



I I M T

Remodelación del microambiente tumoral por 4-Metilumbelliferona e inmunoterapia génica en el hepatocarcinoma asociado a cirrosis: implicancias sobre las *Cancer Stem Cells*.

Tesis presentada por Marcelo Rodríguez para optar al grado de Doctor en Ciencias Biomédicas por la Universidad Austral.

Director de tesis: Dr. Guillermo D. Mazzolini

Co-Directora: Dra. Mariana Malvicini

Año: 2020

*En memoria de mi primo Agustín Sconza, persona
que estaría muy orgulloso de este logro.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, al país que me ha permitido, de manera gratuita, realizar y desenvolverme en este largo camino que es el doctorado. A la Facultad de Ciencias Biomédicas de la Universidad Austral y al IIMT por permitirme realizar mi doctorado y a Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al CONICET por haberme otorgado las becas para poder llevar adelante mi proyecto de investigación.

Al Dr. Guillermo Mazzolini y a la Dra. Mariana Malvicini, dos personas claves en mi formación que hicieron todo lo posible en mi desarrollo como un buen científico. Guillermo siempre motivándome para que mejore mi exposición y siempre firme para que aprendiera. Mariana no solamente fue tutora, sino una compañera que estuvo presente en muchos otros aspectos de mi vida. Al principio, que me recogía desde mi casa para ir juntos al laboratorio, donde me contaba anécdotas de cuando ella había empezado; también de las incansables veces que fuimos al citómetro, en horas pico; y de hasta la vez que salió de garante para mi alquiler. Más allá de las múltiples idas y vueltas que tuvimos, ella siempre estuvo presente.

A los chicos del EP, con los que compartí muchos mates y charlas de ciencia, inversión (que nunca entendía por completo) y de política, obviamente. Estos recuerdos no se olvidan.

A los chicos del quinto piso, con ellos he compartido muchas cosas que atesorar. Aquí, pasé el mayor tiempo del doctorado, por lo que tengo un montón de recuerdos, compañeros y amigos.

Romina: desde el inicio de la carrera hemos tenido feeling, en principio compartimos el amor por la danza; alguien con quien podés contar como amiga ya que se pone la

mochila cuando la necesitas. Recordaré las innumerebles coreografías y trucos hechos juntos. Del super viaje que hicimos a Mardel en el que caímos todos enfermos, de las salidas al campo, de los asados en tu casa y de las sesiones de fotos. Y de ayudarnos mutuamente en el trabajo, tanto en el diseño como la ejecución de los experimentos. A Sofi, persona que conocí desde comienzo, una persona muy directa y compañera, con la que trabajé e hice mis primeros pasos en la qPCR. Hemos sido muy buenos amigos desde entonces, me ayudó muchas veces a superar frustraciones típicas del doctorado, además de compartir cumpleaños, juntadas y sesiones de foto (donde fue la modelo en varias de ellas). Otra persona que entró al grupo de amigos fue Luciana, la tucu, la voy a recordar como una persona amable, directa y celosa de sus amigos, una de las tantas víctimas de mis sesiones de fotos. En el trabajo muy determinada y predispuesta a ayudarte. Y como no recordar a Mai, muy trabajadora y predispuesta a ayudarte.

Por último, los demás compañeros que fuimos consolidando diferentes relaciones, entre ellas, Agostina, Pablo, Melisa, Candelaria, Coni, Maxi, Paula, Norma, Gusti, Rodri, Majo; los cuales aportaron parte de su tiempo y, muchas veces reactivos, para poder llevar a cabo mis experimentos; como así también estuvieron presentes en gran parte de mi paso por el laboratorio.

Una parte muy importante del por qué estoy aquí hoy terminando esta etapa es por mi familia y amigos que siempre me apoyaron e impulsaron a ir hacia adelante. Por un lado, a mi mamá, que siempre está presente y muy orgullosa por donde he llegado; a la tía Celia y el tío Alejandro, por ofrecerme un hogar cuando más lo necesitaba y acompañarme en mis pasos aquí en Bs As, como a si a mis primos Fabiola, Agustín, Luis y Martina; a mis suegros, que siempre estuvieron involucrados en que esté lo más cómodo en un lugar lejano, a mis hermanos: Florencia, que compartió parte de este

largo camino aquí conmigo y me ayudó en muchos aspectos, tantos emocionales como de la casa; a Cecilia, Susan y Marcia por también estar presente cuando necesitaba, en charlas que muchas veces solucionaron muchas cosas; a Paul, que me ayudó en el primer año, dándome ese aporte económico que necesitaba tanto en ese tiempo y además de largas charlas que enriquecían nuestro lazo como hermano, por último, Fredy que siempre está presente en mi vida; a los sobrinos, Gina, Jimena y Ramiro que siempre me hacen reír y me alegran la vida.

Al grupo “donde me meti” que son los amigos que forjé en la facultad en Misiones, donde compartimos nuestras frustraciones, experiencias, problemas laborales etc. Además, de recordar siempre anécdotas que nos divierten y que me hacen feliz. Para Marilyn, Pablo, Agustín, Sofi, Lorena e Iván que siempre están presentes.

A Rocío, mi esposa, que pasamos todos los estados del doctorado, desde la relación a distancia, hasta casarnos. Siempre fue un soporte muy necesario en mi vida, acompañándome en las largas noches de repaso para algún seminario, enseñándome y practicando el speech en inglés, calmándome en momentos de estrés y aconsejándome para tomar las mejores decisiones, siempre junto a mi incondicionalmente.

ABREVIACIONES

Abreviación	Según su significado en español	Según su significado en inglés
Ad5	Adenovirus tipo 5	Adenovirus type 5
ADN	Ácido dexocirribonucleico	Deoxyribonucleico Acid
AH	Ácido Hialurónico	Hyaluronic Acid
ARN	Ácido Ribonucleico	Ribonucleic Acid
ATP	Adenosina 5'-trifosfato	Adenosine 5'-triphosphate
BSA	Albúmina de suero bovino	Bovine Serum Albumine
CDK1	Quinasa dependiente de Ciclina 1	Cyclin-dependent kinase 1
CMV	Citomegalovirus	Cytomegalovirus
CTL	Linfocito T citotóxico	Cytotoxic T lymphocyte
CTLA-4	Proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
dNTP	Desoxinucleósido trifosfato	Deoxynucleoside Triphosphate
ECL	Mejorados Quimioluminiscente	Enhanced chemiluminescent
EMT	Transición epitelial-mesenquimal	Epithelial–mesenchymal transition
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos	Food and Drug Administration
FITC	Isotiocianato de fluoresceína	Fluorescein Isotiocyanine
HBV	Virus de la hepatitis B	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatocarcinoma	Hepatocellular carcinoma
HCV	Virus de la hepatitis C	Hepatitis C virus
HIF	Factor inducible por hipoxia	Hypoxia-inducible factor
IDO	Indoleamina-pirrol 2,3-dioxigenasa	
Ig	Inmunoglobulina	Immunoglobulin
IGF-1	Factor de crecimiento similar insulina 1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleuquina	Interleukin

INF	Interferón	Interferon
i.p.	Intraperitoneal	Intraperitoneal
JAK	Janus quinasa	Janus kinase
JNK	Quinasa N-terminal de Jun	Jun N-terminal Kinasa
LPS	Lipopolisacárido	Lipopolysaccharide
LYVE-1	Receptor endotelial de vaso linfático 1	Lymphatic Vessel endothelial receptor 1
MAP	Proteína activada por mitógenos	Mitogen-Activated Protein
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno	Mitogen-activated protein kinase
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEC	Matriz extracelular	Extracellular matrix
MEK	Quinasa de MAPK/ERK	MAPK/ERK Kinase
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dyphenyltetrazolium Bromide
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica	Non-alcoholic steatohepatitis
NK	Célula asesina natural	Natural killer
PBS	Buffer fosfato salino	Phosphate Buffer Saline
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	Polymerase Chain Reaction
PD-1	Proteína de muerte celular programada 1	Programmed cell death protein 1
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas	Platelet-derived growth factor
PD-L1	Ligando proteína de muerte celular programada 1	programmed death ligand 1
PI3K	Fosfatidilinositol-3 Quinasa	Phosphatidyl-Inositol-3 Kinasa
qPCR	PCR cuantitativo	quantitative PCR
RT-PCR	PCR con retrotranscripción	

RT-qPCR	RT-PCR cuantitativo	
s.c	Subcutánea	Subcutaneous
SDS	Dodecilsulfato de sodio	Sodium Dodecyl Sulfate
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3	signal transducer and activator of transcription 3
TAM	Macrófagos asociados a tumor	Tumor-associated macrophages
TBS	Buffer tris salino	Tris Buffer Salina
TGFβ 1	Factor de crecimiento transformante β-1	transforming growth factor β-1
TK	Tirosina quinasa	Tyrosine kinase
TKI	Inhibidor de la tirosina quinasa	Tyrosine kinase inhibitor
Treg	Células T reguladoras	Regulatory T cells
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular	Vascular endothelial growth factor
α-SMA	Actina alfa del músculo liso	Alpha Smooth Muscle Actin
NF-κb	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

RESUMEN

El hepatocarcinoma (HCC) es el tumor hepático primario más frecuente, y su incidencia y mortalidad se encuentran en aumento. El HCC se desarrolla en hígados con fibrosis avanzada o cirrosis subyacente, en donde existe un entorno inflamatorio crónico dinámico que predispone al inicio del cáncer. A pesar de los avances terapéuticos desarrollados en los últimos años, es necesario aún desarrollar nuevos y más efectivos tratamientos, al mismo tiempo que es imprescindible entender mejor como es la interacción entre las células tumorales y su microambiente tumoral (TME). Existe una compleja interacción entre las células tumorales y los diferentes componentes del TME, como fibroblastos asociados al tumor, células endoteliales, células iniciadoras del tumor o las células madre del cáncer (*Cancer Stem Cells*, CSC) y células del sistema inmunitario, como los macrófagos asociados al tumor (TAM) y las células dendríticas (DCs), interconectadas con una abundante matriz extracelular (MEC) que puede promover la progresión tumoral y la resistencia a las terapias. En este sentido, diversos enfoques terapéuticos experimentales se centran en la remodelación del TME. En nuestro laboratorio se ha demostrado previamente que la cumarina 4-metilumbeliferona (4Mu), un inhibidor selectivo de la síntesis de ácido hialurónico (AH), disminuye la fibrosis hepática e inhibe el crecimiento tumoral en un modelo de HCC con fibrosis subyacente. En este trabajo de tesis doctoral demostramos que la combinación de 4Mu con la inmunoterapia génica basada en el empleo de un vector adenoviral que codifica para los genes de la interleuquina-12 (AdIL-12), induce un potente efecto antitumoral mediado por la remodelación del microambiente tumoral y la generación de una respuesta inmunitaria específica antitumoral. En este sentido, demostramos que 4Mu disminuye los niveles de expresión de marcadores de CSCs, modula el perfil de macrófagos hepáticos hacia el tipo de activación clásica o M1, reduce, directa o

indirectamente, la expresión de CD47 en las células de HCC, pero selectivamente, en las células CD133⁺ (que aquí identificamos como CSCs), y promueve el infiltrado de células inmunitarias en el entorno tumoral. La regulación de la expresión de CD47 permite la fagocitosis de las CSCs por las células presentadoras de antígeno e induce una respuesta citotóxica específica, que potencia la respuesta inmunitaria estimulada por AdIL-12. Además, la modulación de los niveles de expresión de CD47 por 4Mu es esencial para el reconocimiento de las células CD133⁺ y el efecto antitumoral observado. Que, además, aumenta significativamente la supervivencia de los animales cuando se inyectan con células CD133⁺, disminuyendo la agresividad y la capacidad en un modelo de HCC metastásico.

Estos resultados sugieren que 4Mu ejerce un efecto antitumoral significativo: **i)** al inducir un cambio de los macrófagos hepáticos hacia un perfil de tipo M1, **ii)** al reducir su capacidad para secretar IL-6, **iii)** al aumentar el reconocimiento de las células de HCC por parte del sistema inmune, de manera directa actuando sobre las CSCs y/o de manera indirecta tras la incubación de células tumorales con CM derivado de macrófagos tratados con 4Mu, **iv)** reduciendo la expresión de varios marcadores CSCs en células HCC, y **v)** aumentando la capacidad de las DCs para inhibir el crecimiento tumoral en protocolos de vacunación terapéutica. Estos hallazgos resaltan el potencial de 4Mu para modular el TME y facilitar la inducción de una respuesta inmune contra HCC. Los resultados puestos de manifiesto en este trabajo de tesis doctoral sugieren que 4Mu podría ser una herramienta de utilidad para el tratamiento del HCC avanzado.

SUMMARY

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most frequent primary liver tumor, and its incidence and mortality are increasing. HCC arises in livers with advanced fibrosis or cirrhosis, which is characterized by the presence of a dynamic and complex inflammatory milieu that may predispose to cancer development. Therefore, it is necessary to develop new and more effective treatments for HCC, but it is also essential to better understand the interaction between cancer cells and the tumor microenvironment (TME). TME is composed by a heterogeneous mixture of cellular components including cancer cells, cancer stem cells (CSCs), tumor-associated fibroblasts, endothelial cells, and immune cells, such as tumor-associated macrophages (TAMs), and dendritic cells (DCs), interconnected with an extracellular matrix (MEC) that can promote tumor progression and resistance to therapies. Several experimental anticancer approaches have been tested with a focus on TME. In line with this, we have demonstrated that the coumarin 4-methylumbelliferone (4Mu), a selective inhibitor of hyaluronan (AH) synthesis, reduced liver fibrosis and inhibited tumor growth, in an HCC model with underlying fibrosis. In this work, we demonstrate that the combination of 4Mu with an adenovirus encoding interleukin-12 genes (AdIL-12), induces a potent antitumor effect mediated by a remodeling of the TME, and the generation of a specific antitumor immune response. Moreover, we demonstrate that 4Mu treatment modifies the expression levels of CSCs markers, modulates the profile of liver macrophages towards the classical M1 activation type, reduces, directly or indirectly, the expression of the CD47 on HCC cells, but selectively, in CD133⁺ cells (which we identify here as CSCs), and promotes the infiltration of immune cells in the TME. In addition, regulation of CD47 expression allows CSCs phagocytosis by antigen presenting cells, and induces a specific cytotoxic response, which further enhances the immune response

generated by AdIL-12. In this thesis work, we also demonstrate that the modulation of CD47 by 4Mu is essential for the recognition of CD133⁺ cells, and for the observed antitumor effect. In addition, 4Mu treatment decreases the aggressiveness of CSCs through a significant increase in animal survival when 4Mu-treated C133⁺ cells are used in a metastatic HCC model.

The results generated in this work suggest that 4Mu exerts a significant antitumor effect: **i)** by inducing a switch of hepatic M ϕ into a M1 profile, **ii)** by reducing their capacity to secrete IL-6, **iii)** by increasing the recognition of HCC cells by the immune system, directly acting on CSCs and/or indirectly after incubation of tumor cells with CM derived from M ϕ treated with 4Mu; **iv)** by reducing the expression of CSCs markers on HCC cells; and **v)** by increasing the ability of DCs to inhibit HCC tumor growth in therapeutic vaccination protocols. All these findings highlight the potential of 4Mu to modulate the TME and to transform it into a less hostile environment, and to facilitate the induction of an immune response against HCC induced by AdIL-12. The results presented in this doctoral thesis work suggest that 4Mu could be a useful tool for the treatment of advanced HCC.

PUBLICACIONES

Parte de los resultados de esta tesis doctoral fueron publicados en las siguientes revistas científicas:

1. 4*Mu* Decreases CD47 Expression on Hepatic Cancer Stem Cells and Primes a Potent Antitumor T Cell Response Induced by Interleukin-12.

Marcelo M. Rodríguez, Esteban Fiore, Juan Bayo, Catalina Atorrasagasti, Mariana García, Agostina Onorato, Luciana Domínguez, Mariana Malvicini y Guillermo Mazzolini. *Mol Ther.* 2018 Dec 5;26(12):2738-2750. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.09.012.

2. 4-Methylumbelliferone-Mediated Polarization of M1 Macrophages Correlate with Decreased Hepatocellular Carcinoma Aggressiveness.

Marcelo M. Rodríguez, Agostina Onorato, Luciana Domínguez, Maria José Cantero, Esteban Fiore, Juan Bayo, Catalina Atorrasagasti, Mariana García, Mariana Malvicini y Guillermo Mazzolini (enviado, en revisión en *Scientific Reports*)

3. Tumor Microenvironment Remodeling by 4-Methylumbelliferone Boosts the Antitumor Effect of Combined Immunotherapy in Murine Colorectal Carcinoma.

Malvicini M, Fiore E, Ghiaccio V, Piccioni F, Rizzo M, Olmedo Bonadeo L, García M, **Rodríguez M,** Bayo J, Peixoto E, Atorrasagasti C, Alaniz L, Aquino J, Matar P, Mazzolini G. *Mol Ther.* 2015 Sep;23(9):1444-55. doi: 10.1038/mt.2015.112.

Otras publicaciones a las que también se contribuyó durante el desarrollo de esta Tesis:

4. SPARC gene deletion protects against toxic liver injury and is associated to an enhanced proliferative capacity and reduced oxidative stress response.

Peixoto E, Atorrasagasti C, Malvicini M, Fiore E, **Rodríguez M,** Garcia M, Finocchietto P, Poderoso JJ, Corrales F, Mazzolini G. *Oncotarget.* 18 de mayo de 2016; 10 (41): 4169-4179. doi: 10.18632 / oncotarget.9456.

5. *Involvement of hepatic macrophages in the antifibrotic effect of IGF-I-overexpressing mesenchymal stromal cells.*

Fiore E, Malvicini M, Bayo J, Peixoto E, Atorrasagasti C, Sierra R, **Rodríguez M**, Gómez Bustillo S, García MG, Aquino JB, Mazzolini G. Stem Cell Res Ther. 2016 Nov 22;7(1):172. doi: 10.1186/s13287-016-0424-y.

6. *Tumor Microenvironment Remodeling by 4-Methylumbelliferone Boosts the Antitumor Effect of Combined Immunotherapy in Murine Colorectal Carcinoma.*

Malvicini M, Fiore E, Ghiaccio V, Piccioni F, Rizzo M, Olmedo Bonadeo L, García M, **Rodríguez M**, Bayo J, Peixoto E, Atorrasagasti C, Alaniz L, Aquino J, Matar P, Mazzolini G. Mol Ther. 2015 Sep;23(9):1444-55. doi: 10.1038/mt.2015.112.

7. *Human umbilical cord perivascular cells-derived extracellular vesicles mediate the transfer of IGF-I to the liver and ameliorate hepatic fibrogenesis in mice.*

Fiore E, Domínguez LM, Bayo J, Malvicini M, Atorrasagasti C, **Rodríguez M**, Cantero MJ, García M, Yannarelli G, Mazzolini G. Gene Ther. 2020 Feb;27(1-2):62-73. doi: 10.1038/s41434-019-0102-7.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	21
1.1. El Hígado: Anatomía y Fisiología	21
1.2. Hepatocarcinoma	23
1.2.1. Generalidades	23
1.2.2. Etiología	24
1.2.2.1. Hepatitis viral: HBV y HCV	25
1.2.2.2. Fibrosis y cirrosis hepática	26
1.2.2.3. Otros factores	28
1.2.3. Modelo de carcinogénesis	29
1.3. Microambiente tumoral	33
1.3.1. Matriz extracelular	34
1.3.2. Componentes celulares	36
1.3.2.1. Fibroblastos asociados al tumor	36
1.3.2.2. Células del sistema inmunitario	37
1.3.2.3. Cancer Stem Cells	43
1.4. Tratamiento del hepatocarcinoma	49
1.4.1. Convencionales	49
1.4.2. Terapias dirigidas e inhibidores de tirosina quinasas	50
1.4.3. 4-metilumbelliferona y ácido hialurónico	52
1.4.4. Terapia génica	55
1.4.4.1. Terapia génica in vivo: vectores adenovirales	57
1.4.5. Inmunoterapia	60
1.4.5.1. Inmunoterapia basada en IL-12	62
1.4.5.2. Inmunoterapia basada en células dendríticas	64
2. HIPÓTESIS	66
3. OBJETIVOS	67
3.1. Objetivo general	67
3.2. Objetivos específicos	67
4. MATERIALES Y MÉTODOS	69
4.1. Animales	69

4.2.	Líneas celulares _____	69
4.3.	4-Metilumbiliferona: _____	70
4.4.	Vectores adenovirales _____	70
4.5.	Experimentos <i>in vitro</i> _____	71
4.5.1.	Aislamiento de células por separación magnética _____	71
4.5.2.	Cálculo de la tasa de división celular _____	71
4.5.3.	Ensayo de Viabilidad _____	72
4.5.4.	Ensayo de formación de colonias _____	72
4.5.5.	Análisis del ciclo celular _____	72
4.6.	Experimentos <i>in vivo</i> _____	73
4.6.1.	Modelo experimental de HCC asociado a fibrosis _____	73
4.6.2.	Modelo de HCC metastásico _____	74
4.6.3.	Modelos tumorales de implantación subcutánea _____	74
4.6.3.1.	Modelos subcutáneos en ratones inmunosuprimidos e inmunocompetentes _____	74
4.6.3.2.	Vacunación terapéutica con DCs _____	75
4.7.	Experimentos <i>ex vivo</i> _____	75
4.7.1.	Obtención de macrófagos peritoneales y generación de medio condicionado. _____	75
4.7.2.	Cuantificación de células CD3 ⁺ en el HCC <i>in vivo</i> _____	76
4.7.2.1.	Inmunohistoquímica _____	76
4.7.2.2.	Citometría de flujo _____	76
4.7.3.	Ensayo de citotoxicidad _____	77
4.7.4.	Detección de la de granulación de las células T _____	77
4.7.5.	Citometría de flujo en muestras provenientes de tejidos perfundidos _____	78
4.7.6.	Cuantificación de citoquinas por ELISA _____	78
4.7.7.	Ensayo de apoptosis _____	79
4.7.8.	Ensayo de fagocitosis _____	79
4.7.9.	Ensayo de fagocitosis con tinta china _____	79
4.7.10.	Cortes histológicos _____	80
4.7.11.	Extracción de ARN y análisis por RT-qPCR _____	80
4.7.12.	Array de PCR _____	81

4.7.13. Análisis por western blot _____	82
4.7.14. Ensayos con células dendríticas derivadas de médula ósea _____	83
4.7.14.1. Obtención de DCs. _____	83
4.7.14.2. Ensayo de Fagocitosis _____	83
4.7.14.3. Carga antigénica _____	83
4.8. Análisis estadístico. _____	84
5. RESULTADOS _____	86
5.1. La combinación 4Mu + AdIL-12 inhibe el crecimiento tumoral en el modelo ortotópico de HCC establecido sobre hígados con fibrosis. _____	86
5.2. La terapia combinada aumenta el infiltrado inflamatorio en los tumores y bazos de los ratones tratados. _____	88
5.3. La terapia combinada induce una potente respuesta citotóxica específica antitumoral _____	90
5.4. El tratamiento con 4Mu hace más “visibles” a las células tumorales, aumentando la respuesta citotóxica mediada por linfocitos T. _____	91
5.5. El tratamiento con 4Mu estimula la fagocitosis de las células tumorales por células presentadoras de antígeno y potencia la respuesta antitumoral inducida por AdIL-12 _____	94
5.1. El incremento de la fagocitosis de las células tumorales pre-tratados con 4Mu se asocia a una disminución de la expresión de CD47 _____	95
5.2. 4Mu reduce la expresión de marcadores de CSCs en líneas celulares de HCC _____	100
5.3. 4Mu reduce la expresión de los marcadores de CSCs en el tejido hepático con HCC asociado a fibrosis _____	104
5.4. Los cambios inducidos por 4Mu en las CSCs reducen la agresividad de las células tumorales <i>in vivo</i> . _____	105
5.5. 4Mu aumenta la fagocitosis de las CSCs. _____	107
5.6. 4Mu modifica el potencial de las CSCs para iniciar y promover el crecimiento y diseminación tumoral _____	108

5.7. La terapia <i>in vivo</i> con 4Mu induce la polarización de los macrófagos hepáticos hacia un perfil M1. _____	113
5.8. Efecto de 4Mu sobre el perfil de los macrófagos _____	116
5.9. Efecto de la polarización de macrófagos hacia un perfil de tipo M1 inducida por 4Mu. _____	119
5.10. 4Mu promueve la fagocitosis de las células tumorales por parte de las células dendríticas. _____	125
5.11. La vacunación terapéutica empleando células dendríticas pulsadas con extracto tumoral tratado con 4Mu retrasa el crecimiento del HCC. _____	127
6. DISCUSIÓN _____	130
7. CONCLUSIONES _____	143
7.1. PARCIALES _____	143
7.2. CONCLUSIÓN FINAL _____	144
BIBLIOGRAFIA _____	I-XXIII

INTRODUCCIÓN

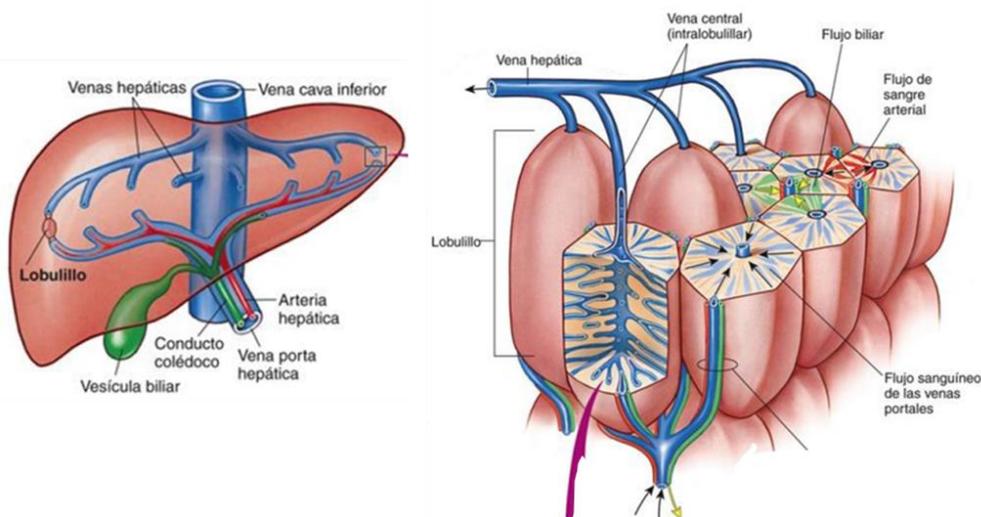
1. INTRODUCCIÓN

1.1. El Hígado: Anatomía y Fisiología

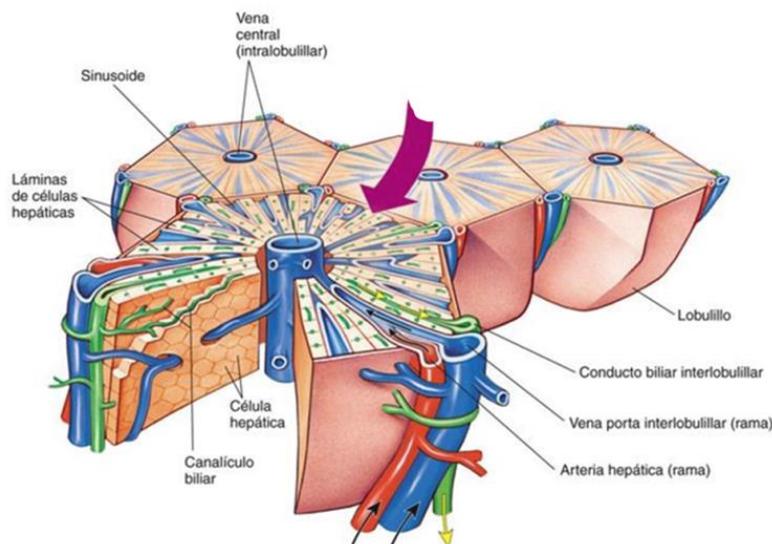
El hígado se ubica en el cuadrante superior derecho de la cavidad abdominal y consta de dos lóbulos principales, el derecho y el izquierdo, los cuales están divididos por el ligamento falciforme y el ligamento redondo. El lóbulo izquierdo tiene dos pequeños lóbulos: el cuadrado y el caudado (*figura 1A*). Posee irrigación sanguínea doble, recibe sangre de la arteria hepática y la vena porta. La sangre sale del hígado a través de las venas supra-hepáticas, las cuales drenan en la cava inferior¹. El hígado es un órgano constituido por diferentes tipos de células entre ellas los hepatocitos, que representan el 80% de las células, y son los encargados de las funciones metabólicas de este órgano y de depurar moléculas transportadas por la sangre (bilirrubina, amoníaco, hormonas, medicamentos, alcohol y otras toxinas). También producen y secretan la bilis, que se almacena en la vesícula biliar y que es fundamental para el metabolismo y la absorción intestinal de los lípidos². Histológicamente, el parénquima hepático está organizado en placa o hileras de hepatocitos, entre las cuales se encuentran los sinusoides hepáticos. Estas estructuras, a su vez, forman lobulillos que se organizan de forma hexagonal con una vena central y tríadas portales en los vértices, formando el acino hepático. Además, los hepatocitos y las células endoteliales forman una red capilar llamada sinusoides hepáticos, en la que la sangre que proviene de la arteria hepática se mezcla con la sangre proveniente de la vena porta en la trayectoria hacia la vena central (*figura 1B*). El hepatocito es una célula grande con forma hexagonal y con tres tipos de bordes: (a) superficie apical, forma la pared del canalículo biliar, relacionados con el transporte y la excreción de bilis, (b) borde basolateral, está en contacto con el torrente sanguíneo a través del cual existe la captación de sustancias y, (c) el borde lateral, que está bordeado por las otras dos superficies (*figura 1D*).

Además, existe una red de células retículo-endoteliales que comprende diversos tipos de células: (i) células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC), con membrana basal fenestrada, (ii) células de Kupffer (macrófagos residentes del hígado), que se encuentran en el sinusoides y, (iii) células estrelladas hepáticas (HSC) o células de Ito, que se encuentran en el espacio de Disse, y que en el hígado sano almacenan grasa y participan en el metabolismo de la vitamina A. Además, se pueden encontrar neutrófilos y escasas células linfoides del tipo natural killer (NK), así como también células T gamma delta (figura 1C)².

A

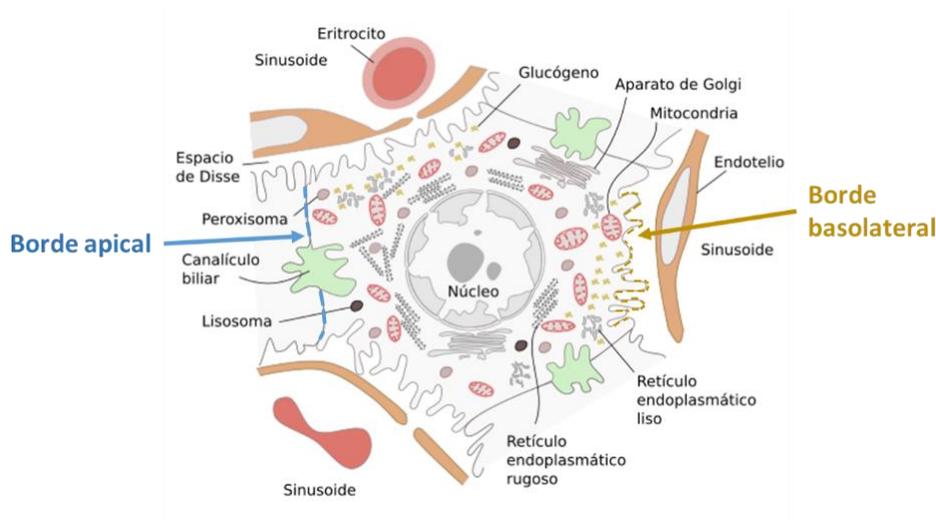


B



continúa →

C



D

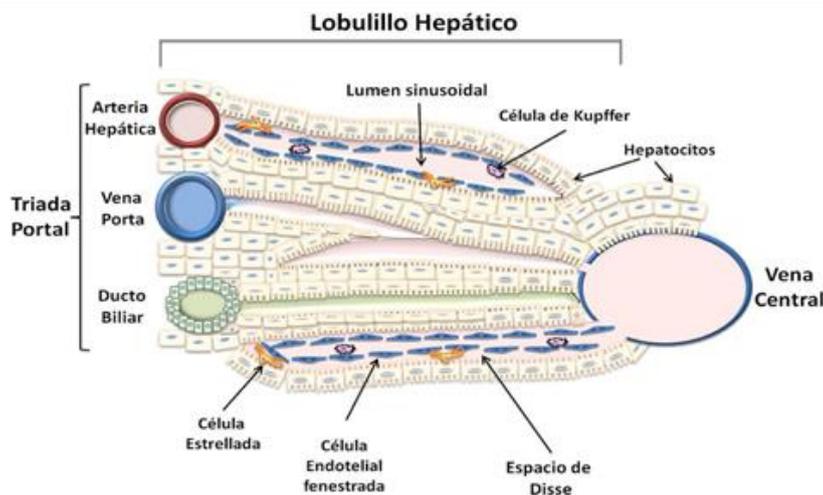


Figura 1: (A) Esquema de la anatomía y ultraestructura hepática (B) de un acino hepático (C), de un lobulillo hepático y (D) de los bordes y ultraestructura de un hepatocito. Tomada y modificada de Gary D. Hammer, Stephen J. McPhee, *Fisiopatología de la enfermedad*, 7^o edición, cap. 14.

1.2. Hepatocarcinoma

1.2.1. Generalidades

El hepatocarcinoma (HCC) es el sexto cáncer más frecuente y es la tercera causa de muerte relacionada con cáncer a nivel mundial, registrándose aproximadamente 800.000 nuevos casos en el año 2018³. Tanto la mortalidad como la incidencia se encuentran en aumento en países occidentales (*Tabla 1*). El HCC se desarrolla en el contexto de cirrosis o fibrosis avanzada, generada a su vez por diferentes causas como la infección

crónica por los virus de la hepatitis B o C (HBV o HCV), el abuso de alcohol y la enfermedad de hígado graso no alcohólico, entre otras⁴. En la Argentina no existen datos firmes acerca de la incidencia del HCC por lo que motivó a la Asociación Argentina para el Estudio de las Enfermedades del Hígado (AAEEH) a convocar por primera vez el Consenso Argentino de HCC⁵. En nuestro país, el HCC es diagnosticado casi exclusivamente en pacientes cirróticos (alrededor del 93%). Tanto la hepatitis crónica C como la cirrosis alcohólica son las 2 etiologías principales y representan el 76% de los casos⁶. La edad de presentación se ubica entre los 60 y 70 años, siendo 2,6 veces más frecuente en varones⁶. Además, la tasa de incidencia cruda de HCC (ambos sexos) fue de 4.7/100.000 habitantes en el año 2018, de acuerdo al programa GLOBOCAN de la International Agency for the Research on Cancer, de la Organización Mundial de la Salud³, pero no existen datos sobre si se están produciendo cambios en la incidencia de HCC en nuestro país⁷.

Tabla 1. Número de nuevos casos y de muertes por cáncer (todos los cánceres y ambos sexos en 2018)³.

Órganos afectados	N°. DE CASOS NUEVOS (% frecuencia mundial)	N°. DE MUERTES (% frecuencia mundial)
<i>Pulmón</i>	2.093.876 (11.6)	1.761.007 (18.4)
<i>Mama</i>	2.088.849 (11.6)	626.679 (6.6)
<i>Próstata</i>	1.276.106 (7.1)	358.989 (3.8)
<i>Colon</i>	1.096.601 (6.1)	551.269 (5.8)
<i>Piel (no melanoma)</i>	1.042.056 (5.8)	65.155 (0.7)
<i>Estómago</i>	1.033.701 (5.7)	782.685 (8.2)
<i>Hígado</i>	841.080 (4.7)	781.631 (8.2)
<i>Recto</i>	704.376 (3.9)	310.394 (3.2)
<i>Esófago</i>	572.034 (3.2)	508.585 (5.3)
<i>Cuello uterino</i>	569.847 (3.2)	311.365 (3.3)

1.2.2. Etiología

Aproximadamente el 90% de los HCC están asociados a un factor de riesgo subyacente conocido⁸ (**Tabla 2**). Entre los factores más frecuentes están incluidos la hepatitis viral

crónica por HBV y HCV, el consumo exagerado de alcohol y la exposición a aflatoxinas⁹. En África y Asia Oriental, la mayor fracción atribuible se debe a HBV (60%), mientras que en el mundo occidental desarrollado, sólo el 20% de los casos se pueden atribuir a la infección por HBV; mientras que la infección crónica por el HCV parece ser el principal factor de riesgo¹⁰. En todo el mundo, aproximadamente el 54% de los casos pueden atribuirse a la infección por HBV (que afecta a 400 millones de personas), mientras que el 31% puede atribuirse a la infección por HCV (que afecta a 170 millones de personas), dejando aproximadamente el 15% asociado con otras causas, como por ejemplo la obesidad, que se considera un factor contribuyente al aumento de incidencia observada para HCC en áreas de bajo riesgo¹¹.

Tabla 2: Distribución geográfica de los principales factores de riesgo para HCC en todo el mundo⁸.

Área geográfica	AAIR	Factores de Riesgo			
	M/F	HCV(%)	HBV(%)	Alcohol(%)	Otros(%)
Europa	6.7/2.3	60-70	10-15	20	10
Sur	10.5/3.3				
Norte	4.1/1.8				
Norte de América	6.8/2.3	50-60	20	20	10 (NASH)
Asia y África		20	70	10	10 (Aflatoxina)
Asia	21.6/8.2				
China	23/9.6				
Japón	20.5/7.8	70	10-20	10	10
África	1.6/5.3				
en el Mundo	16/6	31	54	15	

AAIR: del inglés *Age-adjusted incidence rates* (Tasas de incidencia ajustadas por edad)

1.2.2.1. Hepatitis viral: HBV y HCV

El factor etiológico más importante que contribuye al desarrollo del HCC es la hepatitis viral crónica, principalmente la provocada por el HBV y el HCV. El HBV es un virus

ADN que se replica en el núcleo de forma episomal, mientras que el HCV es un virus ARN que se replica exclusivamente en el citoplasma de los hepatocitos. Sin embargo, ambos tienen intermediarios replicativos de ARN y pueden interactuar en células coinfectadas, lo que conduce a una expresión viral y patrones serológicos variables provocando alteraciones en múltiples vías de señalización y patrones de expresión génica del huésped^{12,13}. En este sentido, el HCC inducido por el HBV y el HCV se desarrolla, generalmente, en un ambiente de inflamación y regeneración que resulta del daño hepático crónico, lo que sugiere que la patogénesis del HCC está mediada en parte por alguna acción del sistema inmune¹⁴. La infección crónica provoca muerte de los hepatocitos, inflamación, estrés oxidativo, estímulo fibrogénico que puede conducir a la cirrosis que resultan en un reordenamiento de la arquitectura hepática, transición epitelio-mesénquima y estímulo de la angiogénesis^{13,15}. En conjunto, tanto en el HBV como en el HCV, desregulan el ciclo celular o la vía de activación de oncogenes y genes supresores de tumores en los hepatocitos contribuyendo de esta manera al desarrollo del HCC.

El riesgo de desarrollar HCC en pacientes cirróticos por HBV desarrollen HCC es de 2% por año, mientras que, para pacientes no cirróticos es de tan sólo de 0,2% por año¹⁶. En cambio, en los pacientes infectados con HCV, el riesgo de desarrollar HCC en pacientes con cirrosis o sin cirrosis, es un poco mayor y ronda el 3-7% y 0,3% por año, respectivamente¹⁶.

1.2.2.2. Fibrosis y cirrosis hepática

La fibrosis hepática es el resultado del daño hepático crónico generado por un proceso inflamatorio prolongado, y se caracteriza por una acumulación lenta y progresiva de matriz extracelular (MEC) resultado de la activación de las HSCs que juegan un papel central en la fibrogénesis hepática^{17,18}. Los estímulos fibrogénicos más frecuentes son

la ingesta crónica y exagerada de alcohol, la infección crónica por virus B o C, drogas, toxinas, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedades autoinmunes y diversos trastornos metabólicos¹⁹. Un evento fundamental en la fibrosis es la activación de las HSCs que, junto a los hepatocitos, las LSECs y las células de Kupffer cooperan en el proceso de fibrogénesis hepática. En el hígado normal, las HSCs permanecen quiescentes (qHSCs), sin embargo, en respuesta a una lesión hepática, se transforman en un fenotipo miofibroblástico activado, proliferativo, móvil y contráctil en respuesta a señales autócrinas o parácrinas provenientes de hepatocitos lesionados y de células inmunes que las activan²⁰. Durante la fibrogénesis, diversas citoquinas desempeñan un papel central en la activación de las HSCs (aHSCs); entre ellas se encuentran: el factor de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleuquina 1 β , (IL-1 β ,) y el factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1)^{21,22}; estas señales favorecen la activación de las HSCs, caracterizadas por la expresión de la actina del músculo liso α (α -SMA)²³ y a la producción de una gran cantidad de colágeno²⁴.

Por otro lado, la angiogénesis es un proceso presente durante la fibrogénesis y que generalmente se refiere a la formación *de novo* o a la remodelación de los vasos sanguíneos existentes, desempeñando un papel crucial en varios procesos fisiológicos o fisiopatológicos como la cirrosis y cáncer de hígado²⁵. Existen diferentes pasos que ocurren durante el proceso de angiogénesis. En primer lugar, ocurre la defenestración y capilarización de las LSECs y luego, la MEC es degradada por enzimas metaloproteasas (MMPs) para permitir la posterior migración y proliferación de células endoteliales²⁶. La angiogénesis es inducida, principalmente, por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que también tiene efecto sobre la promoción de la inflamación y efectos directos sobre las HSCs²⁷. Tanto el VEGF como el factor de crecimiento de

hepatocitos (HGF) pueden actuar sinérgicamente no solo para inducir la proliferación de las LSECs, sino también afectando la interacción entre éstas y la MEC, mediante la producción y activación de proteasas y receptores celulares tanto en la angiogénesis como en la progresión fibrótica²⁸. En este contexto, las células de Kupffer también se activan actuando como células presentadoras de antígeno (APC) y produciendo señales de muerte, como el ligando de Fas y TNF- α , promoviendo la inflamación y la fibrogénesis^{29,30}. Este proceso inflamatorio hepático agrava el daño y promueve aún más la fibrosis³¹. Además, las células de Kupffer están involucradas en la activación de las HSCs. Estudios *in vitro* han demostrado que las células de Kupffer puede promover la activación de HSCs de rata induciendo la expresión del receptor PDGF³². Además, el TGF- β 1 derivado de las células de Kupffer estimula la proliferación de HSCs y la producción de colágeno en ratas alimentadas con dieta rica en grasas y etanol³³. Este proceso crónico necroinflamatorio y fibrogénico podría resultar en una posterior conversión de la arquitectura hepática normal en nódulos de regeneración hepática patológicos, tabiques fibróticos densos, promoviendo la aparición de nódulos displásicos que posteriormente pueden progresar a HCC³⁴.

1.2.2.3. Otros factores

El consumo excesivo de alcohol genera enfermedad hepática, que comprende una variedad de trastornos que incluyen desde la esteatosis simple hasta formas graves de lesión hepática, como la esteatohepatitis, fibrosis, cirrosis, y el desarrollo de HCC¹⁸. La fibrosis hepática se acelera en pacientes que además padecen otros tipos de enfermedades hepáticas crónicas como la hepatitis viral y la enfermedad del hígado graso no alcohólica (NAFLD)³⁵. El NAFLD es un espectro de enfermedad hepática crónica caracterizada por la acumulación citoplasmática de triglicéridos en los hepatocitos. La afección varía desde acumulación aislada de triglicéridos de hepatocitos

y esteatosis (hígado graso no alcohólico (NAFL)), hasta acumulación de triglicéridos hepáticos con diversos grados de inflamación y lesión de hepatocitos (esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y finalmente fibrosis hepática y cirrosis y/o HCC³⁶⁻³⁸.

Varios factores contribuyen al desarrollo de NAFLD y el posterior desarrollo de HCC; estos factores incluyen modificadores genéticos y ambientales como la dieta o el estilo de vida. El exceso calórico y el estilo de vida sedentario han llevado a una epidemia mundial de obesidad y síndrome metabólico. Se estima que la consecuencia hepática del síndrome metabólico y la obesidad, NAFLD, afecta hasta a un tercio de la población adulta en muchos países desarrollados y en desarrollo³⁸. En este sentido, el NAFLD se considera un factor etiológico creciente del HCC en países desarrolladas³⁹. El 90% de los pacientes con obesidad y el 70% de los pacientes con diabetes mellitus tienen NAFLD, con un riesgo de 1.5–2 veces mayor de desarrollar HCC que la población general^{16,40,41}.

1.2.3. Modelo de carcinogénesis

Los diferentes factores etiológicos provocan continuos ciclos de daño y reparación de los hepatocitos que culminan en la enfermedad crónica del hígado⁴². La lesión hepática persistente y la regeneración concurrente favorecen, por un lado, la acumulación de mutaciones genéticas y alteraciones epigenéticas que conducen a la transformación maligna de los nódulos preneoplásicos y, por otro lado, a la formación de un ambiente de hipoxia e inflamación, características cruciales del microambiente en el HCC⁴³. Las alteraciones genéticas entre individuos, y a veces incluso en diferentes nódulos del mismo individuo con HCC, pueden ser distintas⁴⁴. En este sentido, se han identificado algunas alteraciones genéticas que incluyen algunos genes como, c-myc, ciclina A2, ciclina D1, Rb1, p16, E-cadherina, SOCS, PTEN, p53 y β -catetina, siendo los dos últimos los que presentan mayor frecuencia de mutación en muestras de HCC⁴².

Los nódulos de regeneración hepáticos tienen características citológicas normales en los que la desregulación de las vías de señalización mitogénicas como la vía de Wnt, la del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y PI3k/Akt/mTOR, pueden llevar a la transformación de ciertos clones, a células displásicas⁴⁵. La carcinogénesis consta de tres etapas generales: iniciación, promoción y progresión; esta última es exclusiva de la transformación maligna que implica la capacidad de invadir tejidos circundantes y a distancia⁴⁶. La iniciación ocurre a nivel del genoma y los agentes carcinógenos causantes pueden ser físicos, químicos o virales⁴⁶. La promoción representa la etapa de crecimiento tisular con la formación del tumor. Participan los factores de crecimiento EGF, PDGF, HGF, el de fibroblastos (FGF), el factor crecimiento de colonias símil insulina (IGF-1)) y los receptores de los factores de crecimiento, como así también la angiogénesis y degradación de la MEC⁴⁶. La progresión implica la capacidad que tiene el tumor de invadir otros tejidos, vecinos o a distancia. Para que la progresión tenga éxito debe atravesar diversos obstáculos: a) La célula maligna debe desprenderse de sus adyacentes y migrar por el espacio intercelular atravesando la membrana basal (degradando la matriz); b) Debe introducirse al vaso sanguíneo o linfático; c) Debe sobrevivir al reconocimiento y ataque de las células inmunitarias; y d) Debe atravesar nuevamente la pared vascular y “anidar” en otro tejido que muchas veces no comparte su estirpe (colonización metastásica)⁴⁷. Cuando células cancerosas se desarrollan, las APC reconocen los antígenos asociados a tumores (AAT), lo que desencadena, en los ganglios linfáticos, la activación de células T inmaduras que se convertirán en células T CD8⁺. Una vez activadas, las células T efectoras migran a través del torrente sanguíneo y alcanzan el sitio del tumor. Allí, reconocen y eliminan las células tumorales liberando moléculas como perforinas y granzimas⁴⁸. Además, el reconocimiento de AAT por los receptores de células T (TCR) desencadena la liberación de interferón gamma (IFN- γ) y

otras citoquinas por las células T CD8⁺. Para poder evitar el reconocimiento y la eliminación por parte de las células inmunes, las células tumorales adquieren diferentes mecanismos de evasión. Las proteínas de punto de control inmunitario, como el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), pueden inhibir el desarrollo de una respuesta inmunitaria activa al actuar principalmente al nivel del desarrollo y la proliferación de células T (*figura 2*: paso 3). Además, las células tumorales pueden evitar a los linfocitos que expresan la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1), expresando sus ligandos PD-L1 o PD-L2. Cuando esto sucede, la unión de PD-1/PD-L1 atenúa la respuesta inmune antitumoral, debilitando así la capacidad de ataque de las células T y modular las respuestas inmunes activas en el TME. A esto se denomina escape inmune o tolerancia inmunitaria (*figura 2*: paso 3 y 7).

Si las células tumorales pueden escapar y evadir la respuesta inmune, también pueden eventualmente invadir otras regiones, en un proceso denominado metástasis, causa principal de mortalidad relacionada con el cáncer. Las adaptaciones funcionales adquiridas por las células cancerosas para sobrevivir en entornos alterados se denominan plasticidad fenotípica⁴⁹ (*Figura 3*).

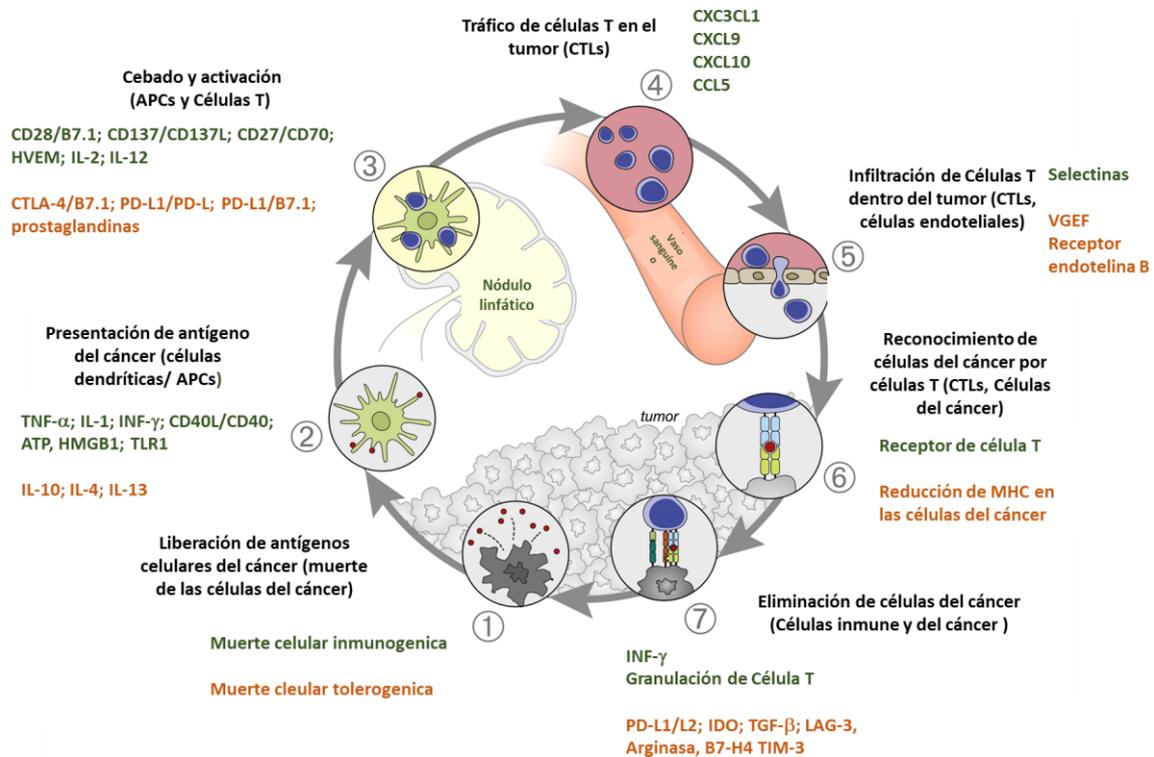


Figura 2: Factores estimuladores e inhibidores en el ciclo de inmunidad al cáncer. El ciclo de interacciones entre las células tumorales y las inmunes se puede dividir en siete pasos específicos, comenzando con la liberación de antígenos de las células tumorales (AAT), el recorrido, y activación de las células T hasta el contacto nuevamente con las células tumorales. Sin embargo, el balance positivo de los factores estimulantes (**verde**) y negativo los factores inhibidores (**marrón**) es de suma importancia para una inmunidad efectiva para la erradicación del tumor. Tomado y modificado de *Chen DS, et al.* Las abreviaturas son las siguientes: CDN, dinucleótido cíclico; ATP, adenosina trifosfato; HMGB1, proteína B1 del grupo de alta movilidad; TLR, receptor tipo Toll; GITR, gen relacionado con la familia TNFR inducido por glucocorticoides; CTLA-4, antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos; PD-L1, ligando de muerte programada 1; CXCL/CCL, ligandos con motivos de quimioquinas; LFA1, antígeno 1 asociado a la función linfocitaria; ICAM1, molécula de adhesión intracelular 1; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; IDO, indoleamina 2,3-dioxigenasa, atenuador VISTA, supresor de Ig del dominio V de la activación de células T; LAG-3, proteína del gen 3 de activación de linfocitos; MIC, secuencia relacionada con el polipéptido proteína MHC clase I; TIM-3, dominio de inmunoglobulina de células T y dominio de mucina-3.

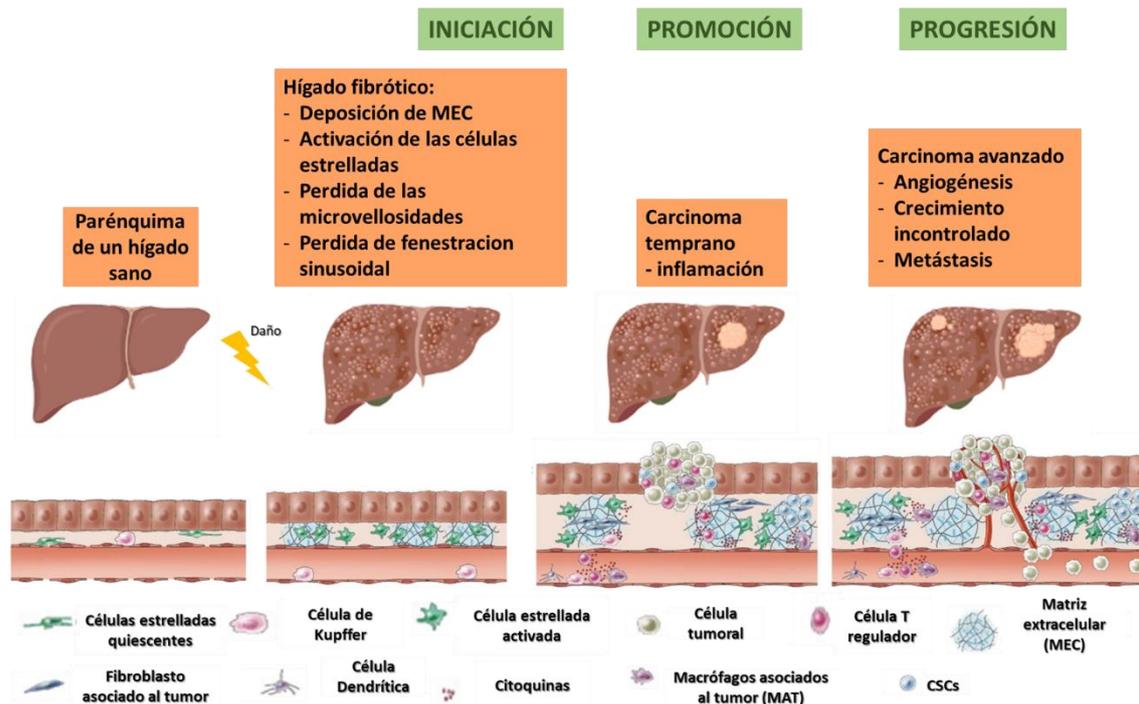


Figura 3: Alteraciones celulares y anatómicas, que conducen al desarrollo del HCC. Modificado de Hernández-Gea, et al: *Gastroenterology* 2013⁴⁷

1.3. Microambiente tumoral

Una característica clave en el desarrollo del cáncer es la presencia de un TME que está involucrado en todas las etapas de la progresión maligna, desde las fases de iniciación hasta y la progresión local y a distancia⁵⁰. Este TME está constituido por componentes celulares como las LSECs, las HSCs, los fibroblastos asociados al cáncer (CAF), las CSCs y células inmunes como los macrófagos asociados al tumor (TAMs), las células T reguladoras (Treg); y las células dendríticas (DCs); todos estos componentes celulares además de la presencia de factores y moléculas de señalización cooperan para favorecer el crecimiento y la diseminación del tumor^{47,51}. La interacción entre las células tumorales y del estroma es dinámica, y altera drásticamente el comportamiento y la agresividad del HCC, particularmente en las primeras etapas de la enfermedad en la cual se favorece la acumulación de mutaciones y aberraciones epigenéticas, que conducen a la transformación maligna de los nódulos preneoplásicos⁵². Ha sido posible identificar

diferentes subclases de entorno inmunitario presentes en el TME que influyen en el inicio del tumor y la respuesta a la terapia⁵³. En general, se pueden describir tres clases de TME (de acuerdo con datos recientes obtenidos de humanos y modelos de ratones) en base a la composición del infiltrado tumoral y a la respuesta inflamatoria⁵³.

1) Aquellos que están ampliamente infiltrados con células inmunes, pero prácticamente sin presencia de linfocitos citotóxicos (CTLs) en el núcleo del tumor, se denominan TME excluidos infiltrados (EI): éstos tienen CTLs localizados a lo largo del borde de la masa tumoral en el margen invasivo, o 'atrapados' en nidos fibróticos. Se ha hipotetizado que los tumores clasificados como EI son poco inmunogénicos o “fríos” y están asociados con tumores epiteliales, como el carcinoma colorrectal⁵⁴, el melanoma⁵⁵ y el adenocarcinoma ductal pancreático⁵⁶. 2) Los TME inflamados e infiltrados (II): pueden tener células inmunes dentro de la masa tumoral y se consideran tumores inmunológicamente “calientes” y se caracterizan por una alta infiltración de CTLs que expresan PD-1 y células tumorales que expresan PD-L1⁴⁵. 3) EL TME puede contener estructuras linfoides terciarias (ELT), que son agregados linfoides cuya composición celular es similar a la de los ganglios linfáticos. Los ELT a menudo, pero no siempre, son correlacionado con un pronóstico positivo⁵⁷. De manera similar a los ganglios linfáticos, los ELT pueden contener una diversidad sustancial de linfocitos, incluidas células T naïve y activadas, Treg, células B y DCs⁵⁸. Los ELT generalmente están presentes en el margen tumoral invasivo y en el estroma, y se cree que actúan como sitios de reclutamiento linfoide y activación inmune que generalmente se forman en entornos de inflamación aumentada⁵⁸.

1.3.1. Matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) es esencial para dar soporte a la arquitectura general del hígado y constantemente interactúa con los componentes celulares del TME. Frente a un

daño en el hígado, la actividad de las enzimas de remodelación de la MEC están desreguladas, conduciendo a un microambiente fibrótico caracterizado por el incremento en la rigidez y abundancia de factores de crecimiento que contribuyen a la tumorigénesis⁵⁹. La MEC y las proteínas asociadas a la MEC, forman en conjunto la denominada “matrisoma”⁶⁰, y se compone principalmente por colágeno, lamininas, ácido hialurónico (AH) y fibronectina (FN), que desencadenan la activación del sistemas receptores específicos de MEC, lo que afecta el comportamiento de las células epiteliales y la tumorigenesis en el HCC⁶¹. Las fibras de colágeno tanto lineales como gruesas a menudo se encuentran en áreas con invasión activa de tejidos y de vascularización , y varios estudios han demostrado que la migración de las células tumorales se lleva a cabo sobre las fibras de colágeno⁶². La desregulación de la producción de colágeno de tipo 1 puede afectar directamente al HCC como lo sugieren estudios *in vitro*, la excesiva producción de colágeno promueve la transición epitelio-mesenquima (EMT)⁶³, la proliferación⁶⁴, y la migración de células tumorales⁶⁵. Sin embargo, se ha demostrado que el colágeno tipo I se correlaciona positivamente con la supervivencia en pacientes con HCC⁶³, lo que sugiere que el colágeno puede promover o restringir el desarrollo del HCC en entornos específicos⁶⁶. Por otro lado, el AH es un glicosaminoglicano no sulfatado que ejerce múltiples funciones en la MEC que incluyen, además de su función como componente mecánico y lubricante, el de promover la cicatrización de heridas, la modular inflamación y el comportamiento de las células epiteliales. La actividad del AH está vinculada a su fragmentación mediada por enzimas (hialuronidasas) específicas y resulta de la interacción del AH y consecuente activación de múltiples receptores, incluidos CD44, RHAMM y TLR4. El receptor CD44 inducido por AH puede resistir la muerte inducida por p53⁶⁷, activar la EMT y permitir la invasión^{68,69}. Además, la expresión aumenta de CD44 en el HCC está

correlacionada con el grado de crecimiento y la menor diferenciación tumoral. Se ha reportado que los pacientes con expresión de CD44, especialmente si son positivos para múltiples isoformas, tienen una supervivencia disminuida^{67,70}.

Además, la MEC es esencial para la neovascularización del tumor. El proceso de vascularización se inicia cuando la membrana basal es removida por las metaloproteasas (MMPs)^{25,27,28}. El crecimiento tumoral requiere la ruptura de los límites preexistentes y la reorganización del tejido hepático, un proceso regulado principalmente por las MMPs e inhibidores tisulares de las MMPs (TIMPs). La sobreexpresión de MMPs puede comprometer la barrera de la membrana basal y facilitar la invasión del tejido por las células cancerígenas. El HCC ha sido asociado con una alta actividad proteolítica y altos niveles de MMP2. Además, un desbalance entre MMP2 y TIMP2 está correlacionado con la aparición de metástasis, y un mal pronóstico⁷¹. La nueva vascularización tumoral facilita la infiltración de células inmunes, y la progresión tumoral⁷².

1.3.2. Componentes celulares

1.3.2.1. Fibroblastos asociados al tumor

Los fibroblastos son críticos tanto en la homeostasis como durante la cicatrización de heridas. En el contexto de la curación de una herida, son necesarios la remodelación de la MEC y la proliferación epitelial; sin embargo, en el TME, estos procesos contribuyen al desarrollo carcinogénico⁷³. La mayoría de los CAFs derivan de fibroblastos residentes del tejido afectado, activados por la interacción de las células estromales en el TME y las señales producidas por las células neoplásicas⁷⁴. Los CAFs también pueden derivarse de células estrelladas, de la migración de células estromales adiposas o derivadas de la médula ósea y de células endoteliales/epiteliales a través de la EMT^{75,76}. Estas células cumplen una función muy importante en el TME, secretando principalmente colágeno tipo I para conformar la MEC. Además, se ha descrito que tienen la capacidad de promover la proliferación celular y mantener las características de célula

madre de las células tumorales; dirigir la angiogénesis, la invasión y metástasis, promover la resistencia a las terapias y suprimir a las células T⁷⁷.

1.3.2.2. Células del sistema inmunitario

El componente inmune del TME está constituido predominantemente por células T CD4⁺ y CD8⁺, DCs, macrófagos (M ϕ) y células T reguladoras (Tregs)⁷⁸. La mayoría de los linfocitos infiltrantes de tumores son linfocitos T CD4⁺ Tregs. Estas células Tregs promueven la tolerancia del Sistema inmune a las células neoplásicas y se ha asociado con un peor pronóstico del HCC^{79,80}. Las células supresoras derivadas de células mieloides (MDSCs) también juegan un papel importante en la regulación e inducción de células T, favoreciendo una respuesta inmunitaria supresora dentro del TME⁸¹. El aumento de la secreción de IL-17 por los linfocitos T CD4⁺ en HCC también se correlaciona con un aumento de la recurrencia tumoral después de la resección⁸¹.

1.3.2.2.1. Células dendríticas

Las DCs son células derivadas de la hematopoyesis linfo-mieloide en la médula ósea (MO), y coordinan respuestas inmunes innatas y adaptativas. Las DCs son APCs que activan y diferencian células T vírgenes en reposo a linfocitos T citotóxicos (CTLs), o colaboradores (LTh CD4+), células NK y las células B jugando un rol crucial en la formación de memoria inmunológica⁸². Las DCs, están presentes en tejidos y órganos linfoides y no linfoides, así como circulantes en linfa aferente y sangre periférica en la cual tienen funciones y morfología únicas y específicas. Estas incluyen a las células de Langerhans, las DCs derivadas de monocitos (CD14⁺), las DCs mieloides y las DCs plasmocitoides⁸³. Se caracterizan por la elevada expresión de antígenos MHC clase II y la ausencia de marcadores de linaje como: CD14 (monocitos), CD3 (linfocitos T), CD19, CD20 y CD24 (linfocitos B), CD56 (células NK) y CD56b (granulocitos)⁸⁴. Presentan moléculas de adhesión comunes con monocitos y M ϕ (CD11a, CD11c, CD50,

CD54, CD58, CD102)^{85,86} y moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86)⁸⁷. Su fenotipo varía a lo largo de los diferentes estados de maduración y activación. Los precursores circulantes en la sangre pueden expresar CD2, CD4, CD13, CD16, CD32 y CD33, que van perdiendo gradualmente con la maduración. Por el contrario, las moléculas coestimuladoras, de adhesión y los antígenos del MHC aumentan a lo largo de la maduración. Otras moléculas, como CD80 y CD86, incrementan su expresión con la activación, principalmente tras la unión de CD40 a su ligando. CD86 es un marcador temprano de maduración, mientras que CD80 aparece más tardíamente y está ausente en los precursores circulantes⁸⁸. En general, las DCs maduras se han considerado inmunoestimuladoras, mientras que las inmaduras son supresoras y tolerógenas. Sin embargo, su gran plasticidad funcional dependerá de su estado de activación, madurez y la polarización en el TME⁸⁹. Entre las funciones de las DCs relacionadas con la inmunidad en cáncer, encontramos los mecanismos de captura, procesamiento y presentación de antígenos derivados de células tumorales.

1.3.2.2.2. Macrófagos asociados al tumor

Las células de Kupffer conocidas como los M ϕ hepáticos residentes, juegan un papel importante en la inflamación y la fibrogénesis hepática siendo una de las poblaciones de células inmunes innatas más abundante del hígado⁹⁰. Estos M ϕ cumplen un rol esencial en el tejido hepático, tanto en el mantenimiento de la homeostasis, como en el inicio y la progresión de las enfermedades hepáticas. Las células de Kupffer pueden activarse por muchos factores nocivos como la infección viral, la dieta rica en grasas y el alcohol, la liberación de citoquinas, PDGF y especies reactivas de oxígeno (ROS)⁹⁰. Se han caracterizado distintas poblaciones de M ϕ en el hígado, los M ϕ residentes (células de Kupffer) y los M ϕ infiltrantes, es decir, M ϕ circulantes derivados de la MO (moM ϕ), M ϕ peritoneales (pM ϕ) que residen en regiones subcapsulares del hígado, y los

monocitos esplénicos⁹¹. Los M ϕ también juegan un papel fundamental en la progresión del cáncer en el contexto de inflamación⁹². Estos TAMs generalmente derivan de monocitos que infiltran el tumor y células de Kupffer residentes que son reclutados en los tejidos tumorales por las quimioquinas y otros factores secretados por las células tumorales y las células inflamatorias presentes en el TME⁹³. Por su plasticidad, los M ϕ son capaces de ejercer efectos tanto antitumorales como protumorales mediante la expresión de diferentes programas funcionales en respuesta a distintas señales del microambiente (*figura 3*)⁹². Los M ϕ pueden presentar un fenotipo de activación proinflamatorio clásico o M1, caracterizado por la presencia de marcadores de superficie como CD86 y complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MCHII), y la secreción de IL-1 β , IL-12, IL-23 y GM-CSF que activan la respuesta de linfocitos de tipo Th1, y un fenotipo de activación alternativo o M2 caracterizado por la presencia de marcadores de superficie como CD206 y CD163, y la secreción de IL-4, IL-10 y TGF- β ⁹⁴. Sin embargo, en los últimos años, se ha revelado una enorme heterogeneidad en los M ϕ hepáticos con fenotipos de activación intermedios, que dependen de la interacción con otras células estromales y citoquinas del TME, capaces de conferir a los M ϕ distintas funciones y firmas genéticas, destacando su importancia en distintas enfermedades hepáticas. (*Tabla 3*). Varios estudios han demostrado que los TAMs presentes en el TME, adquieren polarizan a un fenotipo M2 y promueven la angiogénesis, la metástasis y suprimen la inmunidad adaptativa a través de la expresión de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y MMPs que se han relacionado con un mal pronóstico en el HCC (*figura 4*)^{95,96}.

1.3.2.2.3. Linfocitos

Los linfocitos, células principales del sistema inmunitario adaptativo, tienen origen en la MO a partir de un progenitor linfoide común derivado de la diferenciación de una célula

madre hematopoyética. Los linfocitos B se desarrollan en la MO, mientras los T lo hacen en el timo^{97,98}. A diferencia de las células fagocíticas con capacidad de captar y procesar los diferentes antígenos (Ag), los linfocitos son células leucocitarias altamente específicas. Cada linfocito presenta en su membrana un único tipo de receptor específico, llamado receptor de célula T o B (TCR/ BCR, respectivamente) el cual es capaz de interactuar sólo con un antígeno presentado por las APC.

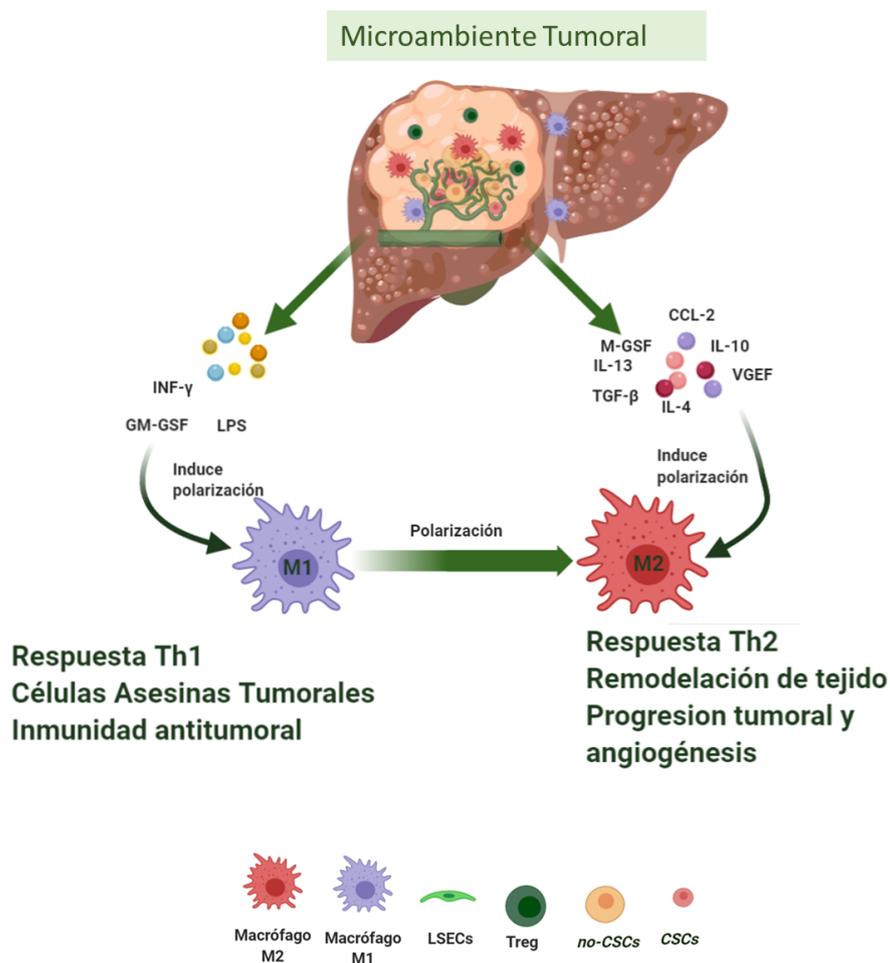


Figura 4: Poblaciones de Mφ y progresión del HCC. Diferentes tipos de Mφ que migran al hígado dañado e interactúan con diferentes componentes del TME. Adaptado de Daphne van der Heide *et al*, *Frontiers in immunology* 2019⁹².

Dado que hay entre 10^{10} y 10^{12} linfocitos diferentes, el repertorio de reconocimiento de antígenos es muy amplio, y son capaces de responder prácticamente a cualquier

patógeno o sustancia extraña que ingresen nuestro organismo. Cuando ocurre presentación de antígeno, que ocurre para eliminar con rapidez al agente extraño, sólo los linfocitos que lo reconocen, se activarán y proliferarán, llamando a este proceso expansión clonal.

Tabla 3: Variabilidad de fenotipos de Mφ funcionales

M1 proinflamatorio	Polariza con LPS o TNFα, INFγ y	Antimicrobiana Tumoricida	Citoquinas: TNFα, IL1b, IL-6, IL-12, IL-5, IL-18, IL-23 y GM-CSF Quimioquinas: CXCL1, 2, 3, 5, 8, 9, 10, CCL2, 3, 4, 5, 11, 17 y 22	
	Asociadas con respuesta Th1 Expresión de iNOS	transduce a través de los factores de transcripción y NFκB, STAT-1(inhibe la activación de STAT-6)	expresión de la subunidad p65 NFκB Presencia de proteína de membrana MHC II+ y de coestimulo CD86+	
M2 Anti-inflamatorio	Alta expresión de Arginasa-1		IL-10, IL-4, IL-13, TGFβ, VEGF y M-CSF CCL2, EGF, PDGF	
	Asociadas con respuesta Th2	Reparación de tejido, la resistencia a los parásitos y promoción de tumores	p50 NFκB	
	Subtipos			
	M2a	M2b	M2c	M2d
	TGFβ, IGF, fibronectina	producción de IgG de células B	mecanismos antiinflamatorios y de eliminación	
	STAT 3		STAT 6	
	IL4, e IL13, FIZZ+ e Ym-1+	IC, LPS e IL-1β	IL-10 y TGFβ, y glucocorticoides	
CD206 y CD163				
Reparación de tejido	Protectora de patógeno	Reprime la fibrosis y la inflamación y promueve la reparación de tejido	Contribuye al complemento inflamatorio Angiogenesis y metástasis.	

Existen diferentes tipos de LT: 1) LT cooperadores (LTh): Son CD3⁺CD4⁺CD8⁻ (linfocitos CD4⁺), interaccionan con APCs que expresan la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC clase II), y pueden diferenciarse a células efectoras dependiendo de algunos factores como: las citoquinas que se producen en el entorno, los distintos patrones de migración y la expresión de factores de transcripción (FT) específicos. De esta manera, los LTh se dividen en subpoblaciones

con distinta función: LTh1, LTh2, LTh17, LTh9, T folicular auxiliar (Tfh) y células T reguladoras inducibles (Treg)^{97,99}.

Los CD4⁺ de tipo Th1 son mediadores de la actividad citotóxica y la inflamación local¹⁰⁰. Una vez activos secretan citoquinas como interleuquina-2 (IL-2) e interferón γ (INF- γ) y expresan el FT, T-bet, participando fundamentalmente en respuestas de tipo celular frente a patógenos intracelular o frente a células tumorales; promoviendo a M ϕ , células dendríticas y a otros linfocitos a aumentar la secreción de mediadores para potenciar la respuesta inmunitaria antitumoral⁹⁷.

Por otro lado, LTh2 cooperan en la respuesta humoral liberando las citoquinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y TGF β e IL-13, y expresan el FT GATA-3^{97,101,102}.

Otras poblaciones de LT son los Tregs, se caracterizados por expresar, además de CD3⁺ y CD4⁺, de manera constitutiva el CD25 (cadena α del receptor para la IL-2) en la membrana. Cuando se activan, por estímulos de citoquinas como IL-2 y TGF β , expresan el FT FOXP3 y STAT5 y comienza la regulación de la respuesta inmune (que se conoce como tolerancia inmunológica) inhibiendo sobre todo a los LTh, tanto a través del contacto célula-célula como con la secreción de citoquinas inhibitorias IL-10 y TGF β ⁹⁹.

Los linfocitos T citotóxicos o CTLs son células CD3⁺CD4⁻CD8⁺, con capacidad citolítica; reconocen antígenos expresados en las moléculas del MHC de clase I de células propias infectadas con virus o células tumorales¹⁰³. Una vez que reconoce al antígeno extraño, se activa y promueve la proliferación clonal, y la secreción de enzimas citolíticas (granzimas y perforinas) y citoquinas como IFN γ y TNF α provocando la apoptosis de la célula blanco¹⁰⁴.

Ambos linfocitos, LT y LB pueden generar células de memoria, que permitirán al sistema inmune recordar contactos previos con un antígeno específico y responder de

forma más rápida y eficaz en sucesivas exposiciones al mismo antígeno. En el contexto de la inmunobiología del cáncer, los linfocitos pueden reconocer, responder y volver a reconocer antígenos, incluyendo antígenos tumorales.

1.3.2.3. Cancer Stem Cells

A pesar de los nuevos datos y las crecientes investigaciones sobre el origen de las células tumorales hepáticas, la evidencia no es aún concluyente. Muchos estudios apoyan la hipótesis jerárquica, que sugiere que los tumores hepáticos tienen células especializadas con alta capacidad de autorrenovación, diferenciación y resistentes a los tratamientos; estas células se denominan células iniciadoras de tumor o cancer stem cells (CSC)¹⁰⁵.

1.3.2.3.1. Origen celular del HCC: del hepatocito a la célula iniciadora del cáncer

Los hepatocitos se encuentran en estado quiescente en situaciones fisiológicas. Sin embargo, tienen una alta capacidad para dividirse y regenerarse en respuesta a agresiones agudas. En respuesta al daño provocado por la inflamación crónica las células progenitoras se activan e intervienen en múltiples procesos que llevan a la activación de diferentes tipos celulares, (como las HSCs) y liberación de factores de crecimiento¹⁰⁶. En este contexto, las CSCs pueden provenir de células madre normales, que tienen capacidad de autorrenovación, que, al adquirir cambios genéticos y epigenéticos transforman su fenotipo; o bien pueden provenir de células somáticas desdiferenciadas que adquieren capacidad de autorrenovación, impulsando el inicio, progresión, metástasis y recurrencia del tumor¹⁰⁷. La heterogeneidad tumoral generalmente es debida a la contribución de la evolución clonal, las diferencias en el microambiente y la organización jerárquica como resultado de la diferenciación de las células tumorigénicas de aquellas no tumorigénicas¹⁰⁸. Según este concepto, los diferentes tipos de cáncer se desarrollarían a partir de un subgrupo de células con

capacidad de autorrenovación análoga a las células madre normales, lo que puede resultar en una heterogeneidad fenotípica única para cada tipo de tumor¹⁰⁹. El modelo de las CSCs propone que las neoplasias están constituidas por dos poblaciones celulares diferentes originadas por una división asimétrica: por un lado, las células troncales malignas con capacidad de autorrenovación, responsables ante todo de la progresión tumoral y la diseminación, y una segunda población de células tumorales, parcialmente diferenciadas, no tumorigénicas que constituyen la mayor parte de la masa tumoral¹¹⁰ (*Figura 5*). Alternativamente, se ha pensado que las células somáticas maduras podrían desdiferenciarse hacia células parecidas a CSCs capaces de autorrenovarse. Esta hipótesis sostiene que esta población celular minoritaria, que se autorrenueva e impulsa el crecimiento y la diseminación tumoral, es refractaria al tratamiento con agentes quimioterapéuticos convencionales dirigidos contra la mayoría de las células tumorales que se dividen rápidamente¹⁰⁵. Esto también se relaciona con la capacidad anti-apoptótica de las CSCs en múltiples tipos de tumores, lo que resulta en la remanencia y al origen de la recurrencia^{111–113}.

1.3.2.3.2. Marcadores de Cancer Stem Cells

A pesar de que la relevancia clínica de las CSCs sigue siendo difícil de determinar, cada vez hay más reportes que respaldan que las CSCs tiene un papel en el inicio y el mantenimiento de los tumores primarios y la promoción de la metástasis. Se ha identificado que la expresión de varios marcadores como EpCAM, CD133, CD90, CD44, CD24, CD13 y OV6 se encuentran presentes en el nicho clonogénico de varios tumores, incluido el HCC^{114–117} (*tabla 4*). Algunos estudios han demostrado que las células EpCAM⁺ y CD90⁺ son dos subpoblaciones independientes.

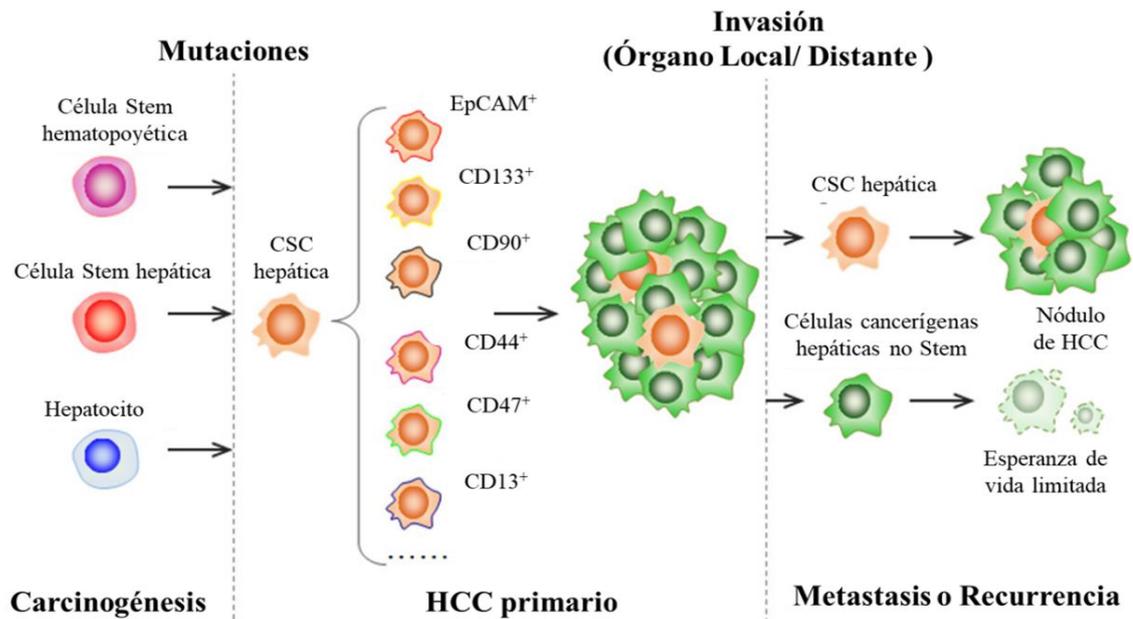


Figura 5: Iniciación y diseminación del HCC basado en el modelo de CSCs. Las CSCs hepáticas podrían derivar de las células madres hepáticas, tras sufrir mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores que le otorgan un potencial tumorigénico, o de una reprogramación en las células hepáticas diferenciadas. Estas CSCs hepáticas eventualmente se expanden con ciclos de autorrenovación y diferenciación. Las CSCs pueden estar involucradas en la recurrencia tumoral luego de la resección, y en la resistencia a las terapias convencionales¹¹⁴. Tomado y adaptado de *Frend et al., Neoplasms 2014*.

Las células EpCAM⁺ tienen características de células madre epiteliales hepáticas y están asociadas con una alta capacidad tumorigénica, mientras que las células CD90⁺ tienen características de células endoteliales vasculares mesenquimatosas y capacidad metastásica¹¹⁸. Por otro lado, se ha demostrado en líneas celulares de HCC que la expresión de CD133 está involucrada en la supervivencia celular a través de la regulación de la captación de glucosa y la autofagia¹¹⁹.

Tabla 4: Marcadores de células iniciadoras del cáncer en el HCC. Extraído y modificado de Flores-Téllez, World Journal of Gastroenterology 2017.

<i>Marcador</i>	<i>Otra denominación</i>	<i>Función</i>
CD133	Prominina-1	Señalización. Neurotensina/IL-8/ CXCL1. proliferación, autorrenovación, diferenciación clonogenicidad y tumorigenicidad. ^{120,121}
OV6	Marcador de células ovas	Desconocido hasta ahora. Se considera marcador de células progenitoras inducibles en modelo de roedores. Clonogenicidad y diferenciación. ^{122,123} .
EpCAM	Molécula de adhesión epitelial celular	Activación de la señalización de Wnt. Reprogramación, autorrenovación, diferenciación y tumorigenicidad. ^{124,125} .
CD13	Grupo de diferenciación 13	Reducción del daño en el ADN inducida por ROS. Quimiorresistencia, quiescencia, tumorigenicidad y autorrenovación. ^{126,127} .
CD24	Antígeno termoestable	Regulación de NANOG mediada por STAT3. Autorrenovación, tumorigenicidad y diferenciación ¹²⁸⁻¹³⁰ .
CD90	Thy	Anclaje de glicofosfatidilinositol (GPI) ^{128,131}
CD44	Receptor de AH	Participación en la EMT. Proliferación, autorrenovación, diferenciación clonogenicidad y metástasis ^{120,132,133}
ALDH	Aldheído dehidrogenasa	Grupo de enzimas intracelulares que oxidan los aldehídos (cumpliendo así una función desintoxicante). ^{134,135}

Además, Zheng Zhu y col, observaron que las células CD133⁺CD44⁺ mostraban alta capacidad tumorigénica con expresión diferencial de algunos genes asociados con células madre y fueron más resistentes a los agentes quimioterapéuticos debido a la regulación positiva de los transportadores de la superfamilia de proteínas con cassetes

de unión a ATP (ABC), incluidos ABCB1, ABCC1 y ABCG2, apoyando que estas células pueden ser el origen del HCC¹²⁰. Además, se ha observado que cuando se aíslan las CSCs hepáticas, mediante sus marcadores, las vías de señalización, de autorrenovación y diferenciación como Wnt, Notch, TGF- β , Hedgehog y la vía PI3K/AKT/mTOR, están muy activas en diferentes magnitudes, apoyando la idea de la contribución de las CSCs a la heterogeneidad del HCC^{108,136}.

Por otro lado, Zhou S *et al*, han descrito que el receptor 4 tipo Toll (TLR4) juega un papel esencial en la progresión del HCC y ha sido explorado como posible marcador de CSC hepática¹³⁷. En su estudio demostraron que la expresión de TLR4, en muestras de pacientes con HCC recidivante, fue mayor que aquellos no recidivantes, y han observado que la vía de señalización de TLR4 es activada por lipopolisacárido (LPS) induciendo la activación de la vía de Akt y el aumento de la expresión SOX2, lo que indica que SOX2 es un mediador aguas abajo de la señalización de LPS-TLR4¹³⁷.

Además de la resistencia observada frente a las terapias convencionales, las CSCs pueden evadir al sistema inmune, por ejemplo mediante la sobreexpresión del marcador CD47, que participa en las vías de transducción de señales inhibitorias, cuando se une a la proteína de señal regulatoria α (SIRP α) presente en M ϕ y otras APCs, evitando que las CSCs sean fagocitadas¹³⁸. SIRP α es una proteína transmembrana que contiene tres dominios similares a inmunoglobulina (Ig) en la región extracelular y cuatro residuos de tirosina para la fosforilación en la región citoplasmática. La fosforilación de la tirosina de la región citoplasmática de SIRP α se desencadena por diversos factores de crecimiento y citoquinas. Además, SIRP α es especialmente abundante en las neuronas, así como en las células hematopoyéticas de linaje mieloide, como los M ϕ o las DCs¹³⁹. La región extracelular de SIRP α interactúa con su ligando, CD47, a través de un dominio similar a IgV en el extremo NH₂ de la región extracelular de SIRP α . En

contraste con la expresión restringida de SIRP α , CD47 se expresa en la mayoría de los tipos celulares y es indicador de supervivencia celular¹⁴⁰. La unión de SIRP α con CD47 promueve la fosforilación de tirosina de la región citoplasmática de las APC. El papel fisiológico de la interacción entre CD47-SIRP α es la prevención de la fagocitosis de las células sanguíneas maduras, actuando como un interruptor molecular para la regulación de la fagocitosis de glóbulos rojos envejecidos. Sin embargo, se ha reportado que la interacción de CD47 expresada en células tumorales con SIRP α en los M ϕ evita la eliminación de las células tumorales (*figura 6*). Recientemente, ha sido propuesto que la interrupción de la interacción CD47-SIRP α sea una nueva estrategia para el tratamiento del cáncer. De hecho, CD47 es idéntico a un antígeno tumoral a OV-3, cuyo nivel se encuentra aumentado notablemente en las células de carcinoma de ovario¹⁴¹. Existen varios reportes que indican el aumento del nivel de la expresión de CD47 en leucemia mieloide aguda¹⁴² y en tumores sólidos¹⁴³. La expresión elevada de CD47 también se ha sido asociada con un mal pronóstico en pacientes con estos tumores malignos¹⁴⁴. Por lo tanto, el aumento de la expresión de CD47 en las células tumorales permite, de alguna manera, la presentación antigénica por los APCs, lo que resulta en la promoción del crecimiento tumoral y la diseminación *in vivo*¹⁴⁵.

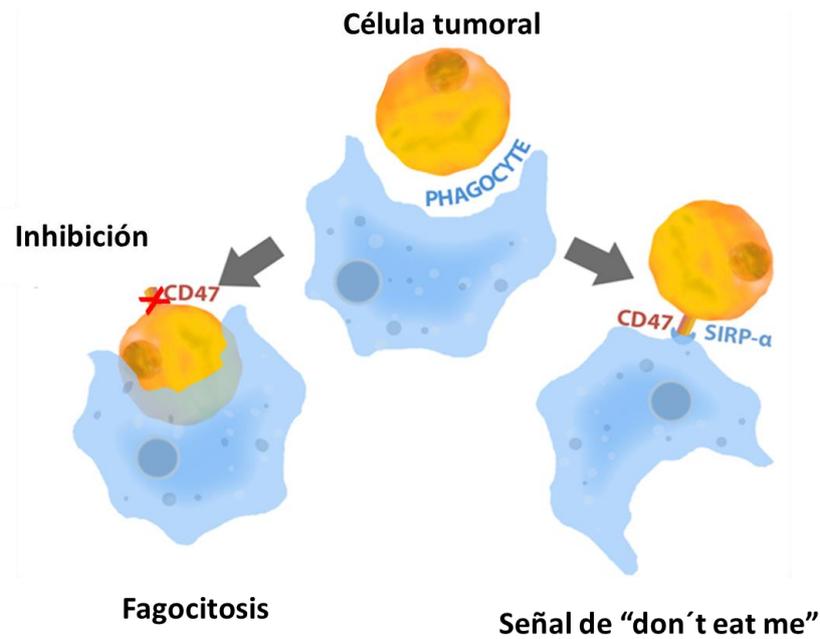


Figura 6: Papel de la interacción CD47-SIRPα en la vigilancia inmunitaria tumoral. La interacción de SIRPα en una APC con CD47 presente en una célula tumoral, evita la fagocitosis las células tumorales por las APC. El bloqueo de la interacción CD47-SIRPα como una nueva estrategia para la terapia contra el cáncer. Modificado del sitio web *Biocience*.

1.4. Tratamiento del hepatocarcinoma

1.4.1. Convencionales

Desafortunadamente, sólo alrededor del 30-40% de los pacientes diagnosticados con HCC puede beneficiarse con tratamientos potencialmente curativos como las terapias ablativas (radiofrecuencia o alcoholización), la resección hepática y el trasplante¹⁴⁶. En la mayoría de los casos, el HCC es diagnosticado en estadios avanzados y las opciones terapéuticas son limitadas y sin intención curativa.

La quimioterapia sistémica no ha mostrado un beneficio en términos de supervivencia en ensayos clínicos aleatorizados, ya que los pacientes con HCC tienen cirrosis subyacente que se asocia con una baja tolerancia a la quimioterapia sistémica, con elevada de toxicidad^{147,148}. En un estudio inicial de fase II, la antraciclina doxorubicina,

que se ha utilizado en un principio para el tratamiento del HCC avanzado, demostró tasas de respuesta de un 79%, incluidas tres respuestas completas en HCC avanzado¹⁴⁹. Sin embargo, estudios posteriores demostraron una eficacia limitada (<20% de respuestas clínicas), elevada toxicidad y sin beneficio significativo en la supervivencia¹⁵⁰.

Por otro lado, el anti-metabolito 5-fluorouracilo (5-FU), una pirimidina fluorada que se usa comúnmente en el tratamiento del cáncer de colon, se ha evaluado para el HCC avanzado mostrando una actividad modesta con tasas de respuesta del 28%¹⁵¹. Sin embargo, en estudios donde se compara con otros quimioterápicos mostró una escasa o nula respuesta clínica^{152,153}. Por otro lado, se ha observado en varios estudios clínicos, que el uso de la gemcitabina, otro anti-metabolito que inhibe la enzima responsable de la generación de los trifosfatos de deoxinucleósidos en la síntesis del ácido desorribonucleico (ADN), induce efecto antitumoral¹⁵⁴ pero con efectos mínimos (17-18%) en la sobrevida o incluso ineficaz, en el HCC¹⁵⁵. Recientemente, se ha investigado la gemcitabina en combinación con la doxorrubicina mostrando una tasa de respuesta del 24%¹⁵⁶.

Por otro lado la radioterapia, tampoco ha probado ser muy eficaz para el HCC, pero se han visto algunos resultados alentadores al utilizar graduaciones crecientes de radiación y/o en combinación con otras terapias dirigidas, que puede proporcionar un excelente control local¹⁵⁷.

1.4.2. Terapias dirigidas e inhibidores de tirosina quinasas

Las tirosinas quinasas (TK) son enzimas fosforilantes que participan en diversas vías celulares y juegan un papel vital en la regulación de la señalización del factor de crecimiento. La activación de las TK produce un aumento de la proliferación y el crecimiento de las células tumorales, tiene efectos anti-apoptóticos y estimula la

angiogénesis. Las proteínas quinasas están involucradas en el comienzo de la tumorigénesis cuando son activadas por mutaciones somáticas. Los inhibidores de la tirosina quinasa (ITK), se unen a los TK o suprimen la unión de la adenosina 5'-trifosfato (ATP) para interferir con la transducción de señales^{158,159}. Existen diferentes ITK como sorafenib, regorafenib, lenvatinib, palbociclib, sunitinib y abemaciclib que varían según sus efectos farmacocinéticos¹⁶⁰.

En la actualidad, el sorafenib (Nexavar®) es el tratamiento estándar, de primera línea, para pacientes con HCC avanzado y aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA). A nivel molecular inhibe múltiples tirosina quinasas de la superficie celular (ej. receptores para VEGF, PDGF (α y β), c-kit) y varias proteínas de la cascada quinasa como Ras, C-Raf, B-Raf, así como MAPK¹⁶¹. Estas cascadas de señalización involucra a la señalización, proliferación, angiogénesis y apoptosis de las células tumorales¹⁶¹. Se ha demostrado que *in vitro*, sorafenib inhibe la proliferación de células HCC e induce su apoptosis, así como también inhibe el crecimiento tumoral, reduce la angiogénesis tumoral e induce la apoptosis de células tumorales en modelos animales de HCC¹⁶². A pesar de la eficacia comprobada del sorafenib para aumentar significativamente la supervivencia en pacientes con HCC avanzado, sus resultados son limitados, en parte debido al desarrollo de resistencia^{163,164}. El ensayo clínico SHARP¹⁶⁵ y su validación en Asia¹⁶⁶ han demostrado que el sorafenib aumenta la supervivencia general en solo de meses en comparación al placebo¹⁶⁷.

Además, lenvatinib (otro ITK), actualmente es considerado tratamiento de primera línea tras los resultados de un estudio randomizado controlado contra sorafenib, ofreciendo similares resultados en cuanto a supervivencia global (no inferioridad en comparación con sorafenib) HCC^{168,169}. Lenvatinib inhibió el crecimiento tumoral en diferentes líneas de HCC y en modelos animales *in vivo*¹⁷⁰.

Por otro lado, en 2017, la FDA aprobó el regorafenib (Stivarga®), en segunda línea para pacientes con HCC no resecable^{43,171}. El regorafenib exhibió actividad anti-proliferativa, anti-angiogénica, anti-tumoral y anti-metastásica en varios modelos murinos de cáncer¹⁷². Por ello, es el primer fármaco aprobado para el tratamiento del HCC en pacientes que han progresado durante o después de la terapia con sorafenib¹⁷³. Pacientes refractarios a sorafenib que recibieron regorafenib mostraron un beneficio de supervivencia. Además, el regorafenib ha mostrado más potencia para inhibir las TK y las fosfatasas que el sorafenib y un mejor perfil de tolerancia en pacientes con HCC¹⁷⁴. Desafortunadamente, en un estudio de 379 pacientes que recibieron regorafenib, se ha observado una leve prolongación en la supervivencia de los pacientes de sólo 3 meses. En la actualidad, el regorafenib es la terapia estándar de segunda línea para pacientes refractarios al sorafenib¹⁷⁵. Por otro lado, nuevos fármacos se están evaluando en la actualidad para pacientes HCC avanzados tratados previamente con sorafenib. El cabozantinib, demostró en un ensayo aleatorizado, controlado con placebo, de fase III, una mejoría significativa en la supervivencia general¹⁷⁶.

Por otro lado, ramucirumab (Cyramza®), un anticuerpo monoclonal anti-VEGFR-2 completamente humano, ha sido aprobado como monoterapia para el tratamiento de pacientes con HCC y niveles de α -fetoproteína ≥ 400 ng/ml, previamente tratados con sorafenib. Ramucirumab prolongó significativamente la supervivencia general y la supervivencia libre de progression en relación con el placebo en un ensayo aleatorizado REACH 2, de doble ciego de fase 3²³³.

1.4.3. 4-metilumbelliferona y ácido hialurónico

El AH es un glucosaminoglicano (GAG), componente principal de la MEC, con muchas funciones en el desarrollo de los tejidos, incluido el apoyo y el anclaje de las células, que facilita la señalización célula a célula, el movimiento y la migración celular. Ha

sido descrito que el AH se encuentra aumentado en muchos sitios de inflamación crónica, incluido el TME de varios tumores malignos¹⁷⁷. El AH es un dímero sintetizado por tres enzimas presentes en la membrana celular llamadas sintetasas del AH o HAS1, HAS2 y HAS3 reguladas independientemente. Estas enzimas generan predominantemente AH de alto peso molecular (APM-AH) de entre 2×10^5 y 2×10^6 Dalton¹⁷⁸. Estas enzimas agregan repetidamente ácido glucurónico (UDP-GlcUA) y UDP-N-acetil-glucosamina (UDP-GlcNAc), proveniente del citoplasma, al polisacárido naciente hacia el espacio extracelular, formando el AH¹⁷⁷. El AH en circulación se degrada rápidamente, mientras que el AH que tiene una vida más larga es el que se une a las proteínas y se incorpora a los tejidos, como en las articulaciones, las membranas basales y el tejido vítreo del ojo. Muchos procesos de enfermedades asociadas con inflamación crónica están asociados con aumentos de AH, incluida la diabetes tipo 2 (T2D)¹⁷⁹, la cirrosis hepática¹⁸⁰, el asma y entre otras^{181,182}. En este sentido, se ha descrito que la cumarina de origen vegetal 4-metilumbelliferona (4Mu) (*figura 7*) puede modular la síntesis de AH en diferentes modelos experimentales de cáncer como de mama¹⁸³, hígado¹⁸⁴, colon^{185,186}. El 4Mu es una molécula derivada de las plantas de la familia Umbelliferae, representadas principalmente por el apio de monte (*Levisticum officinale*) y la manzanilla (*Matricaria recutita*)¹⁸⁷.

4Mu es conocido por sus propiedades fluorescentes, es incoloro a pH 7.0 y exhibe una fluorescencia azul a pH 7.5. A la luz de estas propiedades, se ha utilizado ampliamente como un indicador fluorescente sensible al pH en múltiples entornos experimentales¹⁸⁷.

Se sabe que 4Mu inhibe la producción de AH al menos de dos maneras. Primero, como un sustrato competitivo para la enzima Uridina difosfato (UDP) glucuronosiltransferasa de (UGT), involucrada en la síntesis de AH¹⁸⁸. Tanto GlcUA como GlcNAc son marcados con un residuo UDP a través de la enzima UGT. La disponibilidad de UDP-

GlcUA y UDP-GlcNAc controla así la síntesis de AH por las HAS¹⁸⁹. Sin embargo, cuando 4Mu está presente la UGT formando 4Mu-GlcUA que une covalentemente a través de su grupo hidroxilo en la posición cuatro al ácido GlcUA. Como consecuencia, la concentración de UDP-GlcUA declina en el citosol y la síntesis de AH se reduce. De este modo, 4Mu reduce el contenido de UDP-GlcUA dentro de las células e inhibe selectivamente la síntesis de AH¹⁹⁰.

En segundo lugar, 4Mu reduce la expresión de la expresión de ARNm de las HAS 2 y 3¹⁹¹, así como el ARNm de la UDP-glucosa pirofosforilasa y deshidrogenasa¹⁹². No está claro cómo funciona este segundo mecanismo o qué tan selectivo es para estos ARNm¹⁹⁰.

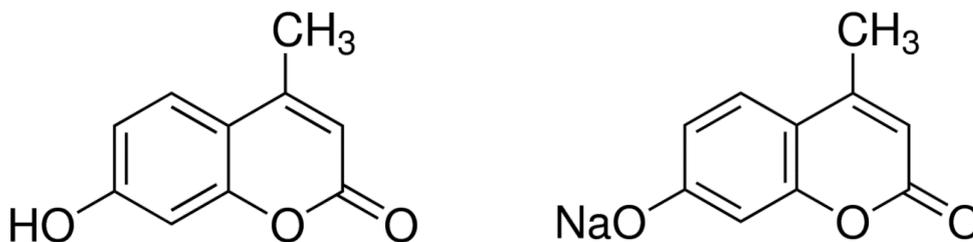


Figura 7: Estructura química de 4-metilumbelliferona (izquierda), con peso molecular de 176.2 kDa y el 4-Metilumbelliferona sódica (derecha), con un peso molecular de 198,15 kDa. Obtenido de Nadine *et al*, *Frontier in immunology* 2015¹⁹³.

Se ha postulado que 4Mu es un inhibidor selectivo de la síntesis de AH, sin afectar otros GAG. Esto se debe a que 4Mu actúa como un competidor selectivo en el citoplasma, impidiendo que otros GAG, como condroitin y heparan sulfatos, fueran afectados por 4Mu, ya que estos se sintetizan en el aparato de Golgi¹⁸⁷.

Publicaciones recientes han demostrado el beneficio de la utilización 4Mu en diferentes patologías. En particular, 4Mu es un medicamento ya aprobado en Europa y Asia llamado "Hymecromona" (Cantabilin[®] en Italia), donde se usa como colagogo. Desde el 2006, se demostró que 4Mu tiene efecto sobre cáncer de páncreas, y se han acrecentado las evidencias que 4Mu tiene efecto antitumoral en líneas celulares y modelos *in vivo* de

diferentes tipos de tumores incluyendo el HCC¹⁸⁴, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de mama, sarcoma, leucemia y cáncer de ovario¹⁸⁷.

La acumulación excesiva de la MEC es una respuesta reparadora natural a una lesión hepática que puede desencadenar en fibrosis. En este sentido, la acción antifibrótica de 4Mu se ha demostrado en modelos de ratón con fibrosis hepática, inducidas con drogas hepatotóxicas como la tioacetamida (TAA)¹⁹⁴ o el tetracloruro de carbono (CCl₄)¹⁹⁵. El efecto del 4Mu se asoció con la menor deposición de AH en el tejido hepático y la disminución en la activación *in vitro* de las HSC.¹⁸⁴

La mayoría de estos efectos son consistentes con lo que se sabe sobre los roles fisiológicos de AH tanto en el crecimiento, la diferenciación normal y aquellos tumores que establecen matrices ricas en AH para promover su propio crecimiento y metástasis. Sin embargo, todos los efectos del tratamiento con 4Mu no están directamente relacionados con la inhibición de la síntesis de AH. Por ejemplo, en una línea celular tumoral ovárica se informó que 4Mu inhibe su crecimiento mediante la supresión del ARNm de la timidina fosforilasa¹⁹⁶.

1.4.4. Terapia génica

Desde la introducción del concepto de terapia génica en la década de 1970, el campo ha avanzado considerablemente con notables éxitos clínicos demostrados en muchas indicaciones clínicas en las que actualmente no hay opciones de tratamiento estándar disponibles¹⁹⁷. La terapia génica consiste en la transferencia del material genético exógeno a las células logrando una expresión del gen terapéutico o "transgen" con el objetivo de corregir un defecto genético o conferir una nueva función biológica con el propósito de prevenir o tratar una enfermedad. Existen dos estrategias básicas: 1) introducir un vector integrador en un precursor o célula madre para que el gen pase a cada célula hija. La transducción de células madre es generalmente un

proceso *ex vivo* y requiere un vector integrador, (el vector está diseñado para integrarse en uno o más loci en los cromosomas del paciente)¹⁹⁸; 2) La administración del gen en cuestión en un vector no integrativo a una célula post mitótica o de división lenta de larga duración, asegurando la expresión de ese gen para la vida de la célula¹⁹⁸.

La terapia génica *ex vivo* requiere la recolección de células del paciente o de un donante en el cual, el gen terapéutico se transduce a estas células *in vitro* y luego estas células se reintroducen en el paciente. Por el contrario, la terapia génica *in vivo* se basa en la modificación funcional de las células dianas mediante inyección transgénica directa en el paciente. Para abordar estas dos opciones, existen múltiples formas de administrar los transgenes terapéuticos (genes completos, moléculas antisentido, ribozimas o ARN de interferencia, entre otros) incluido el uso de vectores virales y no virales (**figura 8**), cada uno de los cuales ofrece ventajas y desventajas. El vector viral modificado, del cual nos referiremos en este trabajo, representan una de las rutas de administración más comunes, debido a su eficiencia de transducción para genes terapéuticos^{197,199–201}.

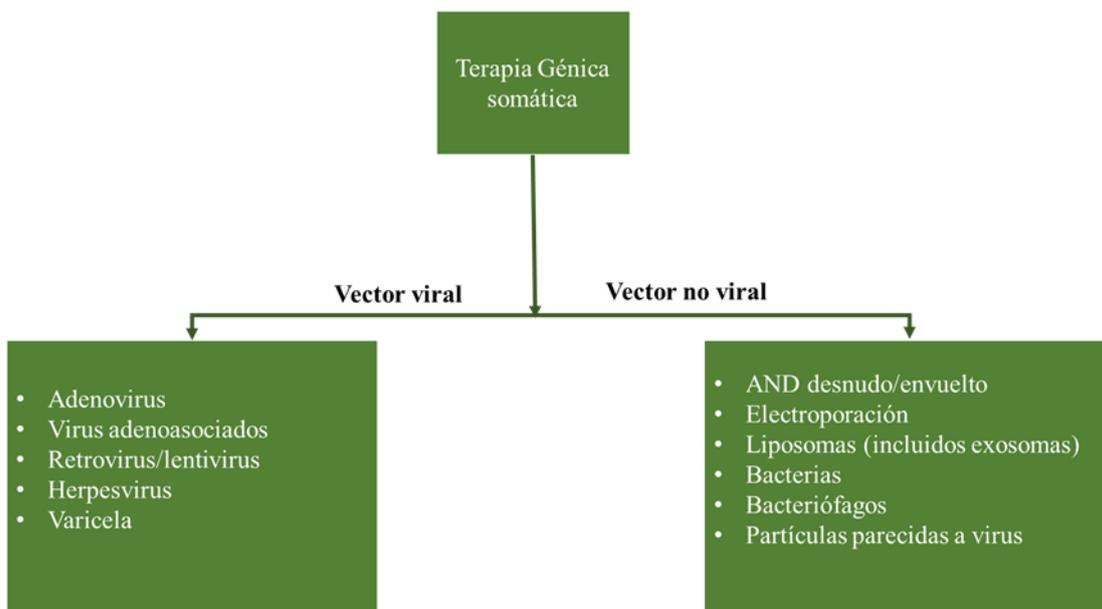


Figura 8: Vectores virales y no virales.

Obtenido de Thorne et al, *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 2018.

1.4.4.1. *Terapia génica in vivo: vectores adenovirales*

Son de los más empleados, actualmente con varios productos aprobados por los organismos regulatorios. Su éxito se debe en su diseño, que se realiza mediante la supresión de regiones implicadas en el proceso de replicación viral y la incorporación en su lugar, del material genético de interés. De esta forma el nuevo virus es efectivo, lo que significa que mantiene la capacidad de infectar las células, pero es incapaz de replicarse en ellas. En este trabajo nos enfocaremos principalmente en los vectores adenovirales¹⁹⁷.

Los adenovirus que infectan humanos son miembros de la familia *Adenoviridae*, es un virus encapsulado por una nucleocápside icosaédrica y ADN bicatenario de 38 kilobases (kb) y carecen de envoltura lipídica²⁰². En su cápside existen alrededor de una docena de proteínas en la que se agrupa en las estructuras llamadas Fibra, Pentón y Hexón (*figura 9A*)²⁰³. Existen al menos 70 serotipos de adenovirus humanos, denominados Ad1-Ad70, que forman en su totalidad siete "especies" (A, B, C, D, E, F y G)^{204,205}.

El primer paso de la infección de los adenovirus implica la fijación de la fibra a su receptor primario. Para los adenovirus de las especies A, C, E y F, este receptor primario es el receptor de coxsackie (CAR), mientras que se demostró que para los adenovirus de las especies B y D la interacción es a través de receptores distintos de CAR²⁰⁶. La interacción entre el receptor CAR y la fibra lleva que el virión se aproxime a la superficie celular facilitando la interacción con las integrinas celulares y la base de pentón. En un segundo paso, esta interacción induce respuestas celulares que cambian el citoesqueleto, internalizan el virión a través de vesículas impermeabilizadas y se transportan al endosoma. Aquí, el virión se desmonta parcialmente y se libera al citoplasma, donde finalmente viaja al núcleo para la replicación viral. Un punto importante, es que la expresión de los genes es de forma transiente, refiriéndose a que su genoma se mantiene en estado episomal en el núcleo²⁰⁶.

El genoma de los adenovirus codifica aproximadamente 35 proteínas que se expresan en dos fases generales, “temprana” y “tardía”. En la etapa temprana, que ocurre antes del inicio de la replicación del ADN viral, unas 7 horas después de la infección, tienen funciones reguladoras que permiten que el virus lleve a cabo la replicación del ADN viral y la replicación de viriones. En esta etapa inducen la expresión de las unidades de transcripcionales E1B, E2, E3 y E4 y alteran la expresión de una multitud de genes para facilitar la replicación del adenovirus. En la etapa "tardía", que ocurre después del inicio de la replicación del ADN, se codifican, principalmente, proteínas estructurales del virus. Los viriones se ensamblan en el núcleo al cabo de un día de infección, y después de varios días la célula se lisa para liberar virus infecciosos (*figura 9B*)²⁰⁷. La mayoría de los vectores adenovirales son versiones genéticamente modificadas del subtipo 5 (Ad5), y son de dos tipos: competentes en la replicación (RC) y defectuosos en la replicación (RD). Los vectores RC (oncolíticos) lisan las células cancerosas como resultado final de su ciclo de vida, y se espera que una partícula infectante produzca 10^3 o incluso 10^4 partículas virales, que luego pueden infectar y destruir las células tumorales vecinas. Por otro lado, Los vectores RD tienen eliminados los genes esenciales E1A y E1B (generalmente también se elimina el gen E3) y reemplazados por un casete de expresión con un promotor de alta actividad como el promotor temprano de Citomegalovirus inmediato (CMV) que impulsa la expresión del transgen de interés²⁰⁸. Estos vectores eliminados E1A y E1B generalmente se construyen a partir de plásmidos o ADN del adenovirus que contienen el genoma adenovirus modificado genéticamente y los vectores crecen en líneas celulares complementarias como HEK293, PER.C6 o N52.E6 que retienen y expresan los genes de E1A y E1B (*figura 9C*).²⁰⁵

En los modelos murinos, el 90% de los vectores basados en Ad5, administrados por vía sistémica, infectan directamente al hígado, y el 10% restante infectan al bazo, corazón,

pulmón y riñón¹⁹⁷. En el hígado, interactúan principalmente con las células de Kupffer, además de interactuar con los M ϕ en el bazo, así como con los neutrófilos, las plaquetas y los glóbulos rojos^{209,210}. Esta infección no se realiza directamente a través del receptor CAR²¹¹, sino que primero se une al factor de coagulación sanguínea X, (FIX, FX) y la proteína del complemento (C4BP), que interactúan con las proteínas de la cápside del adenovirus, lo que dirige del torrente sanguíneo al hígado, donde media la infección por hepatocitos a través de sus proteoglicanos de heparán sulfato^{212,213}.

En la actualidad existen aproximadamente 55 ensayos clínicos activos para el tratamiento del cáncer, en los que se usan adenovirus como vectores oncolíticos, terapia génica o vacunas terapéuticas en la cual utilizan diferentes blancos terapéuticos²¹⁴. Como tal, en estos vectores adenovirales en la terapia contra el cáncer, se debe lograr un equilibrio entre la inducción de respuestas inmunes anti-adenovirales y antitumorales²¹⁴.

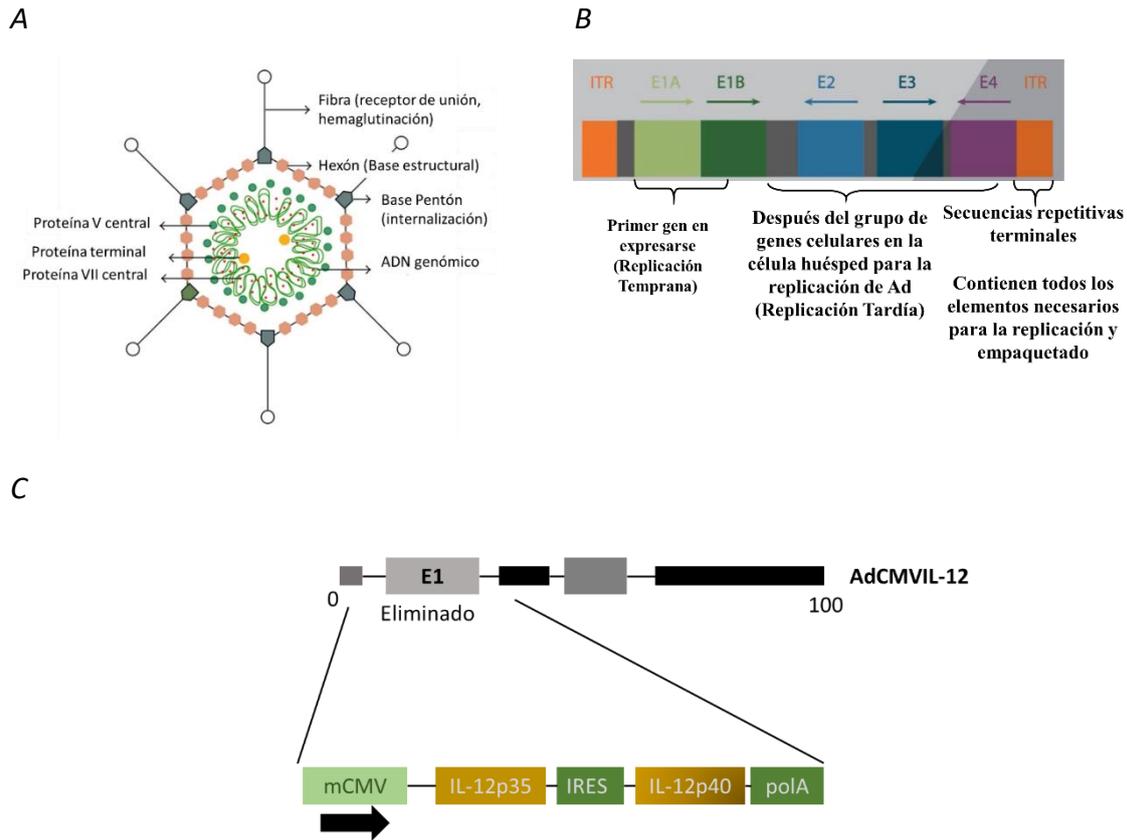


Figura 9: Esquema de la estructura del adenovirus y el sistema de integración génica. Tomado y modificado de Winnie , et al *Advances in Hematology* 2013²¹⁵ y Mazzolini, et al *Trends in immunology* 2001²¹⁶.

1.4.5. Inmunoterapia

El HCC puede ser considerado como un tumor inmunogénico^{217,218} y, por lo tanto, susceptible a estrategias basadas en inmunoterapia²¹⁹. Por ejemplo, a la inoculación de vacunas tumorales o vacunas de polipéptidos basadas en α -fetoproteína (AFP) para activar respuestas inmunes específicas contra HCC²²⁰, la terapia adoptiva de células T empleando linfocitos infiltrantes del tumor o provenientes de sangre periférica, la vacunación terapéutica con DCs, citoquinas administradas por vía sistémica y, más recientemente, anticueros monoclonales inmunoestimuladores, principalmente los inhibidores de los puntos de control inmunitario²²¹. Sin embargo, el TME supresivo del HCC sigue siendo un obstáculo importante para montar una respuesta antitumoral

efectiva, particularmente para las estrategias inmunoterapéuticas^{222,223}, ya que la eficacia de la respuesta inmune es el resultado de diversas interacciones entre los eventos inmunoestimuladores e inmunosupresores^{224,225}

La inhibición de la inmunidad antitumoral se debe a la expresión de moléculas de punto de control CTLA-4 y PD-1. Las moléculas PD-1 y CTLA-4 son altamente expresados por los linfocitos Treg y la activación del receptor PD-1 puede estimular la generación de linfocitos Th2, mientras que su bloqueo mejora la actividad de las células Th1²²⁶. En el año 2017, la FDA aprobó el uso del anticuerpo anti-PD1 (nivolumab) para el HCC avanzado en pacientes refractarios al tratamiento con sorafenib²²⁷. Este anticuerpo monoclonal humano previene la asociación de PD1 con sus ligandos PD-L1 y PD-L2, ya que esta unión conduce a la disminución de la activación de las células T y la consecuente respuesta²²⁸. La molécula CTLA-4 puede inhibir la inmunidad antitumoral al competir por las moléculas CD80 y CD86, expresadas por las DCs, con el receptor coestimulador de células T CD28. En este sentido, la combinación con los inhibidores de puntos de control para CTLA-4 y PD-1/PD-L1 han demostrado tener eficacia en pacientes con HCC, basándose por una potente tasa de respuesta global y por la duración de la respuesta^{229,230}.

Pembrolizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que inhibe directamente la unión de PD-1 a sus ligandos PD-L1 y PD-L2. En 2018, ha sido aprobado terapias de segunda línea por FDA para el tratamiento sistémico de etapa avanzada HCC luego del tratamiento con sorafenib^{231,232}. Los ensayos de fase III de pembrolizumab están en curso, incluido el ensayo KEYNOTE-240 (ClinicalTrials.gov: NCT02702401) en los Estados Unidos, Asia, Australia, Europa y Japón²³¹. Mas allá de los resultados positivos de este ensayo de fase III, este ensayo no alcanzó su objetivo principal de prolongar la sobrevida general ni la sobrevida libre de enfermedad en comparación con el placebo²³¹.

1.4.5.1. Inmunoterapia basada en IL-12

La interleuquina 12 (IL-12) es una citoquina heterodimérica compuesta por dos cadenas, α p35 y β p40, secretada principalmente por las APCs, como las DCs, los M ϕ (específicamente los de fenotipo M1), y algunas células B.

La señalización de IL-12 a través de STAT-4 es crítica para la diferenciación Th1 y la adquisición de funciones citolíticas por las células T CD8⁺; así como también para desplegar su capacidad para inducir la liberación de IFN γ por parte de las células NK, así como de las células T CD4⁺ y CD8⁺. Además, induce la expresión TNF- α y más IL-12, favoreciendo de esta manera una retroalimentación positiva y promoviendo un mayor reclutamiento de APCs y regulando las funciones de otros tipos de células efectoras²³⁴. En una de las vías de señalización que activan la expresión IL-12 se encuentra los TLR, que a su vez activan la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88), que a su vez activa el factor nuclear κ B (NF- κ B) permitiendo la transcripción de IL-12^{234,235} (*figura 10*).

Uno de los objetivos de la inmunoterapia es revertir el ambiente inmuno supresor que se genera en el entorno tumoral. La ausencia de células T CD8⁺ perjudica gravemente los efectos antitumorales en la mayoría de los modelos tumorales. En este sentido, IL-12 posee una potente actividad antitumoral promoviendo la respuesta inmune celular activando tanto las CTL y Th1 específicos del tumor²¹⁶. Pero además, se han identificado mecanismos no inmunes de IL-12, uno de ellos es la regulación negativa de la angiogenesis por la proteína inducible por IFN γ (IP-10) en tumores en crecimiento²³⁶. Los mecanismos mejor estudiados de IFN γ en la modificación el TME incluyen²³⁷: (i) el mejoramiento de la presentación antigénica a través del MHC I en células tumorales, (ii) la inducción de la expresión de quimioquinas CXCL9, 10 y 11 para atraer células T NK,

Th1 y CD8⁺, (iii) la transformación de los Mφ M2 en Mφ M1 activados, (iv) la inhibición de la angiogénesis de una manera dependiente de CXCR3 (*figura 10*).

Los vectores basados en adenovirus que expresan IL-12 (AdIL-12) han mostrado un efecto antitumoral y la potenciación de la respuesta inmune en modelos murinos^{239,240}, en grandes animales en medicina veterinaria²⁴⁰ y en ensayos clínicos²⁴¹.

El uso de vectores de AdIL-12 se encuentra actualmente en ensayos clínicos de fase I para cáncer de próstata y pancreático, tumores cerebrales pediátricos, glioblastomas y oligoastrocitomas (ClinicalTrials.gov: NCT02555397, NCT03281382, NCT03330197, NCT02026271 respectivamente).

Además, se ha comprobado en modelos murinos tanto inmunosuprimidos como inmunocompetentes que la IL-12, además de inducir la liberación de INF-γ puede inhibir la tumorigénesis inhibiendo la angiogénesis, generando arresto en fase G0/G1 e induciendo apoptosis de las células tumorales²⁴². Desafortunadamente, el IFNγ también es el principal mediador de los efectos tóxicos de IL-12. Además, el exceso de IFNγ, activa mecanismos inmunorreguladores como la expresión de PD-L1 y de la enzima indoleamina 2,3-dioxygenasa 1 (IDO-1), mediandola resistencia adaptativa a la inmunoterapia²³⁷.

La expansión de CTL facilita el cultivo de células efectoras para los regímenes de terapia celular adoptiva. Sorprendentemente, la sinergia de IL-12 con la terapia de células T adoptivas no solo proporciona CTL, sino que también funciona a nivel efector. Esto fue revelado por estudios en ratones con enfermedad tumoral sistémica, en los que algunos nódulos malignos se transdujeron con AdIL-12 y posteriormente se administraron CTL antitumorales i.v²⁴³. Además, la IL-12 también se puede utilizar para regular artificialmente las funciones de las DCs para promover las respuestas inmunes celulares. Cuando se realiza la transfección de IL-12 en DCs probablemente

actúa a una serie de niveles, estimulando las células T, las células NK y las DCs de forma autócrina. Las DCs capturan antígenos tumorales dentro del tejido maligno y migran con avidez a los ganglios linfáticos drenantes donde se presentan los antígenos mientras se producen altos niveles locales de IL-12²¹⁶.

1.4.5.2. Inmunoterapia basada en células dendríticas

El HCC es un blanco atractivo para la inmunoterapia como lo demuestra un reclutamiento activo de linfocitos infiltrantes de tumores que son capaces de lisar células tumorales autólogas *ex vivo*. En este sentido, en las últimas décadas, la utilización de DCs pulsadas con antígenos tumorales o modificadas genéticamente para producir citoquinas proinflamatorias se ha propuesto como una herramienta para reestimar el sistema inmunitario potenciándolo para superar el microambiente supresor y conseguir el desarrollo de una respuesta antitumoral significativa^{244,245}. En un ensayo clínico de fase II que investigó la seguridad y la eficacia de la vacunación intravenosa con DCs autólogas maduras pulsadas *ex vivo* con un lisado de la línea celular tumoral hepática (HepG2) en 35 pacientes con HCC avanzado, se observó que fue segura y bien tolerada, con la generación de respuestas inmunitarias específicas en algunos casos²⁴⁶. En otro estudio, Jian-cong Sun *et al*, demostraron que las DCs cargadas con ARN de células HuH7 CD133⁺ podrían inducir una respuesta CTL específica contra estas células *in vitro*²⁴⁷. A pesar que hay muchos estudios en pacientes que indican que las vacunas basadas en DCs son viables y seguras, las ventajas clínicas de su uso como monoterapia para el cáncer siguen siendo modestas.

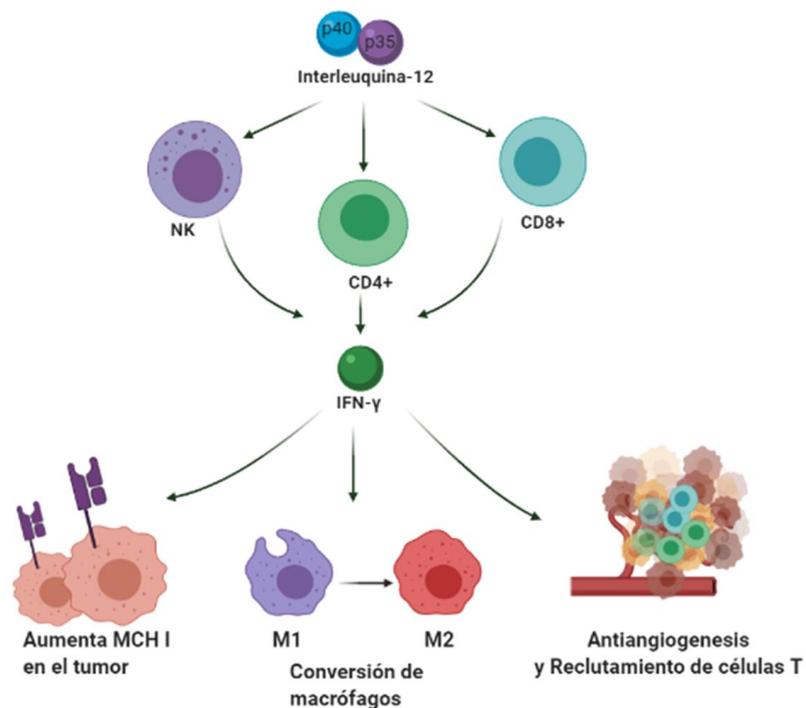
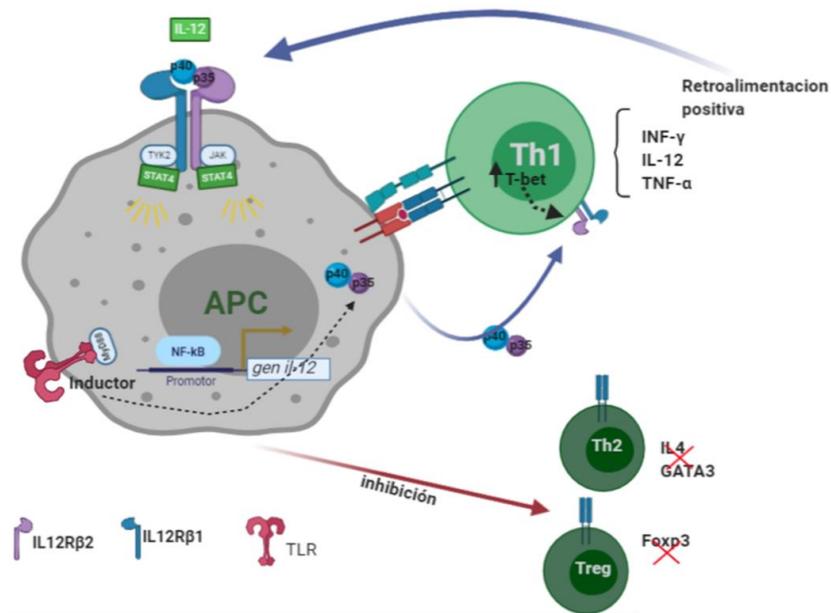


Figura 10: Mecanismos mediados por la IL-12. La activación por TLR4 induce la producción de IL-12 en las APCs, lo que a su vez induce la liberación de IFN γ por las células NK, los linfocitos CD4⁺ y los linfocitos CD8⁺. El IFN γ es el mediador principal de las propiedades inmunoestimuladoras de la IL-12 que actúan sobre células tumorales, M ϕ , linfocitos y células endoteliales. Las flechas azules representan acciones que resultan en efectos proinflamatorio y las flechas rojas representan acciones que resultan en efectos inhibitorios. *Adaptado de Berraondo et al, Clinical Cancer Research 2018^{234,235,237}. Tyrosine kinase-2 (TYK2) y Janus kinases (JAKs).*

2. HIPÓTESIS

Los efectos antifibróticos y antitumorales reportados para 4Mu en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el HCC, permite mejorar la eficacia de la inmunoterapia génica basada en el uso del vector adenoviral que expresa los genes de la citoquina inmunoestimuladora IL-12 (AdIL-12) en el HCC asociado a fibrosis. La acción de 4Mu está mediada por distintos mecanismos, relacionados o no con la capacidad de inhibir la síntesis de AH, incluyendo la modulación del comportamiento de las células tumorales y de otros componentes del microambiente tumoral como las CSCs y células del sistema inmunitario.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo fue evaluar el rol de 4Mu en la remodelación del microambiente tumoral y estudiar si sus efectos sobre diferentes componentes del TME podrían potenciar la eficacia antitumoral de AdIL-12 en un modelo murino de HCC asociado a fibrosis.

3.2. Objetivos específicos

- 1-Evaluar el efecto antitumoral de la terapia combinada basada en 4Mu y el vector adenoviral AdIL-12 en un modelo ortotópico experimental de HCC con fibrosis subyacente.
- 2-Characterizar el perfil de células del sistema inmunitario que infiltran el tejido tumoral hepático tras la terapia.
- 3-Analizar el efecto de los tratamientos individuales o combinados sobre las CSCs en líneas celulares de HCC *in vitro*, así como también en tumores *in vivo*.
- 4-Estudiar los efectos del empleo de 4Mu en protocolos de vacunación terapéutica empleando DCs en modelos de HCC *in vivo*.

***MATERIALES Y
MÉTODOS***

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Animales

Se emplearon ratones machos de 6 semanas de diferentes cepas: C3Hj/He, BALB/c y ratones atómicos N:NIH(S)-nu (nude), adquiridos en el Bioterio Central del Centro Atómico Ezeiza, Buenos Aires, Argentina. Los animales se mantuvieron en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Biomédicas (FCB) de la Universidad Austral. Los experimentos fueron realizados siguiendo las pautas de uso ético de los animales del Instituto de Salud de EEUU (NIH) y de acuerdo a la aprobación de nuestros protocolos por el comité de bienestar animal (CICUAL, protocolo #2018-05) de la FCB.

4.2. Líneas celulares

Para este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares de HCC murinas: Hepa129 (singeneicas con ratones C3Hj/He, que fueron proporcionadas amablemente por el Dr. Volker Schmitz (Universidad de Bonn, Alemania), células Hepa1.6 (singeneicas con ratones C57BL/6), células de colangiocarcinoma BNL (singeneicas con ratones BALB/c), cedidas por el Dr. Jesús Prieto de la Universidad de Navarra, España. Todas las líneas fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen Argentina, Buenos Aires, Argentina) con suero fetal bovino (SFB) al 10%. También se utilizaron células de HCC humanas Hep3B, HepG2 y Huh7 (ATCC, Manassas, VA 20108, EE. UU.), proporcionadas por el Dr. Jesús Prieto, Universidad de Navarra, España; y se cultivaron en medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; GIBCO) con SFB al 10%. Se cultivaron en estufas a 37 °C con 5% CO₂.

4.3. 4-Metilumbiliferona:

Para los estudios *in vitro*, la cumarina 4-Metilumbiliferona (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) se resuspendió en medio de cultivo o solución de Hank [Hank's balanced salt solution (HBSS)] en las concentraciones de 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10 y 50 mM. Para los estudios *in vivo*, 4Mu fue resuspendida en agua de bebida en una concentración de 1 mg/ml.

4.4. Vectores adenovirales

Contamos con vectores adenovirales de primera generación, que expresan la citoquina IL-12 o el gen de la β -galactosidasa (utilizado como adenovirus control), construidos en la Universidad de Navarra y cedidos por el grupo del Dr. Jesús Prieto. El adenovirus recombinante que portaba IL-12 bajo el control del promotor de CMV se construyó de la siguiente manera: un fragmento HindIII/SpeI de pBS/p35 con ADNc de la subunidad p35 de IL12 se rellenó con Klenow y se ligó con extremos romos en BamHI pMV100, que lleva el promotor CMV y una señal de poli (A). El plásmido resultante se cortó mediante HindIII para liberar un casete de expresión p35 que se ligó en pDE1sp1A cortado con EcoRI mediante ligadura de extremo romo (pDE1sp1A/p40). Un fragmento NcoI/SmaI de pBS/p40 que contenía la subunidad p40 de IL-12 se clonó en pCITE-1 cortado con NcoI/EcoRV que lleva el sitio de entrada de ribosoma interno (IRES). El plásmido resultante se cortó con EcoRI para liberar el fragmento IRES/p40; Este fragmento, a su vez, se clonó en pDE1sp1A/p40 cortado con EcoRI para formar pDE1sp1A/IL-12. Se clonó un fragmento BamHI/SalI que contenía el promotor CMV, p35, IRES p40 y señal de poli (A) en el plásmido de adenovirus pMV60 cortado con HindIII para formar pMV60/IL-12²⁴⁸. El plásmido pJM17 contiene el genoma adenoviral necesario para la recombinación homóloga con pMV60/IL12, delecionado en las regiones E1 y E3²⁴⁸. En el laboratorio los adenovirus recombinantes se aislaron de una sola placa y se expandieron utilizando células empaquetadoras Hek293 (ATCC®

CRL-1573). Luego se purificaron mediante ultracentrifugación con gradientes de cloruro de cesio²⁴⁹. Los virus purificados se dializaron extensamente con 10mmol/L de Tris por cada 1mmol/L de MgCl₂ y se almacenaron en alícuotas a -80 °C. fueron tituladas por ensayo de placas. La concentración de vectores recombinantes fue expresada como el 50% de la dosis infecciosa en cultivos de tejidos (DICT₅₀) por mililitro.

4.5. Experimentos *in vitro*

4.5.1. Aislamiento de células por separación magnética

Las células de la línea Hepa129 fueron inmunomarcadas con el anticuerpo anti-Prominin-1 o anti CD133/1 asociado a bolitas (beads) magnéticas (1130-092-564, Miltenyi Biotec, Alemania) por 15 min en BSA 1% en PBS 1X estéril (Buffer FACS). Luego se realizaron dos lavados con el buffer FACS y sus correspondientes centrifugaciones (300g) para eliminar el excedente anticuerpos. Las células CD133⁺ fueron aisladas magnéticamente usando sistema magnético de columnas (MACS), y columnas de selección positiva de menor tamaño (MS). Las columnas MS fueron lavadas 2 veces con 0.5ml de buffer PBS1X BSA0.1% pH=7.2 para eliminar las células que no fueron unidas al anticuerpo. Luego se retira las columnas MS del sistema MACS y se colecta las células CD133⁺ realizando 2 lavados con el mismo buffer. La pureza de las células separadas fue evaluada por citometría de flujo (FACS Aria, BD Biosciences, FranklinLakes, NJ, USA). Posteriormente, las células se tiñeron con tripan blue para evaluar la viabilidad y cuantificar el número final de células obtenidas.

4.5.2. Cálculo de la tasa de división celular

Las células Hepa 129 CD133⁺ o CD133⁻ fueron cultivadas y tratadas o no con 4Mu por 72 hs. El tiempo de duplicación celular durante el crecimiento logarítmico fue calculado acorde a la fórmula de Hayflick: $T = t \times \left[\frac{\ln_2}{\ln_2(Nt/N0)} \right]$ (T=tiempo de duplicación de la

población; t = tiempo designado después del cultivo; N_t = número de células en el tiempo designado; N_0 = número de células al inicio del cultivo).

4.5.3. Ensayo de Viabilidad

Las células Hepa129 CD133⁺ o CD133⁻ aisladas (5×10^3) fueron cultivadas en placas de 96 pocillos y tratadas o no con 4Mu por 72 hs. Luego de este tiempo, las células fueron incubadas con bromuro de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazol (MTT, Promega, Madison, WI, USA) por 4 hs a 37 °C 5% CO₂. Para inactivar la reacción se utilizó una solución de 200 µl de ácido clorhídrico (10N) en 50 ml de Isopropanol. La lectura de la absorbancia a 560nm se realizó utilizando el espectrofotómetro de multipocillos (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). El experimento fue llevado a cabo en 2 ensayos independientes y por quintuplicado.

4.5.4. Ensayo de formación de colonias

Las células Hepa129 fueron tratadas con 4Mu a diferentes concentraciones (0,25; 0,5; 1mM) por 72hs. Luego se sembraron en una densidad de 5 células/cm² en placas de 6 pocillos, en RPMI. Después de 48, 72 y 96 hs de cultivo, las colonias fueron fotografiadas en microscopio óptico (Nikon Eclipse TE300).

4.5.5. Análisis del ciclo celular

Las células Hepa129 CD133⁺ o CD133⁻ fueron cultivadas en presencia o no de 4Mu por 72 hs. Luego, las células fueron fijadas en etanol 70%, 30% PBS 1X y se conservaron a -20 °C por lo menos durante 24 hs. Las células fueron centrifugadas por 10 min a 2000g a 4 °C y se lavaron dos veces con PBS 1X antes de la incubación con de yoduro de propidio en PBS junto con 180 U/ml de ARNasa por 30 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo.

4.6. Experimentos *in vivo*

4.6.1. Modelo experimental de HCC asociado a fibrosis

Utilizamos ratones de la cepa C3H/J:He para evaluar el efecto del tratamiento de 4Mu y AdIL-12 en experimentos *in vivo*. Para desarrollar la fibrosis hepática administramos tioacetamida (TAA, Sigma-Aldrich, USA) (dosis: 200 mg/kg/día) por vía intraperitoneal (i.p.) 3 veces por semana, durante 4 semanas. A la cuarta semana de inducción de la fibrosis con TAA, se procedió a la inoculación de las células Hepa129 (1.25×10^5 células) de manera directa subcapsular en el lóbulo izquierdo del hígado por laparotomía (en adelante, día 0). Luego de 5 días de implantación del tumor, los ratones fueron examinados para observar aparición del tumor mediante cirugía. Posteriormente, los animales fueron distribuidos en grupos de tratamiento ($n = 8/\text{grupo}$) que recibieron: i) salino (control); ii) 4Mu 200 mg/Kg, en el agua de bebida; iii) AdIL-12 1×10^9 DICT₅₀/ml, vía intravenosa (i.v.), día 9; iv) 4Mu + AdIL-12 1×10^9 DICT₅₀/ml i.v, día 9; o v) 4Mu+ Ad β -gal 1×10^9 DICT₅₀/ml, i.v., día 9. Luego de 2 semanas de tratamiento, los ratones fueron sacrificados para estudio (extracción de proteínas, ARN y conservación de órganos y tejido tumoral en formol 10%). Se midió el volumen tumoral [con la fórmula diámetro mayor (D) por diámetro menor al cuadrado (d^2) por $\pi/2$ ($\pi/2$) ($D \times d^2 \times \pi/2$)], además se cuantificó la magnitud de la ascitis y el número de nódulos tumorales satélites.

Para caracterizar las poblaciones de M ϕ intrahepáticos se empleó el mismo modelo experimental de HCC asociado a fibrosis. A los días 9 y 15 de inoculación de las células Hepa129, los ratones fueron sacrificados, los volúmenes tumorales fueron medidos con calibre. Los hígados fueron perfundidos con colagenasa por la vena hepática, y se recolectaron muestras de las regiones peri-tumoral, tumoral y tejido hepático sin tumor.

Luego las secciones fueron disgregadas con un mesh de 70 μm y se realizó un gradiente de densidad con HistodenzTM para separar las células parenquimatosas de las no parenquimatosas de cada región. Luego se seleccionaron las células no parenquimatosas y se marcó con anticuerpo anti-F4/80-FITC, anti-CD86-APC, anti-MHC II-PE (BD Biosciences, USA). Mediante citometría de flujo se midió la proporción de M ϕ tipo 1 y 2 utilizando los marcadores F4/80⁺, CD206⁺ y CD86⁺ utilizando la proporción de M ϕ M1/M2 que fue calculada utilizando el $\log_2 [(F4/80^+ CD86^+) / (F4/80^+ CD206^+)]$. Por otro lado, las células de la fracción no parenquimatosas fueron cultivados *in vitro* por 30 min, para obtener una población purificada de M ϕ . Las células adheridas al plástico fueron conservadas en Trizol[®] (Invitrogen, USA) y posterior extracción de ARN, convertidas a ADNc por la reacción de la transcriptasa inversa y, por último, la RT-qPCR para la evaluación de los perfiles de expresión génica.

4.6.2. Modelo de HCC metastásico

Se aislaron células Hepa129 CD133⁺ y CD133⁻ y fueron tratadas *in vitro* con 0.5 mM de 4Mu por 72 hs. Ratones C3Hj/He fueron separados en 4 grupos y recibieron por vía i.v.:

- i) células Hepa129 CD133⁻ (1×10^5 ; n = 4);
- ii) células Hepa129 CD133⁺ (1×10^5 ; n = 4) (i.v.);
- iii) células Hepa129 CD133⁻ tratadas con 4Mu (1×10^5 ; n = 4) (i.v.);
- o iv) células Hepa129 CD133⁺ tratadas con 4Mu (1×10^5 ; n = 4) (i.v.).

Se analizó la sobrevivencia de los animales. Este experimento fue repetido 3 veces.

4.6.3. Modelos tumorales de implantación subcutánea

4.6.3.1. Modelos subcutáneos en ratones inmunosuprimidos e inmunocompetentes

Para evaluar el crecimiento *in vivo* de las células de HCC se utilizaron ratones Nude y ratones C3Hj/He (n = 4/grupo): Se realizó la inyección s.c. en el flanco derecho de 1×10^5 células Hepa129 CD133⁺, 1×10^5 células Hepa129 CD133⁺ tratadas con 4Mu, 1×10^5 células Hepa129 CD133⁻, 1×10^5 células Hepa129 CD133⁻ tratadas con 4Mu. Se

midió el volumen tumoral con calibre 2 veces por semana utilizando la formula ($V = D \times d^2 \times \pi/2$).

4.6.3.2. Vacunación terapéutica con DCs

Se indujeron tumores de HCC de manera s.c. en ratones C3Hj ($n = 5/\text{grupo}$) inoculando 1×10^6 células de la línea Hepa129 o en ratones BALB/c ($n = 5/\text{grupo}$) inoculando 1×10^6 células de la línea BNL. Cuando los tumores llegaron a un volumen promedio de aproximadamente 80 mm^3 se administraron 1×10^6 DCs maduras sin pulsar o DCs pulsadas con lisado tumoral proveniente de animales portadores de tumor tratados o no con 4Mu. Para ello, se resuspendieron las células en $100 \mu\text{l}$ de solución fisiológica y se aplicaron en la región periganglionar cercano al tumor. El efecto de la terapia se evaluó midiendo el volumen tumoral según la fórmula descrita anteriormente ($D \times d^2 \times \pi/2$) 3 veces por semana y se analizó, además, la sobrevivencia de los ratones.

4.7. Experimentos *ex vivo*

4.7.1. Obtención de macrófagos peritoneales y generación de medio condicionado.

Los pM ϕ fueron aislados realizando un lavado con solución fisiológica de la cavidad peritoneal, en ratones C3Hj/He con HCC asociado a fibrosis tratados o no con 4Mu, en los días 9 y 15 post-administración inoculación de las células de HCC. Se realizó una lisis de glóbulos rojos y se incubaron en medio libre de suero por 30 min en una placa de 24 pocillos (para que se adhieren sólo los M ϕ). Luego de 2 lavados con solución fisiológica, las células se cultivaron con 4Mu $0,5 \text{ mM}$ por 72 hs. Posteriormente, el medio fue reemplazado por medio fresco y se recolectaron los medios condicionados (MC) a las 24 hs y 48 hs. Los M ϕ fueron utilizados para evaluar presencia de marcadores de activación clásica o alternativa ($F4/80^+CD86^+$ y $F4/80^+CD206^+$, respectivamente) por citometría de flujo o conservados en Trizol[®] para la obtención de

ARNm. Los MC fueron utilizados para cultivar las células Hepa129 por 48 hs. Las células Hepa129 tratadas con los diferentes MC fueron usadas para experimentos in vitro o para cuantificación de proteína mediante western blot.

4.7.2. Cuantificación de células CD3⁺ en el HCC *in vivo*

4.7.2.1. Inmunohistoquímica

Los hígados derivados de los ratones con tumor fueron embebidos en parafina y seccionados en el micrótopo en cortes de 5 µm de espesor. Los cortes fueron incubados 20 minutos a 60 °C en la estufa y luego se realizó la inmunomarcación con el anticuerpo policlonal anti- CD3 de ratón hecho en conejo (dilución 1:100; ab5690 Abcam, Cambridge, UK) por 18 hs. Posteriormente, los vidrios se lavaron con PBS 1X y fueron incubados con un anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo hecho en cabra (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) por 2 hs. Se realizaron 2 lavados con PBS 1X y luego dos lavados con buffer acetato 0.1 M; después se incubó con una solución de diamino bencidina (DAB; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), sulfato de amonio níquelado y H₂O₂. Las células CD3⁺ de los cortes de hígado fueron detectadas en el microscopio tomando 10 imágenes a 200x (Nikon Eclipse E800, Global Nikon, USA) y el porcentaje de las áreas positivas fue calculado con el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

4.7.2.2. Citometría de flujo

A partir de la perfusión hepática con colagenasa de animales tratados con 4Mu o salinos se obtuvo una suspensión celular. Las células fueron tratadas con buffer de lisis de glóbulos rojos y marcadas con anti-CD4-PECy5, anti-CD8-Alexa Fluor 488 y anti-CD3-PE. Se analizó el porcentaje de células T CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ por citometría de flujo.

4.7.3. Ensayo de citotoxicidad

Se extrajeron células del bazo de animales control y tratados. Un total de 1×10^7 células fueron estimuladas *in vitro* con Hepa129 pre-tratadas con mitomicina-C (1×10^6 células/pocillo en una placa de 24 pocillos, relación 1:10). A los 5 días, las células fueron cosechadas, se sembraron 2×10^6 células por pocillo en placa de 96 pocillos (células efectoras). Para determinar la actividad citotóxica específica, se utilizaron células Hepa129 (2×10^5 células/ml) como células blanco. Luego de 4 hs de incubación a 37 °C, los pocillos fueron centrifugados y se obtuvieron los sobrenadantes libres de células. Fueron evaluados los niveles de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio luego de la lisis celular inducida por las células citotóxicas (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) y se expresaron como porcentaje de lisis usando la ecuación de absorbancia de $C = (CE - MCB - CEC) / (C_{max} - C_{min})$ [C = citotoxicidad; CE = célula efectora; MCB = Mix células blancos; CEC = células efectoras controles; C_{ma} = Control máximo; C_{min} = control mínimo].

4.7.4. Detección de la de granulación de las células T

La característica indicadora de degranulación en los linfocitos T $CD8^+$, es la expresión de vesículas citolíticas y CD107 es una molécula que se expresa en estas vesículas una vez que los CTL se activan. Por ello, para evaluar la activación de los CTL se utilizaron 1×10^7 esplenocitos provenientes de ratones controles o tratados y fueron estimulados *in vitro* con células Hepa129 pre-tratadas con mitomicina-C (1×10^6 células/pocillo en una placa de 24 pocillos). Al día 5 de la exposición las células fueron cosechadas, sembradas (2×10^6 células por pocillo) en placa de 96 pocillos (células efectoras). Para determinar la degranulación específica de las células T, estas células fueron expuestas nuevamente a células Hepa129 (2×10^5 /ml). Luego se incubó en presencia de monensin (5 µg/ml) a 4 hs a 37 °C durante 3 hs. Pasado este tiempo, los esplenocitos fueron marcados con anticuerpos conjugados: anti-CD8-AlexaFluor488 y anti-CD107-PECy5

(Biolegend, San Diego, CA, USA) y fueron analizados por citometría de flujo y con el software Cyflogic.

4.7.5. Citometría de flujo en muestras provenientes de tejidos perfundidos

Se obtuvieron muestras de hígado con tumor de los diferentes grupos experimentales (4Mu, AdIL-12 y 4Mu+AdIL-12) perfundidos y mantenidos en colagenasa a 37 °C por 2-3 min (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Las células disgregadas fueron marcadas con anti-CD133-APC (141208; Biolegend, San Diego, CA, USA), anti-F4/80-FITC (ab105155; Abcam, Cambridge, UK); y anti CD47-PECy5 (ab108415; Abcam, Cambridge, UK) por 45 min a 4 °C. Las muestras fueron posteriormente analizadas por citometría de flujo y los datos fueron analizados empleando los programas Cyflogic y FlowJo[®] (BD, Becton, Dickinson y compañía). Los esplenocitos de los ratones fueron obtenidos de los bazo de los diferentes grupos, disgregados y tratados con buffer lisis de glóbulos y lavados con PBS 1X con albumina de suero bovino al 1%. Luego, 1x10⁶ células fueron suspendidas en PBS 1X y se incubaron con anticuerpos conjugados con fluorocromos: anti-CD4 PECy5 (553050; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), anti-CD8 Alexa Fluor488 (557668; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

4.7.6. Cuantificación de citoquinas por ELISA

Las muestras de suero extraídas de los ratones controles y tratados fueron analizadas mediante ELISA para cuantificar INF γ . Además, sobre el medio condicionado de los pM ϕ colectado 72 hs después del tratamiento con 4Mu se midió la concentración de IL-6 por ELISA. En ambos casos, siguiendo las recomendaciones del fabricante (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Los resultados fueron obtenidos usando el espectrofotómetro de microplacas Multiskan[™] (Thermo Fisher Scientific).

4.7.7. Ensayo de apoptosis

Los esplenocitos (1×10^7) de los ratones control o tratados fueron estimulados *in vitro* con células Hepa129 (1×10^6 células/pocillo en una placa de 24 pocillos) pre-tratadas o no con 4Mu e incubadas con mitomicina-C. A los 5 días, los esplenocitos fueron cosechados y se sembraron 2×10^6 células por pocillo en placa de 96 pocillos (células efectoras). Las células Hepa129 (2×10^5 células/ml) pre-tratadas o no con 4Mu fueron usado como blanco para las células efectoras. Luego de 18 hs de incubación a 37 °C, se realizó un ensayo de apoptosis de las células Hepa129 usando naranja de acridina (NA) y bromuro de etidio (BE), y visualizándolo en microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E800 Global Nikon, USA). El ensayo fue realizado por cuadruplicado y repetidos al menos 3 veces.

4.7.8. Ensayo de fagocitosis

Se aislaron M ϕ de la cavidad peritoneal (pM ϕ) y luego fueron incubados en medio sin suero por 30 min. Por otro lado, células Hepa129 (5×10^5) fueron pre-tratadas o no con 4Mu (0,5mM) por 72 hs y marcadas con DAPI (1 μ g/ml) por 5 min y con anticuerpo anti-CD47-PECy5 por 45 min. Las células Hepa129 fueron luego co-incubadas con los pM ϕ (5×10^4 células) 2 horas en una placa de 24 pocillos; los pM ϕ fueron identificados con anticuerpo anti-F4/80 (Abcam, Cambridge, UK). La fagocitosis fue determinada por citometría de flujo por la detección de células DAPI⁺F4/80⁺.

4.7.9. Ensayo de fagocitosis con tinta china

Ratones con fibrosis inducida por TAA tratados o no con 4 Mu, recibieron por vía i.v, 100 μ l (10% V/V) de tinta china. Luego de 30 min los animales fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de hígado. La incorporación de tinta china por células fagocíticas se visualizó con microscopio óptico y por contraste con tinción de hematoxilina y eosina (H&E).

4.7.10. Cortes histológicos

Las muestras de hígado y pulmón de los ratones fueron embebidas en parafina, cortadas con un grosor 5 μm y teñidas con H&E o inmunohistoquímica siguiendo los procedimientos estándares y visualizadas en el microscopio óptico.

4.7.11. Extracción de ARN y análisis por RT-qPCR

De las muestras descritas anteriormente, se extrajo ARN total (2 μg) utilizando Trizol[®] y se realizó la transcripción inversa (RT-qPCR) con 200 U de la transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) usando 500 ng de cebadores Oligo (dT). Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) del ADN copia (ADNc) (Stratagene Mx3005p, Stratagene, La Jolla, CA, USA). Con RT-qPCR se cuantificaron los niveles de ARNm para CD133, CD44, CD90, EpCAM, CD13, CD47, SIRP- α , óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), interleuquina-1 β (IL-1 β), factor de necrosis tumoral (TNF- α), arginasa 1, interleuquina-10 (IL-10), factor transformador de crecimiento beta (TGF- β) por SYBR[®]Green (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), usando los cebadores descritos en la *Tabla 5*. Los ciclos de RTqPCR fueron: de 95°C por 10 min y 40 ciclos bajo las siguientes condiciones, desnaturalización (95°C por 30 segundos), apareamiento (56-62°C, dependiendo el primer, por 30 segundos) y extensión (72°C por 1 min). Al final de la reacción, la temperatura fue incrementada de 60°C a 95°C (2°C/min), y la fluorescencia fue medida cada 15 segundos para construir la curva de disociación. Los valores fueron normalizados con el transcripto gliceraldehido3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH; usado como gen control). Los datos fueron calculados como las veces de cambio $\Delta\Delta\text{Ct}$. Las cantidades relativas del producto amplificado de PCR de las células no tratadas fueron relativizadas a 1. Un control fue corrido en cada ensayo, y todas las determinaciones fueron hechas por triplicados para cada animal (n = 5 animales por grupo) en 2 experimentos separados.

La expresión relativa fue calculada acorde a la ecuación de la expresión relativa (fold change) = $2^{\Delta\Delta Ct}$.

Tabla 5: Cebadores

	FORWARD	REVERSE
CD133 humano	5'-AAACAGTTTGCCCCAGGAA-3'	5'-ACAATCCATTCCCTGTGCGT-3'
CD47 humano	5'-CGCTGTGGTTGGACTGATCT-3'	5'-GGGGTTCCTCTACAGCTTTCC-3'
CD47 ratón	5'-ATGCTTCTGGACTTGGCCTC-3'	5'-CCGACCAAAGCAAGGACGTA-3'
SIRPα ratón	5'-AGAAAGCCAAGGGGTCAACATC-3'	5'-TCTCTTTGGGCAGATTCAGGTC-3'
TNF-α ratón	5'-GACCCTCACACTCAGATCATCTTC T-3'	5'-CCACTTGGTGGTTTGCTACGA-3'
iNOS	5'-AAGATGGCCTGGAGGAATGC-3'	5'-TGCTGTGCTACAGTTCCGAG-3'
Arg1	5'-CAGAAGAATGGAAGAGTCAG-3'	5'-CAGATATGCAGGGAGTCACC-3'
TGF-β	5'-AGGACCTGGCTTGAAGTGG-3'	5'-AGTTGGCATGGTAGCCCTTG-3'
IL-10	5'-GGTTGCCAAGCCTTATCGGA-3'	5'-ACCTGCTCCACTGCCTTGCT-3'
IL-1β ratón	5'-TGACAGTGATGAGAATGACCTGTTC-3'	5'-TTGGAAGCAGCCCTTCATCT-3'
TLR4 ratón	5'-ACCTGGCTGGTTTACACGTC-3'	5'-GCAGAAACATTCGCCAAGCA-3'
SOX2 ratón	5'-GATCAGCATGTACCTCCCCG-3'	5'-CGCCCTCAGGTTTTCTCTGT-3'
Nanog ratón	5'-GCATCGAATTCTGGGAACGC-3'	5'-GGGATACTCCACTGGTGCTG-3'
Wnt1 ratón	5'-CAACAGTAGTGGCCGATGGT-3'	5'-ACGATCTTGCCGAAGAGGTG-3'
GAPDH	5'-CATCTCTGCCCCCTCTGCTG-3'	5'-GCCTGCTCACCACCTTCTTG-3'

4.7.12. Array de PCR

Siguiendo el protocolo anteriormente mencionado, se extrajo el ARNm de los ratones controles (salinos) o tratados con la combinación (4Mu+AdIL12) (n = 3/grupo), para

obtener el ADNc. Una vez testeada la calidad se procedió a realizar RT²-PCR (Qiagen, Hilden, Alemania). Se evaluó la expresión de los niveles de 84 genes relacionados a los marcadores de CSCs (PAMM-176ZA; S.A Biosciences, Frederick, MD, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La expresión del ARNm obtenido de cada gen fue normalizada con el control GAPDH. Finalmente, los resultados fueron analizados siguiendo el software del sitio oficial, donde los resultados fueron expresados como las veces de cambio $\Delta\Delta C_t$ relativo al grupo control (grupo salino).

4.7.13. Análisis por western blot

La expresión de TLR4, Sox2, CD47 y CD133 fue analizada en las células Hepa129 y Hepa129 CD133⁺ o Hepa 129 CD133⁻ aisladas que fueron incubadas con el CM de M ϕ tratados o no con 4Mu. Las células se lisaron con un buffer con inhibidores de proteasa (50 mM buffer Tris-HCl, pH7.4, conteniendo 0.1% Tween-20, 150mM NaCl, 10 mg/ml aprotinina, 5 mg/ml leupeptina, 1 mM PMSF) durante 30 min en hielo. Se midió la concentración proteica total utilizando la técnica de Bradford. Cada muestra con 50 μ g de proteína total fue separada en un gel de 10% de acrilamida-bisacrilamida mediante SDS-PAGE y transferida a una membrana de nitrocelulosa y revelada utilizando un anticuerpo específico anti-ratón hecho en cabra IgG conjugado a peroxidasa de rábano (en inglés, HRP) (Jackson ImmunoResearch Labs, USA) diluido 1:5,000 en buffer t-TBS 1X (TBS 1X en 0,1% de Tween). Las bandas fueron detectadas usando reactivos de detección (ECL). Se utilizó el anticuerpo anti-actina como control de carga en dilución 1/1000 (Santa Cruz Biotechnology, USA). La intensidad de las bandas fue medida por densitometría usando el software Scion Image (Scion Corporation, USA).

4.7.14. Ensayos con células dendríticas derivadas de médula ósea

4.7.14.1. Obtención de DCs.

La médula ósea (MO) se extrajo del fémur y tibias de los ratones C3Hj/He o BALB/c de manera mecánica. Luego, se realizó la lisis de eritrocitos utilizando buffer lisis de glóbulos rojos por 5 min. La suspensión celular se cultivó con medio RPMI 1640 con 10% SFB, IL-4 y GM-CSF (20 ng/ml; PeproTech, Alemania). Se realizaron cambios de medio luego de los 3 y 5 días. Luego al día 7, se colectaron las DCs.

4.7.14.2. Ensayo de Fagocitosis

Las DCs (5×10^4 células) obtenidas de MO e inmunomarcadas con anti-CD11c, CD86 and MHCII fueron incubadas con células Hepa129 (5×10^5) tratadas o no con 4Mu y teñidas con DAPI por 2 hs a 37 °C. Se midió la incorporación de Hepa129 por las DCs mediante fagocitosis por citometría de flujo detectado células CD11c⁺ CD86⁺MHCII⁺DAPI⁺.

4.7.14.3. Carga antigénica

Los extractos provenientes de las muestras de HCC de animales o las células BNL tratadas o no con 4Mu se resuspendieron en medio sin suero, se sometieron a 4 ciclos de congelación-descongelación. Los extractos se centrifugaron durante 10 min a 300 g. Se recogieron los sobrenadantes y se determinaron las concentraciones de proteína mediante el ensayo Bradford (Bio-Rad, Alemania). Las DCs maduras se pulsaron con células o lisados tumorales ($200 \mu\text{g}/10^6$ células) a 37 °C durante 18 h. Luego, se usaron para experimentos *in vivo*.

4.8. Análisis estadístico.

Los valores fueron expresados como la media \pm el desvío estándar de la media (SEM). Para los diferentes experimentos se utilizaron el test de comparación entre dos variables (Mann–Whitney) o de múltiples variables (ANOVA con post-tests de Tukey o Kruskal–Wallis) para evaluar las diferencias estadísticas entre grupos. La supervivencia fue analizada con la curva de Kaplan-Meier. El valor $p < 0.05$ fue considerado como significativo. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Prisma (Graph Pad, San Diego, CA, USA). Todos los experimentos expuestos en esta tesis se repitieron al menos 3 veces.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. La combinación 4Mu + AdIL-12 inhibe el crecimiento tumoral en el modelo ortotópico de HCC establecido sobre hígados con fibrosis.

Para evaluar el efecto de la terapia combinada de 4Mu + AdIL-12 sobre el crecimiento tumoral del HCC, se estableció un modelo ortotópico asociado a fibrosis avanzada inducida por TAA (*figura 11A*). Luego de 2 semanas de la inoculación de las células tumorales Hepa129, se midió el tamaño tumoral y se observó que, tanto los ratones tratados con 4Mu como aquellos que fueron tratados con AdIL-12 mostraron disminución en el tamaño tumoral en comparación con los ratones que no fueron tratados (158 ± 36 mm³ y 112 ± 28 mm³ v.s 395 ± 81 mm³; $p<0.05$ y $p<0.01$ respectivamente). Sin embargo, los animales que recibieron el tratamiento combinado mostraron una potente inhibición sobre el volumen tumoral (77 ± 37 mm³; $p<0.001$) (*figura 11B*). Además, se redujo significativamente la presencia de ascitis, así como también el número de nódulos satélites cuando se comparó con los ratones que no recibieron el tratamiento (*Tabla 6*). Del mismo modo, la supervivencia de los ratones que recibieron 4Mu + AdIL-12 fue significativamente mayor ($p<0.001$) comparada con aquellos ratones que recibieron los tratamientos individuales o los que no recibieron tratamiento (*figura 11C*).

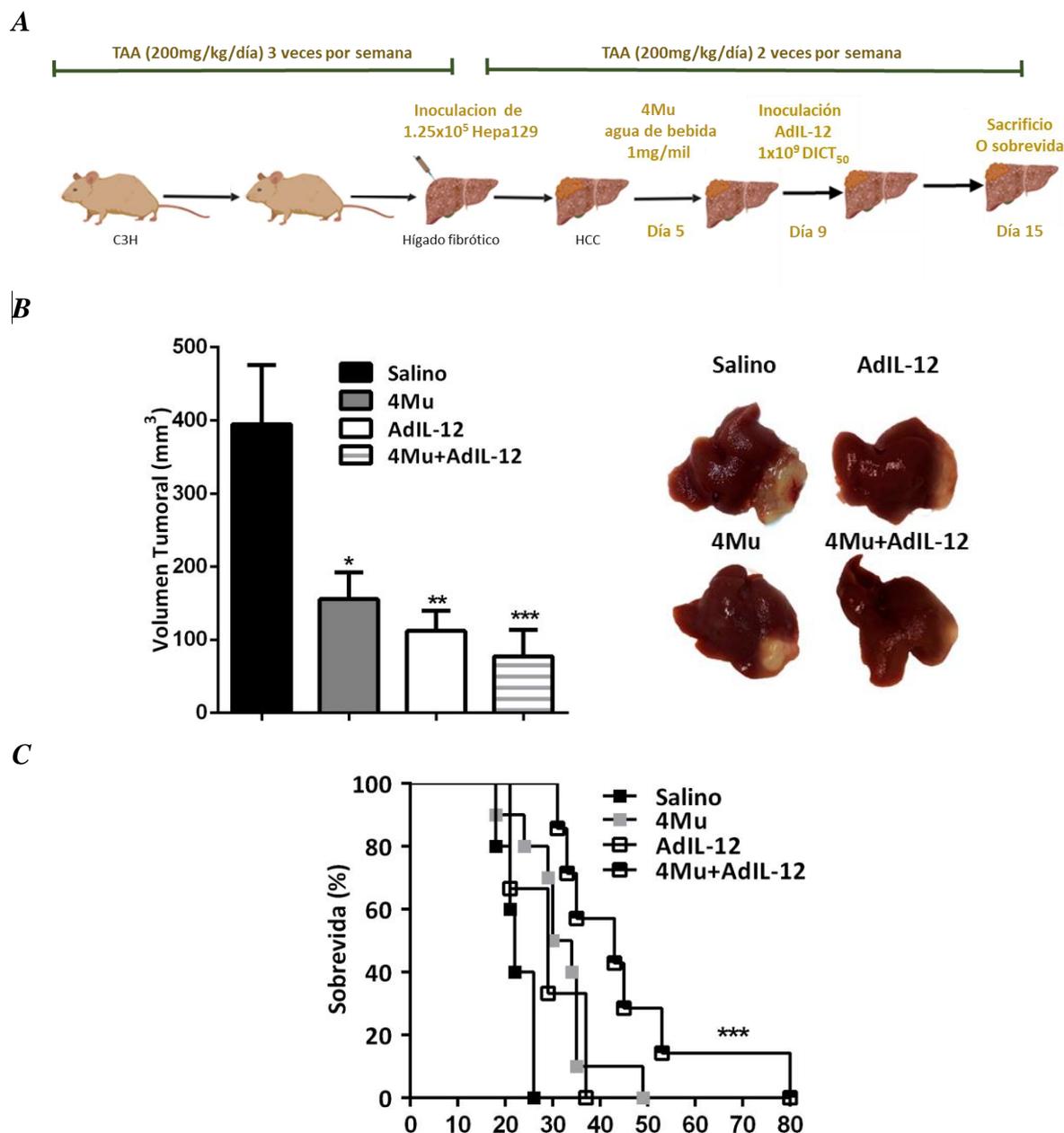


Figura 11: Efecto antitumoral del tratamiento combinado (4Mu + AdIL-12) en un modelo murino de HCC asociado a fibrosis. (A) Ratones machos de la cepa C3Hj/He se sometieron a inyecciones crónicas de TAA (200 mg/kg) para la inducción de fibrosis por 4 semanas. Luego de este tiempo, se inocularon ortotópicamente las células Hepa129 ($1,25 \times 10^5$ células/animal) (día 0). Al día 5, los ratones fueron distribuidos en grupos ($n = 7$ por grupo) (1) los ratones control (salino) (2) ratones que recibieron 4Mu (200 mg/kg) por agua de bebida (3) ratones que recibieron el vector AdIL-12 (1×10^9 DICT₅₀/ml) por inoculación sistémica al día 9 (4) los ratones que recibieron 4Mu+AdIL-12. (B) Tamaño tumoral en los diferentes grupos a los 15 días de la implantación del tumor. * $p < 0.05$, salino vs. 4Mu; ** $p < 0.01$, salino vs. AdIL-12; y *** $p < 0.001$, salino vs. 4Mu+AdIL-12, test de ANOVA de una cola y comparación múltiple de Tukey. Los datos fueron obtenidos de 3 experimentos independientes y están expresados como \pm SEM. (C) sobrevivida de los animales. *** $p < 0.001$, test de rango logarítmico de Kaplan-Meier. Este experimento fue llevado a cabo 2 veces.

Tabla 6: Medición de los nódulos satélites y de la presencia de ascitis (n = 8 por grupo).

	Salino	4Mu	AdIL-12	4Mu + AdIL-12
Ascitis	+++	+	+	-
# Satellite	15 ± 5	5 ± 3	3 ± 2	-

5.2. La terapia combinada aumenta el infiltrado inflamatorio en los tumores y bazos de los ratones tratados.

Para evaluar la presencia de células efectoras de la respuesta inmune que infiltran el tumor realizamos una tinción inmunohistoquímica en cortes de hígado. Pudimos observar que sólo aquellos animales que recibieron el tratamiento con AdIL-12 mostraron un incremento en el infiltrado de células T CD3⁺ en los tumores ($p < 0.001$) (*figura 11A*). Para estudiar la proporción de estas células efectoras en los hígados y bazos de los ratones de los diferentes grupos, realizamos un análisis por citometría de flujo para los marcadores CD4 y CD8. El porcentaje encontrado de las células T CD8⁺ en los ratones del grupo control fue de $5.3 \pm 1.2\%$ y $5.1 \pm 0.4\%$ (hígado y bazo, respectivamente), mientras que el porcentaje de células T CD8⁺ en los ratones tratados con la combinación de 4Mu + AdIL-12 fue significativamente mayor: $16 \pm 3.8\%$ (hígado) y $17 \pm 5.1\%$ (bazo); (*figura 12B y 12C izquierda*). Con respecto a las células T CD4⁺, el porcentaje en los animales control fue $6.2 \pm 0.6\%$ y $9.7 \pm 0.2\%$ en el hígado y en el bazo, respectivamente. La proporción de células T CD4⁺ en los ratones tratados con 4Mu + AdIL-12 fue significativamente mayor, alcanzando valores de $11 \pm 0.6\%$ y $18 \pm 1.1\%$ (en el hígado y el bazo, respectivamente) (*figura 12B y 12C derecha*).

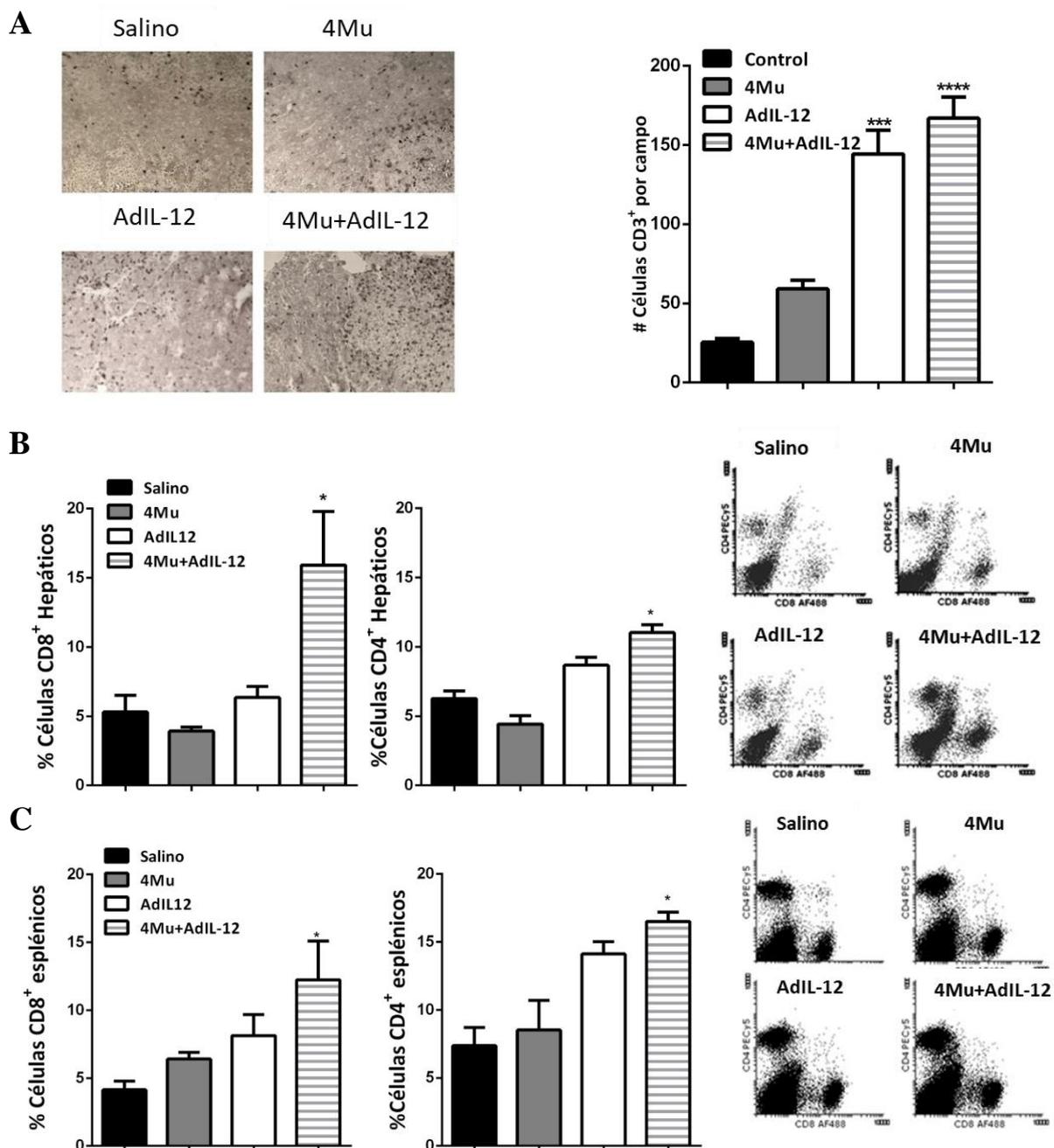


Figura 12. La terapia combinada promueve el infiltrado de células T en el tumor. A) Presencia de células CD3⁺ infiltrantes del tumor (n = 5 por grupo) analizado por inmunohistoquímica en cortes de tejido hepático con tumor (20 campos por muestra). Cada punto representa una célula CD3 positiva. *p < 0.05, salino vs. 4Mu; ***p < 0.001, salino vs. 4Mu+AdIL-12; and ***p < 0.001, salino vs. AdIL-12, ANOVA, test de comparación múltiple de Tukey de una cola. (B) Porcentaje de células T CD8⁺ y CD4⁺ en el tejido hepático de los diferentes grupos (n = 5 por grupo), medido por citometría de flujo. *p < 0.05, salino vs. 4Mu+AdIL-12; ANOVA, test de comparación múltiple de Tukey de una cola. (C) Porcentajes de células T CD8⁺ y CD4⁺ en el bazo de los ratones medido por citometría de flujo. *p < 0.05, salino vs. 4Mu+AdIL-12; **p < 0.01, salino vs. 4Mu+AdIL-12, ANOVA, test de comparación múltiple de Tukey de una cola.

5.3. La terapia combinada induce una potente respuesta citotóxica específica antitumoral

Para determinar si el aumento del infiltrado de células T CD8⁺ estaba asociado con el efecto antitumoral inducido por 4Mu y AdIL-12, realizamos un ensayo de exposición de células Hapa129 a los esplenocitos extraídos de bazo de animales tratados con 4Mu o AdIL-12. Observamos una ligera actividad de linfocitos T citotóxicos (CTL) contra células Hepa129 ($2,08 \pm 2,6\%$ y $6,45\% \pm 2,8\%$, para 4Mu y AdIL-12, respectivamente). Sin embargo, cuando las células Hepa129 se expusieron a esplenocitos extraídos de ratones que recibieron el tratamiento combinado, se observó una respuesta citotóxica significativamente mayor en comparación al grupo salino ($12,5 \pm 2,86\%$; $p < 0,05$) (*figura 13A*). Un resultado similar se observó en los linfocitos T CD8⁺ cuando analizamos el marcador de degranulación CD107. Observamos un aumento en el marcador CD107⁺ en los esplenocitos derivados de los ratones tratados con la combinación 4Mu + AdIL-12 cuando fueron co-cultivados con las células Hepa129 en comparación al grupo salino ($24,62 \pm 6,37\%$; $p < 0,05$) (*figura 13B*). Además, los niveles séricos de IFN γ , el mediador biológico de la expresión de IL-12, en los ratones del grupo 4Mu + AdIL-12, estuvieron significativamente más elevados en comparación con los demás grupos ($p < 0,001$) (*Figura 13C*).

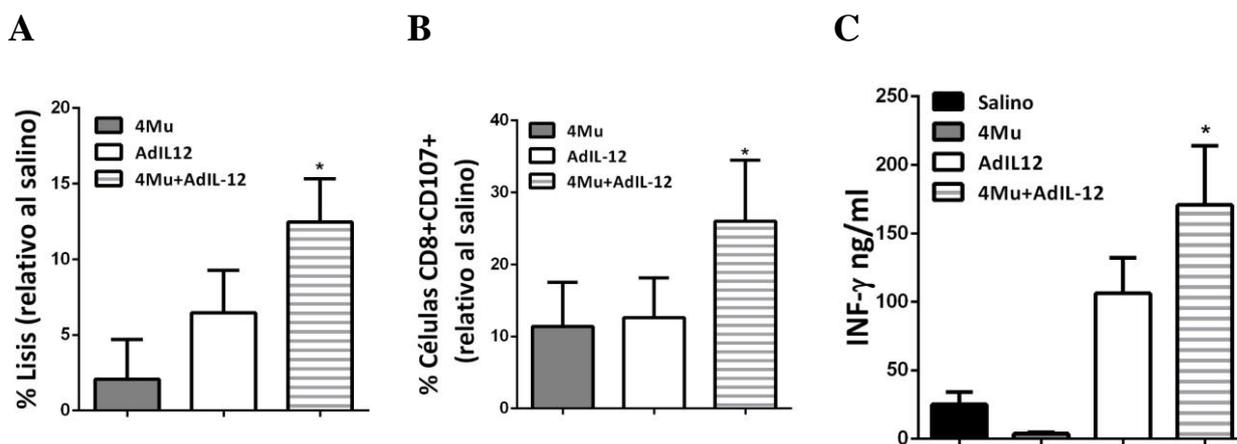


Figura 13: 4Mu + AdIL-12 induce la activación específica de células T citotóxicas. (A) Esplenocitos derivados de ratones de cada grupo (n = 3 por grupo) fueron re-estimulados e incubados con células Hepa129. Se midió la actividad citotóxica mediante el ensayo de lisis celular por la liberación de LDH. * $p < 0.05$, salino vs. 4Mu + AdIL12, ANOVA, test de comparación múltiple de Tukey de una cola. (B) Esplenocitos derivados de ratones de cada grupo fueron incubados con células Hepa129. Se evaluó la activación de las células efectoras mediante la exposición del marcador CD107⁺ en células CD8⁺ por citometría de flujo. * $p < 0.05$ salino vs. 4Mu + AdIL12, ANOVA, test de comparación múltiple de Tukey de una cola. (C) Cuantificación de los niveles séricos de INF γ por ELISA; * $p < 0.05$, salino vs. 4Mu + AdIL12, ANOVA, test de comparación múltiple de Tukey de una cola. Los datos son expresados como la media \pm SEM.

5.4. El tratamiento con 4Mu hace más “visibles” a las células tumorales, aumentando la respuesta citotóxica mediada por linfocitos T.

El tratamiento con AdIL-12 aumentó el número de células efectoras de la respuesta inmune. Sin embargo, la actividad citotóxica disparada por las células T CD8⁺ y la respuesta antitumoral fue superior en el caso del tratamiento combinado. Nos propusimos evaluar la implicancia del tratamiento con 4Mu sobre el efecto específico observado. De acuerdo con resultados previos de nuestro grupo, 4Mu no es capaz de inducir apoptosis en las células Hepa129 en las dosis utilizadas¹⁸⁴, del mismo modo, hemos corroborado en esta línea y en otras líneas tumorales de HCC, humanas y murinas, que 4Mu comienza a tener un efecto sobre la viabilidad células en una concentración mayor a ~4.0 mM (*figura 14*). La tinción con BEth y NAcr, de los esplenocitos re-estimulados *in vitro* con células Hepa129, mostró un aumento del % de células apoptóticas cuando las células Hepa 129 fueron expuestas a los esplenocitos

provenientes de los ratones del grupo 4Mu + AdIL-12 en comparación con los grupos control o AdIL-12 ($19 \pm 2.0\%$, $14 \pm 2.0\%$ y $18 \pm 4.0\%$; respectivamente) (*figura 15A, izquierda*). Notablemente, cuando los esplenocitos derivados de los grupos AdIL-12 o 4Mu + AdIL-12 fueron incubados con células Hepa129 previamente tratadas con 4Mu, el % de células apoptóticas fue mayor ($37 \pm 5.2\%$ y $42 \pm 3.5\%$ respectivamente $***p < 0.01$; test de Kruskal-Wallis) (*figura 15A, derecha*).

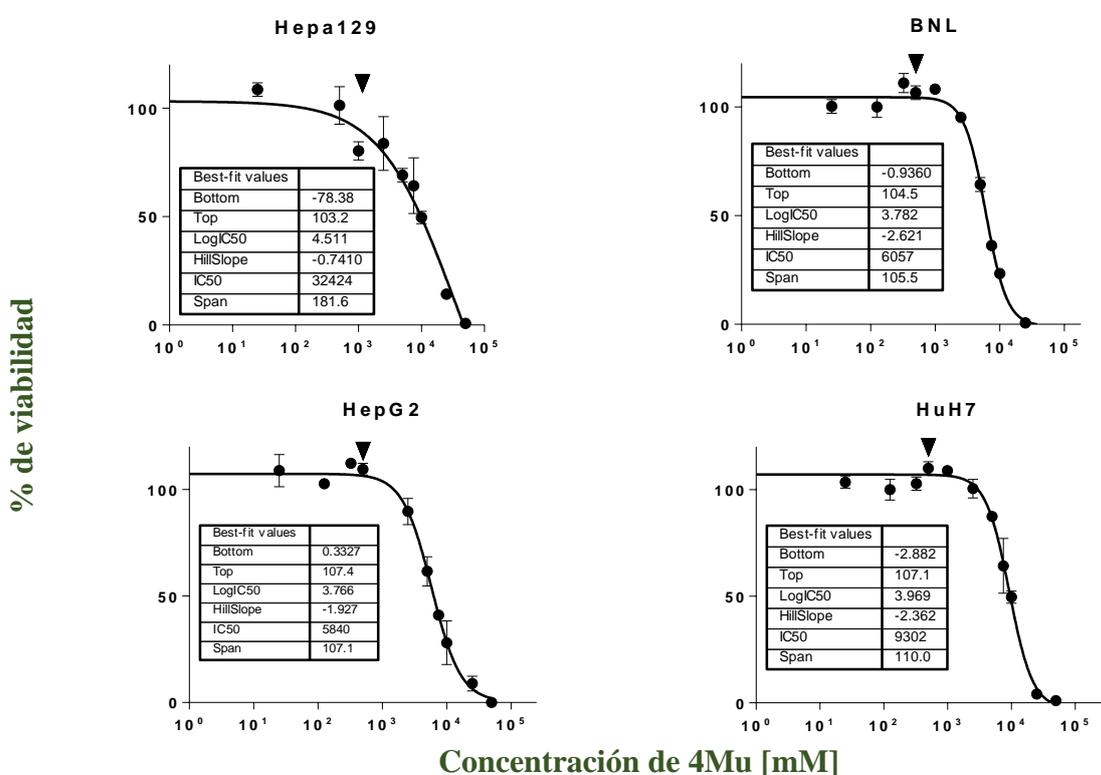
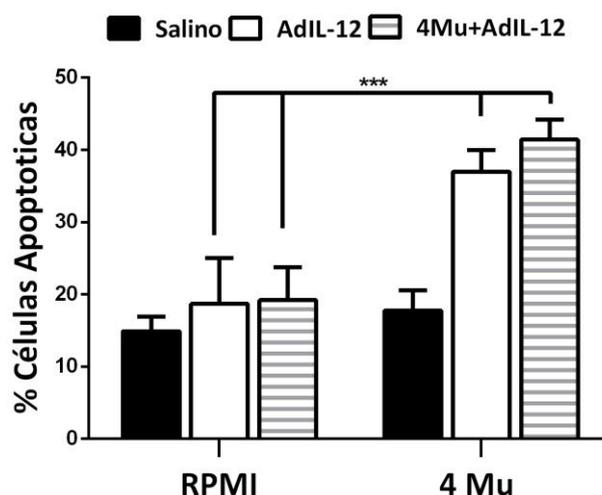


Figura 14: Curvas de dosis-respuesta del efecto de 4Mu sobre la viabilidad de las células tumorales de HCC humanas y murinas. Las células tumorales humanas (HepG2 y HuH7) y murinas (Hepa 129 y BNL) fueron tratadas con diferentes concentraciones de 4Mu por 72hs y se midió la viabilidad de las células por MTT. Los experimentos fueron hechos por sextuplicados. La flecha indica la concentración de 0,5mM de 4Mu. LogIC50 indica la concentración en la cual el 50% de las células son viables.

Además, se midió la degranulación de las células efectoras en esplenocitos provenientes de todos los grupos de tratamiento, observándose un % de células $CD8^+CD107^+$

superior cuando los esplenocitos derivados de ratones tratados con 4Mu + AdIL 12 fueron expuestos a células Hepa129 pre-tratadas con 4Mu (47 ± 3.5 vs. $24 \pm 5.2\%$, respectivamente; $*p \geq 0.05$; test de Kruskal-Wallis) (*figura 15B*).

A



B

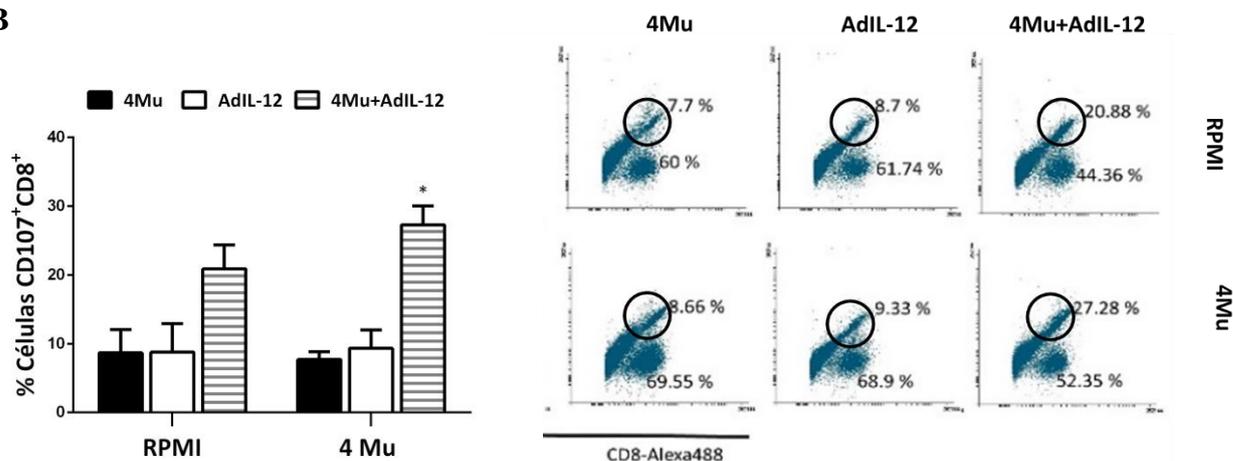


Figura 15: Apoptosis y degranulación de las células T CD8⁺ (A) Las células tratadas con 4Mu *in vitro* fueron expuestas con pool de esplenocitos de ratones tratados con AdIL-12 o AdIL-12 + 4Mu muestran más eventos apoptóticos. $***p < 0.01$, Hepa 129+4Mu vs. Hepa129 (RPMI). (B) Incremento de la expresión de CD107⁺ en las células T CD8⁺ de los diferentes grupos cuando se re-estimularon con células Hepa129 pre-tratadas con 4Mu por 72 hs medida por citometría de flujo. $*p < 0.05$, test de Kruskal-Wallis test. Se utilizaron $n = 5$ ratones por grupo. Los datos fueron expresados como la media \pm SEM.

5.5. El tratamiento con 4Mu estimula la fagocitosis de las células tumorales por células presentadoras de antígeno y potencia la respuesta antitumoral inducida por AdIL-12

Para evaluar si el efecto observado estaba relacionado con la capacidad de 4Mu de facilitar el reconocimiento de las células tumorales por parte de las células inmunitarias, realizamos un ensayo de fagocitosis *in vitro* usando pM ϕ . Para ello, marcamos con DAPI a las células tumorales Hepa129 y co-cultivamos con los pM ϕ por 2 hs; luego de este tiempo marcamos a los pM ϕ con anti-F4/80 y cuantificamos la presencia de células F4/80⁺DAPI⁺, que representan los pM ϕ que han fagocitados las células Hepa129. Notablemente, el porcentaje de células fagocitadas fue significativamente mayor cuando las células Hepa129 habían sido previamente tratadas con 4Mu, comparadas con las Hepa129 sin tratar. (*p<0.05 test de Mann-Whitney) (*figura 16A*). Para analizar si 4Mu modificaba la “visibilidad” de las células tumorales o la actividad fagocítica del M ϕ , realizamos un ensayo de fagocitosis *in vivo* usando tinta china. Los ratones tratados o no con 4Mu fueron inyectados con tinta china por la vena de la cola y se sacrificaron luego de 30 minutos. Se realizaron cortes histológicos de los hígados de ambos grupos, observándose por microscopía que tanto los ratones que fueron tratados como aquellos que no lo fueron presentaban perfiles similares de internalización de tinta china en los M ϕ (*figura 16B*).

La cinética de la fagocitosis de las células Hepa129 se muestra en la figura 17. La incorporación de las células tumorales comienza a partir de los 15 min de incubación de los pM ϕ con las células Hepa129. Además, aquí también se observó un incremento en el % de células fagocitadas cuando estaban pre-tratadas con 4Mu (*figura 17A*). Este resultado fue confirmado con la observación del proceso a diferentes tiempos en el microscopio de fluorescencia. (*figura 17B*)

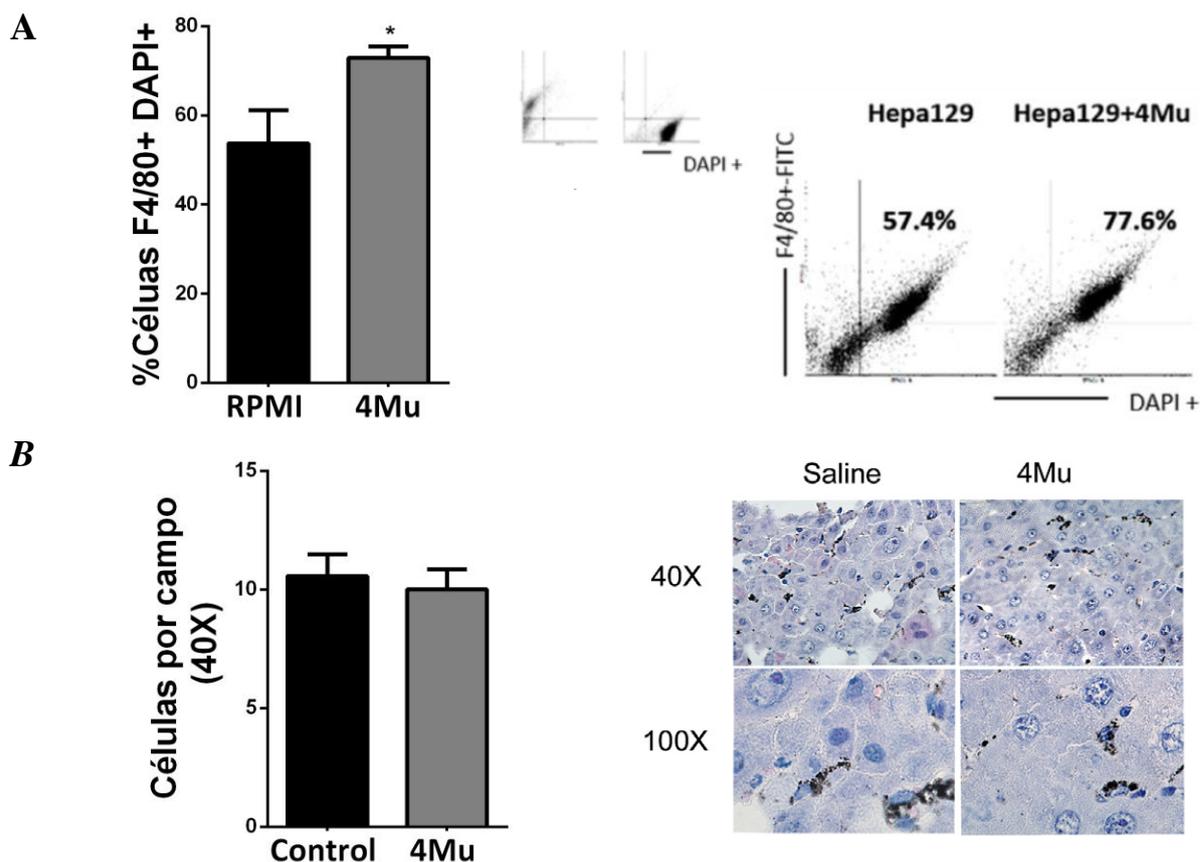


Figure 16. Fagocitosis mediada por macrófagos (in vitro e in vivo). (A) Porcentaje (%) de células fagocitadas determinado por citometría de flujo (células F4/80+DAPI+). * $p < 0.05$, Hepa129 + 4Mu vs. Hepa129, test de Mann-Whitney. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado. Los dot plots (arriba) corresponden a las células Hepa129 o M ϕ solos. (B) Incorporación de tinta china por los M ϕ hepáticos. La cuantificación de la fagocitosis no mostró diferencias entre los ratones ($n = 3$ por grupo) tratados o no con 4Mu; ns (no significativo), salino vs. 4Mu, test de Mann-Whitney fueron expresados como la media \pm SEM.

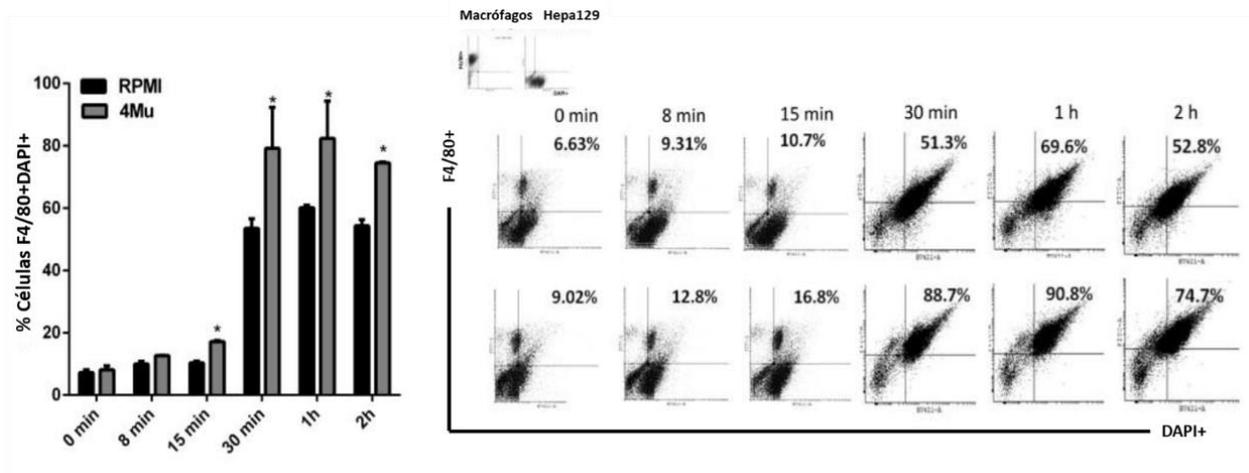
5.1. El incremento de la fagocitosis de las células tumorales pre-tratados con 4Mu se asocia a una disminución de la expresión de CD47

Ha sido reportado que la molécula de superficie CD47 interactúa con la proteína reguladora de señal alfa (SIRP α) y suprime la actividad fagocítica de las células inmunes¹⁴³. La presencia de CD47 en los tumores sólidos humanos y particularmente sobre las CSC es considerado un mecanismo de evasión de la fagocitosis seguido de una progresión tumoral²⁵⁰. Para evaluar el mecanismo implicado en el aumento de la fagocitosis de las células tumorales, decidimos analizar la expresión génica de CD47 *in*

in vitro sobre las células Hepa129 o Hepa129+4Mu, por qPCR. El tratamiento con 4Mu disminuyó significativamente la expresión de CD47 (*figura 18A, derecha*). Entonces, confirmamos la expresión de la proteína CD47, observando una reducción del marcador en las células tratadas con 4Mu por citometría de flujo (*figura 18B*). Volvimos a realizar un ensayo de fagocitosis observando que las células F4/80⁺DAPI⁺ también presentaban una reducción de los niveles de CD47⁺ cuando habían sido tratadas con 4Mu (*figura 18C*). En contraste, los niveles de ARNm de SIRP α fueron similares tanto en los pM ϕ como en los pM ϕ + 4Mu (*figura 18A, izquierda*). Para determinar si el efecto de 4Mu sobre CD47 era o no dependiente de la línea celular, analizamos en diferentes líneas celulares de HCC, tanto murinas como humanas. Observamos una disminución de células CD47⁺ y en la intensidad media de fluorescencia (MFI) en todas las líneas analizadas (*figura 19*).

Estos resultados sugieren que 4Mu tiene la capacidad de disminuir la expresión de CD47 en las células tumorales, mientras que no tienen efecto sobre la expresión génica de SIRP α en los M ϕ . Como describimos, 4Mu tampoco modificó la capacidad innata de fagocitar en los M ϕ . Estos resultados sugieren que la respuesta antitumoral de las células T inducida por IL-12 en los ratones con HCC avanzado puede estar potenciada por el aumento de la fagocitosis de las células Hepa129 inducido por 4Mu.

A



B

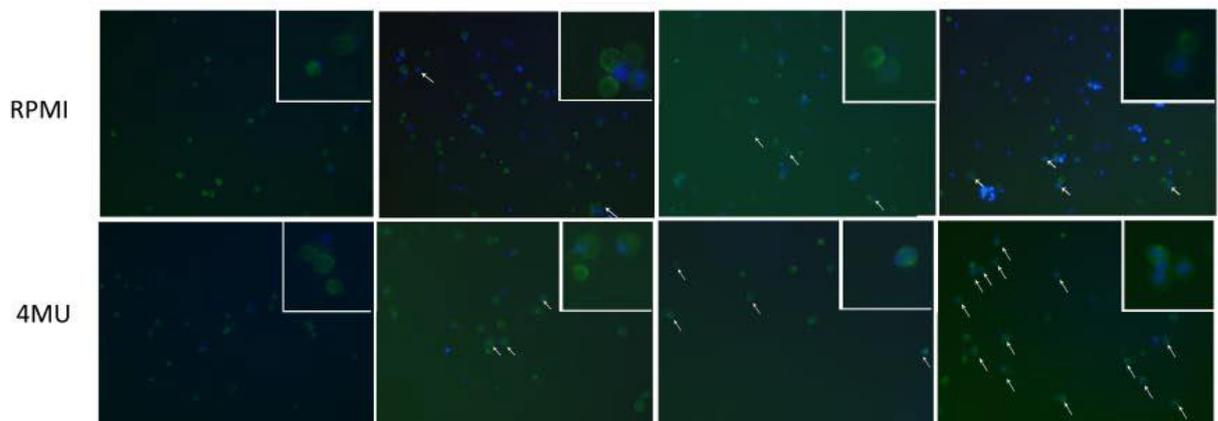


Figura 17. Estudio de la fagocitosis de células Hepa129 tras el tratamiento con 4Mu. A) Las células Hepa129 tratadas o no con 4Mu (0.5mM), fueron incubadas con Mφ y analizadas por citometría de flujo (células F4/80+DAPI+) a diferentes tiempos. * $p < 0.05$ 4Mu vs. RPMI a 15min, 30 min, 1 h y 2 h después del co-cultivo de Mφ con células Hepa129. ANOVA de 2 colas, comparación múltiple de Sidak's (B) Análisis por microscopia de fluorescencia, las flechas muestran las células fagocitadas. Los datos fueron realizados por triplicado y expresados como la media \pm SEM.

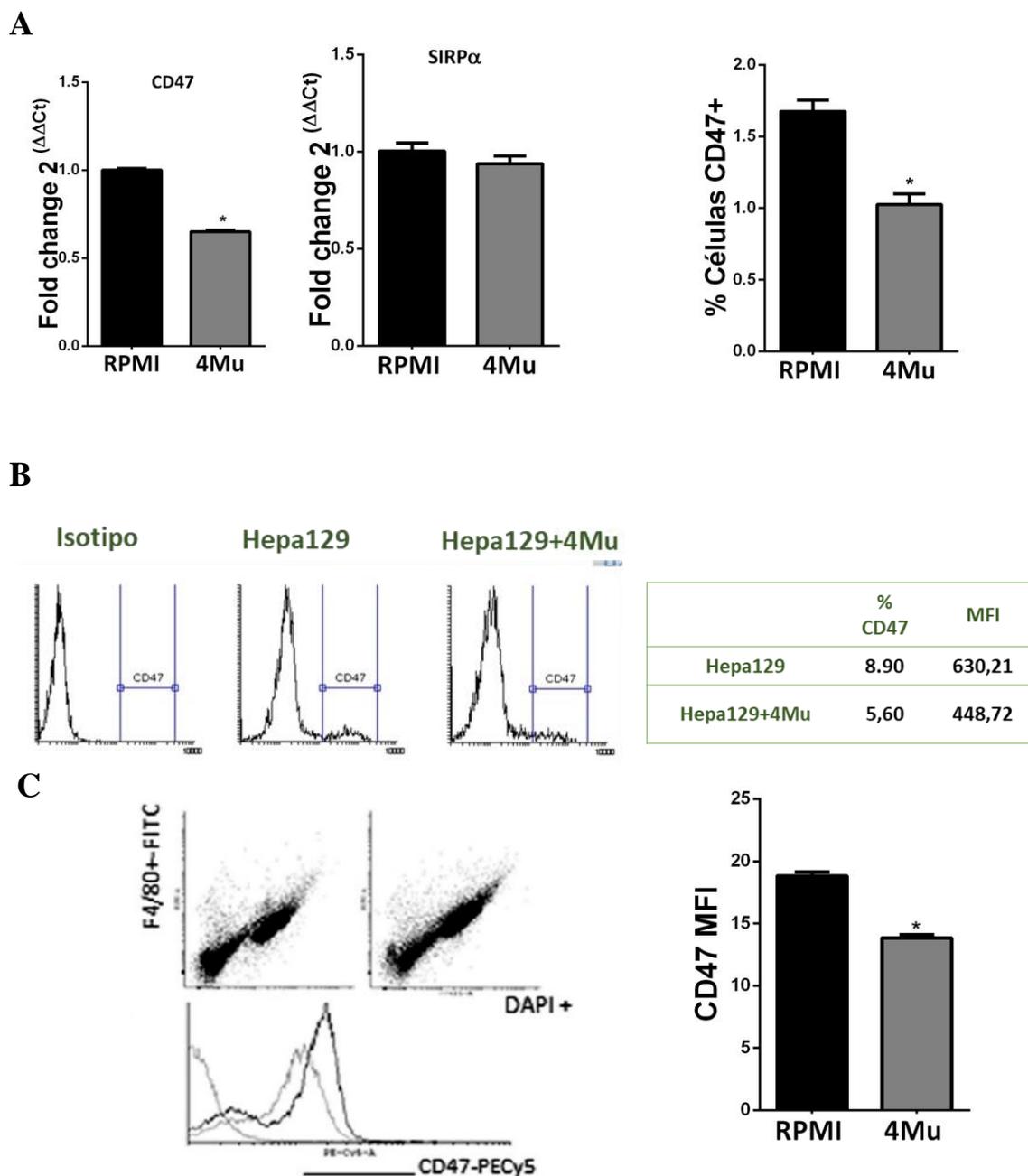


Figura 18: 4Mu modula la expresión de CD47 y aumenta la fagocitosis de las células Hepa129. (A) El tratamiento de las células Hepa129 con 4Mu disminuye los niveles de expresión de CD47 (izquierda). En los pMφ tratados *ex vivo* con 4Mu, los niveles de expresión de SIRPα resultaron similares a los de los pMφ no tratados; ns, test de Mann-Whitney * $p < 0.05$, Hepa 129 + 4Mu vs. Hepa 129, test de Mann-Whitney (derecha). (B) Citometría de flujo de las células Hepa129; los histogramas muestran niveles de expresión de CD47 disminuidos en las células que fueron pre-tratadas con 4Mu, test de Mann-Whitney * $p < 0.05$, Hepa129 vs. RPMI. (C) Intensidad media de fluorescencia (MFI) de CD47 en las células fagocitadas F4/80+DAPI+ tratadas o no con 4Mu. * $p < 0.05$, test de Mann-Whitney test. Los ensayos fueron realizados por triplicado y expresados como la media \pm SEM; MFI: Intensidad media de fluorescencia.

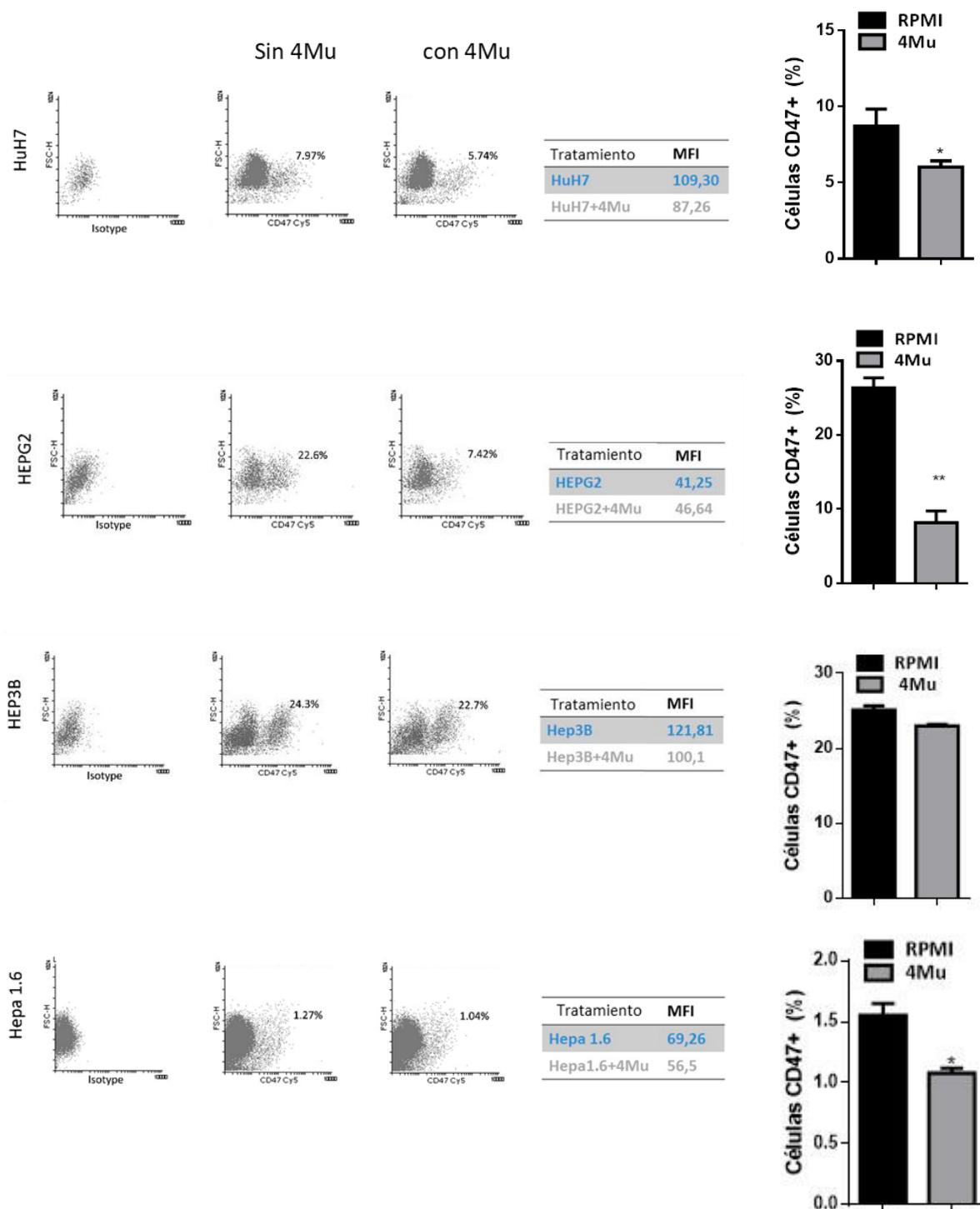


Figura 19: Niveles de expresión de CD47 en líneas celulares de HCC humanas y murinas. Células HuH7, HepG2, HEP3B y Hepa1.6 fueron tratadas durante 72 hs con 4Mu (0.5mM); la expresión de CD47 fue medida por citometría de flujo. Los datos se representaron como porcentajes de CD47⁺ y MFI. HuH7 y HepG2 *p<0.05; HEP3B **p<0.01 y Hepa1.6 *p<0.05 vs. 4Mu, test de Mann-Whitney. Los datos se obtuvieron por triplicado y fueron expresados como la media ± SEM.

5.2. 4Mu reduce la expresión de marcadores de CSCs en líneas celulares de HCC

Se ha informado previamente de una mayor expresión de CD47 en el tejido de pacientes con HCC, en comparación con el hígado adyacente no tumoral, y que se relaciona principalmente con las CSCs¹³⁸. En este sentido, con la habilidad de 4Mu para modular la expresión de CD47, decidimos investigar si 4Mu podría afectar la expresión de otras moléculas implicadas en la identificación y el fenotipo de las CSCs. En este sentido, CD133 es un marcador característico de CSCs para muchos tipos tumorales, incluyendo el HCC²⁵¹. Analizamos la presencia de CD133 por citometría de flujo, en células de HCC *in vitro*. Las células Hepa129 mostraron bajos niveles de CD133 ($1.69 \pm 0.16\%$), pero, el % de células CD133⁺ fue reducido significativamente cuando las células Hepa129 fueron tratadas con 4Mu 0,5mM durante ($0.80 \pm 0.11\%$; * $p < 0.05$, test de Mann-Whitney) (*figura 20A, izquierda*). Además, observamos que las células CD133⁺ eran también CD47⁺ (*figura 20A, derecha*).

Por otro lado, encontramos una reducción de los niveles de ARNm de los marcadores de CSCs como CD133, CD90 y CD13 en las células Hepa129 tratadas *in vitro* con 4Mu (*figura 20B*). Resultados similares se obtuvieron en cuanto a la expresión de ARNm de los marcadores CD133, CD13, CD90 y CD47 evaluados en las otras líneas tumorales ya descritas (*figura 21*).

Adicionalmente, cuando se retiró 4Mu del medio de cultivo, se observó que la expresión de los marcadores CD133, CD90, EPCAM, CD47 y CD44 en Hepa129 fue restablecida luego de las 24, 48 o 72 hs de ausencia del tratamiento. (*figura 22*). Una de las características de las CSCs, es su capacidad de formar colonias. Para evaluar el efecto de 4Mu sobre las capacidades de las células iniciadoras de tumor, realizamos un ensayo de formación de colonias con las células Hepa129. Pudimos observar que aquellas células que fueron tratadas con 4Mu mostraron una menor capacidad de formar colonias tanto a

las 72hs, como a las 96 hs en comparación con las células que no fueron tratadas con 4Mu (*figura 23*).

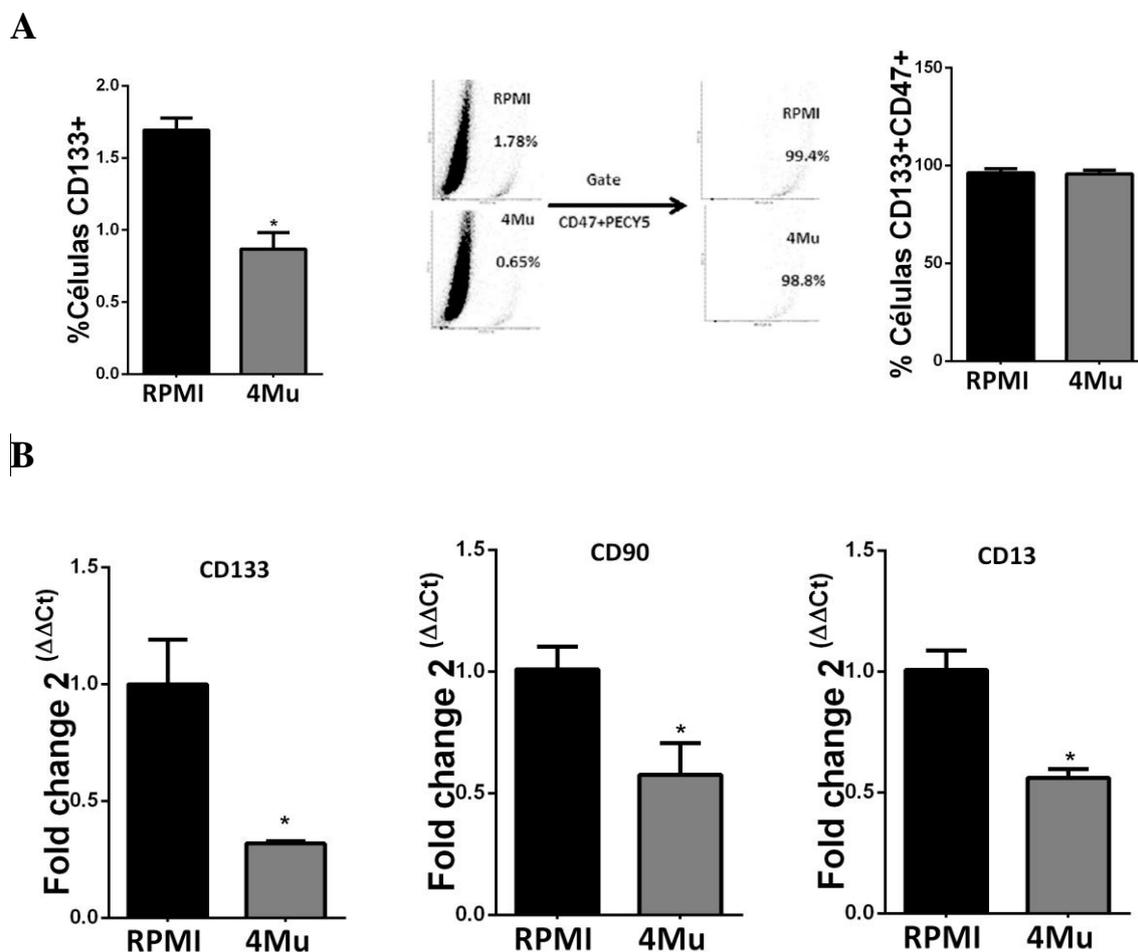


Figura 20: Expresión de marcadores de CSC en la línea celular Hepa129. (A) Análisis por citometría de flujo de células Hepa129 expuestas *in vitro* a 4Mu mostró niveles reducidos del marcador CD133. * $p < 0.05$, Hepa 129 + 4Mu vs. Hepa 129 (RPMI), test de Mann-Whitney. La mayor parte de las células CD133⁺ también eran CD47⁺. (B) Los niveles de ARNm de marcadores de CSCs (CD133, CD90 y CD13) fueron determinados en células Hepa129 pre-tratadas con 4Mu. * $p < 0.05$, Hepa 129+4Mu vs. Hepa 129, test de Mann-Whitney. Los ensayos se realizaron por triplicado y fueron expresados como la media \pm SEM

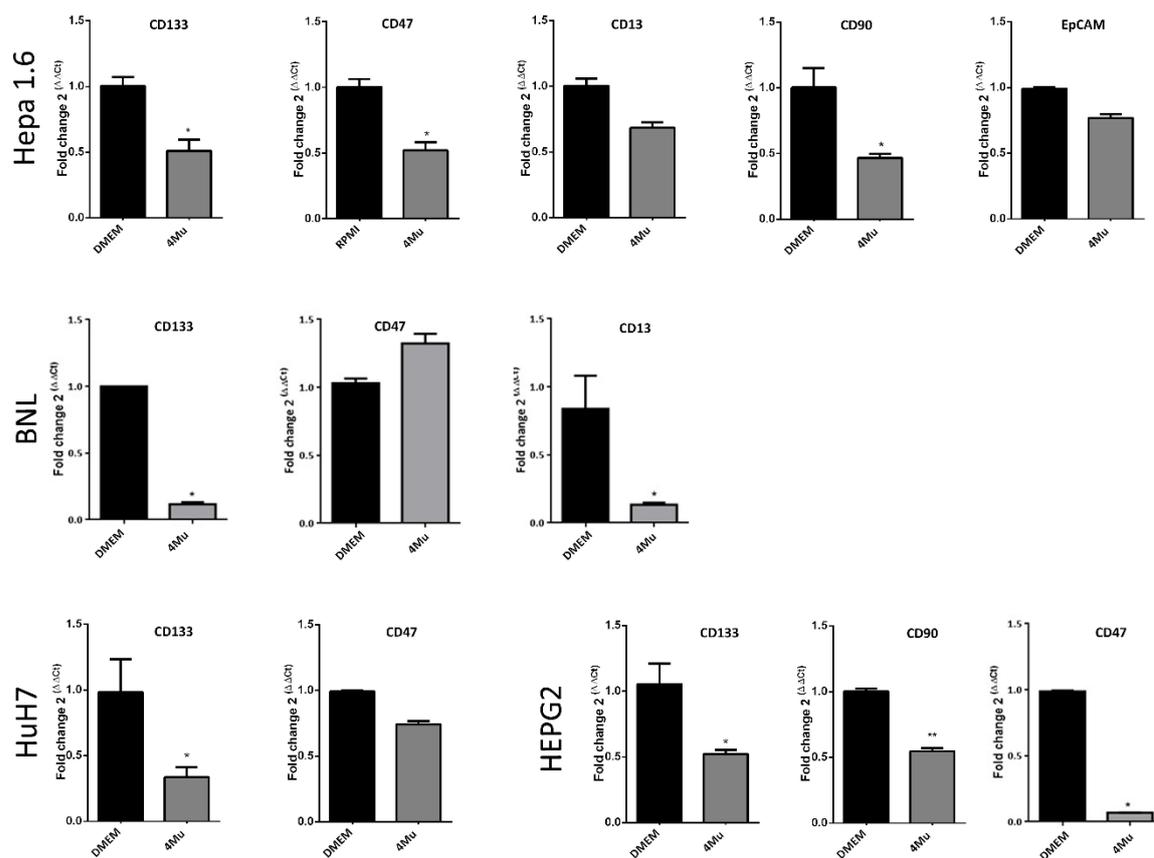


Figura 21: Disminución de los niveles de ARNm de marcadores de CSCs en líneas murinas y humanas de HCC inducidas por el tratamiento con 4Mu. Los perfiles de marcadores de CSCs fueron determinados en líneas murinas de HCC como Hepa1.6 y BNL, así como en líneas humanas HepG2 and HuH7. Se encontraron niveles reducidos de ARNm de CD133, CD13, CD90, EpCAM y CD47 cuando las células fueron expuestas a 4Mu 0.5mM durante 72 hs. Los ensayos fueron obtenidos por triplicado y expresados como la media \pm SEM

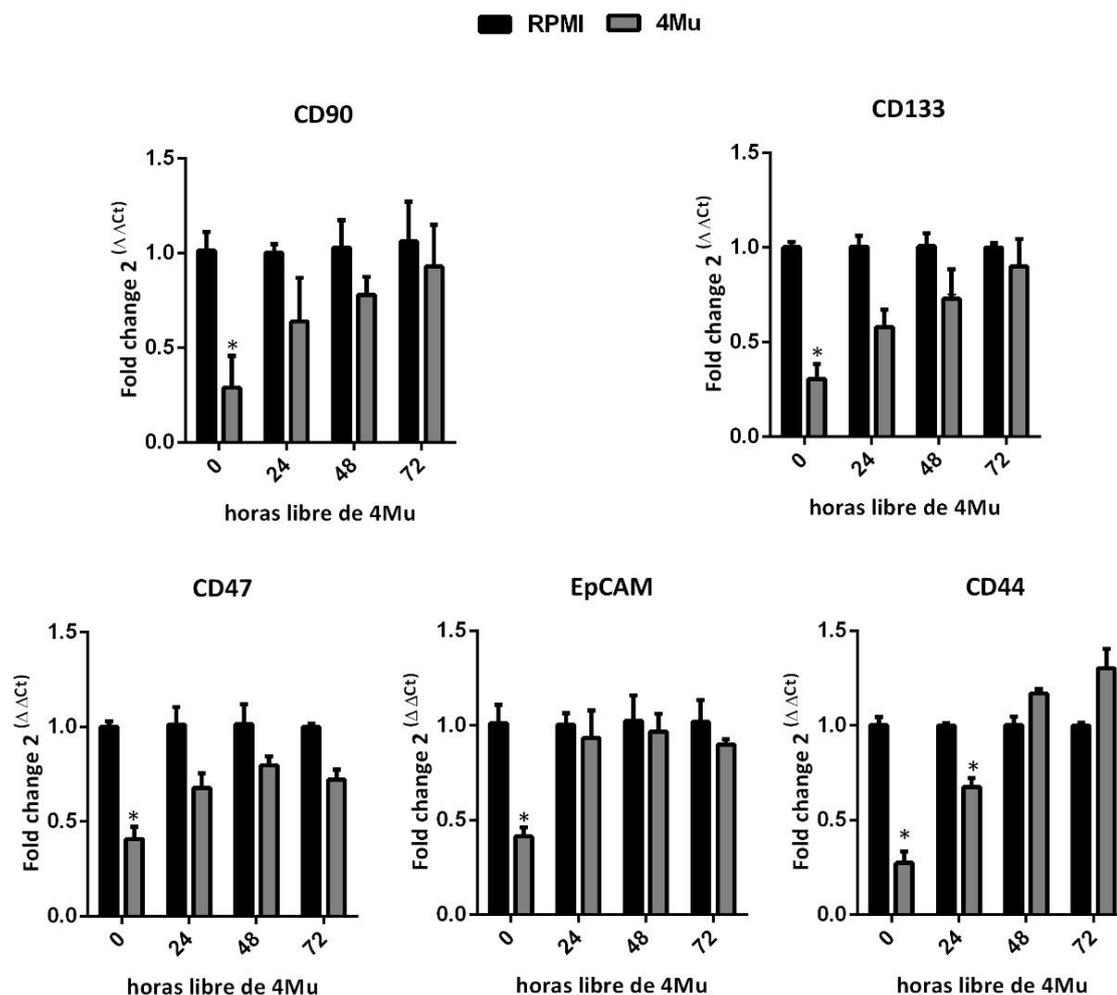


Figura 22. Los niveles de ARNm de marcadores de CSCs en las células Hepa129 recuperaron los valores basales cuando se cultivaron en ausencia de 4Mu. Los perfiles de CSCs fueron determinados en las células Hepa129 tratadas con 4Mu y luego de 24, 48 o 72 hs se reemplazó con medio sin 4Mu. Los niveles de ARNm de CD133, CD44, CD90, EpCAM y CD47 fueron analizados por qPCR CD133: * $p < 0.05$ RPMI vs. 4Mu a tiempos 0 y 24hs; CD44: * $p < 0.05$ RPMI vs. 4Mu a tiempo 0 y 24hs; CD90: * $p < 0.05$ RPMI vs. 4Mu a tiempo 0 hs y; EpCAM $p < 0.05$ RPMI vs. 4Mu a tiempo 0 hs; CD47: $p < 0.05$ RPMI vs. 4Mu a tiempo 0 hs. Los ensayos fueron realizados por quintuplicado y expresados como la media \pm SEM.

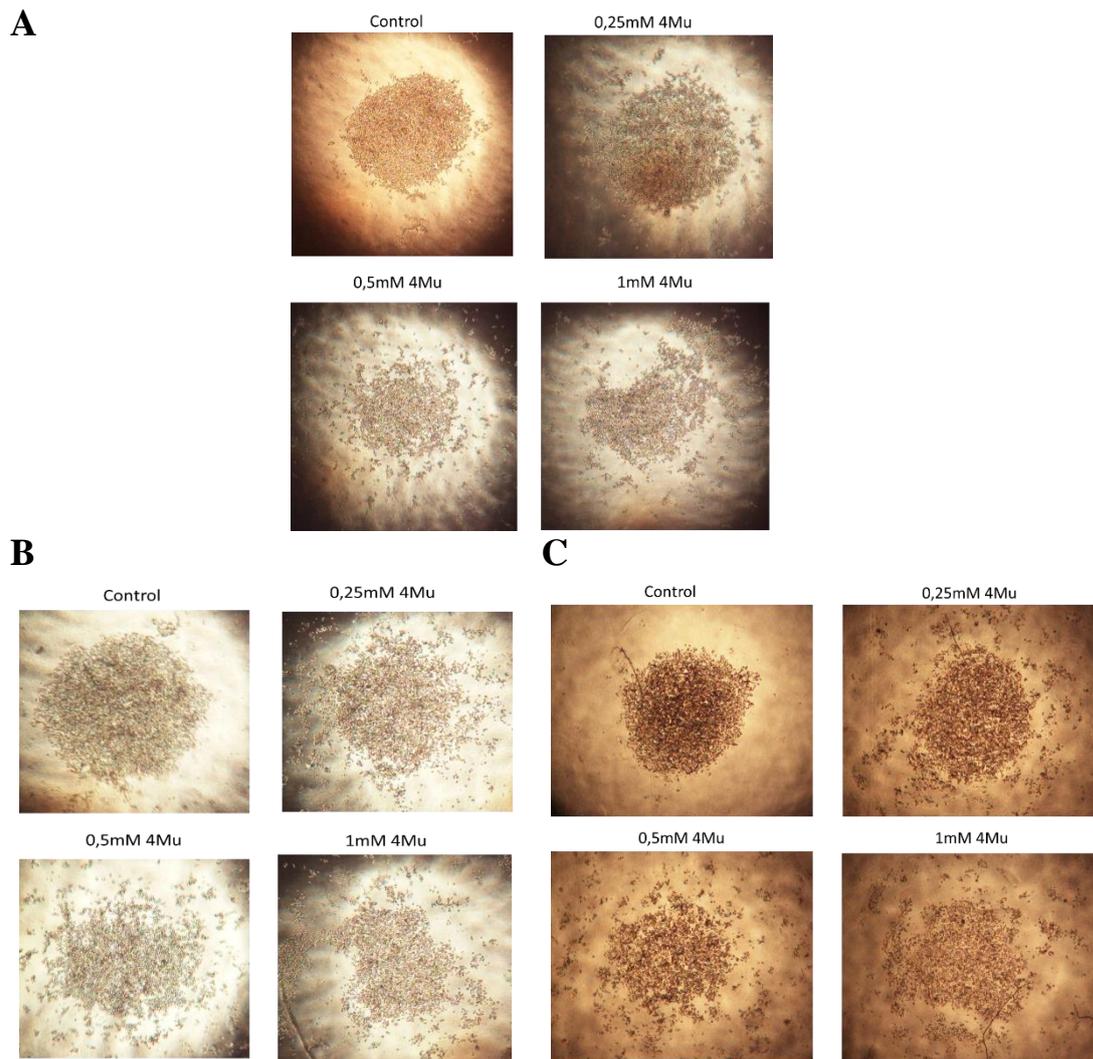


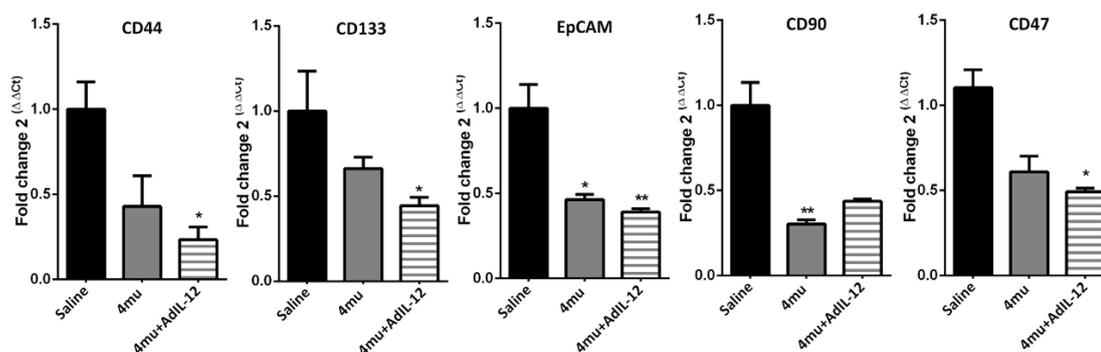
Figura 23. Efecto de 4Mu sobre el crecimiento en colonias de las células Hepa129. Las células fueron tratadas con 4Mu por 72 hs a diferentes concentraciones 0,25; 0,5 y 1 mM y se observaron luego de las 48 hs (A), 72 hs (B) y 96 hs (C) después de la exposición con 4Mu.

5.3. 4Mu reduce la expresión de los marcadores de CSCs en el tejido hepático con HCC asociado a fibrosis

Luego analizamos la expresión de marcadores de CSCs en muestras de tejido hepático con HCC asociado a fibrosis obtenidas de los ratones sin tratar o tratados con AdIL-12, 4Mu y 4Mu + AdIL-12. Los ratones tratados con 4Mu y AdIL-12+4Mu evidenciaron una reducción en los niveles de ARNm de CD133, CD90, CD47 y EpCAM comparado con los ratones control (*figura 24A*). Además, se observó una reducción significativa en

la expresión de CD133 en los tumores de los grupos 4Mu y 4Mu + AdIL-12 analizados por citometría de flujo (* $p < 0.05$ vs. grupo control, test de Kruskal-Wallis test) (*figura 24B*).

A



B

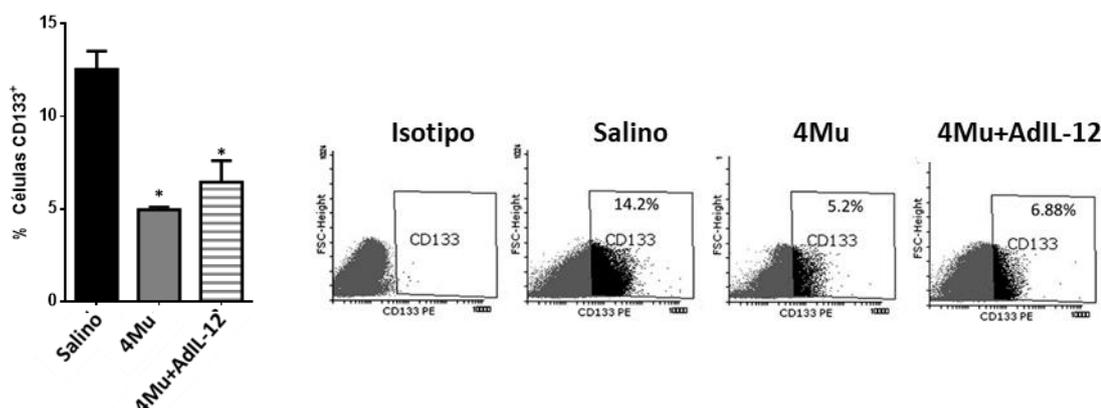


Figura 24. 4Mu reduce la expresión de marcadores de CSCs en HCC in vivo. (A) Niveles de expresión de ARNm de CD133, CD90, EpCAM y CD47 en muestras de HCC asociado a fibrosis de los animales tratados ($n = 5$ por grupo). CD133: * $p < 0,05$, CD47: * $p < 0,05$; CD90: * $p < 0,01$; ratones no tratados vs. tratados con 4Mu o ** $p < 0.001$, ratones no tratados vs. tratados con 4Mu+AdIL-12, test de Kruskal-Wallis. (B) Niveles de expresión de CD133 determinado por citometría de flujo. * $p < 0.05$ salino vs 4Mu; * $p < 0.001$, salinos vs 4Mu+AdIL-12, test de Kruskal-Wallis. Los datos se expresan como la media \pm SEM.

5.4. Los cambios inducidos por 4Mu en las CSCs reducen la agresividad de las células tumorales *in vivo*.

Para estudiar el efecto del 4Mu sobre las CSCs, aislamos las células Hepa129 CD133⁺ por separación magnética (*figura 25A, arriba*). Después de la separación, las células Hepa129 CD133⁻ o CD133⁺ fueron cultivadas en presencia de 4Mu 0,5mM durante 72 hs. Pudimos confirmar que las células CD133⁻ tratadas o no con 4Mu, no re-adquieren

expresión de CD133 en cultivo. Por otro lado, las CD133⁺ mantienen la expresión del marcador *in vitro*. Se observó una disminución en la expresión de CD133 cuando las células fueron tratadas con 4Mu (*figura 25A, abajo*). Además, se analizó la sobrevivencia, el ciclo celular, el tiempo de duplicación y los eventos apoptóticos en las células CD133⁺ y CD133⁻ tratadas con 4Mu. No se encontraron diferencias significativas entre grupos en la viabilidad celular (*figura 26A, izquierda*) o en la apoptosis (*figura 26A, derecha*); sin embargo, 4Mu produjo un leve arresto del ciclo celular en las CD133⁺ (*figura 24B, izquierda*) y aumentó el tiempo de duplicación en comparación con las células CD133⁺ sin tratar (*figura 26B, derecha*).

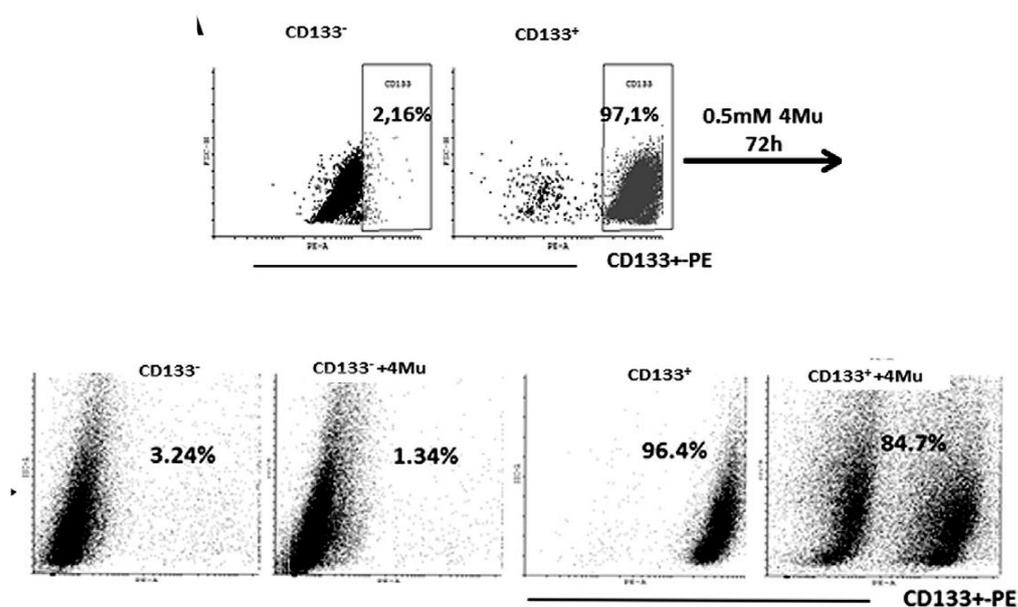


Figura 25. Separación magnética de las células Hepa129 y efecto de 4Mu sobre las CSCs: Células Hepa129 CD133⁺ fueron separadas con anticuerpos anti-CD133 mediante el uso de beads magnéticas (arriba). La expresión de CD133 fue confirmada por citometría de flujo antes y luego de 72 hs de tratamiento con 4Mu (abajo). Resultados obtenidos por triplicado.

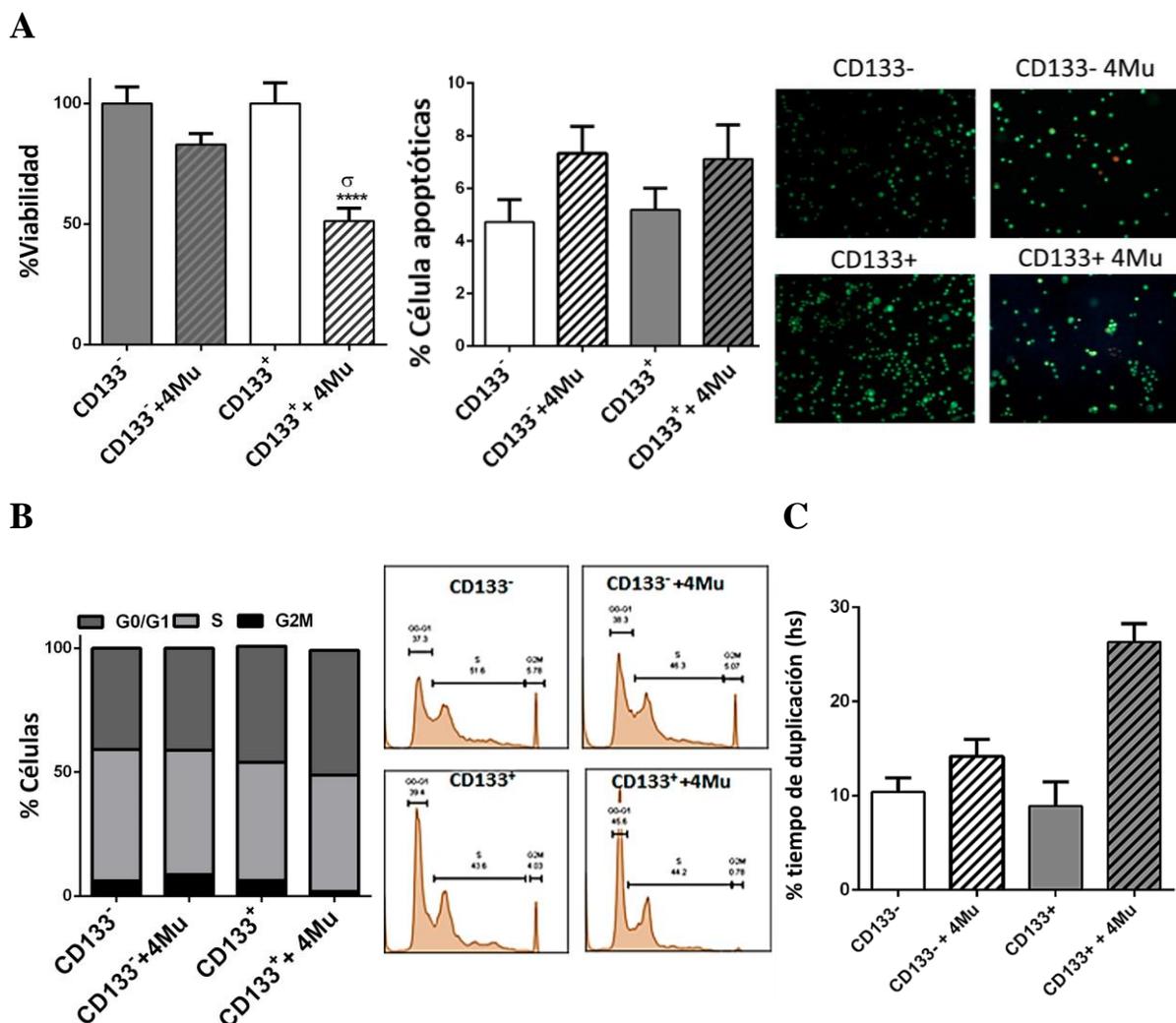


Figura 26. Efectos de 4Mu sobre las células Hepa129 CD133⁺. (A) Viabilidad de células Hepa129 después de 72 hs de cultivo en presencia de 4Mu, 0.5mM determinado por el ensayo de MTT (izquierda). La apoptosis de células Hepa 129 CD133⁺ y CD133⁻ fue evaluada usando naranja de acridina/ bromuro de etidio (derecha). (B) El ciclo celular fue evaluado por citometría de flujo en Hepa129 CD133⁺ y CD133⁻ a 72 hs: 4Mu detuvo en estado G0/G1 a las células Hepa129 CD133⁺, *p<0.05 test de Kruskal-Wallis (izquierda). (C) Las células Hepa129 CD133⁺ + 4Mu mostraron un aumento en el tiempo de duplicación comparado con las células CD133⁺, CD133⁻ y CD133⁻ + 4Mu, ns, test de Kruskal-Wallis. Los ensayos fueron realizados por cuadruplicado y se expresan como la media ± SEM.

5.5. 4Mu aumenta la fagocitosis de las CSCs.

Nuevamente realizamos un ensayo de fagocitosis, donde usamos pMφ marcados con FITC-F4/80 y células Hepa129 CD133⁻, CD133⁻ + 4Mu, CD133⁺ y CD133⁺ + 4Mu. Las células de HCC fueron marcadas con DAPI. En el caso de la condición CD133⁺ + 4Mu, observamos un incremento en el % de células fagocitadas F4/80⁺DAPI⁺ (45.6±3.8 vs.

14.4 ±1.25; *** $p < 0.01$ células Hepa129 CD133⁺ + 4Mu vs. células Hepa 129 CD133⁺; test de Kruskal Wallis) (*figura 27A*). Además, confirmamos que sólo las células Hepa129 CD133⁺ expresan altos niveles de CD47 y, el tratamiento con 4Mu induce una reducción del 50% en la expresión de CD47 en las células F4/80⁺DAPI⁺ (* $p < 0.05$ células Hepa129 CD133⁺ + 4Mu vs. células Hepa129 CD133⁺; test de Kruskal Wallis), lo que permite la fagocitosis de las células tumorales por parte de los Mφ. (*figura 27B*). Estos resultados sugieren que 4Mu tiene un efecto directo sobre las CSCs hepáticas, particularmente sobre las células CD133⁺CD47⁺

5.6. 4Mu modifica el potencial de las CSCs para iniciar y promover el crecimiento y diseminación tumoral

Hemos mostrado en este trabajo de tesis que 4Mu puede modular la expresión de CD47 directamente, contribuyendo a la mayor fagocitosis de las CSCs CD133⁺. Entonces realizamos un experimento donde inoculamos células Hepa129 CD133⁺ tratadas previamente o no con 4Mu tanto en ratones inmunocompetentes como en ratones inmunosuprimidos. Observamos que el desarrollo del tumor fue inhibido en los ratones inmunocompetentes mientras que en los ratones inmunosuprimidos hubo progresión del tumor, demostrando que en ausencia de células efectoras no hay respuesta antitumoral (*figura 28A y B*).

Además, para evaluar si 4Mu podría modificar el potencial de las células CSCs tanto para iniciar como promover la diseminación del HCC, administramos en ratones machos de la cepa C3Hj/He células Hepa129 CD133⁻; CD133⁻ + 4Mu; CD133⁺; CD133⁺ + 4Mu por la vena de la cola. Luego de los 40 días de inoculación de las células Hepa129 la supervivencia de aquellos ratones que recibieron células CD133⁻, CD133⁻ + 4Mu, CD133⁺ y CD133⁺ + 4Mu fue de 75%, 100%, 60% y 100%, respectivamente (*figura 29A*).

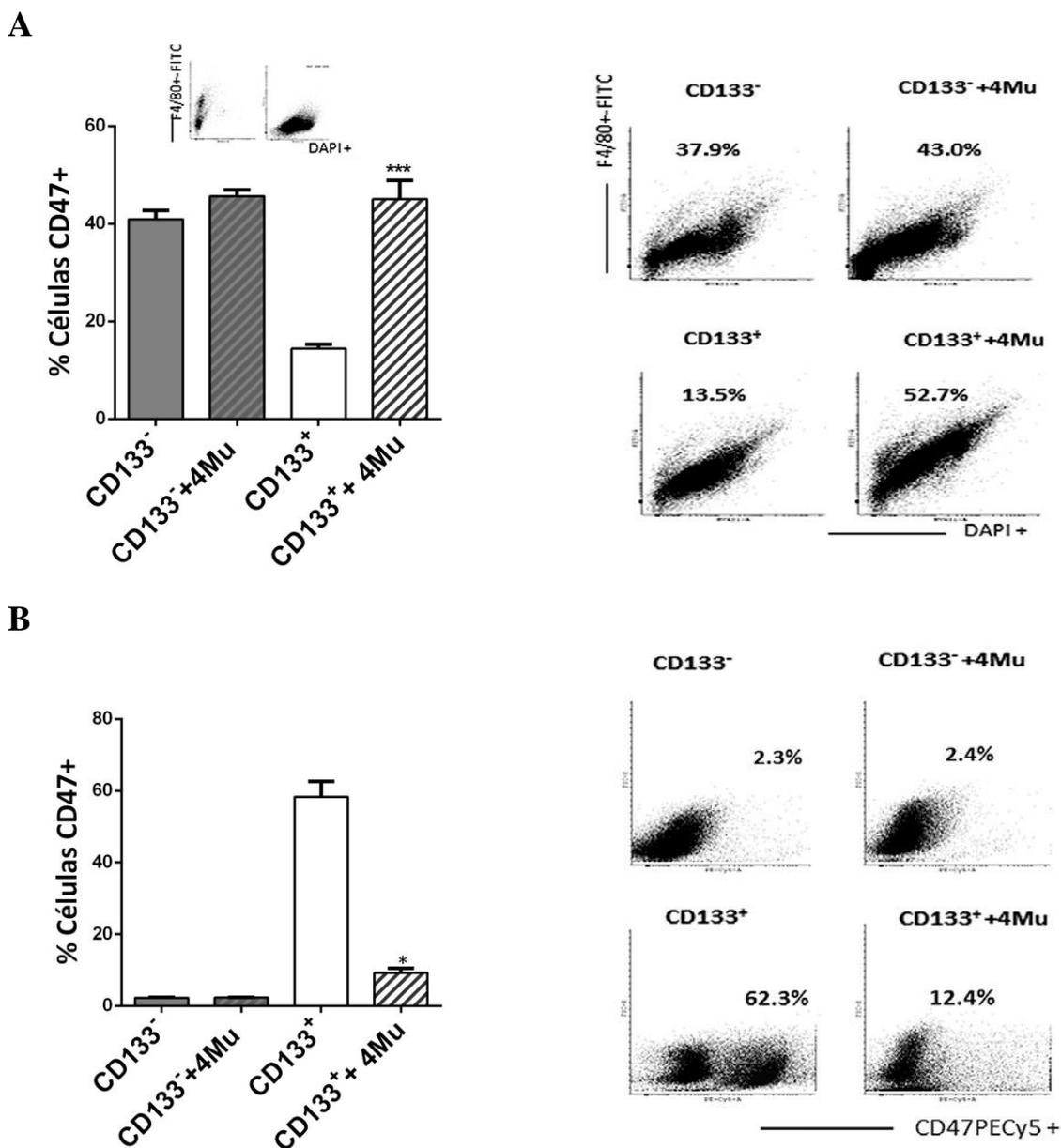


Figure 27. 4Mu favorece la fagocitosis de las células CD133⁺. Porcentaje de células fagocitadas (células F4/80⁺DAPI⁺); ***p<0.001 para Hepa129 CD133⁺ + 4Mu vs Hepa129 CD133⁺, test de Kruskal-Wallis (arriba). Las células Hepa129 CD133⁺ + 4Mu mostraron una disminución significativa en la expresión de CD47 en las células fagocitadas (células F4/80+DAPI) (abajo), *p<0.05 para Hepa129 CD133⁺ + 4Mu vs. Hepa 129 CD133⁺, test de Kruskal-Wallis test. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado y se expresan como la media ± SEM.

Además, la sobrevida fue superior en los ratones que recibieron las células CD133⁺ + 4Mu en comparación con los ratones que recibieron las células CD133⁺ a los 60 y 80 días. (***)p< 0.001 test de Kaplan Meier, log rank). Los exámenes histopatológicos de

los órganos evidenciaron la presencia de metástasis a nivel pulmonar. Como se muestra en la figura 26 (*figura 29B*), los ratones que recibieron las células CD133⁺ mostraron más nódulos metastásicos de HCC pulmonares en comparación a aquellos ratones que recibieron células CD133⁺ + 4Mu o células CD133⁻, indicando que 4Mu disminuye la capacidad de las CSCs CD133⁺ de crecer y diseminarse.

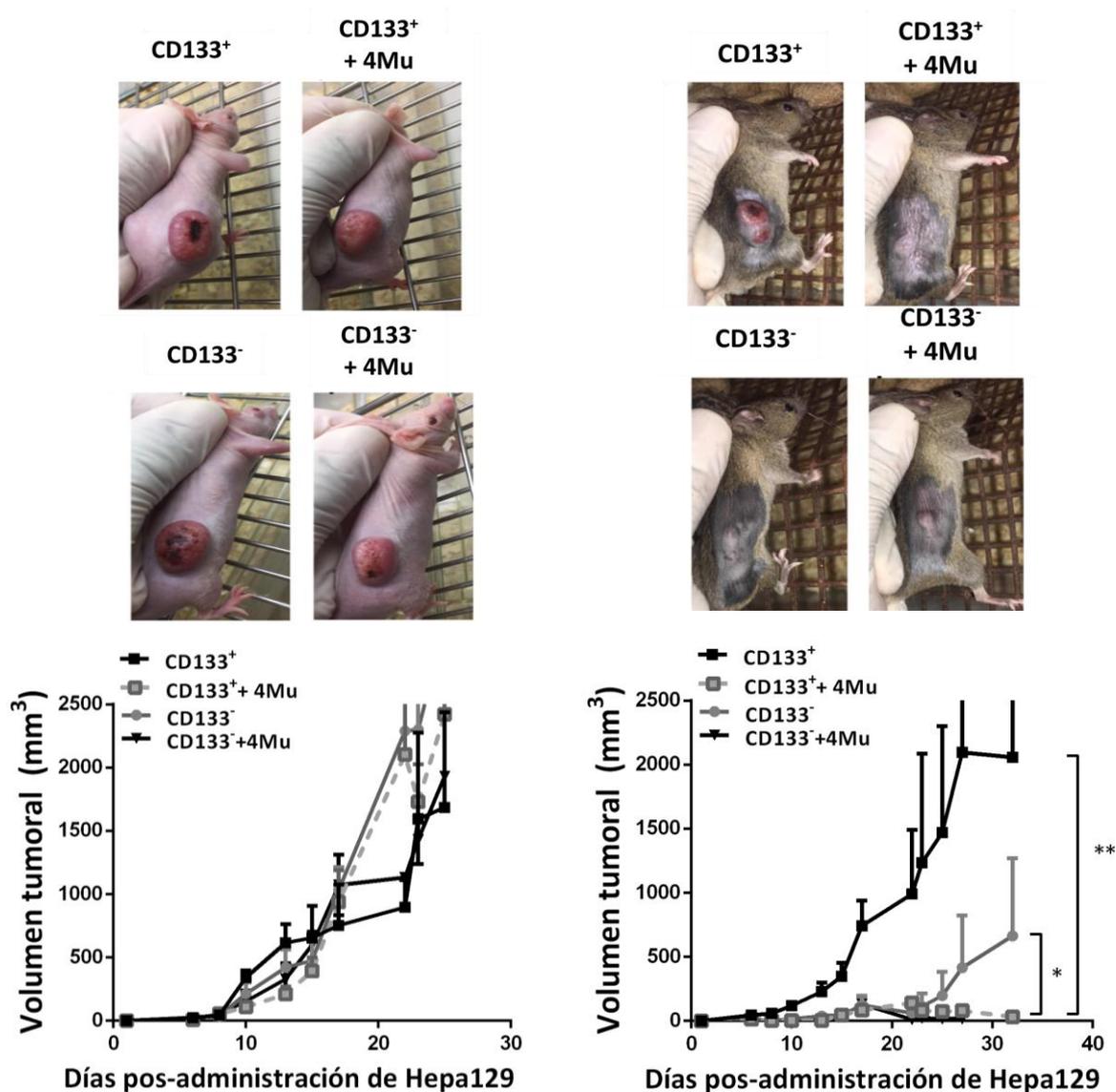
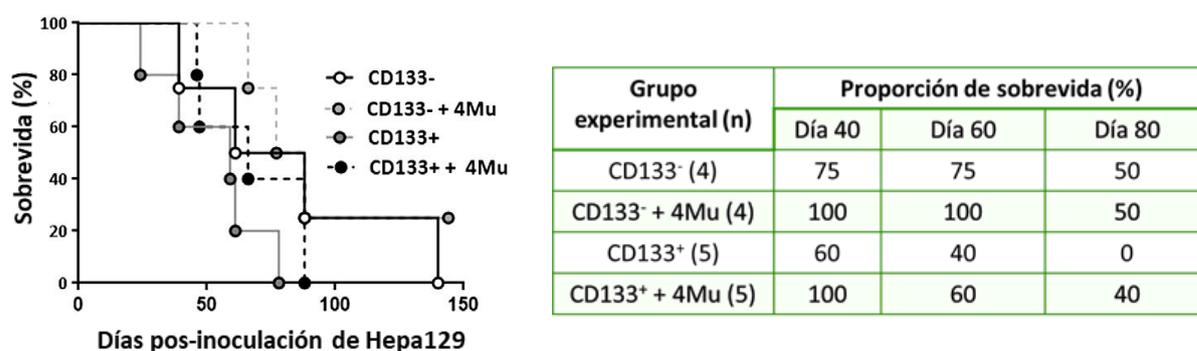


Figura 28: Crecimiento tumoral en ratones inmunosuprimidos e inmunocompetentes. Ratones nude (A) o C3j/He (B) fueron inyectados s.c. con células CD133⁺, CD133⁺ + 4Mu, CD133⁻ y CD133⁻ + 4Mu (1×10^5). Los volúmenes tumorales se midieron 3 veces por semana. ** $p < 0,01$ CD133⁺ vs CD133⁺ + 4Mu y * $p < 0,05$ CD133⁺ + 4Mu vs. CD133⁻ test de comparación múltiple de Tukey. Los datos se obtuvieron de $n = 5$ ratones por grupo y se expresaron como la media \pm SEM.

Corroboramos los datos analizando los perfiles de expresión génica de los tumores tratados con nuestra estrategia terapéutica por un array de qPCR (*figura 30A*). El tratamiento combinado indujo una disminución en la expresión de los marcadores CSCs relacionados con la división asimétrica, la migración celular, autorrenovación, proliferación, pluripotencia, pérdida de característica de célula madre, traducción de señales y genes de blancos terapéuticos (*tabla 6*). Además, los marcadores que presentaron cambios significativos se validaron por qPCR (*figura 30B*).

A



B

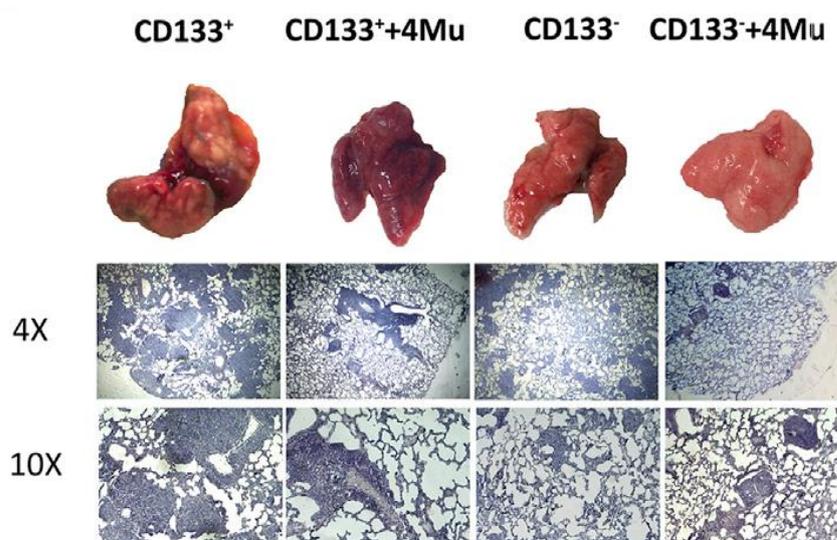


Figura 29. 4Mu disminuye la agresividad de las CSCs. (A) Ratones C3Hj/He (n = 4–5 por grupo) fueron inoculados (i.v.) con (1) 1×10^5 células CD133⁻; (2) 1×10^5 células CD133⁻ + 4Mu; (3) 1×10^5 células CD133⁺; o (4) 1×10^5 células CD133⁺ + 4Mu. Se analizó la supervivencia

de los animales. *** $p < 0.001$, curva de Kaplan-Meier, test log-rank. (B) Cortes histológicos de tejido de ratones que recibieron células $CD133^+$ mostraron más nódulos metastásicos de HCC a nivel pulmonar en comparación a aquellos que recibieron células $CD133^+ + 4\text{Mu}$ o $CD133^-$. Los datos se expresan como la media \pm SEM.

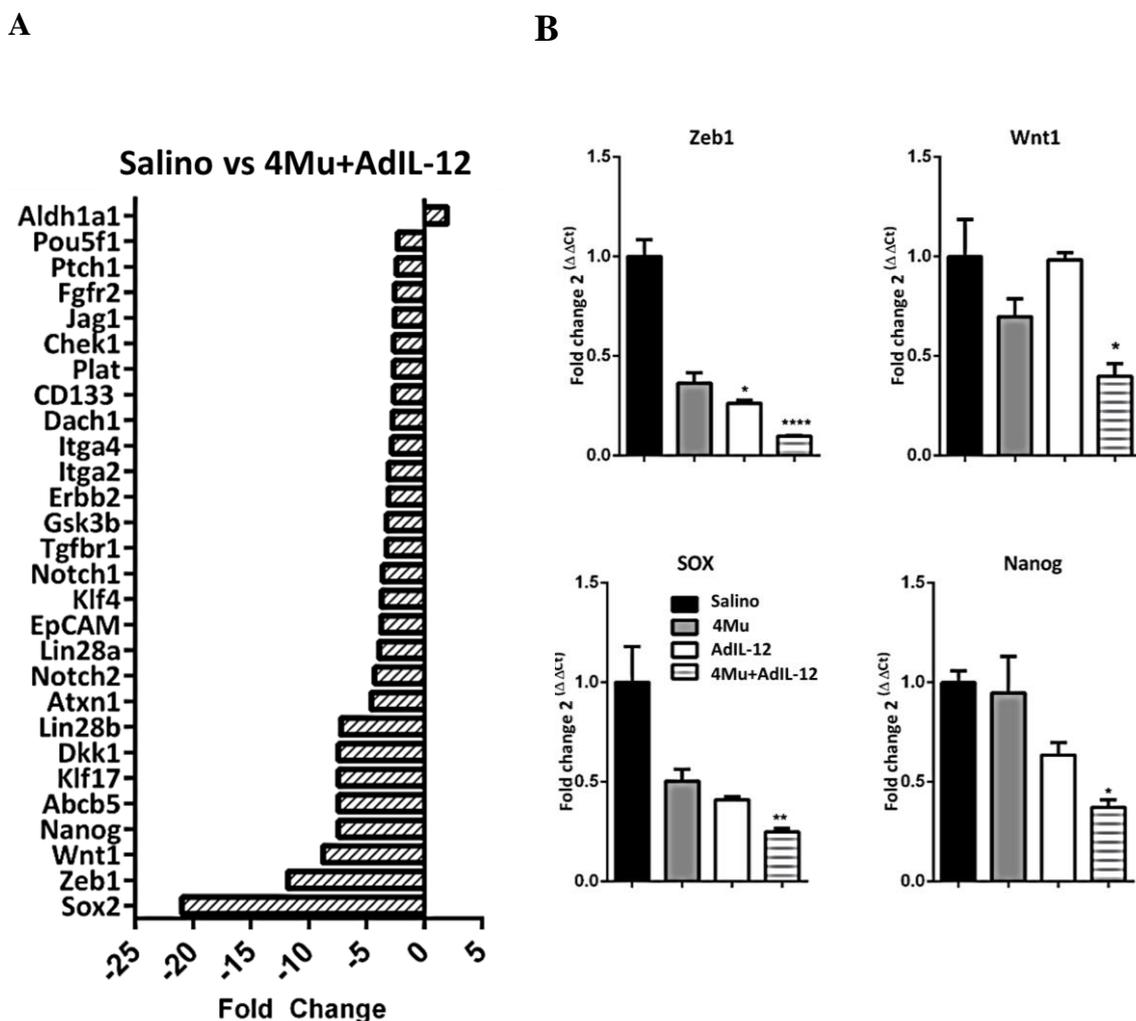


Figura 30. Perfiles de expresión génica de CSCs. (A) Se analizaron los perfiles de expresión génica de las CSCs mediante un array de qPCR de los grupos salino vs. 4Mu+AdIL-12. (B) La qPCR confirmó la disminución de la expresión génica de Nanog, Wnt, Sox, and Zeb1 en las muestras de ratones tratados con 4Mu+AdIL-12 comparados con los ratones controles. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; y **** $p < 0.0001$ vs. salino (test de ANOVA y post test de Tukey). Los datos se obtuvieron de $n = 4$ ratones por grupo y se expresan como la media \pm SEM.

Tabla 6: Expresión de marcadores de CSCs tras el tratamiento basado en AdIL-12 + 4Mu

	Familia de genes								
	Marca- dor CSCs	Prolifera- ción	Autorre- novación	Pluripo- tencia	División asimétri- ca	Migración /metástá- sis	Pérdida stemm	Traduc- ción de señales	Blancos terapéuti- cos
Disminuido	15	3	1	5	3	7	3	12	9
Aumentado	23	0	0	0	0	1	1	2	8

5.7. La terapia *in vivo* con 4Mu induce la polarización de los macrófagos hepáticos hacia un perfil M1.

Ha sido reportado que el aumento de la expresión de CD47 en las células de HCC se correlaciona positivamente con la densidad de los M ϕ hepáticos (hM ϕ)²⁵². Además, la IL-6 que derivada de hM ϕ asociados a tumores, está implicada en el aumento de la expresión de CD47 en células de HCC. Hasta ahora hemos demostrado que 4Mu modula la expresión de CD47 facilitando el reconocimiento y la fagocitosis de las células Hepa129, y esto conduce una potente respuesta inmune antitumoral mediada por AdIL-12 en ratones con HCC avanzado. Para evaluar si 4Mu además tiene la capacidad de modular otros componentes de la TME, analizamos los perfiles de los hM ϕ en nuestro modelo de HCC ortotópico asociado a fibrosis. Los ratones con 4 semanas de fibrosis hepática inducida por TAA, fueron inoculados con $1,25 \times 10^5$ de células Hepa129 (día 0). Al día 5, los animales recibieron solución salina diaria o 4Mu por vía oral (200 mg/kg) (*figura 31A*). Se sacrificaron los animales a los días 9 y 15, se tomaron muestras de la fracción no parenquimatosa del hígado de tres zonas: (tumoraes, peri-tumoraes y no tumoraes) y se analizaron por citometría de flujo los porcentajes de células F4/80⁺CD206⁺ y F4/80⁺CD86⁺. Se evaluaron las 3 regiones, y la proporción M1/M2 se calculó como $\log_2(\text{CD86}^+/\text{CD206}^+)$. Observamos que la terapia con 4Mu induce un perfil polarizado a M1 en secciones tumorales y no tumorales en comparación con los ratones que recibieron solución salina tanto al día 9 como al día

15. Observamos que los ratones tratados con 4Mu presentaban % reducidos de células F4/80⁺CD206⁺ ($44.0 \pm 0.63\%$ vs. $72.0 \pm 4.41\%$ y $60.0 \pm 1.90\%$ vs. $78.2 \pm 1.43\%$; 4Mu vs. solución salina, respectivamente) acompañado por un aumento del porcentaje de células F4/80⁺CD86⁺ en el tejido tumoral ($63,5 \pm 4,63\%$ frente a $32,6 \pm 1,24\%$ y $85,2 \pm 5,22\%$ frente a $71,8 \pm 4,12\%$; 4Mu vs. solución salina, respectivamente) a los días 9 y 15 (*figura 31B*). También encontramos que la proporción de niveles de ARNm de iNOS/Arg1 en los hMφ aislados de las secciones tumorales de ratones tratados con 4Mu fue mayor tanto a día 9 como a día 15 (***) $p < 0,001$ el día 9; *figura 32A y B, izquierda*). Si bien los niveles de citoquinas secretadas por hMφ tumorales en el día 9 no responden claramente a un perfil definitivo, hubo un aumento significativo en los niveles de ARNm de IL1-β y TNF-α con una disminución de TGF-β e IL-10 en el día 15. Por lo cual, los resultados sugieren que 4Mu induce un perfil M1 en los hMφ.

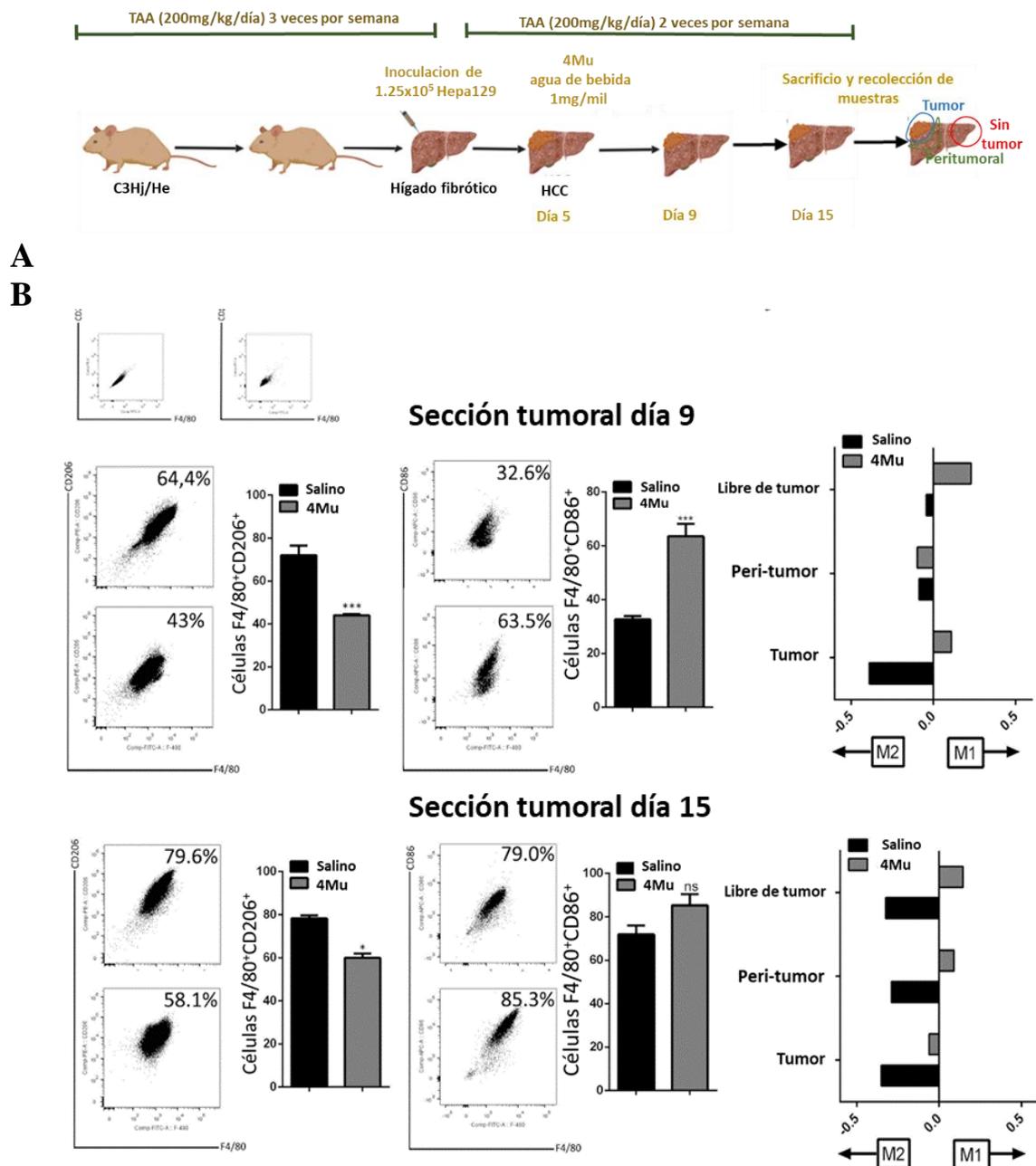


Figura 31: Perfil de macrófagos hepáticos inducido por el tratamiento con 4Mu en ratones con HCC asociado a fibrosis. (A) Se indujo fibrosis con TAA (200 mg/kg) a ratones machos de la cepa C3Hj/He durante 4 semanas, 3 veces por semana. Los ratones recibieron una inoculación intra-hepática de 1.25×10^5 células Hepa129 (al día 0). El día 5 después de la implantación del tumor, los ratones recibieron 4Mu, (200 mg/kg) en el agua de bebida. Los ratones se sacrificaron a los días 9 y 15, y se recogieron muestras de las diferentes regiones. (B) Las muestras de tumor hepático se perfundieron previamente con colagenasa y se dividieron en 3 secciones (sin tumor, peritumoral y tumoral). Las células no parenquimatosas se seleccionaron con un gradiente de histodenzTM y se marcaron con anticuerpos anti-F4/80-FICT, anti-CD86-APC y anti-CD206. Los datos se obtuvieron de n = 4 ratones por grupo y se expresan como la media \pm SEM.

5.8. Efecto de 4Mu sobre el perfil de los macrófagos

Se ha reportado que en un TME supresor, el factor 1 derivado de células del estroma (SDF-1) secretado por sHSCs y VEGF secretado por las células tumorales y las LSECs, puede inducir el reclutamiento de TAM y la polarización de estos hacia un perfil alternativo o M2²⁵³. En nuestro laboratorio se ha demostrado que 4Mu fue capaz de disminuir la activación de las HSCs reduciendo la fibrosis hepática y remodelando del TME disminuyendo la expresión de VEGF, SDF-1 e IL-6²⁵⁴. Para dilucidar si el perfil de los hMφ observado en ratones tratados podría deberse a la modulación ejercida por 4Mu en el tejido hepático o al efecto directo de la molécula en la población de hMφ, aislamos los pMφ de ratones sanos y cultivamos *in vitro* con 4Mu (0,5 Mm). Después de 72 hs, medimos por citometría de flujo la fracción de células F4/80⁺CD86⁺ y F4/80⁺CD206⁺ y, además, analizamos los niveles de ARNm de las citoquinas de perfiles de Mφ M1 y M2 mediante qPCR.

Observamos que 4Mu disminuyó el porcentaje de células F4/80⁺CD206⁺ (*p<0.05; prueba de Mann-Whitney) en comparación con RPMI e indujo un ligero aumento en el nivel de la población de células F4/80⁺CD86⁺ (**figura 33A**). Además, los niveles de ARNm de aquellos pMφ tratado *in vitro* con 4Mu mostraron un aumento de 5 veces en la proporción iNOS/Arg1 (*p <0.05, 4Mu vs. RPMI; prueba de Mann-Whitney) (**figura 32B, izquierda**). Asimismo, los niveles de ARNm de las citoquinas pro-inflamatorias como IL-1β y TNF-α aumentaron significativamente (****p<0.001 y ***p<0.005 4Mu vs. RPMI, respectivamente) mientras que los niveles de ARNm de IL-10 se redujeron (*p<0.05) (**figura 33B**). Estos resultados sugieren que existe un efecto directo de 4Mu en el perfil de los Mφ.

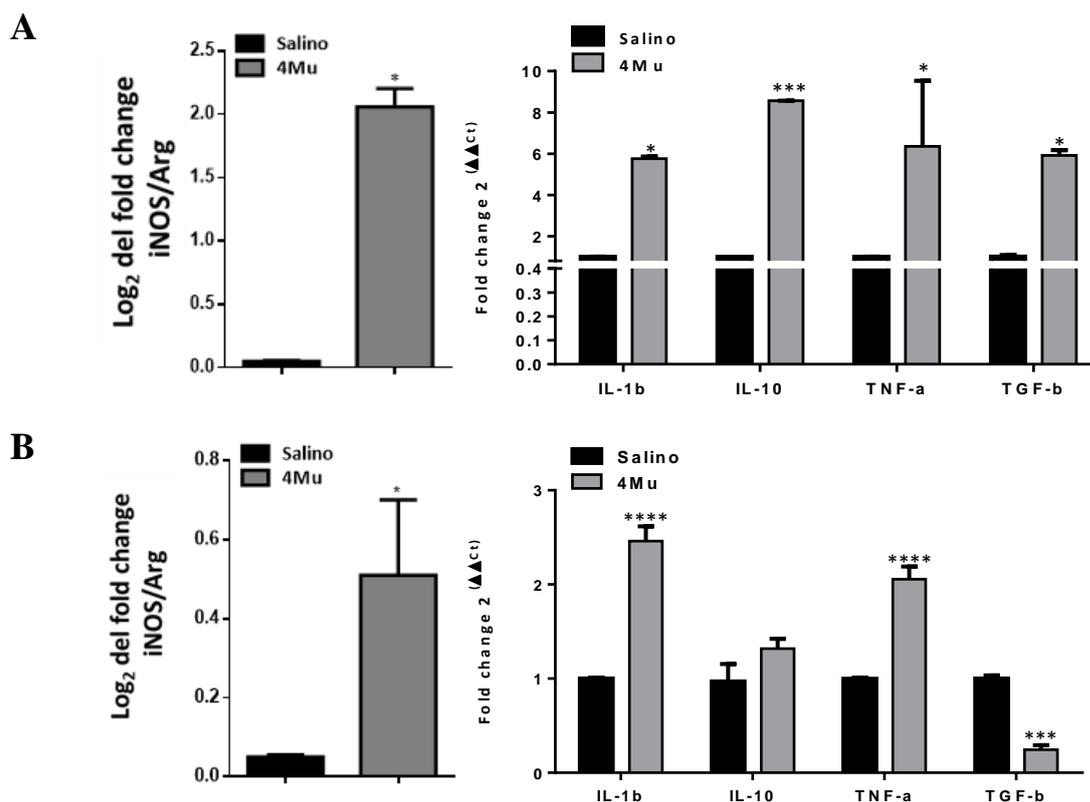
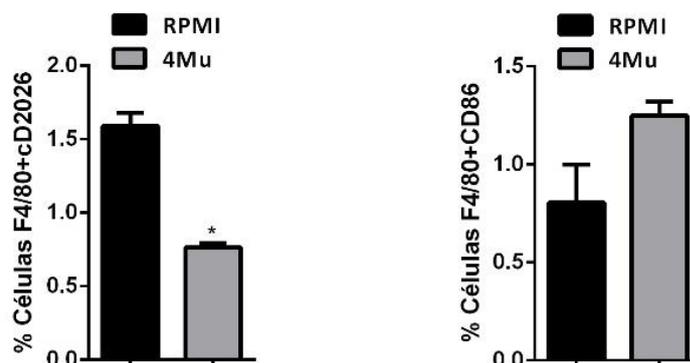


Figura 32: Niveles de expresión génica de citoquinas en macrófagos tratados con 4Mu in vivo. Análisis de expresión de ARNm mediante qPCR a día 9 (A) y día 15 (B) de iNOS, Arg (la cual se calculó como la relación de la expresión de iNOS/Arg), IL-1 β , IL-10, TNF- α , TGF- β . * $p < 0,05$ iNos y Arg1 salino vs 4Mu, test de Mann-Whitney. * $p < 0,05$ Salino vs. 4Mu de TGF- β , IL-1 β e TNF- α día 9; *** $p < 0.005$ Salino vs 4Mu de IL-10 día 9, *** $p < 0.005$ Salino vs 4Mu de TGF- β día 15; **** $p < 0,001$ Salino vs. 4Mu de IL-1 β e TNF- α día 15, test ANOVA de dos factores. Los datos se obtuvieron de $n = 4$ ratones por grupo y se expresan como la media \pm SEM.

En este sentido, quisimos evaluar si el efecto de 4Mu en la polarización de hM ϕ se correlacionaba con el perfil de los pM ϕ , en nuestro modelo experimental de HCC asociado a fibrosis. Se aislaron los pM ϕ realizando lavados peritoneales, en dos etapas (a días 9 y 15 de haber inoculado el tumor) en los ratones con HCC asociado a fibrosis, tratados o no con 4Mu. Observamos que el tratamiento con 4Mu indujo un aumento en la relación M1/M2 en los pM ϕ tanto a día 9 como a día 15 después de la terapia con 4Mu.

A



B

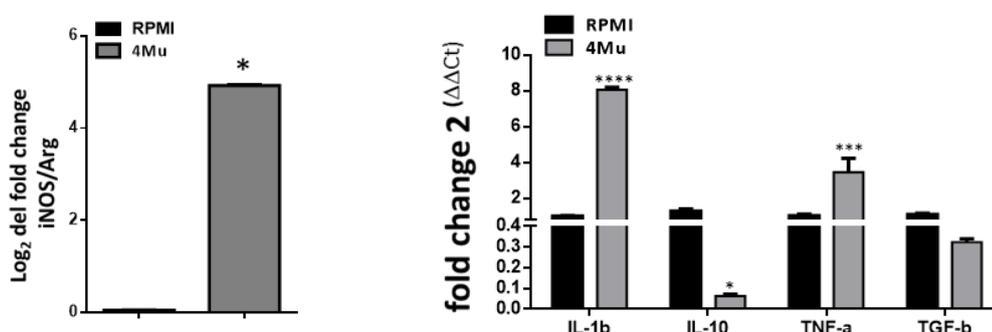


Figura 33: Efecto de 4Mu sobre los macrófagos peritoneales in vitro: (A) Mφ peritoneales (pMφ) se cultivaron con 4Mu, 0,5 mM durante 72 hs, y luego los fenotipos de Mφ se analizaron por citometría de flujo. * $p < 0,05$ RPMI vs. 4Mu, test de Mann-Whitney. (B) Se realizó el perfil de expresión génica de pMφ pre-tratados con 4Mu. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ RPMI vs. 4Mu; Prueba de Mann-Whitney. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado y se expresaron como la media \pm SEM.

El análisis por citometría de flujo muestra el porcentaje representativo de células F4/80⁺CD206⁺ y F4/80⁺CD86⁺ (*figura 34A*). El volumen tumoral fue registrado para ambos grupos al final del experimento para corroborar el comportamiento del modelo experimental (*figura 34B*). El análisis del infiltrado inflamatorio mononuclear de los tumores mostró un significativo aumento de células CD3⁺CD8⁺ ($35.6 \pm 7.01\%$ vs. $6.25 \pm 1.34\%$) aunque no de células T CD3⁺CD4⁺ ($5.64 \pm 0.48\%$ vs. $3.71 \pm 1.43\%$) en secciones de tejido tumoral de ratones tratados en comparación con ratones no tratados,

respectivamente (**p <0.001 células T CD3⁺CD8⁺, 4Mu vs. solución salina; prueba de Mann-Whitney) (*figura 34C*).

5.9. Efecto de la polarización de macrófagos hacia un perfil de tipo M1 inducida por 4Mu.

Nuestro siguiente objetivo fue evaluar si el fenotipo M1 de M ϕ inducido por 4Mu tiene efectos sobre la capacidad de las células HCC para establecerse y crecer. Se establecieron tumores s.c en los ratones C3H/He inoculando células Hepa129 cultivadas en RPMI (Hepa/RPMI) o en presencia de MC derivado de pM ϕ tratados o no con 4Mu (Hepa/MC/4Mu y Hepa/MC, respectivamente). Observamos que hubo progresión tumoral en los ratones que fueron inoculados con Hepa/RPMI o Hepa/MC. Sin embargo, el crecimiento tumoral fue significativamente menor en los ratones que recibieron Hepa/MC/4Mu (*figura 35A*). Posteriormente, quisimos estudiar si esta menor agresividad de las células Hepa129 podría estar modulada por factores solubles presentes en el MC de los pM ϕ tratados con 4Mu. Observamos que después de 24 y 48 el grupo Hepa/MC/4MU presentó una reducción significativa a nivel proteico de los marcadores células madre como TLR4 y CD47, y del factor de totipotencialidad Sox2 (*p<0.05; prueba de Mann-Whitney) (*figura 35B*).

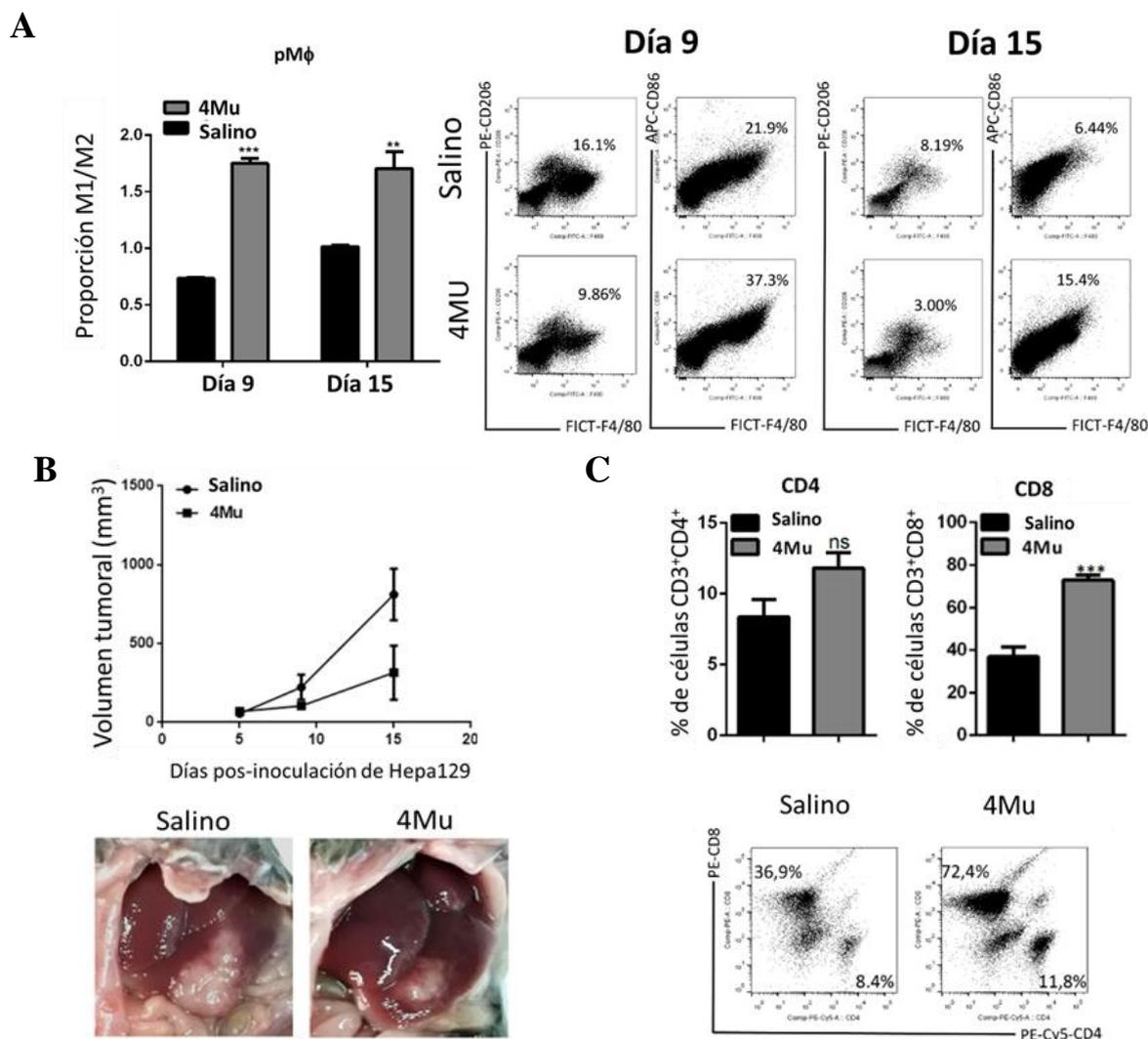


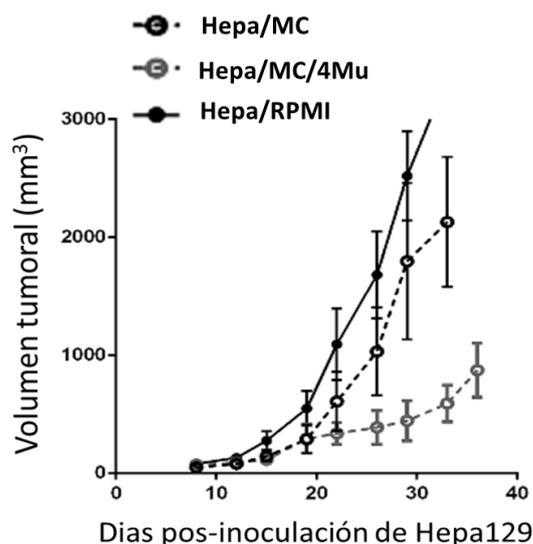
Figura 34: Efectos del 4Mu en el crecimiento tumoral, en el perfil de pM ϕ y en la composición del infiltrado inflamatorio en un modelo murino de HCC. (A) Se obtuvieron M ϕ del peritoneo (pM ϕ) de ratones no tratados o tratados con 4Mu a los días 9 y 15 del modelo experimental. Los pM ϕ se analizaron por citometría de flujo. Las proporciones M1/M2 se calcularon aplicando $\log_2(\text{CD86}^+/\text{CD206}^+)$. * $p < 0,05$, RPMI vs. 4Mu, test de Mann-Whitney **** $p < 0,001$ y *** $p < 0,005$ RPMI vs 4Mu, respectivamente, test de ANOVA de dos factores. (B) Se midió el volumen del tumoral en los animales tratados o no con 4Mu. (C) La presencia de linfocitos en el tejido tumoral se evaluó con anticuerpos anti-CD3-FICT, anti-CD4-PE-Cy5 y anti-CD8-PE, y se midió mediante citometría de flujo. ns, no significativo; * $p < 0,05$, Salino vs RPMI, test de Mann-Whitney. Los datos se obtuvieron de $n = 3$ ratones por grupo y se expresaron como la media \pm SEM.

Como describimos anteriormente, el HCC, y en particular nuestra línea de células Hepa129, está constituida por subpoblaciones de células tumorales con diferentes

habilidades tumorigénicas¹⁰⁸. Posteriormente, volvimos a aislar magnéticamente las células Hepa129 CD133⁺ y CD133⁻, para comparar si el MC tenía un efecto diferencial sobre las CSCs. Y observamos que a las 24 hs de exposición, el grupo Hepa/CD133⁺/MC/4Mu no tuvo cambios en la expresión de TLR4, CD47 o Sox2 (*figura 36, arriba*). mientras que, a las 48 hs de incubación, en el grupo Hepa/CD133⁺/MC/4Mu se notó una reducción significativa de los niveles de expresión proteica de TLR4, CD47 y Sox2 en comparación con su contraparte, el grupo Hepa/CD133⁺/MC (*figura 36, abajo*). Además, observamos que los MC/Mφ/4Mu, mostraban reducción de los niveles de IL-6 en comparación con los MC/Mφ (**p<0.01, test T de Student) (*figura 37*).

En vista de este efecto de MC/Mφ/4Mu sobre la expresión de CD47 y teniendo en cuenta que este marcador en las células tumorales podría promover la progresión tumoral evadiendo la respuesta del sistema inmune, administramos de manera s.c. células Hepa129 (1x10⁶ células) tratadas con MC/Mφ o MC/Mφ/4Mu en ratones atímicos (Nu/Nu). Este experimento mostró que la progresión tumoral en los ratones inoculados con Hepa/MC y Hepa/MC/4Mu fue similar al grupo control, sugiriendo que los cambios en la expresión de los niveles de CD47 inducidos por MC/Mφ/4Mu puedan estar asociados al desarrollo de una respuesta antitumoral, y que ésta, está mediada por las células inmunitarias. Por eso, en los ratones inmunosuprimidos no se observa efecto antitumoral a pesar de haber disminuido la potencialidad de las CSCs por la exposición de las células al MC/Mφ/4Mu (*figura 38*).

A



B

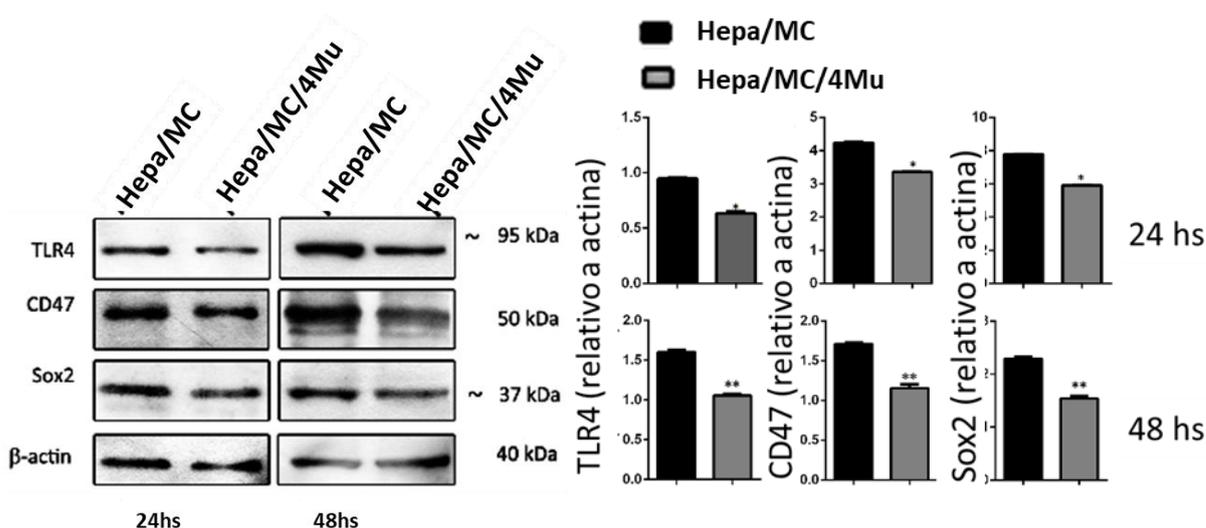


Figura 35: Efecto de la polarización M1 inducida por 4Mu sobre la hepatocarcinogénesis.

(A) las células Hepa129 fueron tratadas 48 hs con RPMI (Hepa/RPMI), con MC/M ϕ (Hepa/MC) o con MC/M ϕ /4Mu (Hepa/MC/4Mu). Se inocularon 1×10^6 células Hepa129 s.c. en ratones C3H y se midió el volumen tumoral tres veces por semana. (B) Células Hepa129 fueron incubadas durante 24 y 48 hs con MC de pM ϕ tratados y sin tratar con 4Mu (Hepa/MC/4Mu y Hepa/MC respectivamente) y se midieron los niveles de expresión de TLR4, CD47 y Sox2 mediante western blot; * $p < 0.05$, 24 h o ** $p < 0.01$, 48 h; prueba de Mann-Whitney. Los ensayos se realizaron por triplicado y se expresaron como la media \pm SEM.

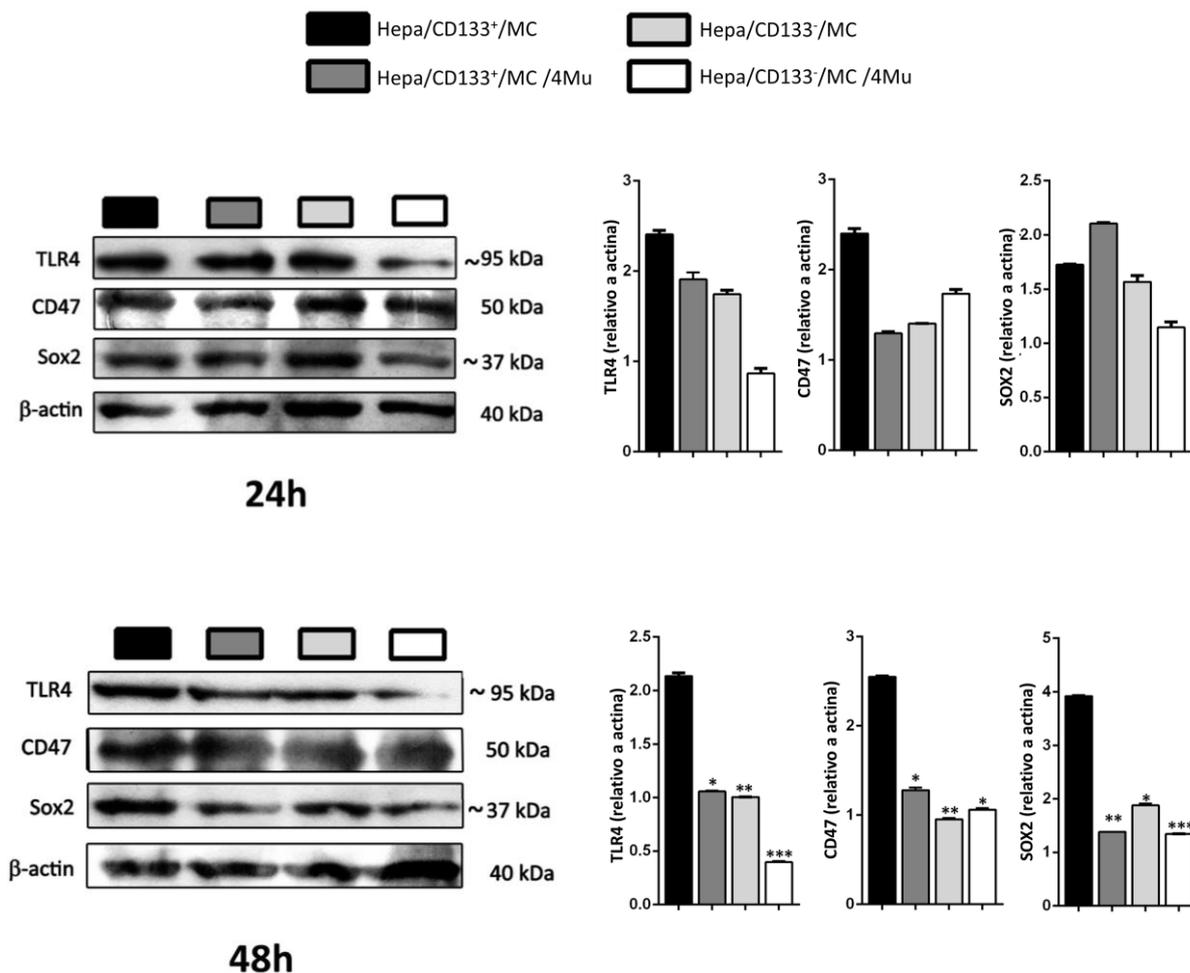


Figura 36: Efecto de la polarización M1 inducida por 4Mu sobre las CSCs. La expresión de TLR4, CD47 y Sox2 se determinó mediante western blot en células Hepa129 CD133⁺ y CD133⁻ y cultivadas con MC derivado de pMφ o MC derivado de pMφ tratado con 4Mu; *p<0,05 **p<0.01, ***p<0,005 todos los grupos vs. hepa/CD133⁺/MC; prueba de Kruskal-Wallis de 48 hs. Los ensayos se realizaron por triplicado y se expresaron como la media ± SEM

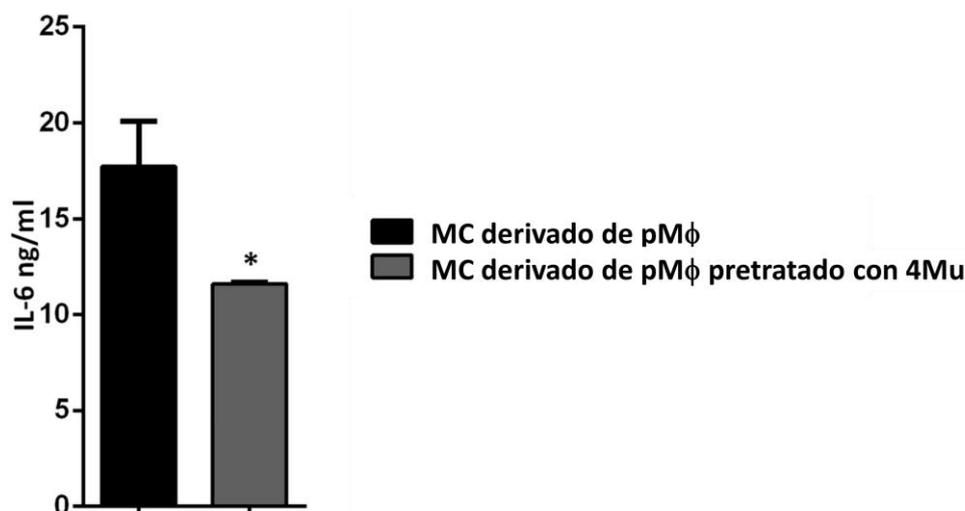


Figura 36: Reducción de los niveles de IL-6 en los medios condicionados de pMφ tratados o no con 4Mu *in vitro* medidos por ELISA, **p < 0.05 Test T de Student; Los ensayos se realizaron por triplicado y se expresaron como la media ± SEM.

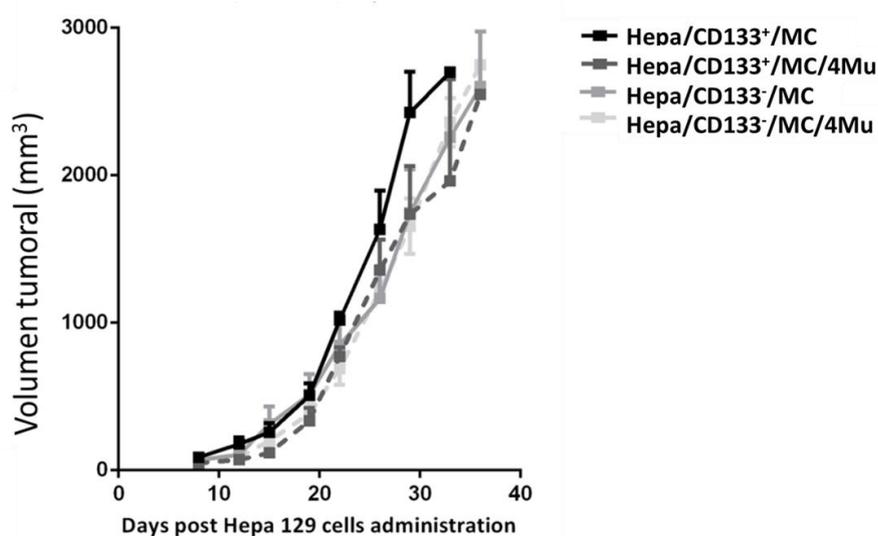
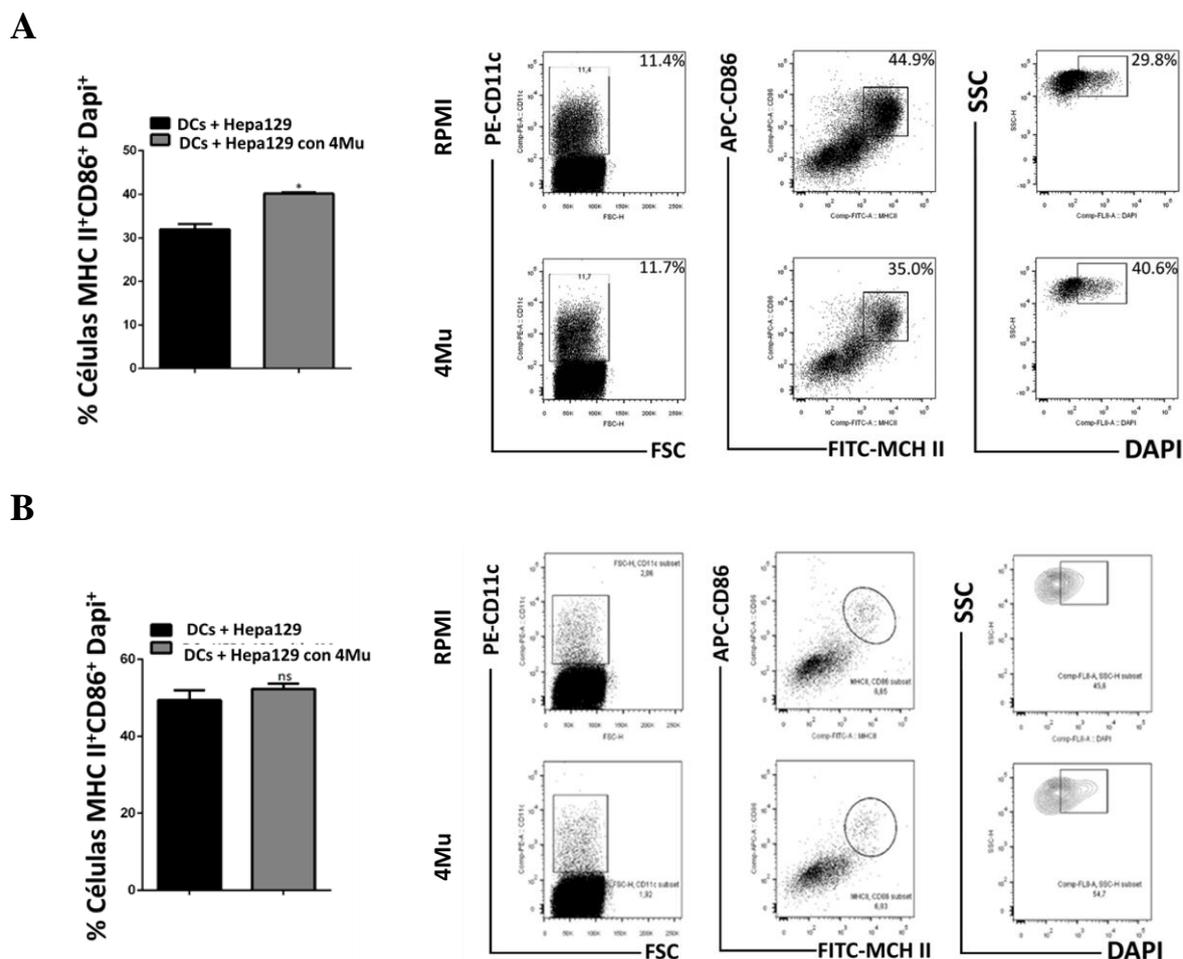


Figura 37. Crecimiento tumoral en ratones inmunosuprimidos inoculados con células Hepa129 CD133 incubadas con CM de macrófagos pre-tratados con 4Mu. A) Se inyectaron 1×10^6 de células Hepa129 CD133⁺ y CD133⁻ que se incubaron previamente durante 48 hs con MC de pMφ (Hepa/CD133⁺/MC/ y CD133⁻/MC) y MC de pMφ tratados con 4Mu (CD133⁺/MC/4Mu y CD133⁻/MC/4Mu). Las células fueron inyectadas s.c. en ratones Nu/Nu, y se midió el volumen del tumor 3 veces por semana. Se emplearon 4 animales por grupo y los datos se expresaron como la media ± SEM.

5.10. 4Mu promueve la fagocitosis de las células tumorales por parte de las células dendríticas.

Hasta aquí hemos analizado el papel que ejerce 4Mu sobre las células tumorales, reduciendo la expresión de algunos marcadores de CSCs y visibilizando las células para un mejor reconocimiento y captación por los M ϕ . Además, hemos demostrado que 4Mu tiene un efecto sobre la activación de los M ϕ modulándolos hacia un perfil de activación clásico o M1. También quisimos evaluar si 4Mu podría tener alguna implicancia en otra población de células presentadoras de antígeno como las DCs²⁵⁰. En este sentido, realizamos un ensayo de fagocitosis *in vitro* usando DCs derivadas de médula ósea de ratones C3Hj/He sanos. Co-cultivamos las DCs con células Hepa129 tratadas o no con 4Mu y teñidas con DAPI, por 2 hs y 24 hs. Se consideraron células fagocitadas como las células MHCII⁺ CD11c⁺ CD86⁺ DAPI⁺. Pudimos observar un incremento de las células MHCII⁺ CD11c⁺ CD86⁺ DAPI⁺ por citometría de flujo a las 2 hs de co-cultivo con las DCs y las células Hepa129 pre-tratadas con 4Mu en comparación con las células Hepa129 sin tratar con 4Mu (*p<0.05, DCs/Hepa/4Mu vs DCs/Hepa, test de Mann-Whitney) (*figura 39A*). Sin embargo, a las 24 hs de co-incubación, la fagocitosis fue similar en ambos grupos (*figura 39B*). Estos resultados sugieren que la habilidad de reconocer las células tumorales por las DCs esta incrementada por 4Mu.



5.11. La vacunación terapéutica empleando células dendríticas pulsadas con extracto tumoral tratado con 4Mu retrasa el crecimiento del HCC.

Posteriormente estudiamos el efecto de la terapia con DCs pulsadas con lisado tumoral proveniente de tumores subcutáneos de ratones tratados con 4Mu (DCs+Hepa129+4Mu) o de ratones controles (DCs+Hepa129). Para llevar a cabo este objetivo, inyectamos las DCs pulsadas en la región peritumoral en proximidad con el ganglio linfático regional en ratones con tumores s.c. En la *figura 36A* se observa que el tratamiento con DCs+Hepa129+4Mu indujo un potente efecto antitumoral en comparación con los ratones que recibieron DCs+Hepa129. Además, la terapia con DCs+Hepa129+4Mu incrementó significativamente la supervivencia de los ratones (* $p < 0,01$, prueba de log-rank) (*figura 36B*). Para validar este resultado, evaluamos la actividad antitumoral del tratamiento con DCs en un modelo murino de hepato-colangiocarcinoma (células BNL). De manera similar, los ratones que recibieron las DCs pulsadas con células BNL tratadas con 4Mu mostraron una disminución significativa en el crecimiento tumoral y un incremento en la supervivencia en comparación con los ratones que recibieron DCs pulsadas con células sin tratar (* $p < 0,05$, prueba de Kruskal-Wallis, * $p < 0,01$ prueba de log-rank, respectivamente) (*figura 36C*).

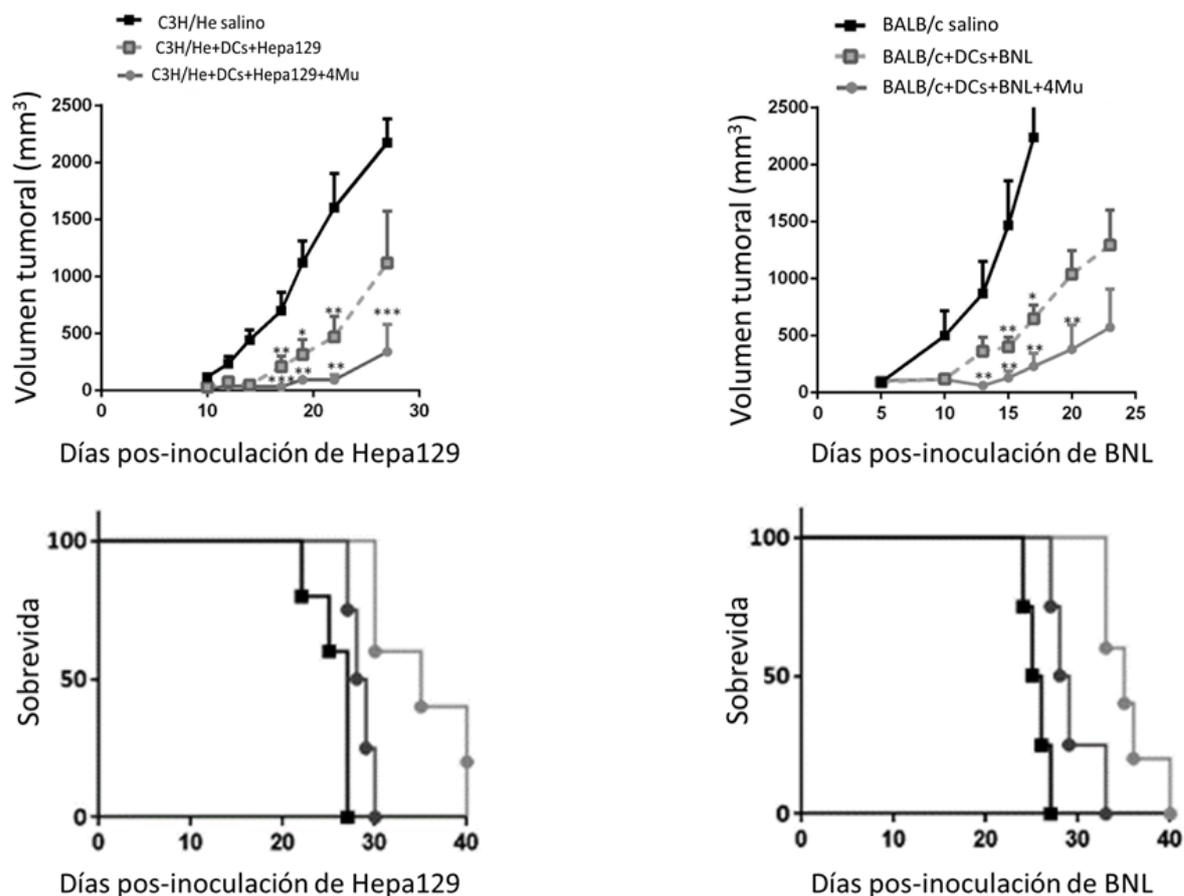


Figura 40: Evaluación del volumen tumoral después del tratamiento con DCs. Las DCs fueron obtenidas de la médula ósea de ratones sanos ($n = 5$) de la cepa C3H/He o BALB/c y fueron incubados 7 días en medio RPMI con GM-CSF (20 ng/ml) e IL4 (20 ng/ml); se pulsaron con extractos tumorales de células Hepa129 o BNL tratadas o no con 4Mu. Por otro lado, las células Hepa 129 o BNL fueron inoculadas s.c. en ratones C3H/j (izquierda) o BALB/c (derecha), respectivamente ($n = 4$ /grupo). Cuando los tumores alcanzaron los 90 mm³, los animales fueron distribuidos en grupos y tratados con. i) Salino, ii) DCs pulsadas con extracto de células sin pre-tratar con 4Mu, iii) DCs pulsadas con extracto tumoral pre-tratados con 4Mu. (A) Los tumores fueron medidos 3 veces por semana; * $p < 0.05$ salino vs. DCs pulsadas con extracto de células Hepa129 con 4Mu, ** $p < 0.05$ DCs + BNL + 4Mu vs. DCs + BNL o Salino; y DCs + Hepa129 + 4Mu vs DCs + Hepa129 o Salino. Test de Kruskal-Wallis. Los ensayos fueron relizados empleando 5 ratones por grupo y representados como la media \pm SEM.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Un gran porcentaje de los HCC se desarrollan en pacientes con cirrosis hepática subyacente²⁵⁵, que puede ser considerada como una condición pre-neoplásica resultado de una respuesta biológica al daño crónico y una continua remodelación hepática²⁵⁶. Esta condición genera ciclos repetitivos de daño y regeneración, que promueven cambios genéticos y epigenéticos en los hepatocitos. Además, la remodelación de la MEC predispone a la desregulación de la división celular, la resistencia a la apoptosis y la evasión del sistema inmune, promoviendo el desarrollo de nódulos displásicos⁴⁷. Una gran cantidad de reportes han demostrado que el microambiente tumoral (TME) desempeña un rol fundamental en la hepatocarcinogénesis^{47,257-260}. Este proceso es además acompañado de una alteración en la composición, metabolismo y depósito de diversos componentes de la matriz extracelular (MEC), incluyendo el ácido hialurónico (AH), como así también de diversos factores solubles, citoquinas y factores de crecimiento²⁶¹. En el caso del HCC, el TME es típicamente inmunosupresor y se caracteriza por la presencia de células Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, reclutadas por las células tumorales para suprimir la respuesta inmune antitumoral²⁶², TAMs (principalmente M ϕ con fenotipo tipo 2 (M2)), y células mieloides supresoras (MDSCs)²⁶³. Se han llevado a cabo un gran número de estrategias destinadas para inducir una respuesta inmune efectiva contra las células tumorales y revertir el microambiente inmunosupresor²⁶⁴: terapia adoptiva con células T, administración de citoquinas, administración de anticuerpos monoclonales que bloquean puntos de control, como pembrolizumab o nivolumab, o vacunas basadas en células dendríticas; transferencia de ARNm de antígenos, quimioterapia metronómica, y virus oncolíticos, entre otros^{229,230,265}. A pesar de que se han generado avances terapéuticos con

incrementos en la supervivencia global de los pacientes con HCC, aún existen obstáculos que favorecen la progresión tumoral y resistencia al tratamiento⁵².

En este contexto, en el laboratorio hemos estudiado cómo modificar el TME para optimizar la eficacia de algunas estrategias de inmunoterapia. Hemos observado en trabajos previos el efecto de 4Mu en el HCC¹⁸⁴ y en otros tipos de tumor como el cáncer de colon avanzado^{186,266} y hemos demostrado que 4Mu inhibe la producción de AH pero también conduce otros mecanismos de acción independientes de los efectos sobre el AH. El AH es un GAG no ramificado que interacciona con varios receptores presentes tanto en células tumorales como en células no tumorales^{267,268}. De estos, los mejores caracterizados son el CD44, el receptor para la motilidad mediada por ácido hialurónico (RHAMM) y el receptor tipo Toll (TLR4). También se ha reportado que el receptor endotelial linfático 1 (LYVE-1), que está implicado en el tránsito de leucocitos y células tumorales a través de los vasos linfáticos, puede interactuar con AH de la superficie de las células tumorales. En un estudio de Yan Du *et al*, proponen que el AH regula la adhesión de las células tumorales de mama a las células endoteliales linfáticas promoviendo la invasión y metástasis al influir en la unión con LYVE-1 en las células endoteliales de los vasos linfáticos^{269,270}. Por otro lado, se ha observado que en el HCC, las señales mediadas por CD44 superan la señal de muerte y senescencia por p53⁶⁷, promoviendo la transición epitelio-mesénquima (EMT) y la invasión celular^{68,69}. Además, se ha visto que la expresión aumentada de CD44 en el HCC se correlaciona con una etapa avanzada de la enfermedad y con una pobre diferenciación^{67,70}. En células epiteliales se ha visto que la unión de AH a CD44/RHAMM ejerce una activación directa e indirecta de algunas vías de señalización, como la activación de MAPK²⁵⁸, que regula la proliferación, la supervivencia y la motilidad celular^{271,272}. Por otro lado, la unión de AH a TLR4 activa la respuesta inmune innata y la inducción de la expresión de

genes inflamatorios en una variedad de células inmunes, incluidos los M ϕ y DCs^{273,274}. Makkar S *et al.*, observaron que la unión del AH a TLR4 promueve la proliferación y bloquea la apoptosis en cáncer de colon²⁷⁵. En este contexto, la capacidad de 4Mu para controlar la progresión tumoral por inhibición de la síntesis del AH ha sido demostrado en cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer pancreático y HCC^{194,276-278}. Además, 4Mu modula eventos claves de la angiogénesis, incluyendo la proliferación de la células endoteliales, la adhesión y la formación de tubos^{184,186,279}.

Ademas, en el laboratorio hemos reportado que 4Mu potencia la actividad inmunoestimuladora de la terapia génica con el vector AdIL-12 en combinación con ciclofosfamida, a través de diversos mecanismos entre los que se destaca la disminución de la presión intratumoral y el aumento de la permeabilidad de los tumores, lo que permite la llegada de linfocitos específicos al entorno tumoral de una manera más eficaz, en un modelo murino de cáncer de colon y en un modelo de metástasis hepática²⁸⁰.

En este trabajo de tesis investigamos el efecto de la combinación de 4Mu con la inmunoterapia empleando el vector AdIL-12 en un modelo ortotópico de HCC con fibrosis subyacente.

Hemos podido demostrar que la combinación de 4Mu+AdIL-12 tiene una actividad antitumoral aditiva sobre los tumores de HCC, prolongando la sobrevida de los ratones. Además, induce un potente efecto antitumoral que fue superior al efecto de las terapias individuales con 4Mu o con AdIL-12, generando una inhibición significativa del crecimiento tumoral y reduciendo la cantidad de nódulos satélites. De este modo, la terapia combinada fue una estrategia efectiva para reducir el tamaño tumoral y mejorar la sobrevida de los animales.

La activación de la rama inmunológica adaptativa es esencial para la generación de una respuesta específica contra el tumor²⁶⁴. Asimismo, IL-12 es una citoquina clave para inducir una respuesta polarizada a Th1 y para mediar una potente actividad citotóxica (CTL) específica principalmente de células T CD8⁺. Además, induce la síntesis de INF γ en las células efectoras²³⁷. Aquí demostramos que el efecto antitumoral de la terapia combinada fue consecuencia de la activación de células T CD4⁺ y CD8⁺ en el hígado, y de la producción de altos niveles séricos de INF- γ .

Estudios recientes han sugerido que la hepatocarcinogénesis podría resultar de la relación jerárquica entre las células cancerosas y un subconjunto de CSCs²⁸¹. Estas CSCs hepáticas han sido identificadas por varios antígenos de superficie celular tales como CD133, CD90, EpCAM, CD13, CD44, OV6 y CD24²³¹, y que son capaces de resistir a la quimioterapia y a la radioterapia, y de ser responsables de las recidivas tumorales y/o las metástasis^{282,283}. Además, se ha demostrado que las APCs son capaces de presentar antígenos de células tumorales fagocitadas, y promover la activación de células T²⁸⁴. En el presente trabajo observamos que cuando precondicionamos las células de HCC con 4Mu se estimula la fagocitosis de las células tumorales por los M ϕ a través de la modulación de la expresión de la molécula CD47. Este marcador, está altamente expresado en muchos tipos de tumores incluyendo el HCC, particularmente en las CSCs, y transmite señales inhibitorias a través de la molécula SIRP α presentes las APCs, por ejemplo en los M ϕ , protegiendo a las CSCs de la fagocitosis y favoreciendo la proliferación de la célula tumoral^{139,145}. Además, se ha reportado la alta expresión de CD47 en piezas tumorales de pacientes con HCC comparado con tejido adyacente (no tumoral)¹³⁸. Nosotros demostramos que 4Mu fue capaz de reducir la expresión de CD47 en las células de HCC, principalmente en las CSCs, promoviendo una mayor fagocitosis de las células tumorales y estimulando la

respuesta antitumoral. Además, ha sido reportado el rol de SIRP α expresado por las DCs en las respuestas antitumorales, incluyendo el HCC²⁸⁵. Es posible que la reducción de la expresión de CD47 por 4Mu también afecte la respuesta mediada tanto por los M ϕ como por las DCs.

En este trabajo también observamos la habilidad de 4Mu para modular la expresión de CD47 en otras líneas celulares de HCC, tanto humanas como murinas. Hemos encontrado que las células de HCC que son CD47⁺ son también CD133⁺ (marcador de CSCs en el hígado). Asimismo, 4Mu tuvo la capacidad de reducir la expresión de otros marcadores de CSCs como CD133, CD90, EpCAM, CD44, y CD13 tanto *in vitro* como *in vivo*.

El rol de las CSCs en el crecimiento del HCC está bajo estudio, tanto para dilucidar las razones de recurrencia tumoral o para predecir la respuesta terapéutica²⁸⁶. Se ha demostrado que altos niveles de expresión de CD133 y CD44 fueron relacionados con un peor pronóstico en pacientes con HCC, y que la expansión de células CD44⁺ esta correlacionada con una alta recurrencia del tumor luego del trasplante de hígado^{287,288}. Por lo tanto, las estrategias dirigidas para reducir el número de las CSCs están ganando mucha atención en este campo.

Otra característica de las CSCs es la habilidad de iniciar el crecimiento tumoral y la capacidad de diferenciarse a una célula madura. Esta característica está determinada por la disminución de la expresión de ciertos marcadores de CSCs, acompañado de un incremento en la expresión de marcadores de diferenciación²⁸⁹. En este trabajo de tesis doctoral, demostramos que 4Mu fue capaz de modificar la expresión de marcadores de CSCs y, al mismo tiempo, de modular su capacidad de auto-renovación. Este efecto fue puesto de manifiesto en un ensayo donde se analizó la capacidad metastásica de las CSCs y cómo la terapia con 4Mu fue capaz de inhibir su potencial invasivo. Para ello,

administramos de forma sistémica células de HCC CD133⁺ pre-tratadas con 4Mu y evaluamos la capacidad de generar metástasis pulmonares en ratones. Observamos que aquellos animales que recibieron células CD133⁺ + 4Mu o CD133⁻, mostraban un número reducido de metástasis pulmonares en comparación con aquellos que recibieron células CD133⁺. Del mismo modo, la supervivencia fue mayor en los ratones que fueron inyectados con células CD133⁻ pre-tratadas con 4Mu en comparación con ratones inyectados con células CD133⁺.

Como hemos mencionado, el TME desempeña un papel fundamental en el desarrollo del HCC y es crucial desarrollar terapias que se dirijan al TME^{16,290}. Los macrófagos del TME actúan en sinergismo para facilitar la progresión tumoral, desempeñan un papel importante en la activación de las HSCs y en el recambio de la MEC en la enfermedad inflamatoria crónica, participando tanto en la actividad pro- como anti-fibrogénica dependiendo de las diferentes etapas de la fibrogénesis y/o hepatocarcinogénesis²⁹¹. Las HSCs activadas se caracterizan por la expresión de α SMA y vimentina²⁹², y por su capacidad de liberar componentes de la MEC como colágeno 1 y 3, AH, fibronectina y factores de crecimiento (PDGF, HGF y TGF- β), promoviendo la desregulación en la proliferación de hepatocitos, y estimulando el reclutamiento de células que aumentan la inmunosupresión como las Treg, MDSCs, CAF y los TAM⁴⁷. En este contexto, los TAM adquieren un fenotipo polarizado a M2 y son reclutados por M-CSF, CCL2, VEGF y TGF- β provenientes del TME. Además, en el TME se producen una serie de citoquinas con diversas funciones protumorales; la liberación de IL-6 y TGF- β promoviendo el crecimiento tumoral, la invasión y metástasis por parte de IL-6 y MMPs, la supresión de la respuesta inmune antitumoral por parte de TGF- β e IL-10, el estímulo de la angiogénesis a través de PDGF, EGF, VEGF y TGF- β ⁹⁵. De hecho, esta población de M ϕ M2 se ha asociado con un mal pronóstico en el HCC y estudios

recientes han demostrado que las vías de señalización de NF- κ B, STAT3 y HIF-1 α desempeñan papeles claves en esta polarización^{225,290,293,294}.

Diversos estudios se han focalizado en el cambio de fenotipo M2→M1 para revertir la inmunosupresión¹⁴⁰. Por un lado, la activación clásica de los M ϕ (M1) es caracterizada por la expresión de la molécula de co-estímulo como CD86²⁹⁵, por un incremento de actividad de la iNOS, y por la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β y TNF- α , y así como de IL-12 para promover la respuesta antitumoral²⁹⁶. Por otro lado, la polarización alternativa de los M ϕ (M2) es caracterizada por la expresión del marcador CD206, por el incremento de la actividad Arginasa I, y por la liberación de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β . Además, una de las funciones de los M ϕ M2 es promover la cicatrización, la reparación y la remodelación de los tejidos²⁹⁶⁻²⁹⁸. Se ha demostrado que la muerte no selectiva de M ϕ inhibe la progresión de una serie de tumores²⁹⁹, pero esto puede tener muchos efectos secundarios de ser empleada como estrategia terapéutica^{300,301}. En este sentido, la destrucción selectiva de los M ϕ M2 con la preservación de los M ϕ M1 sería una terapia más apropiada, aunque difícil de poner en práctica³⁰².

En este trabajo pudimos demostrar que los M ϕ del entorno tumoral presentaban un perfil M2, con una fuerte expresión del marcador CD206, actividad Arginasa I y citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β , mientras que el tratamiento con 4Mu tuvo la capacidad de modular y mantener a los M ϕ en un fenotipo M1, disminuyendo la proporción de células CD206⁺ y aumentando las poblaciones de CD86⁺, aumentando la actividad de iNOS y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β y TNF- α . Los ratones con exposición temprana a 4Mu no pudieron normalizar las citoquinas anti-inflamatorias liberadas por los M ϕ M2, esto podría deberse a las altas presiones inmunoregulatoras de los otros componentes de la TME. Sin embargo, 4Mu

pudo ejercer una modulación directa sobre los M ϕ a tiempos más prolongados, sobre la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, conduciéndolos a un perfil de tipo M1. En un trabajo de Shi Q *et al.*, demostraron que la interacción entre los M ϕ y la MEC, específicamente con el AH de alto peso molecular, dirige a los M ϕ a un fenotipo M2 promoviendo efectos anti-inflamatorios³⁰³. Además, en otro trabajo reciente de Andreichenko *et al.*, demostraron que 4Mu tiene la capacidad de inhibir la fibrosis en un modelo de daño crónico inducido con tetracloruro de carbono. Asimismo, a las dos semanas de tratamiento con 4Mu observaron una disminución en la expresión de HAS2 en los M ϕ , aunque esta disminución no ocurrió en las HSCs; sin embargo, sí mostraban una reducción del número de células de HSC en comparación con el grupo control¹⁹⁵.

Como ha sido mencionado, los TAMs desempeñan un papel crítico la regulación del microambiente inflamatorio durante la hepatocarcinogénesis, en la progresión tumoral y en la metástasis³⁰². En este sentido, Yeung *et al.* describieron un efecto directo de los M ϕ M2 en el crecimiento del HCC, observando que la expansión de los TAM M2 promueven el crecimiento tumoral a través de la liberación de CCL22. Además, en muestras de pacientes, la acumulación de los M ϕ M2 en la región peri-tumoral fue correlacionada con un peor pronóstico de los pacientes^{294,304}. Además de la liberación de CCL22, se ha demostrado que los TAMs M2 también secretan TGF- β e IL-6, promoviendo la transición EMT y la adquisición de propiedades de CSCs^{253,305}. Asimismo, en muestras de pacientes con HCC se detectaron altos niveles de IL-6 que se correlacionaron con la presencia de marcadores de CSCs y, en cultivo, la expresión de IL-6 liberada por los TAMs indujo la expansión de células CSCs CD44⁺²⁵³.

En resultados previos obtenidos en el laboratorio, vimos que 4Mu tiene la capacidad de mitigar el daño hepático crónico inducido por TAA, y que esto es debido a una reducción tanto en la acumulación de AH, como en la activación de las HSCs y la

producción de IL-6 por los M ϕ hepáticos; así como también por la inhibición de la angiogénesis y el crecimiento tumoral *in vivo*¹⁸⁴.

La citoquina IL-6 puede promover el crecimiento tumoral, la invasión y la metástasis. Zhu *et al.*, observaron las células tumorales de HCC aumentaron significativamente la capacidad de invadir y de proliferar cuando fueron co-cultivadas con MC proveniente de M ϕ M2 o con CCL17 exógeno. Además, el establecimiento de tumores fue significativamente mayor cuando las células tumorales de HCC fueron pre-tratadas con CM proveniente de M ϕ M2. Por último observaron que el co-cultivo con M ϕ M2 o el tratamiento con CCL17 modula el proceso de EMT, la señalización de TGF- β 1 y Wnt/ β -catenina en las células de HCC³⁰⁶.

En cuanto a las características de iniciar y promover el tumor de las CSCs, los factores de transcripción Nanog, Oct-4 y Sox-2 juegan un rol importante. Se ha descrito que estas células tienen la capacidad formar esferas *in vitro* y están involucradas en el proceso de recurrencia, metástasis y resistencia a fármacos en el cáncer^{307,308}. La potencialidad de las CSCs está regulada de manera positiva por la activación aberrante de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina³⁰⁹. Ha sido reportado que la exposición de las células tumorales a los CM provenientes de M ϕ M2, promueve la formación de colonias y la expansión de las CSCs. Además, el co-cultivo con células M ϕ M2 y el tratamiento con CCL17 aumenta los niveles relativos de expresión de Nanog, Oct-4 y Sox-2 en las células tumorales³⁰⁶.

Recientemente, se ha reportado que el incremento de la expresión de CD47 en las células de HCC fue correlacionado positivamente con la densidad de los M ϕ hepáticos y con un peor pronóstico clínico²⁵². En este trabajo, los autores sugieren que la citoquina IL-6 derivada de los TAMs hepáticos está involucrada en el incremento de la expresión de CD47 en las células de HCC.

En este trabajo, observamos que el CM de los M ϕ tratados con 4Mu (CM+4Mu), presentaba una reducción en los niveles de IL-6. Además, observamos un retraso en la progresión tumoral cuando las líneas celulares de HCC fueron cultivadas con CM+4Mu, e inoculadas en ratones inmunocompetentes. Estos datos sugieren que 4Mu modula la habilidad de los M ϕ hepáticos para promover el crecimiento tumoral sugiriendo un rol potencial de IL-6 con respecto a la expresión reducida de los marcadores relacionados con CSCs (incluidos CD47) observado en nuestro modelo. Se ha propuesto que la presencia de M ϕ M2 hepáticos induce resistencia a la acción de las células T CD8⁺³¹⁰, en gran medida debido a una asociación positiva entre los niveles de expresión de los M ϕ M2, la disminución de células CD8⁺ infiltrantes y los niveles de PD-L1 tanto en las TAMs como en las células tumorales³¹⁰. Observamos que en los animales que fueron tratados con 4Mu, la inducción en la polarización de los M ϕ a un fenotipo M1 se acompañaba de un aumento en la infiltración de linfocitos T CD8⁺ en los tumores hepáticos, abriendo la posibilidad de combinar 4Mu con otras inmunoterapias tales como el uso de inhibidores de puntos de control³¹¹. En este sentido, Li X *et al.* observaron la supresión del crecimiento de tumores hepáticos de manera dependiente de células T CD8⁺ cuando utilizan un antagonista del CCR2 (necesario para reclutar a los TAMs) en un modelo de xenoinjerto; este efecto estuvo mediado por el bloqueo de la polarización de los M ϕ hepáticos a un fenotipo M2³¹².

Los pacientes con HCC avanzados tratados con inhibidores de tirosin kinasas (ITK) pueden resultar refractarios al tratamiento. Los clones resistentes a sorafenib derivados de líneas celulares de HCC mostraron propiedades de CSCs, incluyendo un aumento en la expresión de CD47³¹³. Asimismo, se encontró que la expresión de CD47 fue regulada por el factor nuclear kappa B (NF- κ B) y en muestras de pacientes con HCC se encontró una correlación positiva entre NF- κ B y la presencia del marcador CD47. La capacidad

de 4Mu para modular directamente a CD47 o indirectamente a partir de la inducción de M ϕ M1 hepáticos, podría sensibilizar a las células tumorales para la terapia con ITK.

Las DCs son APCs profesionales que capturan antígenos, procesan, migran hacia los ganglios y activan a las células T vírgenes, e inducen respuestas antitumorales en modelos de ratones^{314,315}. En este sentido, observamos que el tratamiento con 4Mu tuvo la habilidad de aumentar la capacidad de las DCs para reconocer y fagocitar células de HCC. La inmunoterapia basada en las DCs ha sido bien testada en ensayos clínicos en melanoma, cáncer de próstata, cáncer de células renales y el HCC³¹⁶⁻³²⁰, demostrando su seguridad con eficacia variable^{321,322}. Además, debido a que el HCC no expresa un antígeno único de forma ubicua, utilizamos un lisado de células completas como fuente de múltiples antígenos, ya que una ventaja de este enfoque es que las DCs serán más efectivas para provocar respuestas específicas a múltiples antígenos tanto de las células T CD4⁺ como de las células T CD8⁺, independientemente del tipo de HLA³²³. Así mismo, mostramos que la progresión tumoral fue inhibida significativamente en los ratones que recibieron las DCs pulsadas con los lisados de HCC pre-tratados con 4Mu en comparación con aquellos ratones que recibieron DCs pulsadas con lisados de HCC sin tratar. Esto sugiere que la terapia con 4Mu incrementa el potencial de las DCs para generar una respuesta inmune específica contra el HCC.

En este sentido, el desarrollo de DCs como una plataforma de vacunas terapéuticas ha sido ampliamente evaluado en pacientes con cáncer, por la capacidad de extraerlas de sangre periférica en cantidades suficientes y de manipularlas *ex vivo* para presentar antígenos de interés³²⁴. Además, un meta-análisis reciente, demostró que la inmunoterapia celular con DCs, podría mejorar el pronóstico de los pacientes al aumentar la supervivencia general y reducir la recurrencia en los pacientes con HCC

avanzado³²⁵. Sin embargo, aun no se han llegado a un consenso sobre la fuente o la dosis óptima de antígeno, la dosis de DCs o la vía de administración. Pero la mayoría de los investigadores ahora evitan la administración intravenosa, ya que los estudios han sugerido que la vacunación subcutánea o intradérmica conduce a una mejor migración de DCs a los ganglios linfáticos³²⁶ y una mayor polarización linfocitos Th1³²⁷. Además, es importante destacar que varios estudios indican que las DCs necesitan ser maduras para generar efectivamente una respuesta inmune específica de antígeno en humanos. La inyección de voluntarios sanos con DCs inmaduras cargadas de antígeno se ha asociado con respuestas tolerogénicas³²⁸, y en un ensayo aleatorizado en pacientes con melanoma metastásico que comparó DCs inmaduras pulsadas con péptidos administrados con adyuvante y GM-CSF demostró una inmunogenicidad significativamente menor en comparación con pacientes que recibieron la vacuna DCs maduras³²⁹. Además, una comparación directa de DCs inmaduras y maduras cargadas con péptidos en pacientes con melanoma metastásico mostró que solo las DCs maduras inducían respuestas citotóxicas específicas de antígeno³³⁰. En este sentido, 4Mu podría estar mediando una mayor activación de las DCs, permitiendo mejorar la presentación antigénica, la migración y la activación de las células efectoras del sistema inmune.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

7.1. PARCIALES

1. La terapia combinada combinada entre 4Mu e AdIL-12 inhibe el crecimiento tumoral en un modelo ortotópico de HCC establecido en hígados con fibrosis.
2. La terapia combinada entre 4Mu e AdIL-12 promueve el infiltrado de células T en el tejido tumoral e induce una potente respuesta citotóxica específica.
3. 4Mu convierte en más “visibles” a las células tumorales Hepa129 promoviendo el incremento de la fagocitosis de las células de HCC por las células presentadoras de antígeno. Esto podría deberse a la disminución de la expresión de CD47 en las células de HCC, sin observarse cambios en la expresión de SIRP α ni en la fagocitosis innata en los macrófagos.
4. 4Mu disminuye la presencia de marcadores de CSCs y, principalmente, la potencialidad de las CSCs CD133⁺ para crecer y diseminarse.
5. 4Mu tiene un efecto directo en el perfil de los M ϕ , dirigiéndolos hacia un perfil de polarización de tipo M1.
6. 4Mu modula positivamente la capacidad de reconocer y procesar las células tumorales por las DCs y potenciar un efecto antitumoral cuando se aplica como vacuna terapéutica.

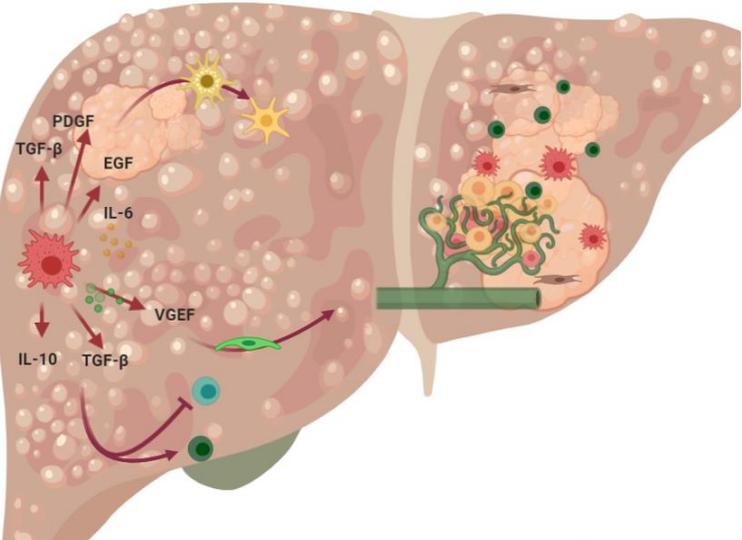
7.2. CONCLUSIÓN FINAL

Los resultados generados en este trabajo de tesis doctoral nos permiten concluir que 4Mu, en combinación con la inmunoterapia con el vector AdIL-12, tiene la capacidad de promover la inmunidad antitumoral contra el HCC, principalmente contra las CSCs. Además, 4Mu *per se* es capaz de modular, directamente, a componentes del TME como los M ϕ hepáticos hacia un perfil proinflamatorio, o indirectamente, a través de citoquinas/quimioquinas, que pueden estimular el reconocimiento de las CSCs y reclutar células T efectoras en el TME. Más importante aún, 4Mu permite mejorar la eficacia antitumoral de las DCs, que podrían utilizarse en protocolos de vacunación terapéutica.

4Mu es una molécula con capacidad para modificar la configuración del TME en el modelo estudiado, limitando la inmunosupresión mediada por macrófagos de tipo M2, modificando el potencial y la capacidad de evadir la respuesta inmunitaria de las CSCs, permitiendo potenciar la eficacia antitumoral cuando se combina con estrategias de inmunoterapia como el uso del vector adenoviral AdIL-12 o la administración de DCs. Por todo ello, 4Mu es una molécula con potencial para ser utilizada como adyuvante en terapias combinadas contra el HCC avanzado.

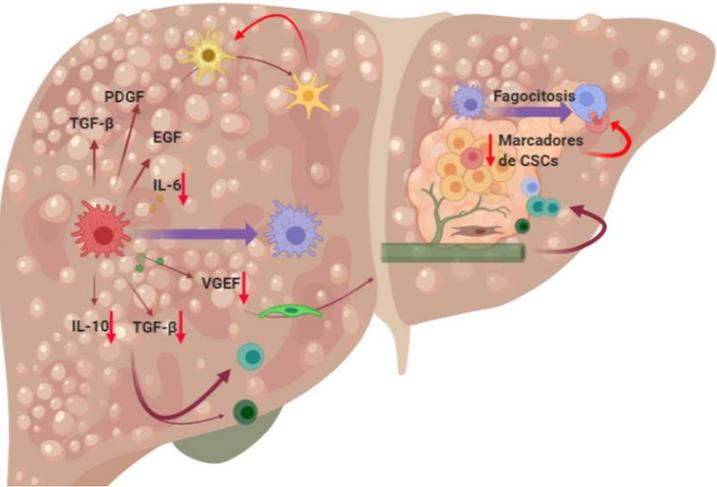
A

TME



B

4Mu



Continúa →

C)

4Mu+AdIL-12

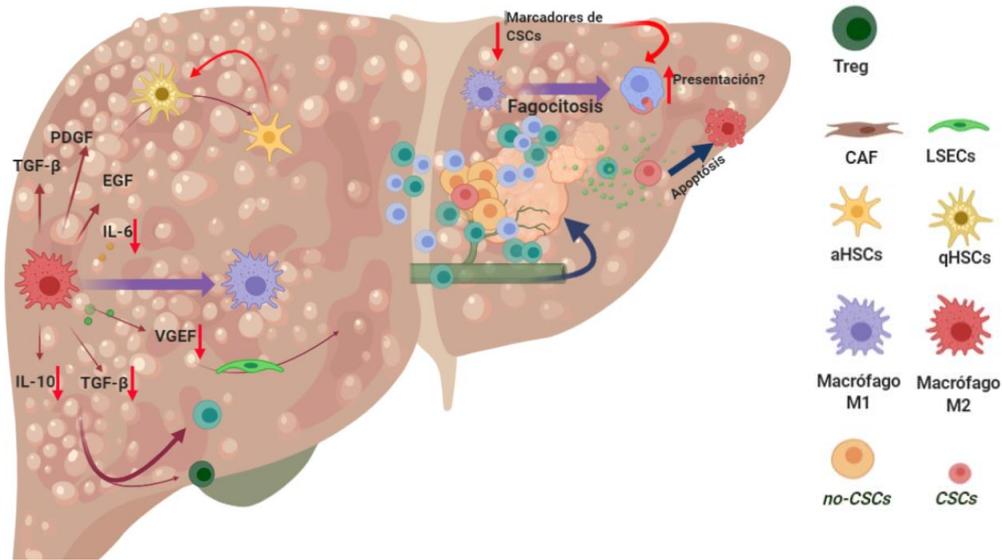


Figura 41: Resumen de los efectos del tratamiento con 4Mu en monoterapia o combinado con AdIL-12: A) El HCC se desarrolla en un contexto inflamatorio crónico, caracterizado por la presencia de HSCs activadas, incremento de la angiogenesis, presencia de Treg y Mφ M2 que liberan citoquinas y quimioquinas que potencian y mantienen la hepatocarcinogenesis. B) En presencia de 4Mu, hay polarización de los Mφ hacia un fenotipo proinflamatorio que favorece el reclutamiento de las células T; disminuye los marcadores de CSCs y promueve una mayor fagocitosis de las células tumorales. C) La administración del vector adenoviral AdIL-12, estimula la producción de INF-γ, y el reclutamiento de CTLs promoviendo la respuesta inmunitaria contra el HCC.

1. HEPATOLOGIA by Muñoz Espinosa, Linda, L. Ph. D. Jefa de la Unidad de Hígado, | LIBROPOLIS. <https://www.abebooks.com/HEPATOLOGIA-Muñoz-Espinosa-Linda-Jefa-Unidad/1571483455/bd>. Accessed April 22, 2020.
2. Ross Histología, texto y atlas Ed.7º por Pawlina, Wojciech - 9788416004966 - Journal. <https://www.edicionesjournal.com/Papel/9788416004966/Ross+Histología++texto+y+atlas+Ed+7º>. Accessed January 22, 2020.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492
4. Maluccio M, Covey A. Recent progress in understanding, diagnosing, and treating hepatocellular carcinoma. *CA Cancer J Clin*. 2012;62(6):394-399. doi:10.3322/caac.21161
5. Aballay G, Adrover R, Allevato J, et al. *Consenso y Guías Argentinas Para La Vigilancia, Diagnóstico y Tratamiento Del Hepatocarcinoma*. Vol 46.; 2016.
6. Fassio E, Míguez C, Soria S, et al. Etiology of hepatocellular carcinoma in Argentina: Results of a multicenter retrospective study. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2009;39(1):47-52.
7. (PDF) “Consenso y Guías Argentinas para la Vigilancia, Diagnóstico y Tratamiento del Hepatocarcinoma.” https://www.researchgate.net/publication/312210524_Consenso_y_Guias_Argentinas_para_la_Vigilancia_Diagnostico_y_Tratamiento_del_Hepatocarcinoma. Accessed May 30, 2020.
8. Bruix J, Boix L, Sala M, Llovet JM. Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*. 2004;5(3):215-219.
9. Thun MJ, Linet MS, Cerhan JR, Haiman C, Schottenfeld D. *Schottenfeld and Fraumeni Cancer Epidemiology and Prevention, Fourth Edition*. Oxford University Press; 2017. doi:10.1093/oso/9780190238667.001.0001
10. Chimed T, Sandagdorj T, Znaor A, et al. Cancer incidence and cancer control in Mongolia: Results from the National Cancer Registry 2008–12. *Int J Cancer*. 2017;140(2):302-309. doi:10.1002/ijc.30463
11. Marengo A, Rosso C, Bugianesi E. Liver Cancer: Connections with Obesity, Fatty Liver, and Cirrhosis. *Annu Rev Med*. 2016;67(1):103-117. doi:10.1146/annurev-med-090514-013832
12. Mavilia MG, Wu GY. HBV-HCV Coinfection: Viral Interactions, Management, and Viral Reactivation. *J Clin Transl Hepatol*. 2018;6(3):296-305. doi:10.14218/JCTH.2018.00016
13. Arzumanyan A, Reis HMGPV, Feitelson MA. Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(2):123-135. doi:10.1038/nrc3449
14. Rehmann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(3):215-229. doi:10.1038/nri1573

15. Axley P, Ahmed Z, Ravi S, Singal AK. Hepatitis C Virus and Hepatocellular Carcinoma: A Narrative Review. *J Clin Transl Hepatol*. 2018;6(2):1-6. doi:10.14218/jcth.2017.00067
16. Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Prim*. 2016;2. doi:10.1038/nrdp.2016.18
17. Ezhilarasan D, Sokal E, Najimi M. Hepatic fibrosis: It is time to go with hepatic stellate cell-specific therapeutic targets. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2018;17(3):192-197. doi:10.1016/j.hbpd.2018.04.003
18. Lamas-Paz A, Hao F, Nelson LJ, et al. Alcoholic liver disease: Utility of animal models. *World J Gastroenterol*. 2018;24(45):5063-5075. doi:10.3748/wjg.v24.i45.5063
19. Koyama Y, Brenner DA. New therapies for hepatic fibrosis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015;39:S75-S79. doi:10.1016/j.clinre.2015.06.011
20. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011;25(2):195-206. doi:10.1016/j.bpg.2011.02.005
21. Blaner WS, O'Byrne SM, Wongsiriroj N, et al. Hepatic stellate cell lipid droplets: A specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2009;1791(6):467-473. doi:10.1016/j.bbalip.2008.11.001
22. Kikuchi A, Pradhan-Sundt T, Singh S, Nagarajan S, Loizos N, Monga SP. Platelet-Derived Growth Factor Receptor α Contributes to Human Hepatic Stellate Cell Proliferation and Migration. *Am J Pathol*. 2017;187(10):2273-2287. doi:10.1016/j.ajpath.2017.06.009
23. Moles A, Tarrats N, Fernández-Checa JC, Marí M. Cathepsins B and D drive hepatic stellate cell proliferation and promote their fibrogenic potential. *Hepatology*. 2009;49(4):1297-1307. doi:10.1002/hep.22753
24. Lakner AM, Steuerwald NM, Walling TL, et al. Inhibitory effects of microRNA 19b in hepatic stellate cell-mediated fibrogenesis. *Hepatology*. 2012;56(1):300-310. doi:10.1002/hep.25613
25. Wang J si, Zhang Q yun, Cheng J lian, et al. Angiogenesis and Hepatic Fibrosis: Western and Chinese Medicine Therapies on the Road. *Chin J Integr Med*. 2018;24(9):713-720. doi:10.1007/s11655-018-3007-1
26. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003;9(6):653-660. doi:10.1038/nm0603-653
27. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*. 2019;176(6):1248-1264. doi:10.1016/j.cell.2019.01.021
28. Bueno M, Salgado S, Beas-Zárate C, Armendariz-Borunda J. Urokinase-type plasminogen activator gene therapy in liver cirrhosis is mediated by collagens gene expression down-regulation and up-regulation of MMPs, HGF and VEGF. *J Gene Med*. 2006;8(11):1291-1299. doi:10.1002/jgm.961
29. Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, et al. Kupffer Cell Engulfment of Apoptotic Bodies Stimulates Death Ligand and Cytokine Expression. *Hepatology*. 2003;38(5):1188-1198. doi:10.1053/jhep.2003.50472

30. Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol*. 2006;12(46):7413-7420. doi:10.3748/wjg.v12.i46.7413
31. López-Navarrete G, Ramos-Martínez E, Suárez-Álvarez K, et al. Th2-associated alternative Kupffer Cell activation promotes liver fibrosis without inducing local inflammation. *Int J Biol Sci*. 2011;7(9):1273-1286. doi:10.7150/ijbs.7.1273
32. Friedman SL, Arthur MJP. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. *J Clin Invest*. 1989;84(6):1780-1785. doi:10.1172/JCI114362
33. Matsuoka M, Zhang MY, Tsukamoto H. Sensitization of hepatic lipocytes by high-fat diet to stimulatory effects of kupffer cell-derived factors: Implication in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatology*. 1990;11(2):173-182. doi:10.1002/hep.1840110204
34. Giulio Romanelli R, Stasi C. Recent Advancements in Diagnosis and Therapy of Liver Cirrhosis. *Curr Drug Targets*. 2016;17(15):1804-1817. doi:10.2174/1389450117666160613101413
35. Bataller R, Gao B. Liver fibrosis in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis*. 2015;35(2):146-156. doi:10.1055/s-0035-1550054
36. European Association for the Study of the Liver (EASL). EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetologia*. 2016;59(6):1121-1140. doi:10.1007/s00125-016-3902-y
37. Burt AD, Lackner C, Tiniakos DG. Diagnosis and Assessment of NAFLD: Definitions and Histopathological Classification. *Semin Liver Dis*. 2015;35(3):207-220. doi:10.1055/s-0035-1562942
38. Anstee QM, Reeves HL, Kotsiliti E, Govaere O, Heikenwalder M. From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(7):411-428. doi:10.1038/s41575-019-0145-7
39. Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology*. 2018;67(1):123-133. doi:10.1002/hep.29466
40. Mittal S, El-Serag HB, Sada YH, et al. Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis in United States Veterans Is Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2016;14(1):124-131.e1. doi:10.1016/j.cgh.2015.07.019
41. Piscaglia F, Svegliati-Baroni G, Barchetti A, et al. Clinical patterns of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver disease: A multicenter prospective study. *Hepatology*. 2016;63(3):827-838. doi:10.1002/hep.28368
42. Mishra L, Banker T, Murray J, et al. Liver stem cells and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2009;49(1):318-329. doi:10.1002/hep.22704
43. Llovet JM, Montal R, Sia D, Finn RS. Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(10):599-616. doi:10.1038/s41571-018-0073-4
44. Wong QW-L, Wong N, Lai PB-S, To K-F, Wong N. Clonal relationship of tumor

- nodules in hepatocellular carcinoma: a hierarchical clustering analysis of comparative genomic hybridization data. *Hum Pathol.* 2005;36(8):893-898. doi:10.1016/j.humpath.2005.06.007
45. Nishida N, Kudo M. Oncogenic Signal and Tumor Microenvironment in Hepatocellular Carcinoma. *Oncol.* 2017;93(1):160-164. doi:10.1159/000481246
 46. Teresa Martín de Civetta M, Domingo Civetta J. *Carcinogénesis.*
 47. Hernandez-Gea V, Toffanin S, Friedman SL, Llovet JM. Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2013;144(3):512-527. doi:10.1053/j.gastro.2013.01.002
 48. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity.* 2013;39(1):1-10. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012
 49. Bacac M, Stamenkovic I. Metastatic Cancer Cell. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2008;3(1):221-247. doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151523
 50. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
 51. Klemm F, Joyce JA. Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. *Trends Cell Biol.* 2015;25(4):198-213. doi:10.1016/j.tcb.2014.11.006
 52. Wang X, Hassan W, Jabeen Q, Khan GJ, Iqbal F. Interdependent and independent multidimensional role of tumor microenvironment on hepatocellular carcinoma. *Cytokine.* 2018;103:150-159. doi:10.1016/j.cyto.2017.09.026
 53. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med.* 2018;24(5):541-550. doi:10.1038/s41591-018-0014-x
 54. Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, et al. Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity.* 2016;44(3):698-711. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.025
 55. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature.* 2014;515(7528):563-567. doi:10.1038/nature14011
 56. Ademmer K, Ebert M, Müller-Ostermeyer F, et al. Effector T lymphocyte subsets in human pancreatic cancer: Detection of CD8+ CD18+ cells and CD8+ CD103+ cells by multi-epitope imaging. *Clin Exp Immunol.* 1998;112(1):21-26. doi:10.1046/j.1365-2249.1998.00546.x
 57. Finkin S, Yuan D, Stein I, et al. Ectopic lymphoid structures function as microniches for tumor progenitor cells in hepatocellular carcinoma. *Nat Immunol.* 2015;16(12):1235-1244. doi:10.1038/ni.3290
 58. Neyt K, Perros F, GeurtsvanKessel CH, Hammad H, Lambrecht BN. Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity. *Trends Immunol.* 2012;33(6):297-305. doi:10.1016/j.it.2012.04.006
 59. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol.* 2012;196(4):395-406. doi:10.1083/jcb.201102147

60. Naba A, Clauser KR, Hoersch S, Liu H, Carr SA, Hynes RO. The matrisome: In silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11(4). doi:10.1074/mcp.M111.014647
61. Lai KKY, Shang S, Lohia N, et al. Extracellular matrix dynamics in hepatocarcinogenesis: A comparative proteomics study of PDGFC transgenic and Pten null mouse models. *PLoS Genet*. 2011;7(6). doi:10.1371/journal.pgen.1002147
62. Provenzano PP, Eliceiri KW, Campbell JM, Inman DR, White JG, Keely PJ. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med*. 2006;4. doi:10.1186/1741-7015-4-38
63. Hepatic stellate cells secrete type I collagen to trigger epithelial mesenchymal transition of hepatoma cells. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hepatic+stellate+cells+secrete+type+I+collagen+to+trigger+epithelial+mesenchymal+transition+of+hepatoma+cells>. Accessed April 28, 2020.
64. Zhang R, Ma M, Lin XH, et al. Extracellular matrix collagen i promotes the tumor progression of residual hepatocellular carcinoma after heat treatment. *BMC Cancer*. 2018;18(1). doi:10.1186/s12885-018-4820-9
65. Ji J, Zhao L, Budhu A, et al. Let-7g targets collagen type I $\alpha 2$ and inhibits cell migration in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2010;52(5):690-697. doi:10.1016/j.jhep.2009.12.025
66. Fang M, Yuan J, Peng C, Li Y. Collagen as a double-edged sword in tumor progression. *Tumor Biol*. 2014;35(4):2871-2882. doi:10.1007/s13277-013-1511-7
67. Dhar D, Antonucci L, Nakagawa H, et al. Liver Cancer Initiation Requires p53 Inhibition by CD44-Enhanced Growth Factor Signaling. *Cancer Cell*. 2018;33(6):1061-1077.e6. doi:10.1016/j.ccell.2018.05.003
68. Okabe H, Ishimoto T, Mima K, et al. CD44s signals the acquisition of the mesenchymal phenotype required for anchorage-independent cell survival in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. 2014;110(4):958-966. doi:10.1038/bjc.2013.759
69. Mima K, Okabe H, Ishimoto T, et al. CD44s regulates the TGF- β -mediated mesenchymal phenotype and is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2012;72(13):3414-3423. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0299
70. Endo K, Terada T. Protein expression of CD44 (standard and variant isoforms) in hepatocellular carcinoma: Relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, p53 expression, and patient survival. *J Hepatol*. 2000;32(1):78-84. doi:10.1016/S0168-8278(00)80192-0
71. Daniele A, Divella R, Quaranta M, et al. Clinical and prognostic role of circulating MMP-2 and its inhibitor TIMP-2 in HCC patients prior to and after trans-hepatic arterial chemo-embolization. *Clin Biochem*. 2014;47(3):184-190. doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.11.022
72. Adler B, Ashkar S, Cantor H, Weber GF. Costimulation by extracellular matrix proteins determines the response to TCR ligation. *Cell Immunol*. 2001;210(1):30-40. doi:10.1006/cimm.2001.1800

73. Rønnov-Jessen L, Petersen OW. Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Lab Invest*. 1993;68(6):696-707.
74. Giannoni E, Bianchini F, Masieri L, et al. Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res*. 2010;70(17):6945-6956. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0785
75. Yin C, Evason KJ, Asahina K, Stainier DYR. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *J Clin Invest*. 2013;123(5):1902-1910. doi:10.1172/JCI66369
76. Ishii G, Sangai T, Oda T, et al. Bone-marrow-derived myofibroblasts contribute to the cancer-induced stromal reaction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;309(1):232-240. doi:10.1016/S0006-291X(03)01544-4
77. Denton AE, Roberts EW, Fearon DT. Stromal cells in the tumor microenvironment. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol 1060. Springer New York LLC; 2018:99-114. doi:10.1007/978-3-319-78127-3_6
78. Qin L-X. Inflammatory Immune Responses in Tumor Microenvironment and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Microenviron*. 2012;5(3):203-209. doi:10.1007/s12307-012-0111-1
79. Fu J, Zhang Z, Zhou L, et al. Impairment of CD4⁺ cytotoxic T cells predicts poor survival and high recurrence rates in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2013;58(1):139-149. doi:10.1002/hep.26054
80. Zhang L, Mu Y, Zhang A, et al. Cytokine-induced killer cells/dendritic cells-cytokine induced killer cells immunotherapy combined with chemotherapy for treatment of colorectal cancer in China: a meta-analysis of 29 trials involving 2,610 patients. *Oncotarget*. 2017;8(28):45164-45177. doi:10.18632/oncotarget.16665
81. Zamarron BF, Chen W. Dual Roles of Immune Cells and Their Factors in Cancer Development and Progression. *Int J Biol Sci*. 2011;7(5):651-658. doi:10.7150/ijbs.7.651
82. Malvicini M, Gutierrez-Moraga A, Rodriguez MM, et al. A tricin derivative from *deschampsia antarctica* desv. Inhibits colorectal carcinoma growth and liver metastasis through the induction of a specific immune response. *Mol Cancer Ther*. 2018;17(5). doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0193
83. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science (80-)*. 2010;327(5966):656-661. doi:10.1126/science.1178331
84. Hart DNJ. Dendritic cells: Unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*. 1997;90(9):3245-3287. doi:10.1182/blood.v90.9.3245
85. Rodríguez-Fernández JL, Corbí AL. Adhesion molecules in human dendritic cells. *Curr Opin Investig Drugs*. 2005;6(11):1103-1111.
86. Hart DNJ, Prickett TCR. Adhesion molecules in tonsil DC-T cell interactions. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol 329. ; 1993:65-69. doi:10.1007/978-1-4615-2930-9_11

87. Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, et al. The CD40 Antigen and its Ligand. *Annu Rev Immunol.* 1994;12(1):881-926. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.004313
88. McLellan AD, Starling GC, Williams LA, Hock BD, Hart DNJ. Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule. *Eur J Immunol.* 1995;25(7):2064-2068. doi:10.1002/eji.1830250739
89. O'Neill DW, Adams S, Bhardwaj N. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood.* 2004;104(8):2235-2246. doi:10.1182/blood-2003-12-4392
90. Boltjes A, Movita D, Boonstra A, Woltman AM. The role of Kupffer cells in hepatitis B and hepatitis C virus infections. *J Hepatol.* 2014;61(3):660-671. doi:10.1016/j.jhep.2014.04.026
91. Wang J, Kubes P. A Reservoir of Mature Cavity Macrophages that Can Rapidly Invade Visceral Organs to Affect Tissue Repair. *Cell.* 2016;165(3):668-678. doi:10.1016/j.cell.2016.03.009
92. van der Heide D, Weiskirchen R, Bansal R. Therapeutic Targeting of Hepatic Macrophages for the Treatment of Liver Diseases. *Front Immunol.* 2019;10:2852. doi:10.3389/fimmu.2019.02852
93. Yan L, Xu F, Dai CL. Relationship between epithelial-to-mesenchymal transition and the inflammatory microenvironment of hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018;37(1):203. doi:10.1186/s13046-018-0887-z
94. Tacke F, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *J Hepatol.* 2014;60(5):1090-1096. doi:10.1016/j.jhep.2013.12.025
95. Mantovani A, Allavena P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *J Exp Med.* 2015;212(4):435-445. doi:10.1084/jem.20150295
96. Noy R, Pollard JW. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity.* 2014;41(1):49-61. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.010
97. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu Rev Immunol.* 2010;28(1):445-489. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101212
98. Heizmann B, Kastner P, Chan S. The Ikaros family in lymphocyte development. *Curr Opin Immunol.* 2018;51:14-23. doi:10.1016/j.coi.2017.11.005
99. Dupage M, Bluestone JA. Harnessing the plasticity of CD4+ T cells to treat immune-mediated disease. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(3):149-163. doi:10.1038/nri.2015.18
100. Tubo NJ, Pagán AJ, Taylor JJ, et al. Single naive CD4+ T cells from a diverse repertoire produce different effector cell types during infection. *Cell.* 2013;153(4):785-796. doi:10.1016/j.cell.2013.04.007
101. Morel PA. Differential T-cell receptor signals for T helper cell programming. *Immunology.* 2018;155(1):63-71. doi:10.1111/imm.12945
102. Rogers PR, Croft M. CD28, Ox-40, LFA-1, and CD4 Modulation of Th1/Th2 Differentiation Is Directly Dependent on the Dose of Antigen. *J Immunol.* 2000;164(6):2955-2963. doi:10.4049/jimmunol.164.6.2955

103. Silberman D, Krovi SH, Tuttle KD, et al. Class II major histocompatibility complex mutant mice to study the germ-line bias of T-cell antigen receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(38):E5608-E5617. doi:10.1073/pnas.1609717113
104. Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(11):749-761. doi:10.1038/nri3307
105. Flores-Tellez TNJ, Villa-Trevino S, Pina-Vazquez C. Road to stemness in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2017;23(37):6750-6776. doi:10.3748/wjg.v23.i37.6750
106. Makino Y, Hikita H, Kodama T, et al. CTGF mediates tumor–stroma interactions between hepatoma cells and hepatic stellate cells to accelerate HCC progression. *Cancer Res*. 2018;78(17):4902-4914. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-3844
107. Guo Z, Li LQ, Jiang JH, Ou C, Zeng LX, Xiang B De. Cancer stem cell markers correlate with early recurrence and survival in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2014;20(8):2098-2106. doi:10.3748/wjg.v20.i8.2098
108. Mishra L, Banker T, Murray J, et al. Liver stem cells and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2009;49(1):318-329. doi:10.1002/hep.22704
109. Marusyk A, Almendro V, Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer*. 2012;12(5):323-334. doi:10.1038/nrc3261
110. W.C. Pang R, T.P. Poon R. Cancer Stem Cell as a Potential Therapeutic Target in Hepatocellular Carcinoma. *Curr Cancer Drug Targets*. 2012;12(9):1081-1094. doi:10.2174/156800912803987995
111. Li X, Lewis MT, Huang J, et al. Intrinsic Resistance of Tumorigenic Breast Cancer Cells to Chemotherapy. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2008;100(9):672-679. doi:10.1093/jnci/djn123
112. Iijima J, Konno K, Itano N. Inflammatory alterations of the extracellular matrix in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2011;3:3189-3205. doi:10.3390/cancers3033189
113. Mimeault M, Hauke R, Mehta PP, Batra SK. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. *J Cell Mol Med*. 2007;11(5):981-1011. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00088.x
114. Ji J, Wang XW. Clinical implications of cancer stem cell biology in hepatocellular carcinoma. In: *Seminars in Oncology*. Vol 39. ; 2012:461-472. doi:10.1053/j.seminoncol.2012.05.011
115. Feng D, Wang N, Hu J, Li W. Surface markers of hepatocellular cancer stem cells and their clinical potential. *Neoplasma*. 2014;61(5):505-513. doi:10.4149/neo_2014_061
116. Gao X, Sheng Y, Yang J, et al. Osteopontin alters DNA methylation through up-regulating DNMT1 and sensitizes CD133+/CD44+ cancer stem cells to 5 azacytidine in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1). doi:10.1186/s13046-018-0832-1
117. Yoshida GJ. How to eliminate MYCN-positive hepatic cancer stem cells to prevent the recurrence? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(28):E6388-E6389. doi:10.1073/pnas.1808092115

118. Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, et al. Discrete nature of EpCAM+ and CD90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2013;57(4):1484-1497. doi:10.1002/hep.26168
119. Ma S, Chan KW, Hu L, et al. Identification and Characterization of Tumorigenic Liver Cancer Stem/Progenitor Cells. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2542-2556. doi:10.1053/j.gastro.2007.04.025
120. Zhu Z, Hao X, Yan M, et al. Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133+CD44+ population in hepatocellular carcinoma. *Int J cancer*. 2010;126(9):2067-2078. doi:10.1002/ijc.24868
121. Tang KH, Ma S, Lee TK, et al. CD133 + liver tumor-initiating cells promote tumor angiogenesis, growth, and self-renewal through neurotensin/interleukin-8/CXCL1 signaling. *Hepatology*. 2012;55(3):807-820. doi:10.1002/hep.24739
122. Farber E. Similarities in the Sequence of Early Histological Changes Induced in the Liver of the Rat by Ethionine, 2-Acetylaminofluorene, and 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res*. 1956;16(2):142.
123. Zheng YW, Tsuchida T, Shimao T, et al. The CD133+CD44+precancerous subpopulation of oval cells is a therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Stem Cells Dev*. 2014;23(18):2237-2249. doi:10.1089/scd.2013.0577
124. Huang HP, Chen PH, Yu CY, et al. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) complex proteins promote transcription factor-mediated pluripotency reprogramming. *J Biol Chem*. 2011;286(38):33520-33532. doi:10.1074/jbc.M111.256164
125. Yamashita T, Budhu A, Forgues M, Xin WW. Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt- β -catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2007;67(22):10831-10839. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0908
126. Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, et al. CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *J Clin Invest*. 2010;120(9):3326-3339. doi:10.1172/JCI42550
127. Yamada T, Abei M, Danjoh I, et al. Identification of a unique hepatocellular carcinoma line, Li-7, with CD13(+) cancer stem cells hierarchy and population change upon its differentiation during culture and effects of sorafenib. *BMC Cancer*. 2015;15(1):260. doi:10.1186/s12885-015-1297-7
128. [Expression of CD90/EpCAM/CD24 in hepatocellular carcinoma cell lines at various stages of differentiation]. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=%5BExpression+of+CD90%2FEpCAM%2FCD24+in+hepatocellular+carcinoma+cell+lines+at+various+stages+of+differentiation%5D>. Accessed April 29, 2020.
129. Oertel M, Shafritz DA. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2008;1782(2):61-74. doi:10.1016/j.bbdis.2007.12.004
130. Qiu Q, Hernandez JC, Dean AM, Rao PH, Darlington GJ. CD24-positive cells from normal adult mouse liver are hepatocyte progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 2011;20(12):2177-2188. doi:10.1089/scd.2010.0352
131. Yang ZF, Ho DW, Ng MN, et al. Significance of CD90+ Cancer Stem Cells in Human Liver Cancer. *Cancer Cell*. 2008;13(2):153-166. doi:10.1016/j.ccr.2008.01.013

132. Ishimoto T, Nagano O, Yae T, et al. CD44 Variant Regulates Redox Status in Cancer Cells by Stabilizing the xCT Subunit of System xc- and Thereby Promotes Tumor Growth. *Cancer Cell*. 2011;19(3):387-400. doi:10.1016/j.ccr.2011.01.038
133. Park NR, Cha JH, Jang JW, et al. Synergistic effects of CD44 and TGF- β 1 through AKT/GSK-3 β / β -catenin signaling during epithelial-mesenchymal transition in liver cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;477(4):568-574. doi:10.1016/j.bbrc.2016.06.077
134. Kim MP, Fleming JB, Wang H, et al. ALDH activity selectively defines an enhanced tumor-initiating cell population relative to CD133 expression in human pancreatic adenocarcinoma. *PLoS One*. 2011;6(6). doi:10.1371/journal.pone.0020636
135. Ma S, Kwok WC, Lee TKW, et al. Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations. *Mol Cancer Res*. 2008;6(7):1146-1153. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0035
136. Zhang W, Mu D, Feng K. Hierarchical potential differentiation of liver cancer stem cells. *Adv Clin Exp Med*. 2017;26(7):1137-1141. doi:10.17219/acem/66343
137. Zhou S, Du R, Wang Z, et al. TLR4 increases the stemness and is highly expressed in relapsed human hepatocellular carcinoma. *Cancer Med*. 2019;8(5):2325-2337. doi:10.1002/cam4.2070
138. Xiao Z, Chung H, Banan B, et al. Antibody mediated therapy targeting CD47 inhibits tumor progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2015;360(2):302-309. doi:10.1016/j.canlet.2015.02.036
139. Murata Y, Kotani T, Ohnishi H, Matozaki T. The CD47-SIRP signalling system: its physiological roles and therapeutic application. *J Biochem*. 2014;155(6):335-344. doi:10.1093/jb/mvu017
140. He XY, Liu BY, Xu C, Zhuo RX, Cheng SX. A multi-functional macrophage and tumor targeting gene delivery system for the regulation of macrophage polarity and reversal of cancer immunoresistance. *Nanoscale*. 2018;10(33):15578-15587. doi:10.1039/c8nr05294h
141. Brown EJ, Frazier WA. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol*. 2001;11(3):130-135. doi:10.1016/S0962-8924(00)01906-1
142. Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, et al. CD47 Is an Adverse Prognostic Factor and Therapeutic Antibody Target on Human Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Cell*. 2009;138(2):286-299. doi:10.1016/j.cell.2009.05.045
143. Willingham SB, Volkmer J-P, Gentles AJ, et al. The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRP α) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(17):6662-6667. doi:10.1073/pnas.1121623109
144. Chao MP, Takimoto CH, Feng DD, et al. Therapeutic Targeting of the Macrophage Immune Checkpoint CD47 in Myeloid Malignancies. *Front Oncol*. 2020;9:1380. doi:10.3389/fonc.2019.01380
145. Liu X, Pu Y, Cron K, et al. CD47 blockade triggers T cell-mediated destruction of immunogenic tumors. *Nat Med*. 2015;21(10):1209-1215. doi:10.1038/nm.3931
146. Gluer AM, Cocco N, Laurence JM, et al. Systematic review of actual 10-year survival

- following resection for hepatocellular carcinoma. *HPB*. 2012;14(5):285-290. doi:10.1111/j.1477-2574.2012.00446.x
147. Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev*. 2011;91:221-264. doi:10.1152/physrev.00052.2009
148. Llovet J, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology*. 2003;37(2):429-442. doi:10.1053/jhep.2003.50047
149. Olweny CL, Toya T, Katongole-Mbidde E, Mugerwa J, Kyalwazi SK, Cohen H. Treatment of hepatocellular carcinoma with adriamycin. Preliminary communication. *Cancer*. 1975;36(4):1250-1257. doi:10.1002/1097-0142(197510)36:4<1250::aid-cncr2820360410>3.0.co;2-x
150. Gish RG, Porta C, Lazar L, et al. Phase III randomized controlled trial comparing the survival of patients with unresectable hepatocellular carcinoma treated with nolatrexed or doxorubicin. *J Clin Oncol*. 2007;25(21):3068-3075. doi:10.1200/JCO.2006.08.4046
151. Porta C, Moroni M, Nastasi G, Arcangeli G. 5-Fluorouracil and d,l-leucovorin calcium are active to treat unresectable hepatocellular carcinoma patients: preliminary results of a phase II study. *Oncology*. 52(6):487-491. doi:10.1159/000227516
152. Tetef M, Doroshow J, Akman S, et al. 5-fluorouracil and high-dose calcium leucovorin for hepatocellular carcinoma: A phase II trial. *Cancer Invest*. 1995;13(5):460-463. doi:10.3109/07357909509024907
153. Abdel-Rahman O, Abdel-Wahab M, Shaker M, Abdel-Wahab S, Elbassiony M, Ellithy M. Sorafenib versus capecitabine in the management of advanced hepatocellular carcinoma. *Med Oncol*. 2013;30(3). doi:10.1007/s12032-013-0655-z
154. Seong J, Kim SH, Suh COK. Enhancement of tumor radioresponse by combined chemotherapy in murine hepatocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2001;16(8):883-889. doi:10.1046/j.1440-1746.2001.02533.x
155. Pastorelli D, Cartei G, Zustovich F, et al. Gemcitabine and liposomal doxorubicin in biliary and hepatic carcinoma (HCC) chemotherapy: preliminary results and review of the literature. *Ann Oncol*. 2005;17:153-157. doi:10.1093/annonc/mdj972
156. Ulrich-Pur H, Kornek GV, Fiebiger W, Schüll B, Raderer M, Scheithauer W. Treatment of advanced hepatocellular carcinoma with biweekly high-dose gemcitabine. *Oncology*. 2001;60(4):313-315. doi:10.1159/000058526
157. Chino F, Stephens SJ, Choi SS, et al. The role of external beam radiotherapy in the treatment of hepatocellular cancer. *Cancer*. 2018;124(17):3476-3489. doi:10.1002/cncr.31334
158. Kim S, Abou-Alfa GK. The role of tyrosine kinase inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2014;12(1):36-41.
159. Arora A, Scholar EM. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;315(3):971-979. doi:10.1124/jpet.105.084145
160. Hartmann J, Haap M, Kopp H-G, Lipp H-P. Tyrosine Kinase Inhibitors – A Review on Pharmacology, Metabolism and Side Effects. *Curr Drug Metab*. 2009;10(5):470-481. doi:10.2174/138920009788897975

161. Adnane L, Trail PA, Taylor I, Wilhelm SM. Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar®), a Dual-Action Inhibitor That Targets RAF/MEK/ERK Pathway in Tumor Cells and Tyrosine Kinases VEGFR/PDGFR in Tumor Vasculature. *Methods Enzymol.* 2006;407:597-612. doi:10.1016/S0076-6879(05)07047-3
162. Liu L, Cao Y, Chen C, et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res.* 2006;66(24):11851-11858. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1377
163. Zhai B, Sun XY. Mechanisms of resistance to sorafenib and the corresponding strategies in hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol.* 2013;5(7):345-352. doi:10.4254/wjh.v5.i7.345
164. Cheng AL, Kang YK, Lin DY, et al. Sunitinib versus sorafenib in advanced hepatocellular cancer: Results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol.* 2013;31(32):4067-4075. doi:10.1200/JCO.2012.45.8372
165. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2008;359(4):378-390. doi:10.1056/NEJMoa0708857
166. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol.* 2009;10(1):25-34. doi:10.1016/S1470-2045(08)70285-7
167. Keating GM. Sorafenib: A Review in Hepatocellular Carcinoma. *Target Oncol.* 2017;12(2):243-253. doi:10.1007/s11523-017-0484-7
168. Hao Z, Wang P. Lenvatinib in Management of Solid Tumors. *Oncologist.* 2020;25(2). doi:10.1634/theoncologist.2019-0407
169. Kudo M, Finn RS, Qin S, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet.* 2018;391(10126):1163-1173. doi:10.1016/S0140-6736(18)30207-1
170. Ogasawara S, Mihara Y, Kondo R, Kusano H, Akiba J, Yano H. Antiproliferative effect of lenvatinib on human liver cancer cell lines in vitro and in vivo. *Anticancer Res.* 2019;39(11):5943-5982. doi:10.21873/anticancerres.13802
171. Bruix J, Tak WY, Gasbarrini A, et al. Regorafenib as second-line therapy for intermediate or advanced hepatocellular carcinoma: Multicentre, open-label, phase II safety study. *Eur J Cancer.* 2013;49(16):3412-3419. doi:10.1016/j.ejca.2013.05.028
172. Wilhelm SM, Dumas J, Adnane L, et al. Regorafenib (BAY 73-4506): A new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int J Cancer.* 2011;129(1):245-255. doi:10.1002/ijc.25864
173. Heo YA, Syed YY. Regorafenib: A Review in Hepatocellular Carcinoma. *Drugs.* 2018;78(9):951-958. doi:10.1007/s40265-018-0932-4
174. Bruix J, Qin S, Merle P, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2017;389(10064):56-66. doi:10.1016/S0140-

6736(16)32453-9

175. FDA aprueba regorafenib para cáncer de hígado - Instituto Nacional del Cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/noticias/temas-y-relatos-blog/2017/fda-regorafenib-higado>. Accessed January 15, 2020.
176. Abou-Alfa GK, Meyer T, Cheng AL, et al. Cabozantinib in patients with advanced and progressing hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2018;379(1):54-63. doi:10.1056/NEJMoa1717002
177. Laurent TC, Laurent UBG, Fraser JRE. The structure and function of hyaluronan: An overview. In: *Immunology and Cell Biology*. Vol 74. Nature Publishing Group; 1996. doi:10.1038/icb.1996.32
178. Itano N, Atsumi F, Sawai T, et al. Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(6):3609-3614. doi:10.1073/pnas.052026799
179. Kang L, Lantier L, Kennedy A, et al. Hyaluronan accumulates with high-fat feeding and contributes to insulin resistance. *Diabetes*. 2013;62(6):1888-1896. doi:10.2337/db12-1502
180. Wong VS, Hughes V, Trull A, Wight DGD, Petrik J, Alexander GJM. Serum hyaluronic acid is a useful marker of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat*. 1998;5(3):187-192. doi:10.1046/j.1365-2893.1998.00100.x
181. de la Motte CA. Hyaluronan in intestinal homeostasis and inflammation: Implications for fibrosis. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2011;301(6). doi:10.1152/ajpgi.00063.2011
182. Liang J, Jiang D, Jung Y, et al. Role of hyaluronan and hyaluronan-binding proteins in human asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(2). doi:10.1016/j.jaci.2011.04.006
183. WANG R, ZHOU W, WANG J, et al. Role of Hyaluronan and Glucose on 4-Methylumbelliferone-inhibited Cell Proliferation in Breast Carcinoma Cells. *Anticancer Res*. 2015;35(9):4799-4805.
184. Piccioni F, Fiore E, Bayo J, et al. 4-methylumbelliferone inhibits hepatocellular carcinoma growth by decreasing IL-6 production and angiogenesis. *Glycobiology*. 2015;25(8):825-835. doi:10.1093/glycob/cwv023
185. Alaniz L, Rizzo M, Malvicini M, et al. Low molecular weight hyaluronan inhibits colorectal carcinoma growth by decreasing tumor cell proliferation and stimulating immune response. *Cancer Lett*. 2009;278(1):9-16. doi:10.1016/j.canlet.2008.12.029
186. Malvicini M, Fiore E, Ghiaccio V, et al. Tumor Microenvironment Remodeling by 4-Methylumbelliferone Boosts the Antitumor Effect of Combined Immunotherapy in Murine Colorectal Carcinoma. *Mol Ther*. 2015;23(9). doi:10.1038/mt.2015.112
187. Nagy N, Kuipers HF, Frymoyer AR, et al. 4-Methylumbelliferone Treatment and Hyaluronan Inhibition as a Therapeutic Strategy in Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. *Front Immunol*. 2015;6(March):1-11. doi:10.3389/fimmu.2015.00123
188. Kakizaki I, Kojima K, Takagaki K, et al. A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone. *J Biol Chem*. 2004;279(32):33281-33289. doi:10.1074/jbc.M405918200

189. Vignetti D, Ori M, Viola M, et al. Molecular cloning and characterization of UDP-glucose dehydrogenase from the amphibian *Xenopus laevis* and its involvement in hyaluronan synthesis. *J Biol Chem*. 2006;281(12):8254-8263. doi:10.1074/jbc.M508516200
190. Yoon Y, Chae MK, Lee EJ, Yoon JS. 4-Methylumbelliferone suppresses hyaluronan and adipogenesis in primary cultured orbital fibroblasts from Graves' orbitopathy. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. January 2020. doi:10.1007/s00417-019-04528-3
191. Kultti A, Pasonen-Seppänen S, Jauhiainen M, et al. 4-Methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and downregulation of hyaluronan synthase 2 and 3. *Exp Cell Res*. 2009;315(11):1914-1923. doi:10.1016/j.yexcr.2009.03.002
192. Vignetti D, Rizzi M, Viola M, et al. The effects of 4-methylumbelliferone on hyaluronan synthesis, MMP2 activity, proliferation, and motility of human aortic smooth muscle cells. *Glycobiology*. 2009;19(5):537-546. doi:10.1093/glycob/cwp022
193. Nagy N, Kuipers HF, Frymoyer AR, et al. 4-Methylumbelliferone treatment and hyaluronan inhibition as a therapeutic strategy in inflammation, autoimmunity, and cancer. *Front Immunol*. 2015;6(MAR). doi:10.3389/fimmu.2015.00123
194. Piccioni F, Malvicini M, Garcia MG, et al. Antitumor effects of hyaluronic acid inhibitor 4-methylumbelliferone in an orthotopic hepatocellular carcinoma model in mice. *Glycobiology*. 2012;22(3):400-410. doi:10.1093/glycob/cwr158
195. Andreichenko IN, Tsitrina AA, Fokin A V., et al. 4-methylumbelliferone Prevents Liver Fibrosis by Affecting Hyaluronan Deposition, FSTL1 Expression and Cell Localization. *Int J Mol Sci*. 2019;20(24):6301. doi:10.3390/ijms20246301
196. Tamura R, Yokoyama Y, Yoshida H, Imaizumi T, Mizunuma H. 4-Methylumbelliferone inhibits ovarian cancer growth by suppressing thymidine phosphorylase expression. *J Ovarian Res*. 2014;7(1). doi:10.1186/s13048-014-0094-2
197. Thorne B, Takeya R, Vitelli F, Swanson X. Gene therapy. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Vol 165. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2018:351-399. doi:10.1007/10_2016_53
198. High KA, Roncarolo MG. Gene therapy. *N Engl J Med*. 2019;381(5):455-464. doi:10.1056/NEJMra1706910
199. Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, et al. *Gene Therapy for Immunodeficiency Due to Adenosine Deaminase Deficiency*. Vol 360.; 2009.
200. Naldini L, Blömer U, Gallay P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science (80-)*. 1996;272(5259):263-267. doi:10.1126/science.272.5259.263
201. Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL, Strohl WR. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs*. 2017;31(4):317-334. doi:10.1007/s40259-017-0234-5
202. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1953;84(3):570-573. doi:10.3181/00379727-84-20714

203. Hagedorn C, Kreppel F. Capsid Engineering of Adenovirus Vectors: Overcoming Early Vector-Host Interactions for Therapy. *Hum Gene Ther.* 2017;28(10):820-832. doi:10.1089/hum.2017.139
204. HAdV Working Group. <http://hadvwg.gmu.edu/>. Accessed May 1, 2020.
205. Wold W, Toth K. Adenovirus Vectors for Gene Therapy, Vaccination and Cancer Gene Therapy. *Curr Gene Ther.* 2014;13(6):421-433. doi:10.2174/1566523213666131125095046
206. Meier O, Boucke K, Hammer SV, et al. Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J Cell Biol.* 2002;158(6):1119-1131. doi:10.1083/jcb.200112067
207. Berraondo P, Prieto J, Gonzalez-Aseguinolaza G. Advances in Interleukin-12 Gene Therapy for Acquired Liver Diseases. *Curr Gene Ther.* 2009;9(2):62-71. doi:10.2174/156652309787909553
208. Bramson J, Hitt M, Gallichan WS, Rosenthal KL, Gauldie J, Graham FL. Construction of a double recombinant adenovirus vector expressing a heterodimeric cytokine: In vitro and in vivo production of biologically active interleukin-12. *Hum Gene Ther.* 1996;7(3):333-342. doi:10.1089/hum.1996.7.3-333
209. Kalyuzhniy O, Di Paolo NC, Silvestry M, et al. Adenovirus serotype 5 hexon is critical for virus infection of hepatocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(14):5483-5488. doi:10.1073/pnas.0711757105
210. Martin K, Brie A, Saulnier P, Perricaudet M, Yeh P, Vigne E. Simultaneous CAR- and α integrin-binding ablation fails to reduce Ad5 liver tropism. *Mol Ther.* 2003;8(3):485-494. doi:10.1016/S1525-0016(03)00182-5
211. Verdino P, Witherden DA, Havran WL, Wilson IA. The molecular interaction of CAR and JAML recruits the central cell signal transducer PI3K. *Science (80-).* 2010;329(5996):1210-1214. doi:10.1126/science.1187996
212. Shayakhmetov DM, Gaggar A, Ni S, Li Z-Y, Lieber A. Adenovirus Binding to Blood Factors Results in Liver Cell Infection and Hepatotoxicity. *J Virol.* 2005;79(12):7478-7491. doi:10.1128/jvi.79.12.7478-7491.2005
213. Doronin K, Flatt JW, Di Paolo NC, et al. Coagulation factor X activates innate immunity to human species C adenovirus. *Science (80-).* 2012;338(6108):795-798. doi:10.1126/science.1226625
214. Shaw AR, Suzuki M. Immunology of Adenoviral Vectors in Cancer Therapy. *Mol Ther - Methods Clin Dev.* 2019;15:418-429. doi:10.1016/j.omtm.2019.11.001
215. Wy Ip W, Qasim W. Management of Adenovirus in Children after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Adv Hematol.* 2013;2013. doi:10.1155/2013/176418
216. Melero I, Mazzolini G, Narvaiza I, Qian C, Chen L, Prieto J. IL-12 gene therapy for cancer: In synergy with other immunotherapies. *Trends Immunol.* 2001;22(3):113-115. doi:10.1016/S1471-4906(00)01824-X
217. Vrecko S, Guenat D, Mercier-Letondal P, et al. Personalized identification of tumor-associated immunogenic neoepitopes in hepatocellular carcinoma in complete remission

- after sorafenib treatment. *Oncotarget*. 2018;9(83):35394-35407. doi:10.18632/oncotarget.26247
218. Pardee AD, Butterfield LH. Immunotherapy of hepatocellular carcinoma: Unique challenges and clinical opportunities. *Oncoimmunology*. 2012;1(1):48-55. doi:10.4161/onci.1.1.18344
219. Zhang R, Zhang Z, Liu Z, et al. Adoptive cell transfer therapy for hepatocellular carcinoma. *Front Med*. 2019;13(1):3-11. doi:10.1007/s11684-019-0684-x
220. Baradaran Noveiry B, Hirbod-Mobarakeh A, Khalili N, et al. Specific immunotherapy in hepatocellular cancer: A systematic review. *J Gastroenterol Hepatol*. 2017;32(2):339-351. doi:10.1111/jgh.13449
221. Breous E, Thimme R. Potential of immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2011;54(4):830-834. doi:10.1016/j.jhep.2010.10.013
222. Yarchoan M, Xing D, Luan L, et al. Characterization of the immune microenvironment in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2017;23(23):7333-7339. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0950
223. Roth GS, Decaens T. Liver immunotolerance and hepatocellular carcinoma: Pathophysiological mechanisms and therapeutic perspectives. *Eur J Cancer*. 2017;87:101-112. doi:10.1016/j.ejca.2017.10.010
224. Knutson KL, Disis ML, Salazar LG. CD4 regulatory T cells in human cancer pathogenesis. *Cancer Immunol Immunother*. 2007;56(3):271-285. doi:10.1007/s00262-006-0194-y
225. Kalathil SG, Thanavala Y. High immunosuppressive burden in cancer patients: a major hurdle for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2016;65(7):813-819. doi:10.1007/s00262-016-1810-0
226. Carbone DP, Gandara DR, Antonia SJ, Zielinski C, Paz-Ares L. Non-small-cell lung cancer: Role of the immune system and potential for immunotherapy. *J Thorac Oncol*. 2015;10(7):974-984. doi:10.1097/JTO.0000000000000551
227. FDA grants accelerated approval to nivolumab and ipilimumab combination for hepatocellular carcinoma | FDA. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-nivolumab-and-ipilimumab-combination-hepatocellular-carcinoma>. Accessed April 26, 2020.
228. Cancer L. Immune checkpoint blockade in hepatocellular Carcinoma: 2017 update. *Liver Cancer*. 2017;6(1):13-15. doi:10.1159/000449342
229. El-Khoueiry AB, Sangro B, Yau T, et al. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet*. 2017;389(10088):2492-2502. doi:10.1016/S0140-6736(17)31046-2
230. Duffy AG, Ulahannan S V, Makorova-Rusher O, et al. Tremelimumab in combination with ablation in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2017;66(3):545-551. doi:10.1016/j.jhep.2016.10.029
231. Qiu L, Li H, Fu S, Chen X, Lu L. Surface markers of liver cancer stem cells and innovative targeted-therapy strategies for HCC. *Oncol Lett*. 2018;15(2):2039-2048.

- doi:10.3892/ol.2017.7568
232. Kudo M. Pembrolizumab for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Liver Cancer*. 2019;8:143-154. doi:10.1159/000500143
233. Syed YY. Ramucirumab: A Review in Hepatocellular Carcinoma. *Drugs*. 2020;80(3):315-322. doi:10.1007/s40265-020-01263-6
234. Behzadi P, Behzadi E, Ranjbar R. Il-12 family cytokines: General characteristics, pathogenic microorganisms, receptors, and signalling pathways. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2016;63(1):1-25. doi:10.1556/030.63.2016.1.1
235. Vignali DAA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol*. 2012;13(8):722-728. doi:10.1038/ni.2366
236. Sgadari C, Angiolillo AL TG. Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood*. 87(9):3877-3882.
237. Berraondo P, Etxeberria I, Ponz-Sarvisé M, Melero I. Revisiting Interleukin-12 as a Cancer Immunotherapy Agent. *Clin Cancer Res*. 2018;24(12):2716-2718. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0381
238. Freytag SO, Zhang Y, Siddiqui F. Preclinical toxicology of oncolytic adenovirus-mediated cytotoxic and interleukin-12 gene therapy for prostate cancer. *Mol Ther - Oncolytics*. 2015;2:15006. doi:10.1038/mto.2015.6
239. Bortolanza S, Bunuales M, Otano I, et al. Treatment of pancreatic cancer with an oncolytic adenovirus expressing interleukin-12 in Syrian hamsters. *Mol Ther*. 2009;17(4):614-622. doi:10.1038/mt.2009.9
240. Pavlin D, Cemazar M, Sersa G, Tozon N. IL-12 based gene therapy in veterinary medicine. *J Transl Med*. 2012;10(1). doi:10.1186/1479-5876-10-234
241. Sangro B, Mazzolini G, Ruiz J, et al. Phase I trial of intratumoral injection of an adenovirus encoding interleukin-12 for advanced digestive tumors. *J Clin Oncol*. 2004;22(8):1389-1397. doi:10.1200/JCO.2004.04.059
242. Zhou ZF, Peng F, Li JY, Ye Y Bin. Intratumoral IL-12 gene therapy inhibits tumor growth in a HCC-Hu-PBL-NOD/SCID Murine model. *Onco Targets Ther*. 2019;12:7773-7784. doi:10.2147/OTT.S222097
243. Mazzolini G, Qian C, Narvaiza I, et al. Adenoviral gene transfer of interleukin 12 into tumors synergizes with adoptive T cell therapy both at the induction and effector level. *Hum Gene Ther*. 2000;11(1):113-125. doi:10.1089/10430340050016201
244. Nabel GJ. Designing tomorrow's vaccines. *N Engl J Med*. 2013;368(6):551-560. doi:10.1056/NEJMra1204186
245. Palucka K, Banchereau J. Dendritic-Cell-Based Therapeutic Cancer Vaccines. *Immunity*. 2013;39(1):38-48. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.004
246. Palmer DH, Midgley RS, Mirza N, et al. A phase II study of adoptive immunotherapy using dendritic cells pulsed with tumor lysate in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2009;49(1):124-132. doi:10.1002/hep.22626
247. Sun JC, Pan K, Chen MS, et al. Dendritic cells-mediated CTLs targeting hepatocellular

- carcinoma stem cells. *Cancer Biol Ther.* 2010;10(4):368-375.
doi:10.4161/cbt.10.4.12440
248. Mazzolini G, Qian C, Xie X, et al. Regression of colon cancer and induction of antitumor immunity by intratumoral injection of adenovirus expressing interleukin-12. *Cancer Gene Ther.* 1999;6(6):514-522. doi:10.1038/sj.cgt.7700072
249. Qian C, Bilbao R, Bruña O, Prieto J. Induction of sensitivity to ganciclovir in human hepatocellular carcinoma cells by adenovirus-mediated gene transfer of herpes simplex virus thymidine kinase. *Hepatology.* 1995;22(1):118-123. doi:10.1002/hep.1840220119
250. McCracken MN, Cha AC, Weissman IL. Molecular Pathways: Activating T Cells after Cancer Cell Phagocytosis from Blockade of CD47 "Don't Eat Me" Signals. *Clin Cancer Res.* 2015;21(16):3597-3601. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2520
251. Miyata T, Oyama T, Yoshimatsu T, et al. The Clinical Significance of Cancer Stem Cell Markers ALDH1A1 and CD133 in Lung Adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 2017;37(5):2541-2547. doi:10.21873/anticancer.11597
252. Chen J, Zheng DX, Yu XJ, et al. Macrophages induce CD47 upregulation via IL-6 and correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Oncimmunology.* 2019;8(11). doi:10.1080/2162402X.2019.1652540
253. Wan S, Zhao E, Kryczek I, et al. Tumor-associated macrophages produce interleukin 6 and signal via STAT3 to promote expansion of human hepatocellular carcinoma stem cells. *Gastroenterology.* 2014;147(6):1393-1404. doi:10.1053/j.gastro.2014.08.039
254. Blois SM, Piccioni F, Freitag N, et al. Dendritic cells regulate angiogenesis associated with liver fibrogenesis. *Angiogenesis.* 2014;17:119-128. doi:10.1007/s10456-013-9382-5
255. Llovet JM, Ducreux M, Lencioni R, et al. EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2012;56(4):908-943. doi:10.1016/j.jhep.2011.12.001
256. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2002;31(4):339-346. doi:10.1038/ng0802-339
257. Yang JD, Nakamura I, Roberts LR. The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma: Current status and therapeutic targets. *Semin Cancer Biol.* 2011;21(1):35-43. doi:10.1016/j.semcancer.2010.10.007
258. Filliol A, Schwabe RF. Contributions of Fibroblasts, Extracellular Matrix, Stiffness, and Mechanosensing to Hepatocarcinogenesis. *Semin Liver Dis.* 2019;39(3):315-333. doi:10.1055/s-0039-1685539
259. Wu S-D, Ma Y-S, Fang Y, Liu L-L, Fu D, Shen X-Z. Role of the microenvironment in hepatocellular carcinoma development and progression. *Cancer Treat Rev.* 2012;38(3):218-225. doi:10.1016/j.ctrv.2011.06.010
260. Sevic I, Spinelli FM, Cantero MJ, et al. The Role of the Tumor Microenvironment in the Development and Progression of Hepatocellular Carcinoma. In: *Hepatocellular Carcinoma.* Codon Publications; 2019:29-45. doi:10.15586/hepatocellularcarcinoma.2019.ch2
261. Vigetti D, Karousou E, Viola M, Deleonibus S, De Luca G, Passi A. Hyaluronan: Biosynthesis and signaling. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2014;1840(8):2452-2459.

- doi:10.1016/j.bbagen.2014.02.001
262. Tanaka A, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res.* 2017;27(1):109-118. doi:10.1038/cr.2016.151
263. Greten TF, Duffy AG, Korangy F. Hepatocellular carcinoma from an immunologic perspective. *Clin Cancer Res.* 2013;19(24):6678-6685. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1721
264. Longo V, Gnoni A, Gardini AC, et al. Immunotherapeutic approaches for hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2017;8(20):33897-33910. doi:10.18632/oncotarget.15406
265. Sangro B, Gomez-Martin C, De La Mata M, et al. A clinical trial of CTLA-4 blockade with tremelimumab in patients with hepatocellular carcinoma and chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2013;59(1):81-88. doi:10.1016/j.jhep.2013.02.022
266. Malvicini M, Rizzo M, Alaniz L, et al. A novel synergistic combination of cyclophosphamide and gene transfer of interleukin-12 eradicates colorectal carcinoma in mice. *Clin Cancer Res.* 2009;15(23):7256-7265. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1861
267. Csoka AB, Stern R. Hypotheses on the evolution of hyaluronan: A highly ironic acid. *Glycobiology.* 2013;23(4):398-411. doi:10.1093/glycob/cws218
268. Poltavets V, Kochetkova M, Pitson SM, Samuel MS. The role of the extracellular matrix and its molecular and cellular regulators in cancer cell plasticity. *Front Oncol.* 2018;8(OCT). doi:10.3389/fonc.2018.00431
269. Du Y, Liu H, He Y, et al. The Interaction between LYVE-1 with Hyaluronan on the Cell Surface May Play a Role in the Diversity of Adhesion to Cancer Cells. *PLoS One.* 2013;8(5). doi:10.1371/journal.pone.0063463
270. Lawrance W, Banerji S, Day AJ, Bhattacharjee S, Jackson DG. Binding of hyaluronan to the native lymphatic vessel endothelial receptor LYVE-1 is critically dependent on receptor clustering and hyaluronan organization. *J Biol Chem.* 2016;291(15):8014-8030. doi:10.1074/jbc.M115.708305
271. Turley E a., Noble PW, Bourguignon LYW. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem.* 2002;277:4589-4592. doi:10.1074/jbc.R100038200
272. Toole BP. Hyaluronan-CD44 Interactions in Cancer: Paradoxes and Possibilities. *Clin Cancer Res.* 2009;15(24):7462-7468. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0479
273. Jiang D, Liang J, Fan J, et al. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med.* 2005;11(11):1173-1179. doi:10.1038/nm1315
274. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, et al. Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via Toll-like receptor 4. *J Exp Med.* 2002;195(1):99-111. doi:10.1084/jem.20001858
275. Makkar S, Riehl TE, Chen B, et al. Hyaluronic acid binding to TLR4 promotes proliferation and blocks apoptosis in colon cancer. *Mol Cancer Ther.* 2019;18(12):2446-2456. doi:10.1158/1535-7163.MCT-18-1225
276. Yoshida E, Kudo D, Nagase H, et al. Antitumor effects of the hyaluronan inhibitor 4-methylumbelliferone on pancreatic cancer. *Oncol Lett.* 2016;12(4):2337-2344. doi:10.3892/ol.2016.4930

277. Nagase H, Kudo D, Suto A, et al. 4-methylumbelliferone suppresses hyaluronan synthesis and tumor progression in SCID mice intra-abdominally inoculated with pancreatic cancer cells. *Pancreas*. 2017;46(2):190-197. doi:10.1097/MPA.0000000000000741
278. Urakawa H, Nishida Y, Wasa J, et al. Inhibition of hyaluronan synthesis in breast cancer cells by 4-methylumbelliferone suppresses tumorigenicity in vitro and metastatic lesions of bone in vivo. *Int J Cancer*. 2012;130:454-466. doi:10.1002/ijc.26014
279. García-Vilas JA, Quesada AR, Medina MÁ. 4-Methylumbelliferone inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem*. 2013;61(17):4063-4071. doi:10.1021/jf303062h
280. Malvicini M, Ingolotti M, Piccioni F, et al. Reversal of gastrointestinal carcinoma-induced immunosuppression and induction of antitumoural immunity by a combination of cyclophosphamide and gene transfer of IL-12. *Mol Oncol*. 2011;5(3):242-255. doi:10.1016/j.molonc.2011.03.007
281. Yoo JE, Kim Y-J, Rhee H, et al. Progressive Enrichment of Stemness Features and Tumor Stromal Alterations in Multistep Hepatocarcinogenesis. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170465. doi:10.1371/journal.pone.0170465
282. Ma S, Lee TK, Zheng B-J, Chan KW, Guan X-Y. CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene*. 2008;27(12):1749-1758. doi:10.1038/sj.onc.1210811
283. Nishiyama M, Tsunedomi R, Yoshimura K, et al. Metastatic ability and the epithelial-mesenchymal transition in induced cancer stem-like hepatoma cells. *Cancer Sci*. 2018;109(4):1101-1109. doi:10.1111/cas.13527
284. Feng M, Chen JY, Weissman-Tsukamoto R, et al. Macrophages eat cancer cells using their own calreticulin as a guide: roles of TLR and Btk. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(7):2145-2150. doi:10.1073/pnas.1424907112
285. Liu Q, Wen W, Tang L, et al. Inhibition of SIRP α in dendritic cells potentiates potent antitumor immunity. *Oncoimmunology*. 2016;5(9). doi:10.1080/2162402X.2016.1183850
286. Sia D, Villanueva A, Friedman SL, Llovet JM. Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. *Gastroenterology*. 2017;152(4):745-761. doi:10.1053/j.gastro.2016.11.048
287. Lin B, Chen T, Zhang Q, et al. FAM83D associates with high tumor recurrence after liver transplantation involving expansion of CD44+ carcinoma stem cells. *Oncotarget*. 2016;7(47):77495-77507. doi:10.18632/oncotarget.12715
288. Zhao Q, Zhou H, Liu Q, et al. Prognostic value of the expression of cancer stem cell-related markers CD133 and CD44 in hepatocellular carcinoma: From patients to patient-derived tumor xenograft models. *Oncotarget*. 2016;7(30):47431-47443. doi:10.18632/oncotarget.10164
289. Chen W, Dong J, Haiech J, Kilhoffer M-C, Zeniou M. Cancer Stem Cell Quiescence and Plasticity as Major Challenges in Cancer Therapy. *Stem Cells Int*. 2016;2016:1740936. doi:10.1155/2016/1740936
290. Capece D, Fischietti M, Verzella D, et al. The inflammatory microenvironment in

- hepatocellular carcinoma: A pivotal role for tumor-associated macrophages. *Biomed Res Int.* 2013;2013. doi:10.1155/2013/187204
291. Tacke F. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases. *J Hepatol.* 2017;66(6):1300-1312. doi:10.1016/j.jhep.2017.02.026
292. Andreichenko IN, Tsitrina AA, Fokin A V., et al. 4-methylumbelliferone Prevents Liver Fibrosis by Affecting Hyaluronan Deposition, FSTL1 Expression and Cell Localization. *Int J Mol Sci.* 2019;20(24). doi:10.3390/ijms20246301
293. Takai H, Ashihara M, Ishiguro T, et al. Involvement of glypican-3 in the recruitment of M2-polarized tumor-associated macrophages in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2009;8(24):2329-2338. doi:10.4161/cbt.8.24.9985
294. Yeung OWH, Lo CM, Ling CC, et al. Alternatively activated (M2) macrophages promote tumour growth and invasiveness in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2015;62(3):607-616. doi:10.1016/j.jhep.2014.10.029
295. Liu CP, Zhang X, Tan QL, et al. NF- κ B pathways are involved in M1 polarization of RAW 264.7 macrophage by polyporus polysaccharide in the tumor microenvironment. *PLoS One.* 2017;12(11):e0188317. doi:10.1371/journal.pone.0188317
296. Pagie S, Gérard N, Charreau B. Notch signaling triggered via the ligand DLL4 impedes M2 macrophage differentiation and promotes their apoptosis. *Cell Commun Signal.* 2018;16(1). doi:10.1186/s12964-017-0214-x
297. Klopffleisch R. Macrophage reaction against biomaterials in the mouse model – Phenotypes, functions and markers. *Acta Biomater.* 2016;43:3-13. doi:10.1016/j.actbio.2016.07.003
298. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol.* 2020;877:173090. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173090
299. Zheng X, Turkowski K, Mora J, et al. Redirecting tumor-associated macrophages to become tumoricidal effectors as a novel strategy for cancer therapy. *Oncotarget.* 2017;8(29):48436-48452. doi:10.18632/oncotarget.17061
300. Baer C, Squadrito ML, Laoui D, et al. Suppression of microRNA activity amplifies IFN- γ -induced macrophage activation and promotes anti-tumour immunity. *Nat Cell Biol.* 2016;18(7):790-802. doi:10.1038/ncb3371
301. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(7):399-416. doi:10.1038/nrclinonc.2016.217
302. Waidmann O, Köberle V, Bettinger D, et al. Diagnostic and prognostic significance of cell death and macrophage activation markers in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2013;59(4):769-779. doi:10.1016/j.jhep.2013.06.008
303. Shi Q, Zhao L, Xu C, Zhang L, Zhao H. High molecularweight hyaluronan suppresses macrophage M1 polarization and enhances IL-10 production in PM2.5-induced lung inflammation. *Molecules.* 2019;24(9). doi:10.3390/molecules24091766
304. Sun Y-F, Xu Y, Yang X-R, et al. Circulating stem cell-like epithelial cell adhesion molecule-positive tumor cells indicate poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Hepatology.* 2013;57(4):1458-1468. doi:10.1002/hep.26151

305. Fan Q-M, Jing Y-Y, Yu G-F, et al. Tumor-associated macrophages promote cancer stem cell-like properties via transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2014;352(2):160-168. doi:10.1016/j.canlet.2014.05.008
306. Zhu F, Li X, Chen S, Zeng Q, Zhao Y, Luo F. Tumor-associated macrophage or chemokine ligand CCL17 positively regulates the tumorigenesis of hepatocellular carcinoma. *Med Oncol.* 2016;33(2):1-12. doi:10.1007/s12032-016-0729-9
307. Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer Stem Cells: Impact, Heterogeneity, and Uncertainty. *Cancer Cell.* 2012;21(3):283-296. doi:10.1016/j.ccr.2012.03.003
308. Zhen FY, Ngai P, Ho DW, et al. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. *Hepatology.* 2008;47(3):919-928. doi:10.1002/hep.22082
309. Kahn M. Can we safely target the WNT pathway? *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(7):513-532. doi:10.1038/nrd4233
310. Wu Q, Zhou W, Yin S, et al. Blocking Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1-Positive Tumor-Associated Macrophages Induced by Hypoxia Reverses Immunosuppression and Anti-Programmed Cell Death Ligand 1 Resistance in Liver Cancer. *Hepatology.* 2019;70(1):198-214. doi:10.1002/hep.30593
311. Sangro B, Chan SL, Meyer T, Reig M, El-Khoueiry A, Galle PR. Diagnosis and management of toxicities of immune checkpoint inhibitors in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2020;72(2):320-341. doi:10.1016/j.jhep.2019.10.021
312. Li X, Yao W, Yuan Y, et al. Targeting of tumour-infiltrating macrophages via CCL2/CCR2 signalling as a therapeutic strategy against hepatocellular carcinoma. *Gut.* 2017;66(1):157-167. doi:10.1136/gutjnl-2015-310514
313. Lo J, Lau EYT, Ching RHH, et al. Nuclear factor kappa B-mediated CD47 up-regulation promotes sorafenib resistance and its blockade synergizes the effect of sorafenib in hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology.* 2015;62(2):534-545. doi:10.1002/hep.27859
314. Binnewies M, Mujal AM, Pollack JL, et al. Unleashing Type-2 Dendritic Cells to Drive Protective Antitumor CD4+ T Cell Immunity. *Cell.* 2019;177(3):556-571.e16. doi:10.1016/j.cell.2019.02.005
315. Salmon H, Idoyaga J, Rahman A, et al. Expansion and Activation of CD103+ Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity.* 2016;44(4):924-938. doi:10.1016/j.immuni.2016.03.012
316. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 1998;4(3):328-332. doi:10.1038/nm0398-328
317. Small EJ, Fratesi P, Reese DM, et al. Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. *J Clin Oncol.* 2000;18(23):3894-3903. doi:10.1200/JCO.2000.18.23.3894
318. Butterfield LH, Ribas A, Dissette VB, et al. A phase I/II trial testing immunization of hepatocellular carcinoma patients with dendritic cells pulsed with four α -fetoprotein peptides. *Clin Cancer Res.* 2006;12(9):2817-2825. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-

319. Lee WC, Wang HC, Hung CF, Huang PF, Lia CR, Chen MF. Vaccination of advanced hepatocellular carcinoma patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells: A clinical trial. *J Immunother.* 2005;28(5):496-504. doi:10.1097/01.cji.0000171291.72039.e2
320. Nakamoto Y, Mizukoshi E, Tsuji H, et al. Combined therapy of transcatheter hepatic arterial embolization with intratumoral dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma: Clinical safety. *Clin Exp Immunol.* 2007;147(2):296-305. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03290.x
321. Butterfield LH. Recent advances in immunotherapy for hepatocellular cancer. *Swiss Med Wkly.* 2007;137(5-6):83-90. doi:10.4414/smw.2007.11077
322. O'Beirne JP, Harrison PM. The role of the immune system in the control of hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2004;16(12):1257-1260. doi:10.1097/00042737-200412000-00003
323. Schumacher L, Ribas A, Dissette VB, et al. Human dendritic cell maturation by adenovirus transduction enhances tumor antigen-specific T-cell responses. *J Immunother.* 2004;27(3):191-200. doi:10.1097/00002371-200405000-00003
324. Cerundolo V, Hermans IF, Salio M. Dendritic cells: A journey from laboratory to clinic. *Nat Immunol.* 2004;5(1):7-10. doi:10.1038/ni0104-7
325. Cao J, Kong FH, Liu X, Wang XB. Immunotherapy with dendritic cells and cytokine-induced killer cells for hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2019;25(27):3649-3663. doi:10.3748/wjg.v25.i27.3649
326. Mullins DW, Sheasley SL, Ream RM, Bullock TNJ, Fu YX, Engelhard VH. Route of immunization with peptide-pulsed dendritic cells controls the distribution of memory and effector T cells in lymphoid tissues and determines the pattern of regional tumor control. *J Exp Med.* 2003;198(7):1023-1034. doi:10.1084/jem.20021348
327. Fong L, Brockstedt D, Benike C, Wu L, Engleman EG. Dendritic Cells Injected Via Different Routes Induce Immunity in Cancer Patients. *J Immunol.* 2001;166(6):4254-4259. doi:10.4049/jimmunol.166.6.4254
328. Dhodapkar M V., Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med.* 2001;193(2):233-238. doi:10.1084/jem.193.2.233
329. Slingluff CL, Petroni GR, Yamshchikov G V., et al. Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells. *J Clin Oncol.* 2003;21(21):4016-4026. doi:10.1200/JCO.2003.10.005
330. Jonuleit H, Giesecke-Tuettenberg A, Tütting T, et al. A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer.* 2001;93(2):243-251. doi:10.1002/ijc.1323