Y, Du W, Gong L, Chang H, Zou Z. Tumor-associated macrophages: An accomplice in solid tumor progression. *J Biomed Sci*. 2019;26(1):1–13.
118. Brassart-Pasco S, Brézillon S, Brassart B, Ramont L, Oudart JB, Monboisse JC. Tumor Microenvironment: Extracellular Matrix Alterations Influence Tumor Progression. *Front Oncol*. 2020;10(April):1–13.
119. Chen X, Song E. Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(2):99–115.
120. Cukierman E, Bassi DE. Physico- mechanical aspects of extracellular matrix influences on tumorigenic behaviors. *Semin Cancer Biol*. 2010;20(3):139–45.
121. Conti JA, Kendall TJ, Bateman A, Armstrong TA, Papa-Adams A, Xu Q,

- et al. The desmoplastic reaction surrounding hepatic colorectal adenocarcinoma metastases aids tumor growth and survival via α integrin ligation. *Clin Cancer Res.* 2008;14(20):6405–13.
122. Ao T, Kajiwaru Y, Yonemura K, Shinto E, Mochizuki S, Okamoto K, et al. Prognostic significance of histological categorization of desmoplastic reaction in colorectal liver metastases. *Virchows Arch.* 2019;475(3):341–8.
123. Kang N, Gores GJ, Shah VH. Hepatic stellate cells: Partners in crime for liver metastases? *Hepatology.* 2011;54(2):707–13.
124. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. 1st ed. Vol. 147, *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* Elsevier Inc.; 2017. 1–73 p.
125. Laronha H, Caldeira J. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells.* 2020;9(5).
126. Mittal R, Patel AP, Debs LH, Nguyen D, Patel K, Grati M, et al. Intricate Functions of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological Conditions. *J Cell Physiol.* 2016;231(12):2599–621.
127. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006;69(3):562–73.
128. Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H, Takeyama H. Cancer-associated fibroblasts: Their characteristics and their roles in tumor growth. *Cancers (Basel).* 2015;7(4):2443–58.
129. Adhikari N, Amin SA, Jha T. Collagenases and gelatinases and their inhibitors as anticancer agents. *Cancer-Leading Proteases.* Elsevier Inc.; 2020. 265–294 p.
130. Björklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2005;1755:37–69.
131. Fox SB, Gatter KC, Harris AL. Tumour Angiogenesis. *J Cell Biochem.* 1996;179:232–7.

132. Li T, Kang G, Wang T, Huang H. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer (Review). *Oncol Lett.* 2018;16(1):687–702.
133. Lopez A, Harada K, Vasilakopoulou M, Shanbhag N, Ajani JA. Targeting Angiogenesis in Colorectal Carcinoma. *Drugs.* 2019;79(1):63–74.
134. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol.* 2018;59(2):455–67.
135. Karaman S, Leppänen VM, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease. *Dev.* 2018;145(14):1–8.
136. Park SA, Jeong MS, Ha KT, Jang SB. Structure and function of vascular endothelial growth factor and its receptor system. *BMB Rep.* 2018;51(2):73–8.
137. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruin EA. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 2004;56(4):549–80.
138. Zhao Y, Adjei AA. Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor. *Oncologist.* 2015;20(6):660–73.
139. Zimna A, Kurpisz M. Hypoxia-Inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: Applications and therapies. *Biomed Res Int.* 2015;2015.
140. Tao L, Huang G, Song H, Chen Y, Chen L. Cancer associated fibroblasts: An essential role in the tumor microenvironment (review). *Oncol Lett.* 2017;14(3):2611–20.
141. Fu LQ, Du WL, Cai MH, Yao JY, Zhao YY, Mou XZ. The roles of tumor-associated macrophages in tumor angiogenesis and metastasis. *Cell Immunol.* 2020;353(February).

142. Toomey DP, Murphy JF, Conlon KC. COX-2, VEGF and Tumour Angiogenesis. *Surgeon*. 2009;7(3):174–80.
143. Chandrasekharan N V., Dai H, Roos KLT, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(21):13926–31.
144. Nakanishi M, Rosenberg DW. Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Semin Immunopathol*. 2013;35(2):123–37.
145. Morita I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002;68–69:165–75.
146. Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*. 1999;155(4):1281–91.
147. Kis B, Snipes JA, Isse T, Nagy K, Busija DW. Putative Cyclooxygenase-3 Expression in Rat Brain Cells. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23(11):1287–92.
148. Kobayashi K, Omori K, Murata T. Role of prostaglandins in tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev*. 2018;37(2–3):347–54.
149. Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: The role of PGE2 synthases. *Clin Immunol*. 2006;119(3):229–40.
150. Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem*. 2007;282(16):11613–7.
151. Castellone MD, Teramoto H, Williams BO, Druey KM, Gutkind JS. Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin- β -catenin signaling axis. *Science (80-)*. 2005;310(5753):1504–10.
152. Li F, Zhu YT. HGF-activated colonic fibroblasts mediates carcinogenesis of colonic epithelial cancer cells via PKC-cMET-ERK1/2-

- COX-2 signaling. *Cell Signal*. 2015;27(4):860–6.
153. Searle GD, Anderson TMD, Miguel A, Jester SL, King KL, Schumacher M, et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. 2000;
154. Sinicrope FA, Gill S. Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2004;23(1–2):63–75.
155. Hull MA, Fenwick SW, Chapple KS, Scott N, Toogood GJ, Lodge JP. Cyclooxygenase-2 expression in colorectal cancer liver metastases. *Clin Exp Metastasis*. 2000;18(1):21–7.
156. Fink SP, Yamauchi M, Nishihara R, Jung S, Kuchiba A, Wu K, et al. Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (HPGD). *Sci Transl Med*. 2014;6(233):1–8.
157. Wang D, DuBois RN. Inflammatory mediator prostaglandin E2 in colorectal cancer. *Cancer J*. 2013;19(6):502–10.
158. Meek IL, van de Laar MAFJ, Vonkeman HE. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: An overview of cardiovascular risks. *Pharmaceuticals*. 2010;3(7):2146–62.
159. H. S, B. D, Y. K. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol Reports*. 2007;59(3):247–58.
160. Zhao SZ, Reynolds MW, Lefkowitz J, Whelton A, Arellano FM. A comparison of renal-related adverse drug reactions between rofecoxib and celecoxib, based on the World Health Organization/Uppsala Monitoring Centre safety database. *Clin Ther*. 2001;23(9):1478–91.
161. Seidenberg BC. COX-2 inhibitors. *Lancet*. 1999;353(9168):1978.
162. Olaso E, Arteta B, Salado C, Eguilegor E, Gallot N, Lopategi A, et al. Proangiogenic implications of Hepatic Stellate Cells Transdifferentiation into Myofibroblasts Induced by Tumor

- Microenvironment. In: *Tissue Repair, Contraction and the Myofibroblast*. 2006. p. 88–101.
163. Weis WI, Taylor ME, Drickamer K. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev*. 1998;163:19–34.
164. Martinez-Pomares L. The mannose receptor. *J Leukoc Biol*. 2012;92(6):1177–86.
165. Liu Y, Chirino AJ, Misulovin Z, Leteux C, Feizi T, Nussenzweig MC, et al. Crystal structure of the cysteine-rich domain of mannose receptor complexed with a sulfated carbohydrate ligand. *J Exp Med*. 2000;191(7):1105–15.
166. East L, Isacke CM. The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2002;1572(2–3):364–86.
167. Malovic I, Sørensen KK, Elvevold KH, Nedredal GI, Paulsen S, Erofeev A V., et al. The mannose receptor on murine liver sinusoidal endothelial cells is the main denatured collagen clearance receptor. *Hepatology*. 2007;45(6):1454–61.
168. Grete M. Receptor-mediated endocytosis of ovalbumin by two carbohydrate-specific receptors in rat liver cells. *Biochem J*. 1990;270(1):197–203.
169. Teichgräber V, Monasterio C, Chaitanya K, Boger R, Gordon K, Dieterle T, et al. Specific inhibition of fibroblast activation protein (FAP)-alpha prevents tumor progression in vitro. *Adv Med Sci*. 2015;60(2):264–72.
170. Clayton A, Evans RA, Pettit E, Hallett M, Williams JD, Steadman R. Cellular activation through the ligation of intercellular adhesion molecule-1. *J Cell Sci*. 1998;111(4):443–53.
171. Vidal-Vanaclocha F. The prometastatic microenvironment of the liver. *Cancer Microenviron*. 2008;1(1):113–29.
172. Engstrand J, Nilsson H, Strömberg C, Jonas E, Freedman J. Colorectal cancer liver metastases - a population-based study on incidence,

- management and survival. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1–11.
173. Chikina AS, Alexandrova AY. The cellular mechanisms and regulation of metastasis formation. *Mol Biol*. 2014;48(2):165–80.
174. Ito S, Nakanishi H, Ikehara Y, Kato T, Kasai Y, Ito K, et al. Real-time observation of micrometastasis formation in the living mouse liver using a green fluorescent protein gene-tagged rat tongue carcinoma cell line. *Int J Cancer*. 2001;93(2):212–7.
175. Sevic I, Spinelli F, MJ C, Reszegi A, Kovalsky I, García M, et al. The Role of the Tumor Microenvironment in the Development and Progression of Hepatocellular Carcinoma. In: Timiz-Parker J, editor. *Hepatocellular Carcinoma*. Brisbane: Codon Publications; 2019. p. 29–45.
176. Kondo T, Okabayashi K, Hasegawa H, Tsuruta M, Shigeta K, Kitagawa Y. The impact of hepatic fibrosis on the incidence of liver metastasis from colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2016;115(1):34–9.
177. Fujisaki T, Tanaka Y, Fujii K, Mine S, Saito K, Yamada S, et al. CD44 stimulation induces integrin-mediated adhesion of colon cancer cell lines to endothelial cells by up-regulation of integrins and c-Met and activation of integrins. *Cancer Res*. 1999;59(17):4427–34.
178. Arteta B. Análisis de la respuesta inflamatoria y endocítica del endotelio sinusoidal hepático durante su interacción con las células de carcinoma de colon C26 in vitro . Implicaciones prometastáticas. Universidad del País Vasco (UPV/EHU); 2001.
179. Benedicto A. ICAM-1 and mannose receptor expressed in liver sinusoidal endothelium modulate the local immune response and the development of C26 colon carcinoma metastasis in the liver. Universidad del País Vasco (UPV/EHU); 2014.
180. Schellerer VS, Langheinrich MC, Zver V, Grützmann R, Stürzl M, Gefeller O, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 is a prognostic marker in colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis*. 2019;34(2):309–17.
181. Valcárcel M, Arteta B, Jaureguibeitia A, Lopategi A, Martínez I,

- Mendoza L, et al. Three-dimensional growth as multicellular spheroid activates the proangiogenic phenotype of colorectal carcinoma cells via LFA-1-dependent VEGF: implications on hepatic micrometastasis. *J Transl Med.* 2008;6:57.
182. Dianza C, Brucato L, Gallicchio M, Rosa AC, Collino M, Fantozzi R. Celecoxib modulates adhesion of HT29 colon cancer cells to vascular endothelial cells by inhibiting ICAM-1 and VCAM-1 expression. *Br J Pharmacol.* 2008;153(6):1153–61.
183. Wen SW, Ager EI, Christophi C. Bimodal role of Kupffer cells during colorectal cancer liver metastasis. *Cancer Biol Ther.* 2013;14(7):606–13.
184. Seok SM, Park DH, Kim YC, Moon CH, Jung YS, Baik EJ, et al. COX-2 is associated with cadmium-induced ICAM-1 expression in cerebrovascular endothelial cells. *Toxicol Lett.* 2006;165(3):212–20.
185. Poh AR, Ernst M. Targeting macrophages in cancer: From bench to bedside. *Front Oncol.* 2018;8(MAR):1–16.
186. Cortese N, Soldani C, Franceschini B, Barbagallo M, Marchesi F, Torzilli G, et al. Macrophages in colorectal cancer liver metastases. *Cancers (Basel).* 2019;11(5):1–12.
187. Tan HX, Gong WZ, Zhou K, Xiao ZG, Hou FT, Huang T, et al. CXCR4/TGF- β 1 mediated hepatic stellate cells differentiation into carcinoma-associated fibroblasts and promoted liver metastasis of colon cancer. *Cancer Biol Ther.* 2020;21(3):258–68.
188. Liu T, Han C, Wang S, Fang P, Ma Z, Xu L, et al. Cancer-associated fibroblasts: An emerging target of anti-cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):1–15.
189. Mueller L, Goumas FA, Affeldt M, Sandtner S, Gehling UM, Brilloff S, et al. Stromal Fibroblasts in Colorectal Liver Metastases Originate From Resident Fibroblasts and Generate an Inflammatory Microenvironment. 2007;171(5):1608–18.
190. Ruan Q, Wang H, Burke LJ, Bridle KR, Li X, Zhao CX, et al. Therapeutic

- modulators of hepatic stellate cells for hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2020;147(6):1519–27.
191. Sahai E, Astsaturon I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(3):174–86.
 192. Olaso E, Santisteban A, Bidaurrezaga J, Gressner AM, Rosenbaum J, Vidal-Vanaclocha F. Tumor-dependent activation of rodent hepatic stellate cells during experimental melanoma metastasis. *Hepatology*. 1997;26(3):634–42.
 193. Keirsse J, Van Damme H, Geeraerts X, Beschin A, Raes G, Van Ginderachter JA. The role of hepatic macrophages in liver metastasis. *Cell Immunol*. 2018;330(March):202–15.
 194. Wen SW, Ager EI, Christophi C. Bimodal role of Kupffer cells during colorectal cancer liver metastasis. *Cancer Biol Ther*. 2013;14(7):606–13.
 195. Li M, Lai X, Zhao Y, Zhang Y, Li M, Li D, et al. Loss of NDRG2 in liver microenvironment inhibits cancer liver metastasis by regulating tumor associated macrophages polarization. *Cell Death Dis*. 2018;9(2).
 196. Tan F, He D, Hu K, Wang D, Zhang S, Li J, et al. WAVE2 enhanced hepatic stellate cells activity in colorectal liver metastases. *Cancer Manag Res*. 2020;12:7671–80.
 197. Kim DJ, Dunleavy JM, Xiao L, Ollila DW, Troester MA, Otey CA, et al. Suppression of TGF β -mediated conversion of endothelial cells and fibroblasts into cancer associated (myo)fibroblasts via HDAC inhibition. *Br J Cancer*. 2018;118(10):1359–68.
 198. Son GM, Kwon MS, Shin DH, Shin N, Ryu D, Kang CD. Comparisons of cancer-associated fibroblasts in the intratumoral stroma and invasive front in colorectal cancer. *Med (United States)*. 2019;98(18).
 199. Lopez BG, Tsai MS, Baratta JL, Longmuir KJ, Robertson RT. Characterization of Kupffer cells in livers of developing mice. *Comp Hepatol*. 2011;10:1–10.

200. Endo-Umeda K, Nakashima H, Komine-Aizawa S, Umeda N, Seki S, Makishima M. Liver X receptors regulate hepatic F4/80 + CD11b+ Kupffer cells/macrophages and innate immune responses in mice. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–14.
201. Maeda K, Kang SM, Sawada T, Nishiguchi Y, Yashiro M, Ogawa Y, et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 and prognosis in colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2002;9(3):511–4.
202. Tachimori A, Yamada N, Sakate Y, Yashiro M, Maeda K, Ohira M, et al. Up regulation of ICAM-1 gene expression inhibits tumour growth and liver metastasis in colorectal carcinoma. *Eur J Cancer*. 2005;41(12):1802–10.
203. Yang M, Liu J, Piao C, Shao J, Du J. ICAM-1 suppresses tumor metastasis by inhibiting macrophage M2 polarization through blockade of efferocytosis. *Cell Death Dis*. 2015;6(6):1–12.
204. Smakman N, Kranenburg O, Vogten JM, Bloemendaal ALA, Van Diest P, Borel Rinkes IHM. Cyclooxygenase-2 is a target of KRASD12, which facilitates the outgrowth of murine C26 colorectal liver metastases. *Clin Cancer Res*. 2005;11(1):41–8.
205. Marnett LJ, Kalgutkar AS. Structural diversity of selective COX-2 inhibitors. *COX-2 Inhibitors*. 2004. p. 15–40.
206. Walker C. Are All Oral COX-2 Selective Inhibitors the Same? A Consideration of Celecoxib, Etoricoxib, and Diclofenac. *Int J Rheumatol*. 2018;2018.
207. Rawat C, Kukal S, Dahiya UR, Kukreti R. Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: future therapeutic strategies for epilepsy management. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):197.
208. Veettil SK, Nathisuwan S, Ching SM, Jinatongthai P, Lim KG, Kew ST, et al. Efficacy and safety of celecoxib on the incidence of recurrent colorectal adenomas: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Manag Res*. 2019;11:561–71.
209. Kim B, Kim J, Kim YS. Celecoxib induces cell death on non-small cell

- lung cancer cells through endoplasmic reticulum stress. *Anat Cell Biol.* 2017;50(4):293–300.
210. Li J, Hao Q, Cao W, Vadgama J V., Wu Y. Celecoxib in breast cancer prevention and therapy. *Cancer Manag Res.* 2018;10:4653–67.
211. Patel MI, Subbaramaiah K, Du B, Chang M, Yang P, Newman RA, et al. Celecoxib inhibits prostate cancer growth: Evidence of a cyclooxygenase-2-independent mechanism. *Clin Cancer Res.* 2005;11(5):1999–2007.
212. Dai H, Zhang S, Ma R, Pan L. Celecoxib inhibits hepatocellular carcinoma cell growth and migration by targeting PNO1. *Med Sci Monit.* 2019;25:7351–60.
213. Cen B, Lang JD, Du Y, Wei J, Xiong Y, Bradley N, et al. Prostaglandin E2 Induces miR675-5p to Promote Colorectal Tumor Metastasis via Modulation of p53 Expression. *Gastroenterology.* 2020;158(4):971-984.e10.
214. Tsuge K, Inazumi T, Shimamoto A, Sugimoto Y. Molecular mechanisms underlying prostaglandin E2-exacerbated inflammation and immune diseases. *Int Immunol.* 2019;31(9):597–606.
215. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.
216. Eggert T, Greten TF. Tumor regulation of the tissue environment in the liver. *Pharmacol Ther.* 2017;173:47–57.
217. Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: A multiscale tuning model. *J Cell Biol.* 2010;188(1):11–9.
218. Che XH, Chen CL, Ye XL, Weng G Bin, Guo XZ, Yu WY, et al. Dual inhibition of COX-2/5-LOX blocks colon cancer proliferation, migration and invasion in vitro. *Oncol Rep.* 2016;35(3):1680–8.
219. Wang D, Li Y, Zhang C, Li X, Yu J. MiR-216a-3p inhibits colorectal cancer cell proliferation through direct targeting COX-2 and ALOX5. *J*

- Cell Biochem. 2018;119(2):1755–66.
220. Wang L, Chen W, Xie X, He Y, Bai X. Celecoxib inhibits tumor growth and angiogenesis in an orthotopic implantation tumor model of human colon cancer. *Exp Oncol*. 2008;30(1):42–51.
221. Sonoshita M, Takaku K, Sasaki N, Sugimoto Y, Ushikubi F, Narumiya S, et al. Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc Δ 716 knockout mice. *Nat Med*. 2001;7(9):1048–51.
222. Okada A, Seiki M. The role of matrix metalloproteinases in cancer invasion and metastasis. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 1997;42(14 Suppl):2386–92.
223. Najafi M, Farhood B, Mortezaee K. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. *J Cell Biochem*. 2019;120(3):2782–90.
224. Sivula A, Talvensaaari-Mattila A, Lundin J, Joensuu H, Haglund C, Ristimäki A, et al. Association of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 expression in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2005;89(3):215–20.
225. Mayoral R, Fernández-Martínez A, Boscá L, Martín-Sanz P. Prostaglandin E2 promotes migration and adhesion in hepatocellular carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2005;26(4):753–61.
226. Leung E, McArthur D, Morris A, Williams N. Cyclooxygenase-2 inhibition prevents migration of colorectal cancer cells to extracellular matrix by down-regulation of matrix metalloproteinase-2 expression. *Dis Colon Rectum*. 2008;51(3):342–7.
227. Hu H, Han T, Zhuo M, Wu LL, Yuan C, Wu L, et al. Elevated COX-2 Expression Promotes Angiogenesis Through EGFR/p38-MAPK/Sp1-Dependent Signalling in Pancreatic Cancer. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–10.
228. Zhenyu Y, Guoping J, Funhg J., Lu L, Shiguang Q. ICAM-1 expressed on hepatic stellate cells plays an important role in immune regulation. *Microsurgery*. 2009;27:328–32.

229. Schellerer VS, Langheinrich M, Hohenberger W, Croner RS, Merkel S, Rau TT, et al. Tumor-associated fibroblasts isolated from colorectal cancer tissues exhibit increased ICAM-1 expression and affinity for monocytes. *Oncol Rep.* 2014;31(1):255–61.
230. Bonan S, Albregues J, Grasset E, Kuzet SE, Nottet N, Bourget I, et al. Membrane-bound ICAM-1 contributes to the onset of proinvasive tumor stroma by controlling actomyosin contractility in carcinoma-associated fibroblasts. *Oncotarget.* 2017;8(1):1304–20.
231. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(9):582–98.
232. Öhlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med.* 2014;211(8):1503–23.
233. Lindner T, Loktev A, Giesel F, Kratochwil C, Altmann A, Haberkorn U. Targeting of activated fibroblasts for imaging and therapy. *EJNMMI Radiopharm Chem.* 2019;4(1):1–15.
234. Sandberg TP, Stuart MPME, Oosting J, Tollenaar RAEM, Sier CFM, Mesker WE. Increased expression of cancer-associated fibroblast markers at the invasive front and its association with tumor-stroma ratio in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2019;19(1):1–9.
235. Haque ASMR, Moriyama M, Kubota K, Ishiguro N, Sakamoto M, Chinju A, et al. CD206+ tumor-associated macrophages promote proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma via EGF production. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–10.
236. Li Y, Wu H, Ji B, Qian W, Xia S, Wang L, et al. Targeted Imaging of CD206 Expressing Tumor-Associated M2-like Macrophages Using Mannose-Conjugated Antibiofouling Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *ACS Appl Bio Mater.* 2020;3(7):4335–47.
237. Wiesolek HL, Bui TM, Lee JJ, Dalal P, Finkielstein A, Batra A, et al. Intercellular Adhesion Molecule 1 Functions as an Efferocytosis Receptor in Inflammatory Macrophages. *Am J Pathol.* 2020;190(4):874–85.

238. Seager RJ, Hajal C, Spill F, Kamm RD, Zaman MH. Dynamic interplay between tumour, stroma and immune system can drive or prevent tumour progression. *Converg Sci Phys Oncol*. 2017;3(3):034002.
239. Lee SWL, Seager RJ, Litvak F, Spill F, Sieow JL, Leong PH, et al. Integrated in silico and 3D in vitro model of macrophage migration in response to physical and chemical factors in the tumor microenvironment. *Integr Biol (Camb)*. 2020;12(4):90–108.
240. Mizuno R, Kawada K, Sakai Y. Prostaglandin E2/EP signaling in the tumor microenvironment of colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2019;20(24).
241. Su CW, Zhang Y, Zhu YT. Stromal COX-2 signaling are correlated with colorectal cancer: A review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;107:33–8.
242. Krishnamachary B, Stasinopoulos I, Kakkad S, Penet MF, Jacob D, Wildes F, et al. Breast cancer cell cyclooxygenase-2 expression alters extracellular matrix structure and function and numbers of cancer associated fibroblasts. *Oncotarget*. 2017;8(11):17981–94.
243. Failli P, DeFranco RMS, Caligiuri A, Gentilini A, Romanelli RG, Marra F, et al. Nitrovasodilators inhibit platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gastroenterology*. 2000;119(2):479–92.
244. Gascard P, Tlsty TD. Carcinoma-associated fibroblasts: Orchestrating the composition of malignancy. *Genes Dev*. 2016;30(9):1002–19.
245. Cirri P, Chiarugi P. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: A diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2012;31(1–2):195–208.
246. Zhu M, Zhu Y, Lance P. TNF α -activated stromal COX-2 signalling promotes proliferative and invasive potential of colon cancer epithelial cells. *Cell Prolif*. 2013;46(4):374–81.
247. Katoh H, Hosono K, Ito Y, Suzuki T, Ogawa Y, Kubo H, et al. COX-2 and prostaglandin EP3/EP4 signaling regulate the tumor stromal proangiogenic microenvironment via CXCL12-CXCR4 chemokine

- systems. *Am J Pathol.* 2010;176(3):1469–83.
248. Zhao Y, Wang Y, Wang Q, Liu Z, Liu Q, Deng X. Hepatic stellate cells produce vascular endothelial growth factor via phospho-p44/42 mitogen-activated protein kinase/cyclooxygenase-2 pathway. *Mol Cell Biochem.* 2012;359(1–2):217–23.
249. Chen WS, Wei SJ, Liu JM, Hsiao M, Kou-Lin J, Yang WK. 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.* 2001;91(6):894–9.
250. Yao M, Lam EC, Kelly CR, Zhou W, Wolfe MM. Cyclooxygenase-2 selective inhibition with NS-398 suppresses proliferation and invasiveness and delays liver metastasis in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2004;90(3):712–9.
251. Huang WH, Zhou MW, Zhu YF, Xiang J Bin, Li ZY, Wang ZH, et al. The role of hepatic stellate cells in promoting liver metastasis of colorectal carcinoma. *Onco Targets Ther.* 2019;12:7573–80.
252. Xu Y, Zhao W, Xu J, Li J, Hong Z, Yin Z, et al. Activated hepatic stellate cells promote liver cancer by induction of myeloid-derived suppressor cells through cyclooxygenase-2. *Oncotarget.* 2016;7(8):8866–78.
253. Lee J II, Campbell JS. Role of desmoplasia in cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2014;61(2):432–4.
254. Zhang C, Yu X, Gao L, Zhao Y, Lai J, Lu D, et al. Noninvasive imaging of CD206-Positive M2 macrophages as an early biomarker for post-chemotherapy tumor relapse and lymph node metastasis. *Theranostics.* 2017;7(17):4276–88.
255. Lepland A, Ascitutto EK, Malfanti A, Simón-Gracia L, Sidorenko V, Vicent MJ, et al. Targeting Pro-Tumoral Macrophages in Early Primary and Metastatic Breast Tumors with the CD206-Binding mUNO Peptide. *Mol Pharm.* 2020;17(7):2518–31.
256. Scodeller P, Simón-Gracia L, Kopanchuk S, Tobi A, Kilk K, Säälík P, et al. Precision Targeting of Tumor Macrophages with a CD206 Binding

- Peptide. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–12.
257. Mendoza L, Olaso E, Anasagasti MJ, Fuentes AM, Vidal-Vanaclocha F. Mannose receptor-mediated endothelial cell activation contributes to B16 melanoma cell adhesion and metastasis in liver. *J Cell Physiol.* 1998;174(3):322–30.
258. Smedsrod B, Melkko J, Risteli L, Risteli J. Circulating C-terminal propeptide of type I procollagen is cleared mainly via the mannose receptor in liver endothelial cells. *Biochem J.* 1990;271(2):345–50.
259. Elvevold K, Simon-santamaria J, Hasvold H, Mccourt P, Smedsrød B, Sørensen KK. Liver Sinusoidal Endothelial Cells Depend on Mannose Receptor-Mediated Recruitment of Lysosomal Enzymes for Normal Degradation Capacity. 2007;2007–15.

