



ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA MODULACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN UN MODELO MURINO DE HEPATOCARCINOMA ASOCIADO A FIBROSIS.

Tesis presentada para optar al grado de Doctora en Ciencias Biomédicas
por la Universidad Austral.

Flavia Piccioni

Laboratorio de Terapia Génica

Director de tesis: Prof. Dr. Guillermo D. Mazzolini

Co-Directora de tesis: Dra. Laura Alaniz

Pilar, Argentina, Marzo de 2015.

*“La utopía está en el horizonte. Camino dos pasos,
ella se aleja dos pasos y el horizonte se corre diez
pasos más allá. ¿Entonces para qué sirve la utopía?
Para eso, sirve para caminar.”*

Eduardo Galeano

Agradecimientos

Al Dr. Guillermo Mazzolini, por haberme permitido realizar mi tesis doctoral en su laboratorio, por haber confiado en mí, y por su estímulo constante, permitiendo que pudiera dar siempre un poco más de mí esta etapa de mi formación.

A la Dra. Laura Alaniz, por medio de quien llegué al Laboratorio de Terapia Génica, por acompañarme y enseñarme día a día en estos años. Gracias por la paciencia, la comprensión y por haber confiado en mí.

A la Universidad Austral, por haberme brindado la oportunidad de formarme en esta etapa de mi carrera en sus instalaciones.

A mis compañeros de Terapia Génica, por acompañarme en todos los sentidos posibles, por ser más que compañeros. Tuve la suerte de encontrar un grupo y un equipo como este, que hizo que cada día de estos 6 años en el laboratorio cerrara con un plus. Infinitas gracias. A Mariana Malvicini, Juan Bayo, Esteban Fiore y Estanislao Peixoto, Miguel Rizzo y Catalina Atorrasagasti.

A la Dra. Mariana García y al Dr. Jorge Aquino, quienes siempre me brindaron su ayuda en todo momento.

A mis compañeros de investigación del quinto piso: A Guille Gastón, Mariana Malet, Vanina, Rodrigo, Melisa, Norma, Tomás, Mariela y Gustavo. Gracias por tantos lindos momentos, charlas y mates compartidos, por la buena predisposición, por ayudarme, y por escucharme también!

A Andrés Zelaya, que hizo posible que llegara a la universidad cada día de estos años, con mucha paciencia y cariño.

A mis compañeras del laboratorio de Berlín: Irene, Petra y Nancy, por su calidez y compañerismo.

A mi gran amiga Marina, por estar siempre, alentarme y ayudarme en las buenas y las malas.

A mi familia:

A mis hermanas. A Ileana, por escucharme, comprenderme y apoyarme siempre que la necesité, y a Nadia, por mostrarme que todo se logra con perseverancia y esfuerzo.

A mis abuelas, y mi abuelo Adriano a quien le hubiera gustado mucho verme llegar a este momento.

A Daniel, mi gran compañero de la vida, por su gran paciencia, por sostenerme fuerte para que siempre siga adelante, por ser incondicional, por brindarme su amor.

A mis padres, Enzo y Rita, gracias por darme los valores y las herramientas que me permitieron ser y hacer lo que elegí; y por respaldarme incondicionalmente. Eternas gracias.

Parte de los resultados de este trabajo de tesis fueron publicados/enviados para su publicación en las siguientes revistas:

- *Glycobiology* 22(3):400-10, 2012. "Antitumor effects of hyaluronic acid inhibitor 4-methylumbelliferone in an orthotopic hepatocellular carcinoma model in mice". **Piccioni F**, Malvicini M, García MG, Rodriguez A, Atorrasagasti C, Kippes N, Piedra Buena I, Rizzo M, Bayo J, Aquino J, Viola M, Passi A, Alaniz L, Mazzolini G.
- *Angiogenesis* 17(1): 119-28, 2014. "Dendritic cells regulate angiogenesis associated with liver fibrogenesis". Blois S, **Piccioni F**, Freitag N, Tirado-González I, Moschansky P, Lloyd R, Hensel-Wiegel K, Rose M, García MG, Alaniz L, Mazzolini G.
- *Glycobiology*, enviado 2015. "4-methylumbelliferone inhibits hepatocellular carcinoma growths by decreasing IL-6 production and angiogenesis". **Piccioni F**, Fiore E, Bayo J, Atorrasagasti C, Peixoto E, Rizzo M, Malvicini M, Tirado-González I, García MG, Alaniz L, Mazzolini G.

También fueron presentados en los siguientes congresos nacionales/internacionales:

- "Antiangiogenic effects in mice with hepatocarcinoma and liver fibrosis by inhibition of Hyaluronic Acid". Piccioni, F; Lloyd, R; Rizzo, M; Fiore, E; Bayo, J; Peixoto, E; Malvicini, M; García, M.G; Alaniz, L; Mazzolini, G. Póster presentado en 1er Simposio Argentino de Glicobiología, Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina, 24 y 25 de Abril de 2014.
- "Las células dendríticas modulan la progresión de la fibrosis hepática mediante factores angiogénicos y citoquinas inflamatorias". Flavia Piccioni, Sandra Blois, Nancy Freitag, Irene Tirado-González, Petra Moschansky, Rodrigo Lloyd, Matthias Rose, Mariana G. Garcia, Laura D. Alaniz, Guillermo Mazzolini. Póster (#627) presentado en LVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata, Buenos aires, Argentina, 19-22 Noviembre 2013.

- “Inhibition of Hyaluronic acid synthesis by 4-methylumbelliferone (4MU) reduces fibrosis in a murine model of orthotopic hepatocellular carcinoma (HCC) associated to liver fibrosis”. Flavia Piccioni, Mariana Malvicini, Manglio Rizzo, Nestor Kippes, Catalina Atorrasagasti, Andrés Rodríguez, Marcelo Amante, Esteban Fiore, Juan Bayo, Jorge Aquino, Mariana G García, Laura Alaniz and Guillermo Mazzolini. Póster presentado en EASL Monothematic conference on liver fibrogenesis: common and organ specific mechanisms 17-18 de Junio, 2011, Bonn, Alemania.
- “Efectos antitumorales de un inhibidor de la síntesis de ácido hialurónico en un modelo murino de hepatocarcinoma ortotópico”. Piccioni F, Malvicini M, Rizzo M, Kippes N, Atorrasagasti C, Rodriguez A, Amante M, Fiore E, Bayo J, Aquino J, García M, Silva M, Alaniz L, Mazzolini G. XVI Congreso Argentino de Hepatología. Comunicación oral. 9-11 de Junio, 2011 – Sheraton Buenos Aires, Argentina.

Resumen

La cirrosis hepática se caracteriza por una acumulación excesiva de componentes de matriz extracelular, entre ellos el ácido hialurónico (AH), que conducen a una distorsión en la histoarquitectura hepática y a la insuficiencia funcional. Además, la cirrosis es considerada una enfermedad pre-neoplásica para el hepatocarcinoma (HCC). Por otra parte, la biosíntesis alterada del AH está asociada con la progresión tumoral con varios tipos de tumores, pero su rol en el HCC no se encontraba descrito. 4-Metilumbeliferona (4MU), un agente oral biodisponible, es un inhibidor conocido de la síntesis de AH con propiedades antitumorales observadas en varios tipos de cáncer.

El objetivo general de este trabajo de tesis fue evaluar el papel del 4MU, inhibidor de la síntesis de AH, en el proceso de generación del HCC en un hígado con fibrosis establecida, y sus mecanismos de acción.

Para ello, inicialmente exploramos los efectos de la inhibición de la síntesis de AH mediante la administración sistémica de 4MU en el tumor de HCC y en su microambiente. Para ello, empleamos un modelo de HCC ortotópico con células Hepa129, establecido en hígados fibróticos mediante la administración crónica del tóxico tioacetamida. En una primera instancia, administramos 4MU por vía intraperitoneal, y luego por vía oral.

En primer lugar evaluamos los efectos de 4MU sobre las células de HCC y células estrelladas hepáticas (CEH) *in vitro* mediante ensayos de proliferación, apoptosis y citotoxicidad. También analizamos el crecimiento tumoral y la fibrogénesis *in vivo*.

Nuestros resultados mostraron que el tratamiento de las células de HCC con 4MU redujo significativamente la proliferación de las células tumorales, a la vez que incrementó la apoptosis de las mismas, mientras que no se observaron signos de daño en hepatocitos, como así tampoco en el estado general de los animales; lo que demuestra que 4MU no produce toxicidad. Además, el tratamiento con 4MU redujo significativamente los niveles sistémicos y hepáticos de AH. Los tumores tratados

sistémicamente con 4MU por vía i.p., si bien no se redujeron significativamente, fueron acompañados por una disminución de nódulos satélites de 2-3 veces. Asimismo, mostraron extensas áreas de necrosis y un incremento del infiltrado inflamatorio de tipo mononuclear. Por otro lado, los animales tratados con 4MU desarrollaron un menor grado de fibrosis en comparación con los controles (F1-2 vs. F2-3 respectivamente). Más aún, 4MU indujo apoptosis de las CEH *in vitro* y redujo la cantidad de CEH activadas *in vivo*. En una etapa posterior, observamos que la administración de 4MU por vía oral y en una dosis 20 veces mayor que la utilizada por vía i.p. redujo además el crecimiento tumoral e incrementó la supervivencia de los animales. Para evaluar posibles mecanismos responsables de tal efecto antitumoral, estudiamos los efectos de 4MU sobre la angiogénesis y la producción de IL-6. Realizamos inmunomarcación para CD31 y cuantificación de factores proangiogénicos (VEGF, IL-6, SDF-1). Los niveles de IL-6 también fueron cuantificados en células Hepa129 *in vitro* luego del tratamiento con 4MU. Además, se analizó la migración y capacidad de formación de tubos vasculares. Como resultado, los niveles sistémicos de VEGF se inhibieron significativamente en los animales tratados con 4MU. La expresión de CD31 se redujo luego de la terapia con 4MU en el parénquima hepático en comparación con el grupo control. Asimismo, la expresión del ARNm y niveles de proteína de IL-6 y VEGF se inhibieron, tanto en el tejido tumoral como en el parénquima hepático no tumoral. La producción de IL-6 se redujo drásticamente en las células de Kupffer aisladas de ratones tratados con 4MU, así como también en células Hepa129 *in vitro*. Además, 4MU fue capaz de inhibir la migración de células endoteliales y la formación de tubos.

En conclusión, nuestros estudios sugieren un rol para 4MU como agente antitumoral para el HCC asociado a fibrosis avanzada. Sus mecanismos de acción involucran una inhibición de la angiogénesis y de la producción de IL-6. Además, siendo 4MU una molécula disponible para el uso por vía oral posee un potencial para el tratamiento del HCC.

Durante la fibrogénesis hepática la respuesta inmune y el proceso angiogénico se encuentran finamente regulados, resultando en la activación de las CEH, productoras en exceso de componentes de matriz extracelular. Las células dendríticas desempeñan

un rol central modulando la inmunidad a nivel hepático y han sido implicadas en el favorecimiento de la regresión de la fibrosis, aunque su influencia en el desarrollo de la fibrogénesis en fases iniciales del proceso no era conocido previo al trabajo incluido en esta tesis. Por lo tanto, en otra etapa de esta tesis nuestro objetivo fue explorar si la depleción de las CD durante estadios tempranos de la fibrogénesis hepática tenía un impacto sobre esta patología. Para ello, utilizamos ratones transgénicos CD11c.DTR y las CD fueron depletadas en dos modelos experimentales de fibrosis *in vivo*. El efecto de la terapia antiangiogénica fue analizada durante estadios tempranos de la fibrogénesis. Como consecuencia, la depleción de las CD aceleró el desarrollo de la fibrosis y se potenció el proceso angiogénico. Observamos una regulación positiva de factores pro-angiogénicos junto con una reducción del receptor 1 de VEGF, también conocido como Flt-1, una molécula anti-angiogénica. Asimismo, el proceso fibrogénico acentuó la expresión de Flt-1 en las CD hepáticas, mientras que la administración de Flt-1 soluble (Flt-1s) fue capaz de frenar el incremento de fibrosis generado por la depleción de las CD. Por lo tanto, estos resultados muestran un novedoso rol de las CD durante los inicios de la fibrosis hepática, capaces de regular el proceso angiogénico e influenciando, consecuentemente, la fibrogénesis.

Colaboraciones

Parte del trabajo desarrollado en esta tesis se llevó a cabo en colaboración con las siguientes entidades:

- Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche, Università degli Studi dell'Insubria, Varese, Italia. Dr. Alberto Passi, Dra. Manuela Viola.
- Reproductive Medicine Research Group, Charité Center 12 Internal Medicine and Dermatology, Universitätsmedizin, Berlín, Alemania. Dra. Sandra Blois.

Indice

Indice

ABREVIATURAS	17
1. Introducción.....	23
1.1. El hígado.....	23
1.1.1 Anatomía.....	23
1.1.2 Microarquitectura.....	24
1.1.3. Fisiología hepática.....	26
1.2. Fibrosis hepática.....	28
1.2.1 Bases moleculares y celulares de la fibrosis.....	29
1.2.2. Células dendríticas en la fibrosis hepática.....	33
1.2.3. Modelos animales de fibrosis hepática.....	36
1.3. Cirrosis	36
1.3.1 Tratamiento de la fibrosis y la cirrosis hepática.....	37
1.4. Hepatocarcinoma	38
1.4.1 Epidemiología.....	38
1.4.2. Etiología y patogenia	39
1.4.5. Interacción del HCC con su microambiente.....	42
1.4.6. Interleuquina-6 en el hepatocarcinoma	44
1.4.7. Tratamiento.....	45
1.5. Angiogénesis.....	46
1.5.1 Bases moleculares de la angiogénesis.....	48
1.5.2. Angiogénesis y cáncer	49
1.5.3. Angiogénesis en la fibrosis hepática y el HCC.....	50

1.5.3.1 Relación de las células dendríticas con la fibrosis y la angiogénesis en el hígado.	51
1.6.Ácido Hialurónico	52
1.6.1 Ácido Hialurónico y Angiogénesis.....	56
1.6.2. Ácido hialurónico y su relación con la Interleuquina-6.	57
1.7.Inhibición de la síntesis de AH.....	58
3. Objetivo general.....	61
3.1 Objetivos específicos.	62
4. Materiales y métodos.....	65
<i>Parte I</i>	65
4.1 Líneas celulares.	65
4.2 Reactivos.	65
4.3 Medios condicionados generados a partir de líneas celulares y de cultivos primarios.....	66
4.4 Estudios <i>in vitro</i>	66
4.4.1 Análisis por citometría de flujo de la interacción CD44-AH y síntesis de AH en células tumorales.	66
4.4.2 Ensayos de proliferación celular.....	67
4.4.3 Ensayos de apoptosis celular.	67
4.4.4 Ensayo de citotoxicidad.	68
4.4.5 Ensayo de migración <i>in vitro</i>	68
4.4.6 Ensayo de formación de tubos vasculares <i>in vitro</i>	69
4.4.7 Zimografía en gelatina: detección de la actividad de metaloproteasas.....	69
4.5 Estudios <i>in vivo</i>	70
4.5.1 Modelo experimental.	70
4.5.2 Medición de enzimas indicadoras de daño hepático en suero.....	71

4.5.3 Cultivo primario de hepatocitos.....	72
4.5.4 Cultivo primario de células de Kupffer.	72
4.5.6 Análisis histopatológico. Tinciones.....	73
4.5.7 Cuantificación de área positiva en tinciones e inmunomarcaciones.....	74
4.5.8 Tinciones histoquímicas e inmunomarcaciones.....	74
4.5.8.1 Tinción histoquímica para la detección de AH.	74
4.5.8.2 Inmunohistoquímica para Actina de músculo liso (α -SMA).	75
4.5.8.3 Inmunomarcación de CD31 para detección de células endoteliales vasculares.	76
4.5.8.4 Inmunomarcación para VEGF.....	76
4.5.9 Preparación de homogenatos de tejido hepático para su análisis por ensayos inmunoenzimáticos (ELISA).....	77
4.5.10 Preparación de medio condicionado de Hepa129 para cuantificación de IL-6	78
4.5.11 Ensayos inmunoenzimáticos	78
4.5.11.1 Ensayo tipo ELISA competitivo para detección de AH en medio condicionado de células, suero, o extracto de GAG a partir de tejido hepático tumoral y no tumoral.	78
4.5.12 Análisis de la expresión del ARNm mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	79
4.5.12.1 Retro transcripción de ARN.	79
4.5.12.2 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.	79
4.5.13 Análisis del peso molecular de AH.....	80
4.6 Análisis Estadístico.....	81
<i>Parte III</i>	81
4.7 Modelo de fibrosis hepática.....	81
4.7.1 Expansión y depleción de células dendríticas.	82
4.8 Tratamiento con quimera de receptor 1 de VEGF (Flt-1s/Fc).....	83

4.9 Determinación de niveles séricos de VEGF, Flt-1s y Endogлина por ELISA.	83
4.10 Determinación de citoquinas por arreglo de esferas para citometría (CBA, del inglés, Cytometric Bead Arrays).	83
4.11 Arreglo de proteínas angiogénicas.	83
4.12 Aislamiento de ARN y análisis de PCR cuantitativa.	84
4.13 Análisis histológicos.	84
4.14 Determinación de enzimas hepáticas.	84
4.15 Análisis por inmunofluorescencia.	84
4.16 Separación de suspensión de células no parenquimatosas.	85
4.17 Análisis por citometría de flujo de CD hepáticas.	85
5. Resultados.	87
<i>Parte I</i>	87
5.1 Producción de AH y capacidad de unión por las células de hepatocarcinoma....	87
5.2 Evaluación de los efectos del tratamiento <i>in vitro</i> con 4MU sobre la proliferación, apoptosis y producción de AH en líneas celulares de hepatocarcinoma.	89
5.3 Efectos antitumorales de 4MU administrado por vía intraperitoneal (i.p.) en el modelo ortotópico de HCC asociado a fibrosis avanzada.	91
5.4 Estudios de toxicidad.	93
5.5 Análisis de la modulación de la expresión de AH hepático luego del tratamiento con 4MU i.p.	95
5.6 Efectos del tratamiento con 4MU i.p. sobre el proceso de fibrogénesis hepática inducida por TAA.	98
5.7 Efecto de 4MU <i>in vitro</i> sobre la proliferación celular y apoptosis en líneas de fibroblastos y de células estrelladas de origen hepático.	101
<i>Parte II</i>	103
5.8 Eficacia antitumoral de 4MU administrado por vía oral.	103
5.9 Efecto de 4MU sobre la angiogénesis <i>in vivo</i>	104

5.10 Estudio de la modulación de la producción de IL-6 por las células de HCC y por células de Kupffer tras el tratamiento con 4MU.....	109
5.11 Evaluación de la modulación de la actividad angiogénica <i>in vitro</i> de 4MU sobre células endoteliales.	111
5.12 Efecto de 4MU sobre la actividad metaloproteasa de líneas humanas de células endoteliales vasculares, células de HCC y células estrelladas hepáticas.	113
<i>Parte III</i>	115
5.13 Evaluación del efecto de la depleción de las células dendríticas sobre el desarrollo de la fibrosis hepática.	115
5.14 Estudio del efecto de la ablación de células dendríticas sobre el perfil de citoquinas durante la fibrogénesis hepática.....	119
5.15 Estudio de la modulación expresión de citoquinas angiogénicas tras la ablación de las células dendríticas.	121
5.16 Rol de VEGFR1 en la regulación de la angiogénesis asociada a la fibrogénesis hepática y la depleción de células dendríticas.	123
6. Discusión.....	127
7. Conclusión.	137
8. Bibliografía.....	138

Abreviaturas

4MU: 4- metilumbeliferona

α -SMA: actina α de músculo liso

AASLD : American Association for the Study of Liver Diseases

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: copia de ácido desoxirribonucleico

AH: ácido hialurónico

AH-APM: ácido hialurónico de alto peso molecular

ALT: alanino-aminotransferasa

ANG-1: Angiopoyetina-1

ANGPL4: proteína relacionada a Angiopoyetina- 4

ARN: ácido ribonucleico

AST: aspartato aminotransferasa

BCLC: Barcelona Clinic Liver Cancer

BSA: seroalbúmina bovina

CAFs: fibroblastos asociados al tumor

CD: células dendríticas

CDd: células dendríticas depletadas

CDe: células dendríticas expandidas

CDh: células dendríticas de hígado

CEH: células estrelladas hepáticas

CMH-II: complejo mayor de histocompatibilidad

CPM: cuentas por minuto

CSF-1: factor estimulante de colonias de macrófagos

CTLA4: antígenos de linfocitos T citotóxicos 4

CXCR4: receptor tipo 4 de quemoquinas con motivo C-X-C

DAB: diaminobenzidina

DAPI: 4',6-diamidino-2 fenilindolehidrocloruro

dNTP: deoxinucleótido

EASL: European Association for the Study of the Liver

ESM: error estándar de la media

EGF: factor de crecimiento de epidermis

ELISA: ensayos inmunoenzimáticos

FAL: fosfatasa alcalina

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos

FITC: isotiocianato de fluoresceína

Flt-1s: tirosín kinasa 1 relacionada con fms, soluble

Flt-3L: tirosina tipo FMS

FPLC: cromatografía líquida rápida de proteínas

GAG: glucosaminoglicanos

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GlcA: ácido D-glucurónico

Glc-NAc: N-acetil-D-glucosamina

H&E: hematoxilina-eosina

H₂O_d: agua destilada

HARE: receptor de ácido hialurónico para endocitosis

HAS: sintasas de ácido hialurónico

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution

HCC: hepatocarcinoma

HIF-1 α : factor inducible por hipoxia-1 α

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

Hyal: hialuronidasa

i.p.: intraperitoneal

i.v.: intravenosa

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1

IDO: indoleamina 2,3-dioxigenasa

IL-1: interleuquina 1

IL-10: interleuquina 10

IL-12: interleuquina-12

IL-6: interleuquina 6

IL-6R: receptor de interleuquina 6

IL-8: interleuquina 8

INF- γ : interferón γ

LPS: lipopolisacáridos

LYVE-1: receptor de endotelio vascular linfático-1

MAPK: proteína kinasa activada por mitógenos

MB: membrana basal

MBV: membrana basal vascular

MEC: matriz extracelular

MMP: metaloproteasa

NK: células Natural Killer

PBS: buffer fosfato salino

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDGFR- β : receptor β de PDGF

PE: ficoeritrina

PerCP: peridina clorofila

PHD: prolil-hidrolasa

PI3K: fosfoinositol 3-quinasa

PIGF: factor de crecimiento placentario

PMSF: fenilmetilsulfonil fluoruro

PUAHb: proteína de unión a AH conjugada a biotina

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RHAMM: receptor para motilidad mediada por AH

ROS: especies reactivas de oxígeno

s: semanas

SDF-1: factor derivado de las células del estroma 1

SFB: suero fetal bovino

TA: temperatura ambiente

TAA: tioacetamida

TACE: quimio-embolización transarterial

TAMs: macrófagos asociados al tumor

TD: toxina diftérica

TGF- β : factor de crecimiento transformante β

TIMPs: inhibidores tisulares de metaloproteasas

TLR4: receptor de tipo Toll 4

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

U: unidades

UGT: UDP-glucosiltransferasas

uPA: activador del plasminógeno de tipo urokinasa

VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular

VEGFR: receptor de VEGF

VHB: virus de hepatitis B

VHC: virus de hepatitis C

Introducción

1. Introducción.

1.1. El hígado.

1.1.1 Anatomía.

El hígado es la víscera de mayor tamaño del organismo, pero su verdadera importancia radica en el rol que cumple en el metabolismo general. Está formado por cuatro lóbulos y la vesícula biliar. El lóbulo izquierdo se encuentra extendido sobre el estómago y separado del lóbulo derecho por el ligamento falciforme que une el hígado al diafragma y a la pared anterior del abdomen. Los otros dos lóbulos, el cuadrado y el caudado, son de menor tamaño y se ubican dorsalmente con respecto a los lóbulos principales. La vesícula biliar se encuentra en la cara inferior del lóbulo derecho [1]. El hígado ocupa una posición estratégica en el abdomen, con la particularidad de tener una doble irrigación venosa y arterial. La proveniente del sistema venoso portal, que implica entre el 65-85% de la irrigación total hepática, es rica en compuestos y nutrientes absorbidos en la digestión, pero pobre en oxígeno. El porcentaje restante de sangre total proviene de la arteria hepática, y es sangre rica en oxígeno. Así, este órgano actúa filtrando la sangre y removiendo y adicionando sustancias a la circulación sistémica (**Figura 1**)[2]. En los sinusoides hepáticos, que son los espacios entre hepatocitos, se mezcla la sangre que procede de esta doble circulación, permitiendo a los hepatocitos, tener acceso a oxígeno, nutrientes y metabolitos necesarios para sintetizar sales biliares, que junto al colesterol, lecitina, iones bicarbonato, pigmentos biliares y agua forman la bilis que es secretada hacia la vía biliar [3].

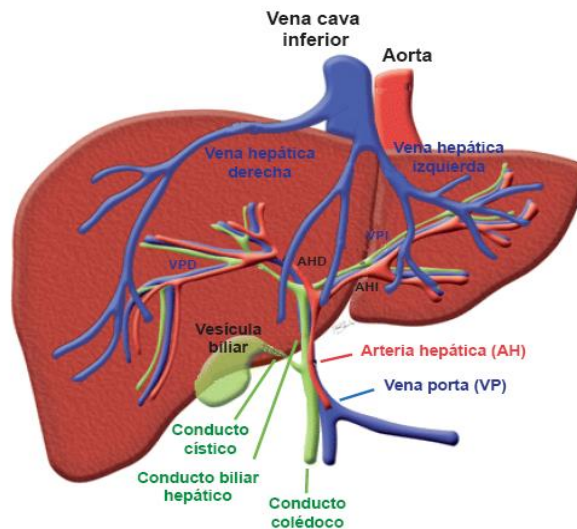


Figura 1. Adaptado de Vascular and Biliary Variants in the Liver: Implications for Liver Surgery. VPD, vena porta derecha; VPI, vena porta izquierda; AHD, arteria hepática derecha; AHI, arteria hepática izquierda [4].

1.1.2 Microarquitectura

Microscópicamente el hígado está dividido en estructuras con forma hexagonal, de 1 a 2 mm de diámetro, que se orientan alrededor de una vena central llamada vena centrolobulillar. A dicha estructura se la denomina lobulillo hepático. Asimismo, cada lobulillo posee en tres de sus vértices los llamados espacios porta, formados por un conducto biliar, una rama de la arteria hepática y una de la vena porta, rodeados por tejido conectivo y fibroblastos (**Figura 2A y B**) [5, 6].

Los hepatocitos, principales células del parénquima hepático, se disponen en el lobulillo en forma radial desde las venas centrilobulillares. Los más próximos a estas venas son los que se encuentran más alejados de la circulación sanguínea arterial y, debido a esta condición fisiológica, se admite hoy que éstos constituyen la periferia de los lobulillos metabólicos a los que se los llama acinos hepáticos, la unidad funcional hepática. Por este motivo, esta estructura queda centrada en el espacio porta y limitado por las venas centrilobulillares en la periferia (**Figura 2C**).

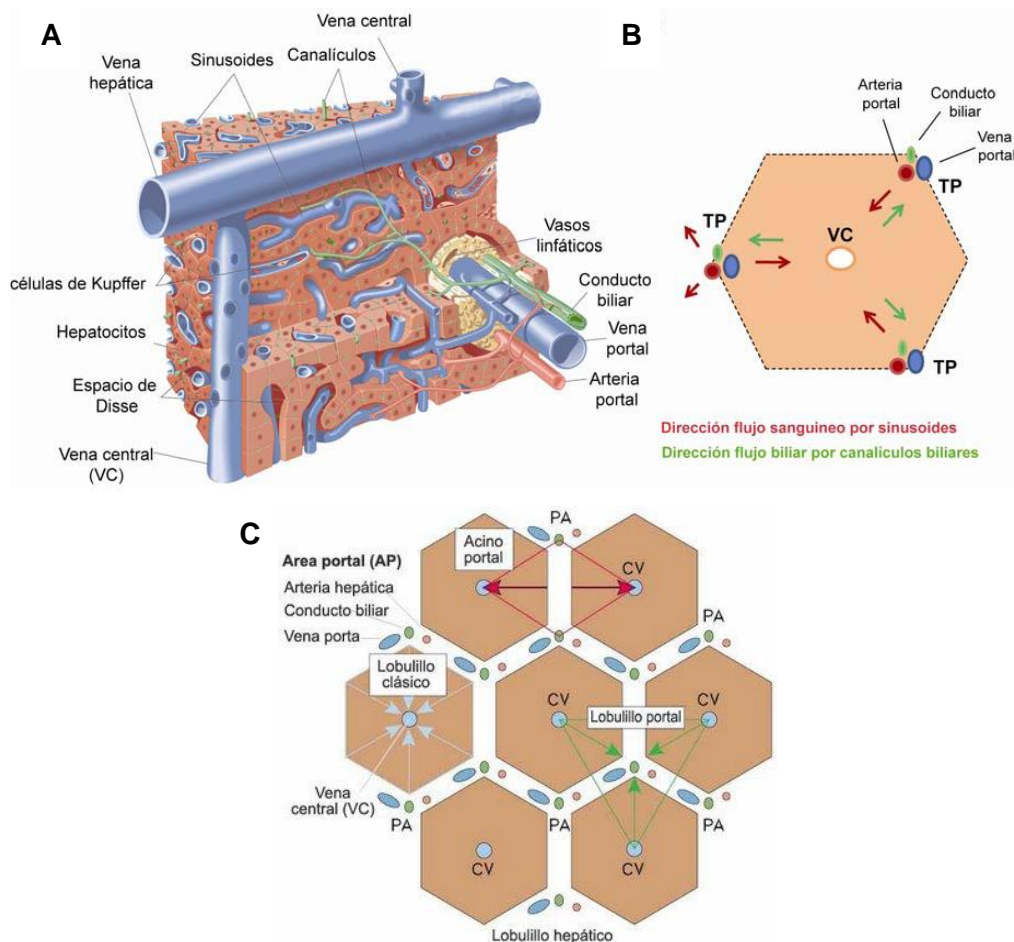


Figura 2. Anatomía e histoarquitectura hepática. (A) Representación estructural del tejido hepático. **(B)** Modelo de la unidad estructural hepática, el lobulillo hepático. Las flechas rojas indican el flujo sanguíneo que circula por los sinusoides desde la zona portal hasta la VC. Las flechas verdes muestran la circulación de la bilis desde los hepatocitos que la producen hasta los conductos biliares. TP: tracto portal, VC: vena central. Adaptado de Wallace *et al*, 2008[5]. **(C)** Modelo de histoarquitectura hepática, estructura del acino hepático. VC: vena central, AP: área portal. Adaptado de Robbins. Patología estructural y funcional. Séptima edición.

Los sinusoides hepáticos se encuentran revestidos por células endoteliales sinusoidales fenestradas y discontinuas que limitan un espacio laxo denominado espacio de Disse [6]. Dentro de este espacio extrasinusoidal, además de proyectarse abundantes microvellosidades hepatocitarias, se encuentran un grupo de células de origen mesenquimal llamadas células estrelladas hepáticas (CEH) o células de Ito. Este grupo de células poseen depósitos de lípidos e intervienen en el almacenamiento y metabolismo de la vitamina A. Durante la inflamación hepática se activan y diferencian

en miofibroblastos, cumpliendo un papel clave en el proceso fibrogénico hepático [7]. Por otra parte, en la superficie luminal de las células endoteliales sinusoidales se encuentran las células de Kupffer o macrófagos hepáticos, que son células del sistema fagocitario monocítico. Las células de Kupffer, conjuntamente con las células endoteliales sinusoidales, forman el mayor sistema de remoción de células envejecidas y proteínas de la sangre, así como de los mecanismos pro-inflamatorios en caso de injuria hepática. Finalmente, dentro de los lobulillos hepáticos se encuentran los canalículos biliares que están constituidos por depresiones de las membranas plasmáticas de células vecinas, y están separados del espacio vascular por uniones intercelulares estrechas entre los hepatocitos adyacentes. A través de estos canales de 1 a 2 μm de diámetro fluye la bilis producida por los hepatocitos hacia la periferia del lobulillo, donde drenan en los conductos biliares. Estos conductos se encuentran recubiertos por los colangiocitos que representan alrededor del 1% de las células del parénquima hepático [2]. Por otro lado, se estima que el hígado contiene alrededor de 10×10^{10} linfocitos de diferentes fenotipos localizados a lo largo de los sinusoides y tractos portales. Estos incluyen células T, NK (del inglés, *natural killer* o asesinas naturales) y células dendríticas (CD) [5].

1.1.3. Fisiología hepática.

El hígado es un órgano en el que ocurren procesos fundamentales para el organismo como procesos metabólicos de detoxificación, digestivos, homeostáticos, inmunológicos y de reservorio [8].

Funciones metabólicas: El hígado cumple un rol irremplazable en los procesos metabólicos de grasas, proteínas y carbohidratos, que son realizados principalmente por los hepatocitos.

Metabolismo de lípidos: Puede ser llevado a cabo por casi todas las células del organismo, pero en ciertos aspectos los hepatocitos son especializados. La síntesis y formación de lipoproteínas, el metabolismo del colesterol y fosfolípidos, la beta-

oxidación de ácidos grasos, y el almacenamiento de vitaminas, en especial la vitamina A por parte de las CEH.

Metabolismo de proteínas: Los hepatocitos son capaces de captar los aminoácidos de la circulación portal provenientes de la alimentación que, a través de la transaminación, son recompuestos en proteínas estructurales y plasmáticas. También son capaces de llevar a cabo la deaminación de los aminoácidos que componen las proteínas con el fin de utilizarlas como fuente de energía cuando el organismo se encuentra en ayuno. Además, el hígado metaboliza compuestos tóxicos derivados del nitrógeno como el amoníaco, y solo los hepatocitos tienen las enzimas necesarias para que, a partir de dicho compuesto, se realice la síntesis de urea, no tóxica, y así excretarlo sin producir daño.

Metabolismo de hidratos de carbono: El hígado es el principal responsable de la homeostasia de los azúcares. Cuando la concentración de glucosa en sangre se incrementa, el hígado remueve el exceso de la misma por la vía de la síntesis de glucógeno y lipogénesis, acumulando energía. Asimismo, cuando se produce un descenso de glucosa en sangre, el hígado la produce por la vía de glucogenolisis y gluconeogénesis.

El hígado forma la bilis, principal vía de secreción de la bilirrubina y colesterol, y la almacena en la vesícula biliar. Por otra parte, la presencia de sales biliares en la luz intestinal permite la digestión y/o absorción de las grasas y vitaminas liposolubles ingeridas.

También puede cumplir funciones hemodinámicas actuando como reservorio de sangre del organismo. De hecho es capaz de almacenar el 10% del volumen total de sangre, administrando así el nivel de la volemia en situaciones de híper o hipovolemia.

Varias funciones inmunológicas se llevan a cabo a nivel hepático. Las células de Kupffer, que recubren los sinusoides hepáticos, fagocitan parásitos, virus, bacterias y macromoléculas (como inmunocomplejos y endotoxinas bacterianas) por endocitosis mediada por receptores. Por lo tanto, estas células constituyen una poderosa e importante barrera fagocítica para toxinas y microorganismos provenientes del

intestino [9]. También en el hígado sano se encuentra un gran número de células NK, en menor proporción células dendríticas, mastocitos y, en muy baja proporción, granulocitos. Por otro lado, el hígado sintetiza proteínas de fase aguda (como proteína C reactiva), componentes del complemento y citoquinas, que forman parte del sistema inmune innato. Asimismo, residen también linfocitos B y T en el tejido hepático, como componentes del sistema inmune adaptativo [10].

1.2. Fibrosis hepática.

Numerosos estudios dan cuenta de la gran capacidad del hígado para regenerar su parénquima en respuesta a distintos tipos de daño. De hecho es capaz de recuperar su tamaño normal tras pérdidas de hasta un 70% del total de su parénquima [11].

Ante un daño hepático temporal se inicia como respuesta un proceso inflamatorio y se produce, en un primer momento, la remodelación de la estructura hepática con la acumulación de depósitos de colágeno y otras moléculas de la matriz extracelular [12] , produciendo la necrosis de hepatocitos; en una segunda instancia, este proceso es compensado por mecanismos de fibrinólisis que degradan esta matriz [13, 14]. De esta forma, el proceso de fibrosis tiene como objeto detener el daño ante la agresión externa. Sin embargo, si el agente causante persiste y el daño se transforma en una injuria crónica, el proceso de fibrosis pasa a tener un rol deletéreo, alterando la arquitectura tisular y su función. Se reconoce en la actualidad que la fibrogénesis es el resultado de un proceso activo de cicatrización continua [11].

La evolución desde la inflamación hepática hasta la fibrosis y cirrosis hepática es por lo general un proceso lento y progresivo, cuyas características dependen, en parte, del agente causal de la injuria. Entre estos factores causantes se encuentran la ingesta crónica de alcohol, infecciones virales por virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC), drogas hepatotóxicas, enfermedades metabólicas como la hemocromatosis, enfermedades autoinmunes, enfermedad colestásicas, depósitos de grasa, etc. Como patrón general ante un daño crónico se producen cambios en la microarquitectura hepática los que gradualmente ocasionan una disfunción general con apoptosis y

necrosis de hepatocitos, alteración en las funciones metabólicas, depósitos de MEC incrementando la resistencia intrahepática al flujo sanguíneo dando lugar a la hipertensión portal, procesos que culminan en el estadio de cirrosis hepática [15-17].

1.2.1 Bases moleculares y celulares de la fibrosis.

Como se mencionó anteriormente, la fibrosis hepática implica el aumento del depósito de componentes de la matriz extracelular (MEC) como colágeno, elastina, glicoproteínas estructurales, proteoglicanos y ácido hialurónico (AH). Inicialmente, los componentes de la MEC se acumulan en las zonas perisinusoidales (espacio de Disse) extendiéndose luego a las zonas pericentrales o periportales. A este continuo incremento se le adiciona una disminución en los procesos fisiológicos de degradación de la misma y, como consecuencia, aumenta la dificultad del paso de nutrientes y solutos vitales desde el sinusoides hasta el hepatocito, conduciendo a la muerte de los mismos [12](Figura 3).

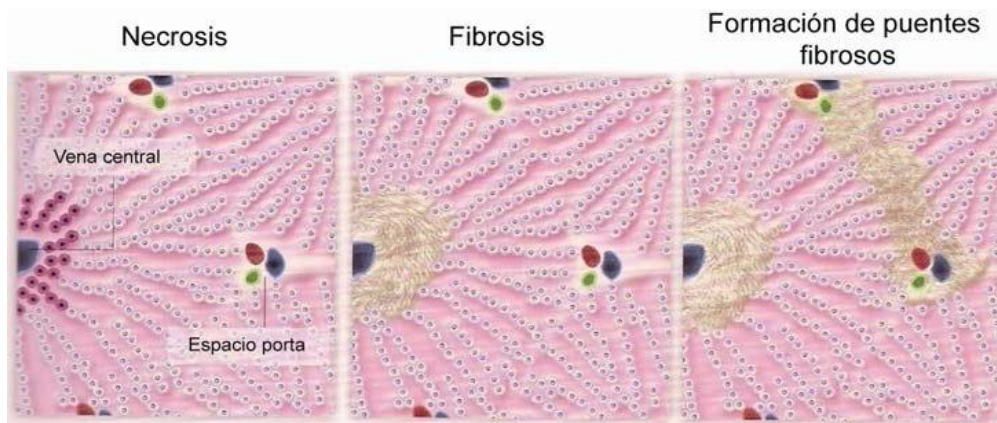


Figura 3. Desarrollo de fibrosis hepática. Esquema secuencial de daño en la región pericentral. Necrosis de hepatocitos (violeta), depósitos en la MEC que forman una cicatriz y formación de septos o puentes fibrosos. Adaptado de Atlas de cirrosis y cáncer hepático, fascículo 3, Bristol&Myers Squib.

El daño de hepatocitos resultante de la injuria provoca el reclutamiento de los macrófagos residentes y de neutrófilos, los cuales producen citoquinas y quemoquinas

responsables de la respuesta inflamatoria generada. Ésta, a su vez, conducirá la regeneración del tejido hepático y en última instancia la sobreproducción de matriz extracelular por las CEH activadas. Entre las citoquinas producidas en este contexto, resultan de mayor relevancia son: el factor de crecimiento transformante β (TGF- β ; del inglés, *Transforming Growth Factor β*), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α ; del inglés, *Tumor Necrosis Factor α*), la interleuquina 1 (IL-1), la interleuquina 6 (IL-6), la interleuquina 10 (IL-10) e interferón γ (INF- γ), predominantemente secretadas por los macrófagos residentes, de los cuales aproximadamente un 80%-90% son células de Kupffer [18].

El TGF- β , producido por las CEH activadas, ha sido identificado como el principal factor pro-fibrogénico, siendo capaz de generar un ciclo autócrino una vez secretado, provocando una amplificación del estímulo pro-fibrogénico. TGF- β promueve la transición de las CEH al fenotipo de tipo miofibroblasto, la expresión de colágeno tipo I por parte de las mismas, e inhibición de la degradación de la matriz extracelular por medio de la expresión de inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs; del inglés, *tissue inhibitor of metalloproteases*). De similar importancia resulta el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF; del inglés *Platelet-derived growth factor*), con actividad pro-proliferativa para las CEH [18]. Otros factores con actividad mitogénica hacia las CEH son el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF; del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*), trombina, factor de crecimiento de epidermis (EGF; del inglés *Epidermal Growth Factor*), el factor de crecimiento de queratinocitos y el factor de crecimiento de fibroblastos. Además, la interleuquina 8 (IL-8) actúa como mediador de la diferenciación de CEH, induciendo el fenotipo contráctil y la producción de actina α de músculo liso (α -SMA) [19] (**Figura 4**). Las CEH también expresan el receptor tipo 4 de quemoquinas C-X-C (CXCR4) funcional, y al activarse inducen la expresión de α -SMA, colágeno I y aumento de proliferación [20].

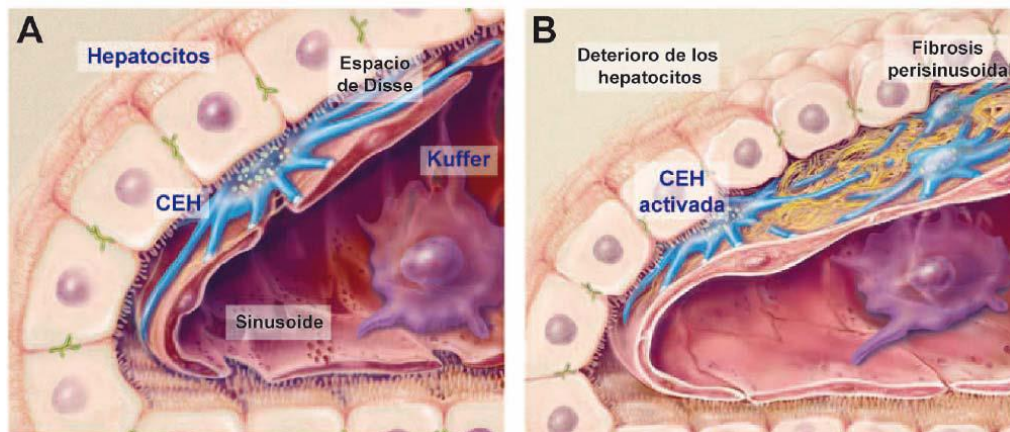


Figura 4. Cambios en el espacio extrasinusoidal durante la fibrosis. **(A)** microarquitectura normal con la presencia de CEH quiescentes (azul). **(B)** en fibrosis hepática se observa acumulación de la MEC en el espacio de Disse y modificación de las CEH activadas. Adaptado de Friedman, 2003 [21].

Por otro lado, el hígado es el primer órgano que entra en contacto con productos derivados de bacterias, como los lipopolisacáridos (LPS). El consumo de alcohol causa sobre-crecimiento bacteriano a la vez que aumenta la permeabilidad del intestino y la translocación del LPS derivado de bacterias de éste hacia el hígado. Luego, el LPS es reconocido por el receptor de tipo Toll 4 (TLR4; del inglés, *Toll-like receptor 4*) que se encuentra en las células de Kupffer, activando la vía independiente de la proteína MyD88, produciendo estrés oxidativo y citoquinas pro-inflamatorias y pro-fibrogénicas, principalmente TNF- α , y causando el daño de hepatocitos [22]. La activación de TLR4 por LPS estimula la producción de quemoquinas y sensibiliza a las CEH ante el TGF- β , que es también producido por las células de Kupffer. Además, en este contexto TLR4 induce la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo TNF- α , IL-1 e IL-6 [18, 23] (**Figura 5**).

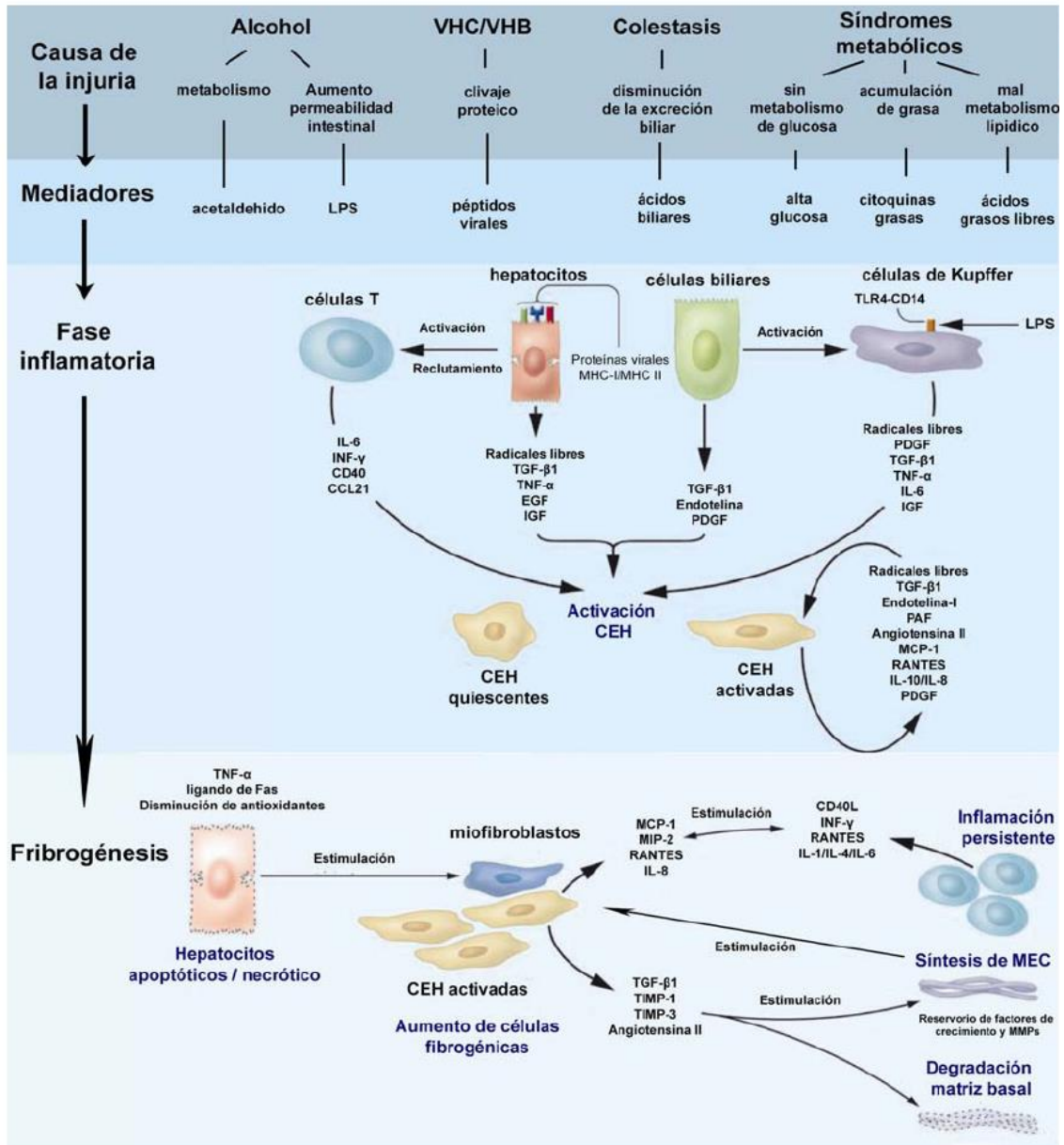


Figura 5. Mecanismos celulares involucrados en la fibrosis hepática: diferentes noxas pueden causar injuria hepática. La liberación de factores y citoquinas por parte de hepatocitos dañados producen la activación de las células de Kupffer y estimulan el reclutamiento de linfocitos, generando un microambiente que promueve la activación de las CEH, estas a su vez producen citoquinas que perpetúan su activación y aumento de componentes de la MEC, lo que induce la muerte por necrosis y/o apoptosis de hepatocitos, perpetuando la activación de las CEH. Adaptado de Bataller *et al* 2005 [11].

1.2.2. Células dendríticas en la fibrosis hepática.

Otro grupo de células de relevancia para la modulación de inmunidad en el hígado son las células dendríticas [10], que representan el 25% de los leucocitos presentes en el tejido hepático fibroso. Éstas son las células presentadoras de antígeno más potentes y especializadas, y las iniciadoras fisiológicas de la respuesta inmune [24]. Siendo el nexo entre la inmunidad innata y la adaptativa, las CD migran desde los tejidos dañados, por ejemplo desde un sitio de infección, hacia los tejidos linfáticos regionales para presentar los antígenos a linfocitos T específicos vírgenes. Una vez activados, los linfocitos T se dirigen al sitio de infección para establecer una respuesta específica. Entre otras funciones, las CD tienen la capacidad de polarizar la respuesta efectora de los linfocitos T hacia un perfil Th1 o Th2 según el tipo de citoquinas que estos secreten [25-27]. Existen diferentes subtipos de CD, algunos de los cuales pueden influir en la generación de una respuesta inmunitaria activa, y otros contribuyen en la inducción de tolerancia inmunológica [28]. Las CD expresan marcadores de superficie que las distinguen particularmente: todas son CD11c⁺, CD19⁻ y CD3⁻. En particular, en el hígado existen 3 subtipos principales de CD: mieloides (en ratón también conocidas como CD convencionales), plasmocitoides y CD relacionadas con monocitos [29, 30]. En todas ellas un estado de maduración está caracterizado por un aumento de la expresión de moléculas de coestímulo tales como CD40, CD80 y CD86, y translocación a la membrana de la molécula presentadora de antígeno de clase II (CMH-II) [28, 30]. Sin embargo, aunque las CD son capaces de inducir respuestas inmunitarias potentes, las CD hepáticas tienen una tendencia a inducir respuestas tolerogénicas frente a ciertos antígenos. Esta respuesta deficiente está mediada por la inducción de células T regulatorias o por la delección de células T activadas. Así, de una manera muy simplificada, podría decirse que se genera un estado de “tolerancia” que habitualmente domina la actividad del sistema inmunitario en el tejido hepático [31].

Brevemente, después de la exposición a las señales de peligro y/o activación y estímulos de maduración, las CD inmaduras CD8⁻ de la pulpa roja y de la zona marginal del bazo se movilizan a las zonas de células T y aumentan la expresión de moléculas del CMH y coestímulo (CD80/CD86), la secreción de interleuquina-12p70 (IL-12p70) y

mejoran su capacidad de estimular las células T vírgenes o de memoria. Asimismo, la interacción entre CD40L en las células T y CD40 en las CD induce una mayor activación y maduración de ambos subconjuntos de CD. Las CD maduras CD8⁻ podrían inducir la expansión de células T reguladoras. Por el contrario, en el estado de tolerancia, las CD CD8⁺ y CD8 α ⁺ permanecen en reposo una vez capturado y procesado el antígeno (mediante la internalización de células apoptóticas). Estas CD semi-maduras expresan bajos niveles de moléculas de coestímulo y por lo tanto inducen la activación deficiente de las células T vírgenes, la apoptosis de las células T o anergia, y probablemente la generación y/o expansión de las células T reguladoras. Además, la interacción CD80/CD86 en ambos subconjuntos de CD con antígenos de linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA4) aumenta la síntesis de indoleamina 2,3-dioxigenasa funcional (IDO). La síntesis de IDO por CD CD8 α ⁺ requiere la liberación autócrina de IFN- γ y se inhibe por la secreción autócrina de IL-6, una citoquina que regula a la baja la expresión receptor del IFN- γ (RIFNg). Las CD CD8 α ⁺ esplénicas también expresan el ligando CD95 funcional (CD95L), que puede desencadenar la muerte de células T [32] **(Figura 6).**

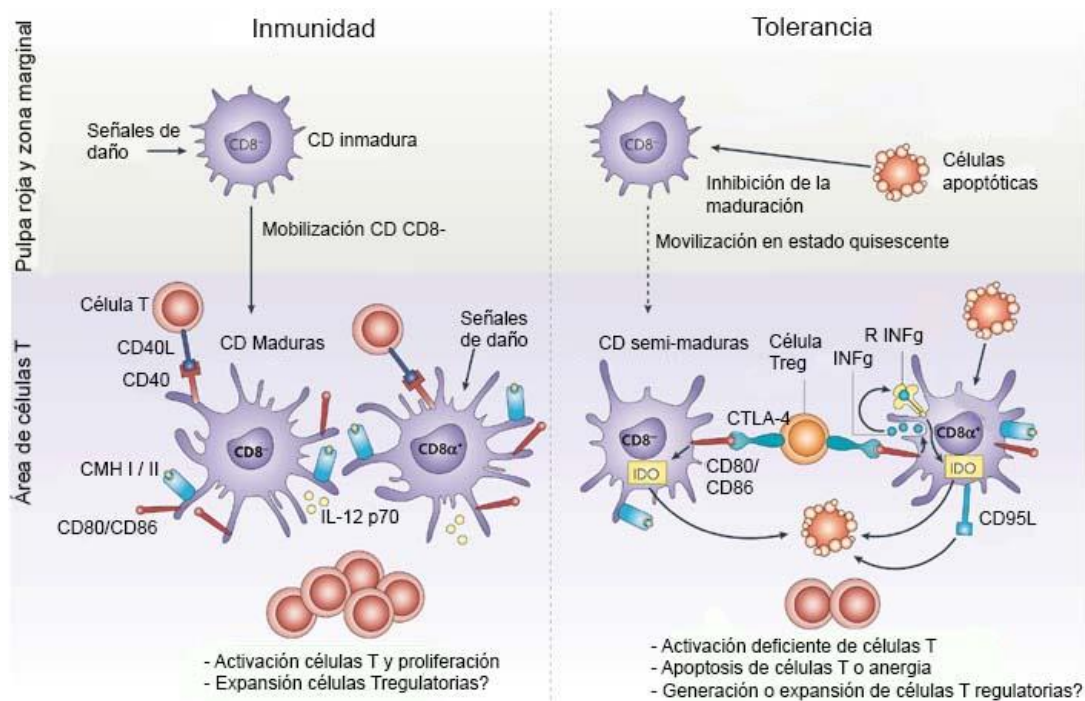


Figura 6. Diferencias entre las CD esplénicas en ratones, durante la inmunidad y la tolerancia. Adaptado de Morelli & Thompson, 2007 [32].

Las CD hepáticas contienen gran cantidad de células plasmocitoides B220⁺, que tienen baja actividad inductora de inmunidad antígeno-específica [25]. Además, se ha demostrado que estas células expresan niveles muy bajos CMH-II y moléculas coestimuladoras, caracterizando a un estado inmaduro o tolerante. Estas CD residentes del hígado se localizan principalmente en las áreas periportales y alrededor de las venas centrales, y tienen limitada su capacidad para migrar hacia los ganglios linfáticos regionales (en el hilio hepático) [25]. Además, se ha observado en pacientes con hepatitis C que la progresión hacia la enfermedad crónica y la fibrosis está relacionada, al menos en parte, a un microambiente inmunosupresor inducido por la infección crónica por VHC en el cual las CD juegan un rol clave [33]. Connolly y colaboradores [31] mostraron recientemente que las CD hepáticas contribuyen a estadios avanzados de fibrosis mediante la secreción de TNF- α . Además, se ha observado que las CD favorecen la regresión de la fibrosis mediante la producción de metaloproteasa 9 (MMP-9) [34]. Por otra parte, las CD podrían producir diversos factores pro- y anti-angiogénicos dependiendo de su estado de activación y

microambiente de citoquinas [35, 36]. Sin embargo, su potencial rol como reguladores de la angiogénesis durante la fibrogénesis está poco claro. Este punto será retomado en la sección 1.5.3.1 (*Relación de las células dendríticas con la fibrosis y la angiogénesis en el hígado*).

1.2.3. Modelos animales de fibrosis hepática.

Los modelos animales de fibrosis hepática permiten, no sólo entender mejor la fisiopatología de la fibrogénesis hepática, sino también poder determinar la efectividad de nuevos tratamientos. Debido a la gran cantidad de enfermedades hepáticas que producen fibrosis y dado que no hay ningún modelo animal que reproduzca exactamente lo que ocurre en humanos, existen numerosos modelos que se complementan entre sí [37]. Particularmente, en el presente trabajo de tesis se utilizó el modelo en ratón con toxicidad crónica inducido por tioacetamida (TAA). La TAA es un potente agente hepatotóxico. Una vez administrado, este compuesto es bioactivado por el citocromo p450 y/o por el sistema monooxigenasa conteniendo flavina que lo convierten en TAA-S-óxidos, que poseen la capacidad de generar necrosis centrolobulillar [38]. La muerte de hepatocitos por este hepatotóxico se debe a la inducción de cambios en la permeabilidad celular, incremento de los niveles de Ca^{2+} e inhibición de la actividad mitocondrial [39, 40]. La aplicación crónica de TAA en dosis de 200 mg/kg intraperitoneal (i.p.) 3 veces por semana produce una fibrosis preferentemente pericentral con eventual formación de puentes entre venas centrales y porto-portales [41-43].

1.3. Cirrosis

La cirrosis representa el estadio final de la fibrosis del parénquima hepático, y es una enfermedad crónica e irreversible en su estadio final. Consiste en el remplazo del tejido hepático normal por tejido fibroso, como consecuencia de un proceso de injuria crónica. Esta enfermedad constituye el estadio final y común de un elevado número de hepatopatías crónicas de distintas etiologías [17]. La fibrosis extensa y la distorsión del parénquima hepático, que le confieren un aspecto nodular [16], provocan una

alteración vascular intra-hepática y una reducción de la masa funcional que llevan a la hipertensión portal y la insuficiencia hepatocelular, lo que constituye la esencia fisiopatológica de las complicaciones de la cirrosis. Esta enfermedad provoca aproximadamente 30.000 muertes por año, 10.000 de las cuales son debidas a cáncer hepático (hepatocarcinoma) que surge de hígados cirróticos en más del 80% de los casos [44].

La cirrosis suele presentarse en pacientes entre 40 y 70 años de edad y en general suelen no presentar manifestaciones clínicas en las primeras etapas de la enfermedad, permaneciendo asintomáticos durante años (cirrosis hepática compensada). En ocasiones, su diagnóstico es casual ante hallazgos como hepatomegalia, esplenomegalia, estigmas cutáneos de hepatopatía crónica o alteraciones de los valores de laboratorio (descenso del valor de plaquetas o alteraciones en las pruebas de coagulación, entre otras). A medida que la función hepática se deteriora, se pueden presentar una o más complicaciones mayores (cirrosis hepática descompensada). En algunos pacientes, complicaciones como la ascitis, hemorragia por varices esófago-gástricas, encefalopatía hepática o HCC, son los primeros signos de esta enfermedad.

Particularmente, debe destacarse que el riesgo de padecer HCC aumenta considerablemente en pacientes con cirrosis. Algunos trabajos muestran un incremento de más de 20 veces en la incidencia del HCC luego de adquirida la enfermedad, por lo que el HCC es una de las principales causas de muerte en pacientes con cirrosis [45].

1.3.1 Tratamiento de la fibrosis y la cirrosis hepática.

En la actualidad no existen tratamientos específicos para la fibrosis hepática y la estrategia terapéutica se enfoca en eliminar el agente causal del daño. Sin embargo, esto no es siempre posible, por ejemplo en pacientes que no responden al tratamiento antiviral, para el caso de infecciones crónicas por los virus de las hepatitis B y C. Por otra parte, para los pacientes con cirrosis avanzada el trasplante hepático es la única alternativa posible. Sin embargo, este procedimiento no sólo es costoso sino que enfrenta una problemática limitante, que es la escasez de donantes. Por lo tanto, en

los últimos años se han realizado numerosos esfuerzos con el fin de encontrar alternativas terapéuticas y nuevas dianas que permitan detener la progresión de la cirrosis o contribuir a su resolución.

1.4. Hepatocarcinoma

El hepatocarcinoma es un tumor maligno derivado de las células hepáticas. La identificación del virus de la hepatitis B como causa de hepatopatías crónicas y su posterior caracterización como virus oncogénico, constituyó un paso trascendental para ampliar los conocimientos de la enfermedad [46]. Luego se demostró la existencia de otros factores etiológicos de la enfermedad como la aflatoxina B₁, el alcohol y la infección crónica por los virus de la hepatitis B y C, diabetes y obesidad, entre otros [47].

1.4.1 Epidemiología

En la actualidad el HCC es uno de los tumores sólidos más frecuentes a nivel mundial, siendo la tercera causa de muerte por cáncer más común en hombres, y séptima en mujeres. La cantidad de nuevos casos por año se estima en 520000 y 230000 respectivamente, para hombres y mujeres [48]. Además, posee una tasa de supervivencia muy baja sin tratamiento, razón que lo convierte en el principal responsable de mortalidad en pacientes con cirrosis [45, 49-51]. Su distribución mundial es muy heterogénea, con la mayor incidencia en el sudeste asiático y el África subsahariana, lo cual representa el 80% de los casos [45]. En lo que corresponde a Argentina, se estima que la incidencia es de un 3,1% de la mortalidad por cáncer en ambos sexos, según el Instituto Nacional del Cáncer. La explicación a esta heterogeneidad poblacional se encuentra, al menos en parte, en que también existe una distribución variable de los factores de riesgo de HCC. Por ejemplo, en las zonas de mayor incidencia se encuentra una elevada prevalencia de la infección por el virus de la hepatitis B y en la exposición a la aflatoxina B₁. Más aún, su incidencia ha comenzado a disminuir en áreas históricamente caracterizadas por tasas muy elevadas gracias a programas efectivos de vacunación contra el HVB y el mejor control de la exposición a la aflatoxina B₁ [45]. Sin embargo, a nivel global ha comenzado a aumentar su incidencia debido a la diseminación de la infección crónica con VHC.

1.4.2. Etiología y patogenia

Como fue previamente mencionado, la infección con el VHB sola o asociada con aflatoxina B₁, la infección con el VHC o el consumo crónico de alcohol son los factores de riesgo más comunes; estos dos últimos predominando en países industrializados [52]. Asimismo, su incidencia se incrementa notablemente en pacientes con cirrosis, por lo que se considera a la cirrosis como una enfermedad pre-neoplásica [53]. Más aún, en los últimos años se ha demostrado que otros factores como la obesidad, la diabetes, el síndrome metabólico, la dislipemia y el tabaquismo se asocian a un incremento del HCC [45]. No obstante, la transformación neoplásica de los hepatocitos se produce como consecuencia del incremento en el recambio celular inducido por la lesión crónica, la respuesta inflamatoria y el daño oxidativo del ADN (ácido desoxirribonucleico). Esto podría resultar en alteraciones genéticas como la activación de oncogenes virales, la inactivación de genes supresores de tumores, la inestabilidad genómica, la activación de telomerasas y la sobreexpresión de factores de crecimiento y pro-angiogénicos [54]. En este sentido, e independientemente de la etiología del HCC, se han observado una serie de mecanismos generales implicados en la hepatocarcinogénesis como alteraciones en el ciclo celular, consecuencia de la disfunción de las proteínas supresoras de tumores p53, p16 o Rb o de la sobreexpresión de la ciclina D1, que se encuentra involucrada en la regulación del ciclo celular, paso de G1 a S. Además, se observa un incremento de la neoangiogénesis, resultado de la actividad de factores pro-angiogénicos como el VEGF, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF; del inglés, *Platelet-derived Growth Factor*) o angiopoyetina 2 y alteraciones en los mecanismos reguladores de la apoptosis, favoreciendo de este modo un potencial replicativo ilimitado [55]. Por lo tanto ha sido aceptado que el proceso de hepatocarcinogénesis se desarrolla en múltiples pasos, aunque los mismos se encuentran menos definidos que en otros tipos de tumores [56]. Además, la transformación neoplásica de los hepatocitos se encuentra asociada no solo con mutaciones genéticas o alteraciones cromosómicas sino también con modulaciones epigenéticas, que modulan la expresión de genes sin alterar la secuencia del ADN, regulando de este modo diversas vías de señalización celular [57, 58].

Particularmente la lista de genes afectados por mutaciones genéticas es extensa incluyendo a p53, clave en el control de la reparación del ADN y del ciclo celular; k-RAS, cuya activación provoca un aumento en la capacidad de invasión y metástasis, y una disminución de la apoptosis celular y la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K; del inglés, phosphatidylinositol 3-kinase). Asimismo, dentro de la modulación epigenética se encuentran la metilación aberrante con la resultante pérdida de función por parte de genes supresores de tumores. De esta manera se han observado metilaciones en las regiones promotoras de *BRCA-1*, *p16* y de la cadherina E en pacientes con HCC [55, 58].

Recientemente se ha propuesto un índice basado en los niveles de expresión combinada de los genes HN1, RAN, RAMP3, KRT19, y TAF9, que evalúa el pronóstico de pacientes con HCC tratados mediante resección quirúrgica. De esta manera, este índice permitiría clasificar a los pacientes según este factor pronóstico, ayudando así a la toma de decisiones terapéuticas [59].

Finalmente, en el proceso de hepatocarcinogénesis la interacción entre las células tumorales y su microambiente tumoral tiene un rol crucial. Este último se encuentra formado por diversos componentes, entre ellos, una extensa matriz extracelular, fibroblastos asociados al tumor (CAFs; del inglés, *cancer-associated fibroblasts*), CEHs, macrófagos asociados al tumor (TAMs; del inglés, *tumor-associated macrophages*), células endoteliales asociadas a tumor, pericitos adyacentes a las células endoteliales, CD, células madres y progenitores. Estos componentes del microambiente tumoral interaccionan entre ellos y con las células del HCC directa o indirectamente, lo cual confiere un fenotipo anormal y lleva a la alteración de las células del HCC (**Figura 7**)[60].

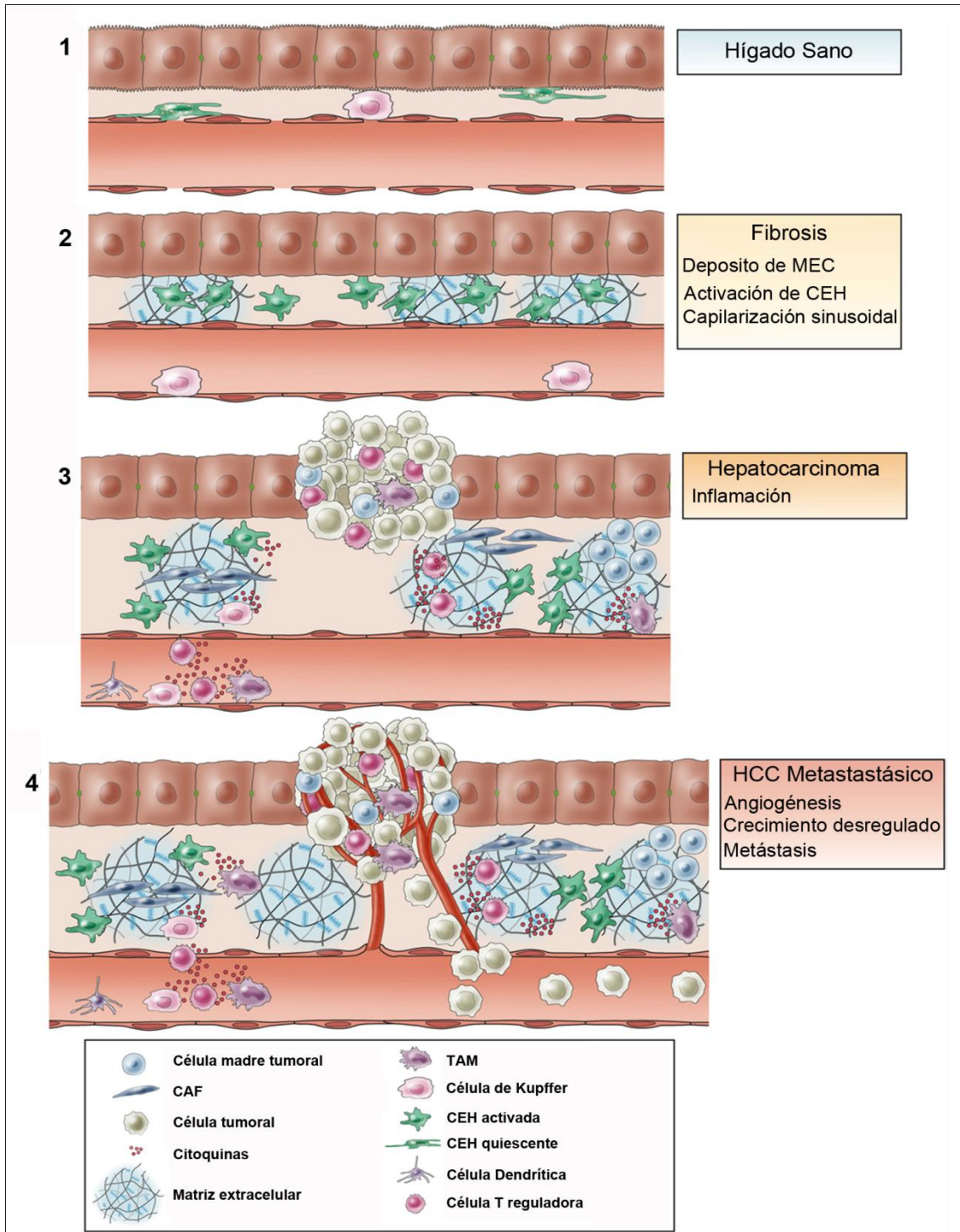


Figura 7. Esquema de las alteraciones que conllevan al desarrollo del HCC. 1) En el parénquima hepático normal los hepatocitos con microvellosidades y células endoteliales sinusoidales cuyas fenestraciones favorecen el intercambio metabólico. El espacio de Disse presenta CEHs que contienen gotas de lípidos. 2) El daño crónico del hígado facilita la generación del proceso fibrogénico, los hepatocitos pierden su microvellosidades, las células endoteliales sinusoidales sus fenestraciones, y las CEHs se activan, perdiendo las gotas de lípidos y secretando MEC. 3) La aparición del HCC ocurre por la transformación maligna de los hepatocitos con un crecimiento descontrolado y el reclutamiento de células endoteliales, inflamatorias, CAFs, TAMs mediante la secreción de citoquinas, quimiocinas y factores de

crecimiento. 4) Se produce el desarrollo de nuevos vasos (neoangiogénesis) y metástasis a distancia. Extraído y modificado de Hernandez-Gea y col., 2013 [61].

1.4.5. Interacción del HCC con su microambiente.

El entorno pre-canceroso del hígado presenta neoangiogénesis, incluyendo varias anormalidades vasculares como arterialización y capilarización sinusoidal, así como también inflamación y fibrosis. En paralelo, se suscitan otros eventos como la hipoxia, el estrés oxidativo y la autofagia [62]. Estos procesos se vuelven más pronunciados al progresar la falla hepática, aumentando exponencialmente el riesgo de cáncer. Así es que la interacción de las células tumorales con el microambiente que las rodea desempeña un papel importante en la regulación del crecimiento, invasión, angiogénesis y metástasis del HCC.

En esta interacción se produce un extenso intercambio de señales mediado por citoquinas, factores de crecimiento y quimiocinas, las cuales median dicho reclutamiento (**Figura 7**). De esta manera, las células tumorales son capaces de reclutar CAFs, CEHs, TAMs y células endoteliales a través de la secreción de VEGF, PDGF, TGF- β y del factor estimulante de colonias de macrófagos (CSF-1; del inglés, *colony stimulating factor 1*), entre otros [63-65]. En respuesta, los CAFs y TAMs promueven la invasión de las células del HCC mediante la secreción de MMPs, activador del plasminógeno de tipo urokinasa (uPA; del inglés, urokinase-type plasminogen activator), IL-8, factor derivado de las células del estroma 1 (SDF-1; del inglés, *stromal cell-derived factor*) y TNF- α [66, 67]. De manera similar, dichas citoquinas reclutan células del sistema inmunitario incluyendo CD₄⁺ T reguladores y leucocitos que contribuyen con el ambiente inmunosupresor del tumor. Más aún, la acumulación de los CAFs y TAMs también puede ocurrir en las zonas que rodean a las islas de elevada proliferación tumoral desde donde secretan VEGF, PDGF, TNF- α , IL-8, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF; del inglés, *fibroblast growth factor*), MMP-2, MMP-9 y MMP-12, favoreciendo la estabilización y formación de nuevos vasos sanguíneos por las células endoteliales asociadas al tumor [68, 69]. Por otra parte, en respuesta a estas mismas señales, las CEHs son activadas, reclutadas y estimuladas a proliferar y secretar factores pro-angiogénicos [70, 71]. Estos factores de

crecimiento, citoquinas y quimiocinas también son capaces de reclutar a células progenitoras del hígado y a las células mesenquimales estromales circulantes y provenientes de la médula ósea.

Por otro lado, y aunque el HCC es un tumor altamente vascularizado, los vasos formados mediante neo-angiogénesis son funcionalmente anormales y no cubren los requerimientos de oxígeno del tumor, creándose zonas de hipoxia. Esta situación induce la expresión del factor inducible por hipoxia-1 α (HIF-1 α ; del inglés, *hipoxia-inducible factor 1 α*), uno de los factores de transcripción más importante en la regulación de la expresión de genes proangiogénicos, evasión del sistema inmune, invasión y metástasis [62].

Además, la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés, *reactive oxygen species*) por parte de las propias células tumorales y TAM, provoca estrés oxidativo y nitrosativo mediante la interacción con el ADN, ARN, lípidos y proteínas, provocando un aumento de mutaciones, inestabilidad genómica, cambios epigenéticos y disfunción de proteínas. Los altos niveles de ROS promueven la invasividad por parte de las células de HCC y contribuyen a la invasión tumoral mediante la producción de MMP [72].

Los componentes del estroma expuestos a condiciones de estrés oxidativo inducido por células tumorales junto con la hipoxia, inducen autofagia, un proceso catabólico que en el estroma tumoral promueve la supervivencia de células tumorales, por medio del suministro de energía que les permite resistir el desbalance metabólico [73].

De esta manera, el microambiente tumoral es una parte esencial e intrínseca del HCC, regulando tanto su crecimiento como su progresión (**Figura 8**).

marcador de mal pronóstico para este tipo de cáncer [77]. En concordancia con esto, se ha reportado que IL-6 tiene un rol importante en la progresión tumoral, incluyendo la proliferación, migración y angiogénesis. Se han descrito varias vías angiogénicas relacionadas con IL-6, incluyendo la señalización IL-6/HIF en cáncer de ovario, y la señalización Stat3/VEGF en cáncer de mama [77]. Sin embargo, el mecanismo por el cual IL-6 induce angiogénesis no está completamente dilucidado.

1.4.7. Tratamiento

En la actualidad, la decisión terapéutica se basa en el empleo del sistema de estadificación y guía de tratamiento Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) generado por el grupo del hospital Clinic de Barcelona, el cual asocia estadio del tumor con tratamiento y pronóstico. Este sistema fue incorporado por las asociaciones americana y europea para el estudio de las enfermedades hepáticas, AASLD y EASL, respectivamente [78, 79]. En los pacientes que presentan cirrosis y han sido diagnosticados de HCC, la estrategia de tratamiento dependerá no sólo de la extensión tumoral, de la existencia de metástasis, y de la invasión vascular, sino también de la función hepática residual (Child-Pugh) y del estado general del paciente. Esto se debe a que estos últimos índices condicionan en muchos casos la supervivencia y la aplicabilidad de los tratamientos. Así, para pacientes en estadio 0 (muy precoz) o A (precoz) se eligen opciones terapéuticas con intención curativa (trasplante, resección o técnicas de ablación) y su supervivencia varía entre el 50% y el 70% a los 5 años. En pacientes en estadios B (intermedio) y C (avanzado) los tratamientos son la quimioembolización transarterial (TACE) y el tratamiento médico con sorafenib- un inhibidor multiquinasa que reduce la proliferación tumoral-, respectivamente. Estos pacientes presentan una vida media entre 11 y 20 meses en estadio B, mientras que en estadio C es de 6 a 9 meses. Finalmente, para pacientes en estadio D (terminal) sólo se contempla el tratamiento sintomático con una supervivencia media de 3 meses aproximadamente [80]. En este contexto, las opciones terapéuticas con intención curativa sólo son aplicables en una minoría de los pacientes debido a los estrictos criterios en la selección de los candidatos. Más aún, el trasplante hepático también es

limitado por la disponibilidad de donantes. Por lo tanto, son necesarias nuevas opciones terapéuticas para esta enfermedad.

1.5. Angiogénesis.

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos a partir de vasos existentes, y ocurre tanto en procesos fisiológicos como patológicos, comenzando en el útero y continuando en la vida adulta [81]. Fisiológicamente es un proceso esencial que ocurre durante el desarrollo embrionario y fetal, y en el adulto, sólo ocurre en la reparación de heridas, el crecimiento óseo, el ciclo menstrual y el embarazo. Sin embargo, también puede presentarse angiogénesis patológica en enfermedades específicas, como son los desórdenes neovasculares intraoculares, la artritis reumatoidea, psoriasis y cáncer [82].

Los capilares vasculares son necesarios en todos los tejidos para el intercambio por difusión de nutrientes y metabolitos. El oxígeno y el resto de los factores hemodinámicos son críticos para la supervivencia de las redes vasculares y para la adaptación estructural de las paredes vasculares [81]. La angiogénesis puede ocurrir por diferentes mecanismos: brotación, vasculogénesis, elongación o por la incorporación de células precursoras endoteliales circulantes a las paredes de los vasos [83]. En la angiogénesis por brotación, la angiogénesis se inicia en tejidos poco perfundidos al detectarse un cierto nivel de hipoxia por mecanismos sensores de oxígeno, demandando la formación de nuevos vasos para satisfacer las demandas metabólicas de las células no parenquimales [81]. Éstas responden al entorno hipóxico mediante la secreción de factores de crecimiento como VEGF -el factor angiogénico clave-, FGF básico (bFGF), PDGF, quemoquinas y otros. Como primer paso, la membrana basal (MB) del vaso preexistente, que separa el epitelio del estroma, es degradada por la acción de metaloproteasas. Las mismas son producidas por células estromales, endoteliales o por las propias células tumorales, aunque también pueden ser producidas por células del sistema inmune que se rodean las células tumorales. Al degradarse la MB ocurren varios eventos, entre ellos la liberación de las células endoteliales de sus anclajes celulares (integrinas) para luego migrar y proliferar, la liberación de factores de crecimiento secuestrados (VEGF y bFGF) y el

desprendimiento de pericitos que le dan sostén al vaso sanguíneo [84]. A continuación, ocurren los procesos de tubulogénesis (la formación de tubos por células endoteliales) la fusión del vaso original con el vaso nuevo, la poda del neovaso y la estabilización de los pericitos que lo rodean [81] (**Figura 9**).

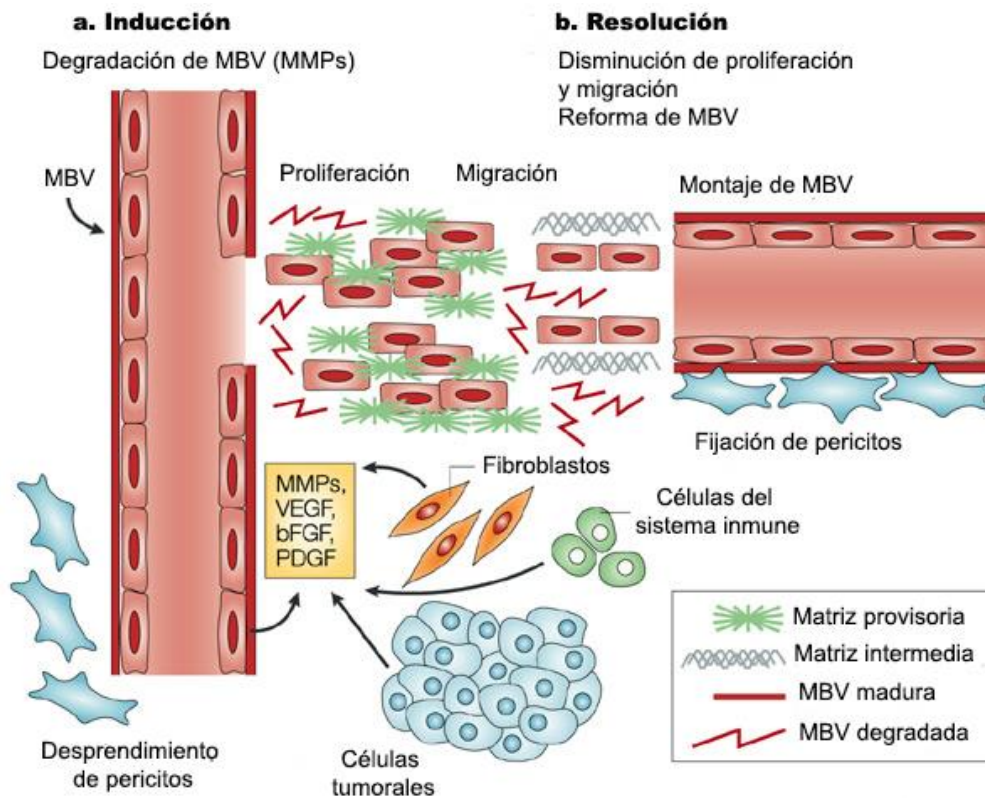


Figura 9. La angiogénesis está relacionada con una degradación y reforma de membranas basales vasculares (MBV). a) En respuesta a factores de crecimiento y MMPs, la MBV sufre cambios degradativos y estructurales. Luego, la transición de una MBV madura a una matriz provisoria promueve la proliferación y posterior migración de las células endoteliales vasculares. Los factores de crecimiento como VEGF, bFGF y PDGF son liberados desde la membrana basal, además de ser producidos por las células tumorales, fibroblastos y células del sistema inmune. b) Estos procesos inducen luego la formación de una MBV intermedia, que posteriormente se transformará en nueva y madura. Junto con las células endoteliales vasculares y pericitos, la MBV inicia la formación de un nuevo vaso sanguíneo. Extraído y adaptado de Kalluri R. 2003.

1.5.1 Bases moleculares de la angiogénesis.

Como se mencionó anteriormente, la angiogénesis es un proceso finamente regulado tanto por factores moleculares como biomecánicos. Dentro de los factores bien caracterizados se encuentra VEGF-A, este constituye el principal miembro de una familia de genes con acción angiogénica que también incluye VEGF-B, -C, -D, y el factor de crecimiento placentario (PIGF; del inglés, placental growth factor) [85].

La señalización celular inducida por VEGF es a través de los receptores tirosinquinasa VEGFR-1 y -2 (del inglés, VEGF Receptor) y activa distintas vías de señalización que incluyen la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK; del inglés, *mitogen activated protein kinase*) y PI3K, afectando la función de células endoteliales [86]. Cabe aclarar que ambos receptores parecen cumplir distintas funciones: el VEGFR-2 media principalmente señalización inducida por VEGF-A, afectando la mitogénesis de las células endoteliales y la permeabilidad vascular [87]. Contrariamente, la señalización mediada a través de VEGFR-1 puede regular negativamente la señalización de VEGFR-2, secuestrando la molécula de VEGF. Por otro lado, VEGF-B se une selectivamente a VEGFR-1 [88, 89]. VEGF-C y -D interactúan principalmente con el VEGFR-3 estimulando la linfangiogénesis [90]. La funcionalidad de VEGF también depende del procesamiento proteolítico que afecta su biodisponibilidad [91].

Por otro lado, para que los vasos formados sean funcionales, tanto las células endoteliales como toda la pared vascular deben adquirir una completa maduración y adaptación a los requerimientos del tejido que irrigan. Esto involucra el depósito de células murales (células de músculo liso y pericitos) y de la MEC. Este proceso depende parcialmente de TGF- β que estimula la inducción, diferenciación y proliferación de células murales, como así también la producción de MEC por parte de distintas células. Otro factor involucrado es el receptor β de PDGF (PDGFR- β , del inglés, Platelet-derived growth factor β) que induce el reclutamiento de células murales. La estabilización de los vasos requiere la expresión de Angiopoietina-1 (ANG-1) producida por las células murales, que activa su receptor Tie-2 en las células endoteliales, el cual promueve la adhesión de pericitos y su adecuada permeabilidad. Además, la forma adecuada de los

vasos depende de los sensores de oxígeno (prolil-hidrolasa 1-3, PDH 1-3) que regulan la activación de HIF-1 [91].

La permeabilidad vascular, esencial para mantener el correcto intercambio de fluidos, solutos y células del sistema inmune entre la circulación sanguínea y los tejidos, depende de la habilidad de las células endoteliales de regular la adhesión célula-célula, lo cual está controlado principalmente por la expresión de las proteínas VE-cadherina and N-cadherina en las uniones adherentes [91].

1.5.2. Angiogénesis y cáncer

A medida que un tumor crece, la demanda de oxígeno y nutrientes es mayor y la provisión local no es suficiente, por lo que se genera un microambiente hipóxico que junto a eventos oncogénicos promueven la angiogénesis [91]. Este estado de hipoxia lleva a la activación del factor de transcripción HIF-1, capaz de inducir la expresión de distintos factores angiogénicos, entre ellos VEGF. HIF-1 es un heterodímero compuesto por dos subunidades: α y β . La subunidad 1- α es la regulada por el nivel de oxígeno, y dentro de condiciones de normoxia su nivel es bajo dado que sufre degradación a nivel proteosomal por ubiquitinación [92]. Ese nivel de oxígeno es sentido por los receptores PDH1-3. La hipoxia reduce la actividad de estos sensores y por lo tanto se previene la degradación de HIF [92].

La sobreexpresión de VEGF y otros factores angiogénicos en los tumores lleva a la formación de nuevos vasos que son anatómicamente y funcionalmente anormales. Estos nuevos vasos son tortuosos, frágiles, con inadecuada presencia de pericitos, propensos al sangrado y a la exudación. Esta vasculatura anormal altera el microambiente tumoral e influye dramáticamente en el progreso y crecimiento del tumor, en su capacidad metastásica, escape inmunológico y respuesta a la terapia anti-tumoral [91]. Si bien VEGF-A es un factor crítico también están involucrados otros factores, y es el desbalance crónico entre factores angiogénicos y antiangiogénicos lo que lleva a la formación anormal de vasos sanguíneos. La mayoría de las células tumorales humanas expresan VEGF-A y su receptor VEGFR-2, y también las células estromales que las

rodean: fibroblastos, monocitos y plaquetas [93]. Los fibroblastos asociados al tumor median angiogénesis tanto por liberación de VEGF, como de otros factores como FGF y SDF-1 α , que actúan como factores quimioattractantes de progenitores derivados de medula ósea [63, 94].

1.5.3. Angiogénesis en la fibrosis hepática y el HCC.

Durante el proceso de regeneración que ocurre en la fibrosis hepática se secretan diversas citoquinas y factores de crecimiento, muchos de los cuales están involucrados también en el proceso de angiogénesis tumoral, más aun, podrían estar relacionados con la aparición y el crecimiento de micrometástasis luego de una hepatectomía parcial, entre ellos HGF, EGF, TGF- β , HIF-1 y varias metaloproteinasas (MMPs) [95]. El estado de hipoxia que se genera durante la fibrosis es un factor activador de las CEH, lo que lleva a la perpetuidad del proceso. En estas condiciones las CEH sintetizan VEGF, PDGF y proteína relacionada a Angiopoyetina- 4 (ANGPL4; del inglés, *Angiopoyetin-like 4*) en forma dependiente de HIF-1 [96].

Por otro lado, el HCC es uno de los tumores sólidos más vascularizados, y la angiogénesis juega un rol importante desde etapas tempranas de su desarrollo. En este tipo de tumor se ha observado que la expresión de VEGF se correlaciona con el grado de agresividad de HCC [97].

En las últimas décadas se han desarrollado distintas terapias anti-angiogénicas que inhiben la formación completa de nuevos vasos, por ejemplo mediante la neutralización de VEGF con el anticuerpo monoclonal bevacizumab, por la inhibición de la señalización mediada por VEGF a nivel del receptor mediante los llamados inhibidores multikinasa, tales como sorafenib, sunitinib, y pazopanib, que inhiben la señalización a nivel de VEGFRs, PDGFRs, c-kit, y c-fms [98]. Se ha observado que una completa remisión de la vasculatura tumoral no resulta en los beneficios esperados en relación a disminución del crecimiento tumoral y/o aumento de la sobrevida [99]. En diferentes ensayos clínicos en los que se utiliza la monoterapia dirigida contra la supresión de la acción de VEGF, la sobrevida no ha aumentado de manera significativa,

puesto que otros factores también estarían involucrados. La remisión completa de la vasculatura tumoral tampoco sería un objetivo beneficioso si se piensa en el uso combinado con otras drogas, que requiera la adecuada llegada al seno del tumor a través del flujo sanguíneo. La terapia antiangiogénica usando drogas como sorafenib, un inhibidor multikinasa, y bevacizumab, que bloquea la molécula de VEGF, han mostrado cierta eficacia clínica en el tratamiento de HCC; de hecho, sorafenib es la primera droga aprobada por la FDA para tratar HCC avanzado [100, 101]. Sin embargo, ha logrado incrementar la supervivencia de los pacientes sólo unos pocos meses [102]. Por lo tanto, se requieren más estudios que permitan aplicar una terapia antiangiogénica adecuada, o bien tendiente a restablecer la angiogénesis normal.

1.5.3.1 Relación de las células dendríticas con la fibrosis y la angiogénesis en el hígado.

Como se mencionó en la sección 1.2.2, se ha descrito que las CD juegan un importante rol en la fibrosis hepática, y además son capaces de producir factores pro-angiogénicos en el contexto de tumores. En este aspecto, se ha sugerido que factores pro-angiogénicos, como VEGF, β -defensina, SDF-1 o CXCL12, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF; del inglés, *hepatocyte growth factor*) e IL-8 (o CXCL8) reclutan potencialmente a CD inmaduras a los tumores [103]. Asimismo, se ha demostrado que estas CD asociadas al tumor son capaces de dirigir la angiogénesis tumoral a través de la liberación de citoquinas pro-angiogénicas como TNF- α , IL-8 y osteopontina [104, 105]. A su vez, estos factores estimulan a otras células, entre ellas los monocitos, a liberar moléculas pro-angiogénicas como IL-1 [103]. Más aún, trabajos recientes indican que existen CD inmaduras que co-expresan marcadores de CD y de células endoteliales, y representan un reservorio de células progenitoras endoteliales. Luego de la trans-diferenciación a células tipo-endoteliales, estas células son capaces de integrarse a la vasculatura de este modo fomentan la angiogénesis tumoral [106]. Es de destacar, que la expresión de marcadores de células endoteliales en las CD y el proceso de diferenciación parecen estar controlados por factores angiogénicos como VEGF y oncostatina M [106, 107].

Entre los factores derivados de tumor que podrían ser responsables del fenotipo angiogénico de las CD inmaduras, VEGF ha sido el más estudiado. Sin embargo, otros factores como HGF, TGF- β , prostaglandina E2, lactato y osteopontina también están implicados en la inhibición de la maduración de CD y la inducción de propiedades pro-angiogénicas [103]. De manera inversa, se ha observado que las CD inmaduras pueden aumentar la expresión de VEGF e IL-8 en un entorno hipóxico [108], lo que podría ejercer una función pro-angiogénica en el microambiente tumoral. Esta misma premisa podría ser válida además para el hígado con fibrosis, ya que se ha demostrado que en esta patología hay un aumento de la angiogénesis, aunque su relación con la presencia de las CD aún no ha sido estudiado.

1.6.Ácido Hialurónico

Entre los componentes de la matriz extracelular cuya síntesis y acumulación se incrementa durante la fibrogénesis y tumorigénesisse encuentra el Ácido Hialurónico (AH). Éste es un polímero miembro de la familia de los glucosaminoglicanos (GAG) con características distintivas frente otros GAGs. Es una molécula con un peso molecular de entre 10^5 - 10^7 Da y una longitud de 2-25 μ m, compuesta por 2000-2500 unidades repetidas de disacáridos de ácido D-glucurónico (GlcA) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), sin grupos sulfatos [109] (**Figura 10**).

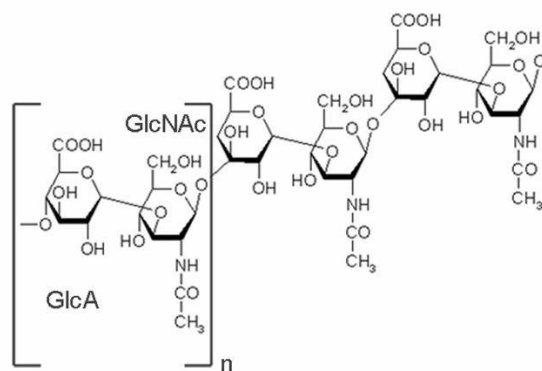


Figura 10. Estructura del AH. Cada subunidad está constituida por ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina. El número de disacáridos puede encontrarse en un rango de entre 2000 y 2500 unidades. Adaptado de Alaniz et.al. 2009 [110]

El mecanismo de síntesis de AH difiere de los demás componentes de MEC en que no es sintetizado dentro de la célula y luego transportado a la superficie celular mediante vesículas. Las enzimas que lo sintetizan, las sintetasas HAS1, HAS2 y HAS3, están ubicadas en la membrana citoplasmática en lugar de estar en el aparato de Golgi. Por este motivo, el AH sintetizado puede alcanzar pesos moleculares que van desde los 5 KDa hasta los 20000 KDa. Estas tres enzimas han sido caracterizadas tanto en humano como en ratón, y difieren entre sí por su actividad catalítica (HAS3>HAS2>HAS1) y el tamaño del producto final: las primeras dos polimerizan cadenas largas de disacáridos GlcA-GlcNAc, mientras que HAS3 polimeriza fragmentos menores a los 300 KDa [111].

El metabolismo de esta molécula comienza por endocitosis del AH de alto peso molecular (AH-APM) que se encuentra en la matriz extracelular. Este proceso puede ser mediado por receptor o bien por macropinocitosis-sin receptores involucrados-. Luego es transportado hacia el interior de la célula por endosomas, los que se fusionan con lisosomas dentro de los cuales el AH es degradado en fragmentos entre 50-500 sacáridos por la enzima Hialuronidasa 2 (Hyal2) [112]. Estos sacáridos pueden ser luego endocitados nuevamente y degradados a oligosacáridos por la Hialuronidasa 1, que se encuentra en los endosomas, y a su vez los mismos pueden degradarse a monosacáridos para convertirse en sustrato de una nueva cadena de GAG o bien ser exocitados [113]. Los oligosacáridos exocitados son capaces de inducir una gran variedad de efectos biológicos; pero además la vía endocítica de AH es esencial para su homeostasis [111] (**Figura 11**).

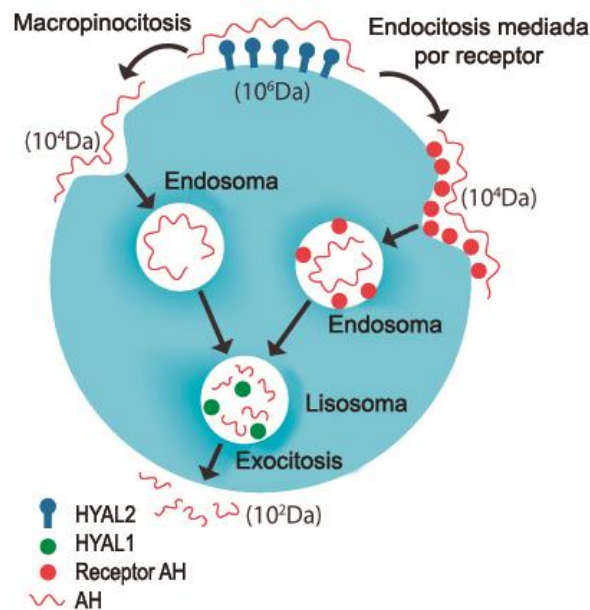


Figura 11. Metabolismo del AH. Adaptado de “Hyaluronan endocytosis: mechanisms of uptake and biological functions”. Capítulo 14. Racine R, Mummert M. 2012.

La endocitosis mediada por receptor involucra a los receptores de AH CD44 y Endotelio vascular linfático-1 (LYVE-1), que no sólo facilitan la endocitosis de AH sino que también disparan eventos de señalización que generan respuestas celulares específicas a la unión de AH; y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1; del inglés, *intercellular adhesion molecule 1*), que es receptor metabólico y se cree que también tiene un rol en la señalización [114, 115]. Otros receptores de AH son el receptor para motilidad mediada por AH (RHAMM), vinculado en muchos estudios a la progresión tumoral, posiblemente actuando junto con CD44, LYVE-1 se expresa en la superficie de las células endoteliales linfáticas, y luego de unirse al AH se asocia con el CD44 de la superficie de los linfocitos facilitando su adhesión y entrada a los vasos linfáticos [116]. Es relevante destacar que el 85% del AH total de cuerpo es metabolizado en los ganglios linfáticos, siendo el hígado el responsable de metabolizar el 15% restante [117]. Por otra parte, el receptor de AH para endocitosis (HARE; del inglés, Hyaluronan Receptor for Endocytosis) se expresa en los sinusoides hepáticos y en los ganglios linfáticos, y su presencia resulta indispensable para el metabolismo de AH [118].

La molécula de AH se encuentra altamente conservada en la evolución y entre las especies. Es de distribución ubicua en la MEC, y se lo encuentra particularmente en las matrices que rodean a células en proliferación o migración, o durante procesos patológicos como tumorigénesis, donde se observa un aumento en su síntesis [119].

AH cumple distintas funciones, desde un papel meramente estructural, ofreciendo propiedades físicas y de hidratación adecuadas a los tejidos o la posibilidad de interactuar con proteoglicanos esenciales en la estructura y ensamble de los mismos; por otro lado, es capaz de influir sobre el comportamiento celular al unirse con sus receptores específicos en la superficie celular e inducir señales intracelulares [120] (**Figura 12**).

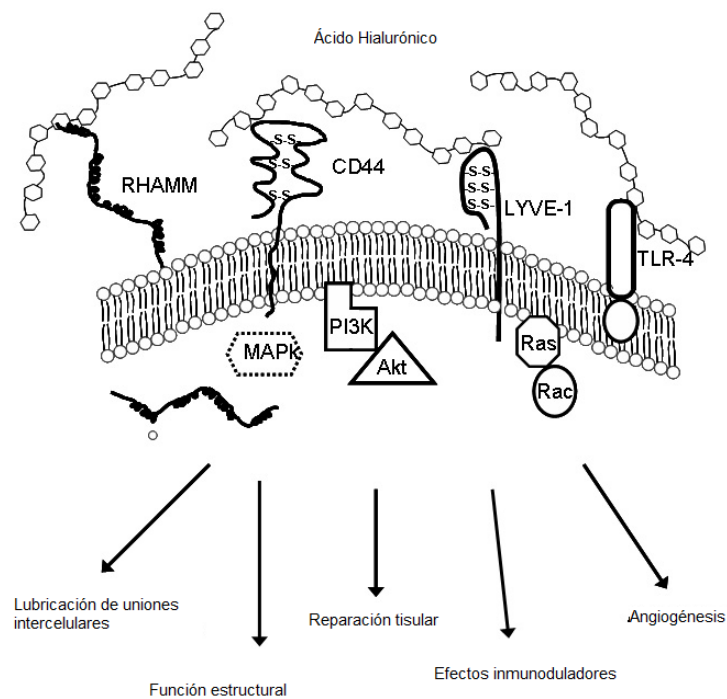


Figura 12. La interacción del AH con sus distintos receptores desencadena diversas respuestas fisiológicas y patológicas. Adaptado de Alaniz et.al. 2009 [110].

Como se dijo anteriormente, el AH puede encontrarse como especies de distintos rangos de peso molecular [121], lo cual se correlaciona con sus distintas funciones biológicas descritas. El AH-APM ($2-6 \times 10^6$ Da) cumpliría un papel fisiológico, participando en la homeostasis de los tejidos y en la distribución de proteínas en la

membrana plasmática. Sin embargo, la especie de bajo PM ($0.1-1 \times 10^6$ Da), que puede ser generada por expresión diferencial de alguna de las HAS, estaría relacionada con procesos patológicos [122]. Distintos antecedentes indican que puede estimular IL- 1β , TNF- α , óxido nítrico sintetasa, quimiocinas pro-inflamatorias, factor de transcripción NF- κ B y metaloproteasas derivadas de macrófagos, todos procesos mediados a través de la interacción con CD44 [123].

Estudios experimentales en modelos animales han documentado un papel crucial para AH, que especialmente a través de la interacción con CD44 puede modular el crecimiento y desarrollo tumoral [120]. Durante las últimas décadas se ha demostrado que existe una correlación entre los niveles de síntesis de AH y el grado de malignidad de varios tumores [124]. Altos niveles de expresión de AH se correlacionaron con una escasa diferenciación y disminución de la supervivencia en ciertos carcinomas humanos como cáncer de mama, próstata, páncreas, colon, gástricos y linfoma [125-129]. Este AH es producto de un aumento en su síntesis, ya sea por la propia célula tumoral o por interacciones de ésta con las células que la rodean en las cuales se induce la producción de AH [122, 129]. De hecho, la acumulación de AH constituye una señal que favorece la transición epitelio-mesenquimal, tanto en tejidos embrionarios como en tejidos tumorales. Además, estudios en pacientes fueron consistentes con la idea de que el AH en células tumorales podría contribuir a un mayor potencial de diseminación [125]. Conjuntamente, AH también juega un rol clave durante la reparación de injurias, dirigiendo la migración de fibroblastos y proliferación en los sitios injuriados [130].

Si bien existen evidencias directas que relacionan a AH con la progresión tumoral, los mecanismos por los cuales esta molécula promueve un fenotipo maligno no están totalmente aclarados y constituyen un área de activa investigación.

1.6.1 Ácido Hialurónico y Angiogénesis

Distintos trabajos han demostrado que AH, en particular fragmentos del mismo u oligómeros pueden estimular la angiogénesis. Estos fragmentos de AH de bajo PM

pueden inducir angiogénesis por diferentes vías: estimulando la proliferación, migración y formación de tubos en células endoteliales. Asimismo se ha demostrado su capacidad angiogénica en varios modelos experimentales, por ejemplo se ha observado que la aplicación de fragmentos de AH en la piel de ratas adultas aumenta el número de vasos/mm de piel [131]. También se ha determinado que AH tiene un papel crítico en la vasculogénesis embrionaria dado que animales deficientes en HAS2 presentan graves alteraciones en la morfogénesis cardíaca [128]. Por otro lado, se ha sugerido que las matrices ricas en AH representan un nicho de células progenitoras capaz de reclutar y retener desde la circulación células endoteliales progenitoras, favoreciendo los mecanismos de formación de vasos a partir de estas células derivadas de médula ósea o circulación [132].

En lo que concierne a antecedentes en materia del efecto de 4MU, inhibidor de la síntesis de AH, sobre procesos angiogénicos, resultan ser muy escasos. Se ha demostrado en un modelo experimental de cáncer de próstata que 4MU reduce la expresión de MMP-2 y -9, a la vez que disminuye la microdensidad vascular en el tejido tumoral [133]. Algunos resultados más específicos fueron descritos recientemente, en un trabajo que muestra los efectos antiangiogénicos de 4MU evaluados *in vitro* en células microvasculares endoteliales humanas (HMEC-1), e *in vivo* en membrana corioalantoica de pollo y en un modelo de pez cebra [134]. Sin embargo, los efectos de esta droga sobre el contexto de HCC asociado a fibrosis y la angiogénesis no habían sido estudiados sino hasta el trabajo incluido en esta tesis.

1.6.2. Ácido hialurónico y su relación con la Interleuquina-6.

Con respecto a la relación entre estas dos moléculas que se encuentran aumentadas tanto en la fibrosis hepática como en HCC, se ha mostrado que la IL-6 es capaz de unirse selectivamente a glucosaminoglicanos-componentes de la matriz extracelular-, entre ellos el AH [135]. Puntualmente, en un estudio en pacientes con mieloma múltiple se demostró que la IL-6 producida por células estromales media el efecto de supervivencia provocado por AH, y que la retención y concentración próxima al sitio de secreción favorece su actividad autocrina y paracrina [136].

1.7. Inhibición de la síntesis de AH.

Cuatro-Metilumbeliferona (4MU) es un inhibidor específico de la síntesis de AH, cuyo efecto se descubrió en primeras instancias sobre un cultivo de fibroblastos humanos en el cual se observó inhibición sobre la síntesis de AH y la formación del mismo en la matriz pericelular, no así de otros GAG [137]. Posteriormente, el mismo efecto se observó en células de melanoma B16F10 y células de cáncer pancreático humano KP1-NL [138]. 4MU es una cumarina modificada (7-hidroxi-4-metil cumarina), molécula de origen vegetal, ampliamente empleada por vía oral como colagogo o anti-espasmódico en humanos (Heparvit™) [139] como así también en ensayos clínicos en pacientes con hepatitis B y C crónica (ClinicalTrials.gov identifier: NCT00225537), [139] (Figura 13).

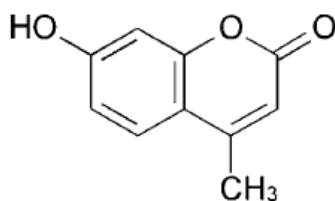


Figura 13. Estructura molecular de 4MU.

Si bien el mecanismo de acción de 4MU no está claramente definido, este compuesto ejercería su acción por medio de la disminución de los niveles de ARNm de las enzimas de síntesis de AH, las AH sintasas (HAS), y por depleción de los precursores de la síntesis de este polímero (UDP-GlcUA) como se ha observado en líneas celulares derivadas de melanoma, cáncer de mama y ovario [140]. 4MU inhibe competitivamente la elongación de la cadena de AH al ser glucuronidado por UDP-glucosiltransferasas (UGT) endógenas, depletando así las moléculas de UDP-GlcUA. Entonces, estos precursores que normalmente son sustrato de HAS (enzimas con actividad UGT), se consumen para producir MU-GlcUA [140]. Por otro lado, se ha demostrado en un modelo experimental de tumor de melanoma que 4MU inhibe

selectivamente la síntesis de AH en el hígado de los ratones y, además, posee un efecto inhibitorio sobre la metástasis tumorales de las células de melanoma en dicho órgano, ya que la formación de AH en la superficie de la célula sería necesaria para la diseminación tumoral, en este caso de células de melanoma [141]. Por otro lado, antecedentes recientes mostraron que el uso simultáneo de esta droga potencia la acción de la gemcitabina, reduciendo el tamaño de tumores pancreáticos de ratones inoculados con células tumorales humanas de cáncer de páncreas [138]. El efecto anti-tumoral de 4MU ha sido demostrado en una gran variedad de tumores en la última década. Se ha observado un efecto inhibitorio de 4MU sobre células de osteosarcoma [142] y cáncer de colon [143]. Además, su acción fue efectiva en modelos *in vivo* de metástasis de cáncer de pulmón [142], cáncer de esófago [144], metástasis de células mesenquimales de cáncer de mama en hueso [145, 146], leucemia [147], cáncer renal-en combinación con sorafenib [148].

Estos antecedentes indican el potencial uso de 4MU ya sea solo o en combinación con otras drogas en el tratamiento de distintos tumores.

*Hipótesis y
Objetivos*

2. Hipótesis de trabajo.

Conociendo que AH está sobreexpresado durante el proceso de fibrosis y en cirrosis hepática, es posible postular que este componente de la MEC desempeña un papel importante en el desarrollo del HCC, generando un entorno favorable para su crecimiento.

- El uso de un inhibidor específico de la síntesis del AH (4MU) durante el proceso fibrogénico hepático podría afectar el establecimiento del HCC al generarse una MEC hepática menos permisiva para el desarrollo del mismo, tanto por un efecto sobre las células responsables de generar la fibrosis como por un efecto directo sobre las células tumorales.
- Si, en efecto, la inhibición del AH por 4MU resultase en un efecto antitumoral, se podría postular que esta droga sería capaz de modular factores implicados en el proceso angiogénico patológico, debido a que se conoce que el AH puede modular la angiogénesis.

Por otro lado, y en base a que en el contexto de la fibrosis hepática las células dendríticas cumplen un rol importante en la regresión de la fibrosis en estadios avanzados, postulamos que las CD también ejercen una función relevante durante estadios tempranos de la fibrosis, y que su presencia podría ser capaz de modular el proceso angiogénico, dado que las mismas en el contexto del microambiente tumoral presentarían un fenotipo con actividad tolerogénica y moduladora de la angiogénesis.

3. Objetivo general.

Nos proponemos estudiar si la reducción de expresión de AH hepático mediante la administración de un inhibidor específico de AH (4MU) es capaz de afectar el proceso de generación del hepatocarcinoma en un hígado con fibrosis establecida. Se estudiarán los potenciales mecanismos de acción que puedan evitar el desarrollo

tumoral al inhibirse la expresión de AH. Entre tales mecanismos se evaluarán los relacionados con el proceso de angiogénesis y la modulación de la expresión de IL-6. Como *objetivo final* nos proponemos caracterizar la acción del 4MU en el tratamiento del HCC, para así avanzar en el desarrollo terapéutico preclínico y sentar las bases de un potencial desarrollo clínico en esta enfermedad.

En el presente estudio también evaluaremos el rol de las células dendríticas durante estadios tempranos de la fibrogénesis hepática *in vivo*, mediante la depleción de esta población celular, y su relación con el proceso de angiogénesis.

3.1 Objetivos específicos.

Parte I

- Caracterizar el microambiente que se genera en el hígado en un modelo murino de fibrosis hepática inducido por tioacetamida (TAA) y posterior desarrollo de HCC por implantación ortotópica de células de hepatocarcinoma (línea Hepa129). En particular, nos proponemos estudiar el impacto de la modulación de la matriz extracelular por medio de la inhibición de la síntesis de AH por 4MU durante la fibrosis hepática y luego de la implantación del tumor.
- Analizar el efecto biológico de la inhibición de la síntesis de AH por 4MU. Para ello se evaluará su impacto sobre el desarrollo de HCC y sobre la fibrosis hepática, y la influencia de esta droga sobre la proliferación, apoptosis y capacidad de síntesis de AH por células tumorales y estromales.
- Evaluar el efecto de 4MU sobre la función hepática y caracterizar su perfil de toxicidad.

Parte II

- Estudiar los mecanismos de acción de 4MU responsables de la inhibición del crecimiento tumoral, si lo hubiere, enfocando a la evaluación de:

- a) la modulación de la angiogénesis en los tumores de HCC y en su microambiente, tanto *in vivo* como *in vitro*.
- b) la modulación de expresión de IL-6 en los tumores de HCC y en su microambiente, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Parte III

- Examinar el rol de las células dendríticas en el microambiente del hígado fibrótico y su relación con el proceso angiogénico.

*Materiales
y métodos*

4. Materiales y métodos.

Parte I

4.1 Líneas celulares.

Se utilizaron las siguientes líneas celulares: línea de HCC de ratón Hepa129, cedida generosamente por el Dr. Schmitz, Medizinische Klinik I, Bonn, Alemania; líneas de HCC humano Hep3B y Huh7, provistas amablemente por el Prof. Jesús Prieto (CIMA, Universidad de Navarra, Pamplona, España); línea de CEH humanas LX2, provista amablemente por el Dr. Scott Friedman (Mount Sinai, School of Medicine, NY); línea de células endoteliales humanas HMEC-1, provistas por el CDC (Centers for Disease Control, Atlanta, USA); línea de CEH de rata CFSC-2G, cedidas por el Dr. Marcos Rojkind (Albert Einstein College of Medicine); línea de fibrosarcoma humano HT-1080, cedida generosamente por el Dr. Daniel Bonfil (Wayne State University, School of Medicine, Detroit, MI, USA); y línea de fibroblastos hepáticos de ratón IZA2.1, provistas por el Dr. Ignacio Melero (Universidad de Navarra, España). Las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM (GIBCO, Invitrogen) completo (2 μ mol/L glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 mg/ml estreptomina y 10% suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor), excepto por las células Hepa129 que se cultivaron con medio RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen) suplementadas con 2-Mercaptoetanol 55 μ M y CSF-2G con medio MEM (GIBCO, Invitrogen).

4.2 Reactivos.

- Preparación de la solución de 4-Metilumbeliferona (4MU)

La solución madre de 4MU sal de sodio (Sigma-Aldrich) se preparó disolviendo 50 mg de esta droga en 1 ml de medio Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, GIBCO), resuspendiendo repetidas veces.

- Preparación de la solución de ácido hialurónico de alto peso molecular (AH-APM).

El AH-APM recombinante (AH nativo), de 1.5-1.8x10⁶ Da, fue cedido amablemente por Farmatrade. Se preparó una solución madre de 5 mg/ml de AH-APM en solución

fisiológica estéril. Se resuspendió sucesivas veces y se agitó durante 1 hora a 37°C para su completa disolución.

4.3 Medios condicionados generados a partir de líneas celulares y de cultivos primarios.

Los cultivos primarios (células de Kupffer y hepatocitos) y los de líneas celulares (Hepa129, Hep3B, Huh7, HT-1080, HMEC-1, LX-2, CFSC-2G e IZA2.1) fueron cultivados hasta que alcanzaron un 90% de confluencia, fueron lavados con PBS 1X y cultivados durante 24 horas (ó 12 hs para ensayo de síntesis de AH con Hepa129), en DMEM completo sin SFB ó el medio de cultivo indicado en cada caso. Posteriormente se colectaron los sobrenadantes y se centrifugaron durante 30 minutos a 16000xg a fin de eliminar posibles restos celulares. Los sobrenadantes así generados fueron guardados hasta el momento de su utilización en freezer de -80°C.

4.4 Estudios *in vitro*

4.4.1 Análisis por citometría de flujo de la interacción CD44-AH y síntesis de AH en células tumorales.

Para determinar si las células de las líneas tumorales Hepa129, Hep3B y Huh7 unen AH por medio de su receptor CD44, 5×10^5 células fueron procesadas de la siguiente manera: las líneas Hep3B y Huh7, que crecen adheridas al plástico, fueron levantadas utilizando un raspador, para evitar el clivaje de receptores de superficie celular; no así las células Hepa129, que crecen en suspensión. Luego, se bloquearon los receptores Fc de las células con SFB 5% en solución seroalbúmina bovina (BSA) 1% en PBS durante 30 min, y se incubaron con AH acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC; del inglés, *fluorescein isothiocyanate*) (Calbiochem) diluido 2:100 en PBS durante 1 hora a 4°C en oscuridad. El control de especificidad de la unión se realizó en exceso de AH sin marcar. Para determinar si la unión del AH-FITC a las células estaba mediada por CD44, las células fueron pre-tratadas con anticuerpos monoclonales anti-CD44: CD44 anti-ratón KM81 1:100 para las células Hepa129, CD44-acoplado a ficoeritrina (PE) anti-humano 1:11 (Miltenyi-Lab Systems S.A.) para las células Hep3B y Huh7 o control de isotipo (BD Bioscience). Para establecer si estas

células sintetizaban AH, se utilizó la proteína de unión a AH conjugada a biotina (PUAHb, Calbiochem), se adicionó avidina-PE (BD Bioscience y se incubó durante 1 hora a 4°C en oscuridad. Finalmente, las células fueron fijadas con paraformaldehído 1% en PBS. El procesamiento se realizó en un citómetro de flujo (FACS Aria, Beckton Dickinson Immunocytometric Systems), y los datos fueron analizados utilizando el software WinMDI (The Scripps Research Intitute).

4.4.2 Ensayos de proliferación celular.

Se sembraron 5×10^5 células (Hepa129, Hep3B, Huh7, IZA2.1, LX2, CFSC-2G o HMEC-1) por pocillo, en una placa de 96 pocillos. Las células fueron tratadas con distintas concentraciones 4MU: 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1 y 5 mM, incluyendo además un control basal (solo medio de cultivo), durante 48 hs. Seis hs antes de finalizada esta incubación, se adicionó ^3H -Timidina 20Ci/mmol (PerkinElmer) y se cosechó la placa: las células se lisaron con NaOH 0,1 M/SDS 1%, se adicionó ácido tricloroacético 40% incubando a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 min. Luego, el lisado celular se colocó en discos de fibra de vidrio especiales para ^3H -Timidina, se lavó con ácido tricloroacético 10% y etanol 100%. Los discos fueron embebidos en líquido de centelleo, y el equipo contador de centelleo (β -counter, Beckman LS 6500) registró cuentas por minuto (CPM).

4.4.3 Ensayos de apoptosis celular.

Se utilizaron 5×10^5 células tratadas con las mismas concentraciones de 4MU utilizadas para el ensayo de proliferación celular. Las células tumorales, fibroblastos y CEH fueron incubadas durante 48 hs, mientras que los hepatocitos se cultivaron por 24 hs. Luego fueron resuspendidas en una mezcla de bromuro de etidio y naranja de acridina en partes iguales. Las células teñidas se observaron al microscopio de fluorescencia (E800, Nikon) y se contaron 100 células, discriminando entre apoptóticas, apoptóticas vivas, necróticas o viables por sus características distintivas: fragmentación del núcleo, aumento del citoplasma y condensación de la cromatina. El porcentaje de células apoptóticas fue calculado como:

$$\% \text{ de apoptosis} = N^\circ \text{ de núcleos apoptóticos} \times 100 / N^\circ \text{ de núcleos totales.}$$

Luego, el índice de apoptosis se calculó de la siguiente manera:

Indice de apoptosis= % apoptosis células con 4MU - % apoptosis células sin 4MU

4.4.4 Ensayo de citotoxicidad.

Para evaluar la toxicidad de 4MU sobre las células Hepa129 y sobre un cultivo primario de hepatocitos (ver sección 4.5.3) se empleó la técnica de liberación de LDH utilizando un kit comercial (Roche).

El porcentaje de toxicidad fue determinado utilizando la siguiente fórmula:

% citotoxicidad: [(abs 492 nm experimental -abs 492 nm mínima)/(abs 492 nm máxima - abs 492 nm mínima)]× 100

Donde:

abs 492 experimental= absorbancia a 492nm de las muestras (células + 4MU)

abs 492mínima= absorbancia a 492nm de células diana solas

abs 492 máxima= absorbancia a 492nm de células diana en presencia de buffer de lisis (Tritón 10%)

4.4.5 Ensayo de migración *in vitro*.

Para evaluar la capacidad migratoria de las células HMEC hacia medio condicionado de células Hep3B pre-tratadas con diferentes dosis de 4MU (0.06, 0.12, 0.25 y 0.5 mM) se realizaron ensayos de migración en cámaras de Boyden de 48 pocillos (Neuroprobe). En los pocillos inferiores se colocaron los distintos medios condicionados o DMEM como control, y sobre ellos se colocó una membrana de policarbonato (poro de 8 µm, Neuroprobe). Las células cultivadas previamente durante 18 hs en DMEM sin SFB se agregaron en los pocillos superiores (12x10³ células/pocillo). La cámara se incubó durante 4 hs a 37°C. Luego se desmontó la membrana y las células del lado superior fueron cuidadosamente removidas por medio de una cuchilla. Aquellas que migraron, ubicadas en el lado inferior de la membrana, fueron fijadas con formol 2% y luego de lavar con PBS, fueron teñidas con 4',6-diamidino-2

fenilindolehidrocloruro (DAPI, Sigma-Aldrich). Finalmente, el número de células que migraron se determinó por microscopía de fluorescencia (E800, Nikon) utilizando una magnificación de 100x. Las imágenes de tres campos representativos fueron capturadas y posteriormente analizadas utilizando el programa Cell Profiler (www.cellprofiler.com). Se calculó el número de células promedio por campo.

4.4.6 Ensayo de formación de tubos vasculares *in vitro*.

Para determinar la capacidad de formación de tubos vasculares de las células HMEC-1 estimuladas con medio condicionado de Hep3B pre-tratadas con 4MU, se sembraron 40 μ l de Matrigel Growth Factor Reduced (BD Bioscience) frío en pocillos de una placa de 96 pocillos. Se dejó solidificar incubando 30 minutos a 37°C, y se sembraron 2×10^4 células HMEC-1 pre-incubadas por 18 hs con DMEM sin SFB, en 90 μ l de medio DMEM sin SFB fresco. Las mismas fueron estimuladas con 10 μ l de medio condicionado de células Hep3B pre-tratadas durante 18 hs con distintas concentraciones de 4MU (0.06, 0.12, 0.25 y 0.5 mM) o sólo medio de cultivo a modo de control; y se incubó la placa durante 6 hs en estufa de cultivo. Como control positivo se utilizó VEGF recombinante humano (100 ng/ml, Calbiochem). Luego, se descartó el sobrenadante, y las células adheridas al Matrigel fueron fijadas y teñidas con una solución de Cristal Violeta en metanol. La cuantificación del área libre de células, indicativa del cambio de adhesión celular en monocapa hacia un patrón con forma tubular, se realizó tomando 3 imágenes por pocillo con una magnificación de 100 (E800, Nikon) que fueron procesadas mediante el programa ImageJ (National Institutes of Health). El porcentaje área libre de células por campo se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ área libre de células} = 100 - \% \text{ área positiva}$$

4.4.7 Zimografía en gelatina: detección de la actividad de metaloproteasas.

Para evaluar la inducción de actividad gelatinasa en los medios condicionados de las líneas humanas HMEC-1, Hep3B y LX2 pre-tratadas con 4MU, se sembraron 5×10^4 células en placas de 24 pocillos por 18 hs. Luego, se lavaron con PBS y incubaron con 4MU en dosis de 0.06, 0.12, 0.25 y 0.5 mM durante otras 18 hs. Se colectó el

sobrenadante y se determinó la actividad de MMP-9 y MMP-2 por zimografía. Se sembraron cantidades fijas de proteína total de los medios condicionados o sobrenadante de células HT-1080 (control positivo) y se corrieron en un gel SDS-PAGE 10% conteniendo 0.1% de gelatina (Sigma-Aldrich). El gel se tiñó luego con Coomassie Brilliant Blue R-250 por 30 min a TA. La actividad gelatinasa se visualizó por coloración negativa. Las imágenes se obtuvieron con cámara digital (Canon EOS 5D), y se analizaron por densitometría utilizando el software ImageJ. La actividad relativa de MMP se obtuvo por normalización a los valores de las muestras sin tratamiento (sólo DMEM).

4.5 Estudios *in vivo*

4.5.1 Modelo experimental.

Utilizamos ratones machos de la cepa C3H/HeJ de 6-8 semanas de edad, provenientes del Centro Atómico Ezeiza, Bs. As, Argentina. Los animales fueron mantenidos en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Biomédicas de la Universidad Austral, de acuerdo a las normativas establecidas por el “Comité de cuidado animal” de esta institución sobre el uso ético de animales.

La fibrosis se indujo mediante la administración de tioacetamida (TAA, Sigma-Aldrich) en dosis de 200 mg/kg en solución fisiológica estéril por vía intraperitoneal (i.p), 3 veces por semana, durante 42 días [149]. A los 30 días de tratamiento con TAA, se implantaron $1,25 \times 10^5$ células Hepa129 en el lóbulo izquierdo del hígado mediante inyección subcapsular para establecer los tumores ortotópicos [150]. Para realizar la cirugía, los animales fueron anestesiados con una mezcla de Midazolam 10%, Ketamina 12% y Fentanilo 5% en H₂O estéril. Los animales fueron tratados con una dosis diaria de 4MU (Sigma-Aldrich) (Grupo 4MU). A En la *Parte I*, 4MU comenzó a administrarse 2 días antes de la cirugía, en una dosis de 20 mg/kg por vía i.p. (**Figura 14**); en la *Parte II* se utilizó una dosis de 400 mg/kg, administrada con el agua de bebida, comenzando 5 días antes de la cirugía, hasta el final del experimento. Al día 12° post- operación se sacrificaron los animales. Se determinó el tamaño tumoral mediante medición con calibre, utilizando el siguiente cálculo, que corresponde al volumen de una zona esférica o semiesfera:

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = (\text{Diámetro mayor} \times (\text{diámetro menor})^2) \times \pi/6$$

Además, se contaron los nódulos satélites del tumor de HCC. Luego, para la recolección de suero, se realizó sangrado retro-orbital en tubos sin heparina, y se centrifugó a 0.8xg por 10 min a 4°C. Se separaron muestras de tumor y de parénquima hepático mediante un corte limpio con bisturí, y se conservaron para su posterior análisis, tal como se detalla en cada técnica.

Los grupos experimentales fueron los siguientes (n=10 animales/grupo):

- **Sanos**
- **TAA**; animales con fibrosis inducida por 6 semanas.
- **Salino**; animales con fibrosis y HCC tratados con vehículo de 4MU (medio HBSS)
- **4MU**; animales con fibrosis y HCC tratados con 4MU.

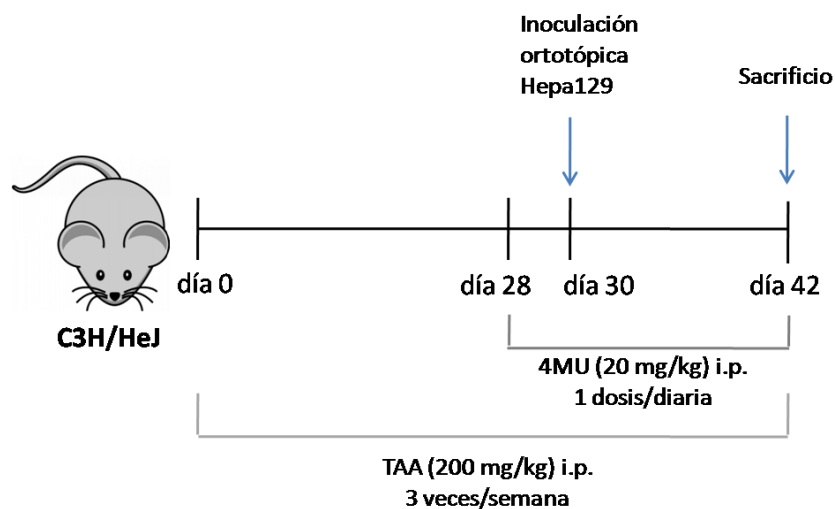


Figura 14. Diseño experimental Parte I.

4.5.2 Medición de enzimas indicadoras de daño hepático en suero.

Se midieron los niveles de las transaminasas ALT (alanina aminotransferasa) en el suero de los animales experimentales mediante el autoanalizador ARCHITECT (Abbott).

4.5.3 Cultivo primario de hepatocitos.

El cultivo primario de hepatocitos de ratón se obtuvo a través de perfusión hepática con colagenasa tipo IV (Sigma-Aldrich). Se canuló la vena porta hepática y se realizó una primera perfusión con 30 ml de solución de lavado filtrada 1:25 en H₂O destilada (H₂O_d) (NaCl 3.55 M, KCl 0.16 M, Hepes 0.24 M, 75 ml NaOH 1M en H₂O_d hasta volumen final 500 ml, con el agregado final de EDTA 0.4 mM). Luego de unos minutos de comenzado el lavado, se cortó la vena cava para drenar. A continuación se cerró la circulación de la vena cava, y se perfundió con 30 ml de solución de colagenasa filtrada 1:10 en H₂O_d (NaCl 0.68 M, KCl 0.06 M, Hepes 1M, 66 ml NaOH 1M y CaCl₂.H₂O 55 mM en 100 ml de H₂O_d, luego se agregó seroalbúmina bovina (BSA) 1% y 0.018% colagenasa) y mantenida a 37°C durante el procedimiento. Al comenzar la perfusión se cerró la circulación de la vena suprahepática, confinando así el circuito de circulación al hígado solamente. Posteriormente, se extrajo el hígado y se disgregó manteniendo en solución 1% BSA. La solución se filtró utilizando una malla de 40 µm y se centrifugó a 400xg por 2 min a 4°C. Los hepatocitos, obtenidos del precipitado resultante, fueron mantenidos en medio 70% DMEM–30% F12 con 10% SFB, 8.5 ng/ml de toxina colérica, 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico y 0.8 µg/ml de hidrocortisona [151].

4.5.4 Cultivo primario de células de Kupffer.

Las células de Kupffer fueron extraídas del hígado de los animales experimentales según se describió previamente por Smedsrød B. [152]. En primer lugar se realizó perfusión del hígado con colagenasa IV, tal como se describió para el cultivo primario de hepatocitos. Luego de decantar los hepatocitos, la suspensión se centrifugó a 300xg por 10 min. a 4°C. El pellet resultante fue resuspendido en 2 ml de medio RPMI, los cuales fueron mezclados con 8 ml de una solución de Histodenz (Sigma-Aldrich) al 30% en PBS, en un tubo Falcon de 15 ml. A continuación, se agregaron suavemente 2 ml de medio RPMI, sobre las paredes del tubo, y la suspensión se centrifugó a 1500xg durante 20 min a 4°C sin freno. Como consecuencia, se formó un gradiente de densidades, en el cual se generó una banda blanca entre 2

fases, conteniendo la fracción de células no parenquimatosas. La misma fue extraída y lavada con medio RPMI, centrifugando a 800xg por 10 min. El pellet obtenido a partir de 1 hígado fue resuspendido en 1 ml de medio RPMI y plaqueado sobre 2 pocillos de una placa de 24 pocillos. Se incubó en estufa de cultivo durante 10 minutos, y luego se descartó el medio y se lavó con solución fisiológica, permaneciendo adheridos los macrófagos. Para confirmar que se trataba de macrófagos, se realizó una inmunomarcación con un anticuerpo anti-F4/80 (Abcam) al 1%, incubando durante 45 min en frío. Se lavó con BSA 1% en PBS, y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a FITC (Vector Laboratories, Inc.). Luego se observó al microscopio de fluorescencia (E800, Nikon). El medio condicionado a partir del cual se cuantificó los niveles de IL-6 fue generado incubando las células de Kupffer con 350 µl de medio RPMI suplementado con 10% SFB durante 24 hs.

4.5.6 Análisis histopatológico. Tinciones.

Los hígados extraídos de los animales experimentales fueron fijados en formol 10% durante 2 días. Luego, fueron deshidratados mediante pasajes sucesivos en alcohol 70% y 90%, durante 2 hs cada uno, y luego se mantuvieron en alcohol absoluto durante toda la noche. A continuación, se realizaron 3 pasajes por xilol de 1 hora cada uno, y se embebieron en parafina líquida a 60°C realizando 2 pasajes de 1 hora cada uno. Luego, los tacos de parafina fueron cortados con micrótomo en secciones de 5 µm, y se realizaron las siguientes tinciones:

- **Hematoxilina & Eosina (H&E):** Se desparafinizó el tejido mediante dos pasajes en xilol y se hidrató en agua. Se incubó con una solución de hematoxilina por 15 minutos. Se lavó con agua corriente. Para rehidratar el tejido se incubó 1 minuto en etanol 100%, 1 minuto en etanol 96%, 1 minuto en etanol 70% y 1 minuto en agua. Se realizó una contra-tinción con solución de eosina alcohólica durante 2 minutos. Se eliminaron los restos de eosina con etanol 70%. Se incubó en etanol 100% por 2 minutos. Se aclaró en xilol y montó con bálsamo de Canadá (Biopack).

- **Tricrómico de Masson:** La coloración de fibras de colágeno se realizó con un kit comercial (Biopur), siguiendo las instrucciones del fabricante. Mediante esta tinción se

estableció histológicamente el grado de fibrosis, según el índice de Metavir (**Tabla 1**) [153]. El análisis se realizó de manera ciega por un patólogo.

Índice de Fibrosis	Descripción
F0	Sin fibrosis
F1	Fibrosis portal sin septos
F2	Fibrosis portal con algunos septos
F3	Numerosos septos (puentes) sin cirrosis
F4	Cirrosis

Tabla 1. Índice de Metavir para evaluar grado de fibrosis hepática.

- **Rojo Sirio:** Brevemente, se desparafinizó el tejido mediante dos pasajes en xilol. Se incubó durante 1 hora con solución de rojo sirio: Direct Red 80 0,1 % m/v; Sigma-Aldrich en ácido pícrico saturado. Se lavó dos veces en ácido acético glacial al 0,005% en H₂O. Se deshidrató mediante dos pasajes de 30 segundos en etanol 100%. Se aclaró en xilol y se montó con bálsamo de Canadá. Esta tinción también fue empleada para marcar fibras de colágeno y para establecer el grado de fibrosis mediante la escala de Metavir.

4.5.7 Cuantificación de área positiva en tinciones e inmunomarcaciones.

Para cuantificar el área positiva, se tomaron 50 imágenes por sección a una magnificación de 200X, utilizando un microscopio E800, Nikon asociado a una cámara digital y se obtuvo el valor promedio de área marcada a partir de cada sección utilizando el software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>; National Institutes of Health).

4.5.8 Tinciones histoquímicas e inmunomarcaciones.

4.5.8.1 Tinción histoquímica para la detección de AH.

Se analizó el nivel de expresión de AH en tejido hepático por tinción histoquímica utilizando la PUAHb (Calbiochem). Los hígados embebidos en parafina fueron cortados en secciones de 5µm y montados sobre vidrios con carga positiva (Patho-Lab), luego fueron desparafinados en xilol y rehidratados mediante pasajes por alcoholes de porcentaje decreciente, hasta PBS. A continuación se bloqueó la peroxidasa endógena mediante incubación con H₂O₂ 3% en etanol durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). El control negativo se incubó con 100 U/ml de hyaluronidasa (*Streptomyces Hyaluronidase*, Calbiochem). A continuación se bloqueó la avidina y biotina endógena (Blocking Kit, Vector Laboratories, Inc.) mediante incubaciones de 20 min cada una a TA, realizando 3 lavados con PBS entre cada una de ellas. El bloqueo de proteínas se realizó incubando con una solución de BSA 5 µg/ml durante 30 min a TA. Luego se trataron las muestras con 50 µl de PUAHb 5 µg/ml en BSA 1%/PBS durante toda la noche a 4°C. Se reveló con un conjugado enzimático avidina-peroxidasa (Extravidin-peroxidase, Sigma-Aldrich) diluido 1:10 en PBS. El revelado final se realizó en una mezcla de Diaminobenzidina (DAB) 0,1% en H₂O_d con una solución de sulfato de Amonio-Níquel 5%, CINH₄ 0.08% y glucosa 0.4% en acetato de sodio 0.2 M.

4.5.8.2 Inmunohistoquímica para Actina de músculo liso (α-SMA).

Brevemente, secciones de hígado embebido en parafina fueron cortados en secciones de 5 µm de espesor y rehidratadas en pasajes en alcoholes de porcentajes decrecientes y luego se lavaron en PBS. La recuperación antigénica se realizó incubando las secciones en buffer citrato pH 6, y calentando en microondas sucesivas veces a potencia máxima, durante 4 min, 2 min y 1min, dejando reposar 10 minutos entre cada vez. Luego de realizar un lavado con agua corriente, las secciones fueron incubadas con 3% de H₂O₂ en metanol durante 30 min a TA, para el bloqueo de peroxidasa endógena. A continuación se bloqueó la avidina y biotina endógena (Blocking Kit, Vector Laboratories, Inc.) mediante incubaciones de 20 min cada una a TA, realizando 3 lavados con PBS entre cada una de ellas. Posteriormente, se bloquearon las proteínas incubando con una solución BSA 1% durante 10 min a TA. Las secciones fueron luego incubadas con el anticuerpo policlonal anti- α-SMA (Abcam) diluido 1:10 en BSA0.2%/Triton X-100 0.1% en PBS durante toda la noche a 4°C. Luego de realizar 3 lavados en PBS, se incubó con un anticuerpo secundario anti-conejo

biotinilado (Vector Laboratories, Inc.) 1:100 en BSA 0.2%/PBS a TA durante 1 h. Se realizaron 3 lavados en PBS. La señal fue detectada tal como se describió para la tinción para AH. La cuantificación de la marca positiva se realizó tal como se describió para la tinción con Rojo Sirio.

4.5.8.3 Inmunomarcación de CD31 para detección de células endoteliales vasculares.

Brevemente, secciones de hígado embebido en parafina fueron cortados en secciones de 5 μm de espesor y rehidratadas en pasajes en alcoholes de porcentajes decrecientes. La recuperación antigénica se realizó incubando durante 20 min con 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Proteinasa K (Sigma-Aldrich) a TA en una cámara húmeda. Luego de realizar un lavado con agua corriente, las secciones fueron incubadas con 3% de H_2O_2 en agua destilada durante 30 min a TA, para el bloqueo de peroxidasa endógena. A continuación se bloqueó la avidina y biotina endógena (Vector Laboratories, Inc.) mediante incubaciones de 20 min cada una a TA, realizando 3 lavados con PBS entre cada una de ellas. Posteriormente, se bloquearon las proteínas incubando con una solución BSA 2.5%/PBS/Tween0.1% durante 10 min a TA. Las secciones fueron luego incubadas toda la noche a 4°C con un anticuerpo monoclonal anti-CD31 hecho en rata (Abcam) en una dilución 1:100 en PBS. El control negativo se realizó sin el anticuerpo primario. Se realizaron 3 lavados con PBS y se incubó con un anticuerpo secundario biotinilado anti-rata (Vector Laboratories, Inc) diluido 1:100 en 0.2% BSA/PBS durante 1 hora a TA. La señal fue detectada mediante el revelado descrito en las anteriores inmunomarcaciones. El análisis densitométrico se realizó tomando 10 imágenes por sección de hígado a 400x (Nikon Eclipse E800), y el área positiva fue calculada empleando el programa ImageJ (National Institutes of Health).

4.5.8.4 Inmunomarcación para VEGF.

Se realizaron cortes de hígado de 8 μm de espesor con criostato, a partir de tacos preparados en medio de montaje apropiado para su conservación a -80°C (Cryoplast, Biopack). Las criosecciones fueron fijadas en acetona durante 10 min a -20°C. Luego de 3 lavados sucesivos en PBS, las mismas fueron deshidratadas en pasajes por alcoholes de porcentaje creciente, hasta xilol, y luego rehidratadas en orden inverso hasta PBS. Luego, se bloqueó la peroxidasa endógena con 3% de H_2O_2 en metanol durante 30 min

a TA. Se lavó con PBS y se bloqueó la avidina y biotina endógena mediante Blocking Kit (Vector Laboratories, Inc), incubando durante 20 min a TA, y realizando 3 lavados en PBS entre cada una de las incubaciones. Luego se bloquearon las proteínas mediante incubación con una solución BSA 1% en PBS, y se incubó con el anticuerpo primario anti-VEGF (Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:100 en BSA 1%/ PBS/0.1% Tritón durante toda la noche a 4°C. El control negativo se realizó sin el anticuerpo primario. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS y se incubó con un anticuerpo secundario biotinilado (Vector Laboratories, Inc) diluido 1:400 durante 2 hs a TA. El sistema de revelado se realizó de igual manera que las otras inmunomarcaciones. Se realizó una contracoloración con una solución de H&E (Biopur).

4.5.9 Preparación de homogenatos de tejido hepático para su análisis por ensayos inmunoenzimáticos (ELISA).

- Para detectar citoquinas o proteínas mediante kits de ELISA comerciales, se prepararon extractos citoplasmáticos de tejido hepático de la siguiente manera: el tejido se homogeneizó mecánicamente con Ultra-Turrax (Ika) en buffer lisis con inhibidor de proteasas (Tris-HCl pH 7.4 50 mM, Tween 20 0.1%, NaCl 150 mM, Leupeptina (Sigma-Aldrich) 5µg/ml, Aprotinina (Sigma-Aldrich) 20 µg/ml y fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 1 mM. La suspensión se centrifugó 2 veces a 10000xg durante 20 min, a 4°C. Luego de cada centrifugación se colectó el sobrenadante, que se conservó a -80°C hasta su uso.
- Para detectar la producción de AH mediante un ensayo tipo ELISA, se aisló la fracción de GAG a partir de tejido hepático de la siguiente manera: el tejido se cortó en pequeños trozos con tijera y se homogeneizó mecánicamente con 300 µl de buffer de acetato de amonio 100 mM pH 7.0 conteniendo 20 U/ml de Pronasa (Sigma-Aldrich). Luego, se incubó durante toda la noche a 60°C y posteriormente se inactivó la enzima por calentamiento a 95°C durante 5 min. La suspensión se centrifugó a 10000xg durante 10 min a 4°C, se tomó el sobrenadante conteniendo GAG, los cuales fueron precipitados adicionando 1200 µl de etanol 96%, y se conservó toda la noche a -20°C. Luego, se centrifugó

a 11000xg durante 15 min a 4°C, conservando el pellet con GAG, el cual se dejó secar y finalmente se resuspendió en PBS 1X [154].

4.5.10 Preparación de medio condicionado de Hepa129 para cuantificación de IL-6

Para cuantificar los niveles de IL-6 producidos por las células Hepa129, se incubaron 5×10^5 células/pocillo en una placa de 24 pocillos, y se incubaron durante 20 hs con diferentes concentraciones de 4MU preparadas en medio RPMI: 0, 0.06, 0.12, 0.25 y 0.5 mM. Luego, se realizó un lavado con solución fisiológica, y una parte de las células fueron incubadas con 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de AH APM durante 20 hs más, en un volumen final de 500 μl . Las células que no fueron incubadas con AH, se mantuvieron con medio de cultivo. Finalmente, se separó el medio condicionado mediante centrifugación de la suspensión celular a 350xg durante 5 min, el cual se utilizó para cuantificar los niveles de IL-6 por ELISA.

4.5.11 Ensayos inmunoenzimáticos .

Las muestras de suero, extractos citoplasmáticos de hígado o medios condicionados fueron analizados mediante ensayos de ELISA competitivos. Los niveles de VEGF-a se detectaron mediante el kit VEGF DuoSet para ratón (R&D Systems), y los de IL-6 fueron determinados usando OptEIA™ Set Mouse IL-6 (BD Bioscience). En ambos casos el procedimiento se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de los extractos citoplasmáticos de hígado, los niveles de proteína a analizar fueron relativizados a la cantidad total de proteína, cuantificada por Bradford.

4.5.11.1 Ensayo tipo ELISA competitivo para detección de AH en medio condicionado de células, suero, o extracto de GAG a partir de tejido hepático tumoral y no tumoral.

Se cubrieron los pocillos de una placa de alta capacidad de unión (Nunc) con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de AH APM y se incubó durante toda la noche a 4°C. Se realizaron lavados con 0,05% Tween20/PBS. Luego se bloqueó con BSA3%/Tween20 0,05%/PBS, incubando 1 hora a 37°C. Por otro lado se incubaron las muestras de medio condicionado de células, suero (1:20), extracto de GAG de tejido hepático (1:500) o estándares de AH

con PUAHb (Calbiochem) durante toda la noche a 37°C, disueltos en BSA 0,3%/Tween20 0,05%/PBS. En este ensayo se utiliza esta proteína de unión debido a que no existen anticuerpos dirigidos contra AH, por su falta de inmunogenicidad. Luego se incubaron las muestras o estándares con PUAHb en la placa durante 4 horas a 37°C. Se lavó y se incubó con Avidina-peroxidasa (Sigma) 1:200 en BSA 0,3%/Tween20 0,05%/PBS durante 40 min. a 37°C. Se lavó nuevamente, se agregó solución de tetrametilbenzimidina (TMB, BD Bioscience) y se observó la aparición de color dentro de los 20 min de incubación. La reacción se detuvo con H₂SO₄ y se leyó la absorbancia a 450 nm. Luego, a partir de la curva estándar de AH se extrapolaron los valores de absorbancia de las muestras, mediante una curva de tipo sigmoidea dosis-respuesta, obteniendo así los valores de concentración de AH.

4.5.12 Análisis de la expresión del ARNm mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

4.5.12.1 Retro transcripción de ARN.

El ARN total de tumor, parénquima hepático o células fue extraído mediante TRIzol Reagent (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, en primer lugar el ARN total (2 µg) fue tratado con ADNasa I (Thermo Scientific). En un volumen final de 10 µl se incubaron 2 µg de ARN, solución buffer de ADNasa 1X y ADNasa I (2U) durante 30 minutos a 37°C. Luego de agregar 0,5 µl de EDTA 25 mM se inactivó durante 10 min a 65°C. Se realizó la transcripción reversa utilizando el sistema *First Strand cDNA Synthesis* (ThermoScientific) según instrucciones del fabricante. Brevemente se incubó el ARN obtenido, cebador oligo-dT, 1mM de dATP, dGTP, dCTP y dTTP durante 5 minutos a 65°C. Posteriormente se colocaron las muestras en hielo y se agregó solución buffer 5X, inhibidor de ARNasa RiboLock y 40U de la retrotranscriptasa M-MuLV. Se incubó 1 hora a 37°C y 5 minutos a 70°C.

4.5.12.2 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Luego, se estudió la expresión de diversos genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qPCR; del inglés, *quantitative polymerase chain reaction*), utilizando los cebadores específicos (**Tabla 2**). En todos los casos se

utilizó la enzima Taq platinum (Invitrogen), dNTPS (0,2 mM), cebadores (0,4 μ M), y el colorante SYBR Green (1,96 μ M) para realizar la qPCR en un termociclador Stratagene Mx3005p (Stratagene).

GEN	SECUENCIA SENTIDO (5'-3')	SECUENCIA ANTISENTIDO (5'-3')
GAPDH	CATCTCTGCCCCCTCTGCTG	GCCTGCTTCACCACCTTCTTG
IL-6	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	TCCACGATTTCCAGAGAAC
SDF-1α	GAGAGCCACATCGCCAGAG	TTTCGGGTCAATGCACACTTG
VEGF	GTGCACTGGACCCTGGCTTTA	GGTCTCAATCGGACGGCAGTA

Tabla 2. Secuencias de cebadores empleados.

Por último la reacción se incubó 10 minutos a 95°C seguida de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C; finalmente se realizó un ciclo de extensión de 10 minutos a 72°C. Al terminar la reacción de PCR se aumentó la temperatura de forma gradual (2°C) desde 60°C hasta 95°C y se midió fluorescencia cada 15 segundos a fin de construir una curva de disociación para cada producto. El gen codificante de GAPDH fue utilizado como control de carga y amplificación, por lo que los niveles de expresión fueron normalizados al mismo. Para el análisis de los datos obtenidos se aplicó el método de $\Delta\Delta$ Ct (ddCt), según el cual los niveles de expresión se determinan en relación al nivel de expresión en las células control. Los ensayos se realizaron por triplicado.

4.5.13 Análisis del peso molecular de AH.

Para el análisis del PM de AH, se aislaron los GAG como se describió anteriormente (ver sección 4.5.9). Los mismos fueron luego derivatizados con AMAC, tal como se describió por Calabro *et. al* [155]. La separación de GAG se realizó mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC; del inglés, *Fast Protein Liquid Chromatography*) (AKTA Amersham Pharmacia Biotech). La cromatografía en gel se realizó utilizando una columna SuperdexTM 200 HR 10/30 a TA. El buffer utilizado

fue acetato de amonio 0.1 M, pH 7.0, con Tween20 0.05%, y la tasa de flujo empleada fue de 0.35 ml/min. Los picos de elución de la muestra fueron monitoreados siguiendo la absorbancia a 280 nM del AMAC. Los picos fueron colectados en fracciones de 2 ml, las cuales fueron liofilizadas, luego resuspendidas en 100 µl de acetato de amonio 0.1 M pH 7.0 y precipitadas con 9 volúmenes de etanol 96% a -20°C durante toda la noche. Posteriormente, se centrifugaron a 10000xg durante 45 min a 4°C, los pellets se dejaron secar para luego ser resuspendidos en 100 µl de acetato de amonio 0.1 M pH 7.0, y digeridos con 100 mU/ml de hialuronidasa (Calbiochem) y 100 mU/ml de condroitinasa ABC (Seikagaku) a 37° durante 3 hs. Los disacáridos insaturados obtenidos fueron luego derivatizados mediante AMAC y analizadas por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC; del inglés *high performance liquid chromatography*) [155, 156] para identificar las fracciones que contenían AH.

4.6 Análisis Estadístico.

Los intervalos de confianza de 95% se determinaron a través del cálculo de los valores promedio aritméticos y la varianza.

Para evaluar si la diferencia entre los valores obtenidos con los distintos tratamientos fueron significativas, se utilizó el test de Student (T-test, Mann-Whitney) en el caso de comparaciones entre dos grupos. El análisis de la varianza (ANOVA, Kruskal-Wallis) también fue utilizado para evaluar las diferencias entre valores de más de dos grupos experimentales. Se utilizó el programa Prism (Graph Pad, San Diego, CA, USA) y se consideró un $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. Todos los datos corresponden a promedios aritméticos con error estándar de la media (ESM).

Parte III

4.7 Modelo de fibrosis hepática.

Utilizamos ratones machos C57BL/6 CD11c.DTR de 7-8 semanas de edad, los cuales expresan el receptor de la toxina diftérica bajo el control del promotor CD11, tal como se describió por Jung *et. al* [157]. Los mismos fueron obtenidos de Jaxmice (Alemania), y fueron inyectados intraperitonealmente (i.p.) con TAA (Sigma Aldrich) en una dosis de 0.2 mg/g de peso corporal, o solución salina utilizada como control, 3

veces/semana durante un período de 4 semanas. Utilizamos también un segundo modelo de fibrosis inducido por tetracloruro de carbono (CCl₄) [158]. En este caso, los ratones fueron inyectados i.p. 2 veces/semana con 0.75 ml CCl₄/kg de peso corporal (en solución 2:5 volúmen en volumen en aceite mineral) por 4 semanas.

Los procedimientos con animales fueron aprobados por la autoridad estatal de Uso de Animales para Investigación y Educación y llevados a cabo de acuerdo a las directrices de cuidados y usos de animales de laboratorio para investigación promulgadas por la Universidad de Berlín.

Fracciones de los hígados de los animales fueron congelados rápidamente en nitrógeno líquido, embebidos en un compuesto óptimo para cortes en temperatura, y guardados a -80°C hasta su uso, o fijados en Formol 10% en PBS. Los sueros fueron obtenidos a partir de sangrado retro-orbital y conservados a -80°C hasta su análisis.

4.7.1 Expansión y depleción de células dendríticas.

Para expandir las CD en estadios tempranos de fibrosis, los ratones (n=5-7) fueron tratados con una inyección diaria i.p. de Flt-3L (del inglés, FMS-like tyrosine kinase 3 ligand) recombinante humana (500 ng/g de peso corporal, en PBS, BioxCell) por 7 días consecutivos durante la tercer semana de administración de TAA. Para la depleción de CD, los ratones CD11c.DTR fueron inyectados con una única dosis de toxina diftérica (TD, 4 ng/g de peso corporal en PBS) durante la tercer semana de la fibrosis inducida por TAA o CCl₄ (Figura 15).

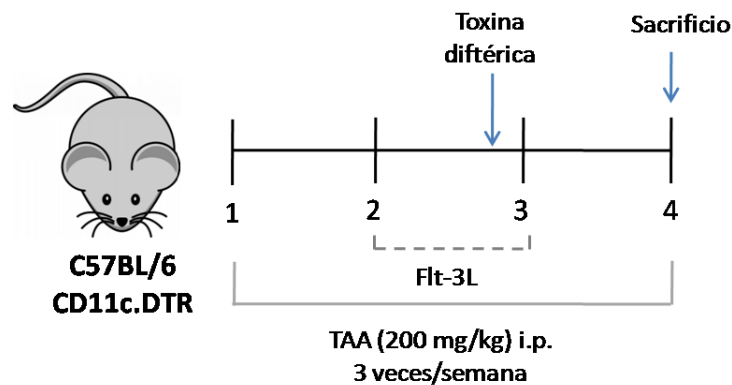


Figura 15. Diseño experimental Parte III.

4.8 Tratamiento con quimera de receptor 1 de VEGF (Flt-1s/Fc).

Los animales con CD depletadas fueron inyectados con una única dosis de Flt-1s/Fc (130 pg/día, R&D Systems) por vía intravenosa (i.v.), durante 7 días consecutivos, comenzando en la tercer semana de tratamiento con TAA.

4.9 Determinación de niveles séricos de VEGF, Flt-1s y Endoglina por ELISA.

Las muestras de suero fueron analizadas mediante ELISA competitivo utilizando kits comerciales de R&D Systems, para cuantificar VEGF (Duoset mouse VEGF) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de los niveles de Flt-1 en suero se realizó utilizando Mouse Flt-1 Quantikine Immunoassay (R&D Systems), según las indicaciones del fabricante. Los niveles de endoglina en suero fueron determinados utilizando Endoglin/CD105 DuoSet para ratón de R&D Systems, siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.10 Determinación de citoquinas por arreglo de esferas para citometría (CBA, del inglés, Cytometric Bead Arrays).

Se analizaron los niveles de citoquinas en suero utilizando CBA. Se detectaron simultáneamente TNF- α , IL-6, MCP-1 e IL-10 utilizando el kit CBA (BD Bioscience). Se mezclaron 50 μ l de cada muestra con 50 μ l de una suspensión de esferas capturadas y 50 μ l de reactivo de detección con ficoeritrina (PE), que consiste en anticuerpos anti-ratón contra TNF- α , IL-6, MCP-1 e IL-10 conjugados a PE. Las muestras fueron incubadas a TA por 2 hs en oscuridad. Luego de la incubación con el reactivo de detección, las mezclas fueron lavadas y resuspendidas en 300 μ l de solución de lavado previo a la adquisición de datos con el citómetro FACSCalibur (Becton-Dickinson). Los datos fueron analizados con el programa para arreglos FCAP (BD Bioscience).

4.11 Arreglo de proteínas angiogénicas.

El perfil de la expresión de proteínas relacionadas con la angiogénesis en los hígados de los ratones con CD depletadas o sólo TAA fue analizado usando Proteome ProfilerTM de R&D Systems, siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.12 Aislamiento de ARN y análisis de PCR cuantitativa.

El ARN total fue extraído de tejido hepático utilizando el kit Nucleospin (Macherey–Nagel). Luego de digerir con ADNasa (Invitrogen), se generó ADNc por retrotranscripción utilizando cebadores aleatorios (Invitrogen). La reacción de PCR en tiempo real se realizó empleando el sistema TaqMan 7500 (Applied Biosystems). Para cada reacción, se utilizó 1 µl de ADNc, sintetizado a partir de 1 µg de ARN en 25 µl, en un volumen total de 11 µl conteniendo 6.25 µl de mezcla Power SYBR Green PCR (Applied Biosystems), 3.75 µl de agua DEPC y 450 nM de los correspondientes cebadores sentido y antisentido (SDF-1 y GAPDH, ver Materiales y métodos *Parte II*).

4.13 Análisis histológicos.

Las muestras de hígado embebidas en parafina fueron cortadas en secciones de 4 µm de espesor y teñidas con H&E, Tricrómico de Masson y Rojo Sirio, tal como se describió previamente. Los análisis se realizaron en forma ciega.

4.14 Determinación de enzimas hepáticas.

Los niveles de enzimas aspartato aminotransferasa (AST), ALT y fosfatasa alcalina (FAL) fueron determinados en muestras de suero obtenidas antes y después de la depleción de CD durante el tratamiento con TAA. Las muestras de suero de los animales fueron analizadas mediante el auto-analizador HITACHI (Roche) equipado con el programa Cobas 800.

4.15 Análisis por inmunofluorescencia.

Crio-secciones de hígado de 8 µm fueron fijadas en acetona durante 10 min a -20°C. Luego de realizar 3 lavados con PBS, las secciones fueron incubadas con diferentes anticuerpos primarios: anti-αSMA (Sigma Aldrich), anti-endoglinina (Santa Cruz Biotechnology) o anti-VCAM (BD Bioscience), durante toda la noche. Se realizaron 3 lavados en PBS, y en todos los casos se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a rodamina (Jackson Immuno-Research), seguido por tinción con DAPI. Las inmunomarcaciones se analizaron utilizando un microscopio confocal (cLSM 510, Carl Zeiss).

4.16 Separación de suspensión de células no parenquimatosas.

Las CD fueron aisladas del hígado de la siguiente manera: los hígados se cortaron en pequeñas partes y se incubaron con una solución con colagenasa IV (Sigma-Aldrich) 0,5 mg/ml en medio HBSS sin $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$, con 10% de SFB, durante 45 minutos a 37°C y agitación intermitente. Luego, la pasta obtenida se disgregó utilizando el émbolo de una jeringa sobre una malla con poros de 70 μm , y se resuspendió en medio HBSS sin $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$. Se realizó una centrifugación suave a 100xg durante 2 min para decantar los hepatocitos, y a continuación una centrifugación del sobrenadante obtenido a 800xg durante 10 min a 4°C. De esta manera, se obtuvo una suspensión conteniendo mayormente células no parenquimatosas hepáticas, a partir de la cual se realizó luego una marcación con anticuerpos específicos para CD.

4.17 Análisis por citometría de flujo de CD hepáticas.

Las CD aisladas de hígado (CDh) fueron resuspendidas en una solución BSA 1% en PBS y pre-incubadas con 1% del anticuerpo monoclonal CD16/CD32 y 10% de suero de ratón para evitar unión inespecífica a receptores Fc. Luego las CDh fueron incubadas por 30 min a 4°C con los siguientes anticuerpos: CD11c anti-ratón conjugado con FITC (BD Biosciences), IAb anti-ratón acoplado a PE (BD Biosciences) y CD86 anti-ratón acoplado a peridina clorofila (PerCP) (BD Biosciences). Luego de realizar 2 lavados con solución BSA 1% en PBS, se adquirieron los datos mediante el sistema FACSCalibur (BD Biosciences). La información obtenida fue analizada utilizando el programa FlowJo.

Resultados

5. Resultados.

Parte I

5.1 Producción de AH y capacidad de unión por las células de hepatocarcinoma.

Dado que uno de los primeros objetivos del trabajo de tesis fue evaluar el comportamiento de las células tumorales Hepa129 frente a la modulación de la expresión de AH, y que no se contaba con antecedentes previos, se evaluó en las mismas la expresión de AH, de su principal receptor CD44 y la capacidad de unión a AH por medio de CD44. Para ello, se realizaron ensayos de citometría de flujo de las células tumorales, y se observó que las mismas expresaban el receptor CD44 (60,3%) y se unían a AH (59,2%) (**Figura 16A**). A su vez, observamos que esa unión se establecía en parte a través de CD44, dado que el bloqueo de este receptor mediante un pretratamiento con un anticuerpo monoclonal que bloquea el sitio de unión de AH a CD44 (KM81), neutralizó parcialmente esa unión, que se tradujo en una disminución de la señal de 59.2% a 45.4% (**Figura 16A**). Esto indica que indica que otros receptores estarían involucrados en la capacidad de estas células de unir AH, pero los mismos no fueron estudiados en este trabajo.

Además, observamos que las células Hepa129 secretan elevadas cantidades de AH, tal como se evidenció por citometría de flujo (72.8%, **Figura 16A**). La detección de AH en la superficie celular es posible dado que durante su secreción se mantiene unido a la membrana plasmática. Por otro lado, cuantificamos los niveles de expresión en el sobrenadante de cultivo mediante un ensayo tipo ELISA, siendo la cuantificación de AH de 1940 ± 90 ng/ml/24 h (**Figura 16B**).

Estos parámetros también se analizaron en las líneas celulares humanas de HCC Hep3B y Huh7 y observamos que las mismas no expresan CD44 y que producen una menor cantidad de AH en comparación con la línea murina Hepa129 (17.7% y 2.4%, respectivamente); tal como se detectó mediante citometría de flujo (**Figura 16A**) y por ensayo tipo ELISA (1450 ± 60 y 500 ± 200 ng/ml/24 h, respectivamente; **Figura 16B**).

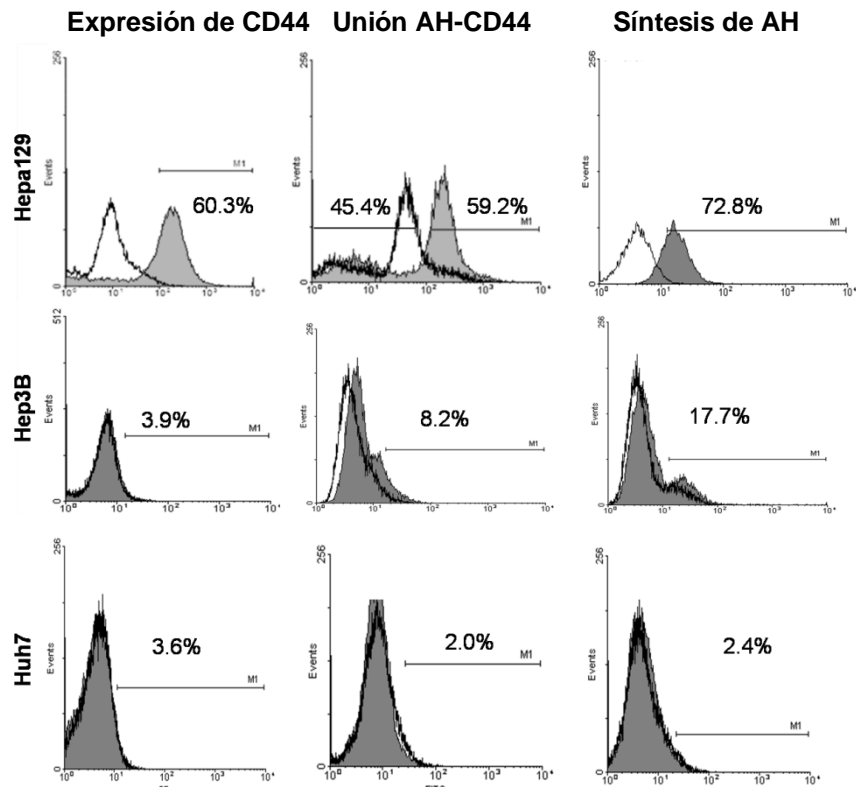
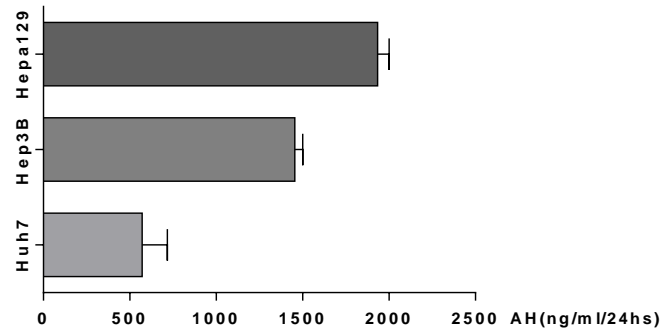
A**B**

Figura 16. Unión y producción de AH por líneas celulares de HCC. (A) Expresión de CD44 (sombra gris) por Hepa129, Hep3B y Huh7, y su respectivo control de isotipo (línea negra). AH se une a través de CD44 (sombra gris); la línea negra representa el desplazamiento por un anti-CD44 (KM81). **(B)** Medición de niveles de AH mediante un ensayo tipo ELISA. Los valores se expresan como promedio de tres experimentos \pm ESM.

5.2 Evaluación de los efectos del tratamiento *in vitro* con 4MU sobre la proliferación, apoptosis y producción de AH en líneas celulares de hepatocarcinoma.

Con el fin de evaluar si la inhibición de AH por el tratamiento con 4MU ejercía algún efecto sobre el crecimiento de las células de HCC, se realizaron ensayos de proliferación *in vitro* mediante marcación con timidina tritiada.

Las líneas Hepa129 y Hep3B mostraron inhibición de la proliferación de manera dosis-dependiente. La proliferación de estas dos líneas celulares se redujo significativamente con la dosis de 0.5 mM de 4MU. Sin embargo, en la línea Huh7 la proliferación se inhibió empleando dosis mayores de 4MU (5 mM) (90% vs control; **Figura 17A**).

Posteriormente, evaluamos si la inhibición de la proliferación celular obtenida mediante la aplicación de 4MU se debía a una inducción de la apoptosis. Observamos, mediante tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio, la presencia de cambios celulares indicadores de inducción de apoptosis. Con esta técnica se evidenció que 4MU fue capaz de inducir significativamente la apoptosis en la dosis de 5 mM (52% para Hepa129 y 49% para Huh7 vs. control basal, respectivamente; **Figura 17B**), mientras que las células Huh7 fueron resistentes a la apoptosis en todas las dosis estudiadas (**Figura 17B**).

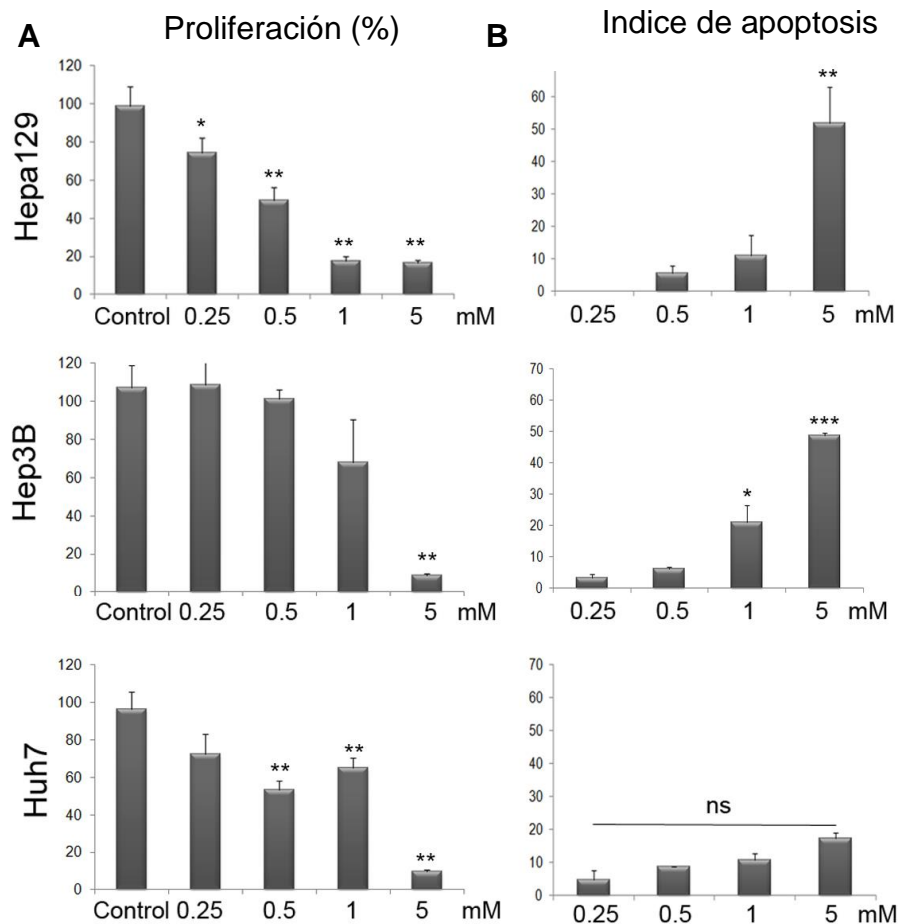


Figura 17. Efectos de 4MU sobre la proliferación y apoptosis. **(A)** Proliferación *in vitro* de células de HCC evaluada por incorporación de ^3H -Timidina en tres líneas celulares con distintas concentraciones de 4MU. Control: medio HBSS. *** $P < 0.001$ vs control. Los valores están expresados como promedio \pm ESM (de tres experimentos). **(B)** Inducción de la apoptosis con diferentes concentraciones de 4MU. El índice de apoptosis = % apoptosis con 4MU - % apoptosis del control (medio HBSS). ** $p < 0.01$ vs control. Los resultados representan el promedio \pm ESM (de tres experimentos), (test Kruskal-Wallis, ANOVA).

Si bien la línea Hepa129 secreta mayores cantidades de AH en comparación con las líneas humanas Hep3B y Huh7 (**Figura 16**), procedimos a medir el efecto de 4MU sobre la síntesis de AH en estas tres líneas de HCC. Como se muestra en la **Figura 18**, 4MU inhibió la síntesis de AH tanto en Hepa129 como en Hep3B. Para la línea Hepa129, la inhibición fue significativa a las 12 hs en comparación con el control (0 mM 4MU, **Figura 18A**), aunque no se observaron diferencias significativas a las 24 hs (**Figura 18B**). La línea de células humanas Hep3B mostró una reducción significativa del nivel de AH sólo a las 24 hs de tratamiento con 4MU, en comparación con el control (**Figura 18B**), mientras que en la línea HuH7 no hubo reducción de los niveles de AH en los

tiempos analizados (**Figura 18A,B**). Estos resultados muestran una correlación entre la síntesis de AH y la inducción de apoptosis luego del tratamiento con 4MU para Hepa129 y Hep3B, mientras que las células Huh7 fueron resistentes a la apoptosis inducida por 4MU.

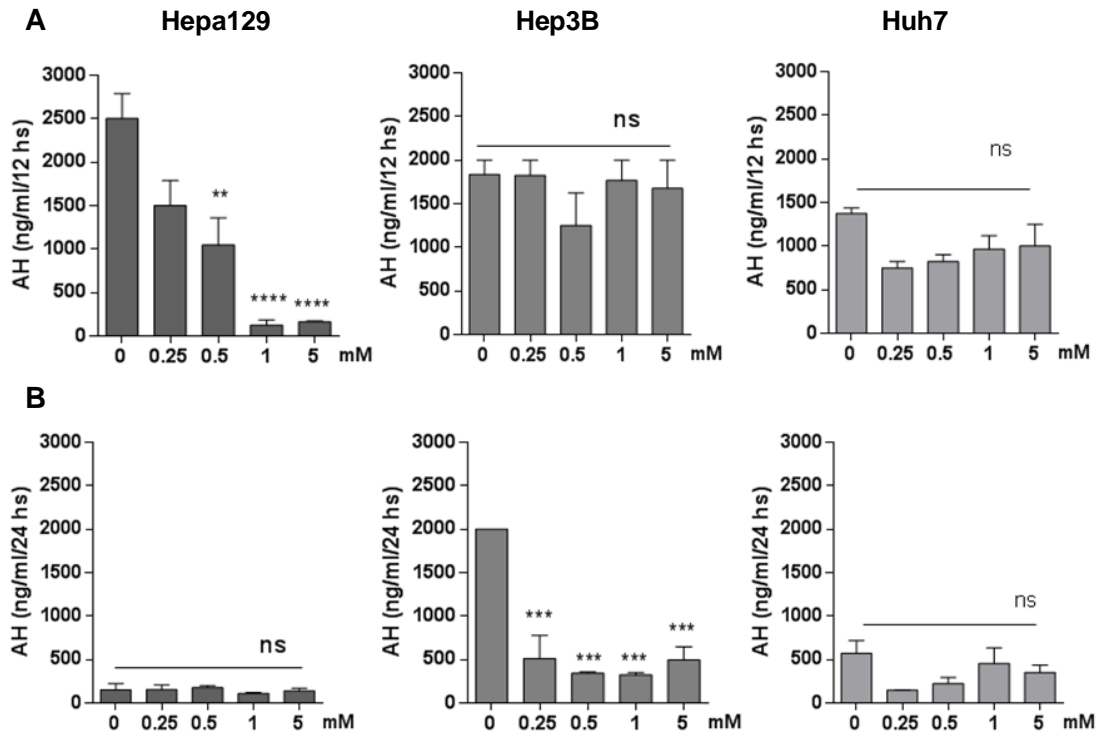


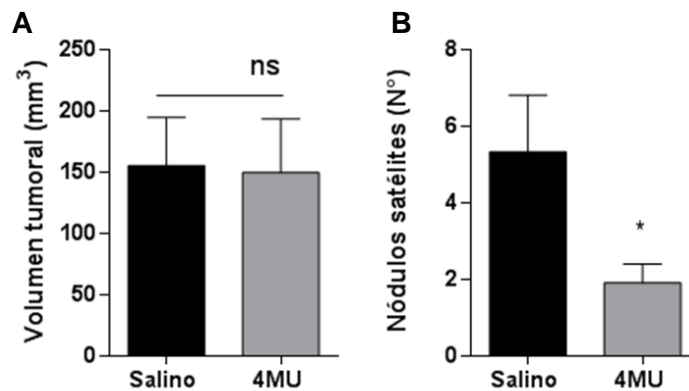
Figura 18. Medición de los niveles de AH en las líneas celulares Hepa129, Hep3B y Huh7 por un ensayo tipo ELISA. Las células (10^6 /ml) fueron cultivadas y tratadas durante **(A)** 12 hs ó **(B)** 24 hs con diferentes concentraciones de 4MU y el contenido de AH se determinó a partir de los sobrenadantes. Los resultados representan la media \pm ESM (de tres experimentos). **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ vs control sin 4MU (0 mM) (test Kruskal-Wallis, ANOVA).

5.3 Efectos antitumorales de 4MU administrado por vía intraperitoneal (i.p.) en el modelo ortotópico de HCC asociado a fibrosis avanzada.

Como se describió anteriormente, el HCC asienta, en más del 85% de los casos, sobre hígados con cirrosis o al menos con fibrosis avanzada. Para determinar los efectos de la inhibición de la síntesis de AH utilizando 4MU durante el desarrollo del tumor, establecimos un modelo de tumor ortotópico asociado a fibrosis avanzada

inducida por TAA (**Figura 14**, Materiales y Métodos), que se caracteriza por la presencia de un tumor principal y nódulos tumorales satélites macroscópicos. 4MU se administró diariamente por vía i.p., comenzando 2 días previos al implante de células tumorales Hepa 129 y durante 12 días posteriores al mismo.

Como resultado, observamos que si bien 4MU i.p. no redujo el crecimiento del tumor principal en los animales tratados con 4MU (155 ± 39 vs. 150 ± 44 mm³, respectivamente; **Figura 19A**), el número de nódulos satélites asociados al tumor, indicadores de agresividad tumoral, disminuyó tres veces en los animales tratados con 4MU respecto al grupo control (5.3 ± 1.5 vs. 1.9 ± 0.5 ; **Figura 19B**). Notoriamente, 4 de 6 animales del grupo control (Salino) desarrollaron ascitis severa (incluyendo ascitis hemorrágica), mientras que en el grupo 4MU la ascitis fue moderada o estuvo ausente (1 de 5 animales). El examen microscópico de los tumores hepáticos reveló que los animales tratados con 4MU presentaban mayor infiltrado inflamatorio de tipo mononuclear, más abundante en los márgenes del tumor, y extensas áreas de necrosis en comparación con los animales que no recibieron tratamiento (**Figura 19C**).



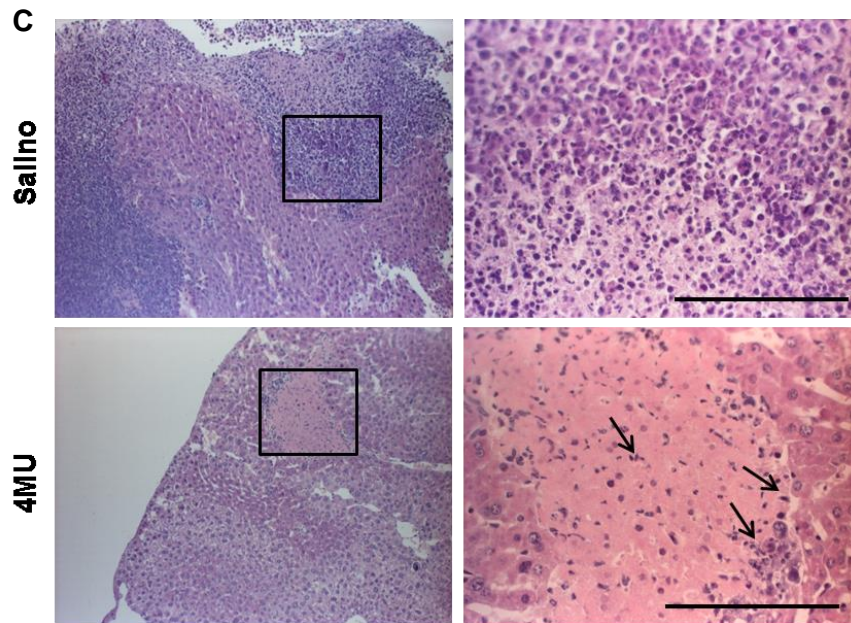


Figura 19. Efecto de 4MU sobre los tumores de Hepa129 implantados de forma ortotópica. **(A)** Medición del volumen tumoral (mm^3) en animales con fibrosis subyacente tratados con 4MU ó sin tratar. **(B)** Cuantificación de los nódulos satélites asociados al tumor. $*p < 0.05$ vs Salino (test Mann-Whitney, test de Student). **(C)** Examen microscópico de los tumores mediante tinción con hematoxilina-eosina (100 \times). Magnificación de la región (paneles de la derecha, 400 \times) mostrando áreas necróticas (áreas eosinófilas) e infiltrado inflamatorio en la periferia del tumor. Las flechas indican infiltrado de células mononucleares en los animales tratados con 4MU.

5.4 Estudios de toxicidad.

Posteriormente, evaluamos la toxicidad de 4MU *in vitro* e *in vivo*.

Desde el punto de vista clínico, el tratamiento con 4MU no modificó el comportamiento general de los animales, así como tampoco el aspecto clínico ni el peso corporal total.

Analizamos los niveles en suero de alanina aminotransferasa (ALT), los cuales no mostraron diferencias significativas en el grupo de ratones con 4MU (**Figura 20A**), indicando la ausencia de necrosis de hepatocitos luego de la administración de la droga. Además, el tratamiento no causó ningún indicio de daño hepatocelular, dado que el tejido hepático mostró una histología normal (**Figura 20B**). Luego, evaluamos *in vitro* la apoptosis y citotoxicidad en un cultivo primario de hepatocitos tratados con 4MU. Los mismos fueron aislados de los hígados de los animales mediante perfusión

con colagenasa, utilizando una circulación cerrada a nivel hepático tal como se describe en la sección Materiales y Métodos. Observamos que el tratamiento no indujo apoptosis significativa en los hepatocitos en cultivo (**Figura 20E**), y la citotoxicidad fue menor al 5% para todas las dosis de 4MU evaluadas (**Figura 20C**). Además, 4MU tampoco tuvo un efecto citotóxico sobre las células Hepa129 (**Figura 20D**).

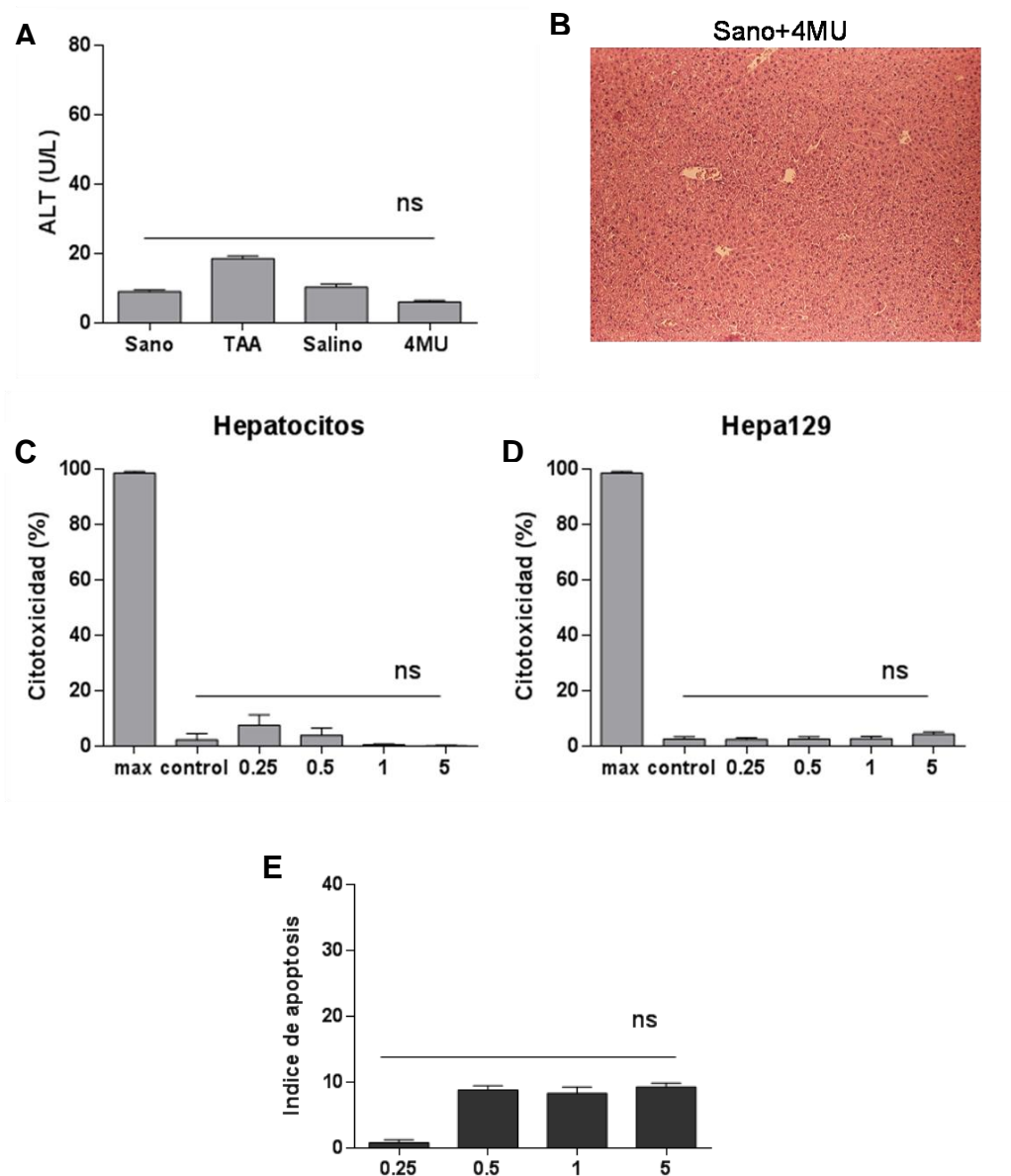


Figura 20. Evaluación de la toxicidad de 4MU. **(A)** Medición de los valores de ALT (U/L). **(B)** Imagen representativa de un corte histológico del hígado de un ratón sano tratado con 4MU (Magnificación 100X). **(C)** Evaluación de la citotoxicidad de 4MU mediante la

liberación de LDH sobre un cultivo primario de hepatocitos y sobre **(D)**Hepa129.max= control de lisis máxima. **(E)** Índice de apoptosis evaluada por bromuro de etidio y naranja de acridina en hepatocitos en cultivo, luego del tratamiento con 4MU. Los experimentos fueron realizados por triplicado. ns, no significativo (test Kruskal-Wallis, ANOVA).

5.5 Análisis de la modulación de la expresión de AH hepático luego del tratamiento con 4MU i.p.

La expresión de AH fue evaluada en secciones de tejido hepático de los animales provenientes de los distintos grupos por tinción histológica con una proteína de unión a AH biotinilada. En los hígados de los ratones sanos, la marca de AH fue prácticamente nula, mientras que en las secciones de hígado de ratones con fibrosis establecida y en el grupo Salino la marca de AH se observó más intensa (**Figura 21A**). Como resultado de la terapia con 4MU, los ratones mostraron una marcada reducción de la expresión de AH en el parénquima hepático y principalmente dentro del tumor de HCC (**Figura 21A**).

Además, se cuantificó el AH presente en el tejido hepático por un ensayo tipo ELISA, y en concordancia con lo observado histológicamente, observamos una disminución muy significativa del contenido de AH en los animales tratados con 4MU en comparación al grupo Salino. Esta reducción se evidenció también al comparar animales con fibrosis solamente (**Figura 21B**). Es importante destacar que, como se esperaba, al analizar los niveles de AH en el suero de estos mismos grupos de animales observamos también una reducción significativa del AH luego del tratamiento con 4MU (**Figura 21C**).

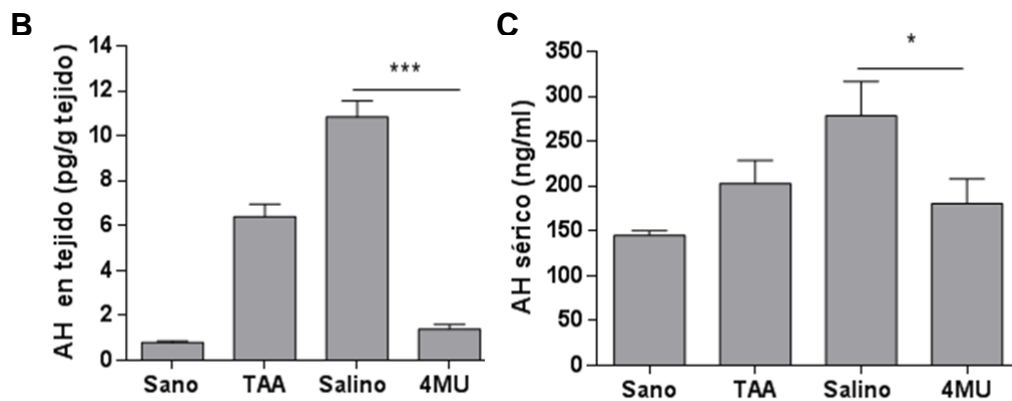
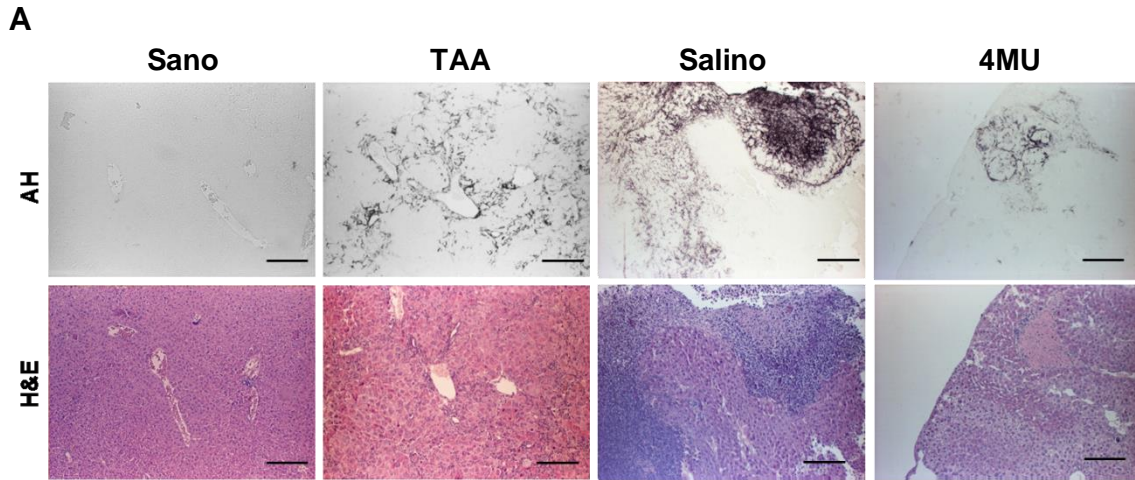


Figura 21. Efecto del 4MU sobre los niveles hepáticos y sistémicos del AH. **(A)** Evaluación de la presencia del AH en el tejido hepático y/o tumor revelado mediante la unión a una proteína de unión a AH biotinilada. Los depósitos de AH se observan en negro. La arquitectura general del tejido se puede observar mediante tinción de hematoxilina-esoina (H&E). Barra = 50 μ m. **(B)** Cuantificación de los niveles de AH a partir de los extractos de GAGs del tejido hepático mediante un ensayo tipo ELISA, normalizado a los gramos de tejido. **(C)** Cuantificación de los niveles séricos de AH mediante un ensayo tipo ELISA. Las barras representan los valores medios de tres experimentos para cada grupo \pm ESM. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ (test Kruskal-Wallis, ANOVA).

Posteriormente, investigamos a nivel hepático si la disminución de la acumulación de AH se obtenía a expensas de cambios en el tamaño de la molécula de AH, dado que se ha observado que los efectos biológicos del AH dependen de su peso molecular [159]. Para ello, analizamos el peso molecular del AH presente en el tejido

hepático de los diferentes grupos de animales. Los estudios estructurales del peso molecular [121] se llevaron a cabo mediante un análisis de FPLC. La información cromatográfica obtenida mostró dos picos diferentes de componentes de GAG (**Figura 22**). El primer pico, alrededor de los 7-8 ml, corresponde a AH APM ($\sim 1.8 \times 10^6$ Da), y el segundo, que comienza desde los 16 hasta los 22 ml ($\sim 6.5 \times 10^5$ Da a 10^3 Da) representa otros GAG que no son AH (**Figura 22**). Estos resultados indican que el PM del AH hepático no fue modificado sustancialmente luego del tratamiento con 4MU, lo que implica que la importante reducción de la cantidad de AH observada en el hígado de los animales tratados con 4MU no se debe a un cambio en las dimensiones de la molécula de AH, que permaneció alrededor de los 2×10^6 Da.

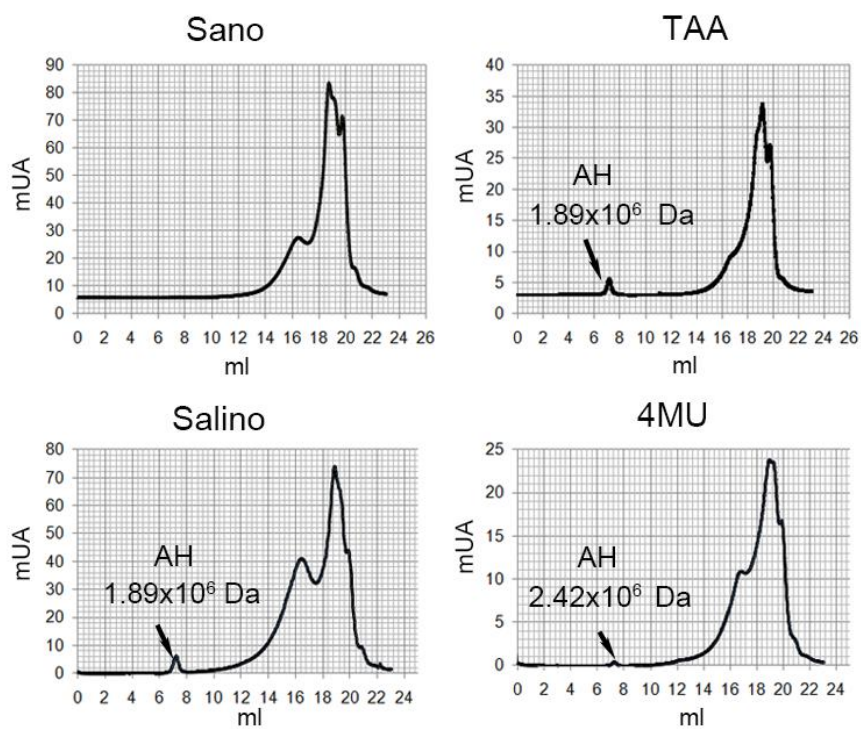


Figura 22. Análisis del peso molecular de AH por cromatografía de filtración en gel. Los GAG fueron extraídos de tejido hepático de los diferentes grupos. Los gráficos corresponden a un animal representativo de cada grupo. Las flechas indican el peso molecular calculado de los picos que contienen AH. mAU= miliUnidades Arbitrarias

5.6 Efectos del tratamiento con 4MU i.p. sobre el proceso de fibrogénesis hepática inducida por TAA.

Luego de obtener los resultados descriptos en apartados anteriores, decidimos evaluar si el tratamiento con 4MU era capaz de influir en la fibrogénesis hepática, proceso implicado en el modelo animal en estudio. Luego de 6 semanas de administración de TAA, los hígados de los animales con fibrosis y tumor mostraron aparición de puentes fibrosos porto-portales y porto-centrales, distorsión de la arquitectura hepática normal y nódulos de regeneración, mientras que en los animales tratados con 4MU se observó una marcada reducción en la cantidad de septos fibrosos y de nódulos de regeneración, con puentes porto-portales ocasionales (**Figura 23A**). Para determinar el grado de extensión de la fibrosis, se realizó una tinción de la fibras de colágeno, siendo uno de los componentes de matriz extracelular que más se acumula en el hígado con fibrosis y que puede ser determinada específicamente por tinción con Rojo Sirio. Luego se aplicó la escala de Metavir, tal como se describió en la sección Materiales y Métodos. Las características observadas en el grupo Salino correspondieron con un estadio más avanzado de fibrosis (F2-F3), mientras que el grupo 4MU presentó un estadio menos avanzado, F1-F2 (**Figura 23A**).

Con el objetivo de cuantificar el contenido de colágeno en el hígado, secciones hepáticas de los diferentes grupos experimentales fueron teñidos con Rojo Sirio y se realizó, posteriormente, un análisis morfométrico. Mediante este estudio pudimos evidenciar una reducción significativa en el área positiva para Rojo Sirio en los animales tratados con 4MU al ser comparados con los animales del grupo Salino (0.65 ± 0.08 vs. 1.48 ± 0.11 respectivamente; **Figura 23B**).

La fibrogénesis hepática se caracteriza por la presencia de células estrelladas hepáticas (CEH) activadas que sufren un proceso de trans-diferenciación hacia células con un perfil de miofibroblastos. Éstos constituyen la principal fuente de componentes de la MEC así como también de citoquinas pro-inflamatorias y quimiocinas en el hígado con fibrosis, y aumentan la expresión de actina- α de musculo liso (α -SMA) de acuerdo a su grado de activación. Con el fin de determinar si el número de

miofibroblastos en los septos fibrosos y/o el estado de activación de los mismos podría ser afectado por el tratamiento con 4MU, se realizaron tinciones inmunohistoquímicas para la detección de la expresión de α -SMA en secciones de hígado de los animales sanos, con sólo fibrosis, Salinos ó 4MU. Como resultado, observamos una reducción significativa del área positiva para α -SMA luego del tratamiento con 4MU al ser comparado con los animales que no recibieron el tratamiento (0.17 ± 0.02 vs. $0.4\pm 0.04\%$ respectivamente; **Figura 23C**). Estos resultados sugieren que la terapia con 4MU reduce el número y/o estado de activación de miofibroblastos, células con un rol clave en la fibrogénesis hepática.

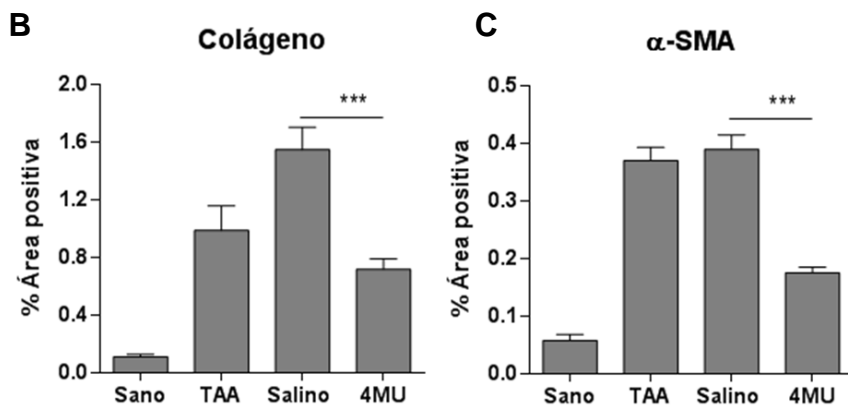
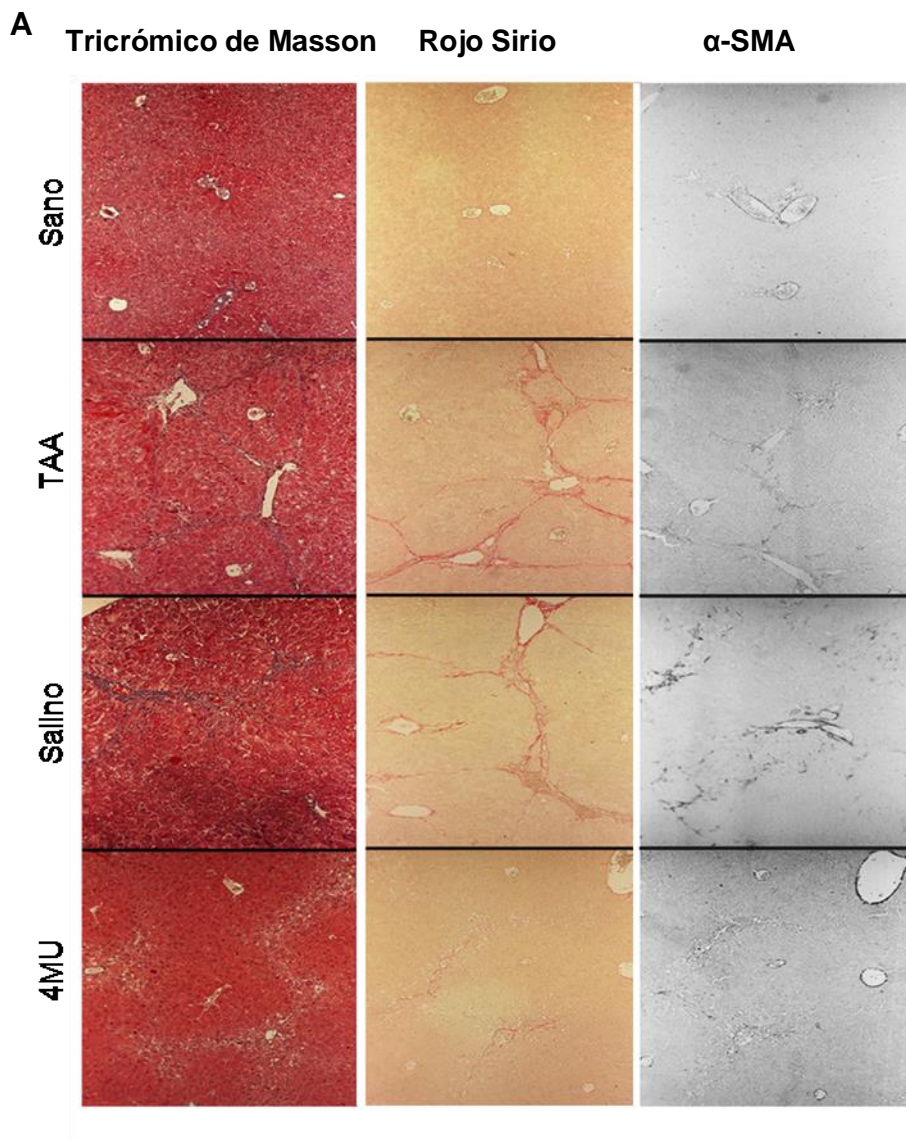


Figura 23. Efecto del 4MU sobre la fibrosis hepática. **(A)** Evaluación de la fibrosis hepática: se observan fibras de colágeno tipo I mediante la tinción de tricrómico de Masson y Rojo Sirio. Detección de α -SMA por inmunohistoquímica. **(B)** Cuantificación de las fibras de colágeno tipo

I por morfometría.*** $p < 0.001$. **(C)** Cuantificación de células positivas para α -SMA por densitometría. *** $p < 0.001$ (test Kruskal-Wallis, ANOVA). Las barras representan el promedio de tres experimentos \pm ESM.

5.7 Efecto de 4MU *in vitro* sobre la proliferación celular y apoptosis en líneas de fibroblastos y de células estrelladas de origen hepático.

Con el mismo objetivo de estudiar el efecto del tratamiento con 4MU en el desarrollo de la fibrosis, se analizó la proliferación y apoptosis de fibroblastos hepáticos y CEH, tal como se describió en Materiales y Métodos. Se observó una inhibición de la proliferación en todas las dosis de 4MU estudiadas para los fibroblastos hepáticos murinos IZA2.1, y para las células estrelladas hepáticas de rata CFSC-2G y humanas LX2 (**Figura 24A**). Sin embargo, el índice de apoptosis aumentó sólo en dosis altas de 4MU (5mM) para las tres líneas (**Figura 24B**).

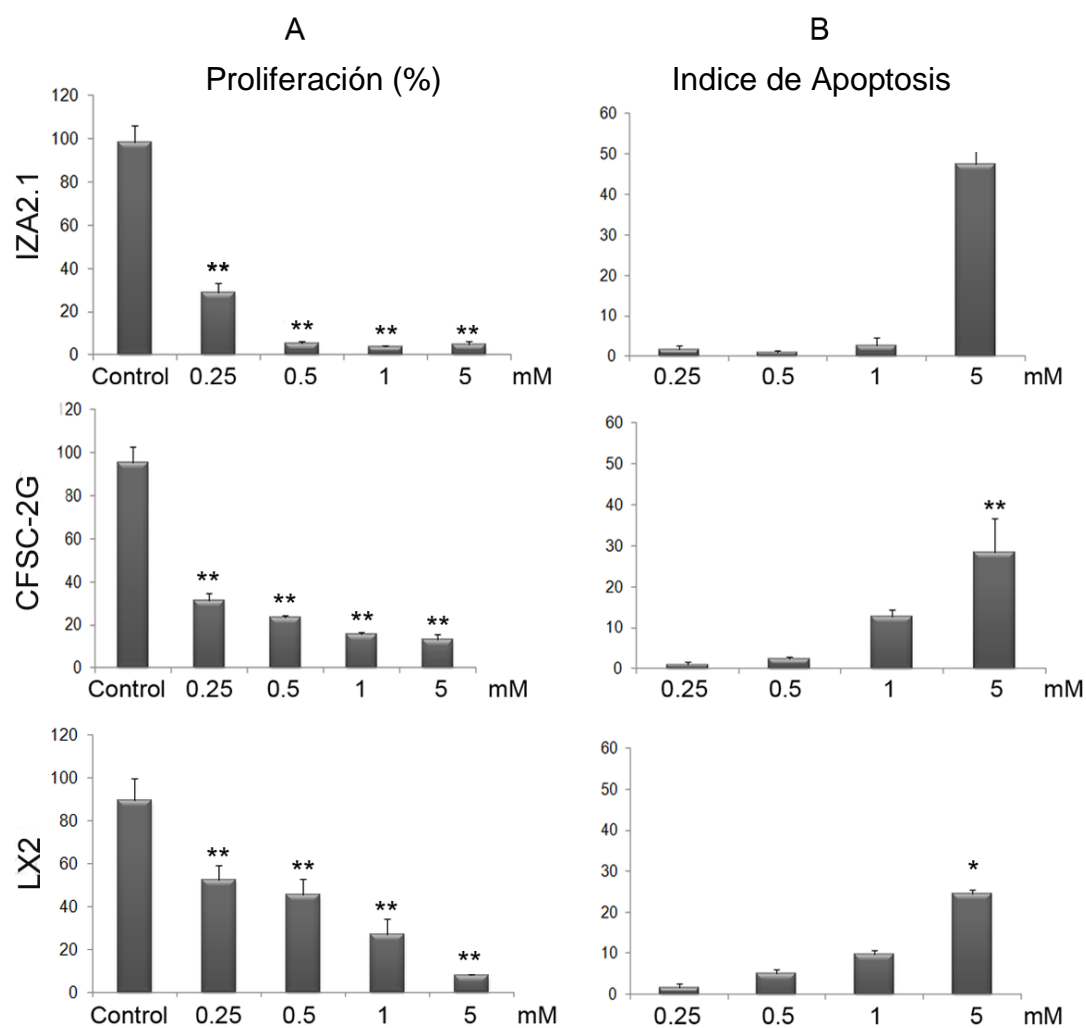


Figura 24. Efecto de 4MU sobre la proliferación y apoptosis de fibroblastos.(A) Proliferación *in vitro* de fibroblastos hepáticos IZA2.1 y células estrelladas hepáticas de rata (CFSC-2G) y humanas (LX2) evaluada por incorporación de [³H]-Timidina luego del tratamiento con diferentes dosis de 4MU. Control: medio HBSS. **p< 0.01 vs control (test Kruskal-Wallis, ANOVA). Se muestra un experimento representativo de 3 ensayos independientes. Los resultados se expresan como la media de la proliferación ± ESM (las mediciones se realizaron en triplicados). (B) Evaluación de la apoptosis por cambios morfológicos visualizados por tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio. Índice de apoptosis= % apoptosis 4MU -% apoptosis control. *p< 0.05, **p< 0.01 vs control (test Kruskal-Wallis, ANOVA). Las barras representan el promedio de las mediciones en cada grupo ± ESM.

En resumen, en esta sección de resultados generados en el trabajo de tesis mostramos que 4MU, conocido inhibidor de la síntesis de AH, es un compuesto no tóxico con propiedades antitumorales y antifibróticas en los modelos experimentales expuestos hasta aquí.

Parte II

5.8 Eficacia antitumoral de 4MU administrado por vía oral

En una etapa posterior, se decidió evaluar si era posible mejorar, y a la vez simplificar, el efecto antitumoral de 4MU observado por vía i.p., para lo cual abordamos la terapia preventiva con 4MU por vía oral (mediante sonda), en una dosis de 400 mg 4MU / kg / día, en base a estudios previos en los que ya se utilizaba esta forma de administración en modelos murinos [133, 141] y datos de administración oral en humanos [160].

En este caso se observó que el empleo de 4MU por vía oral fue capaz de reducir significativamente el volumen de la masa tumoral (30 ± 8 vs 10 ± 3 mm³; **Figura 25A**), así como también el número de nódulos satélites, que fue 7 veces menor ($2,3 \pm 0,6$ vs $0,3 \pm 0,2$; **Figura 25B**). En concordancia con este resultado, encontramos además que la tasa de supervivencia de los ratones tratados con 4MU se incrementó significativamente, de 28,5 a 35,5 días (**Figura 25C**).

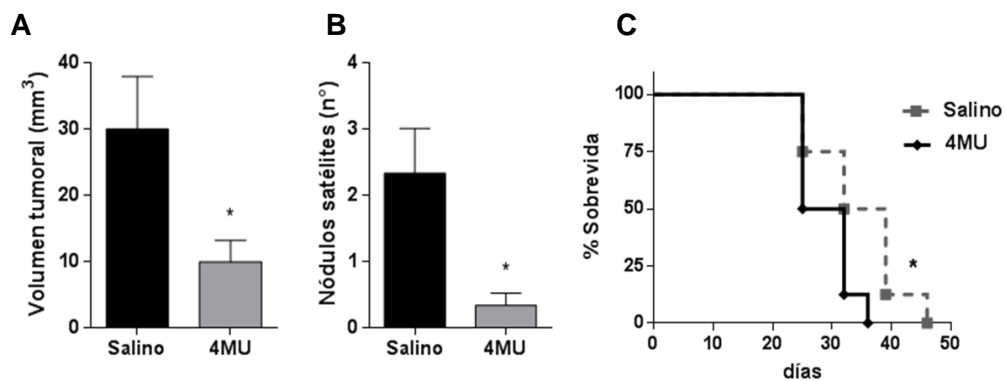


Figura 25. Efecto antitumoral de la terapia con 4MU por vía oral. **(A)** Los tumores de HCC fueron medidos con calibre 12 días posteriores a la inoculación de las células Hepa129. **(B)** El número de los nódulos satélites fueron contados macroscópicamente. * $p < 0.05$ vs Salino, test Mann-Whitney. **(C)** La tasa de supervivencia fue analizada mediante una curva Kaplan-Meier. * $p < 0.05$ vs Salino, test Log-rank.

5.9 Efecto de 4MU sobre la angiogénesis *in vivo*

Como se describió anteriormente tanto en la fibrosis hepática como en el HCC el proceso angiogénico es crítico para la fisiopatología de ambas enfermedades [161]. Además, dado que la síntesis de AH se encuentra exacerbada en ambas patologías, decidimos evaluar si el efecto terapéutico de 4MU podría también estar relacionado a una modulación de la angiogénesis hepática. Para tal fin, evaluamos en primer lugar la densidad microvascular dada por la expresión de CD31, marcador de células endoteliales, mediante inmunohistoquímica tanto en el tumor como en el parénquima hepático. Si bien en los tumores la señal positiva para CD31 fue prácticamente nula (**Figura 26C**), en el parénquima hepático se observó tinción positiva tanto en vena porta como en puentes fibróticos de los animales del grupo salino (**Figura 26A**). Es importante destacar que la expresión de CD31 en dichas zonas se redujo significativamente en el grupo de animales tratados con 4MU (0.22 ± 0.15 vs. 0.06 ± 0.10 % área positiva; **Figura 26B**).

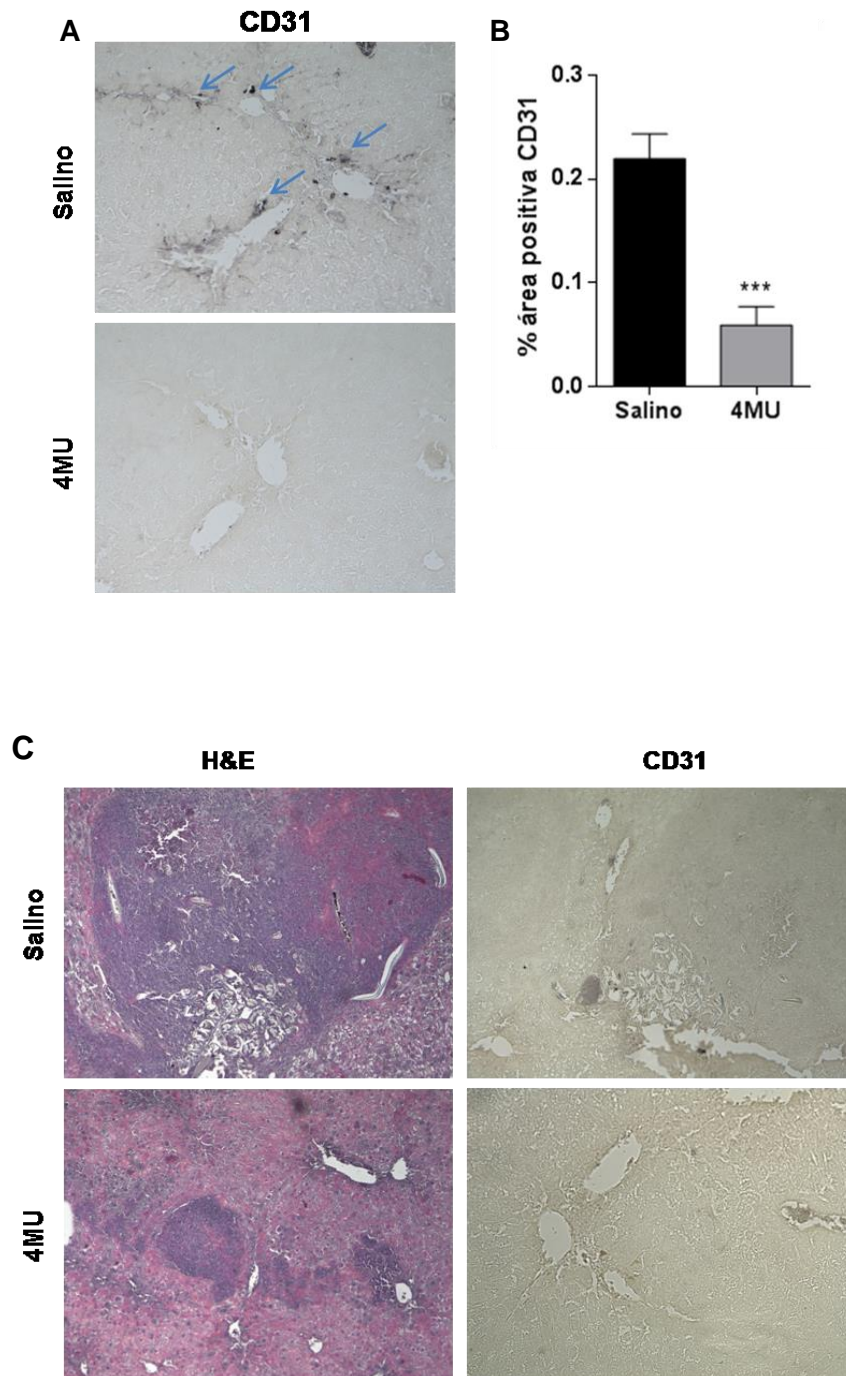


Figura 26. (A) La microdensidad vascular en secciones de parénquima hepático fue evaluada por inmunomarcación para CD31 y (B) cuantificada por densitometría. *** $p < 0.001$ vs Salino, test Mann-Whitney. (C) Inmunomarcación para CD31 en zonas tumorales, y su correspondiente sección teñida con H&E. Las imágenes fueron tomadas con una magnificación de 100X. Las barras representan el promedio de mediciones de cada grupo \pm ESM. El gráfico es representativo de 3 experimentos independientes.

En concordancia con esta observación, la inmunomarcación para el factor proangiogénico VEGF-A fue menor que en el parénquima hepático del grupo salino (**Figura 27A**). La señal positiva también se observó en puentes fibróticos y en áreas portales. Las zonas tumorales mostraron la misma tendencia, observándose que la señal positiva se encontraba distribuida de manera heterogénea(**Figura 27A**). Luego, al evaluar los niveles de VEGF en suero, encontramos que los mismos se redujeron significativamente en el grupo 4MU respecto al grupo salino (151.3 ± 2.8 vs. 83.8 ± 3.4 pg/ml; **Figura 27B**).

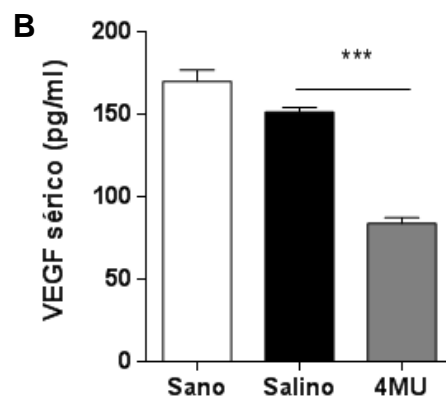
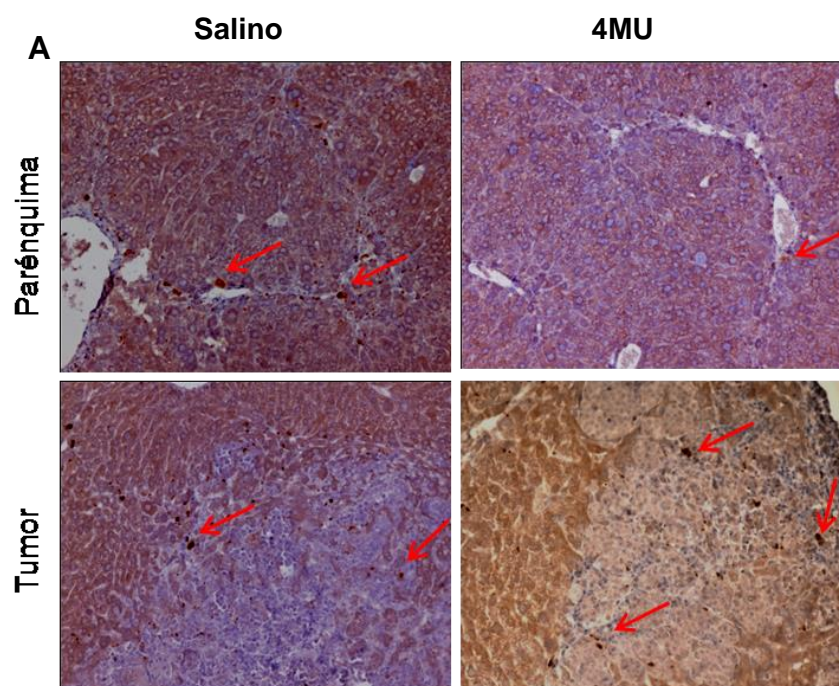


Figura 27. (A) Inmunomarcación para VEGF en parénquima hepático y zonas tumorales. La señal positiva se evidencia por puntos marrones, indicada por flechas, alrededor de áreas

porta (paneles superiores) o heterogéneamente distribuidas en el tumor (paneles inferiores). Imágenes con magnificación 100X. **(B)** Los niveles sistémicos de VEGF fueron cuantificados por ELISA. *** $p < 0.001$ vs Salino, test Kruskal-Wallis, ANOVA. Las barras representan el promedio de mediciones de cada grupo \pm ESM. El gráfico es representativo de 3 experimentos independientes.

Para evaluar los efectos del 4MU en la angiogénesis tumoral, la masa tumoral principal fue separada mediante microcirugía del parénquima hepático, y a partir de ella se analizó la expresión de moléculas proangiogénicas. Encontramos que los niveles de proteína de VEGF, detectados por ELISA, se redujeron significativamente en los animales tratados con 4MU en comparación con los animales del grupo salino (1.6 ± 0.6 vs. 0.9 ± 0.2 ng VEGF/proteína total; **Figure 28B**). Los niveles de IL-6, los cuales se encuentran generalmente elevados en el HCC [162] y además están relacionados con vías de señalización angiogénicas [77], también se redujeron en el tejido tumoral de los animales tratados con 4MU (188.6 ± 3.7 vs. 88.95 ± 6.2 pg IL-6/ mg proteína total; **Figura 28E**).

A continuación, examinamos por PCR cuantitativa la expresión del ARNm de SDF-1, dado que es un factor inducido perivascularmente durante la angiogénesis patológica, aguas abajo de VEGF [163]. Como resultado, la expresión de SDF-1 se redujo significativamente en los tumores de los ratones tratados con 4MU respecto al grupo control (1.02 ± 0.09 vs. 0.63 ± 0.04 ; **Figura 28C**).

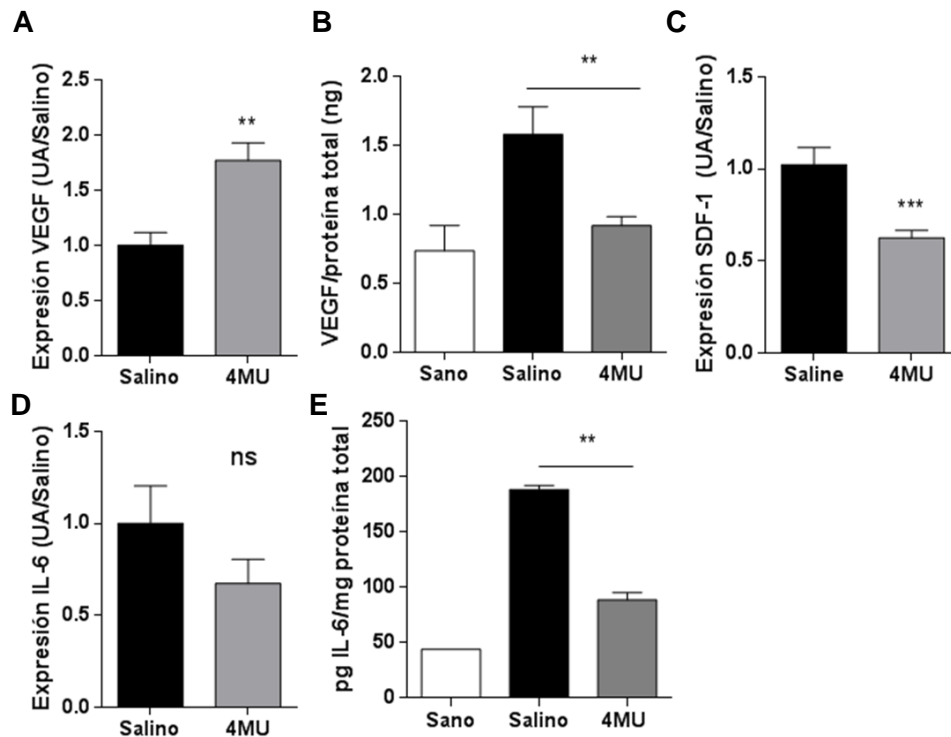


Figura 28. 4MU reduce la expresión de moléculas proangiogénicas en el tumor de HCC. La expresión del ARNm de **(A)** VEGF, **(C)** SDF-1 e **(D)** IL-6 fue evaluada por PCR en tiempo real. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ vs Salino, test Mann-Whitney. Los niveles de proteína **(B)** VEGF e **(E)** IL-6 fueron medidos a partir de extractos de tejido tumoral por ELISA. ** $p < 0.01$ vs Salino, test Kruskal-Wallis, ANOVA. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

De manera similar a lo observado en el tumor de HCC, el tratamiento con 4MU redujo la expresión del ARNm de VEGF (1.06 ± 0.19 vs. 0.47 ± 0.07 ; **Figura 29A**) así como también de la proteína (1.7 ± 0.6 vs. 0.9 ± 0.1 ng VEGF/proteína total; **Figura 29B**) en el parénquima hepático no tumoral. Además, la expresión del ARNm de IL-6 (1.0 ± 0.2 vs. 0.3 ± 0.1 ; **Figura 29D**) y de la proteína (255.40 ± 48.70 vs. 21.14 ± 0.02 pg IL-6/mg proteína total; **Figure 29E**) se redujeron significativamente con el tratamiento con 4MU. Lo mismo se observó para la expresión del ARNm de SDF-1 (1.02 ± 0.12 vs. 0.53 ± 0.03 ; **Figura 26C**).

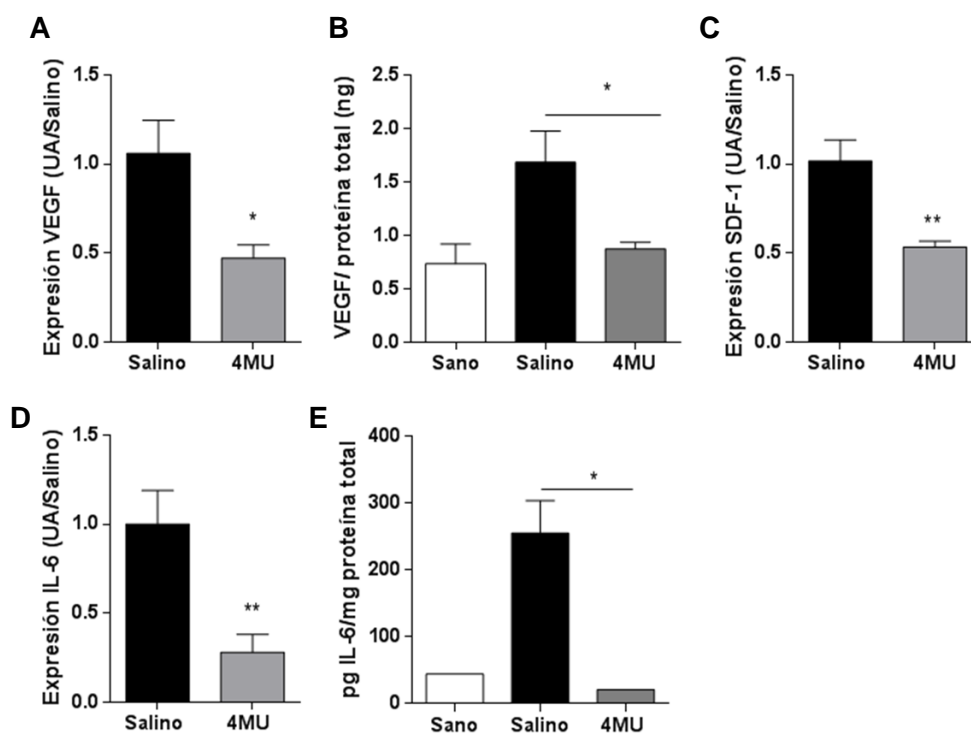


Figura 29. 4MU reduce la expresión de moléculas proangiogénicas en el parénquima hepático. La expresión del ARNm de **(A)** VEGF, **(C)** SDF-1 e **(D)** IL-6 fue evaluada por PCR en tiempo real. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ vs Salino, test Mann-Whitney. Los niveles de proteína **(B)** VEGF e **(E)** IL-6 fueron medidos a partir de extractos de parénquima hepático no tumoral por ELISA. * $p < 0.05$ vs Salino, test Kruskal-Wallis, ANOVA. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

5.10 Estudio de la modulación de la producción de IL-6 por las células de HCC y por células de Kupffer tras el tratamiento con 4MU.

Dado el marcado efecto de la terapia con 4MU sobre la expresión de IL-6, tanto en los tumores como en el parénquima no tumoral, decidimos investigar qué tipo de células eran blanco de 4MU. Por un lado, tratamos células Hepa129 con 4MU por 20 hs y medimos los niveles de IL-6 mediante ELISA. Utilizamos dosis de 4MU que no indujeron apoptosis significativa (ver Figura 17); y observamos que utilizando las dosis de 0.25 y 0.5 mM de 4MU, los niveles de IL-6 se redujeron notablemente a concentraciones indetectables (1.000 ± 0.045 vs. 0.135 ± 0.078 y 0.010 ± 0.005 pg IL-6/ml, respectivamente; **Figura 30A**). Sin embargo, cuando restablecimos la presencia de AH, la producción de IL-6 también se restituyó en el sobrenadante de las células tratadas con 0.25 y 0.5 mM de 4MU (0.508 ± 0.042 y 0.052 ± 0.030 pg IL-6/ml, respectivamente; **Figura 30A**). Este resultado sugiere que la producción reducida de IL-6 por las células

Hepa129 luego de la terapia con 4MU depende, al menos en parte, de la inhibición de AH.

Por otro lado, las células de Kupffer están implicadas críticamente en la fibrogénesis y hepatocarcinogénesis [76]. Para investigar si 4MU era capaz de modificar la producción de IL-6 por las células de Kupffer *in vivo*, las mismas fueron aisladas del parénquima hepático no tumoral mediante un gradiente de densidad. Luego de extraerlas se cultivaron durante 24 hs y se obtuvo un sobrenadante a partir del cual se cuantificó IL-6. Hallamos una marcada reducción de los niveles de proteína de IL-6 producidos por las células de Kupffer de los ratones tratados con 4MU, en comparación con el grupo control (237.0 ± 19.8 vs 13.7 ± 1.5 pg IL-6/mg proteína total; **Figura 30B**).

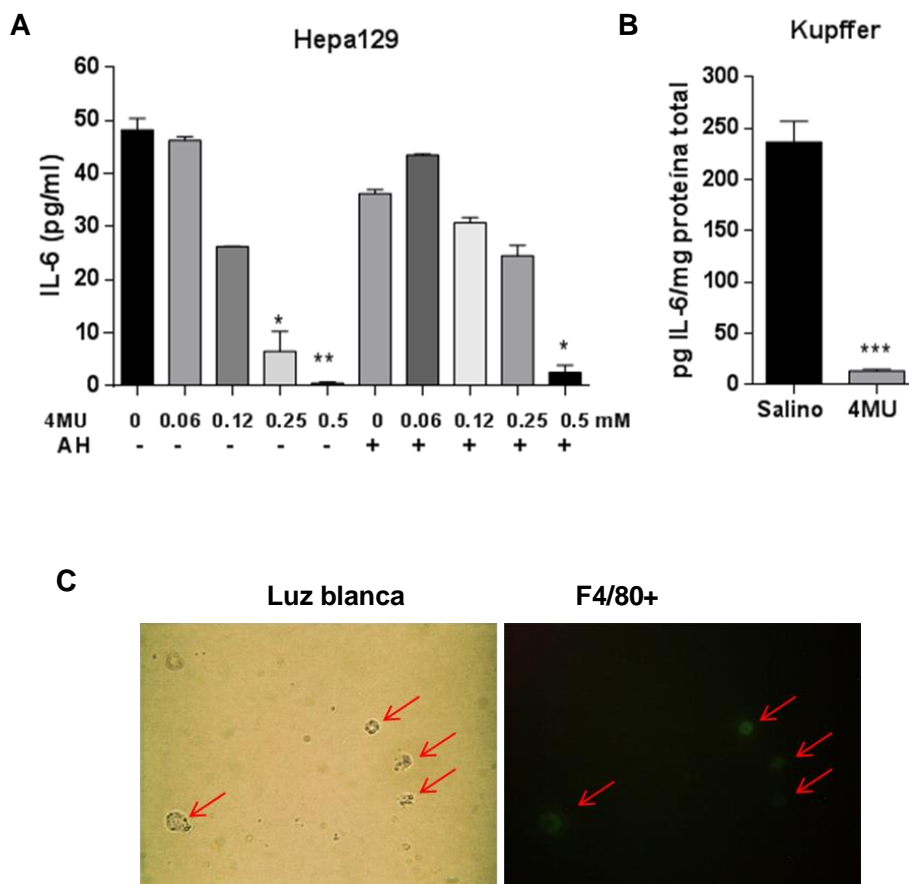


Figura 30. 4MU modula los niveles de IL-6 producidos por las células Hepa129 y Kupffer. **(A)** Los niveles de proteína IL-6 fueron medidos a partir de sobrenadante de Hepa129, luego de 20 hs de tratamiento con 4MU. La incubación con AH restituyó la producción de IL-6 disminuída por 4MU 0.25 mM. * $p < 0.05$ vs. 0 mM, test Kruskal-Wallis, ANOVA. **(B)** Los niveles de IL-6 producidos por las células de Kupffer aisladas de animales tratados o no con 4MU se midieron

a partir de sobrenadante de las mismas. *** $p < 0.001$ vs. Salino, test Mann-Whitney. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. **(C)** Evaluación de la pureza del cultivo primario de células de Kupffer. En el panel derecho se observan las células positivas para el marcador de macrófagos F4/80, respecto al total de células en el panel izquierdo. Magnificación: 200X.

5.11 Evaluación de la modulación de la actividad angiogénica *in vitro* de 4MU sobre células endoteliales.

La angiogénesis tumoral implica un conjunto de eventos entre los cuales la membrana basal vascular es degradada por MMPs, las células endoteliales vasculares proliferan y migran, y la formación de tubos vasculares es inducida por factores de crecimiento como VEGF [84]. En primer lugar evaluamos si las células endoteliales vasculares (HMEC-1) producían AH, y de ser así, si 4MU afectaba su biosíntesis, mediante un ensayo tipo ELISA utilizando una proteína de unión a AH. Como resultado, observamos que las células HMEC-1 producían bajos niveles de AH (**Figura 31A**). Además, la proliferación de las mismas no fue afectada por ninguna dosis empleada de 4MU (**Figura 31B**).

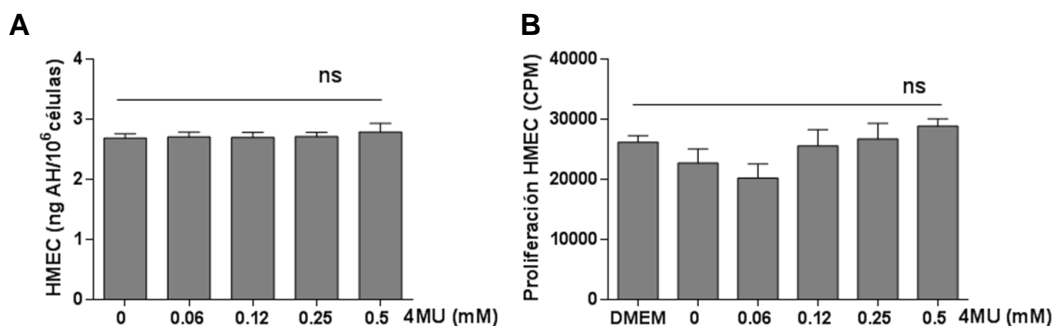


Figura 31. **(A)** La producción de AH y **(B)** la proliferación de las células HMEC-1 no fueron afectadas por 4MU. Ns= no significativo. ANOVA. Las células fueron incubadas con 4MU por 18 hs y luego procesadas para el correspondiente análisis.

Dado que se conoce que los factores producidos por las células tumorales pueden modular el comportamiento de las células endoteliales [84], evaluamos posteriormente si AH era capaz de modular el proceso de migración de las células HMEC-1. Considerando que previamente observamos que 4MU afectaba su capacidad

de síntesis de AH, las células Hep3B fueron pre-tratadas con 4MU por 18 hs. El medio condicionado de las mismas fue recolectado y utilizado como quimioattractante para migración de las células HMEC-1 en una cámara de tipo Boyden. Como resultado, hallamos una reducción significativa de la migración de las células endoteliales hacia el medio condicionado de las células tumorales pre-tratadas con la menor dosis de 4MU empleada (1.00 ± 0.04 0mM vs. 0.57 ± 0.07 0.06 mM; **Figura 32**).

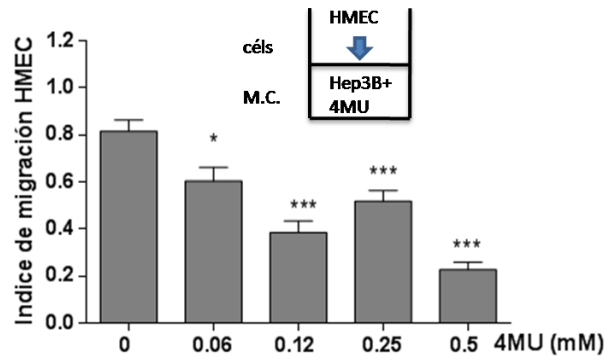


Figura 32. Migración de células HMEC-1 hacia medio condicionado de células Hep3B pre-tratadas con 4MU. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. 0 mM, test Kruskal-Wallis, ANOVA. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Luego, analizamos la capacidad de las células HMEC-1 de formar tubos vasculares bajo el estímulo de factores secretados por células tumorales Hep3B. Para tal fin, se sembraron células HMEC-1 sobre una capa de Matrigel sembrada en placas y se incubaron por 6 hs con medio condicionado de células Hep3B pre-tratadas con diferentes dosis de 4MU. Observamos que la formación de tubos se redujo significativamente (0.25 mM 4MU) (88.1 ± 0.9 0mM vs. 63.2 ± 5.3 0.25 mM % área libre de células/campo, **Figura 33**).

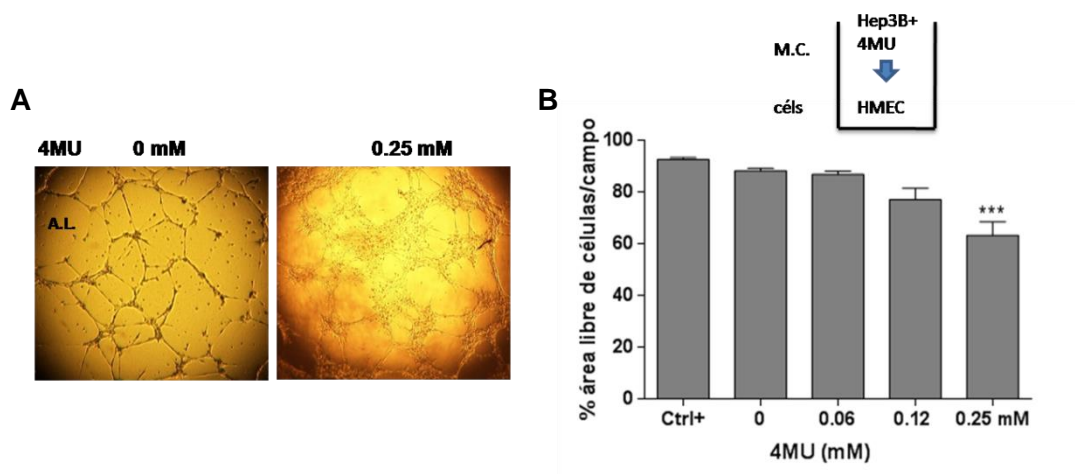


Figura 33. Ensayo de formación de tubos vasculares. **(A)** Las células endoteliales HMEC-1 fueron sembradas sobre placas cubiertas con Matrigel y estimuladas durante 6 hs con medio condicionado de células Hep3B pre-tratadas con 4MU. Magnificación 20X. (AL=área libre de células). **(B)** Cuantificación por densitometría del área libre de células, delimitada por la red de tubos vasculares. *** $p < 0.001$ vs. 0 mM, test Kruskal-Wallis, ANOVA. Las barras representan el % de área libre de células. Los resultados son representativos de al menos de 3 experimentos independientes.

5.12 Efecto de 4MU sobre la actividad metaloproteasa de líneas humanas de células endoteliales vasculares, células de HCC y células estrelladas hepáticas.

En base a que la producción de metaloproteasas por células del estroma tumoral ocurre en los tejidos durante el proceso angiogénico, evaluamos la capacidad de 4MU de modular la actividad de las metaloproteasas MMP-2 y -9 por zimografía, en tres líneas celulares implicadas en este contexto: una línea de células endoteliales vasculares (HMEC-1), una línea de células de HCC (Hep3B) y una línea de CEH (LX2). Encontramos que las células humanas HMEC-1 sólo presentaban actividad MMP-2, la cual disminuyó con una dosis de 0.25 mM de 4MU (**Figura 34A**). Las células Hep3B también presentaban actividad MMP-2, pero la misma no fue afectada significativamente por el tratamiento con 4MU (**Figura 34B**). En cambio, las células LX2 exhibieron actividad de MMP-9, la cual no sufrió cambios ante el tratamiento con 4MU (**Figura 34C**), y de MMP-2, que se redujo significativamente con la dosis 0.5 mM de 4MU (**Figura 34D**).

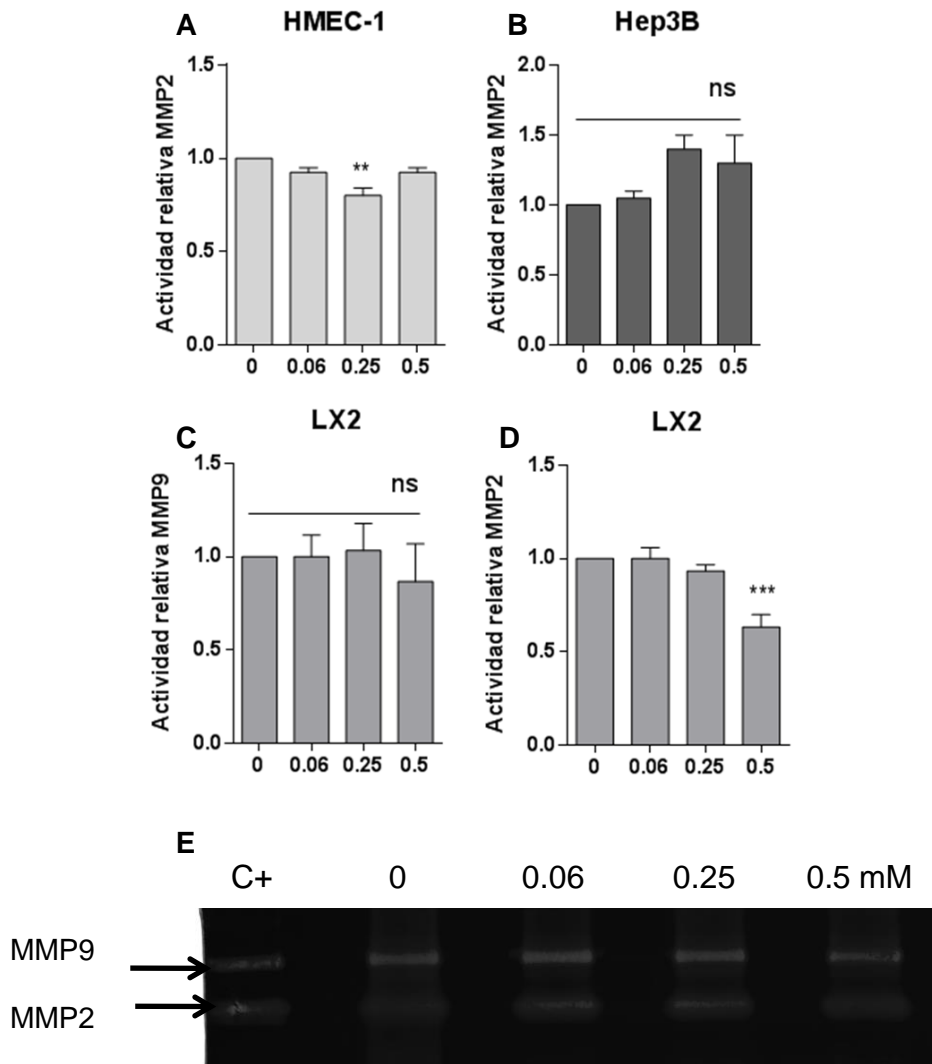


Figura 34. Efecto de 4MU sobre la actividad MMP-2 y -9 en líneas celulares *in vitro*. **(A)** Actividad MMP-2 en HMEC-1. **(B)** Actividad MMP-2 en Hep3B. **(C)** Actividad MMP-9 y **(D)** MMP-2 en la línea LX2. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ vs. 0 mM, test Kruskal-Wallis, ANOVA. **(E)** Zimografía representativa de sobrenadante de células LX2. Como control positivo (C+) se utilizó sobrenadante de una línea de fibroblastos HT-1080. La intensidad de las bandas de tres experimentos independientes fue determinada mediante densitometría y graficada como actividad relativa de MMP.

En resumen, en esta parte del trabajo de tesis observamos un efecto antitumoral más potente logrado mediante la administración oral de 4MU, y hallamos que sus mecanismos de acción implican una reducción de los factores proangiogénicos VEGF-A y SDF-1, así como también una menor producción de IL-6 tanto en el tumor como en el tejido adyacente no tumoral.

Parte III

En la última sección de esta tesis, estudiamos el rol de las células dendríticas en el desarrollo de la fibrosis hepática en el modelo experimental bajo estudio.

5.13 Evaluación del efecto de la depleción de las células dendríticas sobre el desarrollo de la fibrosis hepática.

En base al conocimiento de que las células dendríticas son importantes moduladoras del proceso fibrogénico hepático [31, 33, 34], decidimos evaluar su rol durante estadíos tempranos de la fibrogénesis. Para ello, se utilizaron dos estrategias experimentales diferentes. La primera implicó el empleo de ratones transgénicos CD11c.DTR, que permitían la ablación condicional de las CD con una inyección única de toxina diftérica (TD); una segunda estrategia consistió en expandir las CD mediante la administración de Flt-3L por 7 días consecutivos. Para evaluar el comienzo del proceso de fibrogénesis inducida por TAA en este modelo, evaluamos el depósito de colágeno mediante tinción con Rojo Sirio luego de 1, 2 y 3 semanas de tratamiento (**Figura 35**). El análisis histológico reveló una notoria presencia de colágeno a las 3 semanas de tratamiento con TAA. Por lo tanto, elegimos esta instancia (3s) para depletar o expandir las CD en el hígado, mientras que la administración de TAA se continuó hasta la semana 4.

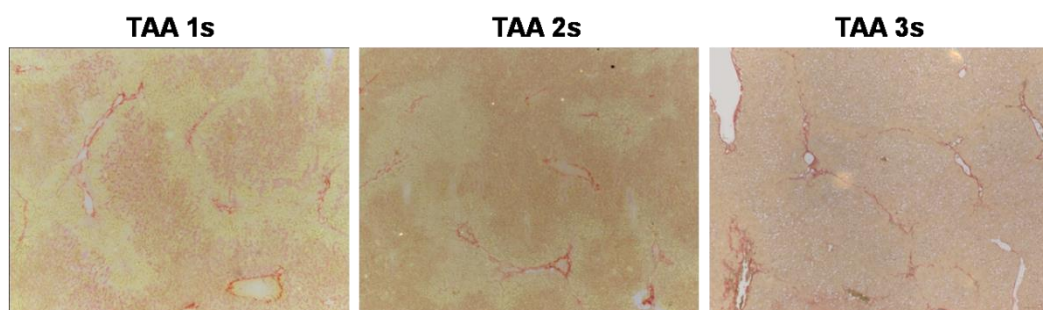
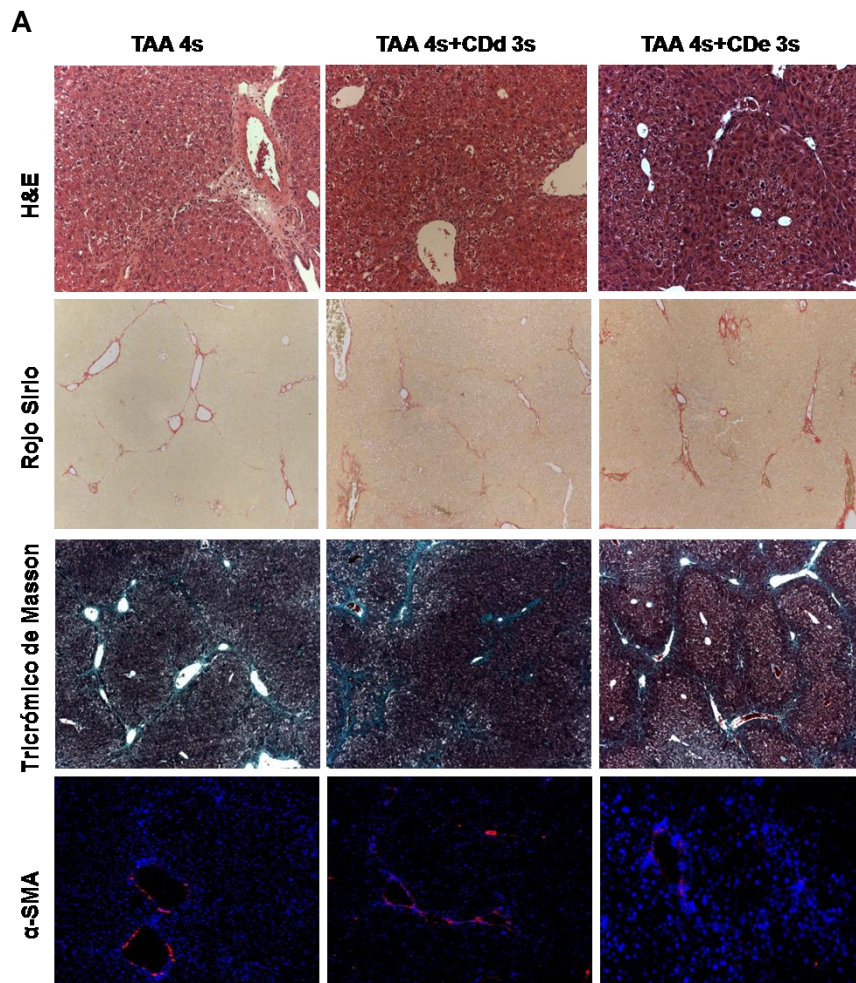


Figura 35. Tinción con Rojo Sirio para evaluar el depósito de colágeno en el hígado de ratones a los cuales se les administró TAA por 1, 2 y 3 semanas. Magnificación 50x.

Mediante las tinciones de Rojo Sirio y Tricrómico de Masson se observó que los hígados de los animales cuyas CD fueron depletadas (TAA 4s+CDd 3s) presentaban mayor depósito de colágeno y formación pseudo-lobular, indicativo de puentes de fibrosis (F3), respecto a los hígados de animales cuyas CD fueron expandidas (TAA 4s+CDd 3s) o el grupo control de ratones tratados con TAA (TAA 4s) (F1) (**Figura 36A**).



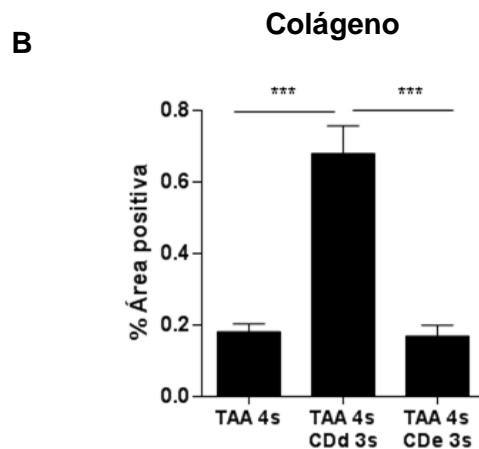


Figura 36. (A) Evaluación de H&E, Rojo Sirio, Tricrómico de Masson y α -SMA del hígado de los animales control (TAA 4s), con CD depletadas ó CD expandidas. Magnificación original 50x. **(B)** Cuantificación de colágeno a partir de la tinción con Rojo Sirio por morfometría. *** $p < 0.001$, test Bonferroni, ANOVA.

La depleción de CD también se asoció con un aumento de la presencia de CEH activadas en comparación con el grupo TAA 4s, dado que se observó una mayor expresión de α -SMA en el tejido hepático (**Figura 36A**). Para cuantificar el contenido de colágeno en el hígado, secciones de hígado de ratones tratados con TAA por 4 semanas se tiñeron con Rojo Sirio y luego fueron analizadas morfométricamente. Encontramos un aumento significativo del área positiva para Rojo Sirio en el grupo de ratones con depleción de CD al comparar con el grupo sin depleción o con expansión de CD (**Figura 36B**). Resultados similares se observaron en el modelo de CCl_4 , que produce fibrosis hepática por mecanismos análogos a los de TAA (**Figura 37A,B**), denotando que el efecto observado no es dependiente sólo de la fibrosis inducida por esta droga.

A

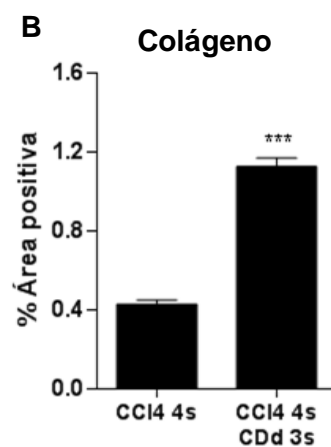
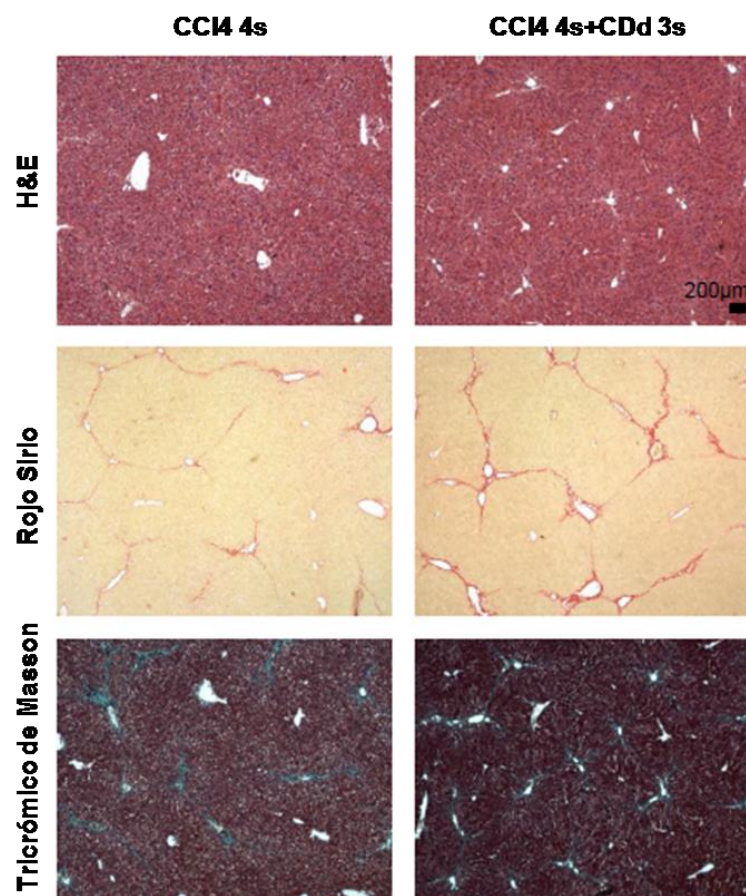


Figura 37. (A) Evaluación de H&E, Rojo Sirio, Tricrómico de Masson y α -SMA del hígado de los animales con fibrosis inducida por CCl₄. Magnificación original 50x. **(B)** Cuantificación de colágeno a partir de la tinción con Rojo Sirio por morfometría. *** $p < 0.001$, test Bonferroni, ANOVA.

Además, como se muestra en la **Tabla 3**, las enzimas hepáticas (ALT, AST y FAL) aumentaron significativamente en el hígado de los ratones con CD depletadas en

comparación con los ratones que sólo tenían fibrosis (TAA 4s), indicando mayor necrosis de hepatocitos y colastasis.

Grupos	ALT (U/l)	AST (U/l)	FAL (U/l)
TAA 4s	301.8±24.4 ^a	323.6±45.5 ^d	183.3±24.1 ^a
TAA 4s CDd 3s	291.3±26.1 ^a	535.6±25.8 ^{d**}	206.5±10.7 ^a
		213.5±8.4 ^d	79.7±10.5 ^a
		295.8±12.3 ^{d*}	161.8±4.3 ^{d**}

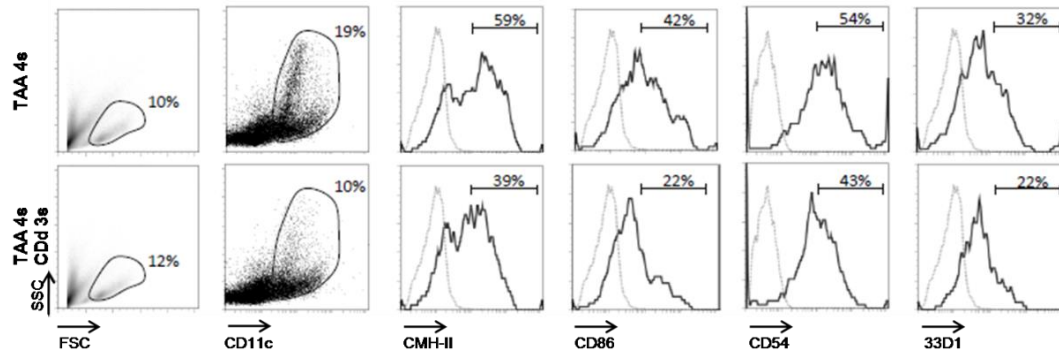
Tabla 3. Cambios en actividad de las enzimas hepáticas alanina aminotransferasa [133], aspartato aminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina (FAL) en suero, en ratones con fibrosis y depleción de CD. Los valores están expresados como promedio de 5 mediciones diferentes ± EST. Los valores con diferentes superíndices representan el análisis realizado a=antes y d=después de la depleción de CD en animales que recibieron TAA. *p<0.05 y **p<0.01 vs TAA 4s, test Mann-Whitney.

5.14 Estudio del efecto de la ablación de células dendríticas sobre el perfil de citoquinas durante la fibrogénesis hepática.

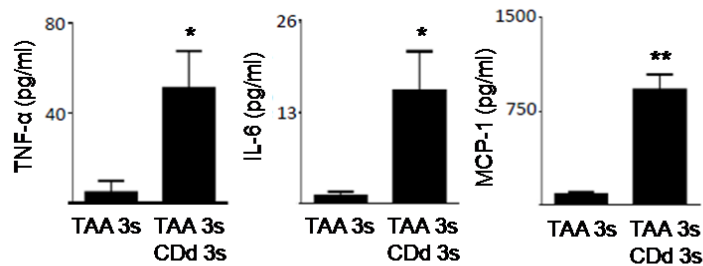
Para definir los mecanismos por medio de los cuales las CD influyen en la fibrogénesis, evaluamos el fenotipo de las células CD11c+ aisladas de los hígados de los grupos de ratones TAA y TAA-dCD, siendo que el marcador CD11c es uno de los más utilizados para la identificación de CD [10]. Como se observa en la **Figura 38A**, la expansión de las CD durante el proceso de fibrogénesis se retrasó en el grupo TAA 4s-CDd 3s, evidenciado por un bajo porcentaje de células no parenquimatosas CD11c+. En particular, las CD CD11c+ aisladas de los hígados del grupo TAA 4s-CDd 3s exhibieron un fenotipo inmaduro al ser comparadas con las CD del grupo control (TAA 4s), dado por la menor expresión de moléculas coestimuladoras (**Figura 38A**). Además, las citoquinas inflamatorias TNF- α , IL-6 y MCP-1 aumentaron su expresión inmediatamente luego de la depleción de CD en la semana 3 (**Figura 38B**). Sin embargo, a la cuarta semana de tratamiento con TAA las cantidades de TNF- α e IL-6 se

restablecieron a los niveles del control (**Figura 38C**). Esto fue acompañado además por una disminución significativa de IL-10 (**Figura 38C**).

A



B



C

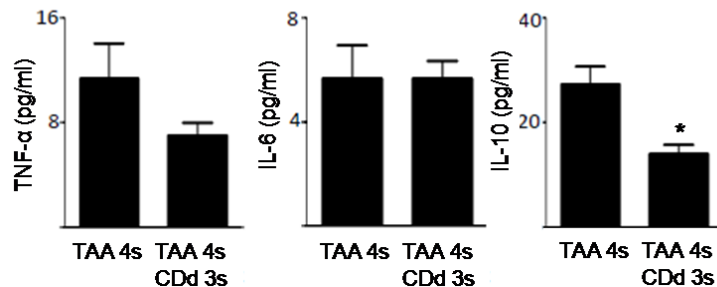


Figura 38. (A) Caracterización de las CD hepáticas por citometría de flujo. La línea gris representa el control de isotipo. **(B)** Determinación de citoquinas inflamatorias en suero por Cytometric Beads Assay (CBA), en ratones con 3 semanas de inducción de fibrosis por TAA y depleción de CD. **(C)** Determinación de citoquinas inflamatorias en suero por CBA, en ratones con 4 semanas de inducción de fibrosis por TAA y depleción de CD. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ y $p < 0.01$ vs TAA 3s (B) ó TAA 4s (C), test Mann-Whitney, Student.

5.15 Estudio de la modulación expresión de citoquinas angiogénicas tras la ablación de las células dendríticas.

Se ha observado en algunos estudios que en determinados contextos las CD son capaces de influir en el proceso angiogénico, tanto en procesos fisiológicos como patológicos [104, 106, 164, 165]. Por este motivo decidimos examinar la expresión de marcadores endoteliales en el hígado tras la depleción de CD. En comparación con el grupo TAA 4s, en el cual se observó marca discreta de endoglina y VCAM-1 (**Figura 39A**), la activación de las células endoteliales se evidenció por un aumento notable de tinción positiva de ambos marcadores en los hígados del grupo TAA 4s-CDd 3s (**Figura 39A,B**). Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de endoglina soluble (Endoglina sérica) entre los grupos TAA 4s y TAA 4s-CDd 3s (**Figura 39C**).

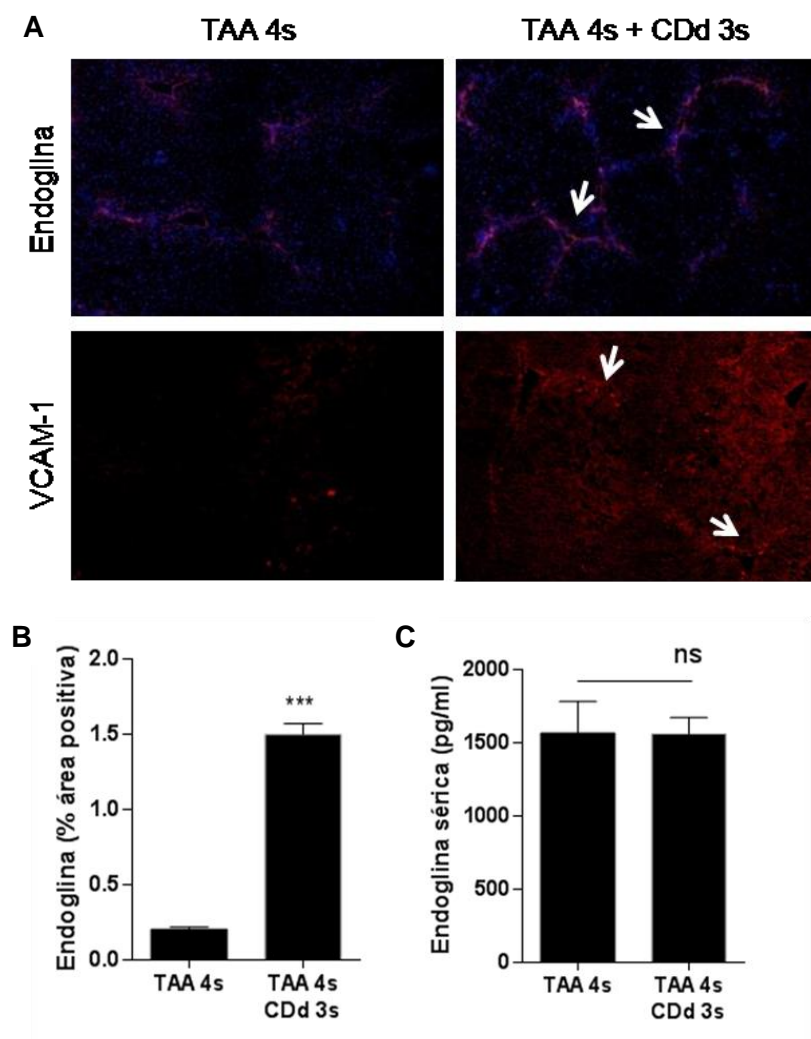


Figura 39. (A) Expresión de Endoglina y VCAM-1 en hígado analizada mediante inmunofluorescencia. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las flechas indican la señal positiva. **(B)** Cuantificación del área positiva para endoglina por morfometría. *** $p < 0.001$ vs TAA 4s. **(C)** Niveles de endoglina soluble analizados por ELISA. ns= no significativo. Test Mann-Whitney.

Por otro lado, observamos que la depleción de CD durante la fibrogénesis no generó cambios significativos en los niveles de VEGF sérico (**Figura 40A**); sin embargo, sí se observó una disminución significativa de la molécula antiangiogénica Flt-1 ó VEGFR1 (**Figura 40B**). Además, los niveles de ARNm de SDF-1 aumentaron significativamente tras la depleción de las CD durante la fibrogénesis (**Figura 40C**). Estas observaciones podrían reflejar un aumento de la biodisponibilidad de VEGF en el hígado, tal como se ha reportado previamente [163, 166].

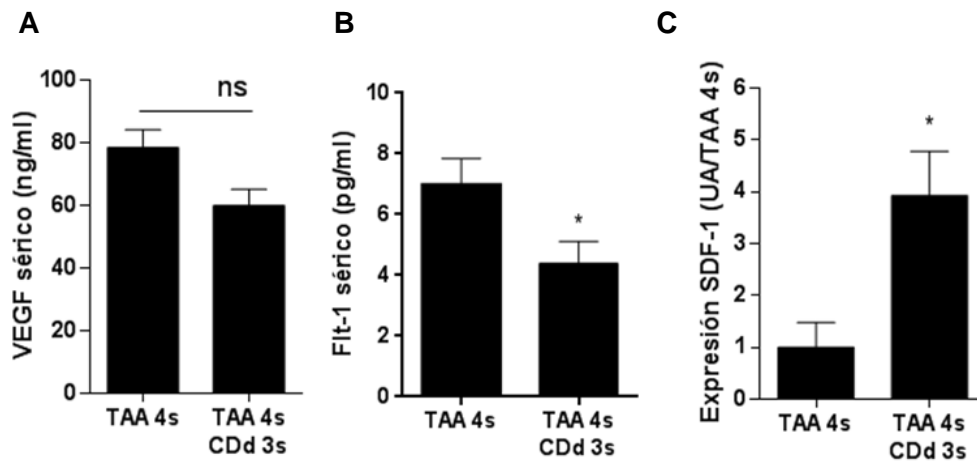


Figura 40. Determinación de **(A)** VEGF y **(B)** Flt-1 en suero por ELISA. **(C)** Expresión de SDF-1 en tejido hepático, analizado por PCR en tiempo real. * $p < 0.05$ vs TAA 4s, test Mann-Whitney.

Con el fin de definir el estado angiogénico tras la depleción de las CD, evaluamos el perfil de proteínas hepáticas relacionadas con la angiogénesis mediante un arreglo de proteínas. Como se muestra en la **Figura 41A y B**, proteínas pro-angiogénicas como angiogenina (ANG), factor tisular [107], factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF) y serpina E1 (PAI-1) se incrementaron al depletar las CD durante la

fibrogénesis. Además, factores antiangiogénicos como por ejemplo el factor derivado de pigmento epidérmico (PEDF), trombospondina-2 (TSP-2) y pentraxina-3 (PTX-3), y proteínas implicadas en regeneración hepática como el factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF-2), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), la proteína de unión a IGF 1 y 9 (IGFBP-1 y -9) disminuyeron por la depleción de las CD (**Figura 41C**), según la densitometría realizada sobre la señal positiva obtenida en arreglo proteico.

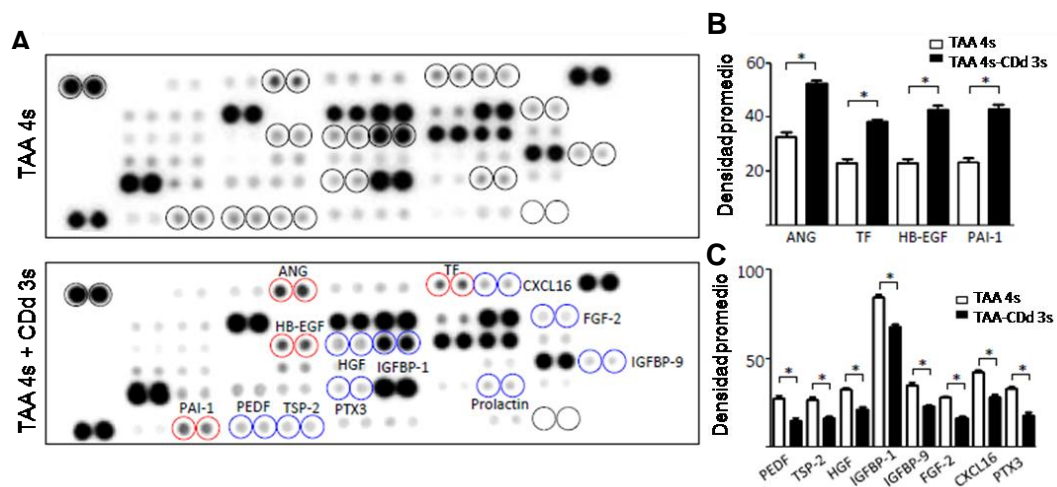


Figura 41. (A) Arreglo de proteínas angiogénicas analizado a partir de lisado de tejido hepático. Los círculos rojos indican las proteínas sobreexpresadas, los círculos azules indican las proteínas cuya expresión disminuyó respecto al control TAA 4s. **(B)** Cuantificación por densitometría de proteínas angiogénicas sobreexpresadas tras la depleción de CD. **(C)** Cuantificación por densitometría de proteínas angiogénicas subexpresadas tras la depleción de CD. *p<0.05 vs TAA 4s, ANOVA, post-test Bonferroni.

5.16 Rol de VEGFR1 en la regulación de la angiogénesis asociada a la fibrogénesis hepática y la depleción de células dendríticas.

Para establecer, además, el rol de las CD hepáticas en la biodisponibilidad de VEGF, evaluamos la expresión de Flt-1, el cual funciona como un inhibidor endógeno de VEGF [166], durante el inicio de la fibrogénesis en los ratones con tratamiento con TAA y depleción de CD a semana 3. En comparación al grupo control, ratones tratados con TAA en los cuales se observó abundante señal alrededor de vasos sanguíneos tras la inducción de fibrosis, la expresión de Flt-1 fue prácticamente nula en los ratones tratados con TAA y depletados de CD (**Figura 42A**). Adicionalmente, el proceso de

fibrogénesis resultó en una expresión aumentada de Flt-1 por las células no parenquimales CD11c⁺ aisladas de hígado (**Figura 42B**). Más aún, las células hepáticas CD11c⁺ estimuladas con LPS exhibieron una mayor expresión de Flt-1 en comparación con las CD no estimuladas, sugiriendo que las CD hepáticas maduras son capaces de regular la biodisponibilidad de VEGF de manera más eficiente. Para proveer evidencia directa que Flt-1 es capaz de prevenir una exacerbación de la fibrogénesis hepática durante la depleción de las CD, tratamos animales CD11c.DTR con Flt-1 soluble (Flt-1s) durante el período en el cual las CD estaban ausentes, tal como se describió en la sección de Materiales y Métodos. Se escogió una estrategia de reducción de biodisponibilidad de VEGF mediante proteína Flt-1s fusionada a Fc [167], por sobre la de Flt-1 mediada por adenovirus, dada la elevada hepatotoxicidad de ésta última [168].

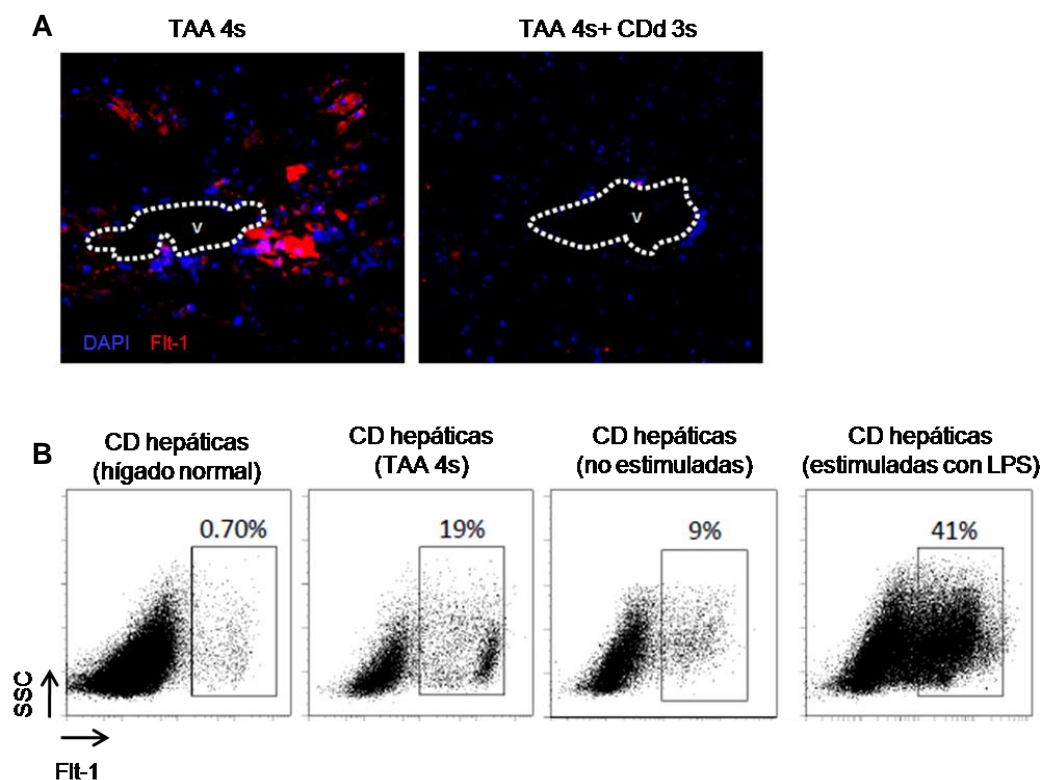


Figura 42. (A) Expresión de Flt-1 analizada por inmunofluorescencia. Imágenes tomadas a 50x. (B) Expresión de Flt-1 por CD, analizada por citometría de flujo. Los resultados corresponden a 3 experimentos independientes.

Luego, evaluamos el efecto de la administración de Flt-1s sobre la fibrosis. Como se muestra en la Figura 43A y B, los animales con TAA, depleción de CD y Flt-1s mostraron similar depósito de colágeno frente al observado en el grupo control, con sólo TAA. Este dato sugiere que Flt-1 es suficiente para reducir la fibrosis hepática durante la depleción de CD, teniendo en cuenta que previamente observamos que la depleción de CD por sí misma incrementaba el grado de fibrosis respecto al grupo control.

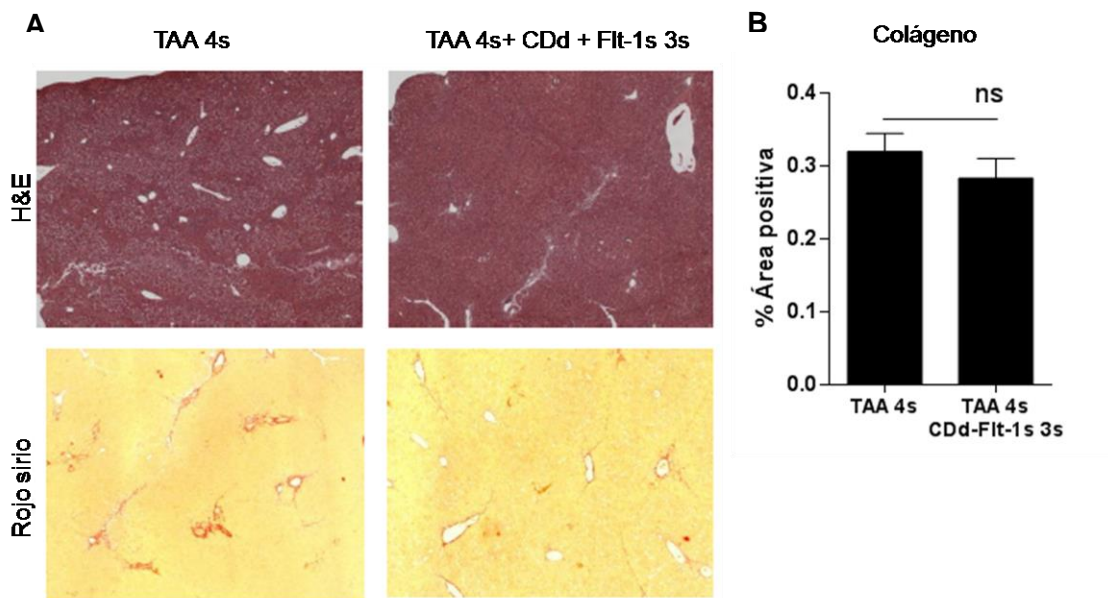


Figura 43. (A) Análisis por H&E y Rojo Sirio del tejido hepático de animales con TAA por 4 semanas ó TAA con CD depletadas y Flt-1s a semana 3. Magnificación: 50x. **(B)** Cuantificación del área positiva para colágeno a partir de la tinción con rojo sirio.

En síntesis, en esta tercer etapa mostramos que las CD desempeñan un rol importante en la regulación del proceso fibrogénico en el hígado, y uno de los mecanismos implicados en esta regulación es la modulación de la angiogénesis por parte de estas células. Además, demostramos un efecto antifibrogénico obtenido como consecuencia del tratamiento con la molécula antiangiogénica Flt-1 en el modelo murino empleado.

Discusión y Conclusión

6. Discusión.

La implicancia del AH en el modelo estudiado en esta tesis radica en el hecho de que la síntesis endógena de AH se encuentra exacerbada durante la fibrosis hepática, la cirrosis [169, 170] y la progresión tumoral [171]. Casi el 90% del AH circulante es metabolizado en el hígado por las CEH y células sinusoidales; por tal motivo la falla hepática deteriora el metabolismo del AH [172, 173]. Nuestra hipótesis de trabajo de la primera parte de esta tesis fue que la acumulación de AH en el hígado cumple un rol en la fibrogénesis hepática y, consecuentemente en el desarrollo de hepatocarcinoma. Por lo tanto, el objetivo de nuestro estudio fue determinar si 4MU era capaz de mejorar la fibrosis hepática y el crecimiento del HCC en un modelo murino ortotópico.

En este trabajo mostramos que 4MU, un inhibidor específico de la síntesis de AH, es un agente antiproliferativo y pro-apoptótico efectivo, con efectos antitumorales y antifibróticos tanto *in vitro* como *in vivo*.

En primer lugar analizamos la expresión de CD44, la síntesis de AH y la capacidad de unión de las células tumorales Hepa129, dado que no se había estudiado previamente. Observamos que estas células eran capaces de unir AH, en parte a través de CD44. Pero dado que la unión a AH no fue completamente bloqueada por el tratamiento con un anti-CD44 (KM81), se puede sugerir que estarían implicados otros receptores, hialadherinas o proteínas de unión, tales como LYVE-1, RHAMM o HARE [174, 175]. Además, las células Hepa129 producen elevadas cantidades de AH tal como determinamos mediante la proteína de unión de AH y ensayos tipo ELISA. Estos resultados se encuentran en concordancia con otros estudios en los que se demuestra que los tumores producen altas cantidades de AH [119]. De hecho, la elevada tasa de síntesis de AH ha sido asociada con un aumento de la migración, desarrollo de metástasis y sobrevida del tumor [119].

El HCC generalmente surge en un hígado cirrótico [176], por lo que resulta de gran importancia investigar el desarrollo de este tumor asociado a un microambiente fibrótico. Por tal motivo, llevamos a cabo un modelo de HCC ortotópico en ratones con

fibrosis avanzada, inducida por la administración crónica con TAA, en base a un modelo establecido por Kornek *et. al.* [150, 177] y luego modificado en nuestro laboratorio [178]. Este modelo nos permitió investigar el efecto de la inhibición de la síntesis de AH por 4MU en un contexto con similitudes al cáncer hepático clínico[176]. Como resultado, observamos que si bien la terapia con 4MU administrada intraperitonealmente no redujo el volumen del tumor principal, sí provocó una reducción del número de nódulos satélites, indicativos del grado de invasividad. Además, el análisis histológico reveló que el tejido tumoral de los animales tratados con 4MU presentaba extensas áreas de necrosis, indicando muerte de células tumorales, e infiltrado inflamatorio. Inclusive, observamos que el tratamiento con 4MU por vía intraperitoneal se asociaba a un menor desarrollo de ascitis severa en ratones con HCC y fibrosis.

Con el fin de determinar el efecto directo de esta droga sobre las células tumorales y confirmar estos resultados *in vivo*, llevamos a cabo ensayos de proliferación y apoptosis *in vitro* en una línea celular de HCC de ratón (Hepa129) y también en líneas humanas (Hep3B y Huh7). Como esperábamos, y muy probablemente por la gran cantidad de AH que producen las Hepa129, 4MU inhibió la proliferación e indujo la apoptosis de estas células. La misma tendencia, en cuanto a la inhibición de la proliferación y la inducción de la apoptosis tumoral, se observó en la línea Hep3B que también produce AH, pero en menor cantidad. Contrariamente, Huh7, que sintetiza bajas cantidades de AH presentó resistencia parcial al tratamiento con 4MU, confirmando que la actividad de 4MU tiene relación directa con su capacidad de inhibición de la síntesis de AH[133, 140]. Por otra parte, con el fin de descartar efectos tóxicos de 4MU, se evaluó su toxicidad *in vivo* en ratones sanos, e *in vitro* en un cultivo primario de hepatocitos. El perfil de toxicidad de 4MU se investigó en los ratones mediante su comportamiento general, sin signos evidentes de toxicidad. Tampoco se observaron cambios significativos en los niveles de ALT plasmática en los grupos estudiados, indicativos de hepatotoxicidad. Además, se preservó la arquitectura hepática en ratones sanos tratados con 4MU, y los hepatocitos aislados de ratones sanos no presentaron evidencias de citotoxicidad luego del tratamiento con

diferentes dosis de 4MU. Por lo tanto, se sugiere que 4MU es bien tolerado y presenta un perfil de toxicidad muy bajo.

En concordancia con otros autores, observamos que en los hígados con fibrosis, el AH se presenta disperso y en puentes de fibrosis [179, 180]. Tanto en la fibrosis como en el HCC se incrementó el AH presente en el tejido hepático y suero, lo que podría ser resultado de una síntesis aumentada y/o deficiencia del metabolismo [173]. Como esperábamos, el tratamiento con 4MU redujo el contenido de AH hepático y sérico en ratones con fibrosis avanzada y HCC. Estos resultados podrían indicar que los efectos inducidos por 4MU están íntimamente relacionados con su capacidad de inhibir la síntesis de AH. Además, 4MU redujo el depósito de AH no sólo en la zona intratumoral sino también en el parénquima adyacente no tumoral.

Se ha observado que el peso molecular del AH podría determinar su función biológica [181]. Hemos analizado el peso molecular del AH hepático por cromatografía (FPLC) y observamos que 4MU parece no afectar la función de AH por alteración de su peso molecular, sino sólo por su cantidad.

La síntesis y composición de la MEC, en particular de la formación de colágeno fibrilar, son pasos críticos durante la fibrogénesis hepática. En este sentido, en este trabajo mostramos que la terapia con 4MU mejora el grado de fibrosis en ratones con administración crónica de TAA. Los animales con tumor que recibieron además TAA mostraron un estadio de fibrosis F2-F3, mientras que los tratados con 4MU presentaron un estadio F1-F2 de fibrosis, determinado por el índice de Metavir (en el cual F0= sin fibrosis, F4= cirrosis). El análisis densitométrico del depósito de colágeno en el tejido hepático con tinción con Rojo Sirio mostró disminución en el grupo de los animales tratados con 4MU en comparación a los animales sin tratamiento.

Los miofibroblastos normalmente se acumulan en el parénquima, cercanos a las zonas de injuria hepática. Muchos de ellos derivan en su mayoría de CEH residentes, que constituyen la principal fuente de colágeno fibrilar. En términos de estudios inmunohistoquímicos, observamos una disminución en el número de miofibroblastos α -SMA⁺ en los hígados con fibrosis de los animales tratados con 4MU. Además, al analizar *in vitro* la acción de 4MU sobre las células tipo miofibroblastos ó fibroblastos

observamos que todas las dosis estudiadas de 4MU inducían apoptosis e inhibían la proliferación celular significativamente, indicando una alta dependencia al AH para la supervivencia, apoyando la idea de que el 4MU posee un efecto antifibrótico. Asimismo, otros estudios han demostrado que el AH es esencial en la diferenciación de miofibroblastos por regulación de la respuesta del TGF- β , principal mediador de la progresión de la fibrosis [182, 183]. No obstante, resultan necesarios más estudios para evaluar posibles mecanismos, incluyendo a 4MU como modulador de la respuesta de TGF- β , en el contexto de la fibrosis hepática.

En una etapa posterior, con el fin de optimar el efecto antitumoral observado con la administración intraperitoneal de 4MU, optamos por la administración de esta droga por vía oral y en una dosis mayor, teniendo en cuenta que ya se había utilizado esta forma de administración en otros estudios [133, 141]. En este caso, 4MU inhibió el crecimiento del tumor principal en un 67%, y además redujo en un 86% el número de nódulos satélites al comparar con ratones con tumor que no recibieron el tratamiento con 4MU. Además, este potente efecto antitumoral se vio reflejado en un incremento en la supervivencia de los animales tratados con 4MU.

Las células tumorales y células estromales reclutadas constituyen el microambiente tumoral y la fuerza que impulsa la progresión y metástasis[184]. La matriz extracelular es parte de este microambiente, siendo el ácido hialurónico un componente importante. Ha sido ampliamente demostrado que la producción exacerbada de AH, particularmente de fragmentos pequeños de AH, son capaces de inducir angiogénesis en diversos tumores[185-187].

En base a que en nuestro modelo de HCC y fibrosis la inhibición de la síntesis de AH por 4MU redujo la fibrosis hepática y retrasó el desarrollo tumoral, y considerando que el AH podría modular la angiogénesis [188], decidimos investigar si la terapia con 4MU tenía efectos sobre este proceso así como también sobre el microambiente tumoral. Nuestra hipótesis de esta segunda etapa fue que la inhibición de la síntesis de AH por 4MU en el entorno tumoral y el tejido adyacente no tumoral es capaz de reducir algunos de los factores pro-angiogénicos clave.

En particular, la información preexistente sobre los efectos de 4MU sobre la angiogénesis tumoral es escasa. Lokeshwar y col. han demostrado que la administración de 4MU regula negativamente las MMP-2 y -9 así como también a CXCR4 en cáncer de próstata, y observaron también una reducción en la microdensidad vascular [133]. Más tarde, García-Vila y col. hallaron efectos anti-angiogénicos de 4MU evaluados en células microvasculares endoteliales humanas e *in vivo* en membrana corioalantoica y en un modelo de pez cebra[134]. Por lo tanto, los efectos de 4MU sobre la angiogénesis en el contexto de HCC y fibrosis no habían sido estudiados hasta el momento.

En primer lugar investigamos si la reducción del volumen tumoral fue consecuencia de una modulación de la angiogénesis mediante la inhibición de la síntesis de AH lograda por la terapia con 4MU. Para tal fin, evaluamos microdensidad vascular hepática mediante inmunomarcación para CD31, un marcador expresado en células endoteliales. Encontramos una significativa reducción del área positiva para CD31 en el parénquima hepático de los animales tratados con 4MU en comparación con el grupo salino, aunque no observamos tinción significativa en el área tumoral. Luego, la presencia de VEGF, principal factor pro-angiogénico [96], fue cuantificado en suero, en tejido tumoral y parénquima hepático no tumoral. Encontramos, notoriamente, una reducción significativa en los niveles proteicos de VEGF en el suero de los animales tratados con 4MU, en comparación con el grupo salino, y la misma tendencia se observó en secciones de hígado inmunomarcadas para VEGF. Estos resultados aquí reportados sugieren que 4MU es capaz de modular la formación de vasculatura patológica generada durante la fibrosis hepática. En línea con estas observaciones, estudiamos de manera separada los efectos de 4MU sobre la angiogénesis en tumores de HCC y parénquima hepático no tumoral. Encontramos que en ambas zonas hubo una reducción significativa de la expresión de las proteínas VEGF e IL-6 en los animales tratados con 4MU, al ser comparados con los animales sin tratamiento. Estos resultados tienen particular importancia dado que la IL-6 se encuentra aumentada en la cirrosis, y es además una citoquina clave para el desarrollo del HCC[77]. Más aún, varias vías de señalización pro-angiogénicas relacionadas con IL-6 han sido descritas, como IL-6/HIF-1 α en cáncer de ovario, y STAT-3/VEGF en cáncer

de mama [77]. Por lo tanto, la reducción de VEGF e IL-6 tanto en el parénquima hepático como en el tumor sugieren un rol antiangiogénico para 4MU en nuestro modelo tumoral.

Grunewald y col. [163] mostraron en su trabajo que en la situación de injuria VEGF induce la expresión de SDF-1 en fibroblastos perivasculares, y concomitantemente esta citoquina atrae y retiene células derivadas de médula ósea CXCR4+, estimulando la proliferación del endotelio vascular durante la angiogénesis. En concordancia con estas observaciones, la expresión del ARNm de SDF-1 también se redujo significativamente por 4MU tanto en los tumores como en el parénquima hepático, posiblemente relacionado con la regulación negativa de VEGF.

Dada la relevancia de la IL-6 en este contexto, como se mencionó anteriormente, nos propusimos discernir qué tipo de células eran las responsables de la modulación de IL-6 por la terapia con 4MU. Para ello estudiamos la producción de IL-6 por las células Hepa129 y de Kupffer utilizando distintas dosis de 4MU. Notoriamente, hallamos una reducción significativa de los niveles proteicos de IL-6 en ambos tipos celulares. Llamativamente, en las células tumorales Hepa129 observamos que la reducción de IL-6 obtenida con 0.25 mM de 4MU fue revertida por la adición de AH, indicando que el efecto fue específico de la inhibición de AH. Se ha visto que IL-6 se une selectivamente a varios glucosaminoglicanos incluyendo AH [135, 136, 189]; además, se demostró en células de mieloma que el AH producido por éstas podía retener y concentrar IL-6 en la proximidad del sitio de secreción, favoreciendo un ciclo autócrino de activación, característico de esta citoquina [136]. Más aún, en un trabajo previo se demostró que el AH induce a macrófagos de médula ósea a secretar IL-6 [121]. Por lo tanto, podríamos hipotetizar que el AH sobreproducido por las células de HCC y células estromales retienen la IL-6 producida por ellas, favoreciendo el ciclo autócrino de activación, y resultando consecuentemente en la estimulación del crecimiento tumoral en nuestro modelo de estudio. Adicionalmente, se ha observado que el AH se acumula en pulmón injuriado y en fibrosis, y que fragmentos de AH de bajo peso molecular estimulan a los macrófagos locales para que produzcan citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento[190]. Esto, a su vez, activa a los fibroblastos para que produzcan más componentes de matriz extracelular. Adicionalmente, los

macrófagos expresan CD44, principal receptor de AH, en su superficie lo que indica que el AH se une a estas células [190]. Esta información está en consonancia con el efecto de la inhibición de AH ejercida por 4MU en las células de Kupffer en nuestro modelo animal. Entonces, 4MU es capaz de modular la producción de IL-6 por células de HCC y Kupffer. Sin embargo, más estudios son necesarios para elucidar los mecanismos moleculares que conducen a la reducción de IL-6 por 4MU en nuestro modelo de estudio.

Los estadios de la angiogénesis incluyen (1) dilatación y aumento de permeabilidad de vasos sanguíneos, que normalmente es estimulado por VEGF; (2) subsecuente degradación de la membrana basal, matriz extracelular y desprendimiento de pericitos; (3) estímulos angiogénicos, que luego facilitan la proliferación y migración de células endoteliales, y finalmente, (4) estabilización del nuevo vaso sanguíneo [191].

Se conoce que los factores producidos por las células tumorales son capaces de inducir la migración de células endoteliales, promoviendo la angiogénesis tumoral [83]. Realizamos ensayos *in vitro* de formación de tubos y migración de células endoteliales para evaluar otros efectos antiangiogénicos de 4MU. Observamos que el pretratamiento con 4MU sobre las células Hep3B fue capaz de inhibir la formación de tubos y la migración de células endoteliales HMEC-1, cuando fue utilizado como medio condicionado estimulante. Estos resultados indican que los factores secretados por las células tumorales de HCC, productoras de AH, estimulan el comportamiento de las células endoteliales vasculares, favoreciendo la formación de nuevos vasos; y que 4MU es capaz de modular dichos factores, afectando tal proceso.

Por otro lado, en cuanto al efecto *in vitro* de MMPs secretadas por células implicadas en el microambiente tumoral y parénquima del hígado fibrótico, observamos que 4MU redujo la actividad MMP-2 en una línea de CEH humanas, LX2, indicando que la inhibición de la síntesis de AH afecta otro de los estadios del proceso angiogénico.

Entonces, en esta etapa mostramos que la administración oral de 4MU en nuestro modelo de HCC con fibrosis subyacente ejerce potentes propiedades antitumorales *in vivo* por mecanismos que implican una reducción de factores pro-

angiogénicos como VEGF, SDF-1 e IL-6, tanto en el tumor de HCC como en el parénquima hepático adyacente no tumoral.

Por lo tanto, dadas las escasas opciones de tratamiento y sobrevida de pacientes con HCC avanzado, 4MU resulta una molécula promisoría en el campo de esta enfermedad asociada a fibrosis hepática. No obstante, la terapia con 4MU combinada con otras drogas con efecto antitumoral y/o antiangiogénicas podría constituir una futura estrategia de mayor impacto, capaz de reducir más drásticamente los tumores de HCC y así aumentar la sobrevida de los pacientes.

En esta tesis también exploramos el rol de las células dendríticas en los estadios tempranos de la fibrogénesis hepática *in vivo*. Estas células, si bien se caracterizan principalmente por ser presentadoras de antígeno por excelencia e inducir la respuesta inmune [10], en el contexto del hígado presentan un fenotipo tolerogénico [31]. Particularmente, en la progresión de la fibrosis se ha demostrado que las CD juegan un rol clave [31, 33], generando un microambiente inmunosupresor; así como también favorecen la regresión de la fibrosis [34]. Además, la angiogénesis y la disrupción de la arquitectura vascular ha sido vinculada a la progresión de esta patología. De hecho, un estudio reciente en ratones mostró que la administración de una quemoquina angiostática (CXCL9) atenúa la angiogénesis y la fibrosis hepática experimental *in vivo* [192]. Asimismo, se conoce que en varios contextos fisiopatológicos, como por ejemplo el cáncer, las CD son capaces de contribuir con el proceso angiogénico [104, 106, 164, 165], pero su rol como reguladoras de la angiogénesis en la fibrosis hepática no había sido aclarado completamente. En este trabajo mostramos que la ablación de CD resultó en la aceleración de la fibrosis hepática. Observamos que los hígados depletados de CD se caracterizaron por un cambio en el entorno de citoquinas, y particularmente un fenotipo predominante de CD inmaduras, caracterizado por una baja expresión de marcadores CMH-II, CD86, CD54 y 33D1; mientras que los animales control presentaban CD con un fenotipo prevalentemente maduro. Además, la angiogénesis se potenció al depletar las CD debido, al menos en parte, a una reducción de los niveles de Flt-1 tanto a nivel hepático como a nivel sistémico, lo que podría indicar un aumento consecuente la

biodisponibilidad de VEGF. Más aún, la fibrosis experimental conllevó a un aumento de la expresión de Flt-1 en las CD hepáticas, en comparación a con las CD derivadas de hígados sanos. Asimismo, la estrategia angiostática experimental por medio de la administración de Flt-1s/Fc fue capaz de disminuir notoriamente la fibrosis hepática inducida por la depleción de CD. Colectivamente, este estudio describe un rol clave para las CD hepáticas en la angiogénesis asociada a la fibrogénesis hepática. Hemos demostrado que la presencia de las CD ejerce un efecto protector en el desarrollo de la fibrosis hepática experimental. Si bien se ha observado previamente que alteraciones en la frecuencia de las CD juegan un rol en la regresión de la fibrosis hepática, debido a su capacidad de secretar MMP-9 [34], el trabajo aquí desarrollado es el primero en describir la implicancia de las CD en fases tempranas del proceso fibrogénico en el hígado. De hecho, la depleción de CD tanto en el modelo de TAA como en el de CCl₄ provocó un aumento del depósito de colágeno y del grado de fibrosis en comparación con el grupo control de ratones sin depleción de CD. Este efecto además fue acompañando por un aumento en la activación de células estrelladas hepáticas, que son el tipo celular pro-fibrogénico más relevante en enfermedades hepáticas crónicas, tal como se evaluó mediante la expresión de α -SMA. Esto resulta de particular importancia, ya que las CEH en su estado activado favorecen a la promoción de la angiogénesis, la cual contribuye a su vez al desarrollo de la fibrosis hepática [193, 194].

En este trabajo mostramos que los niveles de Flt-1s circulantes disminuyeron al depletar las CD, reflejando un posible aumento en la biodisponibilidad de VEGF. Esto a su vez podría explicar el aumento de la expresión de SDF-1 en el hígado de los animales con CD depletadas, de acuerdo a lo expuesto por Grunewald *et. al.* [163]. Este punto es de particular importancia debido a que se ha observado que la vía SDF-1/CXCR4 ejerce un rol importante en el reclutamiento y retención de células del sistema inmune en el hígado de pacientes con infección crónica con VHC y VHB [195]. Asimismo, la endogлина, que es parte del complejo del receptor de TGF- β , se sobreexpresó en el endotelio sinusoidal hepático tras la depleción de CD, sugiriendo que TGF- β podría participar en la precipitación de la angiogénesis. De hecho, el análisis de las proteínas hepáticas provenientes de ratones con depleción de CD mostró un perfil pro-angiogénico en comparación con los ratones con fibrosis sin

depleción de CD. Es de destacar que la depleción de las CD en la fibrosis experimental promovió la regulación negativa de proteínas implicadas en la regeneración hepática (como FGF, IGFBP-1 y -9) y también de factores antiangiogénicos. Bajo estas circunstancias, la angiogénesis se disparó al depletar a las CD.

Por lo tanto, sugerimos que la sobreproducción de factores de crecimiento angiogénicos generados luego de la depleción de CD durante estadíos tempranos de la fibrogénesis hepática podría jugar un importante rol en la patogénesis de esta enfermedad. Adicionalmente, proponemos un rol de las CD en la regulación de la biodisponibilidad de VEGF mediante la secreción de Flt-1 y mostramos que su depleción acelera el proceso de fibrogénesis. A partir de estos datos, la presencia y fenotipo de las CD durante estadíos tempranos de la fibrosis toman aún más relevancia, para ser consideradas como dianas de futuras terapias destinadas a mejorar la fibrosis hepática.

7. Conclusión.

Los estudios desarrollados en esta tesis muestran que 4MU, un inhibidor específico de la síntesis de AH, es un compuesto no tóxico que posee actividad antitumoral y propiedades antifibróticas a nivel hepático. Estos efectos son consecuencia directa de las propiedades antiproliferativas y pro-apoptóticas que confiere la inhibición de la síntesis de AH sobre las células de HCC, fibroblastos y células estrelladas hepáticas. Asimismo, los mecanismos que subyacen a la ralentización del crecimiento tumoral y del grado de fibrosis implican una reducción de los factores pro-angiogénicos VEGF y SDF-1, así como también una disminución de la producción de IL-6 en el microambiente tumoral. Por lo tanto, la terapia con 4MU resulta una opción muy promisoriosa para el tratamiento de HCC asociado a fibrosis hepática.

Los resultados obtenidos en cuanto al rol de las CD en el proceso fibrogénico sugieren un papel crítico para las mismas en dicha patología, y su depleción resulta en una aceleración de la acumulación de colágeno principalmente por estimular la angiogénesis hepática. En este trabajo se describe además el novedoso impacto del tratamiento antiangiogénico con Flt-1 soluble en la fibrogénesis experimental, y sienta un precedente para evaluaciones futuras de su potencial uso terapéutico en enfermedades hepáticas asociadas a angiogénesis y fibrosis. Desde un punto de vista clínico, es posible sugerir a partir de los resultados obtenidos que la terapia con CD podría representar una herramienta prometedora para futuras estrategias antifibróticas.

8. Bibliografía.

- [1] Couinaud C. Le Foie: Etudes Anatomiques et Chirurgicales. New York: Masson publishing; 1957.
- [2] Porth, editor. Fisiopatología. Salud-enfermedad: un enfoque conceptual. . 7 edición ed: Editorial Panamericana; 2009.
- [3] Theise ND, Saxena R, Portmann BC, Thung SN, Yee H, Chiriboga L, et al. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology*. 1999;30:1425-33.
- [4] Catalano OA, Singh AH, Uppot RN, Hahn PF, Ferrone CR, Sahani DV. Vascular and biliary variants in the liver: implications for liver surgery. *Radiographics*. 2008;28:359-78.
- [5] Wallace K, Burt AD, Wright MC. Liver fibrosis. *Biochem J*. 2008;411:1-18.
- [6] Rappaport AM. The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). *Anat Rec*. 1958;130:16.
- [7] Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med*. 2000;21:49-98.
- [8] Robbins C. Patología estructural y funcional tomo II. 8 va edición. España: Elsevier Saunders; 2011.
- [9] Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev*. 2000;174:21-34.
- [10] Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology: with STUDENT CONSULT Online Access: Elsevier Health Sciences; 2011.
- [11] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005;115:209-18.
- [12] Friedman SL. Liver fibrosis—from bench to bedside. *Journal of hepatology*. 2003;38:38-53.
- [13] Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, Tran Van Nhieu J, Deveaux V, Li L, et al. CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med*. 2006;12:671-6.
- [14] Pinzani M, Rombouts K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. *Dig Liver Dis*. 2004;36:231-42.
- [15] Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis*. 1999;19:129-40.
- [16] Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH. The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. *J Clin Pathol*. 1978;31:395-414.
- [17] Heidelbaugh JJ, Bruderly M. Cirrhosis and chronic liver failure: part I. Diagnosis and evaluation. *Am Fam Physician*. 2006;74:756-62.
- [18] Xu R, Zhang Z, Wang F-S. Liver fibrosis: mechanisms of immune-mediated liver injury. *Cellular & molecular immunology*. 2011;9:296-301.
- [19] Mahmood S, Sho M, Yasuhara Y, Kawanaka M, Niiyama G, Togawa K, et al. Clinical significance of intrahepatic interleukin-8 in chronic hepatitis C patients. *Hepatology research*. 2002;24:413-9.
- [20] Hong F, Tuyama A, Lee TF, Loke J, Agarwal R, Cheng X, et al. Hepatic stellate cells express functional CXCR4: Role in stromal cell-derived factor-1 α -mediated stellate cell activation. *Hepatology*. 2009;49:2055-67.
- [21] Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol*. 2003;38 Suppl 1:S38-53.
- [22] Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology*. 2011;141:1572-85.

- [23] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115:209-18.
- [24] Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12:265-77.
- [25] Tiegs G, Lohse AW. Immune tolerance: what is unique about the liver. *Journal of autoimmunity*. 2010;34:1-6.
- [26] Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*. 2007;449:419-26.
- [27] Bleier JI, Katz SC, Chaudhry UI, Pillarisetty VG, Kingham TP, Shah AB, et al. Biliary obstruction selectively expands and activates liver myeloid dendritic cells. *The Journal of Immunology*. 2006;176:7189-95.
- [28] Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y-J, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*. 2000;18:767-811.
- [29] Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology*. 2013;140:22-30.
- [30] Hsu W, Shu S-A, Gershwin E, Lian Z-X. The current immune function of hepatic dendritic cells. *Cell Mol Immunol*. 2007;4:321-8.
- [31] Connolly MK, Bedrosian AS, Clair JM-S, Mitchell AP, Ibrahim J, Stroud A, et al. In liver fibrosis, dendritic cells govern hepatic inflammation in mice via TNF- α . *The Journal of clinical investigation*. 2009;119:3213-25.
- [32] Morelli AE, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7:610-21.
- [33] Watanabe T, Katsukura H, Chiba T, Kita T, Wakatsuki Y. Periportal and sinusoidal liver dendritic cells suppressing T helper type 1-mediated hepatitis. *Gut*. 2007;56:1445-51.
- [34] Jiao J, Sastre D, Fiel MI, Lee UE, Ghiassi-Nejad Z, Ginhoux F, et al. Dendritic cell regulation of carbon tetrachloride-induced murine liver fibrosis regression. *Hepatology*. 2012;55:244-55.
- [35] Sozzani S, Rusnati M, Riboldi E, Mitola S, Presta M. Dendritic cell-endothelial cell cross-talk in angiogenesis. *Trends in immunology*. 2007;28:385-92.
- [36] Fainaru O, Almog N, Yung CW, Nakai K, Montoya-Zavala M, Abdollahi A, et al. Tumor growth and angiogenesis are dependent on the presence of immature dendritic cells. *The FASEB Journal*. 2010;24:1411-8.
- [37] Starkel P, Leclercq I. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2011;25:319-33.
- [38] Hunter AL, Holscher MA, Neal RA. Thioacetamide-induced hepatic necrosis. I. Involvement of the mixed-function oxidase enzyme system. *J Pharmacol Exp Ther*. 1977;200:439-48.
- [39] Ambrose AM, De EF, Rather LJ. Toxicity of thioacetamide in rats. *J Ind Hyg Toxicol*. 1949;31:158-61.
- [40] Neal RA, Halpert J. Toxicology of thiono-sulfur compounds. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1982;22:321-39.
- [41] Muller A, Machnik F, Zimmermann T, Schubert H. Thioacetamide-induced cirrhosis-like liver lesions in rats--usefulness and reliability of this animal model. *Exp Pathol*. 1988;34:229-36.
- [42] Oren R, Dotan I, Papa M, Marravi Y, Aeed H, Barg J, et al. Inhibition of experimentally induced cirrhosis in rats by hypothyroidism. *Hepatology*. 1996;24:419-23.
- [43] Li X, Benjamin IS, Alexander B. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. *J Hepatol*. 2002;36:488-93.
- [44] El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132:2557-76.
- [45] El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132:2557-76.

- [46] Ohbayashi A OK, Mayumi M. Familial clustering of asymptomatic carriers of Australia antigen and patients with chronic liver disease or primary liver cancer. *Gastroenterology*. 1972;62:7.
- [47] Dominguez-Malagon H, Gaytan-Graham S. Hepatocellular carcinoma: an update. *Ultrastruct Pathol*. 2001;25:497-516.
- [48] Bosetti C, Turati F, La Vecchia C. Hepatocellular carcinoma epidemiology. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2014;28:753-70.
- [49] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55:74-108.
- [50] Sangiovanni A, Del Ninno E, Fasani P, De Fazio C, Ronchi G, Romeo R, et al. Increased survival of cirrhotic patients with a hepatocellular carcinoma detected during surveillance. *Gastroenterology*. 2004;126:1005-14.
- [51] Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*. 2004;127:S5-S16.
- [52] Llovet JM. Clinical and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl*. 2007;13:S13-6.
- [53] Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2003;362:1907-17.
- [54] El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, Reddy KR. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2008;134:1752-63.
- [55] Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008;48:1312-27.
- [56] Marquardt JU, Seo D, Andersen JB, Gillen MC, Kim MS, Conner EA, et al. Sequential transcriptome analysis of human liver cancer indicates late stage acquisition of malignant traits. *Journal of hepatology*. 2014;60:346-53.
- [57] Hoshida Y, Villanueva A, Kobayashi M, Peix J, Chiang DY, Camargo A, et al. Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008;359:1995-2004.
- [58] Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:674-87.
- [59] Nault JC, De Reynies A, Villanueva A, Calderaro J, Rebouissou S, Couchy G, et al. A hepatocellular carcinoma 5-gene score associated with survival of patients after liver resection. *Gastroenterology*. 145:176-87.
- [60] Wu SD, Ma YS, Fang Y, Liu LL, Fu D, Shen XZ. Role of the microenvironment in hepatocellular carcinoma development and progression. *Cancer Treat Rev*. 38:218-25.
- [61] Hernandez-Gea V, Toffanin S, Friedman SL, Llovet JM. Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 144:512-27.
- [62] Hernandez-Gea V, Toffanin S, Friedman SL, Llovet JM. Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2013;144:512-27.
- [63] Pietras K, Pahler J, Bergers G, Hanahan D. Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS Med*. 2008;5:e19.
- [64] Zhu XD, Zhang JB, Zhuang PY, Zhu HG, Zhang W, Xiong YQ, et al. High expression of macrophage colony-stimulating factor in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*. 2008;26:2707-16.
- [65] Benetti A, Berenzi A, Gambarotti M, Garrafa E, Gelati M, Dessy E, et al. Transforming growth factor-beta1 and CD105 promote the migration of hepatocellular carcinoma-derived endothelium. *Cancer Res*. 2008;68:8626-34.
- [66] 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. *Am J Pathol*. 2007;171:1608-18.
- [67] Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*. 2006;66:605-12.

- [68] Ryschich E, Lizdenis P, Ittrich C, Benner A, Stahl S, Hamann A, et al. Molecular fingerprinting and autocrine growth regulation of endothelial cells in a murine model of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2006;66:198-211.
- [69] Yu Q. The dynamic roles of angiopoietins in tumor angiogenesis. *Future Oncol.* 2005;1:475-84.
- [70] Xia Y, Chen R, Song Z, Ye S, Sun R, Xue Q, et al. Gene expression profiles during activation of cultured rat hepatic stellate cells by tumoral hepatocytes and fetal bovine serum. *J Cancer Res Clin Oncol.*136:309-21.
- [71] Sancho-Bru P, Juez E, Moreno M, Khurdayan V, Morales-Ruiz M, Colmenero J, et al. Hepatocarcinoma cells stimulate the growth, migration and expression of pro-angiogenic genes in human hepatic stellate cells. *Liver Int.*30:31-41.
- [72] Chung JS, Park S, Park SH, Park ER, Cha PH, Kim BY, et al. Overexpression of Romo1 promotes production of reactive oxygen species and invasiveness of hepatic tumor cells. *Gastroenterology.* 2012;143:1084-94. e7.
- [73] Eng C, Abraham R. The autophagy conundrum in cancer: influence of tumorigenic metabolic reprogramming. *Oncogene.* 2011;30:4687-96.
- [74] Karin M, Greten FR. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:749-59.
- [75] Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H, Takahashi H, Sato M, Takeyama H. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *British journal of cancer.* 2013;110:469-78.
- [76] Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science.* 2007;317:121-4.
- [77] He G, Karin M. NF- κ B and STAT3—key players in liver inflammation and cancer. *Cell research.* 2010;21:159-68.
- [78] Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, et al. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol.* 2001;35:421-30.
- [79] Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2005;42:1208-36.
- [80] Llovet JM, Bru C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis.* 1999;19:329-38.
- [81] Adair TH, Montani J-P. Overview of Angiogenesis. 2010.
- [82] Chung AS, Ferrara N. Developmental and pathological angiogenesis. *Annual review of cell and developmental biology.* 2011;27:563-84.
- [83] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011;473:298-307.
- [84] Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer.* 2003;3:422-33.
- [85] Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003;9:653-60.
- [86] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9:669-76.
- [87] Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis.* 2006;9:225-30; discussion 31.
- [88] Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, et al. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:11709-14.
- [89] Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem.* 1994;269:25646-54.

- [90] He Y, Rajantie I, Pajusola K, Jeltsch M, Holopainen T, Yla-Herttuala S, et al. Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Research*. 2005;65:4739-46.
- [91] Chung AS, Ferrara N. Developmental and pathological angiogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:563-84.
- [92] Tsai Y-P, Wu K-J. Hypoxia-regulated target genes implicated in tumor metastasis. *Journal of Biomedical Science*. 2012;19:102.
- [93] Kut C, Mac Gabhann F, Popel AS. Where is VEGF in the body? A meta-analysis of VEGF distribution in cancer. *Br J Cancer*. 2007;97:978-85.
- [94] Dong J, Grunstein J, Tejada M, Peale F, Frantz G, Liang WC, et al. VEGF-null cells require PDGFR alpha signaling-mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis. *EMBO J*. 2004;23:2800-10.
- [95] Chen JA, Shi M, Li JQ, Qian CN. Angiogenesis: multiple masks in hepatocellular carcinoma and liver regeneration. *Hepatol Int*. 2010;4:537-47.
- [96] Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Kinnman N, Rey C, Poupon R, et al. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology*. 2002;35:1010-21.
- [97] Zhu AX, Duda DG, Sahani DV, Jain RK. HCC and angiogenesis: possible targets and future directions. *Nature reviews Clinical oncology*. 2011;8:292-301.
- [98] Goel S, Duda DG, Xu L, Munn LL, Boucher Y, Fukumura D, et al. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev*. 2011;91:1071-121.
- [99] Villanueva A, Llovet JM. Targeted therapies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2011;140:1410-26.
- [100] Kudo M, Imanaka K, Chida N, Nakachi K, Tak W-Y, Takayama T, et al. Phase III study of sorafenib after transarterial chemoembolisation in Japanese and Korean patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *European Journal of Cancer*. 2011;47:2117-27.
- [101] Thomas MB, Morris JS, Chadha R, Iwasaki M, Kaur H, Lin E, et al. Phase II trial of the combination of bevacizumab and erlotinib in patients who have advanced hepatocellular carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27:843-50.
- [102] Llovet JM, Hernandez-Gea V. Hepatocellular carcinoma: reasons for phase III failure and novel perspectives on trial design. *Clinical Cancer Research*. 2014;20:2072-9.
- [103] Stockmann C, Schadendorf D, Klose R, Helfrich I. The impact of the immune system on tumor: angiogenesis and vascular remodeling. *Frontiers in oncology*. 2014;4.
- [104] Curiel TJ, Cheng P, Mottram P, Alvarez X, Moons L, Evdemon-Hogan M, et al. Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer research*. 2004;64:5535-8.
- [105] Feijó E, Alfaro C, Mazzolini G, Serra P, Peñuelas I, Arina A, et al. Dendritic cells delivered inside human carcinomas are sequestered by interleukin-8. *International Journal of Cancer*. 2005;116:275-81.
- [106] Conejo-Garcia JR, Benencia F, Courreges M-C, Kang E, Mohamed-Hadley A, Buckanovich RJ, et al. Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a β -defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A. *Nature medicine*. 2004;10:950-8.
- [107] Gottfried E, Kreutz M, Haffner S, Holler E, Iacobelli M, Andreesen R, et al. Differentiation of Human Tumour-associated Dendritic Cells into Endothelial-like Cells: An Alternative Pathway of Tumour Angiogenesis. *Scandinavian journal of immunology*. 2007;65:329-35.
- [108] Ricciardi A, Elia AR, Cappello P, Puppo M, Vanni C, Fardin P, et al. Transcriptome of hypoxic immature dendritic cells: modulation of chemokine/receptor expression. *Molecular Cancer Research*. 2008;6:175-85.
- [109] Toole BP. Hyaluronan is not just a goo! *J Clin Invest*. 2000;106:335-6.
- [110] Alaniz L, Garcia M, Rizzo M, Piccioni F, Mazzolini G. Altered hyaluronan biosynthesis and cancer progression: an immunological perspective. *Mini Rev Med Chem*. 2009;9:1538-46.

- [111] Racine R, Mummert ME. Hyaluronan Endocytosis: Mechanisms of Uptake and Biological Functions. 2012.
- [112] Stern R, editor Hyaluronidases in cancer biology. Seminars in cancer biology; 2008: Elsevier.
- [113] Roden L, Campbell P, Fraser JRE, Laurent TC, Pertoft H, Thompson JN. Enzymic pathways of hyaluronan catabolism. The Biology of Hyaluronan D Evered and J Whelan, editors John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK. 1989:61-86.
- [114] Yasuda T. Hyaluronan Inhibits Akt, Leading to Nuclear Factor- κ B Down-Regulation in Lipopolysaccharide-Stimulated U937 Macrophages. Journal of pharmacological sciences. 2011;115:509-15.
- [115] Yasuda T. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is inhibited by hyaluronan via intercellular adhesion molecule-1 in articular chondrocytes stimulated with type II collagen peptide. Journal of pharmacological sciences. 2012;118:25-32.
- [116] Jackson DG. Immunological functions of hyaluronan and its receptors in the lymphatics. Immunological Reviews. 2009;230:216-31.
- [117] Weigel PH, Yik JH. Glycans as endocytosis signals: the cases of the asialoglycoprotein and hyaluronan/chondroitin sulfate receptors. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 2002;1572:341-63.
- [118] Weigel JA, Raymond RC, McGary C, Singh A, Weigel PH. A blocking antibody to the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE) inhibits hyaluronan clearance by perfused liver. Journal of Biological Chemistry. 2003;278:9808-12.
- [119] Toole BP. Hyaluronan promotes the malignant phenotype. Glycobiology. 2002;12:37R-42R.
- [120] Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. Nat Rev Cancer. 2004;4:528-39.
- [121] Noble PW, Lake F, Henson P, Riches D. Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism in murine macrophages. Journal of Clinical Investigation. 1993;91:2368.
- [122] Tammi MI, Day AJ, Turley EA. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. J Biol Chem. 2002;277:4581-4.
- [123] Nandi A, Estess P, Siegelman MH. Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44. J Biol Chem. 2000;275:14939-48.
- [124] Tammi RH, Kultti A, Kosma V-M, Pirinen R, Auvinen P, Tammi MI, editors. Hyaluronan in human tumors: pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. Seminars in cancer biology; 2008: Elsevier.
- [125] Simpson MA, Wilson CM, McCarthy JB. Inhibition of prostate tumor cell hyaluronan synthesis impairs subcutaneous growth and vascularization in immunocompromised mice. Am J Pathol. 2002;161:849-57.
- [126] Itano N, Kimata K. Altered hyaluronan biosynthesis in cancer progression. Semin Cancer Biol. 2008;18:268-74.
- [127] Boregowda RK AHSM, Kumarswamy SB, Sunila S, Thimmaiah K.N, KarunaKumar M, Toole B, Banerjee S. Expression of Hyaluronan in human tumor progression. Journal of Carcinogenesis. 2006;5.
- [128] Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T, Biesterfeldt J, Augustine ML, Calabro A, Jr., et al. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. J Clin Invest. 2000;106:349-60.
- [129] Funamoto Y, Nagai M, Habu R, Kishida F, Kohno K, Kobayashi S. Hyaluronan synthesis by anaplastic large cell lymphoma with massive lymphomatous effusion. A case report. Acta Cytol. 2002;46:864-8.

- [130] Slavkovsky R, Kohlerova R, Jiroutova A, Hajzlerova M, Sobotka L, Cermakova E, et al. Effects of hyaluronan and iodine on wound contraction and granulation tissue formation in rat skin wounds. *Clinical and experimental dermatology*. 2010;35:373-9.
- [131] Sattar A, Rooney P, Kumar S, Pye D, West DC, Scott I, et al. Application of angiogenic oligosaccharides of hyaluronan increases blood vessel numbers in rat skin. *Journal of investigative dermatology*. 1994;103:576-9.
- [132] Itano N, Zhuo L, Kimata K. Impact of the hyaluronan-rich tumor microenvironment on cancer initiation and progression. *Cancer Sci*. 2008;99:1720-5.
- [133] Lokeshwar VB, Lopez LE, Munoz D, Chi A, Shirodkar SP, Lokeshwar SD, et al. Antitumor activity of hyaluronic acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone in prostate cancer cells. *Cancer research*. 2010;70:2613-23.
- [134] García-Vilas JA, Quesada AR, Medina MAn. 4-Methylumbelliferone inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013;61:4063-71.
- [135] Ramsden L, Rider CC. Selective and differential binding of interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-2 and IL-6 to glycosaminoglycans. *European journal of immunology*. 1992;22:3027-31.
- [136] Vincent T, Jourdan M, Sy M-S, Klein B, Mechti N. Hyaluronic acid induces survival and proliferation of human myeloma cells through an interleukin-6-mediated pathway involving the phosphorylation of retinoblastoma protein. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:14728-36.
- [137] Kakizaki I, Kojima K, Takagaki K, Endo M, Kannagi R, Ito M, et al. A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279:33281-9.
- [138] Morohashi H, Kon A, Nakai M, Yamaguchi M, Kakizaki I, Yoshihara S, et al. Study of hyaluronan synthase inhibitor, 4-methylumbelliferone derivatives on human pancreatic cancer cell (KP1-NL). *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;345:1454-9.
- [139] Takeda S, Aburada M. The choleric mechanism of coumarin compounds and phenolic compounds. *Journal of pharmacobio-dynamics*. 1981;4:724-34.
- [140] Kultti A, Pasonen-Seppänen S, Jauhainen M, Rilla KJ, Kärnä R, Pyöriä E, et al. 4-Methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and downregulation of hyaluronan synthase 2 and 3. *Experimental cell research*. 2009;315:1914-23.
- [141] Yoshihara S, Kon A, Kudo D, Nakazawa H, Kakizaki I, Sasaki M, et al. A hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, inhibits liver metastasis of melanoma cells. *FEBS letters*. 2005;579:2722-6.
- [142] Arai E, Nishida Y, Wasa J, Urakawa H, Zhuo L, Kimata K, et al. Inhibition of hyaluronan retention by 4-methylumbelliferone suppresses osteosarcoma cells in vitro and lung metastasis in vivo. *British journal of cancer*. 2011;105:1839-49.
- [143] Heffler M, Golubovskaya V, Conroy J, Liu S, Wang D, Cance W, et al. FAK and HAS Inhibition Synergistically Decrease Colon Cancer Cell Viability and Affect Expression of Critical Genes. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2013;13:584.
- [144] Twarock S, Freudenberger T, Poscher E, Dai G, Jannasch K, Dullin C, et al. Inhibition of oesophageal squamous cell carcinoma progression by in vivo targeting of hyaluronan synthesis. *Mol Cancer*. 2011;10:30.
- [145] Okuda H, Kobayashi A, Xia B, Watabe M, Pai SK, Hirota S, et al. Hyaluronan Synthase HAS2 Promotes Tumor Progression in Bone by Stimulating the Interaction of Breast Cancer Stem-Like Cells with Macrophages and Stromal Cells. *Cancer research*. 2012;72:537-47.
- [146] Urakawa H, Nishida Y, Wasa J, Arai E, Zhuo L, Kimata K, et al. Inhibition of hyaluronan synthesis in breast cancer cells by 4-methylumbelliferone suppresses tumorigenicity in vitro and metastatic lesions of bone in vivo. *International Journal of Cancer*. 2012;130:454-66.
- [147] Uchakina ON, Ban H, McKallip RJ. Targeting hyaluronic acid production for the treatment of leukemia: Treatment with 4-methylumbelliferone leads to induction of MAPK-mediated apoptosis in K562 leukemia. *Leukemia research*. 2013;37:1294-301.

- [148] Benitez A, Yates TJ, Shamaldevi N, Bowen T, Lokeshwar VB. Dietary supplement hymecromone and sorafenib: a novel combination for the control of renal cell carcinoma. *The Journal of urology*. 2013;190:285-90.
- [149] Palacios RS, Roderfeld M, Hemmann S, Rath T, Atanasova S, Tschuschner A, et al. Activation of hepatic stellate cells is associated with cytokine expression in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *Laboratory investigation*. 2008;88:1192-203.
- [150] Kornek M, Raskopf E, Tolba R, Becker U, Klöckner M, Sauerbruch T, et al. Accelerated orthotopic hepatocellular carcinomas growth is linked to increased expression of pro-angiogenic and prometastatic factors in murine liver fibrosis. *Liver International*. 2008;28:509-18.
- [151] De Smet K, Beken S, Vanhaecke T, Pauwels M, Vercruyse A, Rogiers V. Isolation of rat hepatocytes. *Cytochrome P450 Protocols: Springer*; 1998. p. 295-302.
- [152] Smedsrød B. Protocol for preparation of mouse liver Kupffer cells and liver sinusoidal endothelial cells. 2012.
- [153] Beaussier M, Wendum D, Fouassier L, Rey C, Barbu V, Lasnier E, et al. Adaptive bile duct proliferative response in experimental bile duct ischemia. *Journal of hepatology*. 2005;42:257-65.
- [154] Raio L, Cromi A, Ghezzi F, Passi A, Karousou E, Viola M, et al. Hyaluronan content of Wharton's jelly in healthy and Down syndrome fetuses. *Matrix biology*. 2005;24:166-74.
- [155] Calabro A, Benavides M, Tammi M, Hascall VC, Midura RJ. Microanalysis of enzyme digests of hyaluronan and chondroitin/dermatan sulfate by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE). *Glycobiology*. 2000;10:273-81.
- [156] Karousou EG, Militsopoulou M, Porta G, De Luca G, Hascall VC, Passi A. Polyacrylamide gel electrophoresis of fluorophore-labeled hyaluronan and chondroitin sulfate disaccharides: Application to the analysis in cells and tissues. *Electrophoresis*. 2004;25:2919-25.
- [157] Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G-I, De los Santos K, Sparwasser T, et al. In vivo depletion of CD11c⁺ dendritic cells abrogates priming of CD8⁺ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity*. 2002;17:211-20.
- [158] Thomas JA, Pope C, Wojtacha D, Robson AJ, Gordon-Walker TT, Hartland S, et al. Macrophage therapy for murine liver fibrosis recruits host effector cells improving fibrosis, regeneration, and function. *Hepatology*. 2011;53:2003-15.
- [159] Noble PW. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biology*. 2002;21:25-9.
- [160] Wai CT, Lok AS. Treatment of hepatitis B. *Journal of gastroenterology*. 2002;37:771-8.
- [161] Coulon S, Heindryckx F, Geerts A, Van Steenkiste C, Colle I, Van Vlierberghe H. Angiogenesis in chronic liver disease and its complications. *Liver International*. 2011;31:146-62.
- [162] Hoshida Y, Villanueva A, Kobayashi M, Peix J, Chiang DY, Camargo A, et al. Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2008;359:1995-2004.
- [163] Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Yung S, et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*. 2006;124:175-89.
- [164] Webster B, Ekland EH, Agle LM, Chyou S, Ruggieri R, Lu TT. Regulation of lymph node vascular growth by dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203:1903-13.
- [165] Fainaru O, Adini A, Benny O, Adini I, Short S, Bazinet L, et al. Dendritic cells support angiogenesis and promote lesion growth in a murine model of endometriosis. *The FASEB Journal*. 2008;22:522-9.
- [166] Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *Journal of biochemistry*. 2013;153:13-9.
- [167] Sugimoto H, Hamano Y, Charytan D, Cosgrove D, Kieran M, Sudhakar A, et al. Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies

and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278:12605-8.

[168] Mahasreshti PJ, Kataram M, Wang MH, Stockard CR, Grizzle WE, Carey D, et al. Intravenous delivery of adenovirus-mediated soluble FLT-1 results in liver toxicity. *Clinical cancer research*. 2003;9:2701-10.

[169] Engström-Laurent A, Lööf L, Nyberg A, Schröder T. Increased serum levels of hyaluronate in liver disease. *Hepatology*. 1985;5:638-42.

[170] Frébourg T, Delpech B, Bercoff E, Senant J, Bertrand P, Deugnier Y, et al. Serum hyaluronate in liver diseases: study by enzyme-immunological assay. *Hepatology*. 1986;6:392-5.

[171] Boregowda RK, Appaiah HN, Siddaiah M, Kumarswamy SB, Sunila S, Thimmaiah K, et al. Expression of hyaluronan in human tumor progression. *Journal of carcinogenesis*. 2006;5:2.

[172] Vrochides D, Papanikolaou V, Pertoft H, Antoniadis AA, Heldin P. Biosynthesis and degradation of hyaluronan by nonparenchymal liver cells during liver regeneration. *Hepatology*. 1996;23:1650-5.

[173] Fraser J, Laurent TC, Pertoft H, Baxter E. Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit. *Biochem J*. 1981;200:415-24.

[174] Day AJ, Prestwich GD. Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277:4585-8.

[175] Zhou B, Weigel JA, Fauss L, Weigel PH. Identification of the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE). *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275:37733-41.

[176] Pons-Renedo F, Llovet J. Hepatocellular carcinoma: a clinical update. *MedGenMed: Medscape general medicine*. 2003;5:11.

[177] Schmitz V, Tirado-Ledo L, Tiemann K, Raskopf E, Heinicke T, Ziske C, et al. Establishment of an orthotopic tumour model for hepatocellular carcinoma and non-invasive in vivo tumour imaging by high resolution ultrasound in mice. *Journal of hepatology*. 2004;40:787-91.

[178] Piccioni F, Malvicini M, Garcia MG, Rodriguez A, Atorrasagasti C, Kippes N, et al. Antitumor effects of hyaluronic acid inhibitor 4-methylumbelliferone in an orthotopic hepatocellular carcinoma model in mice. *Glycobiology*. 2012;22:400-10.

[179] Urashima S, Tsutsumi M, Shimanaka K, Ueshima Y, Tsuchishima M, Itoh T, et al. Histochemical study of hyaluronate in alcoholic liver disease. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1999;23:56S-60S.

[180] George J, Tsutsumi M, Takase S. Expression of hyaluronic acid in *N*-nitrosodimethylamine induced hepatic fibrosis in rats. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004;36:307-19.

[181] Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4:528-39.

[182] Webber J, Jenkins RH, Meran S, Phillips A, Steadman R. Modulation of TGFβ1-dependent myofibroblast differentiation by hyaluronan. *The American journal of pathology*. 2009;175:148-60.

[183] Webber J, Meran S, Steadman R, Phillips A. Hyaluronan orchestrates transforming growth factor-β1-dependent maintenance of myofibroblast phenotype. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284:9083-92.

[184] Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*. 2001;1:46-54.

[185] West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science*. 1985;228:1324-6.

[186] Gao F, Yang C, Mo W, Liu Y, He Y. Hyaluronan oligosaccharides are potential stimulators to angiogenesis via RHAMM mediated signal pathway in wound healing. *Clinical & Investigative Medicine*. 2008;31:106-16.

[187] Matou-Nasri S, Gaffney J, Kumar S, Slevin M. Oligosaccharides of hyaluronan induce angiogenesis through distinct CD44 and RHAMM-mediated signalling pathways involving Cdc2 and γ-adducin. *International journal of oncology*. 2009;35:761-73.

- [188] Savani RC, Cao G, Pooler PM, Zaman A, Zhou Z, DeLisser HM. Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:36770-8.
- [189] Mummery RS, Rider CC. Characterization of the heparin-binding properties of IL-6. *The Journal of Immunology*. 2000;165:5671-9.
- [190] Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiological Reviews*. 2011;91:221-64.
- [191] Sanz-Cameno P, Trapero-Marugán M, Chaparro M, Jones EA, Moreno-Otero R. Angiogenesis: from chronic liver inflammation to hepatocellular carcinoma. *Journal of oncology*. 2010;2010.
- [192] Sahin H, Borkham-Kamphorst E, Kuppe C, Zaldivar MM, Grouls C, Al-samman M, et al. Chemokine Cxcl9 attenuates liver fibrosis-associated angiogenesis in mice. *Hepatology*. 2012;55:1610-9.
- [193] Lee JS, Semela D, Iredale J, Shah VH. Sinusoidal remodeling and angiogenesis: A new function for the liver-specific pericyte? *Hepatology*. 2007;45:817-25.
- [194] Taura K, De Minicis S, Seki E, Hatano E, Iwaisako K, Osterreicher CH, et al. Hepatic stellate cells secrete angiopoietin 1 that induces angiogenesis in liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2008;135:1729-38.
- [195] Wald O, Pappo O, Safadi R, Dagan-Berger M, Beider K, Wald H, et al. Involvement of the CXCL12/CXCR4 pathway in the advanced liver disease that is associated with hepatitis C virus or hepatitis B virus. *European journal of immunology*. 2004;34:1164-74.