



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Caracterización de células tumorales circulantes en pacientes con carcinoma hepatocelular. Función de EpCAM en la metástasis

Ana Carolina Rhodes Cabrerizo

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES
CIRCULANTES EN PACIENTES CON CARCINOMA
HEPATOCELULAR.
FUNCIÓN DE EpCAM EN LA METÁSTASIS.**

Tesis presentada por

Ana Carolina Rhodes Cabrerizo

para optar al título de doctora

Universidad de Barcelona

Hospital Clínic de Barcelona

Unidad de Oncología Hepática

Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

Directores:

Jordi Bruix Tudó

Loreto Boix Ferrero

Tutora:

Neus Agell Jané

El Dr. Jordi Bruix Tudó y la Dra. Loreto Boix Ferrero como directores y Neus Agell Jané como tutora,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral **CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES EN PACIENTES CON CARCINOMA HEPATOCELULAR. FUNCIÓN DE EPCAM EN LA METÁSTASIS**, realizada en la Unidad de Oncología hepática del Hospital Clínic de Barcelona y presentada por **Ana Carolina Rhodes Cabrerizo** para optar al título de Doctora en el Programa de Doctorado en Biomedicina por la Universidad de Barcelona, cumple todos los requisitos necesarios para su depósito y para ser defendida delante del tribunal de evaluación correspondiente.

Dr. Jordi Bruix Tudó

Dra. Loreto Boix Ferrero

Dra. Neus Agell Jané

Ana Carolina Rhodes Cabrerizo

En cada puesta de sol
y cuando despunte el alba
(MLCD)

A papá, a mamá, a mi hermano
y a Sergi, que conocen mis
luces y mis sombras.

Agradecimientos

Este tendría que ser el apartado más sencillo de esta tesis. No hay que leer artículos, contrastar información ni discutir resultados y, sin embargo, se me antoja el más difícil de todos. Agradecer tanto a tantos me resulta complicado. Resumir en unas líneas la gratitud que siento por quienes me habéis acompañado en este trayecto puede parecer fácil pero no lo es en absoluto.

Quisiera empezar con una mención especial a Loreto, mi directora. Loreto, recuerdo perfectament el dia que et vaig conèixer, el 28 de desembre del 2012. Ho sé perquè era el dia dels Sants Innocents i vaig pensar que fer una entrevista aquell dia havia de ser una broma. Recordo molt bé l'entrevista, em vas dir: fem estudis amb "ratolinets" i vas riure i després em vas explicar algunes de les coses que fèieu. Moltes coses no les vaig entendre però sí que vaig entendre que tu disfrutaves fent ciència. Abans d'aquella entrevista havia fet d'altres, però en cap d'elles havia vist en ningú tanta passió pel que m'explicaven como la que vaig veure en tu. Un mes més tard, el dia del meu aniversari, em trucaries per dir-me que podia començar la meva tesi amb vosaltres. Al llarg d'aquest quatre anys totes dues hem viscut moments molt bons, però també hi ha hagut de dolents. Hem passat per moments durs, tant al laboratori com a nivell personal i en tots ells sempre m'has demostrat fortalesa, humilitat, una gran voluntat per fer que tot anés de la millor manera possible, una notable preocupació per mi, una extraordinària implicació en la meva feina i una comprensió increïble per les meves situacions i estats d'ànim. Has sabut escoltar i esperar a que parlés. Sempre disposada a ajudar-me, a tranquil·litzar-me quan ho he necessitat. Has estat la meva directora, però no només això. Has estat el meu referent científic. Has sigut crítica en la meva feina, has corregit la meva tesi fins a l'extrem, amb comentaris, crítiques i suggerències que, tot i que en alguns moments m'han costat de pair, m'han permés, ens han permés, obtenir finalment aquesta tesi, que és meva, és cert. Però també teva, perquè sense tu no hagués arribat fins aquí. Així que gràcies Loreto, gràcies per aquest aprenentatge, per aquesta lliçó de ciència, per aquesta lliçó de vida.

També vull agrair a Jordi, el meu co-director, l'oportunitat que m'ha brindat de fer la tesi en aquest grup. Recordo perfectament el meu primer dia. Em vas dir que teníem un "proyecto chistera" i mira per on, ha acabat sent la meva tesi! Admiro la teva manera de liderar un grup, confiant en la feina de cadascú de nosaltres, delegant tasques, estimulants-nos a llegir, a estudiar, a qüestionar tot, sempre. Ets un referent en el camp de l'hepatologia, disposes d'una

Agradecimientos

experiencia i uns coneixements envejables i, en canvi, tens la capacitat de explicar-ho tot de manera molt planera. Sempre m'has mostrat disponibilitat absoluta en prestar-me la teva ajuda quan ho he necessitat. Gràcies per haver-me donat l'oportunitat de créixer al BCLC.

Neus, la meva tutora. Gràcies per l'interès que has mostrat durant el meu doctorat, els teus consells i la teva ajuda.

Juanma, el técnico. Y creo que no hay mejor manera de describirlo. Porque él es así, técnico por excelencia. Capaz de explicarte cada detalle de una técnica, cada paso de un protocolo con una precisión infinita. Agradezco tus enseñanzas, tus consejos. Siempre te has mostrado dispuesto a ayudarme. Me has dedicado el tiempo que he necesitado, me has enseñado los secretos de los westerns, los misterios de cultivos, las virtudes de un ELISA. ¡Gracias JuanMa!

Josep, tu llegada al lab trajo alegría. Te quise enseñar y aprendías solo. Te quise ayudar a diseñar experimentos y los montabas sin diseño previo, te quise mostrar a hacer gráficos y lo único que me pediste es si podía pasarte el graphpad. Has sido mi predoc en mi última etapa de predoc y te lo agradezco. Eres el morenito. Eres la pelota desestresante. Eres las galletas en caja de cartón hechas por tu madre. Eres el FACS y los tubos lilas. Eres predoc Josep, pero algún día, aunque parezca increíble, tú también estarás escribiendo unas líneas similares a estas hablando de mí. Ese día Josep, ese día, tú también serás doctor.

Cristina, llegaste para quedarte cuando yo no estaba. Te he enseñado y he aprendido. Te he mostrado los trucos de cultivos, la técnica del western, los misterios de las IPs. He compartido sensaciones y alegrías contigo. Has mostrado interés en cada explicación, en cada comentario científico. Has aportado equilibrio y serenidad. Has sido mi canguro celular. ¡Gracias!

Esther, has venido al lab en mi recta final, en esta carrera de obstáculos con una línea de meta. Las mañanas son mejores cuando llegas. Ese micromundo tan nuestro, tan de las madrugadoras, me ha permitido ver en ti a alguien grande. Dispuesta siempre. ¡Un placer!

Agradecimientos

En esta tesis no sólo hemos participado los miembros del laboratorio, también hay médicos y enfermeras. Ellas: Neus, Gemma y Adela, gracias por tantas extracciones de sangre para mi estudio. Y médicos que se han implicado en el reclutamiento de pacientes: María, Álvaro y Álex. Quisiera hacer una mención especial a Álex, ya que fue él quien me puso en contacto con Loreto y ha sido él quien me ha ayudado en gran parte del análisis estadístico de los pacientes.

Isabel y Cristina de citometría, horas son las que habéis pasado optimizando el análisis de las muestras, buscando soluciones a cada problema que nos hemos encontrado. Agradezco vuestra experiencia, vuestra ayuda, vuestra disposición y vuestros consejos.

Este proyecto no hubiera sido posible sin la disposición altruista de los pacientes incluidos en él. Gracias a todos y cada uno de vosotros por participar. Tampoco hubiera sido posible sin los ratones que hemos utilizado. Siento el dolor que os hayamos podido causar, las molestias ocasionadas, la vida enjaulada. Me gustaría pensar que los resultados han merecido la pena.

Gracias, cómo no, al Azu's lab al completo. Me habéis hecho sentir una más de vosotras. Os conozco y me conocéis como si hubiéramos compartido poyata y pipeta. Helena, conecto contigo de una manera especial. Sé cuándo las cosas van bien y cuando podrían ir mejor. Ana, tu sensibilidad te hace única. Nuria, la bailarina incansable, la excursionista de fondo. Elena, la tenacidad hecha predoc. Miriam, la técnico con más historias. Alba y Aida, las últimas incorporaciones y pura diversión. Isa, siempre aprendiendo, siempre buscando. Marisol, la postdoc mallorquina. Hugo, simplemente entrañable. Azu, gracias por acogerme como a una más. Y Montse... Tú vienes de antes, de mucho antes. Tu sensibilidad y empatía traspasa fronteras. Me has demostrado lo que te importo en infinidad de ocasiones. Me has enseñado que no existen las edades, que sólo hay corazones y luces de colores.

Gracias a todos mis compañeros de la tercera planta del CEK, a todos. A los que están y a los que estuvieron. Todos me habéis aportado cosas positivas, de todos he aprendido. Y especialmente quiero agradecer el tiempo que he pasado con Luis y con Iris en cultivos. Ese ha sido nuestro confesionario, el gabinete psicológico, el quita-miedos, el patio del colegio. Iris, ha sido un verdadero placer encontrarte.

Agradecimientos

Pepa, la lab manager más dispuesta. Todo en orden, todo bajo control. Cada problema con su solución. Pura eficiencia.

Quisiera agradecer también los momentos que he compartido con las bionenes (Mariona, Cristina, Marta y Alba). Con vosotras empecé esta locura de carrera científica. Pasé la época más agri dulce de mi vida. Ahora cada una sigue su camino, pero todavía quedan ratos compartidos.

A mis amigos de siempre. Vosotros que habéis crecido conmigo, que me habéis acompañado en este viaje. A Gemma, Liz, Georgina, Nuria T y Nuria R. A Carlos, Joel y Ricard. A vosotros que me habéis visto arriba y abajo y siempre habéis estado a mi lado. Gracias por estar cuando más os he necesitado.

A mi familia, tíos, primos y abuelos, que piensan que voy a descubrir la cura del cáncer. A mi tía, que dice que soy muy lista, que lo voy a hacer divinamente y que qué sucede con esto del cáncer, que esto antes no pasaba, que si es que se contagia o qué. De ella, de mi tía, he aprendido lo que es la bondad con mayúsculas y la superación. Ella, que ha vivido el dolor en carne propia, habla de alegrías y de sonrisas. Ella, sin ser consciente, me ha enseñado algunas de las lecciones más importantes de mi vida.

Miguel. Eres mi hermano, pero también eres mucho más. Siempre lejos e infinitamente cerca. Cuando era pequeña tuve que escribir una redacción sobre alguien a quien admirara y la escribí sobre ti. Si ahora me volvieran a pedir que escribiera sobre alguien a quien admiro, de quien me siento orgullosa, volvería sin duda a hablar de ti. Hemos crecido y seguimos creciendo. Sabemos lo que es sentir dolor y sonreír. Yo soy cauta, reflexiva, temerosa... tú eres pura decisión. Tan distintos, tan iguales, tan nosotros. Te agradezco todo: de pequeños los juegos, las peleas, cómo cuidabas de mí... de mayores: tus palabras, tus miradas, tu fuerza, tus abrazos con posturas inventadas para que los corazones latan más cerca, tus consejos. Y te agradezco a Viand, la alegría hecha personita, la nueva generación. Gracias a ella soy tía. Gracias a ella tengo un motivo más para sonreír.

Agradecimientos

Sergi, mi compañero de viaje. Eres mi amor, mi amigo, eres mi día y mi noche. Conoces mis claro-oscuros, eres mi risa y mi llanto. Eres la calma y yo soy el nervio. Juntos conseguimos todo. Aceptas mis aciertos y mis errores, me levantas cuando caigo y me acompañas en el vuelo. A lo largo de mi doctorado te he intentado explicar mis experimentos. Todo ha quedado resumido a que las proteínas corren, inyecto cáncer a ratones y hago experimentos con celulitas. En realidad, mi tesis simplificada ha sido eso. Y esa es tu esencia, la capacidad de hacer sencillo lo complicado. La mía es justamente la contraria, yo complico lo simple, yo me enredo con hilos y formo madejas enteras. Pero siempre estás tú, tirando del hilo, desenredando el enredo y tejiendo conmigo ésta que es nuestra vida. Así que gracias, gracias por ser mi mitad, no sé muy bien desde cuándo.

Mamá, tú me conoces mejor que nadie. Siempre me has mostrado tu apoyo incondicional. Tus consejos, tu fuerza y tu coraje han sido decisivos en cada acción de mi vida. Eres una mezcla de acero y miel. Siempre me has mostrado un amor infinito, has estado conmigo siempre, dispuesta a todo por mi bienestar. Cuando se nos partió la vida sacaste fuerzas no sé muy bien de dónde y me animaste a sonreír, a seguir disfrutando, a luchar y a vencer. Te agradezco tanto, te agradezco todo. La vida, a veces, no te lo ha puesto nada fácil, pero siempre has sido tenaz, has luchado y has conseguido salir adelante, has logrado mantenernos a flote y me has animado a seguir mis sueños, a volar bien alto. Gracias por apoyarme en mi doctorado y cada día de mi vida. Gracias por ser mi madre.

Papá, siempre y eterno. Te fuiste demasiado pronto, demasiado rápido, demasiado lejos. Me enseñaste a vivir, crecí contigo, aprendí lo qué es el amor infinito de un padre, de tu mano recorrí una parte de mi vida, me mostraste la belleza de las amapolas, caminamos juntos, disfrutamos mucho, siempre pendiente de mí, siempre dispuesto a escuchar mis historias, mis inquietudes, animándome a sonreír. Siempre esa mirada tan dulce, tan cercana, tan tuya y tan nuestra, siempre cómplices. Siempre... hasta que se puso el Sol. Pero tengo la alegría de haberte tenido, de haberte disfrutado y me siento profundamente agradecida y orgullosa de ti. Así que gracias, gracias por haber sido mi padre y por seguir siéndolo. Me gustaría que supieras que seré doctora y ese día levantaré mi copa y brindaré por ti.

ÍNDICE

I.	ABREVIATURAS	11
II.	INTRODUCCIÓN	19
1.	El hígado	21
1.2.	Anatomía hepática	21
1.3.	Histología hepática	22
1.4.	Daño y regeneración hepática	24
1.5.	Fibrosis y cirrosis hepática	25
1.6.	Tumores hepáticos malignos	27
2.	Carcinoma hepatocelular (CHC)	28
2.1.	Etiología	28
2.2.	Dimorfismo sexual	29
2.3.	Factores de riesgo	31
2.4.	Hepatocarcinogénesis	34
2.5.	Criterios de diagnóstico del CHC	36
2.5.1.	Biopsia líquida y monitorización tumoral	37
2.5.2.	Alfa-feto proteína	38
2.6.	Opciones terapéuticas	38
2.6.1.	Cirugía: Resección quirúrgica y trasplante hepático	38
2.6.2.	Ablación percutánea	39
2.6.3.	Tratamientos transarteriales: Quimioembolización transarterial ..	40
2.6.4.	Tratamientos sistémicos	41
2.7.	Heterogeneidad tumoral	41
2.8.	Transición Epitelio-mesénquima	43
3.	Células tumorales circulantes	46
3.1.	Importancia de las CTCs	47
3.2.	Métodos de detección y caracterización de las CTCs	47
3.3.	Migración colectiva	56
4.	EpCAM	58
4.1.	Señalización	60

4.2. Papel en el desarrollo tumoral	62
4.2.1. Proliferación	62
4.2.2. Metástasis	63
4.3. EpCAM en el hígado y CHC	63
4.4. EpCAM en la biopsia líquida	64
5. MUC1	65
5.1. Estructura	65
5.2. Señalización	66
5.3. c-MET con MUC1	67
III. OBJETIVOS	69
Objetivo 1: Detectar y caracterizar CTCs en pacientes con CHC	71
Objetivo 2: Estudiar la función de EpCAM en la metástasis del CHC	71
IV. METODOLOGÍA	73
A. Detección y caracterización de CTCs	75
1. Pacientes incluidos en el estudio	75
2. Sistemas de análisis de CTCs	75
3. Obtención de muestras	75
4. Metodologías de análisis de CTCs	76
4.1. CellSearch (Veridex)	76
4.2. Real Time-q PCR	76
4.3. ImageStream AMNIS (Merck Millipore)	82
B. Función de EpCAM en la metástasis	87
5. Cultivos celulares	87
5.1. Líneas celulares	87
5.2. Técnicas comunes de cultivos celulares	89
5.2.1. Medio de cultivo	89
5.2.2. Tripsinización y cambio de medio	90
5.2.3. Criopreservación	90
5.2.4. Microscopía	91
6. Transfección vector EpCAM (electroporación)	91

7. Silenciamiento génico mediante lentivirus	93
7.1. Silenciamiento de EpCAM	93
7.2. Silenciamiento de CLDN7	96
8. Extracción de RNA	97
9. Cuantificación de RNA	98
10. Retrotranscripción (RT)	98
11. Real Time-q PCR	99
12. Western blot (WB)	101
12.1. Cultivo celular para extracción de proteína	101
12.2. Extracción de proteína	102
12.1.1. Extracción de proteína total	102
12.1.2. Extracción de proteína nuclear	103
12.3. Cuantificación de proteína	105
12.4. Preparación de muestras para cargar el gel	105
12.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-page)	107
12.6. Transferencia del gel a la membrana de nitrocelulosa	108
12.7. Hibridación de anticuerpos	109
12.8. Revelado por quimioluminiscencia	111
13. Inmunofluorescencia	111
14. Inmunohistoquímica	114
15. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	116
16. Ensayo de proliferación	117
16.1. Ensayo MTS para células con doble fenotipo	117
16.2. Protocolo cristal violeta para células que crecen adheridas	118
17. Ensayo de invasión sobre matrigel	119
18. Ensayo de invasión sobre colágeno IV	119
19. Ensayo de migración	120
20. Ensayo de formación de esferoides	121
21. Co-inmunoprecipitación (Co-IP)	122
22. Modelo murino	123
23. Análisis estadístico	125

V.	RESULTADOS.....	127
	Resultados objetivo 1.....	129
	Resultados objetivo 2.....	133
VI.	DISCUSIÓN.....	169
VII.	CONCLUSIONES.....	181
VIII.	ANEXO.....	187
	1. Hoja de Consentimiento Informado para el paciente participante en el protocolo de investigación.....	189
	2. Sistema de estadificación BCLC.....	193
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	195

I. ABREVIATURAS

Abreviaturas

A	amperios
aa	aminoácido
ACTA1	α -actina
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AFP	alfa feto proteína
AKT	del inglés <i>protein kinase B</i>
ALT	alanina aminotransferasa
AMPc	adenosin monofosfato cíclico
ANGPT2	del inglés <i>angiopoietin</i>
APC	del inglés <i>allophycocianin</i>
AR	del inglés <i>androgen receptor</i>
ARN	ácido ribonucleico
AST	aspartato aminotransferasa
ATP	del inglés <i>adenosine triphosphate</i>
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer
BSA	del inglés <i>bovine serum albumine</i>
CAF	del inglés <i>cancer associated fibroblast</i>
CAM	del inglés <i>cell adhesion molecule</i>
CBP	cirrosis biliar primaria
CD	del inglés <i>cluster of differentiation</i>
CCNA1	Ciclina A1
CCND1	Ciclina D1
CCNE1	Ciclina E1
CDH1	E-Cadherina
CDH2	N-Cadherina

Abreviaturas

CDK	del inglés <i>cyclin dependant kinases</i>
CEC	célula epitelial circulante
CHC	carcinoma hepatocelular
CIC	del inglés <i>cancer-initiating cell</i>
CK7	citoqueratina 7
CK19	citoqueratina 19
CLDN7	claudina 7
CSC	del inglés <i>cancer stem cell</i>
CTC	célula tumoral circulante
CTNNB1	β -catenina
DAB	del inglés <i>3,3'-diaminobenzidine</i>
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DM	diabetes mellitus
DMSO	dimetilsulfoxido
DPBS	del inglés <i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
DTC	del inglés <i>disseminated tumor cell</i>
EGFR	del inglés <i>epithelial growth factor receptor</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGF	del inglés <i>epidermal growth factor</i>
EGFR	del inglés <i>epidermal growth factor receptor</i>
EN	extracto nuclear
ER	del inglés <i>estrogen receptor</i>
ET	extracto total
EpCAM	del inglés <i>Epithelial Cell Adhesión Molecule</i>
EpEX	dominio extracelular de EpCAM
EpICD	dominio intracelular de EpCAM
EPISPOT	del inglés <i>epithelial immunospot</i>

Abreviaturas

E2F	del inglés <i>transcription factor E2</i>
Fas	del inglés <i>cluster of differentiation 95</i>
FasL	del inglés <i>fas ligand</i>
FCS	del inglés <i>fetal calf serum</i>
FDA	del inglés <i>Food and Drug Administration</i>
FGF	del inglés <i>fibroblast growth factor</i>
FGFR3	del inglés <i>fibroblast growth factor receptor 3</i>
FHL2	del inglés <i>four and one-half LIM domains protein 2</i>
FISH	del inglés <i>fluorescent in situ hybridization</i>
GEM	del inglés <i>glycolipid-enriched microdomains</i>
GFP	del inglés <i>green fluorescent protein</i>
GH	del inglés <i>growth hormone</i>
GS	glutamina sintasa
GPC3	gypican-3
HAI	hepatitis autoimmune
HGF	del inglés <i>hepatocyte growth factor</i>
HGFR (o-MET)	del inglés <i>hepatocyte growth factor receptor</i>
HH	hemochromatosis hereditaria
HER2	del inglés <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HSF1	del inglés <i>heat shock factor 1</i>
HSPC	del inglés <i>hepatic stem/progenitor cell</i>
HSP70	del inglés <i>heat shock protein 70</i>
HSP90	del inglés <i>heat shock protein 90</i>
IGF1	del inglés <i>insulin-like growth factor 1</i>
IGFR1	del inglés <i>insulin-like growth factor receptor 1</i>
IgG	inmunoglobulina
ILGFBP1	del inglés <i>insulin-like growth factor binding protein 1</i>

Abreviaturas

IL1	interleucina 1
IL-1R	receptor de IL1
IL6	interleucina 6
Kb	kilobases
LEF	del inglés <i>lymphoid enhancer binding factor 1</i>
LGDN	del inglés <i>low-grade dysplastic nodules</i>
microF	microfarad
MEC	matriz extracelular
MMP	metaloproteasa
ms	milisegundo
mTOR	del inglés <i>mammalian target of rapamycin</i>
MUC1	mucina 1
NASH	de inglés <i>non-alcoholic steatohepatitis</i>
NFkb	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NK	del inglés <i>natural killer</i>
NNK	4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBMC	del inglés <i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PCR	del inglés <i>polymerase chain reaction</i>
PDGFRb	del inglés platelet-derived growth factor receptor b
PE	del inglés <i>phycoerythrin</i>
PEI	del inglés <i>percutaneous ethanol injection</i>
PI3K	fosfoinositol 3-quinasa
PI3P	fosfoinositol-3-fosfato
PRL	prolactina
PSEN2	del inglés <i>presenilin-2</i>

Abreviaturas

PTEN	fosfatidilinositol-3, 4, 5-trisfosfato 3-fosfatasa
P21	del inglés <i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
Rb	del inglés <i>retinoblastoma</i>
RFA	del inglés <i>radiofrequency ablation</i>
RIP	proteólisis intramembrana
RPLP0	del inglés <i>ribosomal protein large P 0</i>
RTK	del inglés <i>receptor tyrosine kinasa</i>
RM	resonancia magnética
rpm	revoluciones por minuto
RIP	del inglés <i>regulated intermembrane proteolysis</i>
RT-PCR	del inglés <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SDS	dodecilsulfato sódico
SEA	del inglés <i>sea-urchin sperm protein, enterokinase and agrin</i>
SNPs	del inglés <i>single nucleotide polymorphisms</i>
SRs	receptores de secretina
TA	temperatura ambiente
TACE	del inglés <i>TNF-alfa converting enzyme</i>
TACE	del inglés <i>transarterial chemoembolization</i>
TACE	del inglés <i>tumor-necrosis-factor alpha converting enzyme</i>
TACSTD	del inglés <i>tumor-associated calcium signal transducer</i>
TAM	macrófago infiltrante tumoral
TARE	del inglés <i>transarterial radioembolization</i>
TBP	del inglés <i>TATA-binding protein</i>
TC	tomografía computarizada
TCF4	del inglés <i>transcription factor 4</i>
TEM	transición epitelio-mesénquima
TEM	del inglés <i>tetraspanin-enriched microdomains</i>

Abreviaturas

TGF β	del inglés <i>tumor growth factor beta</i>
TLR4	del inglés <i>toll-like receptor 4</i>
TNF α	del inglés <i>tumoral necrosis factor alfa</i>
TNF β	del inglés <i>tumoral necrosis factor beta</i>
TNFR1	del inglés <i>tumor necrosis factor receptor 1</i>
TJ	del inglés <i>tight junctions</i>
TME	transición mesénquima-epitelio
TP53	factor de transcripción, proteína supresora de tumores
TRAF6	del inglés <i>TNF receptor-associated factor 6</i>
TY	tiroglobulinas
UA	unidades arbitrarias
V	voltio
VEGF	del inglés <i>vascular endothelial growth factor</i>
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
VHB	virus de la hepatitis B
VHC	virus de la hepatitis C
WNT	del inglés <i>wingless</i>

II. INTRODUCCIÓN

1. El hígado

Es el órgano glandular de mayor tamaño del organismo con un peso de unos 1400 gramos en las mujeres y 1800 gramos en los hombres (Cascales, 2008).

Tiene múltiples funciones, entre las que destaca su implicación en el metabolismo de los carbohidratos, los lípidos y las proteínas, la síntesis de bilis y de factores de coagulación, la neutralización de toxinas, el almacenaje de múltiples sustancias y la transformación del amoníaco en urea (Cascales, 2008; Sibulesky, 2013).

1.2 Anatomía hepática

El hígado está situado en la parte superior derecha de la cavidad abdominal, detrás de las costillas, debajo del diafragma y por encima del estómago, el riñón derecho y los intestinos. Mide en su diámetro mayor o transversal de 20 a 22,5 cm. La zona lateral derecha, verticalmente, mide entre 15 y 17 cm y su mayor diámetro dorso-ventral es de 10 a 12,5 cm. Tiene la forma de una cuña con la base a la derecha y el ápice a la izquierda, tiene una región diafragmática convexa, extensa y relativamente lisa y otra región visceral, cóncava y más irregular (Sibulesky, 2013).

A nivel externo, el hígado está dividido por el ligamento falciforme, que forma un lóbulo derecho mayor y un lóbulo izquierdo más pequeño. El ligamento falciforme une el hígado con la pared abdominal anterior. Se divide en ocho segmentos funcionales independientes, cada uno de los cuales tiene su propio pedúnculo portal, formado por una rama arterial hepática, una rama de la vena porta, un conducto biliar y la rama venosa hepática que lleva el flujo de salida. Los segmentos II, III y IV forman conjuntamente el lóbulo izquierdo del hígado. A su vez, el lóbulo derecho está formado por los segmentos V y VIII (segmentos anteriores) y los segmentos VI y VII (segmentos posteriores). El segmento I se encuentra en la parte posterior (Soler, 2001; Liau, 2004).

1.3. Histología hepática

El tejido del parénquima hepático está compuesto de lóbulos unidos por un tejido areolar extremadamente fino en el cual se ramifican los vasos sanguíneos, linfáticos, biliares y los nervios, estando todo el conjunto revestido por una túnica fibrosa y una serosa.

La histología del hígado consiste en la repetición de una estructura básica denominada lobulillo hepático. Los lobulillos suelen estar separados entre sí por tejido conectivo. Tienen forma de prisma poligonal que mide de 1 a 2 mm de diámetro. En secciones transversales tiene una forma aproximada de hexágono con una vena central. En los vértices del hexágono, entre lobulillos contiguos, se encuentran los espacios portales formados por tejido conectivo y por las triadas portales. Los vasos portales y la vena central se comunican gracias a capilares que discurren entre los hepatocitos denominados capilares sinusoidales, cuya pared está compuesta por una capa discontinua de células endoteliales fenestradas que carecen de membrana basal. Estos capilares discurren de forma radial, recogen el fluido de las venas portas y arterias de los vértices, además de la secreción endocrina de los hepatocitos, y confluyen en el centro del lobulillo para liberar su contenido en la vena centrolobulillar. La confluencia de las venas centrolobulillares da lugar a las venas hepáticas que finalmente drenan en la vena cava inferior (Megías, 2013).

El hígado presenta la siguiente composición celular:

- Células parenquimáticas: son los hepatocitos, células epiteliales que constituyen el 80% del tejido hepático. Son células de forma poliédrica. En su interior se encuentran uno o dos núcleos. Si tienen solo un núcleo, éstos suelen ser poliploides. En el citoplasma de estas células encontramos un elevado número de mitocondrias y un retículo endoplasmático prominente. Tienen inclusiones de glucógeno y ocasionalmente de grasa en su citoplasma. Son las células hepáticas las encargadas de la síntesis proteica, de la gluconeogénesis y glucogenolisis, de la síntesis de la bilis y del metabolismo de muchas toxinas (Gomes, 2013).
- Células no parenquimáticas
 - o Células sinusoidales:
 - Células endoteliales: Son las células que tapizan la superficie del sinusoides. Estas células endoteliales difieren de las que se encuentran en el endotelio vascular del resto del organismo porque carecen de

membrana basal y disponen de fenestras (Cascales, 2008; Gomes, 2013).

- Células perisinusoidales
 - Células de Kupffer: son células fagocíticas hepáticas situadas a lo largo del sinusoides hepático.
 - Células de Ito: se localizan en el espacio perisinusoidal de Disse (estrecho espacio perisinusoidal que se encuentra entre la pared de los sinusoides y las láminas de hepatocitos, ocupado por una red de fibras reticulares y plasma sanguíneo que baña la superficie de los hepatocitos) (Cascales, 2008).
 - Células Pit o trampa: son de estirpe linfocítica, tipo “natural killer” (NK). Son linfocitos situados en la luz del sinusoides hepático, próximas a las células endoteliales y a las células de Kupffer (Peng, 2016).
- Células ductulares: son células caracterizadas por un fenotipo intermedio entre los hepatocitos y las células que constituyen el epitelio biliar y que pueden diferenciarse a hepatocitos (Sirica, 1995).
- Células conjuntivas: son las células que participan de la cohesión de los diferentes elementos hepáticos y conforman el medio en el que se distribuyen los nervios, los conductos biliares y los vasos sanguíneos hepáticos.
- Colangiocitos: son células epiteliales que constituyen entre el 3 y el 5% del total de las células hepáticas. Son las células que forman los epitelios de los conductos biliares (Kanno, 2000) y tienen un papel importante en la composición de la bilis ya que a medida que ésta viaja por los conductos biliares, los colangiocitos segregan o absorben agua, electrolitos y otros solutos orgánicos (Alpin, 1988; Glaser, 2009). Cabe destacar la heterogeneidad existente, así, aquellos colangiocitos que forman parte de los conductos biliares cuyo diámetro supera las 15 micras son células grandes y con una estructura columnar, mientras que los que constituyen las vías biliares más pequeñas son células de menor tamaño (Schaffner, 1961; Steiner, 1961;

Benedetti, 1996) y cuboideas con muy poco citoplasma (Yong, 2016). A estos dos tipos de colangiocitos que forman los conductos biliares se les ha de añadir las células progenitoras situadas en las glándulas peribiliares y que pueden diferenciarse a colangiocitos (Cardinale, 2011; Carpino, 2012).

El 80% del volumen hepático está formado por los diferentes tipos celulares y el 20% restante corresponde a los espacios extracelulares y a la matriz extracelular (MEC). Ésta se sitúa en el espacio porta, en continuidad con el tejido conjuntivo de la cápsula de Glisson, en el espacio de Disse perisinusoidal y en las venas centrolobulillares y está compuesta de colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas. Es el sostén para las células parenquimáticas, refuerza la arquitectura del órgano y hace posible el intercambio de moléculas entre los hepatocitos, lo que resulta fundamental para el mantenimiento de las funciones diferenciadas de todas las células residentes en el hígado (Cequera, 2014).

La interacción existente entre los diferentes tipos celulares y la MEC es esencial para el mantenimiento de la homeostasia. Esta interacción es extremadamente compleja y frágil y representa un papel fundamental en la fibrosis y en la oncogénesis hepática (Rojkind, 1994; Blanc, 2002).

1.4. Daño y regeneración hepática

El hígado se caracteriza por poseer una notable capacidad de proliferar y autorregenerarse (Michalopoulos, 1997.) En la situación de daño hepático leve o moderado la regeneración es llevada a cabo por los hepatocitos maduros independientemente de la existencia de células progenitoras (Michalopoulos 1997; Oertel, 2008). Sin embargo, cuando el daño hepático es demasiado extenso y el número de hepatocitos maduros residuales no es suficiente como para producir la regeneración, o bien cuando su proliferación está inhibida, como ocurre en presencia de carcinógenos, hepatotoxinas o infecciones virales, la regeneración hepática depende de la activación de células progenitoras multipotenciales, que dan origen a los hepatoblastos, células bipotenciales (Faris, 2001; Lorenti, 2001). Éstas tienen capacidad clonogénica y son capaces de generar los dos tipos de células principales del hígado: hepatocitos y colangiocitos (Dabeva, 1993; Fausto, 1994). Los hepatoblastos expresan una variedad de marcadores, muchos de ellos compartidos con las células progenitoras hematopoyéticas (CD117/c-kit, CD133 y CD90), con los colangiocitos (citoqueratina 19 (CK19),

dipeptidilpeptidasa IV) y con los hepatocitos (albúmina, glucosa-6-fosfatasa y α 1-antitripsina) (Grompe, 2001). Durante la regeneración hepática, los hepatoblastos se originan en la región periportal (alrededor de los canales de Hering) e invaden el parénquima por completo, dando lugar a hepatocitos maduros como producto de su diferenciación (Lemire, 1991; Kim, 2004). La regeneración hepática recapitula muchos de los eventos que caracterizan el proceso de organogénesis, desde los cambios observados en la arquitectura hepática (Papp, 2009) hasta el perfil de expresión de genes (Jochheim-Richter, 2006; Nakatsuka, 2007).

1.5. Fibrosis y cirrosis hepática

La fibrosis es una respuesta del hígado a la lesión crónica producida por diversas agresiones, como enfermedades metabólicas, infecciones virales, abuso en la ingesta de alcohol o drogas, o enfermedad autoinmune que provoca daño o anomalías congénitas (Cequera, 2014).

Es la acumulación de cicatrices fibrosas y duras en el hígado. Pero hasta llegar a este punto es necesaria una sucesión de eventos que empiezan con un daño hepático por cualquiera de las causas mencionadas. Este proceso hace que los hepatocitos sufran daños o mueran, momento en que se activa el sistema inmunológico haciendo que el proceso de reparación entre en escena, induciéndose la liberación de citocinas, factores de crecimiento y otras sustancias químicas por parte de las células inmunitarias. Estos mensajeros químicos, producidos en parte por las células de Kupffer, activan las células de Ito que comienzan a producir colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos. Todas estas sustancias tienden a reparar, como si de una cicatrización se tratara, las zonas dañadas por la muerte de las células hepáticas afectadas.

Todos estos elementos se depositan en el hígado, provocando la acumulación de MEC. Al mismo tiempo se altera el proceso de descomposición o degradación del colágeno. En un tejido sano, existe equilibrio entre la síntesis (fibrogénesis) y la degradación (fibrólisis) del tejido matricial. La fibrosis aparece cuando se altera ese equilibrio, es decir, cuando el tejido se acumula a un ritmo más rápido del que puede ser degradado y eliminado por el hígado. Así, en el hígado fibrótico, los componentes de la MEC son similares a los presentes en el hígado normal pero en mayor cantidad. La estructura normal de la matriz presente en el espacio subendotelial se transforma en una matriz de tipo intersticial con alto contenido fibroso. El componente proteico se deposita inicialmente en el espacio porta o en la vena central, conduciendo al desarrollo de conexiones fibrosas entre las estructuras vasculares, seguidas de

la pérdida de fenestras en el endotelio sinusoidal, hecho que altera la arquitectura hepática y se forman nódulos de regeneración hepática, característicos de la cirrosis, siendo ésta el estadio final de todas las enfermedades hepáticas crónicas progresivas (Friedman, 2008; Leeue, 2011). Además se produce la pérdida de las microvellosidades de los hepatocitos, hecho que todavía expande más la MEC e irrumpe en la vascularización normal del hígado. Todo ello contribuye al deterioro de la función del órgano y favorece la progresión hacia un órgano cirrótico (Friedman, 2000) (Fig. 1).



Figura 1: Progresión de la enfermedad hepática. Hígado sano, fibrótico y cirrótico (Pellicoro, 2014)

En el pasado se consideraba que la cirrosis nunca era reversible, sin embargo, desde hace una década el concepto de cirrosis ha pasado de ser un estadio estático a un proceso dinámico. Actualmente se conoce que cuando se elimina la agresión fundamental que ha producido la cirrosis, existe cierto grado de regresión de la fibrosis (Friedman, 2006; García-Tsao, 2010; Trautwein, 2015).

Las complicaciones de la cirrosis son las mismas, independientemente de la causa. La cirrosis cursa en dos fases distintas: cirrosis compensada y descompensada. Los pacientes con cirrosis compensada suelen ser asintomáticos y presentan una supervivencia a 5 años superior al 90%. Sin embargo, los pacientes con cirrosis descompensada presentan una función hepática comprometida, trastornos en la circulación con aumento de la presión portal (presión de la sangre en el territorio portal, en las venas abdominales). Este aumento puede causar la aparición de varices esofágicas y retención de agua con edemas en miembros inferiores y ascitis (acumulación de líquido en el abdomen), así como ictericia o encefalopatía hepática (Tsochatzis, 2014).

La edad de aparición se sitúa en torno a los 40 o 50 años, aunque también se han descrito casos infantiles y no es excepcional que un paciente sea cirrótico durante muchos años sin sintomatología (García Buey, 2012). Es una enfermedad más frecuente en el sexo masculino, probablemente porque la infección por los virus y el alcoholismo son más frecuentes en el varón (Askgaard, 2015). Aproximadamente el 90% de las causas de cirrosis hepática en países occidentales son el abuso de alcohol, “non-alcoholic steatohepatitis” (NASH) y la infección vírica crónica (Lefton, 2009). La cirrosis es la causa principal del desarrollo de un carcinoma hepatocelular (CHC), el tipo de cáncer de hígado más frecuente (Forner, 2016).

1.6. Tumores hepáticos malignos

Existen varios tipos de cáncer de hígado originados en los diferentes tipos celulares que conforman el órgano y cuya incidencia en la población es muy distinta:

- Carcinoma fibrolamelar: tumor maligno que representa alrededor del 1% de los tumores hepáticos. Afecta principalmente a adolescentes y adultos jóvenes y se presenta como una masa tumoral hepática única, frecuentemente de gran tamaño, no asociada a cirrosis y rodeada de una cápsula fibrosa. Su diseminación es preferentemente a través de metástasis linfáticas regionales (Berman, 1988).
- Hepatoblastoma: Es un tumor hepático maligno raro originado a partir de células precursoras hepáticas que afecta principalmente a bebés y niños hasta los tres años. Puede estar asociado al síndrome de Wiedemann-Beckwit, a la poliposis adenomatosa familiar y al síndrome alcohólico-fetal (DeBaun, 1998).
- Angiosarcoma: Tumor maligno originado en el endotelio vascular. Además de aparecer en los vasos hepáticos, también puede hacerlo en otros órganos. Representa el 1 % del total de tumores hepáticos malignos y su origen en la mayoría de los casos es desconocido, aunque se ha asociado a exposiciones a radiación y a sustancias carcinogénicas (Molina, 2012). Se presenta como una masa abdominal con signos y síntomas inespecíficos y con muy mal pronóstico (Almogi, 2004).
- Colangiocarcinoma: Cáncer en las vías biliares. Es el segundo cáncer de hígado más frecuente con un porcentaje de entre el 10 y el 20 % de los tumores hepáticos malignos diagnosticados. Surge a partir de la transformación maligna de los colangiocitos de los conductos biliares. La mayoría de los pacientes no presentan ninguna enfermedad de base ni existen factores de riesgo asociados (Bridgewater, 2014). Puede aparecer en la vías biliares intra y extrahepáticas (Moeni, 2015), siendo el de las vías intrahepáticas el que ha despertado mayor interés debido al aumento de sus tasas de incidencia y mortalidad (Bridgewater, 2014; Njei, 2014).
- Carcinoma hepatocelular: Es el cáncer de hígado más frecuente, constituyendo el 90% del total de cánceres hepáticos diagnosticados (Forner, 2016). Aparece en el contexto de enfermedad hepática crónica (Friemel, 2015). Aunque la secuencia de eventos moleculares que conducen a la carcinogénesis no se conoce exactamente, sí que se

sabe que el CHC resulta de un conjunto de alteraciones genéticas que tienen lugar en células progenitoras y/o en hepatocitos maduros, lo que permite la transformación maligna de un hígado cirrótico (Llovet, 2008; Zucman-Rossi, 2015).

2. Carcinoma Hepatocelular (CHC)

2.1. Etiología

El CHC es la tercera causa de muerte por cáncer y la decimosexta causa de muerte a nivel mundial (Naghavi, 2014; Forner, 2016). Es la sexta neoplasia con mayor incidencia y constituye el 90% de los cánceres de hígado. Afecta casi exclusivamente a individuos con enfermedad hepática crónica que han desarrollado cirrosis, siendo este tipo de cáncer la principal causa de muerte en esta población (Forner, 2016).

El CHC tiene una distribución mundial muy heterogénea relacionada con la prevalencia de los factores de riesgo asociados al desarrollo de la enfermedad. Su mayor incidencia se encuentra en el sureste asiático y África Subsahariana debido al virus de la hepatitis B (VHB), asociado o no a aflatoxinas, unos metabolitos secundarios tóxicos producidos principalmente por *Aspergillus flavus* (hongo que se encuentra en los cultivos de cereales como el arroz y que produce mutaciones en el gen supresor de tumores *TP53*). En regiones con bajo consumo de aflatoxinas y baja prevalencia de infección por el VHB (Estados Unidos o Gran Bretaña) las tasas de mutaciones de *TP53* son extremadamente bajas. La incidencia excede los 15 casos / 100000 habitantes / año (http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx).

En el sur de Europa, incluyendo España, la incidencia se sitúa entre los 5-10 casos / 100000 habitantes / año, mientras que la menor incidencia se encuentra en el norte de Europa y América con 5 casos / 100000 habitantes / año (Bosch, 2004; El-Serag, 2011), donde el virus de la hepatitis C (VHC) y el alcoholismo desempeñan un papel predominante (Morgan, 2004).

En los últimos años se han detectado cambios epidemiológicos en diversas áreas (Nordenstedt, 2010; Welzel, 2013) debido a la implementación universal de la vacuna contra VHB (Chang, 1997; Chang, 2016) hecho que ha comportado una menor incidencia de la enfermedad en las regiones afectadas por VHB. Contrariamente, la incidencia de CHC ha incrementado en el Reino Unido, Canadá y Estados Unidos debido a la diseminación de la infección crónica por VHC (Khan, 2002; elSaadany, 2001; El-Serag, 2012). En España, el VHC es el mayor factor de

riesgo asociado al desarrollo de CHC y existen datos que indican una mayor incidencia en los últimos años (Ribes, 2004; Bosetti, 2008).

La edad de aparición habitual en las zonas de baja incidencia es en la edad madura (60 años), y en el adulto joven en las áreas de alto riesgo. La incidencia es más alta en los varones; 3 varones por cada mujer en áreas de bajo riesgo, y 7 varones por cada mujer en zonas de alto riesgo (www.seom.org).

2.2. Dimorfismo sexual

La incidencia de CHC es mayor en hombres que en mujeres (Clocchiatti, 2016). Pese a que inicialmente se pensaba que dicha diferencia era debida a los distintos hábitos de vida, se ha visto que existen otros factores para explicar este dimorfismo (Siegel, 2015; Torre, 2015). Los receptores de andrógenos (AR) y estrógenos (ER) contribuyen de manera antagonista al desarrollo del CHC: las señales mediadas por AR estimulan la proliferación y el metabolismo de nucleótidos y aminoácidos, mientras que ER ejercen el efecto contrario. Esta acción opuesta está controlada por la familia de factores de transcripción FOX (Li, 2012). Estos factores de transcripción regularán unos u otros genes dependiendo de si contactan con ER o AR (Li, 2009). Así, ER junto con FOX1/2 confiere protección respecto al desarrollo del CHC mediante la reducción de la producción de mediadores inflamatorios como IL6 y la inhibición de la proliferación celular por represión de la transcripción de *MYC* (Naugler, 2007; Li, 2009). Sin embargo, cuando son AR los que contactan con FOX1/2 se estimula este proceso (Li, 2012). (Fig. 2).

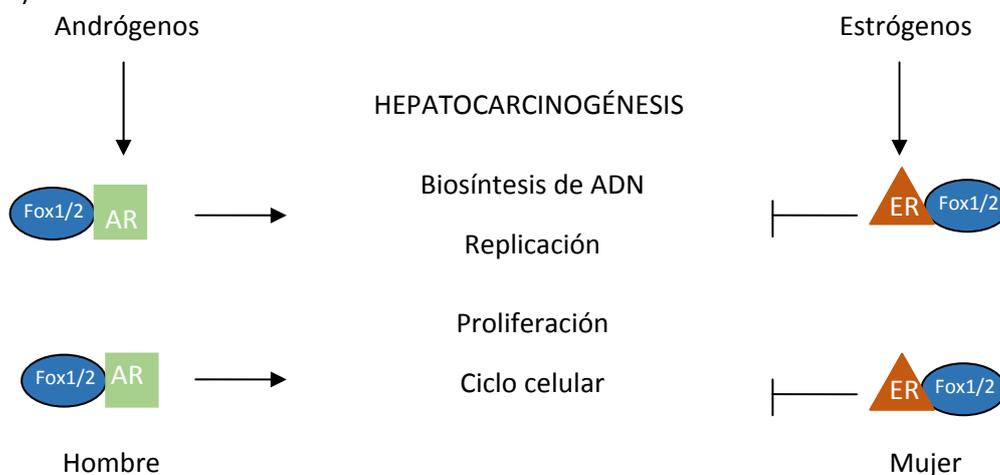


Figura 2: Papel de FOX1/2 en la hepatocarcinogénesis dependiendo de si contacta con AR o ER.

Los efectos de los estrógenos en el hígado también pueden regularse por su acción sobre el eje hipotalámico-pituitario-gonadal que controla la secreción hormonal (Yamamoto, 1993; Matic, 2013). Así, los estrógenos en las mujeres pueden modular la señalización de la hormona del crecimiento (GH) que se libera en menor cantidad pero con mayor frecuencia que en los hombres (Kerrigan, 1992; Baik, 2011), lo que permite a GH en el hígado inducir un patrón de expresión génica específico en cada sexo (Mode, 2006). El efecto de GH sobre la regulación génica está mediado por el factor de transcripción STAT5 (Mueller, 2011). La activación de STAT5 protege a los hepatocitos del daño hepático y la transformación maligna, lo que supone otra causa del dimorfismo sexual en el CHC (Mueller, 2011). Está descrito el efecto de STAT5 sobre el metabolismo lipídico: mutaciones en el receptor de GH y la señalización alterada de STAT5 se relacionan con esteatosis hepática (Fan, 2009). La expresión aberrante de STAT5 induce fibrosis y promueve CHC debido a la desregulación en la expresión de genes encargados de regular la progresión del ciclo celular (Hosui, 2009).

La menor susceptibilidad de las mujeres a padecer CHC también está controlada por la secreción de prolactina (PRL) que está controlada por los estrógenos (Yamamoto, 1995; Hartwell, 2014). PRL protege a las mujeres de la tumorigénesis hepática limitando la inflamación, mientras que en los hombres existe una mayor inducción de inflamación ante el daño celular (Hartwell, 2014), lo que supone un factor de riesgo para el desarrollo del CHC. Concretamente, el estímulo de PRL en las células hepáticas suprime la respuesta del receptor de Interleucina1 (IL-1R), “toll-like receptor 4” (TLR4) y “tumor necrosis factor receptor 1” (TNFR1) debido a la degradación de proteínas adaptadoras como TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6), lo que acaba suprimiendo la activación de c-MYC y la proliferación celular (Hartwell, 2014).

También existen diferencias genéticas entre ambos sexos debidas a genes localizados en los cromosomas X e Y. La activación del gen TSPY localizado en el cromosoma Y o el silenciamiento del gen TSPX situado en el cromosoma X contribuyen al inicio y a la progresión del CHC. Así, alteraciones en la expresión de genes específicos de estos cromosomas tienen un efecto protector o inductor respecto al CHC (Kido, 2014; Kido, 2015; Clocchiatti, 2016) (Fig. 3).

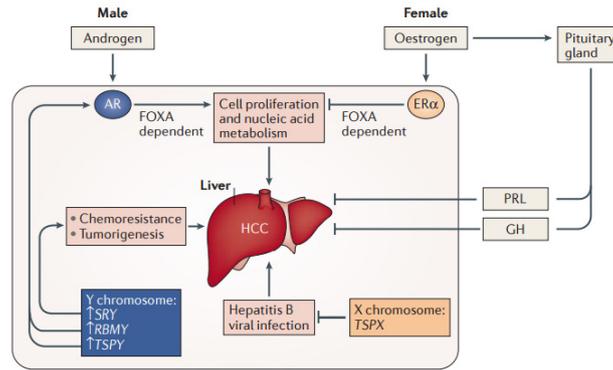


Figura 3: Causas de dimorfismo sexual en el desarrollo de CHC (Clocchiatti, 2016).

2.3. Factores de riesgo

El riesgo de padecer CHC se adquiere al establecerse la cirrosis hepática, asociada a procesos inflamatorios, necróticos y regenerativos que dañan el hígado a nivel estructural y molecular. Por tanto, cualquier enfermedad que pueda dar lugar a daño hepático como hemocromatosis hereditaria, cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune, infección por VHB y VHC, diabetes mellitus (Adami, 1996; El-Serag, 2004; Schlesinger, 2009), alcoholismo, factores asociados con el síndrome metabólico (Powell, 1990; Ratzu, 2002; Calle, 2003; Regimbeau, 2004; Dyson, 2014) y tabaquismo se asocian con un incremento de la muerte asociada a CHC. Además, la coinfección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en pacientes afectados por infección crónica de VHB o VHC comporta una progresión más rápida de la enfermedad hepática, incrementando la incidencia del CHC (MacDonald, 2008; Salmon-Ceront, 2009; Iannou, 2013; Merchante, 2014).

- Infección por VHB:

En las áreas de alta incidencia de VHB la infección se transmite predominantemente de la madre a los recién nacidos y en cerca del 90% de los casos la infección se cronifica. En las áreas de baja incidencia, la infección es adquirida a través de vía sexual y/o parenteral y en el 90% de los casos las infecciones agudas se resuelven espontáneamente (Castells, 2006).

La infección crónica por el VHB produce una serie de efectos sobre el metabolismo celular que condicionan el desarrollo de un CHC. La necrosis de los hepatocitos ocasionada por la persistencia de la replicación del VHB induce una respuesta inflamatoria con la síntesis por parte de las células del sistema mononuclear fagocítico de citoquinas que estimulan la proliferación de los hepatocitos (Brechot, 2000; Brechot, 2004). Esta proliferación celular,

asociada a una mayor expresión de ciclina A1 (CCNA1) (Zhang, 2002) favorece alteraciones en el ciclo celular, la reparación de las cuales puede condicionar la aparición de mutaciones o reordenamientos cromosómicos que pueden llegar a ser determinantes en la transformación neoplásica. A pesar de que la mayoría de los CHC se presentan sobre un hígado cirrótico, en los casos de CHC relacionados con la infección crónica por el VHB, y a diferencia de lo que sucede con la infección crónica por el VHC, este hecho no siempre se cumple y el tumor puede presentarse sobre una hepatitis crónica (Castells, 2006).

- Infección por VHC:

Algunas de las infecciones por VHC tienen remisión espontánea pero la mayoría cronifican dando lugar a una cirrosis hepática que puede acabar desembocando en CHC (Kamal, 2008). Esto es debido a que VHC induce inflamación hepática, fibrosis, promueve la transformación maligna de las células infectadas y tiene un efecto oncogénico directo (Lemon, 2012; Mittal, 2013).

El VHC es la causa más común de la enfermedad hepática crónica en Estados Unidos, Australia y Europa, convirtiéndose en el principal motivo de trasplante hepático en estas regiones (Thimme, 2001). La hepatitis crónica y la cirrosis constituyen las principales lesiones preneoplásicas de la mayoría de CHC, tanto es así que el riesgo de padecer CHC en pacientes infectados por VHC es 17 veces mayor comparado con pacientes sin la infección (Donato, 2002; El-Serag, 2002).

- Alcoholismo:

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades hepáticas son responsables del 70% de las muertes asociadas al alcohol (Sheron, 2011). Su ingesta produce daño hepático a través de endotoxinas, estrés oxidativo e inflamación (Sherman, 2002; Testino, 2013).

A pesar de que la ingesta alcohólica incrementa el riesgo de padecer CHC debido al desarrollo de cirrosis, no existen evidencias de que el alcohol por sí solo tenga efecto carcinogénico. Actúa en sinergia VHB y VHC acelerando el proceso fibrótico y la progresión a cirrosis (Mittal, 2014).

- Síndrome metabólico y diabetes mellitus (DM):

Es un conjunto de condiciones fisiológicas tales como aumento de la presión sanguínea, resistencia a la insulina, grasa abdominal, elevados niveles de colesterol y triglicéridos, estrés oxidativo, inflamación y diabetes mellitus (DM), caracterizada por elevados niveles de glucosa en sangre debido a un defecto en la producción de insulina o a una resistencia a ella (Piero, 2014). Este síndrome lleva asociada la afectación del hígado (EASL–EASD–EASO, 2016).

Esa situación favorece la evolución de la enfermedad hepática. Inicialmente se presentan deposiciones de grasa en el hígado (Shaker, 2014; Rinella, 2015) que pueden derivar en NASH, siendo ésta la causa de enfermedades hepáticas crónicas tales como cirrosis y, en último término CHC (Baffy, 2012; Christopher, 2015).

- Tabaquismo:

El tabaco causa efectos adversos en órganos que no tienen contacto directo con el humo, como el hígado (El-Zayad, 2006). Es en este órgano donde ejerce tres tipos de efectos:

- Efectos tóxicos: las sustancias químicas que contiene el tabaco tienen potencial citotóxico e inducen estrés oxidativo, lo que promueve la activación de las células de Ito y el desarrollo de la fibrosis hepática (Watanabe, 1995; Husain, 2001).
- Efectos inmunológicos: el tabaco afecta a la respuesta celular y humoral (Sopori, 1998). La nicotina bloquea la proliferación linfocitaria y la diferenciación (Geng, 1996; Moszczyński, 2001), induce apoptosis linfocitaria, promueve la expresión de linfocitos citotóxicos T CD8+ y disminuye la de linfocitos T CD4+ (Moszczyński, 2001).
- Efectos oncogénicos: el tabaco contiene sustancias químicas nocivas, tales como hidrocarburos, nitrosamina y cloro (Helen, 1997; Wang, 1998) además de carcinógenos (Maser, 2004; Grando, 2014).

El tabaco se ha asociado a enfermedades hepáticas y es un factor independiente causante de NASH (Hamabe, 2011). Se considera un cofactor junto a VHB y VHC en la hepatocarcinogénesis (Alberti, 1999).

- Hemocromatosis hereditaria (HH):

Es un grupo de enfermedades de origen genético caracterizadas por una acumulación excesiva de hierro en los tejidos (Pietrangelo, 2010).

En este tipo de enfermedades se sobrepasa la capacidad de los hepatocitos de secuestrar el hierro, por lo que se acumulan iones metálicos en el citoplasma de los hepatocitos, las células de Kupffer y el epitelio biliar. Esto produce daño en la estructura y la función hepática, derivando hacia un hígado fibrótico, cirrótico y, si el proceso continúa, acaba desarrollándose CHC (Bradbear, 1985).

- Cirrosis biliar primaria (CBP):

Es una enfermedad autoinmune colestásica en la que hay una inflamación crónica caracterizada por la destrucción de los conductos biliares intrahepáticos, inflamación portal y progresiva fibrosis y cirrosis, hecho que puede acabar conduciendo al desarrollo de CHC (Prince, 2003; Rudic, 2012; Trivedi, 2016).

2.4. Hepatocarcinogénesis

Hay autores que proponen el proceso tumoral como una alteración celular que comporta seis consecuencias celulares básicas: autosuficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad a las señales pro-apoptóticas, capacidad de evadir la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, capacidad de mantener la angiogénesis y capacidad de invadir y metastatizar. En el caso del CHC este proceso se denomina hepatocarcinogénesis y tienen lugar en las células hepáticas (Hanaha, 2000).

El CHC ocurre como consecuencia de alteraciones celulares complejas y de exposiciones ambientales a carcinógenos y a virus que provocan el desarrollo de una enfermedad hepática crónica, lo que supone un primer estadio pre-neoplásico sobre el que se desarrollan la mayoría de los CHC.

Durante la hepatocarcinogénesis que tiene lugar sobre hígado cirrótico aparecen nódulos de regeneración (lesiones formadas por células hepáticas normales proliferativas rodeadas de estroma fibroso) que se caracterizan por una evolución hacia nódulos displásicos, considerados lesiones premalignas (Zucman-Rossi, 2015).

Generalmente, los nódulos displásicos oscilan entre 1 y 3 cm y se definen como nódulos de regeneración que contienen células atípicas con elevada condensación nuclear e irrigación con arteriolas y capilares sin signos histológicos de malignidad. Estos nódulos displásicos se dividen en dos grupos, los de bajo grado o “low-grade dysplastic nodules” (LGDN) y de alto grado o “high-grade dysplastic nodules” (HGDN). Los LGDN presentan una arquitectura y un perfil vascular hepáticos normales y tienen características citológicas con muy bajo potencial de malignización y una progresión muy lenta hacia un CHC. Sin embargo, los HGDN tienen cambios en la arquitectura celular, atipias citológicas e histológicas, tienen una capilarización sinusoidal y por arterias y progresan hacia un CHC más frecuentemente que un LGDN (Paradis, 2013; Quail, 2013).

El pronóstico del CHC depende de factores asociados al estadio tumoral, al grado de disfunción hepática y a la presencia de síntomas relacionados con neoplasia. Existen diferentes sistemas de estadiaje del CHC, siendo el sistema de estadiaje BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) el más usado en nuestro medio y aceptado en las guías de manejo clínico del CHC europeas (EASL-EORTC, 2012) y españolas (Forner, 2016). Según esta clasificación existen cinco estadios tumorales distintos:

- Estadio muy temprano, BCLC 0: un nódulo inferior a 2 cm y función hepática conservada.
- Estadio temprano, BCLC A: pacientes con un único nódulo menor de 5 cm o hasta tres nódulos menores de 3 cm y función hepática conservada.
- Estadio intermedio, BCLC B: pacientes asintomáticos con tumores grandes o aquellos multinodulares que sobrepasen los criterios definidos en el estadio inicial, en ausencia de invasión vascular/extrahepática.
- Estadio avanzado, BCLC C: pacientes con función hepática relativamente conservada que presentan un CHC con invasión vascular y/o extrahepática y/o presentan sintomatología leve relacionada con su neoplasia.
- Estadio terminal, BCLC D: pacientes con función hepática muy deteriorada con marcado deterioro del estado general (Forner, 2010; Mazzocoli, 2016).

La incidencia de alteraciones genéticas en el CHC es muy baja y se limita a unos pocos genes (Nishida, 2011). Estos son principalmente *TP53*, beta-catenina (*CTNNB1*), telomerasa (*TERT*) y Axina 1 (*AXIN1*) (Niu, 2016), aunque también se han descrito mutaciones en genes relacionados con remodelado de la cromatina, estrés oxidativo, señalización de la vía de RAS/MAPK y activadores de la transcripción génica (Fujimoto, 2012; Guichard, 2012; Kan,

2013; Kawai-Kitahata, 2016). Sin embargo, estos genes están mutados en menos del 10% de los CHCs. La alteración en el promotor TERT se ha descrito como la mutación más frecuente en CHC y ya se detecta mutado en lesiones cirróticas preneoplásicas (Nault, 2013; Nault, 2014). Mutaciones en *TP53*, *CTNNB1* y *TERT* tienen efectos aditivos en el desarrollo del CHC y se considera que son los “drivers” que promueven la proliferación y la invasión (Kan, 2013). Pese a que existen otros genes alterados como *MDM2*, *IL6ST* o *ARID1A* (Kan, 2013) asociados al desarrollo del CHC, estos son considerados “passengers” y están alterados en un porcentaje muy bajo de CHCs (Vogelstein, 2013).

Como consecuencia de estas alteraciones, varias cascadas de señalización relacionadas con la supervivencia y la proliferación celular se encuentran activadas. En más del 50% de los CHC la señalización de “epithelial growth factor receptor” (EGFR) y de Ras está activa (Villanueva, 2007), mientras que la vía de mTOR está alterada en el 50% de los casos debido a la inhibición del gen supresor de tumores fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (*PTEN*) o a mutaciones en fosfoinositol 3-quinasa (*PI3K*) (Sahin, 2004; Villanueva, 2008). Existe activación del “insulin-like growth factor receptor 1” (IGF1R) en el 20% de los CHC en estadio temprano y una desregulación de la vía de “hepatocyte growth factor” (HGF) y de “hepatocyte growth factor receptor” (c-MET o HGFR) (Villanueva, 2007).

La vía de “Wingless” (WNT) está activa en un tercio de los CHC como consecuencia de mutaciones en el factor de transcripción CTNNB1, sobreexpresión de receptores de WNT o desregulación de E-Cadherina (CDH1). Además, el CHC es un tumor muy vascularizado, por lo que es necesario una gran actividad angiogénica mediada por “vascular endothelial growth factor” (VEGF), “angiopoyetin” (ANGPT2) y “fibroblast growth factor” (FGF) (Farazi, 2006; Villanueva, 2007).

2.5. Criterios diagnósticos de CHC

El CHC puede diagnosticarse mediante técnicas de inmunohistoquímica a partir de una biopsia o por técnicas radiológicas no invasivas. El diagnóstico radiológico mediante técnicas de imagen dinámicas (tomografía computarizada (TC) y resonancia magnética (RM) con contraste) se basa en la irrigación exclusivamente arterial del CHC comparada con la irrigación mixta portal y arterial del parénquima hepático. Este fenómeno justifica el patrón radiológico específico del CHC caracterizado por una intensa captación de contraste en la fase arterial seguido de un lavado del contraste en la fase portal y tardía (“washout”). La presencia de este

patrón radiológico en un nódulo hepático detectado sobre un hígado con hepatopatía crónica permite el diagnóstico concluyente de CHC sin necesidad de obtener confirmación histológica (Bruix 2011; EASL-EORTC 2012; Forner 2016). La alta especificidad de este criterio diagnóstico no invasivo ha sido confirmada prospectivamente por diferentes autores (Forner, 2008; Sangiovanni, 2010; Khalili, 2011).

En un número relevante de casos, particularmente en lesiones pequeñas, el diagnóstico de CHC no es posible con técnicas de imagen ya que el diagnóstico se realiza en base a la hipervascularización de la lesión y cualquier lesión hepática pequeña con irrigación arterial y venosa podría ser diagnosticada como CHC cuando en realidad se trate de una hiperplasia nodular u otra lesión similar (Wanless, 2006; Forner, 2008; Kojiro, 2009). En estos casos, las guías de práctica clínica recomiendan la realización de una biopsia percutánea (Bruix 2011; EASL-EORTC 2012; Forner 2016). Desde el punto de vista histológico, el CHC se caracteriza por:

- Densidad celular aumentada con aumento de la ratio núcleo/citoplasma y patrón de trabécula fina irregular.
- Número variable de tractos portales en el nódulo.
- Patrón pseudoglandular.
- Transformación grasa difusa.
- Número variable de arterias no pareadas.
- Invasión estromal.
- Tinción inmunohistoquímica: Marcadores como el glypican-3 (GPC3), heat-shock protein 70 (HSP70) y glutamina-sintasa (GS) han sido evaluados en el CHC. Cuando se observa positividad para al menos dos marcadores, la especificidad es del 100%. Este panel podría tener utilidad para aquellos tumores que no presentan los criterios típicos en las pruebas radiológicas no invasivas y en los que la biopsia con tinción convencional con hematoxilina y eosina, no es diagnóstica o existen dudas entre nódulo displásico o hepatocarcinoma bien diferenciado (Di Tomasso, 2009; Tremosini, 2016).

2.5.1. Biopsia líquida y monitorización tumoral

La biopsia líquida consiste en la determinación de marcadores específicos de la presencia de células tumorales circulantes (CTCs) en una muestra de sangre del paciente. Puede ser de utilidad para determinar el pronóstico de la enfermedad tumoral y la respuesta terapéutica (Hofman, 2016). La biopsia líquida tiene la ventaja de ser un método no invasivo que puede ser

repetido a lo largo del seguimiento del paciente, ofreciendo información en cada uno de los momentos, lo que permite monitorizar la enfermedad (Pantel, 2013; Alix-Panabières, 2014; Hofman, 2014; Ilie, 2014).

2.5.2. Alfa-feto proteína (AFP)

Existen marcadores tumorales en sangre evaluados en el diagnóstico y el pronóstico del CHC, entre los que se encuentran AFP, GPC3 o Dickkof-1 (Marrero, 2009; Shen, 2012). De todos ellos, el más utilizado en la práctica clínica es la AFP. Lamentablemente, el uso de la AFP en el diagnóstico precoz está limitado por su baja sensibilidad y especificidad dado que sus valores en muchos casos son normales en tumores iniciales y en pacientes con cirrosis hepática pueden presentar elevaciones transitorias de AFP en ausencia de CHC (Trevisani, 2001; Forner, 2008b; Marrero, 2009; Lok, 2010). Otros marcadores como la fracción L3 de la AFP, GPC3 (Marrero, 2009; Lok 2010) o Dickkof-1 (Shen, 2012), no han podido demostrar superioridad respecto AFP. Con lo anteriormente expuesto, las principales guías de práctica clínica occidentales desaconsejan su uso (Bruix 2011; EASL-EORTC 2012; Forner 2016).

2.6. Opciones terapéuticas

2.6.1. Cirugía: Resección quirúrgica y trasplante hepático

La resección quirúrgica consiste en extraer el CHC. Es el tratamiento de elección en aquellos pacientes que han desarrollado CHC sobre hígado sano o en pacientes cirróticos con tumores únicos, buena función hepática y sin hipertensión portal. La supervivencia tras la resección en esta población oscila entre el 70-75% a 5 años (Llovet, 1999; Ishizawa, 2008).

Para aquellos pacientes con CHC unifocal pero presencia de hipertensión portal o disfunción hepática o en aquellos pacientes con más de un nódulo, la mejor opción es el trasplante hepático ya que permite erradicar todo el tumor y los posibles focos de diseminación intrahepática, lo que se asocia a una menor recurrencia del 8% (Mazzaferro, 1996) y a una supervivencia a 5 años superior al 70% (Finkelstein, 2003; Hasegawa, 2013), y además elimina la cirrosis hepática asociada. Sin embargo, el número de órganos disponibles es un factor limitante por lo que se han de establecer unos criterios para que un paciente pueda formar parte de la lista de espera para ser trasplantado. Los criterios más extendidos mundialmente

son los denominados Criterios de Milán (Mazzaferro, 1996), definidos como un único tumor menor o igual a 5 cm; tres tumores o menos, cada uno de los cuales tenga un tamaño menor o igual a 3 cm y no exista invasión vascular ni diseminación extrahepática (Mazzaferro, 2009).

La aplicación de los criterios de Milán se asocia a un bajo riesgo de recidiva tumoral (5-15%) tras el trasplante, pero posibilita el acceso al trasplante hepático a un pequeño número de pacientes con CHC (Jonas, 2001; Mazzaferro, 2009; Herrero, 2011). Actualmente no existe evidencia científica suficiente para proponer unos límites concretos para el trasplante hepático, más allá de los criterios de Milán, aunque algunos autores han propuesto que ciertos pacientes que sobrepasan moderadamente dichos criterios podrían beneficiarse de recibir un trasplante hepático (Toso, 2008; Mazzaferro, 2009). En uno de estos estudios, multicéntrico, realizado a nivel internacional y que incluyó un número muy elevado de pacientes, se diseñó un modelo para predecir la supervivencia. Éste se basa en el tamaño del nódulo principal, el número de nódulos, y la presencia o no de invasión microvascular en el explante (Mazzaferro, 2009). La conclusión del estudio es que a medida que nos alejamos del límite de los criterios de Milán, bien por aumento del tamaño o bien por aumento del número de nódulos, las cifras de supervivencia se van reduciendo, y en todos los casos, la presencia de invasión microvascular implica un peor pronóstico que en aquellos con igual número de nódulos y tamaño, sin invasión microvascular.

Cabe remarcar que la aceptación de expansión de los criterios de trasplante tendría como contrapartida un aumento de los potenciales candidatos, lo que podría ocasionar un aumento de la mortalidad en lista de espera (Herrero, 2011) ya que durante este tiempo hay un aumento progresivo del riesgo de que el tumor progrese, que determine la retirada del paciente de la lista, o de que la progresión determine mayor riesgo de recurrencia postrasplante (Freeman, 2006).

2.6.2. Ablación percutánea

Para aquellos pacientes en estadio inicial (BCLC 0-A) que no son candidatos a resección o trasplante, la ablación tumoral mediante técnicas basadas en la modificación de la temperatura por calor (radiofrecuencia o microondas) o frío (crioablación), o en la inyección de sustancias (etanol o ácido acético), ha demostrado ser útil en el control de la enfermedad con pocos efectos secundarios. Entre estas técnicas, las más empleadas son la inyección percutánea de alcohol (PEI) y la ablación mediante ondas de radiofrecuencia (RFA). Ambas técnicas son igualmente eficaces para tumores de hasta 2 cm, consiguiendo una ablación

completa en más del 90% de los mismos. Lamentablemente, la eficacia disminuye con el aumento del tamaño tumoral, especialmente con la PEI. Diferentes meta-análisis han demostrado que la RFA es superior a la PEI en términos de supervivencia (Germani, 2010), por lo que la RFA se ha convertido en la técnica de referencia, reservándose actualmente la PEI para aquellos nódulos en localizaciones de riesgo, donde la RFA podría provocar daño por calor y en lesiones adyacentes a grandes vasos. La recurrencia con el tratamiento percutáneo es tan alta como con la cirugía, habiéndose comunicado tasas de supervivencia de hasta el 80% a los cinco años (Lencioni, 2005; Forner, 2016).

2.6.3. Tratamientos transarteriales: Quimioembolización transarterial

En los pacientes con estadio intermedio (BCLC B) la quimioembolización transarterial (TACE) ha demostrado aumentar la supervivencia (Llovet, 2003). Consiste en la administración de quimioterapia por vía intraarterial con posterior embolización de la arteria nutricia tumoral. Los agentes quimioterápicos más usados son doxorubicina y cisplatino, mezclados con lipiodol, seguidos de material embolizante (Marelli, 2007). El material embolizante son unas partículas con capacidad para administrar el agente quimioterapéutico de forma retardada, de manera que la concentración de quimioterapia en la circulación sistémica se reduce significativamente y disminuyen los efectos adversos. La TACE mejora la supervivencia en aquellos pacientes asintomáticos, con función hepática preservada y sin evidencia de enfermedad extrahepática ni invasión vascular (Llovet 2002; Llovet, 2003). En los últimos años se han realizado avances en la técnica radiológica, siendo el más relevante la introducción de esferas biodegradables que permiten una embolización calibrada y una liberación sostenida del agente quimioterapéutico (Varela, 2007; Lammer, 2009).

En los últimos años se ha evaluado la eficacia de la radioembolización transarterial (TARE) en el CHC. Ésta consiste en la administración de partículas radiactivas por vía intraarterial, que quedan impactadas en la microcirculación tumoral. Existen múltiples estudios de cohortes que han mostrado resultados prometedores (Kulik, 2008; Sangro, 2011; Mazzaferro, 2013) pero hasta la fecha no existen ensayos clínicos que hayan demostrado eficacia en términos de supervivencia.

2.6.4. Tratamientos sistémicos

La quimioterapia sistémica no ha demostrado ser eficaz como tratamiento para el CHC (Bruix, 2011). En los últimos años se han producido grandes avances en el conocimiento de las vías moleculares que determinan el inicio y progresión del CHC. Esto ha permitido desarrollar agentes que bloquean aquellas vías alteradas. El primer agente en demostrar eficacia en términos de supervivencia fue sorafenib. Sorafenib es un fármaco que se administra vía oral, inhibidor multiquinasa que bloquea la señal transmitida por varios factores de crecimiento y que determina una inhibición de la proliferación y de la angiogénesis (Wilhelm, 2008). Tras los resultados esperanzadores de un estudio fase 2 (Abou-Alfa, 2006), se realizaron dos ensayos clínicos randomizados multicéntricos controlados con placebo que demostraron beneficio en términos de supervivencia y un enlentecimiento de la progresión tumoral (Llovet, 2008; Cheng, 2009). Se han reportado resultados positivos de un ensayo clínico randomizado y controlado contra placebo en el que se ha evaluado regorafenib en segunda línea en aquellos pacientes que han tolerado el tratamiento de sorafenib pero que han mostrado progresión tumoral (Bruix, 2016).

2.7. Heterogeneidad tumoral

Los CHC pequeños y bien diferenciados se asocian a mejor pronóstico comparados con los que están poco diferenciados y son de mayor tamaño (Hammoud, 2016). Los tumores poco diferenciados se caracterizan por la expresión génica relacionada con las vías de “tumor growth factor beta” TGF β , “protein kinase B” (AKT) y MYC (Mínguez, 2011), además de ser frecuentes las mutaciones inactivadoras del gen *TP53* y la activación de vía de señalización de CTNNB1 (Hammoud, 2016).

La heterogeneidad tumoral es debida a que las células que forman los tumores experimentan un proceso de selección que conlleva la formación de poblaciones con características distintas (Lu, 2016) (Fig. 4).

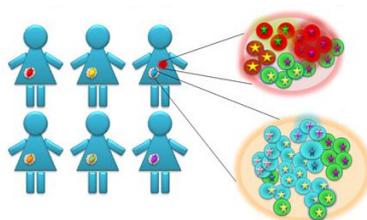


Figura 4: Representación de la heterogeneidad tumoral existente entre pacientes y en un tumor de un mismo paciente (Oslo University Hospital).

La heterogeneidad hace referencia tanto a aspectos morfológicos, como a expresión de proteínas y modificaciones genéticas (Friemel, 2015; Lin, 2017). Dificulta el tratamiento contra dianas específicas y se asocia a tumores metastásicos en los que los nuevos focos presentan características diferentes respecto a sus tumores primarios (Yoshida, 1992; Marimoto, 2003; Lu, 2016). A nivel inmunohistoquímico se ha visto heterogeneidad en un 39% de los CHC estudiados en los que se han analizado los siguientes marcadores: Citoqueratina 7 (CK7) (marcador de vías biliares y de células progenitoras) y CK19 (Durnez, 2006; Yuan, 2011).

También se ha descrito heterogeneidad en la expresión de CD44, una glicoproteína de membrana relacionada con células progenitoras; AFP (Yamashita, 2008; Yang, 2010; Forner, 2012); “Epithelial-Cell Adhesion molecule” (EpCAM) y glutamina sintasa (GS), un marcador indicativo de la activación de la vía de WNT (Austinat, 2008; Zulehner, 2010). Además, a nivel genético se han visto mutaciones en *TP53* y *CTNNB1* en el 22% de los casos (Friemel, 2015a).

Han sido varios los modelos planteados para poder explicar la heterogeneidad, pero actualmente existen dos modelos que cobran mayor peso:

- Modelo de células progenitoras (“cancer stem cell model”): Se asume que dentro de una población de células tumorales existe una subpoblación con capacidad de auto-renovación y que son potencialmente tumorigénicas, son las denominadas “cancer stem cells” (CSC) o “cancer-initiating cells” (CIC). Estas células pueden inducir el crecimiento tumoral y la formación de nuevos tumores. La heterogeneidad intratumoral resultará de diferencias en las células progenitoras (Kreso, 2014; Jayachandran, 2016) (Fig. 5).
- Modelo de evolución clonal: Se asume que el tumor primario surge a partir de una única célula mutada que va acumulando mutaciones sucesivas durante su multiplicación incontrolada. Los subclones aparecidos tienen al mismo tiempo potencial para formar más subclones con ventajas proliferativas y de supervivencia en el ambiente tumoral. (Nowell, 1976) (Fig. 5).

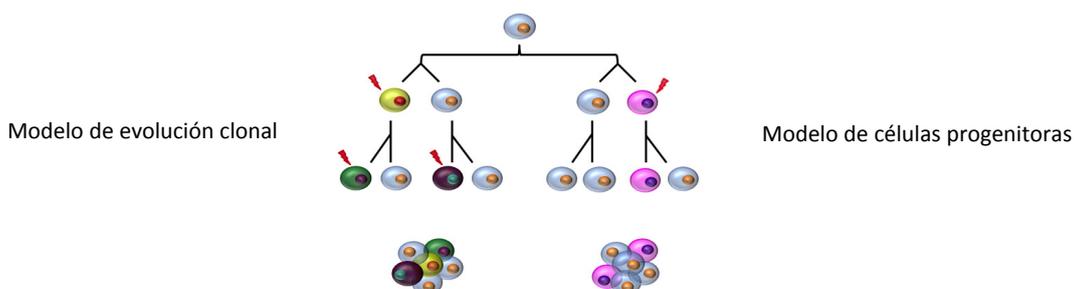


Figura 5: Modelos para explicar la heterogeneidad tumoral: Modelo de células progenitoras y modelo de evolución clonal (García, 2012).

Ambos modelos no son excluyentes y no se descarta que cooperen entre ellos, actuando sinérgicamente en el establecimiento de la heterogeneidad intratumoral durante la transformación neoplásica y el CHC. La heterogeneidad supone un gran reto en el tratamiento del CHC ya que las diferentes subpoblaciones muestran diferentes sensibilidades a las drogas. Así, aquellas poblaciones celulares con resistencia a los fármacos serán las encargadas de repoblar nuevamente el tumor. Además, debido a que factores genéticos provocan la formación de diferentes subclones de células tumorales, puede asumirse que cada paciente presenta subtumores únicos en cuanto a aspectos genéticos, inmunológicos y clínico-patológicos (Weiskirchen, 2016).

La existencia de heterogeneidad exige la caracterización tumoral para mejorar el sistema de clasificación clínico-patológico y para establecer los diferentes tratamientos basados en dianas concretas (Friemel, 2015b; Li, 2015).

2.8. Transición Eitelio-Mesénquima

La Transición Eitelio-Mesénquima (TEM) fue caracterizada por primera vez en el 1995 (Hay, 1995) y hace referencia al cambio por el que las células con características epiteliales adquieren propiedades de células mesenquimales. Este cambio fue descrito en el desarrollo embrionario donde las células epiteliales del epiblasto modifican su fenotipo hacia mesénquima, dando lugar al ectodermo, mesodermo y endodermo (Hugo, 2007).

Las células epiteliales y las mesenquimales difieren en varias características funcionales. Las células epiteliales forman capas de células conectadas mediante estructuras especializadas como las “tight junctions” (TJ), las uniones adherentes, los desmosomas y las uniones gap. Poseen polarización apicobasal, que se manifiesta mediante la distribución localizada de las moléculas de adhesión (cadherinas y ciertas integrinas), la organización del citoesqueleto y la presencia de lámina basal (Thiery, 2006).

En cambio, las células mesenquimales no forman capas organizadas, no poseen polaridad apicobasolateral, ni la misma organización del citoesqueleto que las células epiteliales. Las adhesiones con las células mesenquimales vecinas son menos fuertes y no están asociadas a una lámina basal, lo que les permite una mayor capacidad de movimiento. Por tanto los tejidos mesenquimales son tejidos menos organizados y en muchos casos juegan un papel de soporte

o de relleno, mientras que los tejidos epiteliales presentan una organización más compacta (LaGamba, 2005; Kalluri, 2009) (Fig. 6).

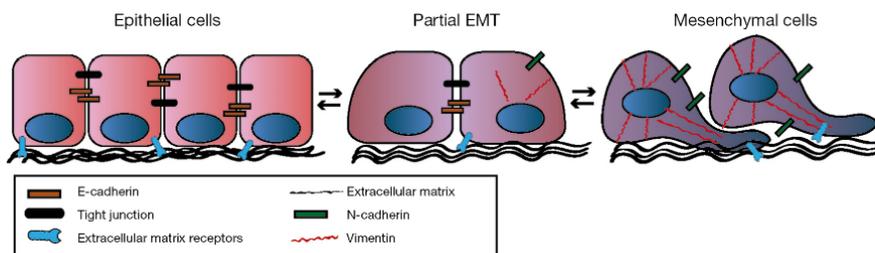


Figura 6: Características estructurales de células epiteliales y mesenquimales (Jakobsen, 2016).

Pese a que la TEM ocurre esencialmente durante la morfogénesis embrionaria, en la progresión del cáncer también juega un papel esencial. En la metástasis las células epiteliales del tumor primario han de adquirir características migradoras para poder desprenderse del tumor inicial y viajar por la sangre hasta colonizar un nuevo órgano, es decir, es necesaria la TEM. La TEM es un proceso transitorio y reversible. Las células que han adquirido características mesenquimales para poder llegar a otros órganos, una vez lleguen y los colonicen, han de re-diferenciarse a células epiteliales. Este proceso se denomina Transición Mesénquima-Epitelio (TME) (Giannelli, 2016; Jayachandran, 2016).

La plasticidad celular explica la capacidad de des-diferenciación y re-diferenciación celular (Taura, 2009; Scholten, 2010). Así, una célula diferenciada puede adquirir características de una CSC que bajo los estímulos adecuados volverá a diferenciarse, por lo que esta población celular, lejos de ser algo estático, constituye una población dinámica dentro del tumor (Jayachandran, 2016).

En el CHC las CSC tienen un papel fundamental en el desarrollo, el mantenimiento, la metástasis y la recidiva. Inicialmente estas CSC en el CHC fueron descritas como células CD133 positivas (CD133+). CD133 es una glicoproteína transmembrana cuya expresión ha sido relacionada con características de CSC, tales como elevado potencial proliferativo, capacidad de auto-renovación y diferenciación y capacidad para iniciar el crecimiento tumoral. Sin embargo, se ha visto que células epiteliales de varios órganos también pueden expresar este marcador, por lo que CD133 no es restrictivo de CSC (Wu, 2009). Es por ello que se han descrito otros marcadores de células de CHC con características de CSC, tales como CD90, CD44, CD13 y CD326 (EpCAM), todos ellos glicoproteínas de membrana (Yang, 2008; Yamashita, 2009; Yamashita, 2013). Se ha visto que en un mismo tumor existe heterogeneidad en los marcadores de CSC, por lo que pese a que varias moléculas se han identificado como

marcadores de CSC no existe un consenso que establezca cuales son los mejores en el CHC (Yamashita, 2009).

A nivel molecular, son varios los factores que intervienen en la TEM. Por un lado están los factores de transcripción SNAIL, SLUG y ZEB1 que inhiben la transcripción de CDH1, por lo que disminuirá la adhesión intercelular; además en la TEM aumenta la expresión de N-cadherina (CDH2) y Vimentina (VIM), una de las proteínas que constituyen los filamentos intermedios y que es indicativo de un fenotipo mesenquimal (Li, 2015) y se activan las vías de TGF β (Chen, 2011).

TGF β es considerado uno de los inductores más potentes de la TEM (Thiery, 2009; van Zijl, 2011). En el CHC el TGF β tiene un papel dual actuando como inhibidor de la proliferación celular en las etapas iniciales del tumor y adquiriendo función de oncogen en fases avanzadas del desarrollo tumoral, lo que promueve la TEM y la diseminación tumoral (Reichi, 2012; Giannelli, 2014), aunque el mecanismo por el que deja de actuar como inhibidor de la proliferación para convertirse en pro-oncogénico no está bien descrito (Calvisi, 2015).

En la TEM también tienen un papel importante las metaloproteasas (MMPs), concretamente las MMP-1,-2,-3,-7,-14 unas enzimas encargadas de degradar la MEC, que junto al resto de cambios fenotípicos que acompañan a la TEM, incrementan la motilidad celular (Hay, 1995). Así mismo, la interacción que establecen las células tumorales con células estromales y el microambiente tumoral es determinante para este proceso. Se ha visto que las células estromales liberan factores de crecimiento, citocinas y proteínas de MEC que favorecen el proceso tumoral (Frank, 2010). Según esto, existe una comunicación entre las células Ito y los hepatocitos transformados, lo que promueve la TEM mediada por HGF y su receptor c-MET (Fernando, 2015). Además los macrófagos infiltrantes tumorales (TAMs) segregan TGF β , favoreciendo el proceso (Yamada, 2014). El crecimiento tumoral rápido supone la aparición de un ambiente pobre en oxígeno y esto se asocia con una malignización del tumor y TEM ya que en una situación de hipoxia se sobreexpresan los factores de transcripción TWIST1 y BMIL, inductores de TEM (Tsuchiya, 2011; Kim, 2015).

3. Células tumorales circulantes (CTCs)

Las células tumorales que circulan en sangre procedentes de un tumor son las CTCs. Se trata de células que han sido capaces de atravesar el endotelio vascular y circular por el torrente sanguíneo. Éstas fueron descritas por primera vez en 1869 cuando se observó mediante microscopía la presencia de células idénticas a las del tumor original en la sangre de un paciente que había muerto por cáncer metastásico (Ashworth, 1869).

En el torrente sanguíneo, las CTCs encuentran un ambiente hostil en el que han de soportar fuerzas de fricción (Erpenbeck, 2010) y están expuestas al ataque del sistema inmune (Labelle, 2011). Debido a estas limitaciones, se seleccionan aquellas poblaciones celulares cuyas características permitan su viabilidad. Así, se seleccionan aquellas células que tengan metabolismos que favorezcan la supervivencia y aquellas que han formado trombos con plaquetas. Las plaquetas forman una barrera protectora alrededor de las CTCs (Palumbo, 2005), favorecen la adhesión de éstas con el endotelio vascular (Gay, 2011) y aportan factores de crecimiento y TGF β a las CTCs con las que contactan, favoreciendo la metástasis (Assoian, 1983; Bakewell, 2003).

Veinte años más tarde de describirse las CTCs se enunció la hipótesis “the seed and the soil” que propone que la metástasis depende de que haya un intercambio de información entre las células tumorales (“the seed”) y el microambiente específico de un órgano (“the soil”), por lo que la colonización de una nueva localización por parte de las CTCs no es un proceso que ocurra al azar (Paget, 1889). Posteriormente esta hipótesis fue revisada (Fidler, 2003) y actualmente continúa en vigor, teniendo en cuenta que la anatomía de la circulación también es un factor importante para determinar dónde tendrá lugar la metástasis (Ewing, 1929; Fidler, 2008).

Pese a que habitualmente se habla de metástasis haciendo referencia al viaje de las CTCs por el torrente sanguíneo, no se ha de menospreciar el papel que tiene el sistema linfático en este proceso ni la difusión de CTCs que se realiza a través de la pleura, el pericardio y la cavidad abdominal (Fidler, 1978), aunque los vasos sanguíneos forman el principal sistema para dar lugar a metástasis a distancia (Riethdorf, 2008).

Aquellas CTCs que sobreviven tras haber infiltrado otros órganos, son las denominadas “disseminated tumor cells” (DTC) (Massagué, 2016). Estas DTCs pueden estar en el órgano diana durante años y sólo en la mitad de los pacientes se acabará desarrollando un nuevo foco tumoral activo. Esto sugiere la idea de que la colonización metastásica es un proceso muy poco

eficiente en el que la mayoría de las células mueren y sólo una pequeña parte de las que consiguen sobrevivir son capaces de formar macrometástasis (Braun, 2005).

Pese a que la diseminación de las CTCs de un tumor primario está vista como un fenómeno unidireccional que culmina con la colonización de un nuevo órgano distal, no siempre sucede así. Estas CTCs también pueden colonizar sus propios tumores de origen, en un proceso llamado “tumor-self-seeding”. El propio tumor de origen libera las citocinas quimioatrayentes IL6 e IL8 y las CTCs realizan la extravasación y la nueva colonización. El “tumor-self-seeding” supone ventajas tumorogénicas, ya que puede acelerar el crecimiento tumoral y la angiogénesis (Kim, 2009).

3.1. Importancia de las CTCs

Más del 90% de las muertes asociadas a cáncer son consecuencia de la metástasis (Mehlen, 2006). Para la detección de CTCs son necesarias técnicas invasivas que requieren la obtención de material procedente de la médula ósea o de los ganglios linfáticos (Domschke, 2013; Pantel, 2014; Györffy, 2015). Por ello, en los últimos años se está explotando el potencial que tienen las CTCs. Éstas son detectadas en sangre periférica de pacientes con cáncer y su presencia se correlaciona con mal pronóstico en varios tipos de cáncer (Cohen, 2009).

Además, hay autores que relacionan el número de CTCs encontradas en una muestra de sangre con el riesgo de metástasis, resistencia al tratamiento y riesgo de recidiva (Cristofanilli, 2004; de Bono, 2008; Cohen, 2008).

3.2. Métodos de detección y caracterización de CTCs

Los sistemas de detección se basan en las diferentes características que expresan las CTCs respecto al resto de células hematopoyéticas que las rodean. Estas características incluyen propiedades físicas (tamaño, densidad, carga eléctrica, deformabilidad) y biológicas (expresión de marcadores de superficie, viabilidad y capacidad invasiva). La selección positiva suele hacerse utilizando anticuerpos contra EpCAM y CK (Pantel, 2008). En 1979 EpCAM fue descrita como una molécula de adhesión celular altamente expresada en cánceres epiteliales (Herlyn, 1979), muy poco en epitelios simples normales y ausente en las células sanguíneas (Patriarka, 2012). Pero la selección de CTCs utilizando exclusivamente EpCAM supone una subestimación

del número de CTCs reales, ya que por un lado, EpCAM es un marcador epitelial y las células tumorales presentes en el torrente sanguíneo son aquellas que han conseguido hacer la TEM, por lo que en principio la mayoría de ellas no expresarán marcadores epiteliales y sí mesenquimales (Kaiser, 2010) y, por otro lado, las CTCs muestran una elevada heterogeneidad, por lo que habrá poblaciones con marcadores de distintos fenotipos. Es decir, en la sangre de un paciente con CTCs co-existirán células con un marcado fenotipo mesenquimal, otras con un marcado fenotipo epitelial y otras con características de CSC, cuya presencia no será valorada si únicamente se utilizan marcadores epiteliales para la detección de las CTCs. Por ello, para evitar subestimar la población de CTCs, lo más adecuado es su detección utilizando una combinación de métodos basados en las propiedades físicas y biológicas para seleccionar fenotipos epiteliales y no epiteliales que incluyan a las CSC y células mesenquimales (Aparicio, 2015).

La concentración de CTCs en sangre es muy baja, pudiendo existir una sola célula entre millones de células sanguíneas, por lo que su identificación y caracterización requiere métodos de elevada sensibilidad y especificidad. Estos métodos suelen constar de un paso inicial en el que se enriquece la muestra para CTCs y a continuación se procede con la detección de las mismas (Alix-Panabières, 2013).

El proceso de enriquecimiento se realiza basándose en las propiedades físicas o biológicas de las células:

- Enriquecimiento basado en propiedades físicas: Las ventajas de estos procedimientos es que permiten una separación celular sin necesidad de un marcaje previo. Son técnicas que permiten la discriminación de CTCs de otras células en función de la densidad, el tamaño, la deformabilidad y las cargas eléctricas (Ferreira, 2016).
 - o **Tamaño**: Generalmente las CTCs muestran un mayor tamaño que los leucocitos, por lo que se pueden diferenciar de ellos en función de sus medidas (Harouaka, 2013), aunque existen muchas variaciones entre las CTCs de distintos tumores e incluso de un mismo paciente (Allard, 2004), lo que supone limitaciones en su detección. Pese a las limitaciones existentes, se han desarrollado técnicas basadas en la filtración de la sangre a través de una malla que deja pasar todo aquello menor de 8 micras, con el objetivo de retener las CTCs suponiendo que éstas sean de un mayor tamaño, lo que puede subestimar la población de CTCs total existente (Ntouroupi, 2008).

- Densidad: Las CTCs poseen una densidad similar a las “Peripheral blood mononuclear cells” (PBMCs), lo que las convierte en buenas candidatas para ser separadas junto a ellas del resto de células sanguíneas mediante centrifugación cuando se utiliza un gradiente de densidad de 1077g/ml (Mostert, 2009; Ferreira, 2016).
 - OncoQuick TM: consiste en un tubo de polipropileno que contiene un filtro poroso situado sobre un medio de separación. Tras situar la sangre sobre este filtro y realizar un centrifugado, los eritrocitos, granulocitos, linfocitos y PBMCs se sitúan en el fondo del tubo y las CTCs, debido a su densidad y a su tamaño son incapaces de atravesar los poros, por lo que permanecen retenidas y pueden ser recogidas y estudiadas posteriormente (Balic, 2005; Clawson, 2012).
 - Existe una técnica de separación de CTCs que combina la densidad celular con la selección de CTCs mediante anticuerpos, es la denominada RosetteSep (StemCell Technologies, Vancouver). El proceso se realiza mediante una selección negativa en la que se establecen complejos entre las células CD45 positivas y los eritrocitos, lo que hace que en un gradiente de densidad de 1077g/ml estas células CD45 positivas se situarán junto con los eritrocitos en la parte inferior del gradiente tras un proceso de centrifugación. Sin embargo, el resto de células que anteriormente se situaban junto a los PBMCs, es decir, las hipotéticas CTCs, continuarán localizándose en el mismo sitio y podrán ser recogidas (Naume, 2004).
- Deformabilidad: Existen estudios que muestran una mayor deformabilidad de las células tumorales respecto a las no tumorales (Remmerbach, 2009; Gosset, 2012) y que esta capacidad se corresponde con el potencial metastásico (Vázquez, 2015). En estos estudios se basa el desarrollo de un biochip que permite detectar aquellas células de mayor tamaño y mayor capacidad para deformarse (Alix-Panabieres, 2013).
- Cargas eléctricas: Para poder seleccionar las CTCs en función de su carga eléctrica es necesaria la realización de una dielectroforesis, que consiste en la aplicación de un campo eléctrico no uniforme provocando que las cargas

eléctricas celulares se localicen en un lado de la célula, hecho que permite la migración hacia uno de los polos (Becker, 1995). Esta técnica es aplicable en el aislamiento de CTCs ya que éstas muestran diferentes características eléctricas que las células sanguíneas. Estas características eléctricas dependen de la composición de la membrana, del núcleo y de los orgánulos, así como del tamaño y la forma celular (Shim, 2013).

- Enriquecimiento basado en propiedades biológicas: Son técnicas basadas en el uso de anticuerpos específicos para seleccionar las CTCs (selección positiva) o para deplecionar las células hematopoyéticas (selección negativa) mediante el uso de anticuerpos contra el marcador leucocitario CD45, aunque también se pueden deplecionar megacariocitos y plaquetas mediante el uso de un anticuerpo contra CD61 (Jacob, 2007). La selección positiva suele acompañarse de una mayor pureza de la muestra, mientras que la selección negativa permite obtener una muestra final en la que la selección por el anticuerpo utilizado no ha sesgado el número de CTCs obtenido en base a ningún marcador concreto y además las CTCs obtenidas no tienen ningún anticuerpo unido que, en caso de estarlo, podría estorbar en pasos posteriores de detección de las CTCs. Sin embargo las ventajas que supone la selección negativa van acompañadas de una menor pureza de la muestra obtenida (Lara, 2004; Yang, 2009; Baccellini, 2013).

La mayoría de los sistemas de detección de CTCs procedentes de tumores epiteliales se caracterizan por el marcaje selectivo de EpCAM, con la consiguiente detección de CK y la tinción nuclear de 4', 6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Pantel, 2008).

Hasta hace poco, la definición inmunohistológica de una CTC era una célula nucleada EpCAM+/CK+/CD45-, pese a que células epiteliales no malignas con este mismo fenotipo se han visto en la sangre de pacientes con lesiones benignas de páncreas (Cauley, 2015), mama (Franken, 2012) y colon (Pantel, 2012), pero no en pacientes sanos (Allard, 2004).

Las tecnologías que utilizan marcadores epiteliales para capturar e identificar las CTCs en función de EpCAM+/CK+/CD45- han demostrado su valor pronóstico. Sin embargo, la aparición de nuevos datos que muestran la TEM y los marcadores de CSC, hacen plantearse nuevas alternativas tales como el uso de CD133 como marcador de CSC, marcadores mesenquimales o el uso de marcadores específicos de cada tumor (Galletti, 2014; Satelli, 2014).

El proceso de detección se realiza mediante métodos basados en la expresión de proteínas o de ácidos nucleicos:

- Detección basada en la expresión de proteínas:

La primera vez que se describieron las CTCs fue utilizando técnicas de imagen convencional (Mostert, 2009). Inicialmente se detectaron CTCs en sangre utilizando tinciones de hematoxilina y eosina y comparando su morfología con la tumoral. Sin embargo, se ha ido incorporando el uso de anticuerpos específicos para proteínas concretas, aunque el principal problema de estas técnicas es la ausencia de antígenos exclusivos de CTCs. El marcador de CTCs perfecto sería aquel que se expresara en estas células de manera exclusiva, no en células sanguíneas y que su expresión no se reprimiera durante el proceso de invasión y circulación (Alix-Panabières, 2014). Sin embargo, los anticuerpos comúnmente utilizados, como aquellos contra CK, pueden unirse inespecíficamente a macrófagos, células plasmáticas y precursores hematopoyéticos (Borgen, 1998; Borgen, 2006); EpCAM es un marcador de célula epitelial y tras la TEM puede que desaparezca su expresión (Kaiser, 2010) y Mucina1 (MUC1) puede unirse a progenitores eritroides (Brugger, 1999) y a linfocitos T activados (Agrawal, 1998). Este problema puede solventarse mediante el uso de un anticuerpo contra CD45 que marca específicamente los leucocitos (Mostert, 2009). Pese a las limitaciones existentes ha habido avances en las técnicas de detección de CTCs mejorando la sensibilidad y la especificidad de las mismas mediante el uso de varios marcadores (Siewerts, 2009).

Para solventar el problema derivado del uso de múltiples anticuerpos unidos a diversos fluorocromos, se han desarrollado diversas tecnologías que permiten la detección de CTCs mediante microscopía (Krivacic, 2004; Hsieh, 2006), así como el uso de técnicas de citometría (Ring, 2005) y otras metodologías entre las que destacan:

- EPISPOT (“Epithelial Immunospot”): Se realiza un recubrimiento con el anticuerpo deseado para detectar las CTCs sobre una membrana de nitrocelulosa situada sobre una placa. A continuación una muestra de sangre procedente del paciente y previamente enriquecida para las CTCs se siembra y se incuba entre 24 y 48 horas. Durante este proceso las proteínas de las CTCs secretadas o escindidas de su membrana son reconocidas por los anticuerpos con los que se ha hecho el recubrimiento. Tras un proceso de lavado, estas proteínas son detectadas con un anticuerpo secundario unido a un fluorocromo, lo que produce una imagen de puntos que serán analizados

mediante un sistema informático (KS ELISPOT, Carl Zeiss Vision). Este ensayo es cuantitativo ya que cada punto puede contarse y cualitativo ya que permite la caracterización de las CTCs procedentes de los diferentes tumores sólidos (Ignatiadis, 2012).

- CTC-Chip: Es un sistema formado por miles de pequeñas columnas micrométricas recubiertas de un determinado anticuerpo a través de las cuales se hace pasar la sangre de un paciente. El anticuerpo que recubre estas columnas atraparán aquellas células que expresen la proteína que reconozca y dejará pasar el resto de tipos celulares. Aunque normalmente este sistema utiliza anticuerpos contra EpCAM, ofrece flexibilidad permitiendo la detección de CTCs en base a otros marcadores, lo que permite detectar una amplia variedad de CTCs (Sequist, 2009). Además, debido a que la sangre se pasa por este sistema sin ningún tipo de procesamiento previo, cerca del 98% de las CTCs permanecen vivas (Nagrath, 2007).

- GILUPI: Es un sistema que permite la detección de CTCs directamente *in vivo*. Consiste en la aplicación de un dispositivo recubierto de anticuerpos contra EpCAM en una vena del brazo durante 30 minutos en los que fluirá un volumen de sangre de 1.5L alrededor del dispositivo. Esto permite que las células que expresan EpCAM queden retenidas a su paso por este sistema. También pueden utilizarse otros anticuerpos, lo que permite retener un amplio abanico de fenotipos celulares. Posteriormente, estas células pueden ser analizadas mediante técnicas inmunocitoquímicas o mediante “Polymerase Chain Reaction” (PCR) (Saucedo-Zeni, 2012).

- Magsweeper: Este sistema se basa en la utilización de esferas magnéticas recubiertas con anticuerpos contra EpCAM. Estas esferas se incuban con sangre total procedente de un paciente y a continuación, la muestra se hace pasar por unos imanes que retienen las esferas y, por consiguiente, todas aquellas células que expresan EpCAM y han sido reconocidas por los anticuerpos (Powell, 2012).

- CellSearch (Veridex): es una tecnología semi-automática en la que se retienen las CTCs presentes en 7.5mL de sangre total mediante el uso de anticuerpos contra EpCAM unidos a esferas magnéticas. Es el único sistema aprobado por la “Food and Drug Administration” (FDA) para la detección de CTCs en cáncer de mama (Cristofanilli, 2004), de colon (Cohen, 2008) y de próstata (de Bono, 2008). En cáncer de mama y de próstata se considera que la detección de 5 o más CTCs en 7.5mL de sangre se relaciona con una menor supervivencia libre de progresión (Cristofanilli, 2004; de Bono, 2008), mientras que en el cáncer de colon el límite se sitúa en 3 CTCs por cada 7.5mL de sangre (Cohen, 2008).

El sistema consiste en diferentes pasos: Inicialmente se obtienen 7.5mL de sangre en los tubos denominados “CellSave Preservative tubes” mediante punción venosa. Estos tubos permiten conservar la sangre durante un máximo de 96 horas. Seguidamente, la sangre es transferida a un tubo cónico de 15mL en el que tras realizar una centrifugación, se elimina el suero y se añaden los anticuerpos unidos a esferas magnéticas (estos anticuerpos suelen ser contra EpCAM, pero también están aprobados el uso contra “human epidermal growth factor receptor 2” (HER2) para pacientes con cáncer de mama) y se realiza una incubación. Tras la incubación se somete la muestra a unos imanes que retienen las células unidas a los anticuerpos junto con las esferas magnéticas y se aspira el resto de fluido junto con las células que no han sido retenidas (Tibbe, 2002). A continuación se procede con la permeabilización celular y la tinción mediante el uso de anticuerpos contra CK unidos al fluorocromo “phycoerythrin” (PE), anticuerpos contra CD45 unidos al fluorocromo “allophycocyanin” (APC) y DAPI para tinción de núcleos (Hoepfener, 2012). Tras la tinción la muestra se transfiere a otro compartimento del sistema, el denominado “MagNest” y se procede al análisis de las células mediante el fotografiado de las mismas en un microscopio automático de fluorescencia (Mostert, 2009). Pese a que todo el proceso es automático y el producto final supuestamente serán exclusivamente CTCs, se realiza un control no automático de las imágenes finales. En este proceso intervienen dos técnicos especializados y son ellos quien, mediante el visionado de las imágenes, discriminan entre CTCs y no CTCs.

Este sistema, pese a ser el único aprobado por la FDA, tiene limitaciones importantes ya que únicamente permite seleccionar aquellas células que expresan EpCAM, pero en el proceso de TEM necesario para que las células tumorales puedan viajar por la sangre, este marcador puede dejar de expresarse ya que las células realizan el cambio hacia un fenotipo mesenquimal. Además, debido a la heterogeneidad tumoral, puede que el tumor de origen de las CTCs no exprese EpCAM en ninguna zona o bien, que la región del tumor de la que se han desprendido las CTCs no exprese este marcador (Hammoud, 2016). Todo esto hace que se subestime el número de CTCs existentes (Farace, 2011; Wicha, 2011).

- AdnaTest: para solventar las limitaciones que supone seleccionar CTCs exclusivamente mediante EpCAM como hace el sistema CellSearch, se ha desarrollado este sistema que permite la selección de CTCs también mediante esferas magnéticas pero estas están unidas a diversos anticuerpos en función del tipo de cáncer. Una vez aisladas las CTCs, se estudia su expresión genética mediante “Real-Time-quantitative Polymerase Chain Reaction” (Real Time-q PCR) (Čapoun, 2016; Gorges, 2016).
- ImageStream AMNIS: Es un sistema que, tras realizar un proceso de enriquecimiento de la muestra de sangre en CTCs y después de tinciones con diversos anticuerpos unidos a fluorocromos, permite detectar las posibles CTCs.

- Detección basada en ácidos nucleicos:

Son técnicas que permiten analizar la expresión de determinados genes expresados en las CTCs, una vez estas han sido aisladas mediante las técnicas basadas en sus propiedades físicas o biológicas.

- “Fluorescent *in situ* hybridization” (FISH): Esta técnica utiliza fluorocromos unidos a sondas que reconocen determinadas regiones de ADN de las que son complementarias, lo que permite determinar la presencia o ausencia de determinadas secuencias de ADN, así como de ARNm, hecho que puede ser útil en la caracterización genética de las CTCs ya que las mutaciones genéticas son características en varios tipos de cáncer (Harouaka, 2014).

- Secuenciación: aquellos genes con mutaciones oncogénicas conocidas pueden amplificarse a partir del ADN genómico o del ADN complementario (ADNc) de las CTCs. Además, mutaciones de múltiples genes se pueden examinar mediante la amplificación del genoma completo y PCR específica para la mutación de interés (Gasch, 2013).
- Real Time-q PCR: Esta técnica se basa en la expresión diferencial de marcadores de las CTCs en comparación con el resto de células sanguíneas que las acompañan. Las muestras sanguíneas con CTCs contienen ciertos genes que están más expresados que en las muestras que no las contienen. La técnica consiste en medir la amplificación de ciertos genes en función de la fluorescencia derivada de la reacción de PCR (Andergassen, 2013). Esta fluorescencia proviene de moléculas fluorescentes que son incorporadas a las nuevas moléculas de DNA sintetizadas durante la reacción, son las denominadas moléculas SybrGreen (Devlin, 2010). Una variante de SybrGreen más sensible, es el uso de moléculas TaqMan que emiten fluorescencia cuando la sonda detecta la secuencia complementaria (Andergassen, 2013).

Son varios los marcadores utilizados para determinar que la muestra de paciente posee CTCs mediante Real Time-q PCR tras un procedimiento de enriquecimiento que suele ser mediante centrifugación y gradiente de densidad. Generalmente se analiza la expresión de *CK8*, *18* o *19* debido a que son genes típicamente epiteliales con una expresión muy baja en leucocitos y una elevada expresión en células tumorales (Zebisch, 2013), siendo *CK19* uno de los marcadores más utilizados en el estudio de CTCs. En cáncer de mama, la presencia de ARNm de *CK19* se relaciona con una mala prognosis (Ignatiadis, 2007; Ignatiadis, 2008) pero sigue siendo necesario el uso de un panel con diferentes marcadores para detectar CTCs en los diferentes tipos de cáncer (de Albuquerque, 2012 a y b).

El análisis de la técnica de Real Time-q PCR se puede hacer mediante la creación de rectas de calibración en la que números conocidos crecientes de células procedentes de un tumor se añaden a muestras de sangre de voluntarios sanos. A continuación se realiza el protocolo de Real Time-q PCR y su análisis, lo que permite establecer una relación posterior entre los

resultados de las Real Time-q PCR de los pacientes con la recta de calibración inicial (Iakovlev, 2008; Zebisch, 2012).

Sin embargo, esta técnica tiene limitaciones (Zippelius, 2000): durante la centrifugación del gradiente de densidad algunas CTCs pueden perderse; el ARN extraído puede degradarse y durante la Real Time-q PCR pueden amplificarse pseudogenes. Estos problemas pueden solventarse mediante el uso de controles adecuados. Para ello se analizan simultáneamente genes de referencia cuya expresión asegura el correcto estado de la muestra y se utilizan primers que amplifiquen específicamente los genes de interés. Debido a que la expresión de genes epiteliales en las CTCs puede variar notablemente es necesario establecer simultáneamente controles negativos. Otra opción es no realizar una recta de calibración inicial, sino utilizar una población de voluntarios sanos para establecer los límites de expresión de los diferentes marcadores de interés (Andergassen, 2013).

3.3. Migración colectiva

Las CTCs son descritas generalmente como células individuales, sin embargo ya desde 1960 se describió la capacidad de éstas para formar agregados, son los denominados “clusters” de CTCs (Finkel, 1960). Estos “clusters” expresan marcadores mesenquimales, son menos apoptóticos que las CTCs aisladas (Hou, 2012) y se relacionan con una menor supervivencia libre de progresión (Aceto, 2014).

Se ha demostrado que los “clusters” de CTCs están formados por entre 2 y 50 células tumorales y se originan a partir de grupos de células que se desprenden del tumor original, no por agregaciones celulares en el torrente circulatorio (Molnar, 2001; Stott, 2010; Cho, 2012; Yu, 2013).

Pese a que su presencia en sangre es menor que las CTCs individuales (forman entre el 2 y el 5 % del total de CTCs detectadas en circulación) su potencial metastásico es entre 23 y 50 veces superior (Aceto, 2014). El número de CTCs detectadas en sangre es muy superior al número de metástasis observadas en un paciente, lo que indica que la mayoría de CTCs mueren en el torrente sanguíneo por anoikis (Duda, 2010).

En pacientes con cáncer de mama se ha demostrado la presencia de placoglobina en los “clusters” de CTCs y en el tumor primario, relacionándose la expresión de esta proteína con un peor pronóstico. La placoglobina es la responsable de mantener las uniones intercelulares (Aceto, 2014). En varios tipos de cáncer se ha visto que los “clusters” interaccionan con otras células presentes en el torrente sanguíneo tales como plaquetas (Labelle, 2011; Yu, 2013) y leucocitos (Wels, 2008). Las plaquetas tienen un efecto protector de los “clusters”, mientras que los leucocitos pueden tener efecto protector o citotóxico. Además, las CTCs pueden incorporar células estromales como fibroblastos en la formación de los “clusters”, hecho que puede facilitarles la formación de un nuevo nicho metastásico en un lugar distante (Psaila, 2009) (Fig. 7).

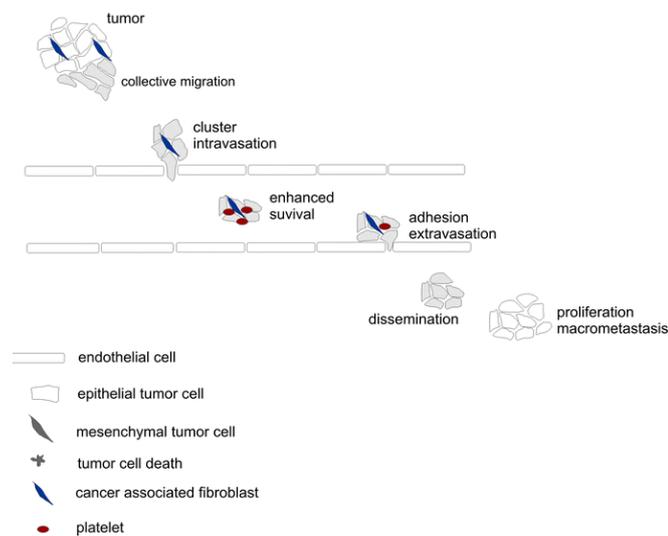


Figura 7: Representación del proceso de migración colectiva (Fabisiewicz, 2017).

Pese al importante significado biológico que tienen los “clusters” de CTCs, su comportamiento en la circulación sanguínea es desconocido (Chaffer, 2011; Krebs, 2014) y se ha visto que la detección de un mayor o menor número de éstos depende del sistema utilizado, lo que es indicativo que algunos de estos agregados celulares son artefactos generados durante el proceso de detección de CTCs (Alix-Panabières, 2014).

Existen varios autores que durante décadas han defendido el hecho de que los “clusters” son incapaces de atravesar los capilares debido a su gran tamaño, lo que implicaría la ruptura de las paredes de los vasos (Weiss, 1987; Paterlini-Brechot, 2007; Hou, 2012; Hong, 2013). Pero existen otros autores que defienden que sí pueden atravesar los capilares mediante un proceso de cambio morfológico transitorio, lo que les permite viajar a través de aquellos vasos más estrechos (Au, 2015). En lo que sí coinciden los diferentes autores es en el concepto de

heterogeneidad que existe dentro de los diferentes “clusters”, donde las células con marcadores epiteliales como EpCAM, CDH1 y CK se combinan con células con marcadores típicamente mesenquimales como VIM y CDH2, confiriendo fenotipos muy distintos dentro de un mismo agregado de CTCs (Hou, 2011).

La migración colectiva de células ocurre durante la morfogénesis, la reparación tisular y el cáncer (Ilina, 2009). Durante la migración colectiva tumoral, las células mantienen las uniones intercelulares a lo largo de todo el proceso, desde la TEM y hasta la TME. (Lintz, 2016). Sin embargo, las diferentes células que forman los agregados desempeñan diferentes funciones dependiendo de si forman parte del núcleo de células o constituyen la región más marginal, adquiriendo estas últimas características de liderazgo para guiar la invasión y la intravasación.

Las células con fenotipo de líderes son las encargadas de generar fuerzas de tracción mediadas por las contracciones de actina. Esto implica que las células localizadas dentro del grupo no contacten con la MEC, sino que se mantienen unidas a las que sí lo hacen mediante cadherinas, proteínas de las TJ y uniones gap, permitiendo mantener una sincronización de los citoesqueletos y de la señalización (Hegerfeldt, 2002).

La TEM ha sido postulada como un episodio necesario para la invasión celular de cánceres epiteliales. Sin embargo, se ha visto que los fibroblastos asociados a cáncer (CAFs) pueden actuar como células líderes en el frente invasivo. Así, las células epiteliales tumorales que forman parte de la agrupación celular pueden continuar manteniendo su fenotipo epitelial y aprovecharse de las características mesenquimales de éstos, sin necesidad de realizar la TEM (Gaggioli, 2008).

4. EpCAM

EpCAM fue descrito por primera vez como un antígeno de superficie celular asociado a cáncer de colon (Herlyn, 1979, Koprowski 1979; Baeuerle, 2007). Es una proteína de la familia de las “cell adhesion molecules” (CAM), formada por las cadherinas, integrinas, selectinas e inmunoglobulinas, pero con características estructurales distintas (Dolle, 2015).

También llamada 17-1A, GA733-2, KSA, ESA, EGP-40, CD326, TROP1, TACSTD1 entre otros nombres, es una glicoproteína transmembrana que media las uniones entre células de forma independiente de calcio. Tiene un peso molecular de 40KDa y está formada por 314

aminoácidos (aa) codificados por el gen *EPCAM* situado en el cromosoma 2, en la localización 2p21, con un tamaño estimado de 14 kilobases (kb) (Linnenbach, 1989; Szala, 1990; Balzar, 2009). *EPCAM* está formado por 9 exones que codifican para cada una de las partes de la proteína:

- Dominio extracelular (EpEX): formado por un péptido de señalización entre el aa 1 y 23, codificado por el exón 1; un dominio “epidermal growth factor-like” (EGF-like) entre los aa 27 y 59, codificado por el exón 2; un dominio de repetición de tiroglobulinas (TY) entre los aa 66 y 135, codificado por el exón 3 (Linnenbach, 1989) y un motivo pobre en cisteínas codificado por los exones 4, 5, 6 y 7 (Schnell, 2013).
- Dominio intracelular (EpiCD): codificado por los exones 8 y 9. Está formado por los aa del 288 al 314, se sitúa a continuación del dominio transmembrana. Este dominio citoplasmático está formado únicamente por 26 aa, tiene un peso molecular de 5 KDa y posee dos posiciones de contacto con α -Actina (ACTA1), lo que determina la localización celular de EpCAM (Balzar, 1998) y el contacto de éste con los filamentos de actina del citoesqueleto (Winter, 2003a) (Fig. 8).

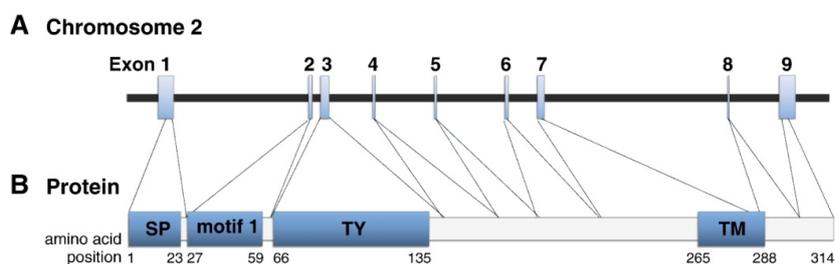


Figura 8: Estructura génica de *EpCAM* y dominios proteicos (Schnell, 2013).

Durante la embriogénesis, EpCAM está altamente expresado en diversos epitelios y en el individuo adulto sano también se expresa, excepto en epitelios escamosos y en algunos epitelios especializados como hepatocitos y queratinocitos (Moldenhauer, 1987; Winter, 2003b). Se ha visto que la expresión de EpCAM disminuye a medida que las células se van diferenciando (Klein, 1987), mientras que se detecta un incremento en su expresión durante procesos inflamatorios, de regeneración tisular y determinados tipos de cáncer (Gires, 2012; Dolle, 2015).

El mecanismo de regulación de EpCAM continúa en controversia. Hay autores que defienden un control epigenético (Lu, 2010), mientras que otros defienden modificaciones post-traduccionales (Ng, 2010).

4.1. Señalización

EpCAM ha sido descrita como una proteína implicada en proliferación y en migración celular (Munz, 2004; Osta, 2004) a través de la activación de una vía de señalización que se inicia con la proteólisis intramembrana (RIP) caracterizada por la actividad de las proteasas “tumor-necrosis-factor alpha converting enzyme” (TACE/ADAM17) y la subunidad catalítica “presenilin-2” (PSEN2) de la γ secretasa, dos enzimas que permiten la escisión y liberación de EpEX hacia el exterior y EpICD hacia el citoplasma celular. EpICD formará parte del complejo nuclear que contiene los reguladores transcripcionales CTNNB1 y “lymphoid enhancer-binding protein 1” (LEF1), ambos componentes de la vía de WNT, mientras que EpEX actuará como un ligando de EpCAM transmembrana, convirtiéndose en la señal necesaria para inducir su escisión, hecho que supone un control auto y paracrino (Maetzel, 2009) (Fig. 9).

El contacto célula-célula se considera como el causante inicial de la activación de EpCAM, hecho que se ve promovido en tejidos tumorales en los que se ha descrito una sobreexpresión de las proteasas implicadas en su escisión. En este contexto, la interacción que establece EpCAM con otras proteínas de la membrana puede determinar la disponibilidad de EpEX para realizar interacciones homólogas, lo que determinará su activación o inactivación (Zöller, 2009).

En condiciones normales en las que las células epiteliales están quiescentes, EpCAM se sitúa en las membranas basolaterales donde establece uniones con proteínas homólogas de las células adyacentes. Sin embargo, en los progenitores hepáticos (Yovchev, 2008) o cuando se desarrolla un cáncer, se ha observado una localización de EpCAM difusa a lo largo de la membrana celular. Así, esta proteína puede actuar como molécula de adhesión intercelular o como factor de transcripción (Maetzel, 2009). La localización de EpCAM en unos microdominios u otros marcará su función, como sucede cuando se sitúa en los “glycolipid-enriched microdomains” (GEMs), unos dominios ricos en glicoproteínas, lípidos y tetraspaninas (Hemler, 2005; Khun, 2007; Zöller, 2009). Así, el papel de EpCAM no sólo depende de sus niveles de expresión, sino de las interacciones que establece con otras proteínas, como sería el caso de Claudina 7 (CLDN7) (Nübel, 2009). CLDN7 es una proteína con cuatro dominios transmembrana localizada en las TJ de la cara apical de las células. Sin embargo, tras fosforilarse por la actividad quinasa de Eph, se deslocaliza (Turksen, 2011) y contacta con EpCAM, situándose en dominios ricos en glicoproteínas (GEM). El contacto entre EpCAM y CLDN7 y la recolocación de ambas en los GEM causa dos efectos directos:

- La adhesión celular mediada por EpCAM queda inhibida ya que las moléculas de EpCAM contactan con sus homólogas a través del dominio transmembrana y es, precisamente este dominio, a través del que CLDN7 lo secuestra, hecho que aumenta la motilidad celular (Kuhn, 2007).
- En los dominios GEM hay una gran cantidad de moléculas, entre las que abundan TACE y PSEN2. Esto facilita la RIP y la consiguiente liberación de EpEX que actuará como unidad catalítica para promover la escisión de moléculas de EpCAM adyacentes, así como la liberación de EpICD, que iniciará la cascada de señalización (Nübel, 2009; Philip, 2014)

Cuando EpICD se escinde y se libera al citoplasma celular, contacta con “Four and one-half LIM domains protein 2” (FHL2) y ésta contacta con CTNNB1, viajando hasta el núcleo donde se inicia la regulación de genes relacionados con proliferación (*c-MYC*, *CTNNB1* y ciclina D1 (*CCND1*)) y migración celular. Además, FHL2 regula la localización y la actividad de TACE y PSEN2 (Johannessen, 2006). Este contacto entre EpCAM y CTNNB1 lleva asociada la inhibición de la adhesión entre células mediada por CDH1 ya que ésta necesita moléculas de CTNNB1 para contactar con los filamentos de actina a través de α -Catenina, permitir su anclaje en el citoplasma celular y mantener las uniones adherentes entre células. La expresión de EpCAM y su relación con CDH1 y CTNNB1, se traduce en una mayor expresión de CTNNB1 asociada a EpCAM y una menor expresión de CDH1 (Winter, 2007; Munz, 2009).

En el núcleo, el complejo formado por EpICD, FHL2 y CTNNB1 contacta con el factor de transcripción LEF1 y, la actividad conjunta de éstos sobre los promotores de determinados genes, permite el control de su expresión, lo que regula la proliferación, el ciclo y la muerte celular (Maaser, 2008) (Fig. 9).

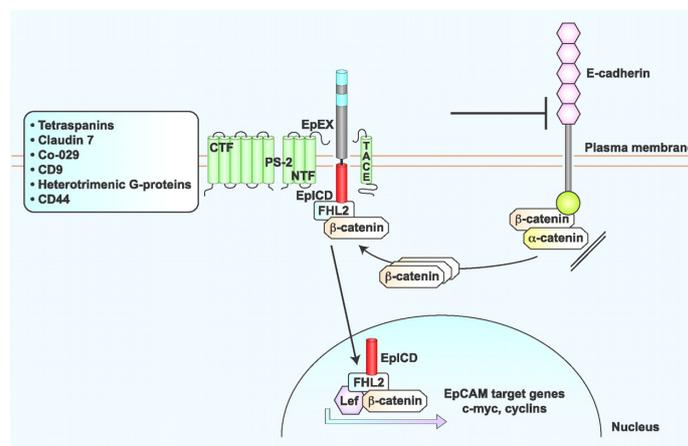


Figura 9: Procesado de EpCAM y señalización (Munz, 2009).

La expresión de EpCAM está controlada mediante la acción de un complejo formado por CTNNB1, LEF1 y “transcription factor 4” (TCF4) que se une al promotor de EpCAM, induciendo su expresión (Yamashita, 2007; Maetzel, 2009).

Tanto la expresión de EpCAM como su procesado y posterior vía de señalización están reguladas y se inician únicamente en caso de una necesidad proliferativa (Schmelzer, 2006; Schmelzer, 2007; Trzpis, 2008). Sin embargo, en condiciones en las que no se requiere proliferación, el factor de transcripción nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFkB) y TP53 son los encargados de actuar sobre el promotor de EpCAM, inhibiendo su expresión (Sankpal, 2009). En el caso concreto de los hepatocitos, éstos expresan EpCAM durante el desarrollo embrionario, mientras que en individuos adultos, EpCAM únicamente se expresa durante el proceso de regeneración en células progenitoras (de Boer, 1999).

4.2. Papel en el desarrollo tumoral

En la mayoría de carcinomas EpCAM está sobreexpresado, hasta el punto que es considerado un marcador de células progenitoras iniciadoras de cáncer (Went, 2004) y se relaciona con cánceres de mayor capacidad proliferativa y mal pronóstico (Schnell, 2013). Además presenta niveles de glicosilación mayores que en un tejido sano (Pauli, 2003; Munz, 2008).

4.2.1. Proliferación

Los primeros datos que relacionan EpCAM con un aumento de la capacidad proliferativa son de los años 90 en los que se vio en determinadas neoplasias la relación con el marcador de proliferación Ki67 (Schon, 1994; Litinov, 1996). Estudios posteriores han demostrado la capacidad de EpCAM para controlar la proliferación celular mediante la inducción transcripcional de *c-MYC* por el complejo formado por EpICD, CTNNB1, FHL2 y LEF1 (Maetzel, 2009; Munz, 2009), así como la capacidad de *c-MYC* de inducir la expresión de *CCNA1* y ciclina E1 (*CCNE1*) (Jansen-Durr, 1993) y la actividad de éste sobre el promotor de *CDH1* para inhibir su expresión, traducándose en la pérdida de las uniones adherentes mediadas por esta proteína. Además, EpCAM controla la progresión del ciclo celular mediante regulación transcripcional de *CCND1* por el mismo complejo proteico que actúa sobre el promotor de

MYC (Chaves-Pérez, 2013). *CCND1* es la primera ciclina necesaria para entrar en ciclo celular ya que permite el paso de la fase G1 a S, actuando como cofactor de las “Cyclin dependant kinases” (CDK4 y CDK6), lo que permite la fosforilación de la proteína supresora de tumores “retinoblastoma” (RB), liberándose así el “transcription factor E2” (E2F) que inducirá la expresión de *CCNA1* y *CCNE1*, permitiendo la proliferación (Schulze, 1995; Soucek, 1997; Labalette, 2008). También cabe destacar, no sólo el papel que tiene EpCAM en la inducción de la proliferación, sino en la capacidad que tiene de inhibir genes supresores de tumores como *TP53* y “cyclin-dependent kinase inhibitor” (*P21*), lo que permitirá una mayor tasa de proliferación celular (Chaves-Pérez, 2013).

4.2.2 Metástasis

En la TEM, las células tumorales pierden sus características epiteliales para poder viajar como CTCs en la sangre y en este proceso la capacidad proliferativa de las células se ve disminuida, coincidiendo con menor expresión de EpCAM. Esta disminución en la expresión se relaciona con una mayor capacidad de migración e invasión celular (Gires, 2014). Posteriormente, cuando las CTCs colonizan nuevos órganos, podría reactivarse la expresión de esta proteína para permitir la proliferación y la generación de nuevos focos tumorales (Imrich, 2012).

4.3. EpCAM en el hígado y CHC

Las “hepatic stem/progenitor cells” (HSPCs) pueden diferenciarse a colangiocitos o hepatocitos (Miyajima, 2014; Tanimizu, 2014). EpCAM está presente en las HSPCs pero su expresión es dinámica y se pierde cuando éstas se diferencian a hepatocitos, mientras que se mantiene si el destino final es convertirse en colangiocitos (Yoon, 2011; Gires, 2012). Sin embargo, en hígados fetales la mayoría de los hepatocitos muestran un patrón de expresión de EpCAM, disminuyendo gradualmente con la diferenciación hepática (Tanaka, 2009).

Los cambios patológicos que tienen lugar en el hígado adulto se asocian a re-expresión de EpCAM (Yamashita, 2009). Cuando hay un daño hepático relacionado con respuesta regenerativa como en el caso de la cirrosis, muchos hepatocitos sí que expresan EpCAM tras un proceso de des-diferenciación, o bien porque son hepatocitos de nueva generación y conservan la expresión de los progenitores hepatobiliares. Se ha visto que la expresión de

EpCAM sólo se da en fases muy avanzadas de la cirrosis, lo que podría suponer estadios tumorales iniciales del desarrollo del CHC, en los que se ha descrito la expresión de EpCAM *de novo* (Yoon, 2011; Imrich, 2012).

4.4. EpCAM en la biopsia líquida

EpCAM es el marcador comúnmente utilizado para la detección de CTCs en sangre. La mayoría de técnicas utilizadas para detectar CTCs, entre las que se encuentra la única aprobada por la FDA (CellSearch, Veridex), basan su detección en la expresión de este marcador (Hammoud, 2016).

Su expresión ha sido descrita en tumores epiteliales por lo que se ha considerado un marcador de célula tumoral de origen epitelial. Sin embargo, la validez de este marcador se está viendo cuestionada ya que la progresión de tumores epiteliales hacia la formación de nuevos focos metastásicos requiere la liberación al torrente sanguíneo de CTCs y/o “clusters” de CTCs. Estas CTCs muestran en su mayoría un fenotipo mesenquimal, caracterizado por la pérdida de la expresión de marcadores propiamente epiteliales como EpCAM, CK7, 8, 19 y CDH1 y la adquisición de CDH2 y VIM. Además, se ha visto que la expresión de fenotipo mesenquimal en las CTCs se asocia a un mal pronóstico, lo que demuestra que la detección basada exclusivamente en marcadores epiteliales no está teniendo en cuenta las poblaciones de CTCs más agresivas (Raimondi, 2011). Por tanto, la detección de CTCs basada exclusivamente en EpCAM subestima el número real de CTCs en sangre (Bednarz-Knoll, 2012; Gorges, 2012). Otros marcadores específicos de tumor están surgiendo como posibles dianas para la detección de CTCs, como MUC1 en el cáncer de mama y de colon y PSA en el de próstata (Gold, 2015).

5. MUC1

MUC1 pertenece a la familia de glicoproteínas denominadas mucinas. La función de éstas es la de proteger los epitelios. Sin embargo, una desregulación de su expresión está relacionada con procesos inflamatorios y tumorales. Estas mucinas pueden ser secretadas o tener una localización transmembrana (Kufe, 2009).

MUC1 se localiza en el cromosoma 1q21 y codifica para una glicoproteína transmembrana localizada en la cara apical de células epiteliales que recubren los tractos mucosos respiratorios y gastrointestinales, así como los ductos de órganos como las glándulas mamarias, el hígado, el páncreas y los riñones, donde forma una barrera mucosa protectora (Kufe, 2013). Muestra una expresión aberrante en algunos tumores malignos como tumores mamarios, pancreáticos, pulmonares, de colon y hematológicos, (Kufe, 2009; Joshi, 2014; Nath, 2014), relacionándose con metástasis tumorales, mal pronóstico y resistencia a la quimioterapia (Bozkaya, 2012).

5.1. Estructura

MUC1 se sintetiza como un polipéptido simple que se autoprocesa por el dominio SEA (“sea-urchin sperm protein, enterokinase and agrin”) en dos subunidades que posteriormente contactarán entre sí por uniones estables no covalentes, lo que permite formar un complejo heterodimérico situado en la membrana celular de epitelios mucosos (Levitin, 2005; Macao, 2006). La región N-terminal contiene un número variable de repeticiones en tándem de 20 aa glicosiladas en los residuos serina y treonina. El extremo C-terminal, por su parte, está formado por 58 aa extracelulares, 28 aa transmembrana y 72 aa que conforman el dominio citoplasmático. El dominio N-terminal está unido al dominio C-terminal transmembrana pero la actividad de las enzimas TACE y gamma-secretasa permiten la escisión de ambas subunidades. Esto permite la liberación al exterior del dominio N-terminal y del C-terminal al interior celular. Este es el inicio de la vía de señalización regulada por MUC1 (Julian, 2009; Kufe, 2009) (Fig. 10).

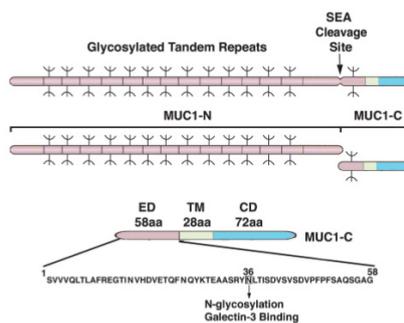


Figura 10: Estructura de MUC1 (Kufe, 2013)

5.2. Señalización

MUC1 se sintetiza en el retículo endoplasmático y se trasloca a la mitocondria donde será glicosilado en el dominio N-terminal. En carcinomas, las glicosilaciones de MUC1 se alteran debido a los cambios que experimentan las glicosiltransferasas en las células malignas (Kufe, 2009). A continuación se trasloca a la membrana apical de las células. Sin embargo, en células transformadas se pierde la polaridad y MUC1 se sitúa a lo largo de toda la membrana citoplasmática (Kufe, 2010). Esta nueva localización permite el contacto con proteínas quinasa que al fosforilar MUC1, marcarán la señal para que sea procesado (Julian, 2009). Tras ser procesado, el dominio intracelular ha de dimerizar con un homólogo a través de una región CQC rica en cisteínas para transducir la señal (Kufe, 2010).

MUC1 en la membrana citoplasmática contacta con galectin-3 y ésta hace de puente entre MUC1 y “Epidermal growth factor receptor” (EGFR) (Kufe, 2009; Horm, 2012). Esta interacción permite que EGFR fosforile a MUC1 en la posición Y46EKV y, mediante esta fosforilación, PI3K contacta a través de sus dominios SH2 con MUC1 y se activa la vía de PI3K-AKT (Raina, 2004; Bitler, 2010). Los 72 aa que conforman el dominio citoplasmático pueden ser fosforilados en diversas posiciones por “receptor tyrosine kinasa” (RTKs) y no RTKs, generando lugares de unión para los dominios SH2 no sólo de PI3K, sino también de SRC y GRB2 (Pandey, 1995; Li, 2001).

La interacción entre MUC1 y EGFR permite que ambos se trasloquen al núcleo acompañados de CTNNB1 donde regularán la transcripción de los genes de la vía de WNT (Li, 2011; Horm, 2012; Rajabi, 2017). La interacción entre MUC1 y CTNNB1 provoca la pérdida de contacto de CTNNB1 con CDH1, lo que se traduce en una alteración de las uniones adherentes, asociadas a mayor motilidad (Kufe, 2009). Esta mayor motilidad relacionada con MUC1 también es promovida por la presencia de ácidos siálicos en el dominio extracelular. Éstos dotan a la proteína de cargas negativas y confieren propiedades anti-adhesivas (Apostolopoulos, 2015).

En el núcleo, MUC1 regula la expresión de galectin-3, (Kufe, 2009), forma complejos con NFκB y p65 e induce la transcripción de genes asociados a la TEM, entre los que se encuentran el mismo *MUC1* y *ZEB1* (Rajabi, 2014). Además, MUC1 reprime la transcripción de *CDH1* debido a que los complejos formados por MUC1, NFκB y p65 inducen la transcripción de metiltransferasas encargadas de metilar dicho gen (Rajabi, 2017).

MUC1 no sólo ejerce su actividad oncogénica controlando la expresión, sino que puede traslocarse a la membrana externa de las mitocondrias debido a la actividad chaperona de

“heat shock protein 70” (HSP70) y “heat shock protein 90” (HSP90) donde inhibirá la apoptosis celular asociada a estrés (Ren, 2004; Ren, 2006; Rajabi, 2017).

La expresión de MUC1 se ha descrito asociada a procesos inflamatorios relacionados con la presencia de citoquinas TNF α , IFN γ e IL6. Una inflamación crónica con presencia de MUC1 puede contribuir a la transformación celular relacionada con la activación de la vía de NF κ B, como sucede en el desarrollo del cáncer gástrico como consecuencia de la infección por *Helicobacter pylori* (Kufe, 2009).

5.3. c-MET con MUC1

HGF fue inicialmente caracterizado como un factor que inducía la proliferación hepatocitaria y la motilidad de las células epiteliales (Nakamura, 2011). HGF contacta con c-MET, un receptor tirosina kinasa encargado de mediar señales celulares relacionadas con supervivencia, proliferación, migración, morfogénesis y angiogénesis (Lai, 2009; Cecchi, 2010).

Durante el desarrollo hepático, hay una sobreexpresión de HGF por parte de las células mesenquimales y su contacto con c-MET constituye el principal estímulo para la progresión del ciclo celular en los hepatocitos (Mohammed, 2005), siendo también imprescindibles durante procesos de regeneración hepática. Además de regular la función celular normal, c-MET también está implicado en procesos tumorales en los que es frecuente una señalización aberrante (Ueki, 1997; Kaposi-Novak, 2006) relacionadas con tumores hepáticos más agresivos y con peor pronóstico (You, 2011). Se han descrito interacciones entre HGF/c-MET y múltiples vías de señalización, entre las que destacan: integrinas, plexinas de clase B, proteoglicanos, receptores asociados a proteínas G y MUC1 (Lai, 2009).

Se ha visto que c-MET puede interactuar con MUC1 y catalizar la fosforilación de éste en su dominio C-terminal en células de cáncer de páncreas (Singh, 2008). Pese a que la expresión de MUC1 se correlaciona con un mayor potencial metastásico y una peor supervivencia en cáncer de mama (Yuan, 2005), en el caso de CHC los resultados son contradictorios: existen estudios que describen una mayor expresión de MUC1 en CHC, mientras que otros no observan diferencias significativas (Cao, 1999; Ichikawa, 2006). Para explicar estos resultados se cree que los efectos oncogénicos de MUC1 dependen de las diferentes moléculas de señalización que interactúen con él (Singh, 2009). Incluso hay autores que afirman que la vía de señalización HGF/c-MET tiene diversos papeles durante la hepatocarcinogénesis dependiendo

de la expresión y del estado en que se encuentre MUC1 en la célula tumoral. Así, aquellos CHCs pobremente diferenciados y muy invasivos, caracterizados por poseer un fenotipo mesenquimal, son deficientes en la expresión de marcadores propios del linaje hepatocitario pero, sin embargo, sobreexpresan MUC1 y c-MET. Por el contrario, aquellos CHCs bien diferenciados, caracterizados por mostrar un fenotipo epitelial con marcadores propiamente hepatocitarios, expresan muy poco MUC1 y c-MET y, todavía hay una menor expresión de éstos cuando el hígado es cirrótico y menos cuando se trata de un hígado sano, lo que hace pensar que la expresión de estos marcadores se correlaciona con un proceso de transformación maligna (Cokakli, 2009; Bozkaya, 2012). Ante un estímulo de HGF, se induce fosforilación de c-MET, lo que provoca la inhibición de la interacción entre éste y MUC1, así como una disminución en los niveles de MUC1 (Bozkaya, 2012).

Los dominios citoplasmáticos de c-MET y MUC1 pueden interactuar con CTNNB1, pero si hay un estímulo de HGF, cuando éste contacta con su receptor, c-MET induce la fosforilación de CTNNB1, lo que comporta la inhibición de la interacción entre c-MET y CTNNB1. Esto hace que CTNNB1 se trasloque al núcleo de los hepatocitos donde se inducirá la expresión de c-MYC. Sin embargo, HGF no afecta a la unión entre MUC1 y CTNNB1 (He, 2007). Se ha visto en líneas celulares de CHC que el tratamiento con HGF se asocia a una mayor capacidad de migración e invasión, pero cuando se tratan las células con un inhibidor de la fosforilación de c-MET, la proliferación permanece inalterable. Además, experimentos de silenciamiento de MUC1 en líneas de CHC muestran que un estímulo de HGF se asocia a mayor expresión y señalización mediada por c-MET, acompañada de un incremento en la migración e invasión celular. Estos datos indican que MUC1 actúa como regulador de la fosforilación de CTNNB1 mediada por HGF/c-MET y de la consiguiente expresión de c-MYC en células de CHC. Así, la interacción entre MUC1 y c-MET regula la proliferación y la metástasis inducida por HGF durante el desarrollo del CHC (Bozkaya, 2012).

III. OBJETIVOS

El carcinoma hepatocelular (CHC) es el cáncer de hígado más frecuente y la sexta neoplasia con mayor incidencia en el mundo. Constituye la tercera causa de muerte por cáncer y la decimosexta causa de muerte a nivel mundial. Afecta principalmente a individuos con enfermedad hepática crónica que han desarrollado cirrosis.

En la metástasis, las células que se liberan del tumor pasan al torrente sanguíneo como células tumorales circulantes (CTCs). La detección de CTCs es de utilidad para valorar el pronóstico tumoral o predecir la respuesta terapéutica. La determinación de las CTCs se basa en la detección de marcadores específicos. Actualmente el único sistema aprobado por la FDA para la detección de CTCs (CellSearch, Veridex) basa su tecnología en la detección de EpCAM en pacientes con cáncer de colon, de mama o de próstata, pero no existe ningún sistema aprobado en pacientes con CHC.

Teniendo en cuenta dichos antecedentes hemos establecido el siguiente objetivo:

Objetivo 1: Detectar y caracterizar CTCs en pacientes con CHC.

- Aproximación al sistema CellSearch (Veridex).
- Analizar nuevos marcadores potenciales mediante Real Time-q PCR.
- Validar el nuevo marcador MUC1.

EpCAM es el marcador utilizado para determinar la presencia de CTCs. En el hígado adulto sano la expresión de EpCAM se limita a los colangiocitos y a las células progenitoras hepáticas y se re-expresa en los hepatocitos durante la hepatocarcinogénesis. La presencia de EpCAM en la célula transformada se asocia a mayor proliferación y a la adquisición de capacidad de migración, contribuyendo a empeorar el pronóstico de la enfermedad.

Teniendo en cuenta dichos antecedentes hemos establecido el siguiente objetivo:

Objetivo 2: Estudiar la función de EpCAM en la metástasis del CHC.

- Función de EpCAM en la proliferación celular.
- Función de EpCAM en la invasión celular.
- Función de EpCAM en la migración celular.

IV. METODOLOGÍA

A. Detección y caracterización de CTCs

1. Pacientes incluidos en el estudio

Este es un estudio prospectivo en el que han participado 214 pacientes visitados en la Unidad de Oncología Hepática del Hospital Clínic de Barcelona entre junio del 2013 y noviembre del 2016. Todos los pacientes incluidos han aceptado participar mediante la firma de un consentimiento informado aprobado por el comité ético del Hospital Clínic de Barcelona. Treinta y tres voluntarios sanos han sido incluidos como controles.

2. Sistemas de análisis de CTCs

Se ha procedido a la detección y caracterización de CTCs en muestras de sangre mediante tres metodologías: se ha realizado un estudio preliminar utilizando el sistema CellSearch (Veridex); se ha analizado la expresión génica de determinados marcadores mediante técnicas de Real Time-q PCR y finalmente, se ha determinado la presencia de CTCs mediante detección de los marcadores utilizando la tecnología ImageStream AMNIS (Merck Millipore).

3. Obtención de muestras

Una muestra de sangre periférica ha sido obtenida de cada participante. La extracción de sangre la han realizado enfermeras de la Unidad de Oncología Hepática del Hospital Clínic de Barcelona. Para la recogida de las muestras se han utilizado tubos CellSave (Veridex) en el caso de los pacientes incluidos en el estudio CellSearch (Veridex), y tubos Vacutainer (BD) en los pacientes en los que la detección de CTCs se ha realizado mediante Real Time-q PCR e ImageStream AMNIS (Merck Millipore). Los tubos Vacutainer (BD) contienen EDTA K₂ y pueden recoger hasta un volumen máximo de 10mL. Están conectados a un adaptador Luer (BD) que contacta con un Equipo Alado Vacutainer SafetyLok (BD), que es el que se introduce en la vena para proceder a la extracción. El volumen de sangre necesario para este estudio ha sido 7.5mL para el análisis por CellSearch (Veridex) y 20mL para los pacientes analizados por Real Time-q PCR o ImageStream AMNIS (Merck Millipore). La muestra de sangre ha sido obtenida siempre después de haber extraído el volumen necesario para las analíticas rutinarias del paciente. De esta manera se reducen al máximo las probabilidades de que en la muestra de sangre exista alguna contaminación por células epiteliales que se hayan podido descomar con la punción.

4. Metodologías de análisis de CTCs

4.1. CellSearch (Veridex)

Material

- Material contenido en el kit de detección de CTCs que facilita el fabricante (Veridex)
- 7.5mL de sangre de cada paciente incluido en el estudio.

En este estudio se han incluido un total de 7 pacientes. En la siguiente tabla aparecen algunas de las características clínicas de los pacientes analizados:

Diagnóstico	Número de pacientes (hombres/mujeres)	Edad	Etiología	Vivos/muertos/perdidos	AFP(<10ng/mL – >10ng/mL-ND)	Child Pugh (A/B/C)
Cirrosis sin tumor	1 (0/1)	49	Criptogénico	1/0	ND	0/1/0
			4 VHC			
BCLC B-C	6 (6/0)	69 (62-79)	1 Alcohol	1/5	1-5-0	5/1/0
			1 VHC alcohol			
Total	7 (6/1)					

Protocolo

Seguir las indicaciones del fabricante (Veridex).

Análisis de los resultados

Los datos obtenidos de cada paciente han sido analizados mediante el visionado de las imágenes obtenidas en este sistema por dos técnicos especialistas siguiendo las indicaciones del fabricante (Veridex).

4.2. Real Time-q PCR

Material

- Tubos (Corning)
- DPBS (Sigma-Lifescience)
- Lymphoprep (Axis-Shield)
- 20mL de sangre de cada participante incluido en el estudio.

Metodología

En este estudio se han incluido un total de 177 pacientes, 7 de los cuales corresponden a los 7 pacientes analizados por CellSearch (Veridex) y 33 voluntarios sanos. En la siguiente tabla aparecen algunas de las características clínicas de los pacientes analizados:

Diagnóstico	Número de pacientes (hombres/mujeres)	Edad	Etiología	Vivos/muertos/perdidos	AFP(<10ng/mL - >10ng/mL- ND)	Child Pugh (A/B/C)
Cirrosis sin tumor	20 (12/8)	59 (49-79)	9 VHC 1 VHB 2 Alcohol 2 VHC alcohol 2 VHB alcohol 4 Otras	15/4/1	12-6-2	13/6/1
BCLC0-A	69 (49/20)	62 (42-80)	30 VHC 7 VHB 1 VHC VHB 14 Alcohol 2 VHC alcohol 1 VHB alcohol 14 Otras	46/16/7	38-28-3	58/11/0
BCLC B-C	81 (73/8)	64 (48-82)	36 VHC 3 VHB 17 Alcohol 10 VHC alcohol 15 Otras	20/50/11	35-44-2	67/13/1
Colangiocarcinoma	1 (1/0)	70	1 VHC	0/0/1	1-0-0	1/0/0
Otras neoplasias	2 (2/0)	62 (55-69)	1 VHC alcohol 1 Otras	0/2/0	1-1-0	2/0/0
CHC - colangiocarcinoma	1 (1/0)	56	1 VHC alcohol	1/0/0	1-0-0	1/0/0
Hiperplasia nodular focal	3 (1/2)	45 (28-55)	1 VHC alcohol 2 Otras	3/0/0	3-0-0	3/0/0
Total	177 (139/38)					

Protocolo

Los 20mL de sangre de cada participante han sido transportados en un plazo máximo de treinta minutos desde la consulta donde son extraídos al laboratorio de Oncología Hepática del Hospital Clínic de Barcelona. Trabajando en cabina de flujo laminar (Nuair) se ha procedido según el siguiente protocolo:

- Para aumentar el rendimiento de obtención de células es necesario diluir la muestra de sangre con DPBS (Sigma-Lifescience) en una proporción final 1:1. Para ello se traspara el volumen de cada tubo a un tubo de 50 mL (Corning) que contiene 10mL de DPBS (Sigma-Lifescience) a temperatura ambiente (TA).
- Tras mezclar con una pipeta el volumen de cada tubo, traspasar el volumen de cada uno muy lentamente con la ayuda de una pipeta a un nuevo tubo de 50 mL (Corning) que contiene 10mL de lymphoprep (Axis-Shield), de manera que ahora se dispone de dos tubos. Cada tubo contiene: en la parte inferior 10mL de Lymphoprep (Axis-Shield) y encima de éste 20 mL de sangre y DPBS (Sigma-Lifescience).
- Seguidamente se realiza un gradiente de densidad de la siguiente manera: Centrifugar ambos tubos en la centrífuga Megafuge 16R (Thermo Scientific) durante 20 minutos a 800g con aceleración 2 y desaceleración 0.
- Recoger el anillo de PBMC de cada tubo de 50mL (Corning) con una pipeta y traspasar las PBMCs de ambos tubos a uno solo de 15mL (Corning).
- Proceder con el lavado de la muestra: Centrifugar el tubo de 15mL (Corning) a 1500rpms durante 10 minutos en la centrífuga Megafuge 16R (Thermo Scientific).
- Descartar el sobrenadante y añadir DPBS (Sigma Lifescience).
- Volver a centrifugar a 1500rpms durante 10 minutos.
- Descartar el sobrenadante.
- Congelar el pellet a -80°C hasta proceder con la extracción de RNA (según el protocolo descrito).
- Tras la extracción de RNA, proceder con la RT (según el protocolo descrito) y la posterior Real Time-q PCR.

Se ha utilizado *TBP* como gen de referencia y se ha analizado la expresión de los siguientes genes (utilizando las sondas descritas en el apartado en el que se explica el protocolo de Real Time-q PCR):

- *EpCAM*: junto con *TROP2* forma la familia de genes denominados TACSTD (“tumor-associated calcium signal transducer”) (Pak, 2012). Fue el primer antígeno humano

asociado a tumor (Munz, 2009) y en diversos tipos tumorales su expresión se asocia a una mal pronóstico debido a la relación que tiene con procesos proliferativos y metastásicos (Munz, 2004; Osta, 2004).

- TROP2: gen localizado en 1p32 (Cubas, 2009) sin intrones originado por retroposición de EpCAM a través de un intermediario de ARNm y comparte el 50% de las secuencias de EpCAM, hecho que hace pensar en un “exon shuffling” previo a la retroposición (Linnenbach, 1993; Maetzel, 2009). Codifica para una proteína transmembrana tipo I de 35KDa formada por 323 aa (Ohmachi, 2006). Posee un péptido hidrofóbico (1-26aa), un dominio extracelular (27-274aa), un dominio transmembrana (275-297aa) y una cola citoplasmática (298-323aa) (El Sewedy, 1998). Fue descrita por primera vez en trofoblasto y en líneas celulares de coriocarcinoma (Lipinski, 1981; Fong, 2008). Se sobreexpresa en muchos carcinomas, tales como cáncer gástrico (Fong, 2008; Mühlmann, 2009); de páncreas, en el que TROP2 se relaciona con metástasis en los ganglios linfáticos; cáncer colorrectal, donde se ha visto que elevados niveles de expresión se correlacionan con mayor metástasis hepática y mayor incidencia de muerte (Ohmachi, 2006), así como un incremento en la fosforilación de ERK1/ERK2 (Brondello, 1995; Meloche, 2007; Liu, 2013) hecho que se relaciona con un incremento en los niveles de CCND1 y CCNE1 y una mayor expresión de Ki-67 (Cubas, 2010; Liu, 2013). Como EpCAM, TROP2 parece tener diferentes papeles en los diferentes tipos de cáncer (Cubas, 2010).

Hay autores que detectan que en ausencia de TROP2 hay una elevada expresión CDH1, mientras que TROP2 sobreexpresado es suficiente para que CDH1 disminuya su expresión, por lo que especulan que elevados niveles de TROP2 en cáncer de cérvix podría estar induciendo la migración y la invasión celular mediante la limitación en la expresión de CDH1 (Cubas, 2009).

La cola citoplasmática de TROP2 es esencial para la señalización (Cubas, 2010). TACE y la subunidad catalítica presenilina 1 de la gamma-secretasa (PSEN1) son las encargadas de realizar la RIP. Esto comporta la liberación del dominio extracelular (ECD) y la acumulación del dominio intracelular (ICD) en el núcleo. La localización nuclear del ICD está presente en cáncer de próstata pero no en el tejido benigno adyacente, hecho que sugiere que la escisión de TROP2 tiene un papel determinante en la tumorigénesis. El ICD promueve autorrenovación, inicia una neoplasia prostática intraepitelial y está involucrado en una cascada de

señalización dependiente de CTNNB1. Así, CTNNB1 colocaliza en el núcleo con ICD en cáncer de próstata, no en tejidos benignos. Además, la pérdida de CTNNB1 elimina la capacidad de TROP2 de autorrenovación y transformación celular. Lo mismo sucede cuando se mutan los lugares de escisión transmembrana de TROP2, hecho que demuestra que la RIP es necesaria para la actividad de TROP2 (Stoyanova, 2012).

Las células progenitoras hepáticas que tienen la capacidad de diferenciarse a hepatocitos y a colangiocitos y que se asocian con procesos tumorigénicos expresan TROP2, pero no los hepatocitos de un hígado sano (Okabe, 2009). La expresión de TROP2 se relaciona con el desarrollo, la progresión tumoral y una peor supervivencia en pacientes con cáncer de cérvix (Liu, 2013).

- HSP70-1 (Heat shock protein 70-1): La familia de HSP70 está formada por ocho miembros, todos ellos con actividad chaperona (Murphy, 2013), pero sólo tres de ellos inducen su expresión ante una situación de estrés, siendo HSP70-1 el más sensible a éste (Parsian, 2000). Tiene una estructura formada por tres dominios: actividad ATPasa en el dominio N-terminal, zona de unión al sustrato (Zhu, 1996; Bertelsen, 2009) y extremo C-terminal que facilita su actividad de co-chaperona, lo que le permite interactuar con otras chaperonas implicadas en el plegamiento proteico (Allan, 2011). Su actividad se relaciona especialmente con respuesta a estrés térmico (Morano, 2007), hipóxico, oxidativo y de pH, por lo que en una situación en la que la célula no está sometida a estrés, los niveles de expresión de HSP70 son bajos, expresándose principalmente durante las fases G1 y S del ciclo celular, momento en el que se requiere su actividad chaperona (Taira, 1997).

El promotor de *HSP70-1* tiene un lugar de unión para "Heat shock factor 1" (HSF1) pero en situaciones en las que no existe estrés, HSF1 se encuentra inactivo en el citosol unido a HSP90. Sin embargo, cuando la célula se enfrenta a un estrés, el HSP90 que se encuentra unido a HSF1 deja de contactar con él, para hacerlo con otras proteínas que no están bien plegadas. Este cambio hace que HSF1 quede libre y se trasloque al núcleo donde contacta con el promotor de *HSP70* induciendo su transcripción (Mason, 1997; Cotto, 1999; Akerfelt, 2010).

Existe una elevada expresión de esta proteína en diversos tipos tumorales debido a la activación de HSF1, relacionándose con mal pronóstico (Wu, 2005; Westerheide, 2009; Chou, 2012). En el caso del CHC su expresión se asocia a tumores más grandes, con invasión de la vena porta y estadios más avanzados (Joo, 2005) ya

que es capaz de promover el crecimiento tumoral mediante la estabilización de CCND1 y la supresión de la apoptosis mediante inhibición de la vía de TP53 (Diehl, 2003; Calderwood, 2006; Tremosini, 2011), relacionándose con la expresión del marcador de proliferación Ki67 (Murphy, 2013) y con una inhibición de la apoptosis celular mediante la inhibición de la traslocación a la mitocondria de la proteína proapoptótica BAX (Gotoh, 2004; Stankiewicz, 2005). Además, evita que APAF-1 y procaspasa-9 se recluten en el apoptosoma; inhibe la actividad quinasa de c-JUN y P38, evitando su función apoptótica (Gabai, 1997; Park, 2001; Park, 2002); se une a AIF (Apoptosis Inducing Factor), hecho que causa una inhibición de la condensación de la cromatina, por lo que se inhibe la muerte celular independiente de caspasas (Ravagnan, 2001).

- MUC1: Mucina transmembrana cuya sobreexpresión se ha descrito en diversos tipos de cáncer (mama, ovario, pulmón, páncreas...), relacionándose con células cancerosas con especial motilidad (Bozkaya, 2012). En el CHC la expresión de MUC1 presenta ciertas controversias (Singh, 2009).
- hTERT: La telomerasa es una ribonucleoproteína cuya función enzimática es la de añadir repeticiones teloméricas *de novo* para mantener estable la longitud de los telómeros gracias a su subunidad catalítica hTERT (Collins, 2002). Se expresa durante el desarrollo embrionario, restringiéndose en el adulto a las células progenitoras, los órganos hematopoyéticos y las células reproductoras (Harrington, 2004; Liu, 2007). La activación de la telomerasa es suficiente para conferir un potencial replicativo ilimitado a las células y de hecho, es un evento frecuente durante la transformación tumoral (Blasco, 2003).

En pacientes con CHC se ha descrito la reactivación y la sobreexpresión de hTERT (Huo, 2006; Mizukoshi, 2006), así como en la mayoría de los distintos tipos de tumor (Qian, 2014), en los que su expresión se asocia con estadios avanzados de la enfermedad y un peor pronóstico (Tabori, 2006). El desarrollo del CHC es un complejo proceso en el que intervienen anomalías teloméricas (Begus-Nahrman, 2012), en las que hTERT contribuye a la malignización e inmortalización de las células (Zhou, 2015).

Análisis de los resultados

El análisis de los resultados de cada paciente se ha efectuado a partir de las CTs obtenidas para cada gen de interés, normalizando este resultado utilizando los valores de CTs del gen de referencia.

Hemos establecido el punto de corte que define positividad para la presencia de CTCs mediante análisis de deciles para cada uno de los marcadores con los resultados obtenidos en una población de 33 voluntarios sanos a los que se les ha aplicado idéntico protocolo de extracción y análisis muestral que a los pacientes. Todos aquellos valores superiores a los obtenidos en el 95% de los voluntarios sanos han sido considerados positivos de la presencia de CTCs.

Existen evidencias de que órganos inflamados o con lesiones premalignas pueden liberar células epiteliales al torrente sanguíneo (Cauley, 2016). Teniendo en cuenta que la cirrosis está considerada como un estadio preneoplásico (Riegler, 1996) y que el desarrollo del CHC tiene lugar principalmente sobre hígado cirrótico, hemos analizado la presencia de células epiteliales circulantes en un grupo de pacientes cirróticos sin evidencia de CHC. Este análisis nos ha permitido conocer las diferentes expresiones génicas respecto a los voluntarios sanos y establecer nuevos límites de detección en función de un fenotipo cirrótico.

Los datos obtenidos han sido analizado mediante el software estadístico SPSS1 versión 2.0.

4.3. ImageStream AMNIS (Merck Millipore)

Esta tecnología integra la capacidad de análisis de imagen cuantitativa junto a las características propias de un citómetro convencional, hecho que permite conocer el número de células y la expresión de determinadas proteínas previamente marcadas mediante anticuerpos. De este modo, tras realizar un marcaje de las proteínas de interés se obtienen imágenes de cada célula en las que se puede observar la localización de las proteínas marcadas.

Este sistema ha sido utilizado para detectar CTCs a partir de los 20mL de sangre de cada paciente sobre los que se realiza una lisis eritrocitaria previa mediante un protocolo basado en la utilización de cloruro amónico. Una vez lisado los eritrocitos se procede con una depleción

leucocitaria mediante el uso de anticuerpos contra CD45 unidos a esferas magnéticas combinados con el uso de columnas sostenidas sobre un soporte imantado que retienen las células CD45+. Esto permite obtener una muestra final enriquecida en CTCs.

La detección de CTCs se ha basado en el análisis de los siguientes marcadores: EpCAM, ya que es nuestra proteína de estudio; MUC1, para confirmar los datos obtenidos en el análisis realizado por Real Time-q PCR y CK8/18/19 como marcadores de célula epitelial. Se han utilizado anticuerpos que reconocen CD45 para detectar posibles leucocitos que se hayan podido quedar después de la depleción mediante el uso de las esferas magnéticas. Antes de proceder con el análisis de las muestras de sangre de los pacientes, ha sido necesaria una puesta a punto del sistema mediante tinciones de las líneas celulares BCLC5, BCLC9 y BCLC12 (línea de colangiocarcinoma con expresión positiva de MUC1), de las que se conocía la expresión positiva de los marcadores que querían detectarse en los pacientes. Los datos obtenidos han sido utilizados para el compensado del sistema, para establecer las concentraciones adecuadas de los anticuerpos y las condiciones óptimas de trabajo.

Material

- Tubos de 1.5mL (Eppendorf)
- Tubos 15mL (Corning)
- Tubos 50mL (Corning)
- DPBS (Sigma-Lifescience)
- Tampón de lisis eritrocitaria, para un volumen de un litro de H₂O miliQ (se almacena hasta seis meses a TA):

Reactivo	Cantidad	Casa comercial
NH ₄ Cl	8.26g	Sigma-Aldrich
KHCO ₃	1g	Sigma-Aldrich
ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	0.037g	Sigma-Aldrich

- Tampón de bloqueo y columna, en DPBS (Sigma-Lifescience):

Reactivo	Concentración	Casa comercial
Bovine serum abumine (BSA)	0.5%	Roche Diagnostics
EDTA	2mM	Sigma-Aldrich

- Tampón de citometría, en H₂O miliQ:

Reactivo	Concentración	Casa comercial
EDTA	1mM	Sigma-Aldrich
HEPES	25mM	Sigma-Aldrich
FCS	1%	Gibco

- FcR blocking reagent (Milteny Biotec)
- CD45 Microbeads (MACS Milteny Biotec)
- MACS Multistand (Milteny Biotec)
- Imán Midimacs
- Columnas LD (Milteny Biotech)
- Tampón para fijar (Life Technologies)
- Tampón para permeabilizar (Life Technologies)
- Anticuerpos:

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución
EpCAM- PerCP/Cy5.5	Abcam	1:25
CK3-6H5-FITC	Milteny Biotec	1:11
CD45- Vioblue 405	Milteny Biotec	1:20
MUC1-PE	Biolegend	1:20

- 20mL de sangre de cada paciente incluido en el estudio.

En este estudio se han incluido un total de 30 pacientes. En la siguiente tabla se muestran algunas de las características clínicas de los pacientes:

Diagnóstico	Número de pacientes (hombres/mujeres)	Edad	Etiología	Vivos / muertos /perdidos	AFP(<10ng/mL - >10ng/mL- ND)	Child Pugh (A/B/C)
BCLC 0-A	13(8/5)	64 (42-80)	4 VHB, 7 VHC, 1 alcohol, 1 AI	10/1/2	10-3-0	10/3/0
BCLC B-C	14(10/4)	64 (50-80)	2 VHB, 6 VHC, 4 alcohol, 2 NASH alcohol	8/6/0	5-8-1	11/3/0
Colangiocarcinoma	1 (0/1)	79	1 VHC	0/1/0	0-1-0	1A
Otras neoplasias	2(2/0)	52	2VHC	2/0/0	2-0-0	2A
Total	30					

Protocolo

Se parte de 20mL de sangre de paciente en los que se realizará la lisis eritrocitaria en dos tubos de 50mL (Corning). En cada uno de ellos:

- Añadir el tampón de lisis y la sangre en proporción (sangre: tampón) 1:5 (10mL de sangre + 40mL de tampón de lisis).
- Dejar 10 minutos a TA (lisis eritrocitaria).
- Centrifugar 5 minutos a 350g en la centrífuga Megafuge 16R (Thermo scientific). Tras la centrifugación, los eritrocitos lisados quedarán en el sobrenadante y las PBMC en el pellet.
- Eliminar el sobrenadante con los eritrocitos lisados.
- Añadir DPBS y recoger el pellet de los dos tubos en uno sólo.
- Centrifugar la suspensión celular a 300g durante 10 minutos en la centrífuga Megafuge 16R (Thermo scientific). Aspirar el sobrenadante completamente.
- Resuspender el pellet celular en 300 microL de tampón de bloqueo y columna.
- Añadir 100microL del FcR blocking reagent (Milteny Biotec).
- Añadir 100microL de las CD45 Microbeads (Milteny Biotec).
- Mezclar bien e incubar a 4 °C durante 15 minutos.
- Centrifugar la suspensión celular a 300g durante 10 minutos en la centrífuga Megafuge 16R (Thermo scientific).
- Aspirar el sobrenadante completamente.
- Resuspender las células en 500 microL de tampón de bloqueo y columna.
- Colocar el imán MidiMACS (Milteny Biotec) en el MACS MultiStand (Milteny Biotec) y posicionar la columna LD (Milteny Biotec) en el imán MidiMACS (Milteny Biotec).
- Situar un tubo de 15mL (Corning) en hielo bajo la columna.
- Equilibrar la columna añadiendo 2mL de tampón de bloqueo y columna y recogerlo en un tubo colocado debajo de la columna y descartar ese volumen.
- Colocar un tubo nuevo de 15mL (Corning) en hielo debajo de la columna.
- Introducir los 500 microL del tampón que contiene las células en la columna y recoger lo que va saliendo por la punta de la columna en el tubo de 15mL (Corning).
- Añadir 1mL de tampón de bloqueo y columna cuando el reservorio de la columna esté vacío y recoger lo que vaya saliendo. Realizar esta operación dos veces. Recoger todo lo que salga en el mismo tubo (esto corresponde a las células que no se han retenido en la columna).
- Centrifugar la suspensión celular a 300g durante 10 minutos en la centrífuga Megafuge 16R (Thermo scientific). Aspirar el sobrenadante completamente.
- Resuspender las células en 100 microL de tampón de citometría y añadir los anticuerpos de superficie:

- 4microL EpCAM PerCP/Cy5.5
- 10microL CD45 VioBlue
- 5microL MUC1 Pe
- Mezclar e incubar 20 minutos a oscuras a 4°C.
- Lavar las células añadiendo 1mL de tampón de citometría y centrifugar 300g durante 5 minutos en la centrífuga Megafuge 16R (Thermo scientific).
- Aspirar el sobrenadante.
- Añadir 100 microL del tampón para fijar (Life Technologies) e incubar 15 minutos a TA.
- Añadir 3mL de tampón de citometría y centrifugar 300g 5 minutos en la centrífuga Megafuge 16R (Thermo scientific).
- Aspirar el sobrenadante
- Añadir:
 - 50 microL de tampón para permeabilizar (Life Technologies)
 - 41microL tampón de citometría
 - 9microL CK3-6H5 (1:11) 9 microL
- Mezclar bien arriba y abajo y dejar 20 minutos a TA a oscuras.
- Añadir 3mL de tampón de citometría, centrifugar 5 minutos a 300g en la centrífuga Megafuge 16R (Thermo scientific).
- Aspirar el sobrenadante
- Resuspender las células en 50 microL de tampón de citometría y traspasar el volumen un tubo de 1.5mL (Eppendorf) para ser analizado por el sistema ImageStream AMNIS ISX (Merck Millipore).

Análisis de los resultados

El sistema ImageStream AMNIS ISX (Merck Millipore) dispone de dos cámaras, doce canales y cinco láseres de excitación. El análisis de las muestras mediante el uso de este sistema se ha efectuado según indicaciones del fabricante (Merck Millipore), obteniendo los datos necesarios para su análisis posterior. Esta tecnología permite fotografiar cada una de las células contenidas en la muestra a analizar, generando una imagen individual de cada una de ellas. El resultado final de cada muestra ha sido analizado mediante el software IDEAS Application versión 6.1 (AMNIS Corporation), según instrucciones del fabricante.

B. Función de EpCAM en la metástasis

5. Cultivos celulares

5.1. Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas para este proyecto fueron obtenidas a partir de tumores de tres pacientes intervenidos quirúrgicamente en la unidad de oncología hepática del Hospital Clínic de Barcelona entre los años 2000 y 2003 y que previamente habían dado su consentimiento por escrito. Tras la intervención quirúrgica, el tumor resecado en el quirófano fue trasladado a la unidad de Anatomía Patológica del Hospital Clínic de Barcelona para su caracterización y un fragmento de éste, tras ser seccionado del tumor original con ayuda de pinzas y una hoja de bisturí, fue trasladado en tampón "Hank's balanced solution" (HBSS, Sigma-Aldrich) a TA, contenido en un tubo cónico estéril de 15mL (Corning), a la sala de cultivos celulares con nivel de contención P2 del laboratorio de Oncología Hepática del Hospital Clínic de Barcelona.

En la sala de cultivos celulares, siempre trabajando dentro de la cabina de bioseguridad Clase II, tipo A2 (Nuairé) se procedió a la derivación de líneas celulares mediante el siguiente procedimiento:

- Traspasar el fragmento a una placa de cultivo p100 (TPP) con solución de digestión Hanks II (Sigma Aldrich) y colagenasa IV al 0.05% (Sigma-Aldrich) y fragmentarlo con ayuda de pinzas y bisturí hasta disgregarlo por completo.
- Traspasar el homogenado celular a tubos estériles de 15mL (Corning) y dejar en agitación en un baño (PolyScience) a 37°C durante 10 minutos.
- Dejar reposar la muestra durante 5-10 minutos y a continuación filtrarla a través de una gasa estéril.
- El producto resultante del filtrado se centrifuga a 170g durante 60 segundos en la centrífuga Megafuge 16R (Thermo Scientific).
- Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en tampón HBSS (Sigma-Aldrich). Mantener la muestra a TA.
- Recuperar el homogenado celular que se había quedado en la gasa estéril y volver a mezclarlo con solución de digestión Hanks II (Sigma Aldrich) y colagenasa IV al 0.05% (Sigma-Aldrich) en otro tubo estéril de 15mL (Corning). Proceder de la misma manera que con la muestra obtenida resultante de la filtración inicial, hasta llegar al paso en el que se resuspende el pellet celular en tampón HBSS (Sigma-Aldrich). Realizar este paso dos o tres veces, de manera que finalmente se obtienen tres o cuatro tubos con suspensiones celulares procedentes de digestiones tisulares sucesivas.

- Mezclar las suspensiones celulares procedentes de las distintas digestiones y purificar las células por centrifugación mediante un gradiente de densidad de alta resolución de ficoll (Sigma-Aldrich) al 15-40%. Las condiciones de centrifugación son 30 minutos a 800g y 4°C en la centrífuga Megafuge 16R (Thermo Scientific).
- Recoger los anillos que contienen las células y lavarlos con HBSS (Sigma-Aldrich).
- Sembrar las células en placas de cultivo p100 (TPP) utilizando medio de cultivo para líneas celulares de CHC.
- Dejar la placa en el incubador Autoflow IR direct heat CO₂ (Nuaire) que permite mantener los cultivos celulares en atmósfera humidificada a 37°C con un 21% de O₂.
- Controlar el cultivo celular mediante el uso del microscopio invertido ZEISS AXIO.
- Realizar cambios de medio cuando sea necesario, hasta observar una confluencia celular suficiente para ser divididas, y así sucesivamente, ir manteniendo el cultivo celular hasta obtener una línea celular estable.
- Realizar diluciones seriadas hasta obtener un cultivo celular procedente de una única célula que permite obtener una línea celular clonal.

Este protocolo se ha realizado con todas las líneas celulares utilizadas en este proyecto. Sin embargo, para obtener una de ellas, la denominada BCLC9, se realizó un paso previo en el que se implantó un fragmento del tumor en el hígado de un ratón de la cepa *nu/nu* Swiss mice (Iffa-Credo Animaux de Laboratoire, L'Abresle, France) de la siguiente manera: El ratón fue anestesiado mediante inyección intraperitoneal de Avertin, 2,2,2-Tribromo-ethanol (Sigma-Aldrich) a una dosis de 0.3 mg/g. Tras realizar una laparotomía media, el fragmento tumoral fue implantado en el lóbulo hepático anterior mediante sutura con Prolene 6-0. La incisión abdominal fue cerrada con grapas. El ratón fue controlado dos veces por semana. El desarrollo del implante hepático fue seguido por laparotomía tras anestesiarse al animal cada seis semanas. Tres meses después de haber implantado el fragmento tumoral se sacrificó el ratón por dislocación cervical (Armengol, 2004). A continuación se derivó la línea celular BCLC9 con idéntico protocolo al descrito anteriormente para el resto de líneas celulares.

Las líneas establecidas mediante este procedimiento y que han sido utilizadas para el desarrollo de esta tesis doctoral son las siguientes:

Línea	Sexo paciente	Edad paciente	Tumor de origen	Etiología	Fenotipo celular	Expresión de EpCAM
BCLC5	Mujer	49	CHC	VHC	Adherente	Negativa
BCLC6	Hombre	70	CHC	Alcohólica	Adherente	Negativa
BCLC9	Mujer	71	CHC	VHB	Adherente/ suspensión	Positiva

Estas líneas son mantenidas en el incubador Autoflow IR direct heat CO₂ (Nuair) que permite mantener los cultivos celulares en atmósfera humidificada a 37°C con un 21% de O₂. En caso de querer mantener las células en cultivo en condiciones de hipoxia se ha utilizado el incubador Micro Galaxy (RS Biotech) que mantiene los cultivos celulares en atmósfera humidificada a 37°C con un 1% de O₂.

5.2. Técnicas comunes de cultivos celulares

5.2.1. Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para las líneas de CHC con las que se ha desarrollado este proyecto tiene la siguiente composición:

Reactivo	Casa comercial	Concentración
Medio Ham's Nutrient Mixture without L-glutamine (NM F12 Ham)	Sigma-Aldrich	50%
Medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose (DMEM)	Sigma-Aldrich	50%
Fetal Calf Serum, origen sudamérica (FCS)	Gibco	10%
Aminoácidos no esenciales	Sigma-Aldrich	1X (stock 100X)
Piruvato sódico	Sigma-Aldrich	1mM
L-glutamina	Sigma-Aldrich	2mM
Penicilina	Sigma-Aldrich	100U/mL
Estreptomina	Sigma-Aldrich	100 microgr/mL

5.2.2. Tripsinización y cambio de medio

Lavar la placa a tripsinizar con Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS; Sigma-Life Science) para eliminar los restos de medio y añadir una solución de tripsina-EDTA (Sigma-Life Science). Dejar durante 3-5 minutos a 37°C en el incubador Autoflow IR direct heat CO₂ (Nuair) para que la tripsina-EDTA actúe. Una vez comprobado por microscopía invertida (Zeiss Axio) que las células se han despegado, añadir el doble de medio fresco que de tripsina-EDTA (Sigma-Life Science), resuspender las células y transferirlas a un tubo cónico estéril de 15 mL (Corning) que será centrifugado en la centrífuga Megafuge 16R (Thermo Scientific) a 1500 rpm (revoluciones por minuto) durante 5 minutos, obteniendo el pellet celular. Descartar el sobrenadante y añadir 5 mL de medio fresco. Proceder con el conteo celular mezclando 10 µL de la suspensión celular y 10 µL del colorante Trypan Blue (Invitrogen) en un tubo cónico de 1.5 mL (Eppendorf). Mezclar bien y traspasar 10 µL de la mezcla a una cámara de conteo (Invitrogen) y proceder con el conteo celular mediante un contador automático (Invitrogen). Tras el conteo celular, sembrar las células a la densidad deseada en una nueva placa o frasco de cultivo. Los cambios de medio y los pases celulares se realizan cada 2-3 días, dependiendo de las condiciones del cultivo celular.

5.2.3. Criopreservación

El proceso de congelación celular se realiza utilizando un medio formado en un 90% por FCS (Gibco) y en un 10% por Dimetilsulfoxido (DMSO; Sigma). Una vez tripsinizadas y contadas las células, resuspender la cantidad deseada en 1.5 mL de medio de congelación y alicuotar en crioviales de 2 mL (Cryo. S, Greiner Bio-One). A continuación, transferir los viales a un contenedor de congelación (Nalgene) que contiene 250 mL de isopropanol (VWR) a TA. Seguidamente, colocar el contenedor de congelación a -80°C durante 48 h (Nuair -86°C Ultralow freezer) y finalmente, si se desea, transferir los crioviales a un contenedor de nitrógeno líquido para una mayor preservación.

Para descongelar las células, extraer los viales del congelador de -80°C (Nuair -86°C Ultralow freezer) y transferirlos a un baño de agua (PolyScience) a una temperatura de 37°C hasta su descongelación. Inmediatamente después transferir el volumen contenido en el criovial a un tubo de 15 mL (Corning) que contiene 10 mL de medio de cultivo a 37°C. Centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos en la centrífuga Megafuge 16R (Thermo Scientific), descartar el sobrenadante y resuspender el pellet celular en el volumen de medio necesario para proceder al sembrado en las placas de cultivo deseadas. En caso de haber almacenado los viales en nitrógeno líquido, estos serán transportados desde el tanque de nitrógeno líquido hasta el

laboratorio mediante el uso de cajas de porexpan con nieve carbónica en su interior. Una vez en el laboratorio, el proceso de descongelación será idéntico al descrito en muestras mantenidas a -80°C.

5.2.4. Microscopía

Las células han sido observadas regularmente con el microscopio óptico invertido (Zeiss Axio), equipado con una fuente de fluorescencia (HBO 100). Las fotografías han sido tomadas con una cámara digital AxioCam MRc5 Zeiss acoplada al microscopio.

6. Transfección vector EpCAM (electroporación)

Para conseguir que las líneas celulares BCLC5 y BCLC6 que no expresan EpCAM de manera endógena lo expresen, se ha realizado el método de electroporación.

Material

- Líneas celulares BCLC5 parental y BCLC6 parental.
- Vector pCMV6-*EpCAM*-GFP (Origene).
- Sistema de electroporación Gene Pulser XCell (BioRad).
- Cytomix:

Reactivo	Casa comercial	Concentración
KCl	Merk Millipore	120mM
CaCl ₂	Merk Millipore	0.15mM
K ₂ HPO ₄	Merk Millipore	10mM (pH 7.6)
KH ₂ PO ₄	Merk Millipore	10mM (pH 7.6)
HEPES	Merk Millipore	25mM
EGTA	Merk Millipore	2mM
MgCl ₂	Merk Millipore	5mM
ATP	Merk Millipore	2mM
Glutación	Merk Millipore	250mM

Protocolo

- Preparar el reactivo Cytomix para cada electroporación en tubos limpios y estériles, con todos los componentes excepto el ATP y el glutatión y filtrar la solución mediante el uso de filtros de 0.22micras (Corning).
- Atemperar todos los reactivos a 37°C.
- Cultivar las líneas celulares que vayan a ser electroporadas en un flascón de 75cm² (T-75, TPP) a un 80% de confluencia.
- Aspirar el medio.
- Lavar con DPBS (Sigma-Life Science).
- Trispsinizar las células y contarlas.
- Transferir 6·10⁶ células a un tubo de 50mL (Corning) y rellenar el volumen necesario hasta 50mL con DPBS (Sigma-Lfe Science).
- Centrifugar a 700rpms durante 10 minutos en la centrífuga Megafuge 16R (Thermo Scientific).
- Aspirar el sobrenadante mediante el uso de una pipeta Pasteur.
- Resuspender el pellet celular mediante movimientos suaves y, a continuación, volver a rellenar el tubo de 50mL con DPBS hasta 50mL y volver a centrifugar a 700 rpms durante 10 minutos en la centrífuga Megafuge 16R (Thermo Scientific).
- Aspirar el sobrenadante mediante el uso de una pipeta Pasteur.
- Añadir al reactivo cytomix el ATP y el glutatión necesarios, obteniendo así Cytomix completo.
- Preparar un tubo de 50mL (Corning) con 12mL de medio DMEM (Sigma-Aldrich), 10% FCS, 100U/mL penicilina y 100microgr/mL estreptomycin. Atemperar a 37°C.
- Resuspender 6·10⁶ células en 400microL de Cytomyx completo y añadir 10microgr del vector pCMV-*EpCAM*-GFP.
- Mezclar bien arriba y abajo y transferir el volumen a una cubeta de electroporación (BioRad).
- Electroporar las células en las siguientes condiciones: 975microF (microfarads), 270V (voltios) y 20ms (milisegundos).
- Tras la electroporación, se transfiere el volumen de la cubeta al tubo de 50mL (Corning) que contiene los 12mL de medio y se dejan las células reposar durante 5 minutos.
- Sembrar los 12mL de medio con el contenido de la cubeta en una placa p100 y dejarla en el incubador Autoflow IR direct heat CO₂ (Nuair).
- Transcurridas 48h se comprueba que las células están verdes mediante un microscopio invertido (Zeiss Axio) equipado con una fuente de fluorescencia (HBO 100) y se inicia la selección de las células que han incorporado el plásmido de interés mediante tratamiento con el antibiótico de selección G418 (Sigma-Aldrich) a una concentración de 500microgr/mL cada

48h, realizando los cambios de medio y los pases celulares que sean necesarios durante los siguientes 15 días. Transcurrido este tiempo se realizan técnicas de Real Time-q PCR para comprobar la expresión de EpCAM a nivel de RNAm y de Western Blot (WB) para determinar su expresión proteica.

7. Silenciamiento génico mediante lentivirus

7.1. Silenciamiento de EpCAM

Material

- Líneas celulares
 - o A transfectar: BCLC5 EpCAM *high*, BCLC6 EpCAM, BCLC9 parental.
 - o Empaquetadoras: HEK293T.

- Reactivos

	Reactivo	Casa comercial	Concentración
	EPCAM - Human, 4 unique 29mer shRNA constructs in lentiviral GFP vector (Vector pGFP-C-shRNALenti A/B/C/D).	Origene	-
	Lentiviral packaging kit	Origene	
	Polybrene	Sigma-Aldrich	8microgr/mL
	Opti-MEM	Gibco	-
	Mega Tran	Origene	-
	Ultracel-30K	Merck Millipore	-
	Puomicina	Sigma-Aldrich	0.25; 0.5microgr/mL
	Medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose	Sigma-Aldrich	-
Medio células	(DMEM)		
	FCS	Gibco	10%
HEK 293T	L-glutamina	Sigma-Aldrich	4mM
	Piruvato sódico	Sigma-Aldrich	1mM

Protocolo

Día 1:

- Sembrar $2.5 \cdot 10^6$ células HEK293T en un placa p100 para cada uno de los cuatro constructos lentivirales (A/B/C/D) e incubar "overnight" a 37°C en el incubador Autoflow IR direct heat CO₂ (Nuair).

Día 2:

- En cuatro tubos de 1.5mL (Eppendorf) mezclar 500microL de Opti-MEM + 6microgr packaging plasmid + 5microgr de pLEnti-shRNA (A/B/C/D respectivamente, denominados tubos 1A, 1B, 1C, 1D).
- En cuatro tubos de 1.5mL (Eppendorf) mezclar 44microL de Mega Tran + 500microL de Opti-MEM, denominando cada tubo como 2A, 2B, 2C y 2D, respectivamente.
- Transferir el material de los tubos 1 a sus correspondientes tubos 2. Agitar mediante el uso de vórtex e incubar a TA entre 15 y 30 minutos.
- Añadir el volumen resultante de unificar los tubos 1 y 2 a cada una de las placas de 10mm que contienen las células HEK 293T sembradas el día anterior.
- Incubar "overnight" a 37°C en el incubador Autoflow IR direct heat CO₂ (Nuair).

Día 3:

- Comprobar mediante el microscopio óptico invertido (Zeiss Axio) equipado con una fuente de fluorescencia (HBO 100) que las células están verdes.
- Recoger el medio de transfección, transferirlo a un tubo estéril de 50mL (Corning) y mantenerlo a 4°C hasta que termine el experimento.
- Añadir 10mL de medio fresco e incubar 24h a 37°C en el incubador Autoflow IR direct heat CO₂ (Nuair).
- Sembrar 100000 células de las líneas celulares que vayan a ser infectadas por el virus (BCLC5 EpCAM *high*, BCLC6 EpCAM, BCLC9 parental) en un pocillo de una placa de 6 pocillos (TPP) y 200000 células en otro pocillo.

Día 4:

- Recoger el sobrenadante viral de las células en cultivo, transferirlo a un tubo estéril de 50mL y mantenerlo a 4°C.
- Añadir 10mL de medio fresco e incubar 24h a 37°C en el incubador Autoflow IR direct heat CO₂ (Nuair).

Día 5:

- Recoger el sobrenadante viral de las células en cultivo y añadirlo a cada uno de los tubos correspondientes que contienen el sobrenadante recogido el día 4, obteniendo así cuatro tubos (A/B/C/D) cada uno de los cuales contiene el medio de dos días correspondiente a cada uno de los pLEnti-shRNA.
- Centrifugar a 3000 rpms en la centrífuga Megafuge 16R (Thermo Scientific) y filtrar utilizando un filtro de 0.45micras (Corning) para eliminar los restos celulares.

En este punto el sobrenadante viral está listo para realizar la transducción. Los sobrenadantes se pueden utilizar en el momento, guardar a 4°C durante dos semanas o a -80°C durante periodos más largos.

- Refrigerar la centrífuga Megafuge 16R (Thermo Scientific) a 18°C.
- Cargar 12mL de H₂O_d en un filtro de centrifugado UltraCel-30K (Merck Millipore) y centrifugar a 4000g durante 5 minutos en la centrífuga Megafuge 16R (Thermo Scientific). Esto se hace en cuatro tubos previamente rotulados para cada uno de los pLEnti-shRNA utilizados.
- Descartar el eluyente por decantación de cada uno de los cuatro filtros de centrifugado UltraCel-30K (Merck Millipore) y añadir 12mL del medio con las partículas víricas correspondientes a cada uno de ellos. Centrifugar a 4000g durante 10 minutos en la centrífuga Megafuge 16R (Thermo Scientific).
- Descartar el eluyente por decantación de cada uno de los cuatro filtros de centrifugado UltraCel-30K (Merck Millipore) y añadir 12mL más del medio con las partículas víricas correspondientes a cada uno de ellos. Centrifugar a 4000g durante 20 minutos en la centrífuga Megafuge 16R (Thermo Scientific).
- Descartar el eluyente por decantación de cada uno de los cuatro filtros de centrifugado UltraCel-30K (Merck Millipore) y añadir 10mL de medio 50% DMEM y 50% NM F12 Ham. Centrifugar a 4000g durante 15 minutos en la centrífuga Megafuge16R (Thermo Scientific) y eliminar el eluyente.
- Recoger el concentrado viral de cada uno de los tubos y unirlos en un único tubo de 15mL (Corning) al que se añade 18mL de medio completo para líneas de CHC a 37°C + 8 microgr/mL de polybrene (Sigma-Aldrich).
- Eliminar el medio en el que se encuentran las células que van a ser infectadas y que se han sembrado el día 3 y sustituirlo por 3mL del concentrado viral + medio completo para líneas de CHC + 8microgr/mL de polybrene (Sigma-Aldrich). Incubar 4h.

- Eliminar el medio, añadir 3mL de medio completo e incubar 72h en el incubador Autoflow IR direct heat CO₂ (Nuair).
- Transcurridas 72h se comprueba que las células están verdes mediante un microscopio invertido (Zeiss Axio) equipado con una fuente de fluorescencia (HBO 100) y se inicia la selección de las células que han incorporado el plásmido de interés mediante tratamiento con puromicina (Sigma-Aldrich) En la condición en la que se ha sembrado 100000 células se añade 0.25microgr/mL y en la condición que se han sembrado 200000 se añade 0.5microgr/mL cada 48h, realizando los cambios de medio y los pases celulares que sean necesarios durante los siguientes 15 días. Transcurrido este tiempo se realizan técnicas de Real Time-q PCR para comprobar la expresión de EpCAM a nivel de ARNm y de Western Blot (WB) para determinar su expresión proteica.

7.2. Silenciamiento de CLDN7

Material

- Líneas celulares
 - A transfectar: BCLC5 parental, BCLC5 EpCAM *high*, BCLC6 parental, BCLC6 EpCAM, BCLC9 parental, BCLC9 EpCAM KD.
 - Empaquetadoras: HEK293T.
- Reactivos: Los mismos utilizados en el caso del silenciamiento de EpCAM a excepción del vector, que en este caso es CLDN7-Human, 4 unique 29mer shRNA constructs in lentiviral GFP vector,

Protocolo

Proceder igual que en el protocolo de silenciamiento de EpCAM.

8. Extracción RNA

Material:

- Kit *mirVana* miRNA ambition (Thermo Fisher Scientific).

Reactivo	Almacenaje
miRNA Wash solution 1	TA
Wash solution 2/3	TA
Collection tubes	TA
Filter Cartridges	TA
Lysis/Binding buffer	4°C
miRNA homogenate additive	4°C
Acid-Phenol: Chloroform	4°C
Elution solution	4°C

- Células de CHC en cultivo que han crecido adheridas (BCLC5 parentales y modificadas, BCLC6 parentales y modificadas) a una placa p100 (TPP); células con un fenotipo doble de adherencia-suspensión que tras ser traspasadas de la placa que las contenía a un tubo de 15mL (Corning) y posterior centrifugado de 5 minutos a 1500 rpms en la centrífuga Megafuge 16R (Thermo Scientific) se ha obtenido el pellet celular (BCLC9) y PBMCs obtenidas a partir de 20mL de sangre humana tras realizar un gradiente de lymphoprep (Axis-Shield). Tanto el pellet celular de las BCLC9 y PBMCs como las células que crecen adheridas, tras ser lavadas con DPBS (Sigma- Life Science) pueden ser congeladas a -80°C y realizar la extracción de RNA con posterioridad o se puede realizar la extracción de RNA directamente.
- Etanol absoluto (VWR)
- Centrífuga spectrofuge 16M (Labnet)
- Cabina de extracción de gases (Ascent Max Ductless)
- Termobloque (Eppendorf)
- "Scrapers" (TPP)
- Pipetas (Eppendorf)
- Puntas con filtro (StarLab)
- Tubos de 2mL (Eppendorf)

Protocolo

Proceder según las indicaciones del fabricante.

9. Cuantificación de RNA

La cuantificación del RNA extraído, así como la pureza del mismo se evalúan mediante el uso de un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific), según indicaciones del fabricante.

10. Retrotranscripción (RT)**Material**

- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)

Reactivo	Almacenaje
10X RT buffer	-20°C
10X RT Random primers	-20°C
25X dNTP Mix (100mM)	-20°C
Multiscribe Reverse Transcriptase (50U/microl)	-20°C

- RNase inhibitor 20U/microl
- Tubos de PCR de 0.5 mL (StarLab)
- RNA
- H₂O AccuGENE (Lonza)
- Termociclador PTC-100 (MJ research, INC)
- Puntas con filtro (Sorenso Bioscience)
- Pipetas (Eppendorf)

Protocolo

· Sacar todos los reactivos almacenados a -20°C y el RNA a -80°C y ponerlos en hielo hasta su completa descongelación.

· Preparar la reacción de RT-PCR, teniendo en cuenta que cada RT-PCR se realiza en un tubo de 0.5mL (Starlab) que contendrá un volumen final de 20microl:

- 2microg de muestra (RNA extraído)

- 10microL Master Mix:
 - o 10X RT Buffer 2microL
 - o 25X dNTP Mix (100mM) 0.8microL
 - o 10X RT Random Primers 2microL
 - o MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/microL) 1microL
 - o RNase inhibitor 20U/microL1microL
 - H₂O AccuGENE (Lonza) necesaria hasta un volumen final de 20microL
- Colocar los tubos de 0.5mL (StarLab) con los reactivos en el termociclador PTC-100 (MJ research, INC) y programar las siguientes condiciones para que tenga lugar la RT:
- 10 minutos → 25°C
 - 120 minutos → 37°C
 - 5 minutos → 85°C
 - ∞ → 4°C
- El producto resultante de la reacción de RT-PCR es ADNc y será el material utilizado para llevar a cabo la reacción de “Real Time-q PCR”. En caso de no realizar la “Real Time-q PCR” inmediatamente, el ADNc puede ser almacenado a -20°C (Liebherr Medline) hasta su uso.

11. Real time-q PCR

Material

- Sondas TaqMan

Gen	Sonda
<i>EpCAM</i>	Hs00158980-m1-FAM (Applied biosystems)
<i>TROP2</i>	Hs00242741-s1-FAM (Applied biosystems)
<i>MUC1</i>	Hs00904327-m1-FAM (Applied biosystems)
<i>HSP70</i>	Hs00359163-s1-FAM (Applied biosystems)
<i>hTERT</i>	Hs00972656-m1-FAM (Applied biosystems)
<i>MMP2</i>	Hs00234422-m1-FAM (Applied biosystems)
<i>MMP7</i>	Hs01042796-m1-FAM (Applied biosystems)
<i>MMP9</i>	Hs00234579-m1-FAM (Applied biosystems)
<i>MMP14</i>	Hs00237119-m1-FAM (Applied biosystems)
<i>CDH1</i>	Hs01023894-m1-FAM (Applied biosystems)

CCND1	Hs99999004-m1-FAM (Applied biosystems)
CTNNB1	Hs00355049-m1-FAM (Applied biosystems)
MYC	Hs00905030-m1-FAM (Applied biosystems)
VIM	Hs00185584-m1-FAM (Applied biosystems)
CLDN7	Hs00600772-m1-FAM (Applied biosystems)
TATA-binding protein (TBP)	4326322E-VIC (Applied biosystems)
(ribosomal protein large P 0)	Hs02992885_s1-VIC (Applied biosystems)
RPLP0	

- ADNc procedente de la RT-PCR
- Mix Applied Biosystems low rox (2X)
- Puntas con filtro (StarLab)
- Pipetas (Eppendorf)
- Tubos de 0.2mL (Applied Biosystems)
- Tubos de 2mL (Eppendorf)
- Placas de Real Time-qPCR de 96 pocillos (Applied Biosystems)
- Film adhesivo para placa de 96 pocillos (Applied Biosystems)
- Centrífuga 5810R (Eppendorf)
- Termociclador StepOne 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystem) y software (Applied biosystem).

Protocolo

- Descongelar todos los reactivos en hielo.
- Preparar las muestras de ADNc en tubos de 0.2mL (Applied Biosystems) y la mix de reacción en un tubo de 2mL (Eppendorf), teniendo en cuenta que cada reacción se hará por duplicado y en una placa de 96 pocillos (Applied Biosystems) en cada uno de los cuales ha de haber un volumen de 20microL, constituidos por:
 - Mix de reacción:
 - Mix Applied Biosystems low rox (2X) → 10 microL
 - Sonda RPLP0 (20X) o TBP (20X) unida al fluoróforo VIC → 1 microL
 - Sonda del gen a analizar unida al fluoróforo FAM (20X) → 1 microL

- ADNc → 8microL. Estos 8 microL contienen la concentración de ADNc necesaria para utilizar 20ng en cada reacción. Si el producto resultante de la RT-PCR se ha de diluir para lograr la concentración deseada se hace con H₂O AccuGENE (Lonza)
- Cuando la placa está preparada, tapar con un film adhesivo para placa de 96 pocillos (Applied Biosystems) y centrifugar a 1000rpms durante 2 minutos en la centrífuga 5810R (Eppendorf).
- Encender y programar el termociclador StepOne 7500 (Applied Biosystems) según indicaciones del fabricante para el análisis mediante el método $\Delta\Delta CT$.

Las condiciones de reacción son las siguientes:

- 2 minutos a 50°C
- 10 minutos a 95 °C
- 40 ciclos de 15 seg a 95°C + 1 minuto a 60°C
- Tras finalizar la reacción se procede con el análisis de los resultados según el método $\Delta\Delta CT$ utilizando el software de análisis que acompaña al instrumento StepOne 7500 (Applied Biosystems).

12. Western blot (WB)

12.1. Cultivo celular para extracción de proteína

Material

- Células de interés (BCLC5, BCLC6 y BCLC9 parentales y modificadas)
- Placa p100 (TPP)
- DPBS (Sigma-Life Science)
- Tubos de 15mL (Corning)

Protocolo

- Sembrar 1 millón de células en una placa p100.
- Incubar 24-48h a 37°C y 5% de CO₂ en el incubador Autoflow IR direct heat CO₂ (Nuair) hasta que la placa esté subconfluyente.
- Lavar la placa dos veces con DPBS (Sigma-Life Science) frío.
- Mantener las placas en hielo para procesarlas o, si se desea continuar en otro momento, congelarlas a -80°C (Nuair).
- ➔ Modificación para células con fenotipo mixto de adherencia y suspensión:
 - Recoger todo el medio celular de la placa p100 y pasarlo a un tubo de 15mL (Corning). Lavar dos veces.

- Lavar la placa de igual modo que en el caso de las células que crecen adheridas.
- Mantener las placas y los tubos en hielo para procesarlos o, si se desea continuar en otro momento, congelarlos a -80°C (Nuair).

12.2. Extracción de proteína

Para poder extraer la proteína del cultivo celular es necesario utilizar tampones cuya concentración salina permite la desestructuración de las membranas celulares y, por tanto, la liberación de las proteínas contenidas en la célula.

12.2.1. Extracción de proteína total

Material

- Tampón de lisis total

Reactivo	Concentración	Casa comercial
Tris pH 7.5	20mM	Sigma-Aldrich
NaCl	150mM	Sigma-Aldrich
MgCl ₂	5mM	Sigma-Aldrich
EDTA pH 8.0	10mM	Sigma-Aldrich
Triton X-100	1%	Sigma-Aldrich

Este tampón se prepara con anterioridad y se guarda a 4°C. Justo antes de proceder a la extracción de la proteína se añaden los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración	Casa comercial
1,4-Dithiothritol	1mM	Sigma-Aldrich
Na ₄ P ₂ O ₇	2.5mM	Sigma-Aldrich
β-Glicerol fosfato	10mM	Sigma-Aldrich
Na ₃ VO ₅	1mM	Sigma-Aldrich
NaF	50mM	Sigma-Aldrich
Inhibidor de proteasas 100X	1X	Sigma-Aldrich

- "Scraper"
- Tubos de 1.5mL (Eppendorf)
- Centrífuga 5424R (Eppendorf)

- Noria (Rotator SB2, Stuart)
- Pipetas (Eppendorf)
- Puntas de pipeta (StarLab)

Protocolo

Todo el proceso se realiza en hielo.

- Añadir 500microL del tampón de lisado total.
- Rascar la placa con un “scraper” para levantar las células y traspasar todo el volumen a un tubo de 1.5mL (Eppendorf).
- Colocar el tubo de 1.5mL (Eppendorf) en una noria (Rotator SB2, Stuart) e incubar en agitación durante 30 minutos a 4°C.
- Centrifugar a 14000g durante 15 minutos a 4°C.
- Recuperar el sobrenadante y traspasarlo con la ayuda de una pipeta (Eppendorf) a otro tubo de 1.5mL (Eppendorf).
- Determinar la cantidad de proteína con el método BCA.
- Congelar las muestras a -80°C hasta su uso.

12.2.2.Extracción de proteína nuclear

Material

- Tampón de lavado (tampón A)

Reactivo	Concentración	Casa comercial
HEPES pH 7.6	10mM	AppBio
KCl	10mM	Sigma-Aldrich
EDTA pH 8.0	100microM	Sigma-Aldrich
EGTA	100 microM	Sigma-Aldrich

Este tampón se prepara con anterioridad y se guarda a 4°C. Justo antes de proceder a la extracción de la proteína se añaden los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración	Casa comercial
1,4-Dithiothritol	1mM	Sigma-Aldrich
Na₂MoO₄	10mM	Sigma-Aldrich
Espermina	150microM	Sigma-Aldrich
Espermidina	75microM	Sigma-Aldrich
Inhibidor de proteasas 100X	1X	Sigma-Aldrich

- Tampón de extracto citosólico (Tampón A + Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich)): Añadir 62.5microL de Igepal CA-630 al 10% por cada mL del tampón A.
- Tampón de extracto nuclear (tampón C)

Reactivo	Concentración	Casa comercial
HEPES pH 7.6	20mM	AppBio
NaCl	400mM	Sigma-Aldrich
EDTA pH 8.0	1mM	Sigma-Aldrich
EGTA	1mM	Sigma-Aldrich

Este tampón se prepara con anterioridad y se guarda a 4°C. Justo antes de proceder a la extracción de la proteína se añaden los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración	Casa comercial
1,4-Dithiothritol	1mM	Sigma-Aldrich
Na₂MoO₄	10mM	Sigma-Aldrich
Inhibidor de proteasas 100X	1X	Sigma-Aldrich

- "Scraper"
- Tubos de 1.5mL (Eppendorf)
- Centrífuga 5424R (Eppendorf)
- Vórtex MS2 minishaker (IKA)
- Noria rotator SB2 (Stuart)
- Pipetas (Eppendorf)
- Puntas de pipeta (StarLab)

Protocolo

Todo el proceso se realiza en hielo.

- Añadir 500microL del tampón de extracto citosólico (A + Igepal CA-630).
- Rascar la placa con un “scraper” para levantar las células y traspasar todo el volumen a un tubo de 1.5mL (Eppendorf).
- Vortexar durante 10 segundos.
- Centrifugar a 14000g durante 30 segundos a 4°C.
- Recuperar el sobrenadante correspondiente el extracto citosólico y traspasarlo a un tubo de 1.5mL (Eppendorf) nuevo.
- Lavar el pellet dos veces con tampón de lavado (tampón A): Se añaden 200microL del tampón A y se centrifuga a 14000g 30 segundos a 4°C y se descarta el sobrenadante.
- Añadir a pellet 150microL del tampón de extracto nuclear (tampón C).
- Colocar el tubo de 1.5mL (Eppendorf) en una noria rotator SB2 (Stuart) e incubar durante 30 minutos a 4°C.
- Centrifugar a 14000g durante 15 minutos a 4°C.
- Recuperar el sobrenadante, correspondiente al extracto nuclear y traspasarlo a un nuevo tubo de 1.5mL (Eppendorf).
- Determinar la cantidad de proteína con el método BCA.
- Congelar las muestras a -80°C hasta su uso.

12.3. Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteínas de los extractos obtenidos se realiza mediante el método BCA, siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific), mediante el uso de una placa de 96 pocillos (TPP) en la que, además de poner las muestras a cuantificar por triplicado, se ha de poner una recta patrón hecha con BSA, según indicaciones del fabricante (Thermo Scientific).

12.4. Preparación de muestras para cargar el gel

El WB se basa en la cuantificación de la expresión de determinadas proteínas en los diferentes carriles que aparecen después de todo el protocolo en una membrana de nitrocelulosa. Para poder cuantificar la proteína de interés y poder ver diferencias de expresión entre los diferentes carriles, es necesario que todos los carriles contengan la misma cantidad de proteínas. Por ello, tras realizar la cuantificación proteica mediante BCA, es necesario preparar cada muestra que quiera ser estudiada en un tubo de 1.5mL (Eppendorf) a la misma concentración que el resto de muestras que vayan a ser cargadas en el mismo gel.

Material

- Laemmly 5X:

Reactivo	Concentración	Casa comercial
Tris pH 6.8	312.5mM	Sigma-Aldrich
Glicerol	50%	Sigma-Aldrich
Dodecilsulfato sódico (SDS)	10%	Sigma-Aldrich
Azul de bromofenol	0.05	AppliChem

- H₂O miliQ
- β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich)
- Puntas (StarLab)
- Pipetas (Eppendorf)
- Termobloque (Eppendorf)
- pHímetro (Crison)

Protocolo

· Suponiendo que se quieren preparar las muestras a una concentración de 1microgr/microL en un volumen final de 200microL, en cada tubo de 1.5mL se pone:

- 30microL Laemmly 5X + 10microL β-mercaptoetanol
- X microL de muestra para estar a una concentración final de 1microgr/microL
- 200microL - 30microL Laemmly - 10microL β-mercaptoetanol - X microL de muestra = Volumen de H₂O MiliQ

· Hervir las muestras a 99°C durante 10 minutos para desnaturalizar las proteínas y a continuación traspasarlas a hielo y cargar el gel o congelar a -80°C para ser usadas con posterioridad.

12.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Material

- Tampón "Running"

Reactivo	Concentración	Casa comercial
Tris-glicina	25mM Tris-190mM glicina	Sigma-Aldrich
SDS	0.1%	Bio-Rad
H ₂ O destilada	-	-

- Gel de poliacrilamida 4-15% (Bio-Rad)
- Puntas de electrophoresis (Bio-Rad)
- Lisados proteicos
- Marcador de peso molecular (Bio-Rad)
- Fuente de electroforesis (Bio-Rad)

Protocolo

- Desprecintar la tira adhesiva inferior del gel de poliacrilamida 4-15% (Bio-Rad), quitar el peine situado en la parte superior, montarlo en el cassette de electroforesis y colocarlo en la cubeta, tal y como indica el fabricante. Si únicamente se dispone de un gel, en el lado opuesto se coloca una pieza de contención que facilita el fabricante.
- Llenar la cubeta con tampón "Running" hasta las marcas indicadas y eliminar las posibles burbujas que hayan podido quedar en los pocillos del gel mediante una punta de electroforesis (Bio-Rad).
- Cargar 10microL del marcador de peso molecular (Bio-Rad) en el primer pocillo.
- Cargar 10-50microL de los lisados proteicos en los demás pocillos.
- Si quedaran pocillos libres, cargarlos con el mismo volumen de Laemmly 1X que el cargado en los lisados proteicos.
- Tapar la cubeta haciendo coincidir los electrodos.
- Conectar la fuente de electroforesis (Bio-Rad) y establecer las condiciones de 90 voltios (V) y 500 mAmperios (mA) durante 10 minutos para que se concentren las proteínas. A continuación, variar el voltaje hasta 110 V y 500mA hasta que el frente de proteínas llegue el límite inferior del gel.
- Parar la fuente de electroforesis (Bio-Rad) y quitar la tapa.

12.6. Transferencia del gel a la membrana de nitrocelulosa

Material

- Tampón de transferencia

Reactivo	Concentración	Casa comercial
Tris-glicina	25mM Tris-190mM glicina	Sigma-Aldrich
Metanol	20%	VWR
H ₂ O destilada	-	-

- TBS-T

Reactivo	Concentración	Casa comercial
Tris pH 7.5	20mM	Sigma-Aldrich
NaCl	150mM	Sigma-Aldrich
Tween-20	0.1%	Sigma-Aldrich
H ₂ O destilada	-	-

- Gel de poliacrilamida (Bio-Rad)
- Membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad)
- Pinzas de WB (Bio-Rad)
- Palanca metálica de WB (Bio-Rad)
- pHímetro (Crison)
- Espátula de plástico para WB (Bio-Rad)
- Papel de filtro para WB (Thermo Fisher Scientific)
- Esponjas de WB (Bio-Rad)
- Rojo ponceau (Sigma-Aldrich)
- Cassettes de transferencia
- Agitador (Sciencific industries)
- Bandejas

Protocolo

- Sacar el gel del cassette y de los plásticos que lo contienen mediante el uso de la palanca metálica (Bio-Rad) situándola en las marcas indicadas por el fabricante.
- Cortar la parte superior de los pocillos con ayuda de la espátula de plástico (Bio-Rad).
- Traspasar el gel a una bandeja con tampón de transferencia frío.

- Preparar un sándwich sobre los cassettes de transferencia, montándolo bien empapado con el tampón de transferencia sobre el lado negro de la siguiente manera: Esponja (Bio-Rad) - papel de filtro para WB Thermo Fisher Scientific) – gel (Bio-Rad) – papel de filtro para WB (Thermo Fisher Scientific) – esponja (Bio-Rad), evitando la formación de burbujas.
- Cerrar el cassette y colocarlo en la estructura de transferencia y todo esto en la cubeta de electroforesis con tampón de transferencia frío.
- Situar un bloque de hielo en la parte posterior de la cubeta y un agitador.
- Tapar la cubeta haciendo coincidir los electrodos.
- Colocar toda la cubeta en una caja con hielo y el conjunto sobre un agitador magnético (Selecta).
- Establecer en la fuente (Bio-Rad) las condiciones de transferencia a 300V y 350mA durante 45 minutos.
- Parar la fuente de electroforesis y quitar la tapa.
- Sacar la membrana del cassette y traspasarla a una bandeja con H₂O destilada.
- Descartar el H₂O destilada y añadir rojo ponceau (Sigma-Aldrich).
- Incubar 2-3 minutos y lavar con H₂O destilada.
- Recuperar el rojo ponceau (Sigma-Aldrich) y lavar dos veces con H₂O destilada.
- Colocar la membrana entre dos láminas de acetato y fotocopiarlas para tener un registro de que la transferencia de las proteínas se ha efectuado correctamente.
- Lavar la membrana con TBS-T en el agitador (Scientific industries).
- Si es necesario, cortar la membrana según el peso molecular de las proteínas de interés y así se hibridará posteriormente cada anticuerpo en el fragmento deseado en el que se espera detectar la proteína.

12.7. Hibridación de anticuerpos

Material

- Leche desnatada (Bio-Rad)
- TBS-T con leche al 5%
- Anticuerpos

Anticuerpo	Dilución	Especie	Casa comercial
EpCAM	1:2000	Conejo	Abcam
VIM	1:250	Ratón	Abcam
CDH1	1:5000	Mouse	BD
CTNNB1	1:2000	Ratón	BD
CCND1	1:500	Ratón	Abcam
CLDN7	1:100	Conejo	Abcam
CLDN7 fosforilada	1:700	Conejo	Abcam
MYC	1:500	Conejo	Abcam
SFPQ	1:500	Ratón	Abcam
ACTB	1:4000	Conejo	Abcam
GAPDH	1:200	Conejo	Abcam
IgG-HRP conejo	1:2000	Cabra	Cell Signaling
IgG-HRP ratón	1:2500	Conejo	Abcam

- Pinzas de WB (Bio-Rad)
- Bandejas de plástico
- Agitador en rotación (KiskerBiotech GmbH &Co.KG)
- Tubos 50mL (Corning).

Protocolo

- Colocar la membrana en una bandeja de plástico y bloquearla con 10mL de TBS-T con leche al 5% durante 1h en agitación y a TA.
- Lavar tres veces con TBS-T, realizando lavados de 5 minutos cada uno.
- Diluir los anticuerpos primarios según indicaciones del fabricante en 10mL de TBS-T.
- Traspasar la membrana con ayuda de las pinzas (Bio-Rad) a un tubo de 50mL (Corning) y añadir el anticuerpo primario diluido.
- Incubar "overnight" a 4°C en agitación (KiskerBiotech GmbH &Co.KG).
- Realizar tres lavados con TBS-T de la membrana.
- Diluir los anticuerpos secundarios según indicaciones del fabricante en 10mL de TBS-T.
- Eliminar los restos de TBS-T y añadir el anticuerpo secundario diluido.
- Incubar 1h a TA en rotación (KiskerBiotech GmbH &Co.KG).
- Recuperar el anticuerpo secundario diluido y lavar la membrana con TBS-T tres veces, realizando lavados de 5 minutos cada uno.

12.8. Revelado por quimioluminiscencia

Material

- Image Quant Las4000 (GE HealthCare)
- Sustrato de quimioluminiscencia (Thermo Fisher Scientific)

Protocolo

- Traspasar la membrana a una bandeja con H₂O destilada.
- Preparar un volumen de 1mL por membrana a una dilución 1:1 con los reactivos A y B del sustrato de quimioluminiscencia (Thermo Fisher Scientific).
- Eliminar el exceso de H₂O destilada y traspasar la membrana a un plástico.
- Cubrir la membrana con la dilución de sustrato de quimioluminiscencia (Thermo Fisher Scientific) e incubar un minuto a TA.
- Eliminar el exceso de reactivo y colocar la membrana entre dos láminas de acetato y llevar al equipo Image Quant Las4000 (GE HealthCare).
- Proceder al revelado por quimioluminiscencia según instrucciones del fabricante, utilizando el software de análisis ImageQuant Las4000 versión 1.2.
- Cuantificar las bandas obtenidas mediante el uso del programa ImageJ según instrucciones del fabricante, referenciando las intensidades de las bandas de la proteína de interés respecto a las intensidades correspondientes a las bandas de la proteína que se ha utilizado como control.

13. Inmunofluorescencia

Material

- Líneas celulares BCLC5, BCLC6 y BCLC9 parentales y modificadas
- Anticuerpos

Anticuerpo	Dilución	Especie	Casa comercial
EpCAM	1:100	Conejo	Abcam
Claudina 7	1:50	Conejo	Abcam
Alexa 488	1:1000	Cabra	Abcam
Alexa 568	1:1000	Cabra	Abcam

- Cubreobjetos redondos de 12mm (VWR)
- Acetona (VWR)

- Etanol (VWR)
- Metanol (VWR)
- H₂O destilada
- Tubos de 50mL (Corning)
- Pinzas
- Placa de 24 pocillos (TPP)
- Poli-Lisina (Sigma-Aldrich)
- DPBS (Sigma-Life Science)
- Agitador (Sciencific industries)
- Parafilm (Laboratory Film)
- Ultraplus Antibody diluent (Thermo scientific)
- Hoechst (Sigma-Aldrich)
- ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen)
- Portaobjetos (Menzel Gläser)

Protocolo

Antes de realizar una inmunofluorescencia es necesario tener las células fijadas sobre en los cubreobjetos redondos de 12mm (VWR). Para ello se procede de la siguiente manera:

- Preparar 3 tubos de 50mL con acetona, H₂O destilada y etanol absoluto, respectivamente.
- Coger los cubreobjetos redondos de 12mm con unas pinzas e ir introduciéndolos primero en acetona, después en agua y finalmente en etanol, escurriéndolos entre un paso y el siguiente. Este proceso sirve para desengrasar los cubreobjetos.
- Colocar los cubreobjetos apoyados en las paredes de una placa de 24 pocillos (TPP), colocando un cubreobjetos por pocillo para permitir que se sequen. Seguidamente mover un poco la placa para que se coloquen sobre la superficie de ésta.
- Añadir 500microl de poli-Lisina al 0.01% (Sigma-Aldrich).
- Incubar 5-20 minutos a TA.
- Aspirar y añadir H₂O destilada.
- Aspirar y añadir DPBS (Sigma-Life Science).
- Aspirar y sembrar las células. Dejar las células en cultivo el tiempo deseado.
- Eliminar el medio y hacer un lavado con DPBS (Sigma-Life Science).
- Permeabilizar y fijar las células añadiendo una dilución 1:1 de acetona y metanol frío e incubar en hielo durante 10 minutos.
- Eliminar la acetona + metanol y proceder con la inmunofluorescencia o bien congelar la placa a -20°C hasta su uso.

Seguidamente ya se puede realizar la inmunofluorescencia propiamente dicha:

- Añadir DPBS (Sigma-Life Science) a los pocillos de la placa que los contiene (TPP) y dejar en el agitador (Sciencific industries) durante 10 minutos para que se rehidraten.
- Preparar una placa p100 con un dibujo cuadrículado en la parte de abajo.
- Recortar un trozo de parafilm (Laboratory Film) con la forma de la placa p100 (TPP) y colocarlo dentro de ésta.
- Añadir 20 microL de Ultraplus Antibody diluent (Thermo Scientific) en cada cuadradito.
- Coger los cubreobjetos (VWR) de la placa de 24 pocillos (TPP) con la ayuda de unas pinzas y colocar cada uno de ellos boca abajo sobre los 20 microL de Ultraplus Antibody diluent (Thermo Scientific) e incubar 30 minutos a TA con la placa cerrada y un trozo de papel húmedo en el interior para generar una cámara húmeda.
- Preparar el anticuerpo primario a la dilución indicada por el fabricante utilizando Ultraplus Antibody diluent (Thermo Scientific) y colocar 20 microL en un cuadrado del parafilm (Laboratory Film) situado sobre la placa p100.
- Coger con unas pinzas los cubreobjetos que han sido bloqueados, eliminar el exceso de Ultraplus Antibody diluent (Thermo scientific) poniendo el vidrio vertical sobre un papel y colocar el vidrio boca abajo encima de cada gota que contiene 20 microL del anticuerpo primario
- Incubar 1h a TA con la placa cerrada y un trozo de papel húmedo en el interior para generar una cámara húmeda.
- Hacer 3 lavados de 5-10 minutos cada uno: Para ello se cogen los cubreobjetos con unas pinzas y se colocan boca arriba uno en cada pocillo de una placa de 24 pocillos (TPP) y se añade DPBS (Sigma-Life Science) y se agita lentamente en el agitador (Sciencific industries) y tras los 5-10 minutos se elimina el DPBS (Sigma-Life Science) con el vacío.
- Preparar el anticuerpo secundario a dilución 1:1000 en Ultraplus Antibody diluent (Thermo scientific) acompañado con el fluorocromo de interés y proceder del mismo modo que con el anticuerpo primario pero con un tiempo de incubación de 30 minutos a TA y tapado con papel de aluminio.
- Lavar los cristales de igual manera que se ha hecho tras la incubación con el anticuerpo primario.
- Colocar cada cubreobjetos (VWR) boca abajo encima de 20microL de Hoechst (Sigma-Aldrich) preparado según indicaciones del fabricante y dejar el tiempo necesario para poner 5 microL del medio de montaje ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen) sobre los portaobjetos (Menzel Gläser), seguidamente se colocan los cubreobjetos (VWR) boca abajo en los portaobjetos (Menzel Gläser) .

- Dejar secar y al día siguiente se puede proceder al visionado mediante microscopía de fluorescencia mediante el microscopio Olympus BX51 que lleva acoplada la fuente Olympus U-RFL-T y la cámara Olympus DP71, que permiten registrar la imagen mediante un ordenador que utiliza el software Cell versión D. También se puede realizar una observación de las muestras mediante microscopía confocal utilizando el microscopio Leica SP5.
- El almacenaje posterior de las muestras se realiza en cajas opacas guardadas a 4°C.

14. Inmunohistoquímica

Material

- Cortes de tejido parafinado situadas sobre portaobjetos (preparaciones)
- Anticuerpos

Anticuerpo	Dilución	Especie	Casa comercial
EpCAM (EpiCD)	1:100	Conejo	Abcam
EpCAM (EpEX)	1:100	Ratón	Dako
CLDN7	1:200	Conejo	Abcam
MYC	1:500	Conejo	Abcam
CDH1	1:100	Ratón	BD
NM23A	1:100	Conejo	Abcam
CK19	1:50	Ratón	Abcam
Ki67	1:200	Conejo	Abcam

- Acetona (VWR)
- Metanol (VWR)
- Koplín Jar
- DPBS (Sigma-Life Science)
- Estufa (Termaks)
- PT-link (Dako)
- Solución a pH ácido para desenmascarar los antígenos (Dako)
- Agitador (Grant-bio)
- H₂O₂ (Dako)
- Ultraplus Antibody diluent (Thermo scientific)
- Anticuerpo secundario (Labelled polymer-HRP, Dako)
- 3,3'-diaminobenzidina (DAB) + chromogen (Dako)

- Hematoxilina (Panreac)
- Medio de montaje Aquatex (Merck)
- Cubreobjetos (VWR)

Protocolo

- Colocar la preparación parafinada en una estufa (Termaks) a 37°C “overnight”.
- Colocar las preparaciones en el PT-Link (Dako) según indicaciones del fabricante y añadir la solución a pH ácido para desenmascarar los antígenos (Dako), diluida 50 veces en H₂O destilada.
- Programar el PT-link (Dako) para que alcance los 95°C durante 20 minutos y baje posteriormente hasta los 65°C.
- Una vez finaliza el programa del PT-link (Dako), pasar las preparaciones inmediatamente a un koplín jar con DPBS (Sigma-Life Science) e incubar en agitación durante 5 minutos.
- Colocar las preparaciones sobre una superficie plana (lo ideal es generar un ambiente de atmósfera húmeda colocando una bayeta mojada dentro de una caja de plástico con tapa y colocar las preparaciones encima de la bayeta) y añadir una gota de H₂O₂ al 3% (Dako) suficiente como para cubrir toda la preparación y dejar 5 minutos (este paso se realiza para que la peroxidasa que tengan las células se inactive ya que al contactar con H₂O₂ exógena actuará sobre ella y después, al poner el anticuerpo secundario con la peroxidasa de rábano, la señal que se observe sea sólo suya).
- Lavar la preparación con DPBS (Sigma-Life Science) en un koplín jar durante 5 minutos.
- Secar el exceso de PBS que quede sobre la preparación y colocar las preparaciones sobre la bayeta.
- Bloquear la preparación con Ultraplus Antibody diluent (Thermo Scientific) durante 30 minutos (unos 30 microL por preparación).
- Eliminar el exceso de Ultraplus antibody diluent (Thermo Scientific) por decantación sobre un papel.
- Añadir el anticuerpo primario diluido en Ultraplus Antibody diluent (Thermo Scientific) a la dilución indicada por el fabricante y dejar actuar durante una hora a TA.
- Realizar tres lavados de 10 minutos cada uno con DPBS (Sigma-Life Science) en un koplín jar colocado sobre un agitador (Grant-bio).
- Eliminar el exceso de DPBS (Sigma-Life Science) y colocar las preparaciones sobre la bayeta.
- Añadir una gota de anticuerpo secundario (Labelled polymer-HRP, DAKO) y dejar actuar durante 30-45 minutos.

- Realizar tres lavados de 10 minutos cada uno con DPBS (Sigma-Life Science) en un koplín jar colocado sobre un agitador (Grant-bio). Mientras se realizan los lavados, preparar la DAB+chromogen (Dako) a una proporción 1:50.
- Secar las preparaciones por los bordes de la muestra con un papel. Añadir una gota de la dilución 1:50 de la DAB sobre la preparación y observar en qué momento se observa un color marrón. Cuando se detecte el cambio de color, introducir los portas en un koplín jar con H₂O para parar la reacción.
- Realizar la contratinción con hematoxilina (Panreac): poner hematoxilina en un koplín jar e introducir las preparaciones durante 3-5 minutos.
- Traspasar las preparaciones a otro koplín jar con agua del grifo. Hacer varios cambios de agua hasta que las preparaciones queden limpias. Secar alrededor de la muestra con papel.
- Montar la muestra mediante la colocación de una gota de medio de montaje Aquatex (Merck) sobre la preparación y colocar encima un cubreobjetos (VWR). Opcionalmente podría montarse la muestra en un medio no acuoso, por lo que la muestra habría que deshidratarla realizando una batería de cuatro etanoles absolutos seguida de cuatro xiloles. Esto se haría bajo una cabina de extracción de gases sumergiendo las preparaciones, colocadas en una cesta, un minuto en cada cubeta. Finalmente se esperaría que se secan y se colocaría un cubreobjetos sobre la preparación utilizando DPX (Sigma-Aldrich) como medio de montaje.
- Para proceder al visionado de las preparaciones se utiliza el microscopio Olympus BX51 acoplado a la cámara DP71 que permiten registrar la imagen mediante un ordenador que utiliza el software Cell versión D.

15. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Material

- Kit ELISA para detectar EpCAM (Sigma-Aldrich)
- Sobrenadante resultante del cultivo de las líneas celulares BCLC5 parentales, BCLC5 EpCAM *low*, BCLC5 EpCAM *high*, BCLC6 parentales, BCLC6 EpCAM y BCLC9 parentales.
- Espectrofotómetro FLUOstar optima (BMG labtech)
- Pipeta multicanal (Eppendorf)
- Recipientes plásticos (Corning)

Protocolo

Proceder según las indicaciones del fabricante.

16. Ensayo de proliferación

16.1. Protocolo MTS para células con doble fenotipo

Material

- Líneas celulares BCLC9 parentales y BCLC9 modificadas
- Medio de cultivo para líneas de CHC
- Placa de 96 pocillos de fondo plano (TPP)
- Pipetas (Eppendorf)
- Puntas (StarLab)
- Pipeta Combitip (Eppendorf)
- Puntas Combitip (Eppendorf)
- Reactivo MTS (Abcam)
- Agitador (Scientific industries)
- Espectrofotómetro FLUOstar optima (BMG labtech)

Protocolo

Antes de proceder al ensayo, es necesario sembrar por triplicado en una placa de 96 pocillos de fondo plano (TPP) las células que vayan a ser objeto de estudio en un volumen por pocillo de 200microl, así como tres pocillos que únicamente contendrán medio sin células y que serán utilizados como “blanco”. Serán necesarias tantas placas en condiciones idénticas de tratamiento como puntos de tiempo de estudio tenga el ensayo. En cada punto del estudio se procederá de la siguiente manera:

- Añadir 20microl del reactivo MTS (Abcam) a todos los pocillos mediante la pipeta y las puntas combitips (Eppendorf).
- Agitar 15 segundos en el agitador (Scientific industries).
- Incubar 2 horas a 37°C en el incubador de CO₂ (Nuair).
- Agitar 15 segundos en el agitador (Scientific industries).
- Leer la absorbancia de la placa en el espectrofotómetro FLUOstar optima (BMG labtech) a una longitud de onda de 490nm y analizar mediante el programa Optima Data análisis.
- Calcular la proliferación restando el “blanco” a los pocillos con células y estableciendo valores de absorbancia del tiempo cero como control de proliferación.

16.2. Protocolo cristal violeta para células que crecen adheridas

Material

- Soluciones

Reactivo	Concentración	Casa comercial
Cristal violeta	0.1% (en H ₂ O miliQ)	Panreac
Ácido acético	10% (en H ₂ O miliQ)	Panreac
Glutaraldehído	50% (en DPBS)	Panreac

- Placa de 96 pocillos de fondo plano (TPP)
- Pipetas (Eppendorf)
- Puntas (StarLab)
- DPBS (Sigma-Life Science)
- Agitador (Sciencific industries)
- Espectrofotómetro FLUOstar optima (BMG labtech)

Protocolo

Antes de proceder al ensayo, es necesario sembrar por triplicado en una placa de 96 pocillos de fondo plano (TPP) las células que vayan a ser objeto de estudio en un volumen de medio por pocillo de 200microL. Serán necesarias tantas placas en condiciones idénticas de tratamiento como puntos de tiempo de estudio tenga el ensayo. En cada punto del estudio se procederá de la siguiente manera:

- Aspirar el medio de los pocillos.
- Lavar las células con 200 microL de DPBS (Sigma-Life Science) y aspirar.
- Fijar las células con 100 microL de 1% glutaraldehído (Panreac).
- Incubar 15 minutos a TA.
- Lavar dos veces con DPBS (Sigma-Life Science).
- Añadir 100 microL/pocillo de cristal violeta al 0.1% (Panreac).
- Incubar 15-30minutos a TA.
- Lavar varias veces con agua destilada el exceso de colorante.
- Secar la placa al aire (puede pararse la técnica en este momento, dejando la placa a TA hasta que se desee extraer el color).
- Añadir 200microL de ácido acético al 10% (Panreac).
- Agitar 15 minutos en un agitador (Sciencific industries).

- Leer la absorbancia a 620nm en el espectrofotómetro FLUOstar optima (BMG labtech), siguiendo las instrucciones del fabricante y analizar mediante el programa Optima Data análisis.
- Calcular la proliferación estableciendo valores de absorbancia del tiempo cero como control de proliferación.

17. Ensayo de invasión sobre matrigel

Material

- Líneas celulares BCLC5, BCLC6 y BCLC9 parentales y modificadas
- Kit Biocoat matrigel invasión chamber (Corning)
- Insertos con matrigel
- Insertos control
- Diff Quik (MicrOptic)
- Pinzas
- Medio de cultivo para líneas de CHC con y sin FCS.

Protocolo

Proceder según las indicaciones del fabricante.

18. Ensayo de invasión sobre colágeno IV

Material

- Kit Cultrex Collagen IV cell invasión assay (R&D systems)
- Líneas celulares BCLC5 parentales y modificadas
- Medio de cultivo para líneas de CHC con y sin FCS
- Espectrofotómetro FLUOstar optima (BMG labtech)

Protocolo

Proceder según las indicaciones del fabricante.

19. Ensayo de migración

Material:

- Líneas celulares BCLC5 y BCLC6 parentales y modificadas
- Medio para líneas de CHC con y sin FCS
- Mitomicina C (Sigma-Aldrich)
- TGF β (PeproTech)
- Placa p6 (TPP)
- Puntas (StarLab)
- Pipetas (Eppendorf)
- DPBS (Sigma-Life Science)
- Microscopio invertido (Zeiss Axio)
- Cámara acoplada al microscopio (AxioCam MRc5 Zeiss)
- Programa de análisis de imagen ImageJ

Protocolo

- Sembrar cada línea celular por triplicado. Las células se siembran en pocillos de una placa p6 (TPP) en un volumen de 3mL de medio para líneas de CHC con FCS al 10%, a una confluencia tal para que transcurridas 48 horas ésta sea del 80-90%.
- Incubar a 37°C en el incubador de CO₂ (Nuaire).
- 24 horas después de haber sembrado las células, eliminar el medio, lavar los pocillos con DPBS (Sigma-Life Science) y añadir 3mL de medio para líneas de CHC sin FCS. Una variante de este paso consiste en añadir TGF β a una concentración de 10ng/mL para ver si supone alguna modificación en el comportamiento migratorio de las células.
- Incubar a 37°C en el incubador de CO₂ (Nuaire).
- 48 horas después de haber sembrado las células, añadir al medio que las contiene 10microgr/microL de mitomicina C (Sigma-Aldrich) e incubar a 37°C en el incubador de CO₂ (Nuaire) durante una hora.
- Realizar un “scratch” mediante una punta de pipeta de 1000microL atravesando de lado a lado cada pocillo en el que se han sembrado las células.
- Eliminar el medio.
- Lavar con DPBS (Sigma-Life Science)
- Añadir 3mL de medio para líneas de CHC con FCS al 10% a cada pocillo.
- Fotografiar una misma zona de cada pocillo durante los días en los que vaya a durar el experimento mediante la cámara (AxioCam MRc5 Zeiss) acoplada al microscopio invertido

(Zeiss Axio). De esta manera se puede observar como en días sucesivos el área que queda libre sin células va disminuyendo y cada vez se observa un área mayor cubierta por las células que van migrando hacia el borde opuesto del “scratch”.

· Cuando finaliza el experimento es necesario analizar las imágenes obtenidas de cada pocillo mediante el programa ImageJ que permite medir el área libre de células en cada pocillo y, tras referenciar el área libre de cada línea a lo largo de los días respecto al área libre inicial, se puede conocer la capacidad migratoria de cada línea celular y, por tanto, compararla con el resto de líneas estudiadas.

20. Ensayo de formación de esferoides

Material

- Líneas celulares BCLC5 y BCLC6 parentales y modificadas
- Medio de cultivo para líneas de CHC
- Placas de 96 pocillos de fondo plano (TPP)
- PoliHema (Sigma-Aldrich)
- Etanol al 95% (VWR)
- DPBS (Sigma-Life Science)
- Tubos 50mL (Corning)
- Balanza de precisión (Sartorius)
- Agitador de tubos (Stuart)
- Microscopio invertido Zeiss Axio
- Cámara AxioCAm MRc5 Zeiss
- Pipetas (Eppendorf)
- Puntas (StarLab)

Protocolo

· Preparar una solución de PoliHema (Sigma-Aldrich) a una concentración de 20mg/mL utilizando como diluyente etanol al 95% (VWR) y pesando la cantidad de PoliHema (Sigma-Aldrich) necesaria en la balanza de precisión (Sartorius). Esta solución se prepara en un tubo de 50mL (Corning) y se deja “overnight” a TA en un agitador de tubos (Stuart) para que el PoliHema se disuelva bien, seguidamente se guarda a 4°C.

· El recubrimiento de la placa se ha de realizar en días previos a la utilización de la placa ya que es un proceso que dura muchas horas y ha de hacerse un doble recubrimiento para asegurar

que las células no se adhieran: Añadir 100microL de la solución de poliHema (Sigma-Aldrich) preparada a una concentración de 20mg/mL. Añadir este volumen a cada pocillo y dejar la placa abierta dentro de una cabina de cultivos (Nuair) hasta que se evapore (unas 4h). Volver a añadir el mismo volumen y espera hasta que se vuelva a evaporar. Cuando se ha evaporado, la placa puede guardarse para ser utilizada más adelante (hasta unas dos semanas después). En el momento de utilizar la placa se ha de realizar un lavado previo con DPBS (Sigma-Life Science).

- Preparar una dilución celular de tal manera que sembrando 200microL del volumen que contenga las células de interés se estén sembrando 25 células de cada línea en 8 pocillos de la placa de 96 pocillos (TPP) recubierta con poliHema (Sigma-Aldrich).
- Dejar la placa a 37°C en el incubador de CO₂ (Nuair) durante 30 días e ir comprobando regularmente el estado del cultivo mediante el microscopio invertido Zeiss Axio. Añadir medio si fuera necesario.
- Fotografiar cada uno de los esferoides generados mediante la cámara AxioCam MRc5 Zeiss acoplada al microscopio invertido Zeiss Axio.
- Analizar mediante el uso del software ImageJ el número y el tamaño de los esferoides generados.

21. Co-Inmunoprecipitación (Co-Ip)

Material

- Líneas celulares BCLC5 EpCAM *high*, BCLC6 EpCAM, BCLC9 parental.
- Universal Magnetic Co-Ip Kit (Active Motif)
- Anticuerpos

Anticuerpo	Dilución	Especie	Casa comercial
CLDN7	1:50	Ratón	Thermo Fisher
CLDN7	1:100	Conejo	Abcam
EpCAM	1:2000	Conejo	Abcam
EpCAM	1:100	Conejo	Novus biologicals
IgG-HRP conejo	1:2000	Cabra	Cell Signaling
IgG-HRP ratón	1:2500	Conejo	Abcam

- Material para WB

Protocolo

Proceder según las indicaciones del fabricante, utilizando el anticuerpo CLDN7 (Thermo Fisher) para realizar la inmunoprecipitación de CLDN7, el anticuerpo EpCAM (Novus Biologicals) para inmunoprecipitar EpCAM y los anticuerpos CLDN7 (Abcam) y EpCAM (Abcam) como anticuerpos primarios para hibridar en la membrana de nitrocelulosa del WB. El análisis de los resultados obtenidos se realiza mediante las imágenes obtenidas mediante Image Quant Las4000 (GE HealthCare), considerando que existe una Co-Ip de ambas proteínas estudiadas cuando habiendo hecho la inmunoprecipitación para una de ellas e hibridando en el WB el anticuerpo para la otra, se obtiene una banda en la membrana de nitrocelulosa.

22. Modelo murino

Mediante ensayos *in vivo* se ha estudiado el efecto de EpCAM en las líneas celulares BCLC5 y BCLC9 parentales y modificadas en la generación de tumores. Para ello se han utilizado ratones hembra de la cepa SCID Hairless Outbred (SHO[®]), del laboratorio Charles River. Esta cepa se caracteriza por una inmunodeficiencia severa sin expresión de linfocitos B ni T y por estar desprovistos de pelaje. Las deficiencias inmunológicas que definen a esta cepa la convierten en un modelo ideal para realizar ensayos de tumor “xenograft”, ya que cuando se inyectan células tumorales de origen humano en esta cepa, el sistema inmune del animal no puede impedir el desarrollo del tumor. Además, el hecho de no tener pelo facilita el seguimiento del tumor cuando éste se implanta a nivel subdérmico. Debido a que tienen el sistema inmunológico comprometido es necesario mantener a los animales en un estabulario SPF (libre de patógenos específicos). Los diferentes estudios se iniciaron después de transcurrir una cuarentena de quince días tras la llegada de los animales procedentes del laboratorio de origen Charles River.

Material

- Líneas de CHC BCLC5 parental, BCLC5 EpCAM *low*, BCLC5 EpCAM *high*, BCLC5 EpCAM KD, BCLC9 parental, BCLC9 EpCAM KD y líneas derivadas.
- DPBS (Sigma-Life Science)
- Material de cultivo celular
- Agujas de 21G (BD)
- Jeringas 1mL (BD)

Protocolo

Hemos analizado el efecto de la expresión y el silenciamiento de EpCAM en las líneas celulares BCLC5 y BCLC9. Para ello se han establecido diferentes grupos de estudio, formados cada uno de ellos por cinco animales hembra mantenidos en jaulas independientes en las condiciones propias de un estabulario SPF con acceso a alimento y a agua permanente.

Para estudiar el efecto de EpCAM en las líneas celulares BCLC5 parentales y modificadas hemos inyectado a cada animal $6 \cdot 10^6$ células contenidas en 100microL de DPBS (Sigma-Life Science) a nivel subdérmico en el flanco derecho posterior del dorso, mediante una aguja de 21G (BD) y una jeringa de 1mL (BD). Se ha establecido un grupo control también formado por cinco animales, a cada uno de los cuales se les ha inyectado 100microL de DPBS (Sigma-Life Science) mediante el mismo procedimiento que en los grupos de estudio. Los animales se han mantenido con vida durante tres meses.

Para analizar el efecto de EpCAM en las líneas BCLC9 parentales y modificadas hemos procedido de igual manera que en las líneas BCLC5 pero esta vez se han inyectado $1 \cdot 10^6$ células y los animales se han mantenido con vida durante 30 días ya que estas líneas tienen mayor capacidad proliferativa que las líneas celulares BCLC5.

Los pesos de los animales, así como el estado físico de los mismos han sido revisados tres veces por semana desde el inicio del ensayo hasta la finalización del mismo. Los ratones han sido sacrificados mediante dislocación cervical. A cada uno de los animales sacrificados se les ha practicado una necropsia en la que se han inspeccionado los diferentes órganos y se han aislado los tumores generados a partir de las células inyectadas. Todos los tumores generados se han preservado en formol y se han llevado a la unidad de Anatomía Patológica del Hospital Clínic de Barcelona donde, tras efectuar una inclusión en parafina, han sido seccionados en láminas de 2 micras de grosor y colocados sobre portaobjetos para realizar técnicas de inmunohistoquímica. De algunos de los tumores generados se han derivado líneas celulares que han sido estudiadas con posterioridad.

23. Análisis estadístico

Los datos están expresados como la media con su desviación estándar correspondiente. Los análisis estadísticos han sido realizados utilizando el test t-student para la comparación de dos grupos. Para la comparación de varios grupos se ha utilizado el análisis de la varianza de una vía ANOVA (one-way analysis). En todos los casos los valores obtenidos son el resultado de al menos 3 experimentos independientes. Se ha considerado la existencia de significación estadística cuando $P \text{ valor} < 0.05$.

V. RESULTADOS

OBJETIVO 1: Detectar y caracterizar CTCs en pacientes con CHC.

Para llevar a cabo el primer objetivo he analizado la presencia de CTCs en pacientes visitados en la unidad de Oncología Hepática utilizando tres sistemas:

1. CellSearch (Veridex).

En este estudio se han analizado las muestras de sangre de 7 pacientes cirróticos. Seis pacientes presentan CHC avanzados clasificados en estadios BCLC B-C, el séptimo es un paciente cirrótico sin evidencia de CHC.

Con este sistema no se ha detectado ninguna CTC en la población estudiada.

2. Real Time-qPCR.

En este estudio se han incluido un total de 177 pacientes, 7 de los cuales corresponden a los 7 pacientes analizados por CellSearch (Veridex) y 33 voluntarios sanos.

Hemos analizado la expresión génica de marcadores cuya expresión se ha descrito incrementada en CHC: *EpCAM*, asociado a mal pronóstico tumoral, mayor proliferación celular y metástasis (Munz, 2004; Osta, 2004); *TROP2*, gen de la familia de *EpCAM*, promueve la proliferación y la migración celular (Okabe, 2009); *hTERT*, su reexpresión confiere potencial replicativo ilimitado (Blasco, 2003); *MUC1*, codifica para una glicoproteína transmembrana cuya expresión en CHC se relaciona con mayor potencial metastásico y peor supervivencia (Cao, 1999, Ichiykawa, 2006) y *HSP70*, asociado a tumores con elevada proliferación y más invasivos (Joo, 2005; Tremosini, 2011). Se ha utilizado *TBP* como gen de referencia.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla (Tabla 1):

Diagnóstico	Número de pacientes (hombre/mujer)	Pacientes positivos estableciendo el "cutoff" con los datos de voluntarios sanos					Pacientes positivos estableciendo el "cutoff" con los datos de pacientes cirróticos sin tumor				
		EpCAM	TROP2	hTERT	MUC1	HSP70	EpCAM	TROP2	hTERT	MUC1	HSP70
Cirrosis sin tumor	20 (12/8)	1 (5.8%)	1 (5%)	1 (7.14%)	5 (26.3%)	7 (35%)	0	1 (5%)	1 (7.14%)	1 (5.2%)	1 (5%)
BCLC 0-A	69 (49/20)	6 (13.6%)	1 (1.6%)	3 (6.9%)	13 (22.8%)	20 (32.2%)	1 (2.2%)	0	3 (6.9%)	3 (5.2%)	5 (8%)
BCLC B-C	81 (73/8)	5 (8.7%)	6 (7.7%)	7 (11.1%)	25 (32.8%)	22 (28.5%)	1 (1.7%)	2 (2.5%)	5 (7.9%)	7 (9.2%)	6 (7.7%)
Colangiocarcinoma	1 (1/0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Otras neoplasias	2 (2/0)	0	0	0	2 (100%)	0	0	0	0	0	0
CHC – colangiocarcinoma	1 (1/0)	0	0	0	1 (100%)	1 (100%)	0	0	0	0	0
Hiperplasia nodular focal	3 (1/2)	1 (33.3%)	0	0	0	1 (33.3%)	0	0	0	0	0
Total	177										

Tabla 1: Resultados del análisis de los pacientes con expresión génica positiva para los marcadores analizados. Comparación de los resultados obtenidos utilizando el "cutoff" del 95% de los voluntarios sanos y el "cutoff" del 95% de los pacientes cirróticos.

Los datos obtenidos para cada grupo de pacientes han sido analizados para cada marcador utilizando el test estadístico t-student. Dicho análisis ha permitido concluir que:

- Los pacientes cirróticos sin tumor expresan niveles más elevados de los marcadores analizados que la población de voluntarios sanos.
- El marcador MUC1 se asocia a la presencia de CTCs en pacientes con CHC.
- Únicamente el 13.6% de los pacientes analizados con un diagnóstico de CHC BCLC 0-A y el 8.7% de los pacientes con un diagnóstico de CHC BCLC B-C muestran expresión positiva para EpCAM, por lo que éste no es un buen marcador para detectar CTCs en nuestra población. Este resultado impide validar CellSearch (Veridex) como sistema para detectar CTCs en CHC.

3. ImageStream AMNIS (Merck Millipore).

En este sistema se han analizado muestras de sangre procedentes de 30 pacientes. La detección de CTCs se ha basado en el análisis de los siguientes marcadores: EpCAM, ya que es nuestra proteína de estudio; MUC1, para confirmar los datos obtenidos en el análisis realizado por Real Time-q PCR y CK8/18/19 como marcadores de célula epitelial. Los resultados obtenidos del análisis se muestran en la siguiente tabla (Tabla 2):

Diagnóstico	Número de pacientes	Pacientes con células positivas para cada marcador		
		EpCAM	CK	MUC1
BCLC 0-A	13	2 (15.3%)	4 (30.7%)	8 (61.5%)
BCLC B-C	14	1 (7.14%)	11 (78.5%)	11 (78.5%)
Colangiocarcinoma	1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Otras neoplasias	2	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)
Total	30			

Tabla 2: Porcentaje de pacientes con expresión positiva para los distintos marcadores analizados por el sistema ImageStream AMNIS (Merck Millipore).

Utilizando el marcador MUC1 hemos sido capaces de detectar CTCs en mayor porcentaje de pacientes que cuando el marcador utilizado ha sido EpCAM. Los datos obtenidos confirman el potencial de MUC1 como marcador para detectar CTCs en la población de pacientes con CHC.

La siguiente tabla muestra la media del número de CTCs detectadas en cada grupo de pacientes según el marcador utilizado para su detección (Tabla 3).

Diagnóstico	Número de pacientes	Media del número de células positivas para cada marcador		
		EpCAM	CK	MUC1
BCLC 0-A	13	0.23 (0-2)	0.84 (0-7)	2 (0-9)
BCLC B-C	14	0	4.76 (0-25)	4.23 (0-13)
Colangiocarcinoma	1	0	0	0
Otras neoplasias	2	1	0.5 (0-1)	1(0-2)
Total	30			

Tabla 3: Número de células positivas para cada marcador analizadas con el sistema ImageStream AMNIS (Merck Millipore).

La media del número de CTCs positivas para MUC1 en pacientes con CHC inicial, en un estadio BCLC 0-A, es mayor que el número de células positivas para EpCAM. Sin embargo, el análisis estadístico mediante el test t-student muestra que estas diferencias no son significativas. En cambio, en aquellos pacientes con CHC más avanzado, en un estadio BCLC B-C, el número de CTCs detectadas es significativamente mayor cuando la detección de CTCs se realiza en base al marcador MUC1. De hecho, ninguno de los pacientes analizados ha mostrado expresión positiva de EpCAM.

La media del número de “clusters” de células obtenidos en cada grupo de pacientes se muestra en la siguiente tabla (Tabla 4):

Diagnóstico	Número de pacientes	Media del número de “clusters” obtenidos
BCLC 0-A	13	610 (0-5919)
BCLC B-C	14	757 (0-4804)
Colangiocarcinoma	1	573
Otras neoplasias	2	590 (378-802)
Total	30	

Tabla 4: Número de “clusters” de CTCs obtenidos en cada grupo de pacientes analizados con el sistema ImageStream AMNIS (Merck Millipore).

El análisis estadístico de los resultados no muestra diferencias significativas entre los grupos estudiados. La mayoría de los “clusters” detectados no muestran positividad para los marcadores analizados. Esto puede ser debido a una expresión realmente negativa o a una limitación física que impide el reconocimiento de los epítomos por parte de los anticuerpos utilizados.

OBJETIVO 2: Estudiar la función de EpCAM en la metástasis del CHC.

Para llevar a cabo el segundo objetivo he trabajado con modelos *in vitro* e *in vivo* en los que se han utilizado líneas celulares derivadas de pacientes con CHC intervenidos quirúrgicamente en la unidad de Oncología Hepática del Hospital Clínic de Barcelona. Estas líneas celulares son las denominadas BCLC5, BCLC6 y BCLC9. Las características de éstas están descritas en el apartado Metodología.

1. Expresión de EpCAM.

Para analizar el efecto de EpCAM en la proliferación, invasión y migración celular, hemos forzado su expresión en las líneas BCLC5 parental y BCLC6 parental mediante transfección génica del vector pCMV6-EpCAM-GFP que contiene *EpCAM* y un gen de resistencia a G418. Hemos derivado dos líneas celulares que muestran distintos niveles de expresión de EpCAM procedentes de la línea BCLC5 parental (BCLC5 EpCAM *low* y BCLC5 EpCAM *high*) y una línea celular procedente de la línea BCLC6 parental, denominada BCLC6 EpCAM. La expresión génica ha sido confirmada por técnicas de Real Time-q PCR (Fig. 1a, 1c) y la expresión proteica mediante WB (Fig. 1b, 1d).

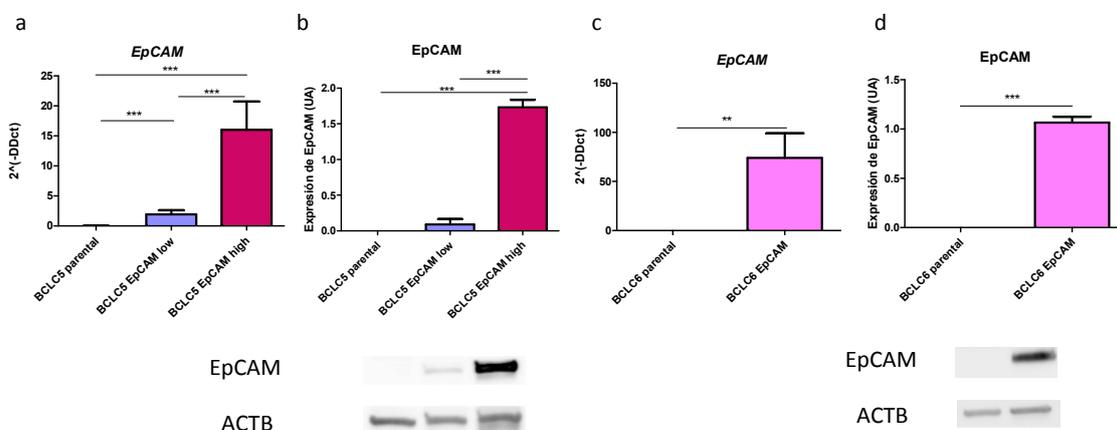


Figura 1. Expresión génica de EpCAM analizada por Real Time-q PCR en las líneas BCLC5 parental, BCLC5 EpCAM *low* y BCLC5 EpCAM *high* (a); BCLC6 parental y BCLC6 EpCAM (c) y expresión proteica analizada en las líneas BCLC5 parental, BCLC5 EpCAM *low* y BCLC5 EpCAM *high* (b); BCLC6 parental y BCLC6 EpCAM (d) por WB. La expresión proteica está expresada en unidades arbitrarias (UA). Los datos han sido analizados mediante el test estadístico t-student. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

2. La proteína EpCAM se procesa a través de su dominio transmembrana liberando EpEX.

Publicaciones recientes describen la liberación simultánea de EpICD y EpEX tras el procesado de EpCAM (Maetzel, 2009; Munz, 2009). Hemos confirmado la liberación de EpEX al medio de cultivo mediante ELISA en las líneas BCLC5 EpCAM *low*, BCLC5 EpCAM *high*, BCLC6 EpCAM y BCLC9 parental.

En estos ensayos se ha cuantificado la concentración de EpEX existente en el medio de cultivo transcurridas 8 horas desde que se siembran las células (es el denominado $t = 0$), así como la concentración de EpEX que se libera cinco días después de haberlas sembrado, momento en el que el cultivo celular está confluyente.

Para analizar el procesado de EpCAM en las líneas BCLC5 EpCAM *low*, BCLC5 EpCAM *high* y BCLC6 EpCAM, se han utilizado sus respectivas líneas parentales como controles. Paralelamente, se ha analizado la liberación de EpEX en la línea BCLC9 parental. Hemos observado una mayor concentración de EpEX en el medio tras 5 días en cultivo. Como control negativo se ha utilizado medio de cultivo (Fig. 2a y 2b).

La línea BCLC5 EpCAM *high* libera más cantidad de EpEX al medio de cultivo que la línea BCLC5 EpCAM *low*. La línea BCLC5 EpCAM *high* tiene mayor capacidad para procesar EpCAM cuando la densidad celular es baja ($t = 0$) que cuando el cultivo está confluyente ($t = 5$ días) (Fig. 2a). La línea BCLC6 EpCAM libera más cantidad de EpEX al medio cuando el cultivo está confluyente (Fig. 2b).

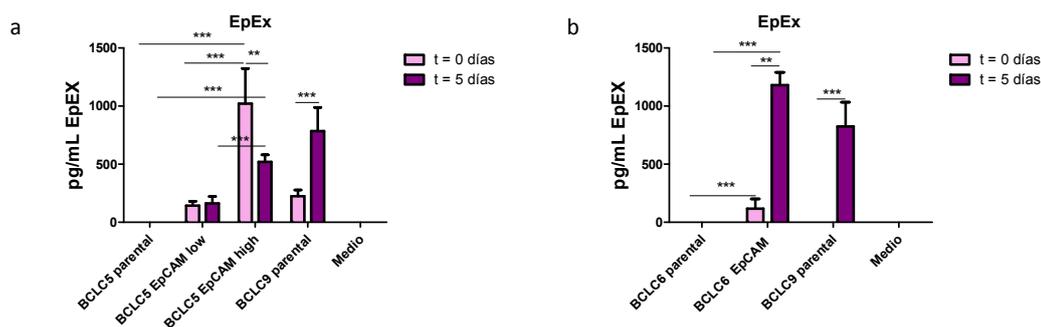
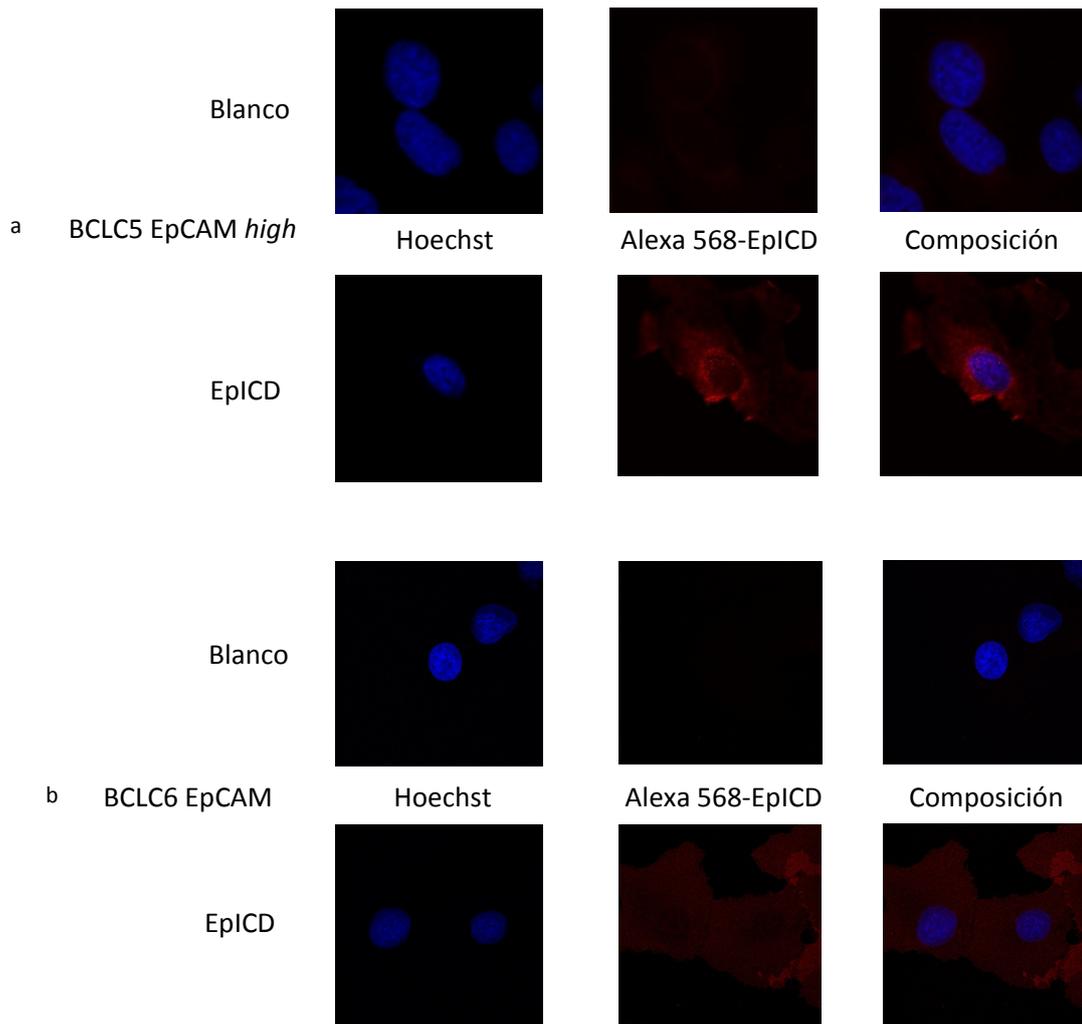


Figura 2. Análisis de la concentración de EpEX en pg/mL presente en el medio que contiene las líneas celulares BCLC5 parental, BCLC5 EpCAM *low*, BCLC5 EpCAM *high* y BCLC9 parental (a); BCLC6 parental, BCLC6 EpCAM y BCLC9 parental (b). Los datos de la liberación de EpEX al medio fueron analizados mediante el test estadístico t-student. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

3. EpICD se localiza en el núcleo de las líneas celulares BCLC5 EpCAM *high*, BCLC6 EpCAM y BCLC9 parental.

Hemos realizado técnicas de inmunofluorescencia para detectar EpICD en el núcleo de las líneas celulares BCLC5 EpCAM *high* (Fig. 3a), BCLC6 EpCAM (Fig. 3b) y BCLC9 parental (Fig. 3c). Seguidamente se han analizado las muestras mediante microscopía confocal (Fig 3).



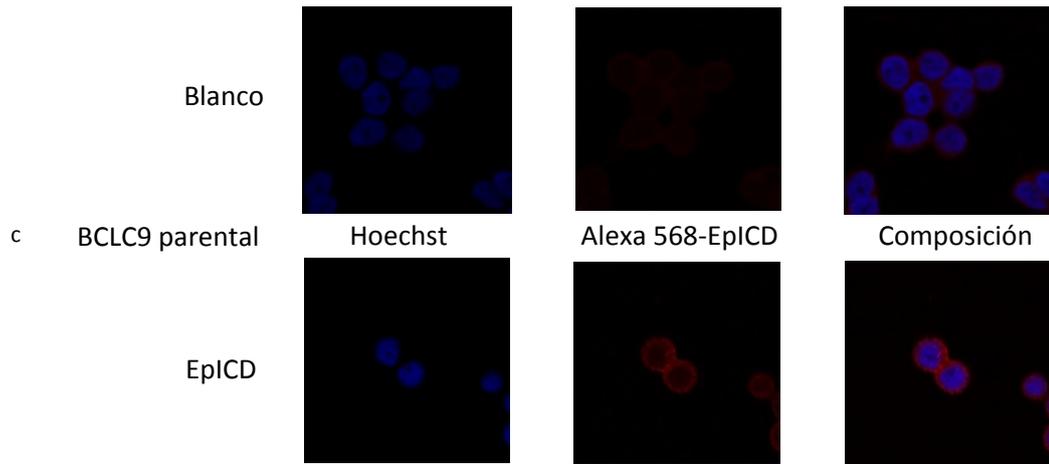


Figura 3: Imágenes tomadas por microscopía confocal en las que se ve EpICD en el núcleo de las líneas celulares BCLC5 EpCAM *high* (a), BCLC6 EpCAM (b) y BCLC9 parental (c).

4. En nuestras células EpICD no regula las dianas descritas asociadas a proliferación.

Analizamos la expresión génica por Real Time-q PCR y proteica mediante WB de las dianas de EpICD asociadas a proliferación y transformación celular (*CTNNB1*, *c-MYC*, *CCND1*) en las líneas celulares BCLC5 parental y BCLC5 EpCAM *high* (Fig. 4a1, 4a2), BCLC6 parental y BCLC6 EpCAM (Fig. 5b1, 5b2) y BCLC9 parental y BCLC9 EpCAM KD (Fig. 6c1 y 6c2). La expresión génica está comparada en todos los casos con la línea celular BCLC9 parental. Hemos comprobado que ninguna línea estudiada modifica la expresión de estos genes en función de la presencia de EpCAM.

Resultados

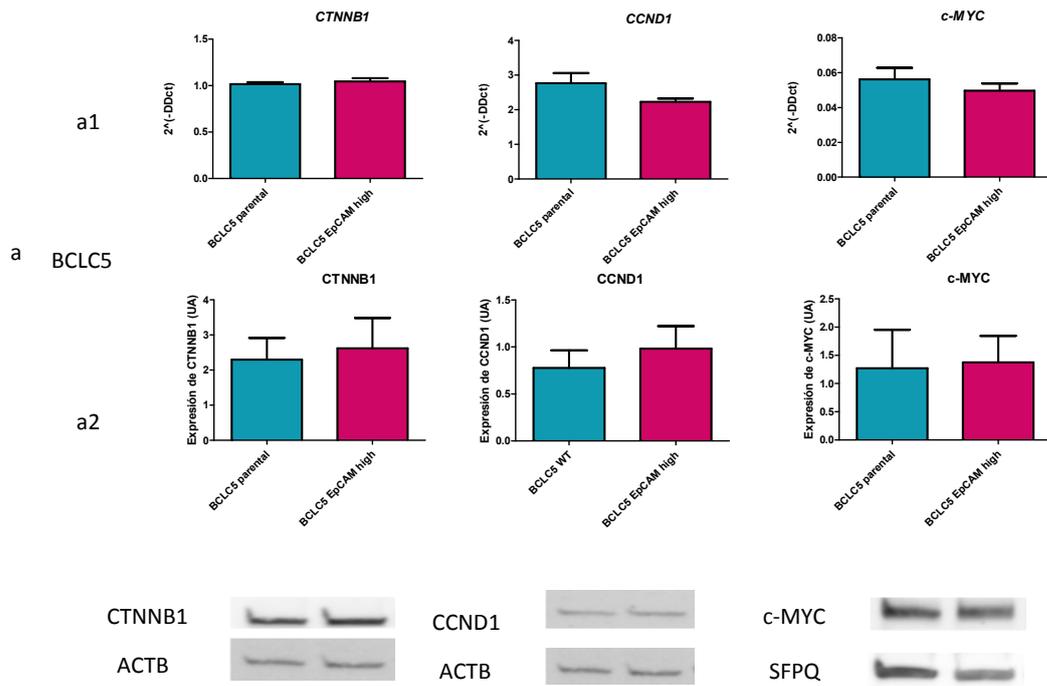


Figura 4: Expresión génica de las dianas reguladas por EpICD en la línea BCLC5 parental y BCLC5 EpCAM *high* analizadas por Real Time-q PCR (a1) y análisis de la expresión proteica de dichas dianas analizadas por WB (a2). La expresión proteica está expresada en UA. Los datos han sido analizados mediante el test estadístico t-student.

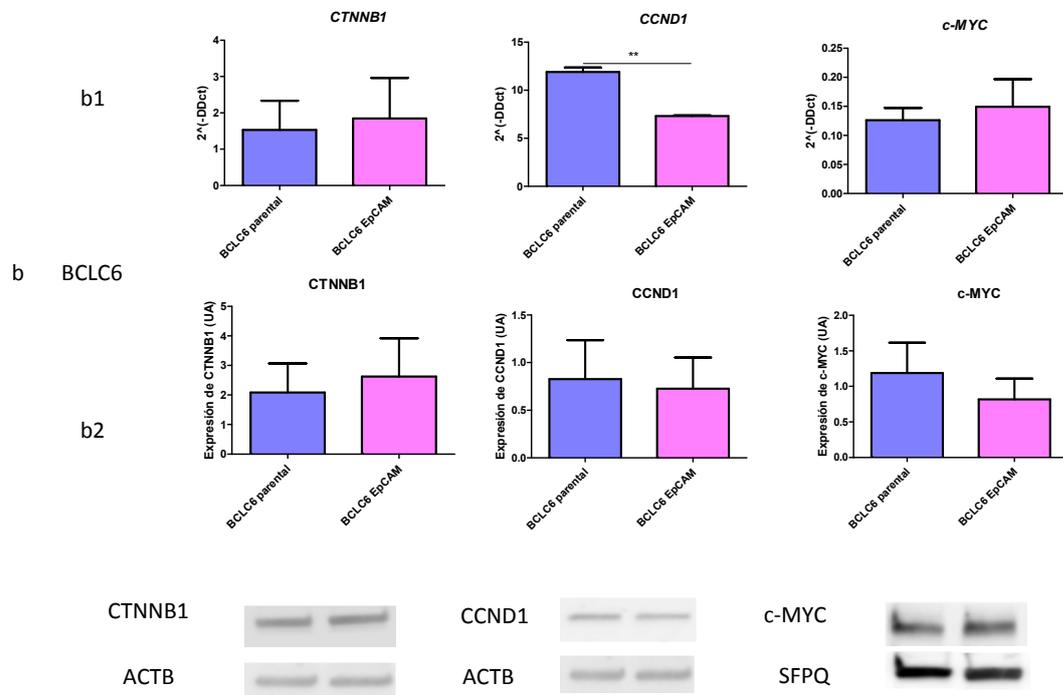


Figura 5: Expresión génica de las dianas reguladas por EpICD en la línea BCLC6 parental y BCLC6 EpCAM analizadas por Real Time-q PCR (b1) y análisis de la expresión proteica de dichas dianas analizadas por WB (b2). La expresión proteica está expresada en UA. Los datos han sido analizados mediante el test estadístico t-student. ** P < 0.01.

Resultados

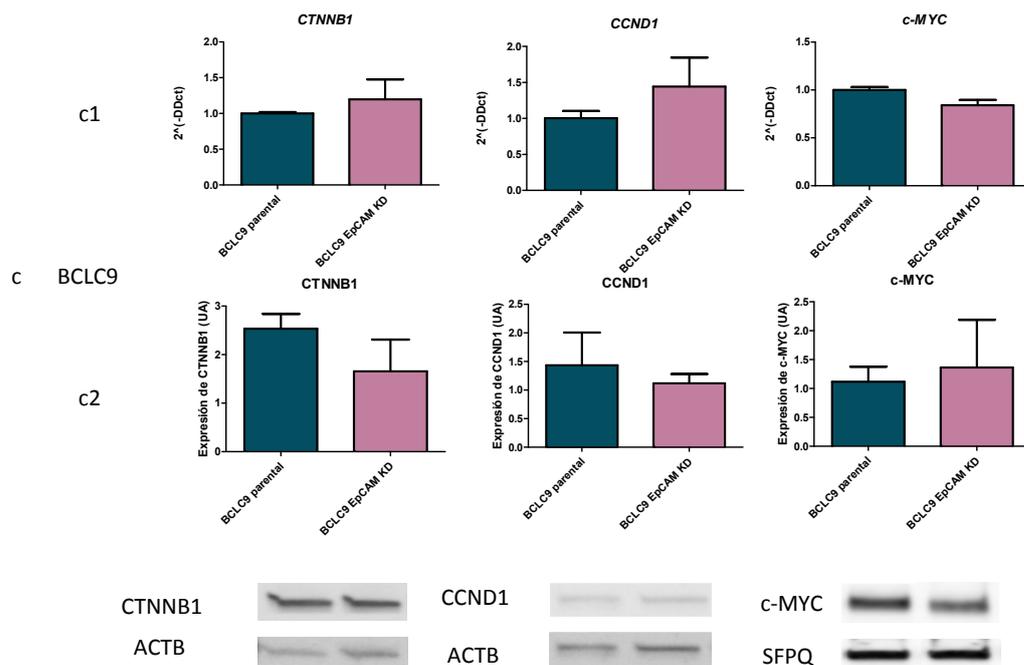
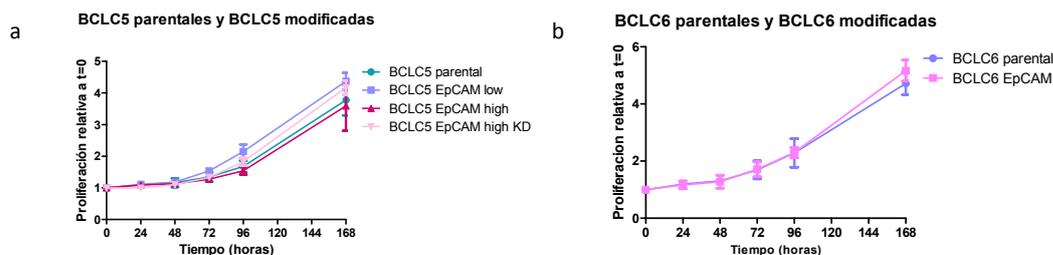


Figura 6: Expresión génica de las dianas reguladas por EpICD en la línea BCLC9 parental y BCLC9 EpCAM KD analizadas por Real Time-q PCRT (c1) y análisis de la expresión proteica de dichas dianas analizadas por WB (c2). La expresión proteica está expresada en UA. Los datos han sido analizados mediante el test estadístico t-student.

5. EpCAM no confiere ventajas en la capacidad de proliferación celular en nuestras células.

Para analizar el efecto de la expresión de EpCAM en la capacidad proliferativa hemos realizado ensayos de proliferación utilizando cristal violeta como colorante vital en las líneas celulares BCLC5 parental, BCLC5 EpCAM *low*, BCLC5 EpCAM *high* y BCLC5 EpCAM KD (Fig. 7a) y BCLC6 parental y BCLC6 EpCAM (Fig. 7b) y ensayos MTS en las líneas BCLC9 parental y BCLC9 modificada (Fig. 7c). Observamos que EpCAM no incrementa el índice proliferativo de nuestras células.



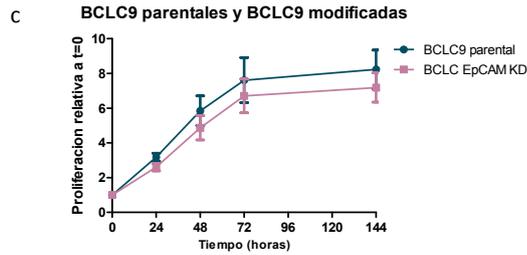


Figura 7: Proliferación celular asociada a la expresión de EpCAM en las líneas BCLC5 parental, BCLC5 EpCAM *low*, BCLC5 EpCAM *high*, BCLC5 EpCAM KD (a); BCLC6 parental y BCLC6 EpCAM (b) y BCLC9 parental y BCLC9 EpCAM KD (c). Los datos han sido analizados mediante el test estadístico t-student.

6. EpCAM no confiere ventajas proliferativas en situación de hipoxia.

Debido a que las células que forman un tumor están sometidas a condiciones limitantes de oxígeno, hemos analizado la capacidad de proliferación celular en función de la presencia de EpCAM en las líneas celulares BCLC5 parental, BCLC5 EpCAM *low* y BCLC5 EpCAM *high* (Fig. 8a) y BCLC6 parental y BCLC6 EpCAM (Fig. 8b) en condiciones de normoxia (21% de O₂) e hipoxia (1% de O₂). Hemos determinado que la expresión de esta proteína no supone ventajas en la proliferación celular en condiciones de hipoxia.

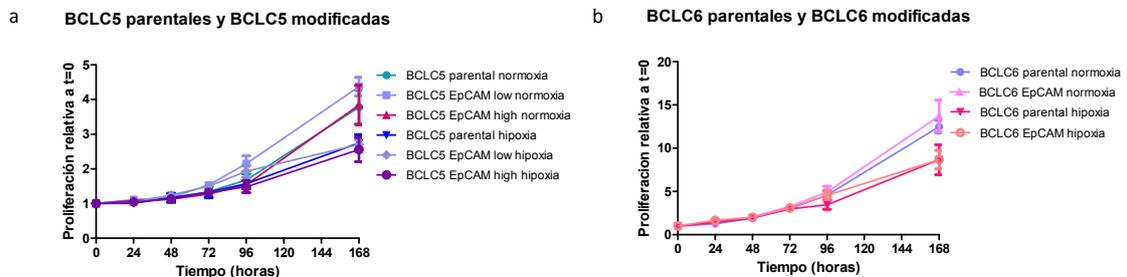


Figura 8: Análisis del potencial proliferativo de las líneas celulares BCLC5 parental, BCLC5 EpCAM *low*, BCLC5 EpCAM *high* (a); BCLC6 parental y BCLC6 EpCAM (b) en función de la presencia de EpCAM. Los datos han sido analizados mediante el test estadístico t-student.

7. La expresión de EpCAM únicamente se asocia a menor expresión de CDH1 en una de las líneas celulares.

Está descrito que cuando EpCAM se procesa EpICD contacta con CTNNB1 y ambas se traslocan al núcleo celular (Munz, 2009). Esto hace que CTNNB1 pierda las uniones con CDH1,

desestabilizándola. Esto se traduce en una menor cantidad de CDH1 en las células con expresión de EpCAM (Winter, 2007; Munz, 2009). Únicamente en la línea BCLC5 EpCAM *high* hay una menor cantidad de CDH1 en presencia de EpCAM (Fig. 9a), mientras en las líneas celulares BCLC6 EpCAM y BCLC9 parental la expresión de CDH1 no se modifica en presencia de EpCAM (Fig. 9b y 9c).

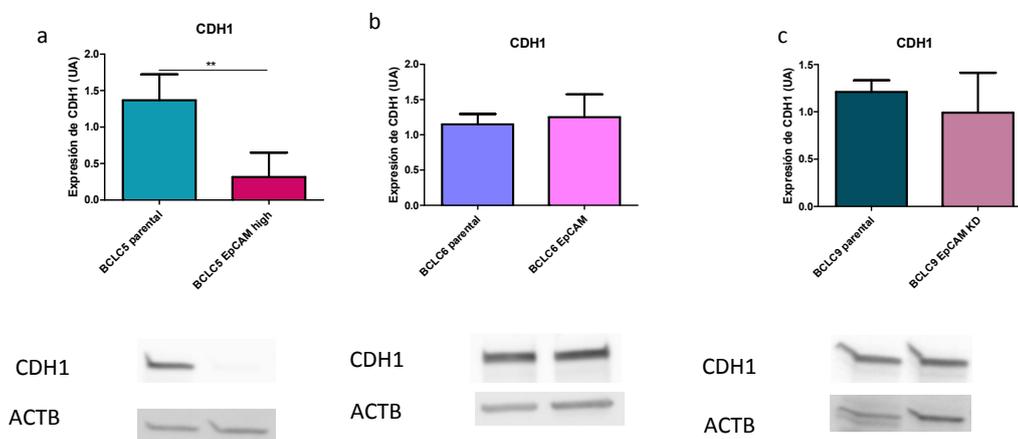
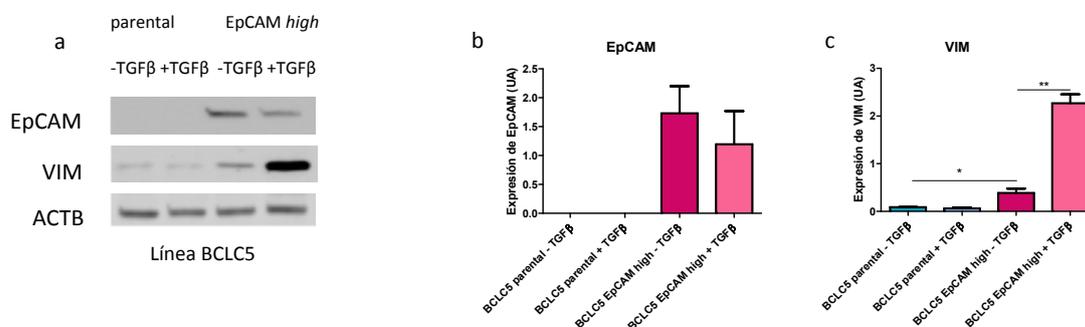


Figura 9: Expresión de CDH1 en función de la presencia de EpCAM en las líneas celulares BCLC5 parental y BCLC5 EpCAM *high* (a); BCLC6 parental y BCLC6 EpCAM (b) y BCLC9 parental y BCLC9 EpCAM KD (c). La expresión proteica está expresada en UA. Los datos han sido analizados mediante el test estadístico t-student. ** P < 0.01.

8. La expresión de EpCAM se asocia a expresión de VIM.

Hemos comprobado que EpCAM se asocia a un incremento en la expresión de VIM en las líneas celulares BCLC5 EpCAM *high* (Fig. 10a, b, c) y BCLC6 EpCAM (Fig. 10d, e, f). Este resultado se confirma tras tratar las células con TGFβ. La línea celular BCLC9 parental no expresa VIM (Fig. 10g, h, i). TGFβ no modula la expresión de EpCAM.



Resultados

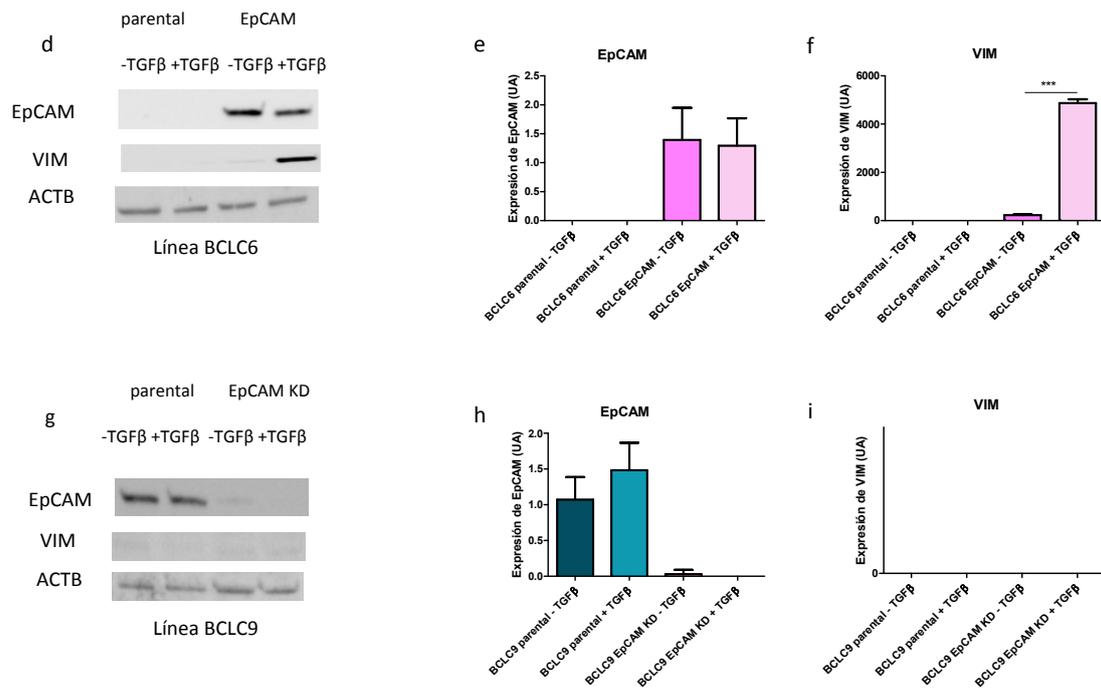


Figura 10: Análisis por WB de la expresión de VIM en las líneas celulares BCLC5 parental y BCLC5 EpCAM *high* (a,c); BCLC6 parental y BCLC6 EpCAM (d,f) y BCLC9 parental y BCLC9 KD (g,i). Expresión de EpCAM analizados por WB en función del tratamiento con TGFβ en las líneas celulares BCLC5 parental y BCLC5 EpCAM *high* (a, b); en las líneas celulares BCLC6 parental y BCLC6 EpCAM (d, e) y en las líneas celulares BCLC9 parental y BCLC9 EpCAM KD (g, h). La expresión proteica está expresada en UA. Los datos han sido analizados mediante el test estadístico t-student. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

9. Silenciamiento de EpCAM.

Hemos silenciado la expresión de EpCAM en la línea celular BCLC9 parental y en la línea BCLC5 EpCAM *high* mediante el uso del vector pGFP-C-shRNALenti. Se han obtenido las líneas BCLC9 EpCAM *high* KD con un porcentaje de silenciamiento del 96.8% respecto a la línea parental (Fig. 11a) y BCLC5 EpCAM *high* KD con porcentaje de silenciamiento del 100% respecto a la línea BCLC5 EpCAM *high* (Fig. 11b), respectivamente. Esto nos ha permitido analizar el efecto de la pérdida de expresión de EpCAM.

Resultados

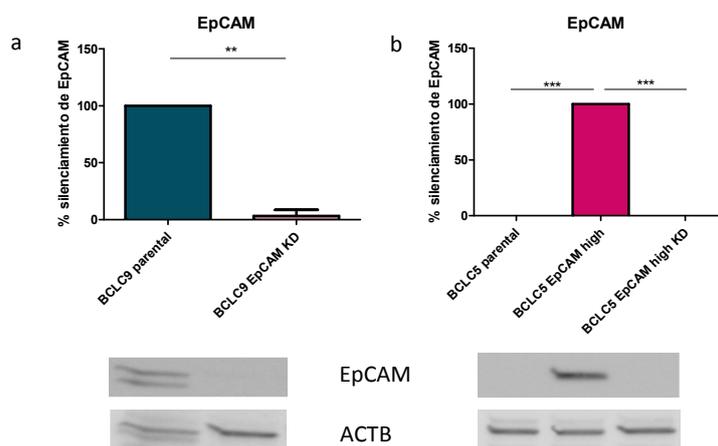


Figura 11. Expresión proteica analizada mediante WB de las líneas celulares BCLC9 parental (a) y BCLC5 EpCAM *high* (b) tras el silenciamiento de EpCAM. La expresión proteica está expresada en UA. Los datos han sido analizados mediante el test estadístico t-student. ** P < 0.01; *** P < 0.001.

10. La expresión de VIM está determinada por la expresión de EpCAM.

Hemos analizado la expresión de VIM en la línea celular BCLC5 EpCAM *high* KD y hemos demostrado que el silenciamiento de EpCAM revierte el aumento en la expresión de VIM (Fig. 12a, b).

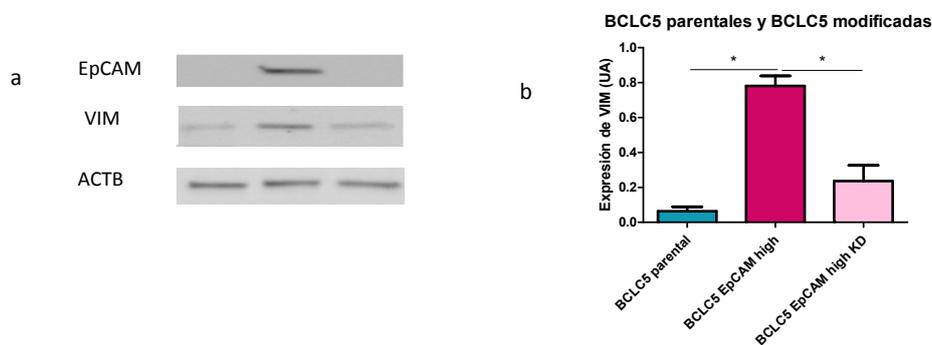


Figura 12: Análisis por WB de la expresión de VIM asociada a la presencia de EpCAM en las líneas celulares BCLC5 parental, BCLC5 EpCAM *high* y BCLC5 EpCAM KD (a y b). La expresión proteica está expresada en UA. Los datos han sido analizados mediante el test estadístico t-student. * P < 0.05.

11. Niveles elevados de EpCAM se asocian a una menor capacidad de migración.

Hemos analizado la capacidad de migración en las líneas celulares BCLC5 parental y BCLC5 EpCAM *high*; BCLC6 parental y BCLC6 EpCAM. Para asegurarnos que los resultados obtenidos son debidos únicamente a la migración y no asociados a la proliferación celular, hemos tratado

las células con mitomicina. Hemos comprobado que las células dejan de proliferar realizando una tinción con el anticuerpo PCNA (Fig. 13).

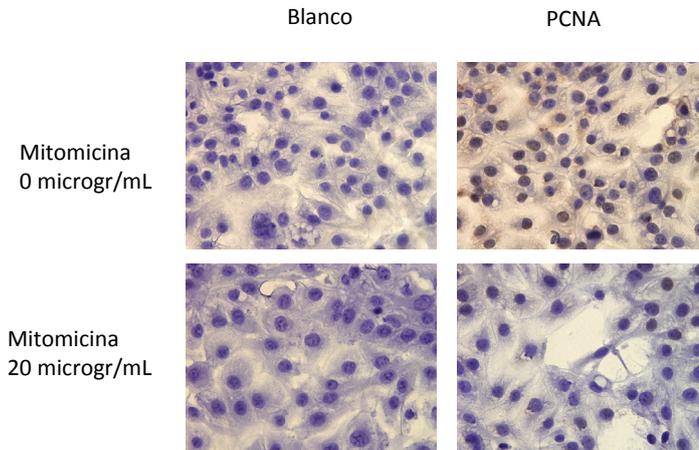


Figura 13: Análisis de la expresión de PCNA por inmunocitoquímica en la línea celular BCLC5 parental tratadas y no tratadas con mitomicina (Objetivo 20X).

Hemos determinado que niveles más elevados de EpCAM en las líneas celulares BCLC5 EpCAM *high* y BCLC6 EpCAM se asocian a un menor potencial de migración celular y que tras el estímulo con TGFβ esta capacidad todavía es menor (Fig. 14a, b).

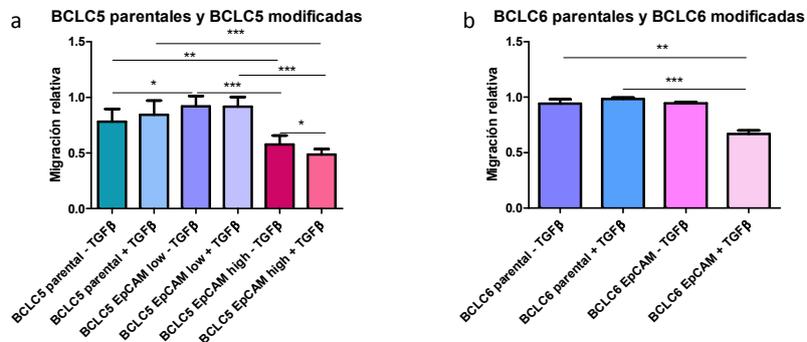


Figura 14: Análisis de la capacidad de migración celular en las líneas BCLC5 parental, BCLC5 EpCAM *low* y BCLC5 EpCAM *high* (a); BCLC6 parental y BCLC6 EpCAM (b) con y sin tratamiento con TGFβ. Los datos han sido analizados mediante el test estadístico t-student. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

12. La presencia de EpCAM no modifica la capacidad invasiva.

Con el objetivo de analizar el efecto de EpCAM sobre la capacidad de invasión celular en las líneas BCLC5 parental, BCLC5 EpCAM *low* y BCLC5 EpCAM *high*; BCLC6 parental y BCLC6 EpCAM y BCLC9 parental y BCLC9 EpCAM KD hemos realizado experimentos de invasión sobre un recubrimiento de matrigel utilizando como estímulo quimioatrayente FCS. Observamos que EpCAM no aumenta el potencial invasivo de las líneas de CHC estudiadas (Fig. 15a, b, c)

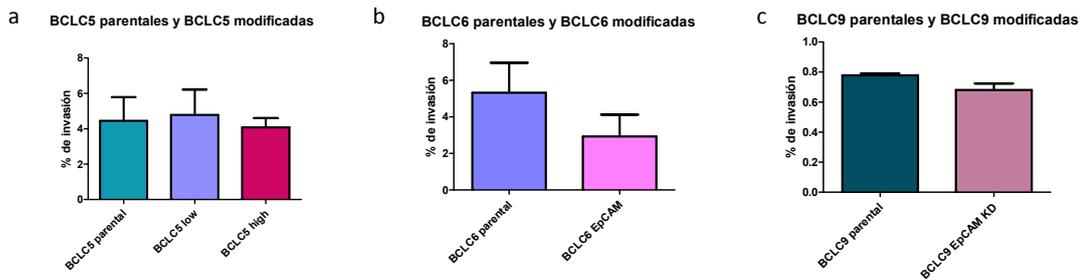
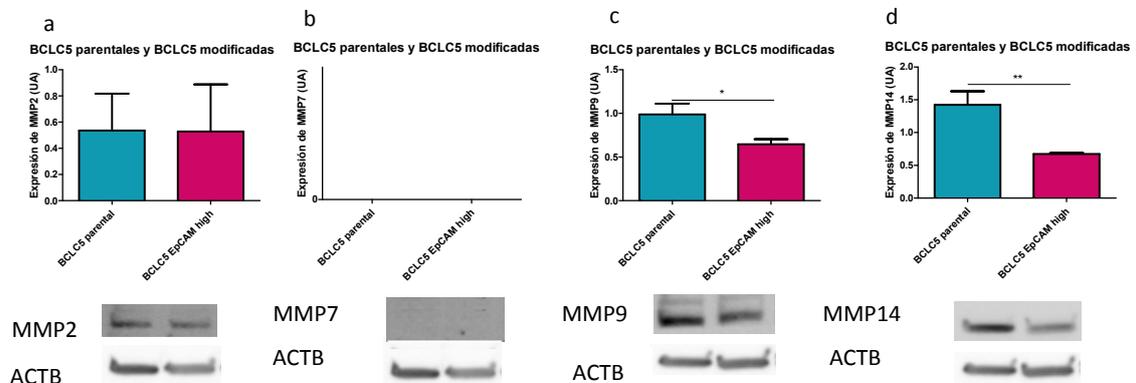


Figura 15: Porcentaje de invasión asociado a la presencia de EpCAM en las líneas celulares BCLC5 parental, BCLC5 EpCAM *low* y BCLC5 EpCAM *high* (a); BCLC6 parental y BCLC6 EpCAM (b) y BCLC9 parental y BCLC9 EpCAM KD (c) Los datos han sido analizados mediante el test estadístico t-student.

13. La expresión de EpCAM se relaciona con una menor expresión de MMPs.

Para que las células puedan invadir y migrar es necesario que degraden la matriz extracelular (Kessenbrock, 2010) y lo hacen gracias a la expresión de metaloproteasas (MMPs) (Gong, 2014). Mediante WB hemos analizado la expresión de MMP2, MMP7, MMP9 y MMP14 en nuestras células y hemos observado que MMP9 y MMP14 disminuyen su expresión en BCLC5 EpCAM *high* (Fig. 16c y 16d) y MMP14 lo hace en la línea BCLC6 EpCAM (Fig. 16h), mientras que MMP2 y MMP7 no muestran ningún cambio (Fig. 16a, 16e, 16b y 16f).



Resultados

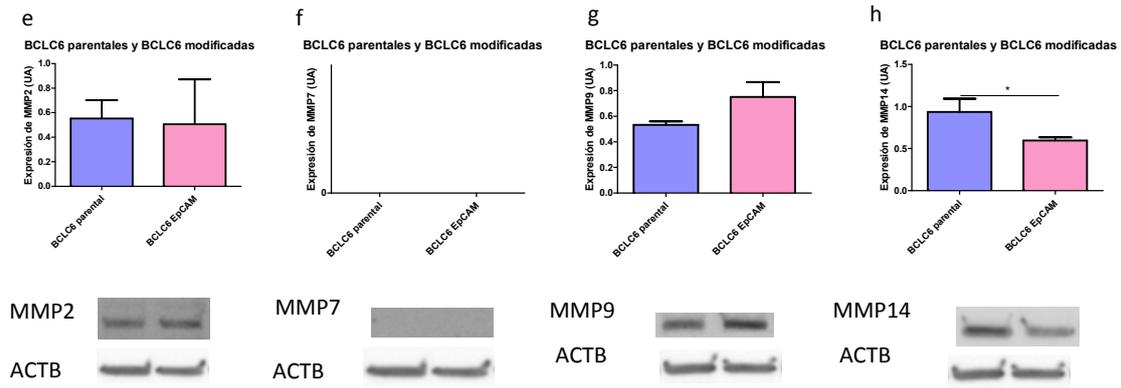
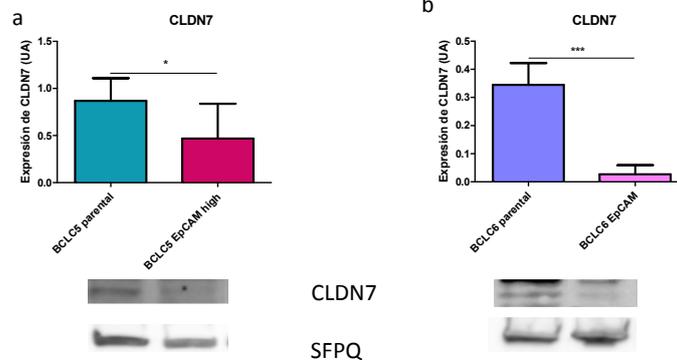


Figura 16: Análisis de la expresión de MMPs asociadas a la degradación de la matriz extracelular en función de la presencia de EpCAM. Análisis en la línea BCLC5 parental y BCLC5 EpCAM *high* (a, b, c, d) y BCLC6 parental y BCLC6 EpCAM (e, f, g, h). La expresión proteica está expresada en UA. Los datos han sido analizados mediante el test estadístico t-student. * P < 0.05; ** P < 0.01.

14. La presencia de EpCAM se relaciona con cambios en los niveles de expresión de CLDN7.

La expresión de CLDN7 disminuye en presencia de EpCAM en las líneas celulares BCLC5 EpCAM *high* (Fig. 17a) y BCLC6 EpCAM (Fig. 17b).



El silenciamiento de EpCAM en la línea BCLC9 EpCAM KD se relaciona con una menor expresión de CLDN7 (Fig. 17c).

Resultados

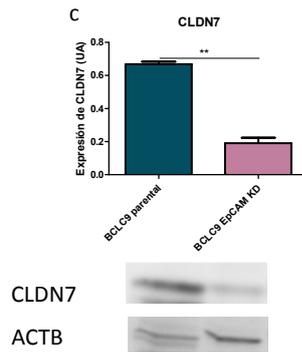
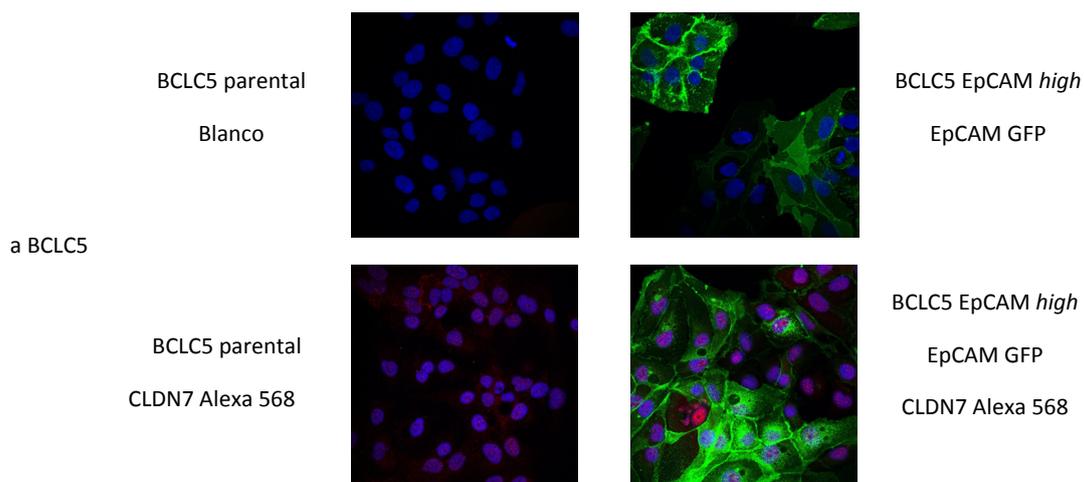


Figura 17: Análisis por WB de la expresión de CLDN7 relacionada con la presencia de EpCAM en las líneas celulares BCLC5 parental y BCLC5 EpCAM *high* (a); BCLC6 parental y BCLC6 EpCAM (b) y BCLC9 parental y BCLC9 EpCAM KD (c). La expresión proteica está expresada en UA. Los datos han sido analizados mediante el test estadístico t-student. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

15. CLDN7 muestra diferente localización dependiendo de la línea celular.

Teniendo en cuenta que la interacción entre EpCAM y CLDN7 provoca la pérdida de las uniones intercelulares mediadas por EpCAM y favorece el acceso de las proteasas encargadas de su procesamiento (Nübel, 2009), hemos analizado la expresión y localización de CLDN7. Hemos demostrado que CLDN7 se expresa en todas nuestras líneas celulares. En las líneas BCLC5 parental y BCLC5 EpCAM *high*; BCLC6 parental y BCLC6 EpCAM su localización es nuclear (Fig. 18a y b) y en la línea BCLC9 parental se localiza en la membrana citoplasmática (Fig. 18c).



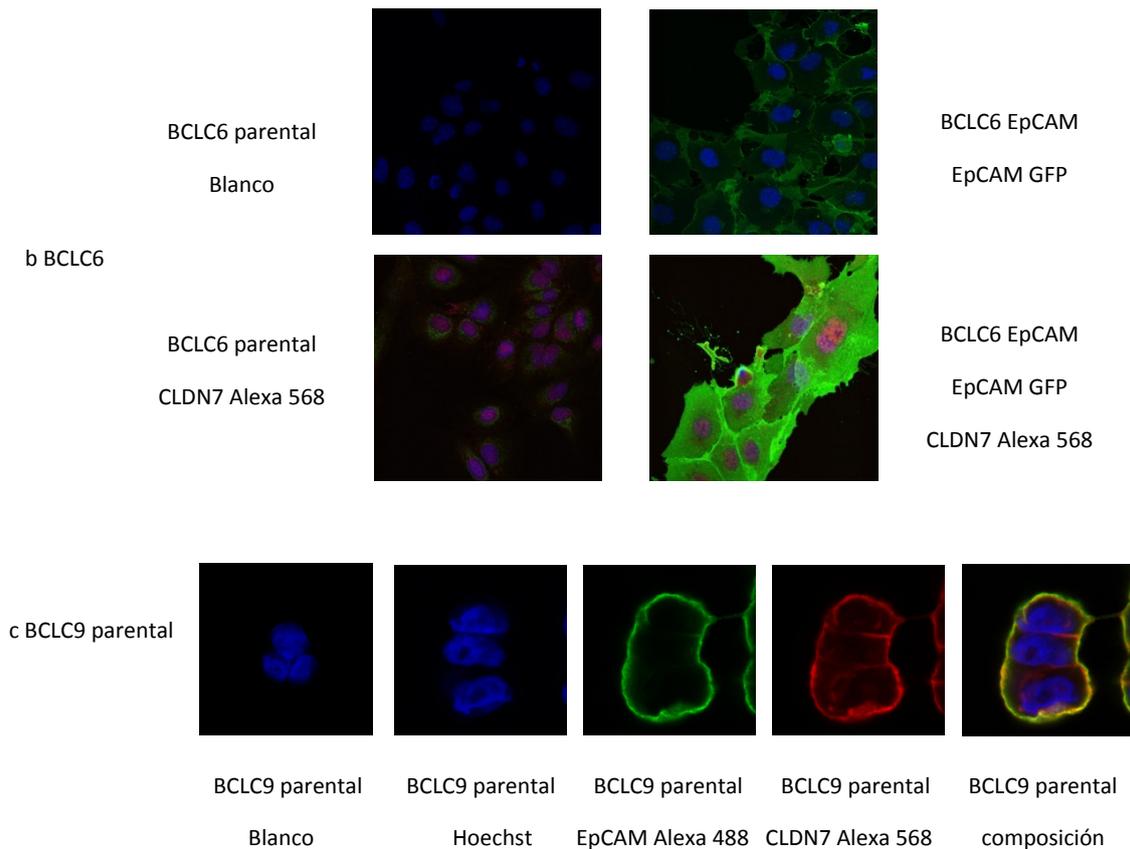


Figura 18: Análisis por microscopía confocal de la localización de EpCAM y CLDN7 en las líneas BCLC5 parental y BCLC5 EpCAM *high* (a); BCLC6 parental y BCLC6 EpCAM (b) y BCLC9 parental (c).

16. EpCAM y CLDN7 interaccionan en el núcleo y en la membrana citoplasmática de todas las líneas celulares analizadas.

Hemos confirmado la interacción de EpCAM con CLDN7 mediante co-inmunoprecipitación. Esta interacción se observa tanto en el núcleo como en la membrana celular.

Para inmunoprecipitar CLDN7 hemos utilizado un anticuerpo procedente de ratón y para inmunoprecipitar EpCAM se ha utilizado un anticuerpo procedente de conejo. Para detectar las proteínas EpCAM y CLDN7 tras la inmunoprecipitación hemos realizado técnicas de WB utilizando anticuerpos primarios originados en conejo que reconocen EpICD y CLDN7. Para su revelado se ha utilizado un anticuerpo secundario originado en cabra y que reconoce proteínas de conejo.

Hemos utilizado la línea BCLC9 parental como control debido a su expresión endógena de EpCAM. Hemos obtenido el extracto de proteínas nucleares (EN) y totales (ET). Una fracción de ambos extractos ha sido utilizada directamente para realizar WB, en otra fracción hemos

inmunoprecipitado EpCAM y en la fracción restante hemos inmunoprecipitado CLDN7. Seguidamente se ha realizado un WB.

Para demostrar que la señal obtenida es debida a un reconocimiento específico del anticuerpo primario del WB por parte del secundario y no debida a interacciones entre el anticuerpo secundario y el utilizado para inmunoprecipitar EpCAM y CLDN7 no hemos hibridado la membrana del WB con ningún anticuerpo primario. Así hemos comprobado que el anticuerpo secundario del WB no reconoce al anticuerpo utilizado para inmunoprecipitar CLDN7 (Fig. 19a). Esto confirma que las señales obtenidas tras haber utilizado anticuerpos primarios en el WB con reconocimiento de EpCAM y de CLDN7 son específicas. Sin embargo, sí que obtenemos señal al inmunoprecipitar EpCAM e hibridar la membrana directamente con el anticuerpo secundario del WB ya que éste reconoce proteínas de conejo y el anticuerpo utilizado en la inmunoprecipitación ha sido generado en esta especie (Fig. 19b).

En experimentos anteriores de WB hemos visto que la localización de CLDN7 en la línea BCLC9 parental es de membrana. Sin embargo, mediante inmunoprecipitación hemos conseguido enriquecer el EN para CLDN7 y hemos visto que no es que no existiera CLDN7 en el núcleo celular, sino que está presente a muy baja concentración y la técnica de WB no es suficientemente sensible (Fig. 19c). En el ET se detecta CLDN7 sin necesidad de realizar la inmunoprecipitación y, cuando se realiza se observa como hemos enriquecido la muestra para esta proteína (Fig. 19d).

Igual que sucede con CLDN7, la técnica de WB no es suficientemente sensible como para detectar los niveles de EpICD presentes en el núcleo de las células BCLC9 parentales. Sin embargo, sí que se detecta tras realizar una inmunoprecipitación de CLDN7 ya que ambas proteínas co-inmunoprecipitan (Fig. 19e). Esto indica que en el núcleo EpICD contacta con CLDN7. En el ET hemos detectado EpCAM sin necesidad de realizar inmunoprecipitaciones. Hemos comprobado tras inmunoprecipitar CLDN7 que ambas proteínas están contactando (Fig. 19f).

Hemos inmunoprecipitado EpCAM en el EN y en el ET y hemos analizado el resultado mediante WB utilizando anticuerpos contra EpCAM y CLDN7. Hemos comprobado que al inmunoprecipitar EpCAM también se detecta la interacción de esta proteína con CLDN7 tanto en el EN como en el ET. En el núcleo de la línea BCLC9 no detectamos EpICD, como ya habíamos visto en experimentos anteriores pero al inmunoprecipitar esta proteína sí que se detecta (Fig. 19g). Teniendo en cuenta que el anticuerpo secundario del WB reconoce al anticuerpo utilizado para hacer la inmunoprecipitación de EpCAM (Fig. 19b), podríamos pensar que la señal obtenida fuera debida a un reconocimiento entre anticuerpos. Sin embargo, al

inmunoprecipitar EpCAM en el ET y utilizar el anticuerpo contra EpCAM en el WB, hemos comprobado que la señal es mucho mayor que la debida a un reconocimiento exclusivo entre anticuerpos, hecho que confirma la interacción entre ambas proteínas (Fig. 19h). A pesar de que CLDN7 no la detectamos en el núcleo de la línea celular BCLC9 mediante WB, sí que se detecta CLDN7 que contacta con EpCAM cuando se enriquece la muestra para EpCAM (Fig. 19i). En el ET se detecta CLDN7 y cuando inmunoprecipitamos EpCAM también enriquecemos la muestra para CLDN7 (Fig. 19j).

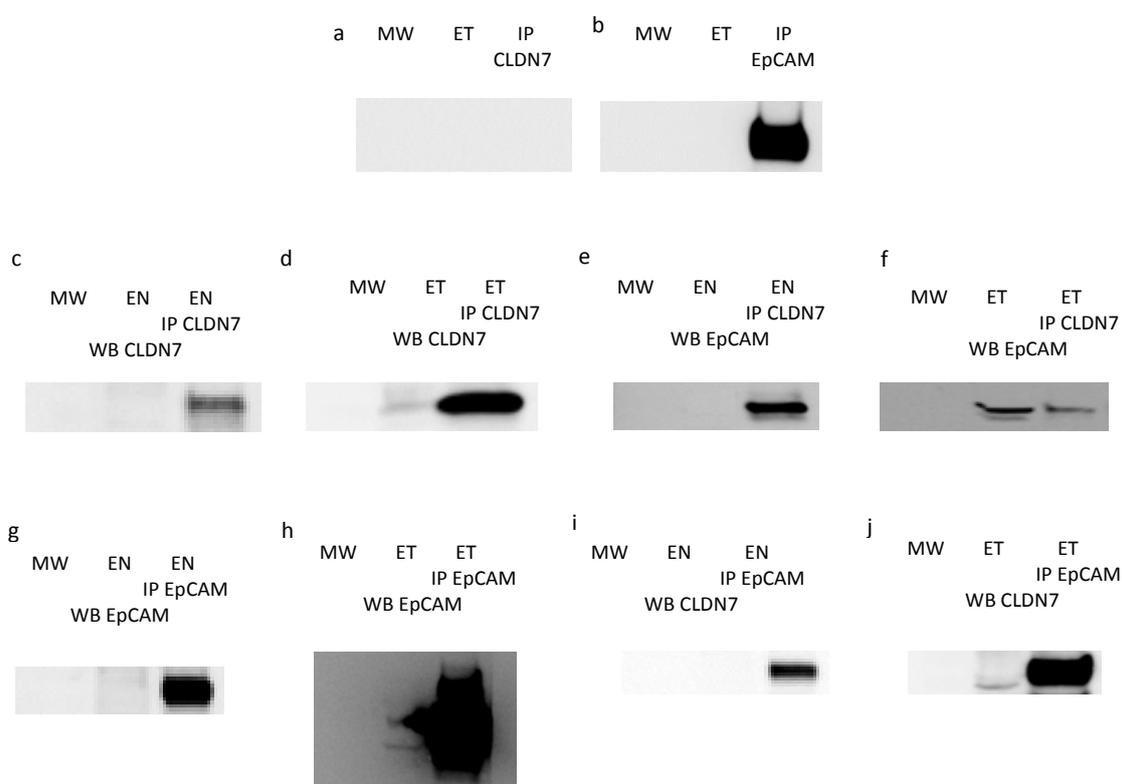


Figura 19: Análisis de la co-inmunoprecipitación de EpCAM y CLDN7 en la línea celular BCLC9 parental analizado por WB. Análisis del reconocimiento del anticuerpo secundario del WB al anticuerpo utilizado para inmunoprecipitar CLDN7 (a) y EpCAM (b); Localización de CLDN7 en la línea BCLC9 parental tras inmunoprecipitar CLDN7 (c, d); Localización de EpCAM en la línea BCLC9 parental tras inmunoprecipitar CLDN7 (e,f). Localización de EpCAM en la línea BCLC9 parental tras inmunoprecipitar EpCAM (g, h); Localización de CLDN7 en la línea BCLC9 parental tras inmunoprecipitar EpCAM (i, j).

En experimentos anteriores de WB hemos visto que la localización de CLDN7 en la línea BCLC5 EpCAM *high* es nuclear. Sin embargo, mediante inmunoprecipitación hemos conseguido enriquecer el ET para CLDN7 y hemos podido detectarla (Fig. 20a). En el EN se detecta una señal muy tenue de CLDN7 sin necesidad de realizar la inmunoprecipitación pero cuando se

inmunoprecipita CLDN7 se observa como hemos enriquecido la muestra para esta proteína (Fig. 20b).

Por WB hemos detectado EpCAM en el ET. Cuando hemos hecho la inmunoprecipitación de CLDN7 y en el WB hemos utilizado el anticuerpo que reconoce EpICD, hemos detectado la proteína. Esto indica que CLDN7 contacta directamente con EpICD (Fig. 20c).

En el núcleo de la línea celular BCLC5 EpCAM *high* no detectamos EpICD por WB. Sin embargo, tras realizar una inmunoprecipitación de CLDN7 sí que lo detectamos mediante WB. Esto indica que la técnica de WB no es suficientemente sensible para detectar EpICD en el EN, pero si se enriquece la muestra para CLDN7, existe suficiente cantidad de EpICD unido a CLDN7 para poder ser detectado (Fig. 20d).

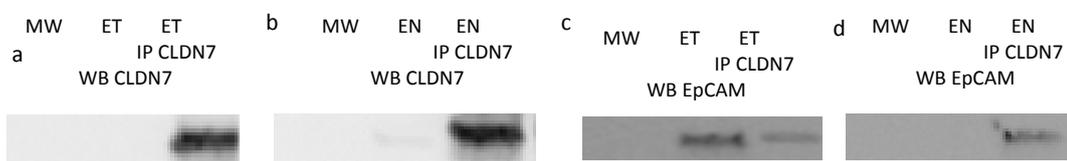


Figura 20: Análisis de la co-inmunoprecipitación de EpCAM y CLDN7 en la línea celular BCLC5 EpCAM *high* analizado por WB. Localización de CLDN7 en la línea BCLC5 EpCAM *high* (a, b); co-inmunoprecipitación de EpCAM y CLDN7 en la línea BCLC5 EpCAM *high* (c, d).

En la línea celular BCLC6 EpCAM hemos obtenido los mismos resultados que en la línea BCLC5 EpCAM *high*. Pese a que en la línea BCLC6 CLDN7 se localiza mayoritariamente en el núcleo, al inmunoprecipitar esta proteína, hemos conseguido detectarla en el ET (Fig. 21a). Hemos comprobado que en esta línea celular EpCAM y CLDN7 contactan en el núcleo celular (Fig. 21b) y en la membrana citoplasmática (Fig. 21c). Tras enriquecer la muestra para CLDN7 EpICD que contacta directamente con ella puede ser detectado mediante WB (Fig. 21d)



Figura 21: Análisis de la co-inmunoprecipitación de EpCAM y CLDN7 en la línea celular BCLC6 EpCAM analizado por WB. Localización de CLDN7 en la línea BCLC6 EpCAM (a, b); co-inmunoprecipitación de EpCAM y CLDN7 en la línea BCLC6 EpCAM (c, d).

17. La presencia de EpCAM modifica la fosforilación de CLDN7.

Ya que CLDN7 es capaz de pasar al núcleo celular, estudiamos la deslocalización de CLDN7 dependiente de fosforilación (Turksen, 2011). Observamos que en la línea celular BCLC5 EpCAM *high* la presencia de EpCAM supone una reducción en el porcentaje de CLDN7 fosforilada de un 54.5% (Fig. 22a), mientras que en las líneas BCLC6 EpCAM y BCLC9 parental, la expresión de EpCAM se asocia a un incremento del 93.75% y 92.75% (Fig. 22b y 22c), respectivamente.

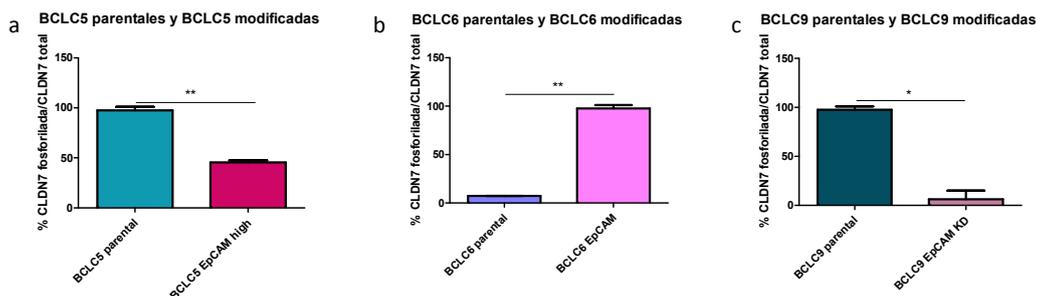


Figura 22: Porcentaje de CLDN7 fosforilada en función de EpCAM en las líneas celulares BCLC5 parental y BCLC5 EpCAM *high* (a); BCLC6 parental y BCLC6 EpCAM (b) y BCLC9 parental y BCLC9 EpCAM KD (c). La cuantificación se ha realizado por WB y el análisis estadísticos mediante el test t-student. * P < 0.05; ** P < 0.01.

18. Silenciamiento de CLDN7 en las líneas BCLC5, BCLC6 y BCLC9.

Para conocer el papel de CLDN7 y su relación con EpCAM en las distintas etapas de la metástasis, hemos silenciado esta proteína, obteniendo las líneas BCLC5 CLDN7 KD (Fig. 23a), BCLC5 EpCAM *high* CLDN7 KD (Fig. 23b), BCLC6 CLDN7 KD (Fig. 23c), BCLC6 EpCAM CLDN7 KD (Fig. 23d), BCLC9 CLDN7 KD (Fig. 23e), BCLC9 EpCAM KD CLDN7 KD (Fig. 23f).

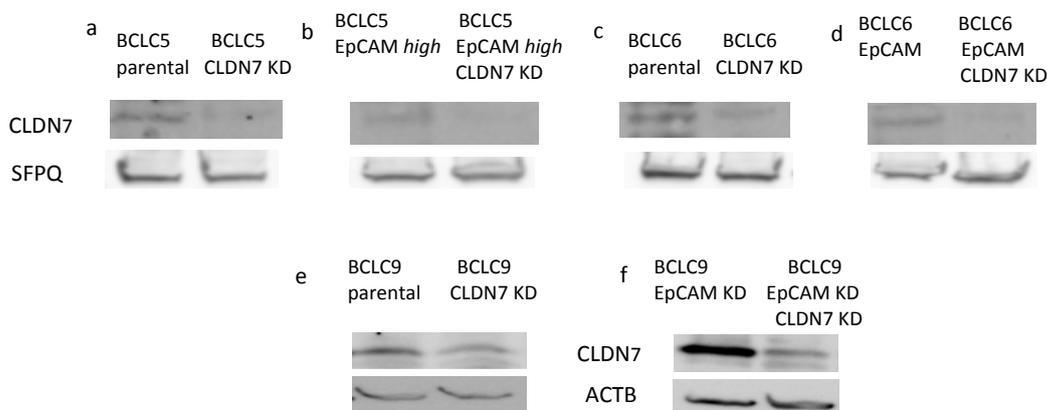


Figura 23: Análisis por WB que muestra el silenciamiento de CLDN7 en las líneas celulares BCLC5 parental y BCLC5 EpCAM *high* (a, b); BCLC6 parental y BCLC6 EpCAM (c, d) y BCLC9 parental y BCLC9 EpCAM KD (e, f).

19. CLDN7 no determina la capacidad proliferativa.

Analizamos el efecto de EpCAM y CLDN7 sobre la capacidad de proliferación celular. Observamos que CLDN7 no tiene efecto sobre la capacidad proliferativa de nuestras líneas celulares (Fig. 24a, b, c).

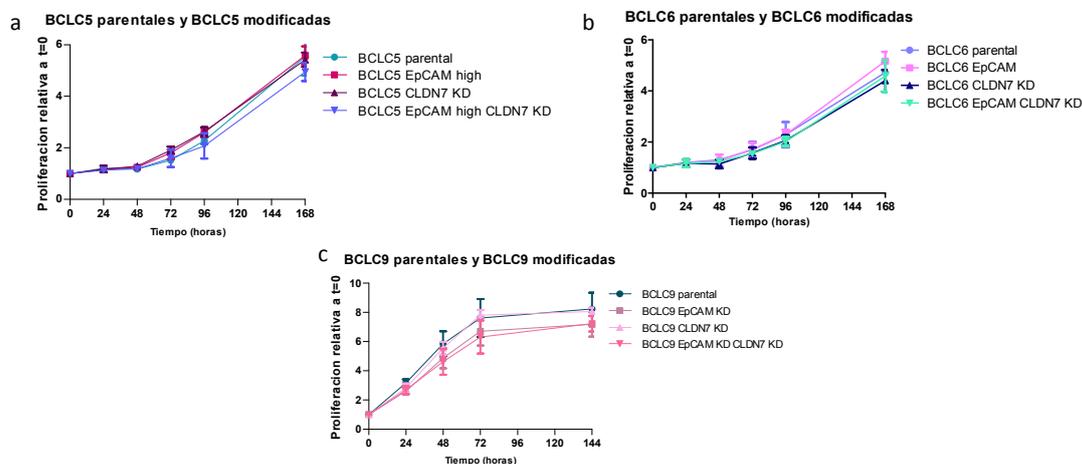


Figura 24: Análisis de la capacidad proliferativa en función de la presencia de EpCAM y CLDN7 en las líneas celulares BCLC5 parental, BCLC5 EpCAM *high*, BCLC5 CLDN7 KD y BCLC5 EpCAM *high* CLDN7 KD (a); BCLC6 parental, BCLC6 EpCAM, BCLC6 CLDN7 KD y BCLC6 EpCAM CLDN7 KD (b) y BCLC9 parental, BCLC9 EpCAM KD, BCLC9 CLDN7 KD y BCLC9 EpCAM KD CLDN7 KD (c). Los datos han sido analizados mediante el test estadístico t-student.

20. La expresión de CLDN7 no modifica la capacidad de invasión de BCLC5 ni BCLC6 parentales o modificadas.

Experimentos en los que se ha determinado el potencial invasivo de nuestras líneas de trabajo en función de la presencia de EpCAM y CLDN7 han demostrado que ninguna de las dos proteínas confiere ventajas en la línea BCLC5 (Fig. 25a) ni en la línea BCLC6 (Fig. 25b) parentales o modificadas.

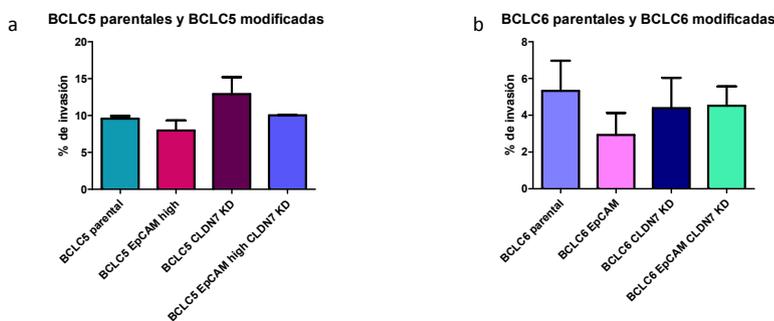


Figura 25: Porcentaje de invasión de las líneas celulares BCLC5 parental, BCLC5 EpCAM *high*, BCLC5 CLDN7 KD, BCLC5 EpCAM *high* CLDN7 KD (a) y BCLC6 parental, BCLC6 EpCAM, BCLC6 CLDN7 KD y BCLC6 EpCAM CLDN7 KD (b). Los datos han sido analizados mediante el test estadístico t-student.

21. El silenciamiento de CLDN7 en la línea celular BCLC5 parental se relaciona con una menor expresión de MMP14.

Hemos analizado mediante WB el efecto del silenciamiento de CLDN7 en la expresión de MMP2 (Fig. 26a, e), MMP7 (Fig. 26b, f), MMP9 (Fig. 26c, g) y MMP14 (Fig. 26d, h) en las líneas celulares BCLC5 parental, BCLC5 EpCAM *high*, BCLC5 CLDN7 KD y BCLC5 EpCAM *high* CLDN7 KD; BCLC6 parental, BCLC6 EpCAM, BCLC6 CLDN7 KD y BCLC6 EpCAM CLDN7 KD. Hemos comprobado que el silenciamiento de esta proteína únicamente supone una disminución en la expresión de MMP14, proteasa encargada de procesar MMP2 y relacionada con invasión, en la línea celular BCLC5 CLDN7 KD (Fig. 26d).

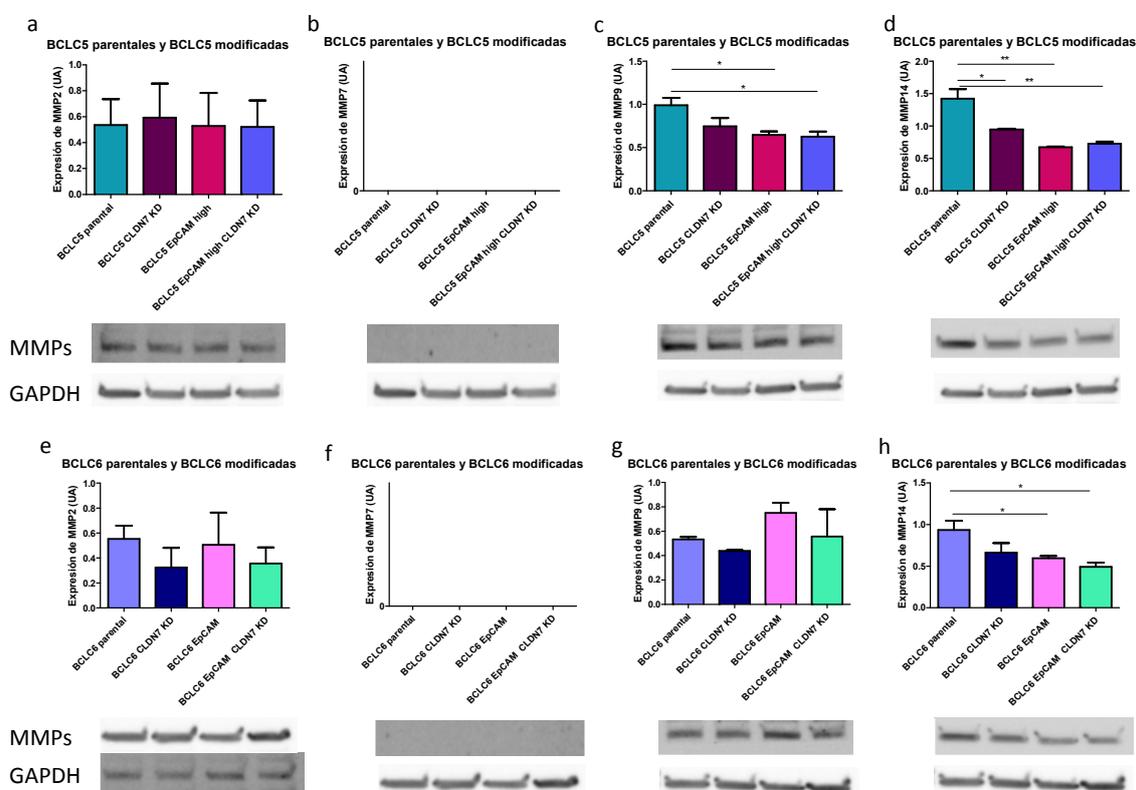


Figura 26: Análisis por WB de la expresión de MMPs asociadas a la expresión de CLDN7 en las líneas celulares BCLC5 parental, BCLC5 CLDN7 KD, BCLC5 EpCAM *high*, BCLC5 EpCAM *high* CLDN7 KD (a, b, c, d) y BCLC6 parental, BCLC6 CLDN7 KD, BCLC6 EpCAM y BCLC6 EpCAM CLDN7 KD (e, f, g, h). La expresión proteica está expresada en UA. Los datos han sido analizados mediante el test estadístico t-student. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

22. EpCAM y CLDN7 tienen un efecto aditivo en la formación de esferoides tumorales.

Nuestros resultados no confirman lo que hasta ahora se ha publicado referente al papel de EpCAM en la proliferación y migración celular. Es un hecho contrastado que los cultivos

celulares en 2 dimensiones (2D) no reflejan el comportamiento de las células tumorales cuando forman parte de un tumor. Por esta razón, hemos analizado el papel de EpCAM y CLDN7 en cultivos en tres dimensiones (3D).

Hemos comprobado que la expresión de EpCAM en las líneas celulares BCLC5 EpCAM *high* y BCLC6 EpCAM se asocia a la formación de mayor número de esferoides tumorales en comparación con las líneas BCLC5 parental y BCLC6 parental (Fig. 27a, c) y estos son de menor tamaño (Fig. 27b, d). CLDN7 actúa de manera aditiva a EpCAM en la formación de estos esferoides tumorales. Estos resultados indican que el papel de EpCAM en la metástasis podría estar relacionado con la formación de nuevos focos metastásicos.

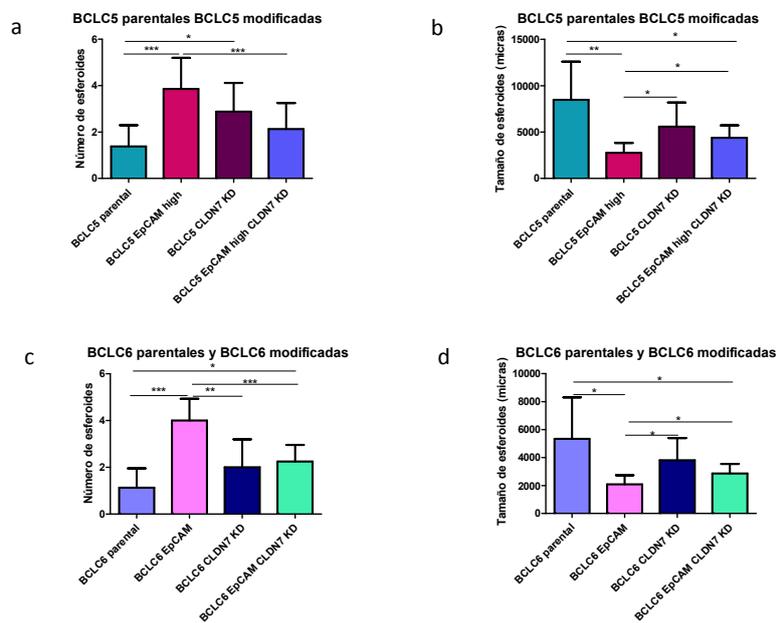


Figura 27: Análisis de formación de esferoides. Representación gráfica del número de esferoides generados por la línea celular BCLC5 parental, BCLC5 EpCAM *high*, BCLC5 CLDN7 KD y BCLC5 EpCAM *high* CLDN7 KD (a) y BCLC6 parental, BCLC6 EpCAM, BCLC6 CLDN7 KD y BCLC6 EpCAM CLDN7 KD (c) y del tamaño de éstos (b, d). Los datos han sido analizados mediante el test estadístico t-student. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

23. CLDN7 se trasloca del núcleo a la membrana citoplasmática cuando la línea celular BCLC6 EpCAM forma esferoides tumorales.

La localización de CLDN7 sigue siendo citoplasmática y nuclear en los esferoides generados por BCLC5 parental y BCLC5 EpCAM *high* (Fig. 28a, b). Sin embargo, CLDN7 se trasloca del núcleo a la membrana citoplasmática en los esferoides generados por la línea celular BCLC6 EpCAM

(Fig. 28c, d), coincidiendo con la localización de CLDN7 en las células BCLC9 parental (Fig. 28e) que crecen formando esferoides de forma espontánea.

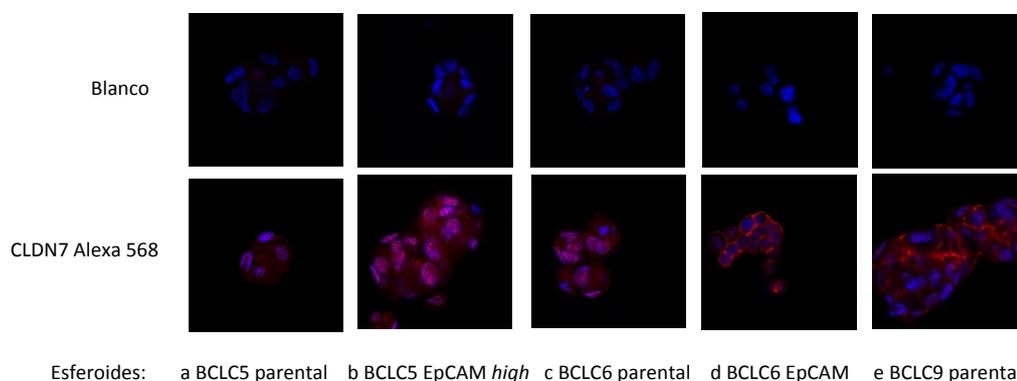


Figura 28: Análisis por microscopía confocal de la localización de CLDN7 en esferoides tumorales de las líneas celulares BCLC5 parental (a), BCLC5 EpCAM *high* (b), BCLC6 parental (c), BCLC6 EpCAM (d) y BCLC9 parental (e).

24. EpCAM en la formación de tumores.

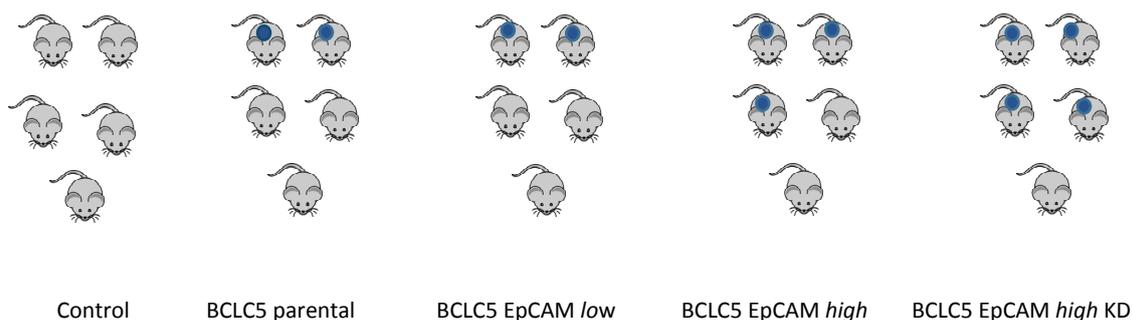
Los datos obtenidos mediante ensayos *in vitro* sugieren que el papel de EpCAM en la metástasis sea el de aumentar su efectividad en la formación de nuevos focos tumorales una vez las células ya han extravasado y están alojadas en una nueva localización. Para demostrar esta hipótesis hemos utilizado el modelo animal de tumor xenograft. Se utilizaron ratones SCID Hairless Outbred (SHOTM) a los que se inyectaron las células tumorales a nivel subdérmico. Los grupos de estudio son los siguientes:

- Grupo A control negativo (n=5): 100μL PBS.
- Grupo B BCLC5 parentales (n=5): $6 \cdot 10^6$ células/100μL PBS.
- Grupo C BCLC5 EpCAM *low* (n=5): $6 \cdot 10^6$ células/100μL PBS.
- Grupo D BCLC5 EpCAM *high* (n=5): $6 \cdot 10^6$ células/100μL PBS.
- Grupo E BCLC5 EpCAM *high* KD (n=5): $6 \cdot 10^6$ células/100μL PBS.
- Grupo F BCLC9 parentales (n=5): $1 \cdot 10^6$ células/100μL PBS.
- Grupo G BCLC9 EpCAM KD (n=5): $1 \cdot 10^6$ células/100μL PBS.

Los grupos de ratones a los que se les inyectaron las líneas celulares BCLC5 fueron sacrificados tres meses después. En cambio, los ratones utilizados para analizar las líneas celulares BCLC9 fueron sacrificados treinta días más tarde de haber inyectado las células. Esta diferencia es debida a que la línea celular BCLC9 tiene mayor capacidad proliferativa. Menos células BCLC9 parental o BCLC9 modificadas son capaces de generar tumores de mayor tamaño y en menos tiempo que los obtenidos por la línea celular BCLC5 parental o BCLC5 modificadas.

Resultados del estudio utilizando las líneas celulares BCLC5 parental y BCLC5 modificadas:

El siguiente esquema muestra el diseño del experimento de las líneas BCLC5 parental y BCLC5 modificadas, así como los tumores generados en los ratones:



El número de ratones en los que se generan tumores a partir de las líneas celulares BCLC5 parental y BCLC5 modificadas se muestra en la siguiente tabla (Tabla 5):

Línea celular	Ratones con tumor/ ratones totales
-	0/5
BCLC5 parental	2/5
BCLC5 EpCAM <i>low</i>	2/5
BCLC5 EpCAM <i>high</i>	3/5
BCLC5 EpCAM <i>high</i> KD	4/5

Tabla 5: Número de ratones que generan tumor tras la inyección de las líneas celulares BCLC5 parental, BCLC5 EpCAM *low*, BCLC5 EpCAM *high* y BCLC5 EpCAM KD.

Los tumores generados por la línea BCLC5 parental han sido visibles tres semanas después de la inyección de las células. Sin embargo, los obtenidos por la línea celular BCLC5 EpCAM *high* y BCLC5 EpCAM *high* KD ya eran visibles una semana después de la inyección de las células tumorales. En el momento de sacrificar los animales hemos aislado el tumor generado en cada uno de ellos y lo hemos caracterizado. Hemos realizado técnicas de inmunohistoquímica: Los tumores generados por las líneas BCLC5 EpCAM *low* y BCLC5 EpCAM *high* mantienen la expresión de EpCAM (Fig. 29a, b). Las células que forman los tumores procedentes de la línea BCLC5 EpCAM *high* KD han recuperado la expresión de EpCAM (Fig. 29c).

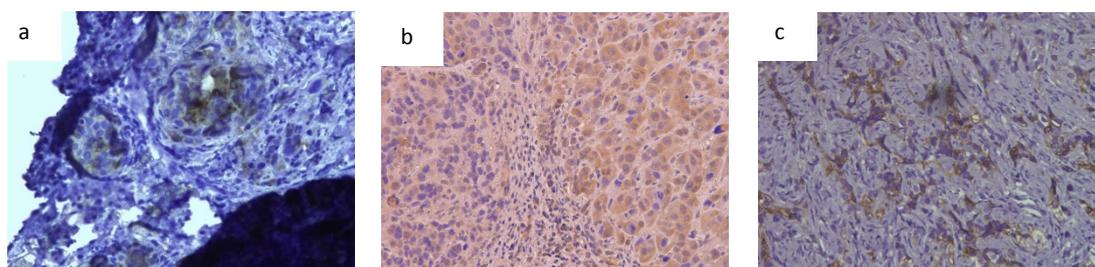


Figura 29: Expresión de EpCAM en tumores generados por las células BCLC5 EpCAM *low* (a), BCLC5 EpCAM *high* (b) y BCLC5 EpCAM *high* KD (c). Análisis por inmunohistoquímica. Objetivo 20X.

Los tumores generados por las línea BCLC5 EpCAM *low* conserva la expresión de CK19 (Fig. 30a), los procedentes de la línea BCLC5 EpCAM *high* han perdido la expresión (Fig. 30b) y los que provienen de la línea BCLC5 EpCAM *high* KD la han recuperado (Fig. 30c).

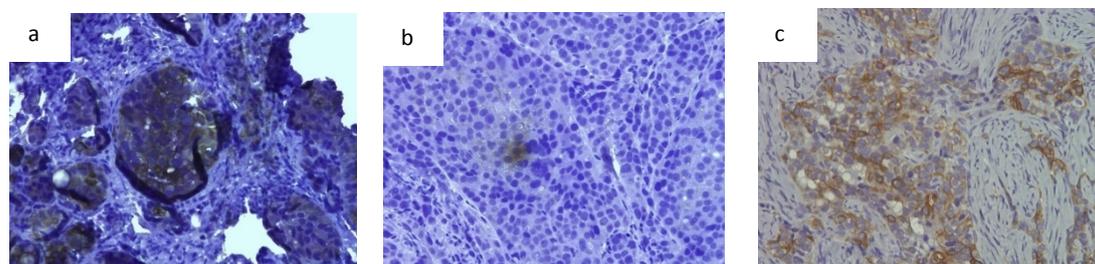


Figura 30: Expresión de CK19 en tumores generados por las células BCLC5 EpCAM *low* (a), BCLC5 EpCAM *high* (b) y BCLC5 EpCAM *high* KD. Análisis por inmunohistoquímica. Objetivo 20X.

Todos los tumores generados por las líneas BCLC5 EpCAM *high* y BCLC5 EpCAM *high* KD son positivos para la expresión de Ki67 (Fig. 31a, b) y c-MYC (Fig. 31c, d), lo que indica su actividad proliferativa.

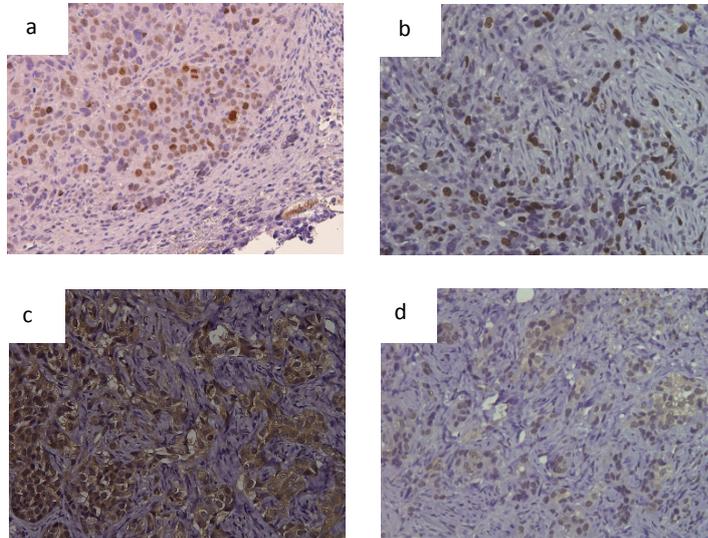
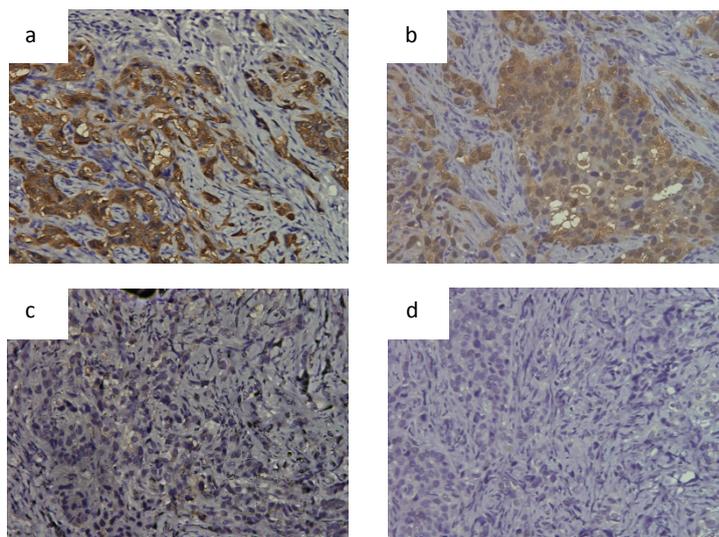


Figura 31: Expresión de Ki 67 en tumores generados por las líneas BCLC5 EpCAM *high* (a) y BCLC5 EpCAM *high* KD (b) y expresión de c-MYC en las líneas BCLC5 EpCAM *high* (c) y BCLC5 EpCAM *high* KD (d). Análisis por inmunohistoquímica. Objetivo 20X.

Todos los tumores obtenidos por las líneas BCLC5 EpCAM *high* y BCLC5 EpCAM *high* KD son positivos para el gen supresor de metástasis NM23A (Fig. 32a, b) y negativos para los marcadores CCND1 (Fig. 32c, d) y CDH1 (Fig. 32e, f).



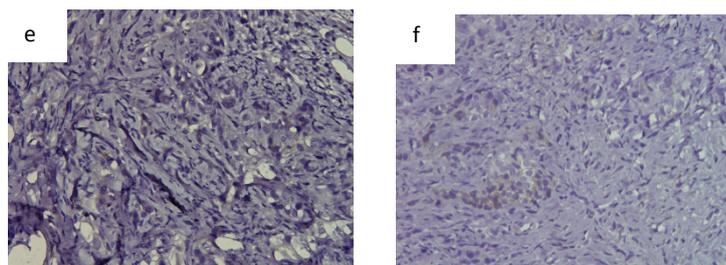


Figura 32: Expresión de NM23A en tumores generados por las líneas BCLC5 EpCAM *high* (a) y BCLC5 EpCAM *high* KD (b); expresión CCND1 en las líneas BCLC5 EpCAM *high* (c) y BCLC5 EpCAM *high* KD (d) y expresión de CDH1 en los tumores generados por las líneas BCLC5 EpCAM *high* (e) y BCLC5 EpCAM *high* KD (f). Análisis por inmunohistoquímica. Objetivo 20X.

Los tumores generados por las líneas BCLC5 EpCAM *high* y BCLC5 EpCAM *high* KD localizan CLDN7 en núcleo y en el citoplasma (Fig. 33a, b).

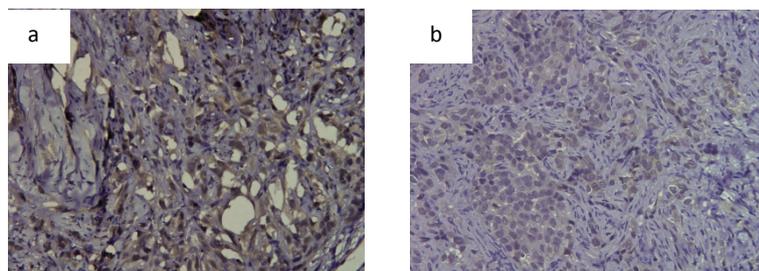


Figura 33: Expresión de CLDN7 en tumores generados por las líneas BCLC5 EpCAM *high* (a) y BCLC5 EpCAM *high* KD (b). Análisis por inmunohistoquímica. Objetivo 20X.

Las células BCLC5 EpCAM *high* inyectadas no han sido sometidas a la presión selectiva del antibiótico de selección G418 mientras generaban el tumor. Por ello, hemos derivado dos sublíneas celulares de uno de los tumores obtenidos en el grupo BCLC5 EpCAM *high*. Una de estas líneas ha sido tratada con el antibiótico de selección G418, obteniendo la línea BCLC5 EpCAM *high* pase 1 + G418. Con este tratamiento hemos pretendido seleccionar algún subclon procedente del tumor generado en el ratón con expresión de EpCAM. En la otra sublínea derivada del mismo tumor, no se ha aplicado ningún tratamiento. Es la denominada BCLC5 EpCAM *high* pase 1 - G418. Hemos reinyectado estas sublíneas a dos nuevos grupos de ratones formados por cinco individuos cada uno. Tres meses después de la inyección hemos sacrificado estos ratones. Todos los ratones han generado tumores (Tabla 6):

Línea celular	Ratones con tumor/ratones totales
-	0/5
BCLC5 EpCAM <i>high</i> pase 1 - G418	5/5
BCLC5 EpCAM <i>high</i> pase 1 + G418	5/5

Tabla 6: Número de ratones que generan tumor tras la inyección de las líneas celulares BCLC5 EpCAM *high* pase 1 – G418 y BCLC5 EpCAM *high* pase 1 + G418.

Los tumores obtenidos se han caracterizado y se ha derivado una línea celular de uno de los tumores de cada grupo. Estas líneas las hemos denominado BCLC5 EpCAM *high* pase 2 + G418 y BCLC5 EpCAM *high* pase 2 - G418. Los tumores generados por la línea BCLC5 EpCAM *high* pase 1 - G418 son más infiltrantes que los generados por las líneas BCLC5 EpCAM *high* pase 1 + G418 (Fig. 34a, b).

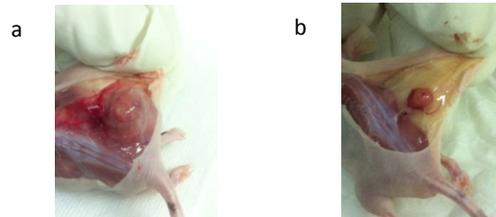
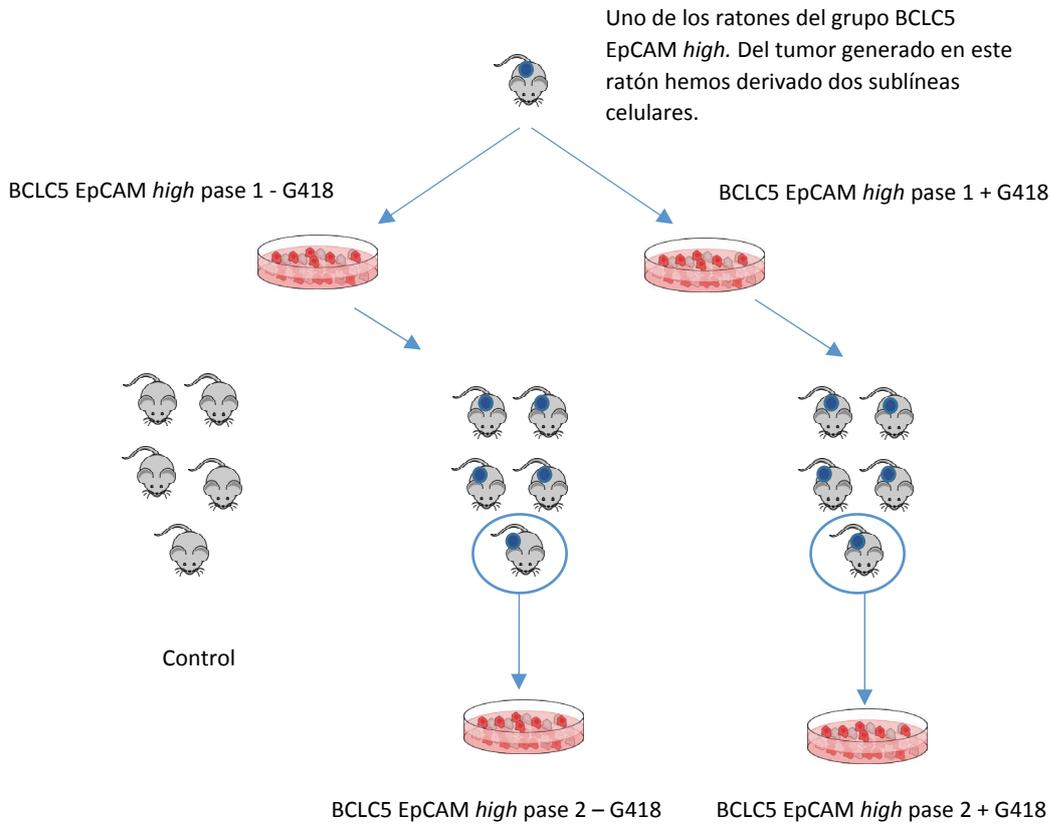
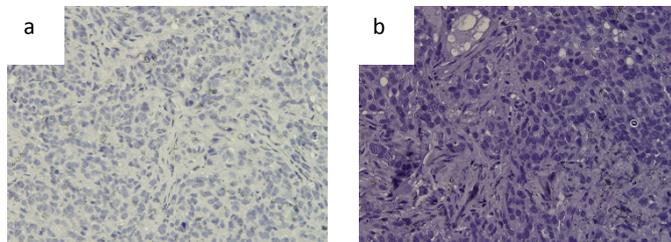


Figura 34: Tumor generado por la línea BCLC5 EpCAM *high* pase 1 - G418 (a) y por la línea BCLC5 EpCAM *high* pase 1 + G418 (b).

El siguiente esquema muestra el diseño del experimento:



Las técnicas de inmunohistoquímica realizadas sobre los tumores obtenidos BCLC5 EpCAM *high* fase 2 - G418 y BCLC5 EpCAM *high* fase 2 + G418 muestran características similares a los tumores generados por la línea celular BCLC5 EpCAM *high* con la diferencia que, en este caso, los tumores han perdido la expresión de EpCAM (Fig. 35a, b) y presentan positividad para el marcador CK19 (Fig. 35c, d).



Resultados

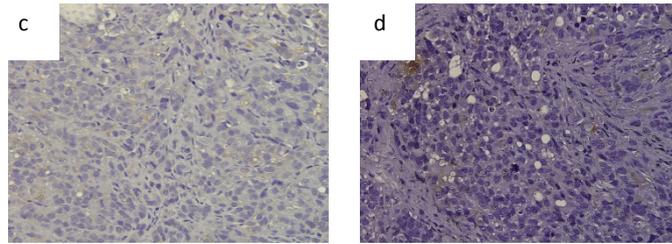


Figura 35: Expresión de EpCAM en tumores generados por las líneas BCLC5 EpCAM *high* fase 2 – G418 (a) y BCLC5 EpCAM *high* fase 2 + G418 (b); expresión de CK19 en tumores generados por las líneas BCLC5 EpCAM *high* fase 2 – G418 (c) y BCLC5 EpCAM *high* fase 2 + G418 (d). Análisis por inmunohistoquímica. Objetivo 20X.

El tamaño de los tumores BCLC5 EpCAM *high* fase 2 - G418 y BCLC5 EpCAM *high* fase 2 + G418 es significativamente mayor al de los tumores generados por las líneas celulares BCLC5 parental, BCLC5 EpCAM *high* y BCLC5 EpCAM *high* KD (Fig. 36).

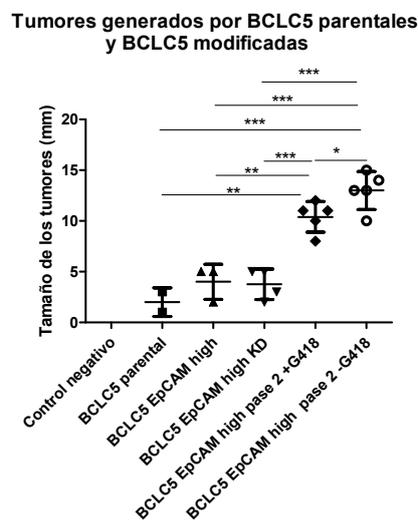


Figura 36: Tamaño de los tumores obtenidos en los ratones tras la inyección de las líneas celulares BCLC5 parental, BCLC5 EpCAM *high*, BCLC5 EpCAM *high* KD, BCLC5 EpCAM *high* fase 2 + G418 y BCLC5 EpCAM *high* fase 2 – G418. Los datos han sido analizados mediante el test estadístico t-student. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

Hemos caracterizado *in vitro* las líneas celulares derivadas de los tumores generados. Hemos analizado los niveles de expresión de las proteínas EpCAM, CCND1 y CTNNB1 en comparación con la expresión de la línea BCLC5 EpCAM *high*. Se ha observado la pérdida de la expresión de EpCAM en las líneas derivadas de los tumores generados en ratón. El resto de proteínas analizadas no experimentan cambios significativos (Fig. 37a, b, c, d).

Resultados

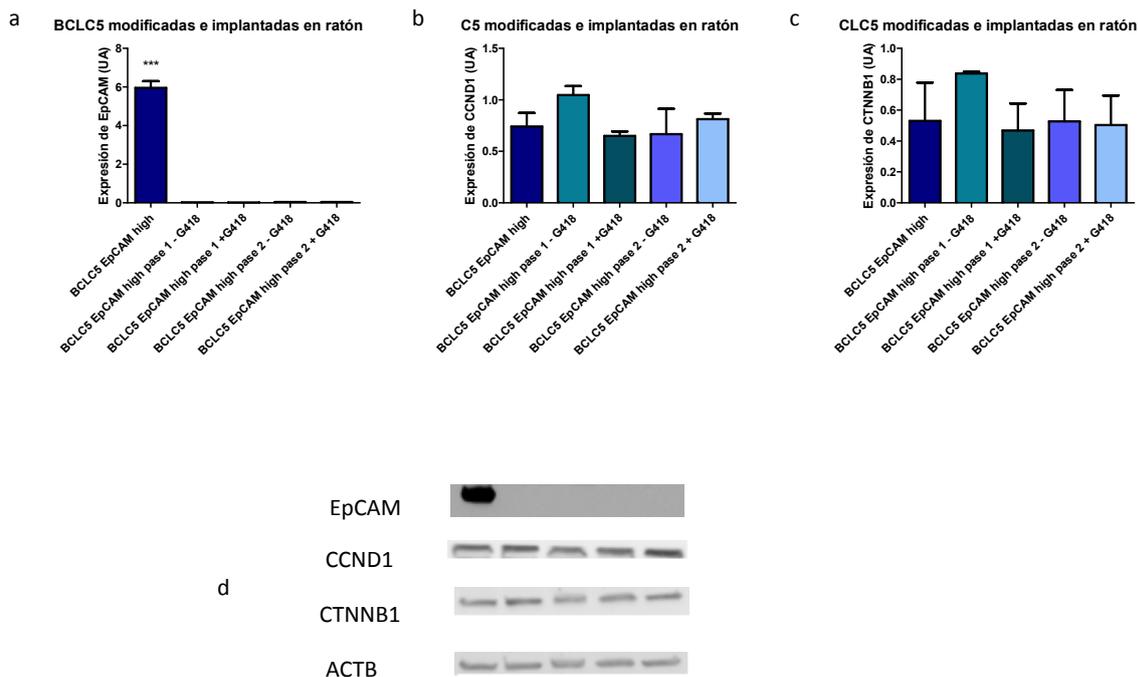


Figura 37: Análisis por WB de expresión de EpCAM (a,d), CCND1 (b, d) y CTNNB1 (c, d) en las líneas celulares BCLC5 EpCAM *high*, BCLC5 EpCAM *high* fase 1 – G418, BCLC5 EpCAM *high* fase 1 + G418, BCLC5 EpCAM *high* fase 2 – G418 y BCLC5 EpCAM *high* fase 2 + G418. La expresión proteica está expresada en UA.

Los ensayos de proliferación en normoxia muestran que todas las líneas derivadas de los ratones tienen una menor capacidad de proliferación que la línea BCLC5 EpCAM *high*. En condiciones limitantes de O₂ estas diferencias desaparecen (Fig. 38).

BCLC5 modificadas e implantadas en ratón

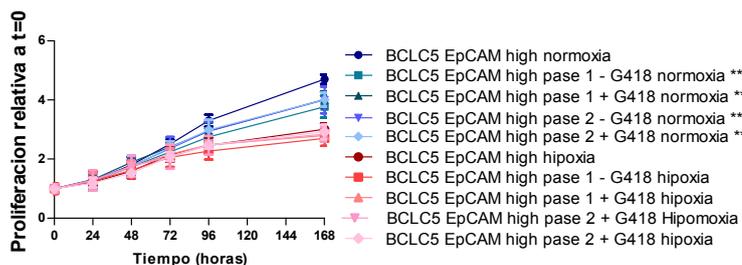


Figura 38: Análisis de la capacidad proliferativa en normoxia e hipoxia de las líneas celulares BCLC5 EpCAM *high*, BCLC5 EpCAM *high* fase 1 – G418, BCLC5 EpCAM *high* fase 1 + G418, BCLC5 EpCAM *high* fase 2 – G418 y BCLC5 EpCAM *high* fase 2 + G418. Los datos han sido analizados mediante el test estadístico t-student. *** P < 0.001.

Hemos analizado la capacidad invasiva de las células utilizando una matriz de colágeno IV y FCS como estímulo quimioatrayente. Ninguna línea celular derivada de ratón supone ventajas en el potencial invasivo (Fig. 39).

Resultados

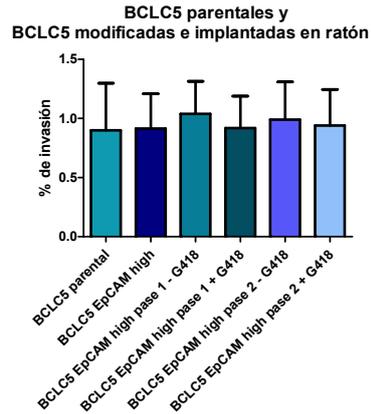


Figura 39: Análisis de la capacidad invasiva de las líneas celulares BCLC5 parental, BCLC5 EpCAM *high*, BCLC5 EpCAM *high* fase 1 – G418, BCLC5 EpCAM *high* fase 1 + G418, BCLC5 EpCAM *high* fase 2 – G418 y BCLC5 EpCAM *high* fase 2 + G418. Los datos han sido analizados mediante el test estadístico t-student.

Resultados del estudio utilizando las líneas celulares BCLC9 parentales y BCLC9 modificadas:

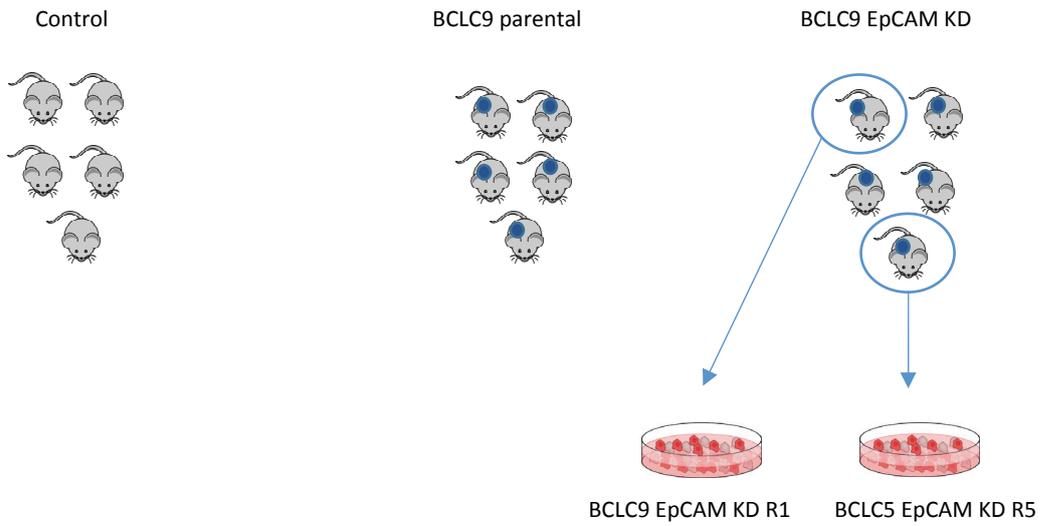
El número de ratones en los que se han generado tumores a partir de las líneas celulares BCLC9 se muestra en la siguiente tabla (Tabla 6):

Línea celular	Ratones con tumor/ratones totales
-	0/5
BCLC9 parental	5/5
BCLC9 EpCAM KD	5/5

Tabla 6: Número de ratones que generan tumor tras la inyección de las líneas celulares BCLC9 parental y BCLC9 EpCAM KD.

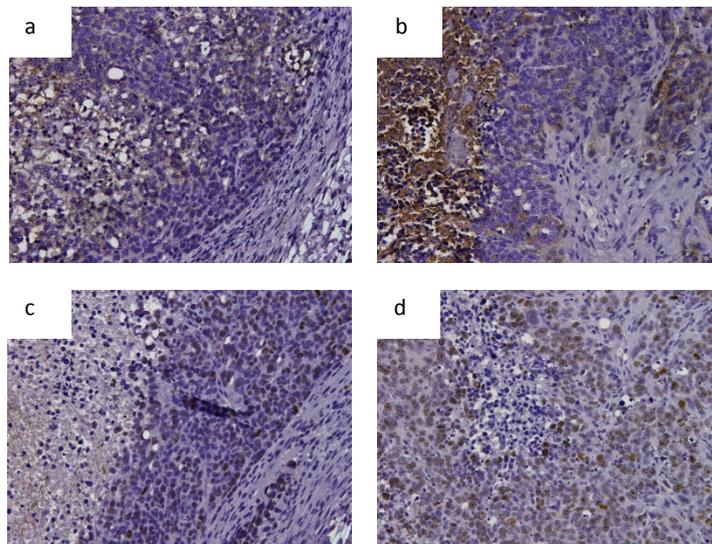
Los tumores generados por ambas líneas celulares son visibles una semana después de haber inyectado las células. En el momento de sacrificar los animales hemos aislado el tumor generado en cada uno de ellos y lo hemos caracterizado. Además, hemos derivado dos sublíneas celulares procedentes de los tumores generados en dos de los ratones a los que se les había inyectado $1 \cdot 10^6$ células BCLC9 EpCAM KD. A estas líneas las hemos denominado como BCLC9 EpCAM KD R1 y BCLC5 EpCAM KD R5.

En el siguiente esquema se muestra el diseño del experimento:



Se han realizado técnicas de inmunohistoquímica en cortes histológicos procedentes de los tumores aislados de los ratones. Los tumores generados por las células BCLC9 parental mantienen la expresión de EpCAM (Fig. 40a) y los obtenidos a partir de las líneas celulares BCLC9 EpCAM KD han recuperado la expresión de esta proteína (Fig. 40b).

Todos los tumores analizados muestran expresión positiva para los marcadores Ki67 (Fig. 40c, d), c-MYC (Fig. 40e, f) y NM23A (Fig. 40g, h).



Resultados

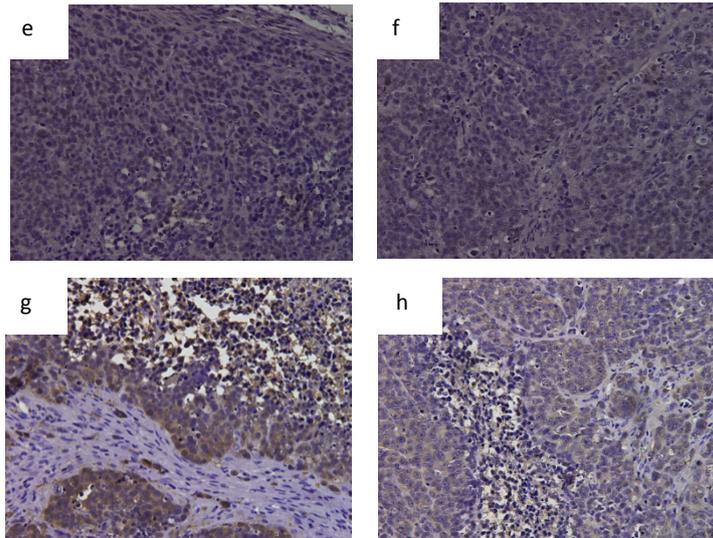
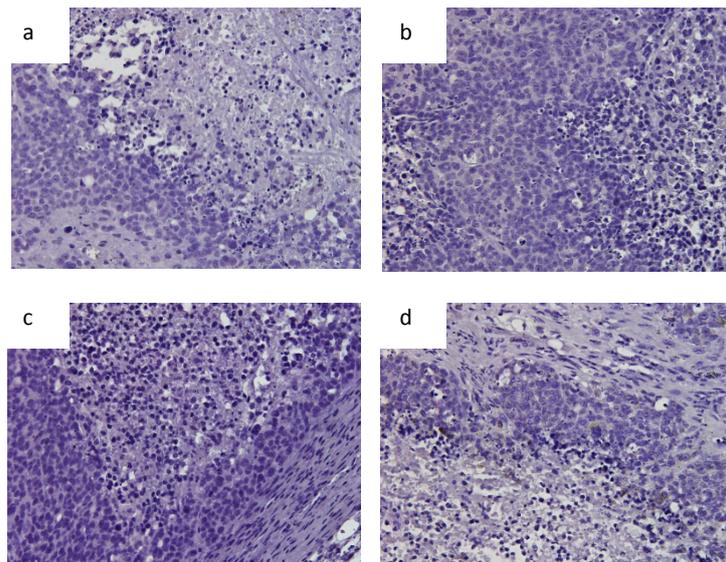


Figura 40: Expresión de EpCAM en tumores generados por las líneas BCLC9 parental (a) y BCLC9 EpCAM KD (b); expresión de Ki67 en tumores generados por las líneas BCLC9 parental (c) y BCLC9 EpCAM KD (d); expresión de c-MYC en tumores generados por las líneas BCLC9 parental (e) y BCLC9 EpCAM KD (f); expresión de NM23A en tumores generados por las líneas BCLC9 parental (g) y BCLC9 EpCAM KD (h). Análisis por inmunohistoquímica. Objetivo 20X.

El marcaje de CCND1 y CDH1 es negativo en todos los tumores generados por las líneas BCLC9 parental (Fig 41a, c) y BCLC9 EpCAM KD (Fig. 41b, d). Los tumores generados por la línea BCLC9 parental (Fig. 41e) y por la línea BCLC9 EpCAM KD (Fig. 41f) son positivos para la expresión de CLDN7 con localización en la membrana citoplasmática.



Resultados

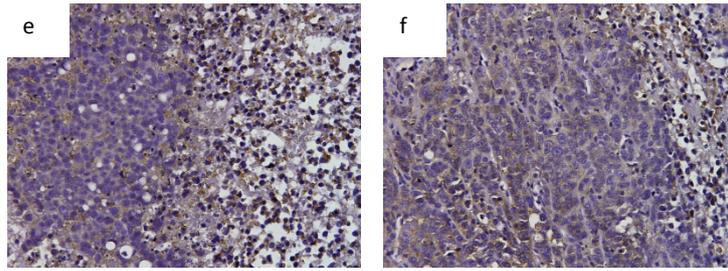


Figura 41: Expresión de CCND1 en tumores generados por las líneas BCLC9 parental (a) y BCLC9 EpCAM KD (b); expresión de CDH1 en tumores generados por las líneas BCLC9 parental (c) y BCLC9 EpCAM KD (d); expresión de CLDN7 en tumores generados por las líneas BCLC9 parental (e) y BCLC9 EpCAM KD (f). Análisis por inmunohistoquímica. Objetivo 20X.

El tamaño de los tumores BCLC9 parental y BCLC9 EpCAM KD no es significativamente diferente (Fig. 42).

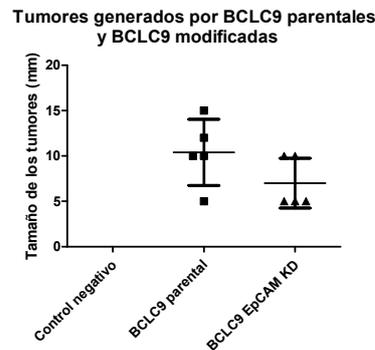
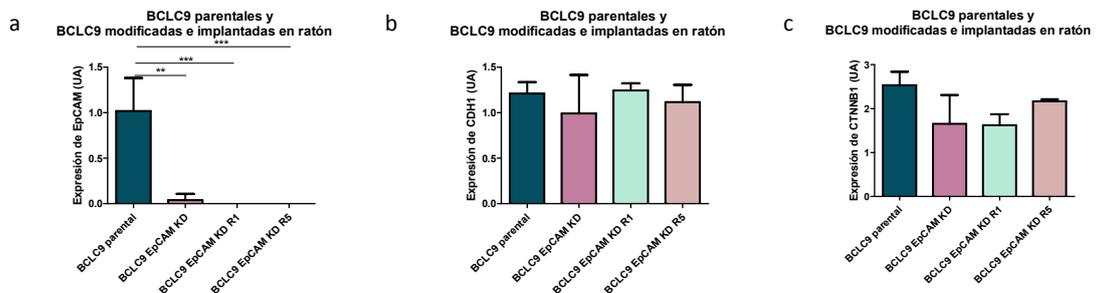


Figura 42: Tamaño de los tumores obtenidos en los ratones tras la inyección de las líneas celulares BCLC9 parental y BCLC9 EpCAM KD. Los datos han sido analizados mediante el test estadístico t-student.

A continuación hemos analizado *in vitro* la expresión proteica de las líneas celulares BCLC9 EpCAM KD R1 y BCLC9 EpCAM KD R5 y la hemos comparado con las líneas BCLC9 parental y BCLC9 EpCAM KD (Fig. 43).



Resultados

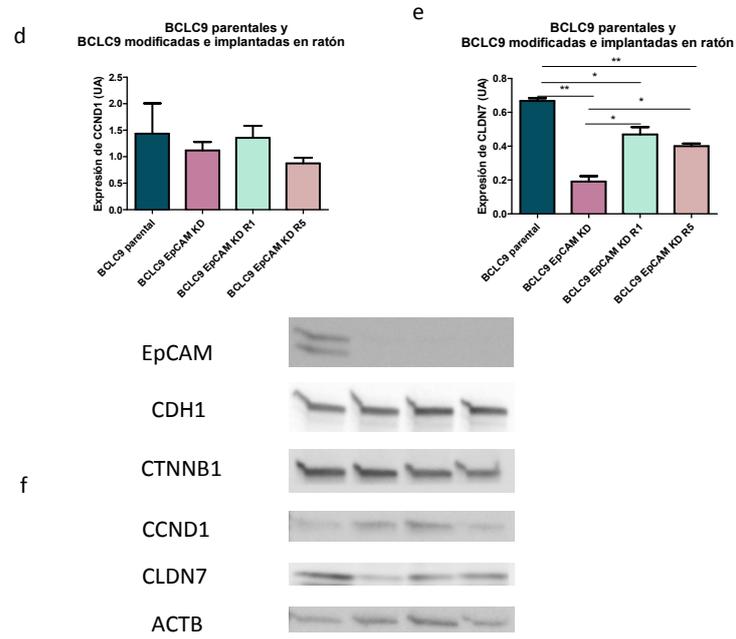


Figura 43: Análisis por WB de expresión de EpCAM (a,f), CDH1 (b, f), CTNNB1 (c, f), CCND1 (d, f) y CLDN7 (e, f) en las líneas BCLC9 parental, BCLC9 EpCAM KD, BCLC9 EpCAM KD R1 y BCLC9 EpCAM KD R5. La expresión proteica está expresada en UA.

DISCUSIÓN

EpCAM es una molécula de adhesión intercelular que puede actuar como factor de transcripción gracias a la escisión de su dominio intracelular o EpICD. Se ha descrito la expresión de EpCAM en numerosos tipos de cáncer y su presencia se asocia a mal pronóstico de la enfermedad, generalmente asociado a la aparición de metástasis (Spizzo, 2002, Brunner, 2008, Fong, 2008). Clásicamente se ha caracterizado la expresión y localización celular de esta proteína en base al reconocimiento específico mediante anticuerpos dirigidos al dominio extracelular o EpEX (Dasgeb, 2013; Pore, 2016).

El sistema CellSearch (Veridex) determina la presencia de CTCs positivas para la expresión de EpCAM contenidas en una muestra de sangre. Esto es así debido a que CellSearch (Veridex) realiza una selección previa de las células basada en el reconocimiento del dominio extracelular de la proteína. Lógicamente este sistema supone la aceptación implícita de que EpCAM es el marcador por excelencia de CTCs (Wicha, 2011). Sin embargo, nosotros hemos confirmado que en los pacientes con CHC de nuestro entorno EpCAM no es un buen marcador.

La evolución tumoral hace que las células que forman el tumor se vean sometidas a situaciones de estrés resultantes de la falta de oxígeno, cambio del metabolismo celular y actividad del sistema inmune, entre otros. Todo ello origina la aparición, dentro del mismo tumor, de clones celulares con diferentes habilidades para resistir y proliferar en este entorno hostil, dando lugar a heterogeneidad intratumoral (Lu, 2016). Esto favorece que las células tumorales que pasan al torrente sanguíneo tengan características distintas. Por ello, cualquier sistema de detección de CTCs debería tener en cuenta este hecho y utilizar combinaciones de distintos marcadores.

Por todo esto decidimos validar dos sistemas distintos como alternativa a CellSearch (Veridex) para la detección de CTCs en sangre de pacientes con CHC. Uno de ellos utiliza la técnica de transcripción reversa y posterior PCR en tiempo real. El otro, denominado ImageStream AMNIS (Merck Millipore), utiliza los principios del fenotipado celular y de la citometría de flujo. Ambas aproximaciones permiten detectar simultáneamente varios marcadores celulares, tanto intracelulares como localizados en la membrana citoplasmática. Mediante Real Time-q PCR hemos analizado la expresión génica de una serie de marcadores de nuestra elección cuya expresión se ha descrito incrementada en CHC y debería ser específica de célula epitelial transformada: *EpCAM*, *TROP2*, *hTERT*, *HSP70* y *MUC1*. Hemos confirmado en una serie de 177 pacientes que únicamente el 13.6% de los pacientes en estadios iniciales de CHC muestran expresión positiva de *EpCAM*, y en aquellos pacientes con un diagnóstico de CHC más

avanzado, la expresión de *EpCAM* se reduce al 8.7% del total. Los marcadores *TROP2* y *hTERT*, se expresan en un porcentaje de pacientes incluso menor que *EpCAM*, por lo que los desestimamos como marcadores de utilidad. Sin embargo, *HSP70* y *MUC1* se expresan en torno al 20-30% de los pacientes analizados, lo que los convertiría en potenciales candidatos a ser marcadores de CTCs. Sin embargo, se ha descrito la expresión de *HSP70* en células hematopoyéticas (Shastry, 2002; Pshennikova, 2007), por lo que los resultados obtenidos podrían ser debidos a estas células presentes en la sangre de los pacientes analizados y no a las CTCs procedentes del tumor. Además, la expresión de *HSP70* en el hígado no se relaciona exclusivamente con procesos tumorales, sino que en determinadas situaciones de estrés como la exposición a sustancias tóxicas (Bhattacharyya, 2017) o procesos inflamatorios también se induce su expresión (Qu, 2015). Por todo ello, en el análisis realizado por Real Time-q PCR *MUC1* muestra su potencial como marcador en la detección de CTCs.

Aunque los datos aportados por Real Time-q pCR ya son indicativos de la diferencia que existe entre los pacientes con CHC y los pacientes cirróticos sin evidencia de presencia de tumor, estos son resultados sobre la expresión génica sin evidencia inequívoca de la presencia de la proteína para la que codifican. Por ello, este resultado preliminar ha sido confirmado en una serie de 30 pacientes analizados con el sistema ImageStream AMNIS (Merck Millipore). En este caso sólo el 15% de los pacientes con CHC inicial y el 7% de los pacientes con un diagnóstico de CHC avanzado han mostrado presencia de células *EpCAM* positivas. En cambio, *MUC1* se ha revelado como potencial marcador de CTCs en pacientes de CHC, mostrando células con expresión positiva en el 61.5% de los pacientes analizados con un diagnóstico de CHC inicial y en el 78.5% de los pacientes con CHC avanzado.

La expresión de *MUC1* en el hígado se asocia a transformación maligna y metástasis, mientras que no se expresa en hepatocitos sanos (Cao, 1999; Yuan, 2005). A pesar de que la expresión de *MUC1* también ha sido descrita en leucocitos (Singh, 2007; Apostolopoulos, 2015; Kato, 2016), el análisis de las muestras mediante ImageStream AMNIS (Merck Millipore) nos ha permitido confirmar la presencia de *MUC1* en células circulantes de linaje epitelial. Si bien *MUC1* ya ha sido validado para detectar CTCs en cáncer gástrico (Uen, 2006), de pulmón (Zhu, 2014) y de páncreas (de Albuquerque, 2012), nunca antes lo había sido en pacientes con CHC. Nuestros datos refuerzan la elección de *MUC1* como marcador de CTCs en el CHC.

Estudios previos demuestran la existencia de células epiteliales benignas en el torrente sanguíneo de pacientes con procesos inflamatorios y de pacientes con tumores benignos de

mama (Franken, 2012), páncreas (Cauley, 2015) y colon (Pantel, 2012). Recientemente se han publicado revisiones en las que se plantea la idea de que la metástasis es un proceso que tiene lugar en las primeras fases del desarrollo tumoral y no únicamente cuando el tumor está en sus fases más avanzadas (Hosseini, 2016). Pero lo cierto es que no hay evidencias sobre la presencia de CTCs en sangre periférica en pacientes con lesiones preneoplásicas en el hígado. La cirrosis está considerada como un estadio preneoplásico (Riegler, 1996) por sus condiciones de inflamación crónica, los ciclos repetitivos de muerte y regeneración celular y por el hecho de que el CHC aparece sobre hígado cirrótico en un 80-90% de los casos (Fattovich, 2004).

Nuestro estudio confirma la presencia de células con marcadores positivos para CTCs en pacientes cirróticos sin evidencia de tumor hepático. La presencia de estas células en esta población de pacientes es superior a la de los voluntarios sanos. Desconocemos el significado real de la existencia de estas células aparentemente normales en la circulación sanguínea, aunque la liberación de dichas células podría ser un mecanismo secundario favorecido por la propia hepatopatía que no tendría más consecuencias, excepto en el caso de que ya se hayan dado signos de transformación maligna. En este caso las células procedentes de un entorno proclive al desarrollo tumoral podrían contar con ciertas ventajas para su supervivencia en entornos hostiles.

En un estudio reciente en el que han analizado muestras de sangre de pacientes cirróticos con y sin CHC mediante ImageStream AMNIS (Merck Millipore), únicamente han detectado CTCs en pacientes con tumor. En este estudio han utilizado como marcadores AFP, GPC3 y EpCAM. Describen un rango de detección comprendido entre 1 y 1600 CTCs (Oegle, 2016). Se mantiene pues la controversia sobre la contribución real de EpCAM a empeorar el pronóstico de cualquier neoplasia. Aunque otros estudios asocian la expresión de esta proteína con una mayor capacidad de adhesión celular, una menor capacidad de invasión y metástasis y, consecuentemente, con una mayor supervivencia (van der Gun, 2010). La re-expresión de EpCAM en los hepatocitos se relaciona con fases avanzadas de la cirrosis. (Imrich, 2012).

En nuestro estudio hemos analizado la función de esta proteína estimulando su expresión en líneas celulares de CHC humano. Forzando la expresión de EpCAM esperábamos demostrar la adquisición de nuevas propiedades celulares y ventajas selectivas por parte de las células modificadas.

Se han descrito múltiples funciones de EpCAM a nivel subcelular. Se requiere el procesamiento de la molécula por parte de dos enzimas, TACE y gamma-secretasa. TACE es la encargada de liberar el dominio extracelular de la proteína mientras que la subunidad catalítica PSN2 de la gamma-secretasa es la encargada de liberar el dominio intracelular. Aunque el procesado de la molécula lo realizan dos enzimas distintas, parece ser que éste sería simultáneo (Munz, 2009; Maetzel, 2009). Nuestros resultados confirman el procesamiento doble de EpCAM en todas nuestras líneas celulares aunque el índice de procesamiento es distinto entre ellas. Así, BCLC6 EpCAM y BCLC9 parental muestran mayor procesamiento de EpCAM cuando mayor es la densidad del cultivo celular mientras que BCLC5 EpCAM *high* no sigue las mismas pautas de comportamiento. El procesamiento de EpCAM requiere que éste se localice en determinadas regiones de la membrana celular en el contexto de polarización celular correcta. Así pues, aunque los contactos célula-célula se han descrito como la causa principal del procesamiento de la molécula (Denzel, 2009), éste puede no ser el mecanismo principal en las células transformadas.

El objetivo final del procesamiento es la liberación de los dominios EpEX y EpICD. EpICD ha sido descrito como el factor regulador de la expresión de determinados genes diana, entre ellos algunos claramente relacionados con la progresión del ciclo celular como *CCND1*, mientras que otros están directa o indirectamente relacionados con la transformación celular, como es el caso de *c-MYC* y *CTNNB1* (Maetzel, 2009).

Nuestros resultados no confieren a EpCAM una función de estímulo de la proliferación celular a pesar de que EpICD se localiza claramente en el núcleo de las líneas celulares estudiadas. Nuestros datos están en contraposición con otros estudios ya publicados (Maetzel, 2009). Si bien en nuestras líneas celulares la presencia de EpICD no supone un cambio en la proliferación celular, sí observamos una disminución en la expresión de CDH1 (Liu, 2013, Schnell, 2013) y el aumento de la expresión de VIM en las líneas BCLC5 EpCAM *high* y BCLC6 EpCAM. El silenciamiento de EpCAM en la línea BCLC5 EpCAM *high* revierte el aumento en la expresión de VIM hasta niveles comparables a los de la línea BCLC5 previos a la modificación génica. Está descrita la relación entre la expresión de EpCAM y la inducción de un fenotipo mesenquimal (Hsu, 2016) pero no se ha descrito hasta el momento la relación directa entre la expresión de EpCAM y VIM como hemos visto nosotros. En nuestras líneas celulares, la expresión de VIM no garantiza la adquisición de fenotipo mesenquimal ni la adquisición de capacidades migradoras ni invasivas. Por tanto, probablemente la expresión de VIM sea uno de los cambios necesarios para el inicio de la TEM aunque no sea suficiente por sí mismo. Sin

embargo, podría ser que este cambio fuera necesario para mantener la arquitectura de las células en suspensión. Tanto es así que las líneas BCLC5 EpCAM *high* y BCLC6 EpCAM muestran menor capacidad de migración que sus correspondientes líneas parentales independientemente de la disminución de CDH1. Dado que EpCAM es una molécula de adhesión intercelular, el hecho de que esté implicada en la TEM parece una contradicción. Hemos analizado la capacidad de migración de las células BCLC5 EpCAM con mayor (BCLC5 EpCAM *high*) y menor expresión de EpCAM (BCLC5 EpCAM *low*) y efectivamente, hemos comprobado que las células con menor expresión de EpCAM muestran mayor habilidad para la migración.

Estos resultados no se confirmaron en los ensayos de invasión celular. Las células transfectadas con EpCAM no mostraban menor capacidad invasiva que las líneas parentales. Sin embargo, sí que se detectó una menor expresión de las metaloproteasas implicadas en este proceso MMP9 y MMP14, encargadas de degradar la MEC, lo que podría explicar la disminución de la capacidad de migración en las líneas celulares con expresión de EpCAM respecto a sus parentales.

De alguna forma los niveles de EpCAM presentes en la célula parecen ser condicionantes de su potencial de migración. Si la función de EpCAM es dependiente de “dosis”, intuimos que su regulación debe ser muy precisa y que la transfección del gen puede no ser el sistema más adecuado para su estudio.

La red de interacciones que mantiene EpCAM con otras proteínas de membrana es compleja y contribuye a la regulación de su función en la célula. EpCAM interacciona mediante su dominio transmembrana con sus homólogos de otras células a través de la región “EGF-like domain” y con EpCAMs adyacentes de la misma célula a través del “tyroglobulin domain” (Kuhn, 2007). Pero EpCAM también contacta con otras proteínas como es el caso de las CLDNs. Una familia formada por 21 proteínas que forman las TJ. Se ha descrito que la interacción de EpCAM con CLDN7, a nivel del dominio “EGF-like”, induce la pérdida de contacto entre moléculas EpCAM de las células colindantes lo que provocaría un aumento de la motilidad celular (Khun 2007; Nübel, 2009). Es decir, la pérdida de funcionalidad de EpCAM es suficiente para inducir la TEM. Otros estudios describen la localización de algunos miembros de esta familia en el núcleo de células tumorales. Este es el caso de CLDN1 y CLDN2. Mientras que CLDN1 requiere ser fosforilada para traslocarse al núcleo celular, CLDN2 pasa a núcleo siempre y cuando no esté

fosforilada. Una vez en el núcleo, CLDN1 regula la expresión de ErbB2, CCND1 y PCNA, mientras que CLDN2 estabiliza CCND1 (French, 2009, Ikari, 2014).

Nuestros resultados demuestran la localización nuclear de CLDN7 en las líneas BCLC5 y BCLC6 parentales y en las líneas modificadas mediante transfección con el gen *EpCAM*. No ocurre lo mismo en BCLC9, en esta línea celular la localización de CLDN7 es exclusiva de membrana citoplasmática.

Observamos que en nuestras células la localización nuclear no es dependiente de fosforilación. No hemos podido demostrar asociación significativa entre el porcentaje de fosforilación de CLDN7 y la presencia de *EpCAM*. Mientras que la línea celular BCLC5 *EpCAM high* localiza CLDN7 en el núcleo celular y la expresión de *EpCAM* se asocia a un menor porcentaje de CLDN7 fosforilada, en las líneas BCLC6 *EpCAM* y BCLC9 parental el porcentaje de CLDN7 fosforilada es mayor. Este mayor porcentaje de CLDN7 fosforilada asociada a la presencia de *EpCAM* en las líneas BCLC6 *EpCAM* y BCLC9 podría relacionarse con una mayor capacidad de relocalizar *EpCAM* en los GEM y, por lo tanto, sería más susceptible de ser procesado por TACE y PSN2, por lo que en estas dos líneas celulares el procesamiento de *EpCAM* se vería potenciado tanto por un mayor contacto entre células adyacentes (Denzel, 2009; Philip, 2015), como por la nueva localización de *EpCAM* en los GEM (Philip, 2014; Raimondi, 2015).

Hemos demostrado la interacción entre *EpCAM* y CLDN7 no sólo en la membrana citoplasmática sino también en el núcleo celular en las tres líneas celulares y hemos descrito una nueva interacción de *EpCAM* y CLDN7 a nivel del dominio intracelular de *EpCAM*, *EpICD*. Pero hasta el momento desconocemos como afecta esta interacción en la regulación de los genes diana por parte de *EpICD*. Para analizar este aspecto, hemos silenciado la expresión de CLDN7 con el objetivo de que *EpICD* quedara libre en el núcleo celular y aumentara el índice de proliferación celular. Sin embargo, este silenciamiento no aumentó la proliferación ni la capacidad invasiva de las células.

A pesar de haber demostrado el procesamiento de *EpCAM* en su dominio transmembrana con la consiguiente liberación de sus dominios intra y extracelulares, la traslocación del dominio *EpICD* al núcleo celular y de haber descrito una nueva interacción de *EpCAM* con CLDN7 a nivel de *EpICD* y su posterior localización en el núcleo, no hemos conseguido asociar la expresión de *EpCAM* con un aumento de la proliferación celular ni con un incremento de las capacidades migradora e invasiva de las células.

Los cultivos celulares tradicionales en dos dimensiones no reproducen las condiciones de crecimiento de las células en un tumor. Estos cultivos pueden estar modificando el fenotipo y el comportamiento de las células frente a diferentes estímulos. Por ello, hemos analizado el papel de EpCAM y CLDN7 en cultivos celulares en tres dimensiones y hemos observado que la expresión de EpCAM se asocia a la formación de un mayor número de esferoides tumorales pero éstos son de menor tamaño. Este dato permite pensar que la presencia de EpCAM aumentaría la eficiencia de la metástasis ya que favorece la formación de mayor número de esferoides celulares. Hemos comprobado que durante la formación de los esferoides tumorales, EpCAM y CLDN7 actúan de manera aditiva. En los esferoides CLDN7 mantiene su localización citoplasmática y nuclear en las líneas BCLC5 parental y BCLC5 EpCAM *high*. Sin embargo, la línea celular BCLC6 EpCAM trasloca CLDN7 del núcleo a la membrana celular, coincidiendo con la localización de esta proteína en las células BCLC9 que crecen formando esferoides de forma espontánea. Este resultado demuestra que los cultivos celulares en dos dimensiones pueden no ser representativos y pueden dar lugar a resultados que no reflejen la realidad.

Pese a que los cultivos de células tumorales en esferoides se asemejan más a la realidad tumoral que los cultivos en dos dimensiones, éstos no dejan de ser aproximaciones *in vitro* que distan de representar las condiciones tumorales *in vivo*. Por ello, hemos utilizado el modelo murino de tumor xenograft para analizar el efecto de EpCAM en la formación de tumores. Esto nos ha permitido comprobar que la expresión de EpCAM se asocia a la formación de tumores más rápidamente y de mayor tamaño que la misma línea celular sin EpCAM. El tamaño de los tumores generados en los ratones no concuerda con los resultados obtenidos *in vitro* en los que los esferoides tumorales de células positivas para EpCAM eran de menor tamaño que los generados por las líneas parentales. Esta diferencia de resultados se podría explicar porque los modelos *in vitro* e *in vivo* no son comparables. En los modelos *in vivo* se muestra mayor eficiencia y tamaño tumoral asociados a la expresión de EpCAM. Nuestros resultados coinciden con estudios publicados en los que se relaciona la expresión de EpCAM con tumores de mayor tamaño (van der Gun, 2010).

Además, las sublíneas derivadas de los tumores obtenidos en ratones tras la inyección de células BCLC5 EpCAM *high* generan tumores más grandes que sus tumores de origen, lo que es indicativo de una mayor agresividad asociada a la evolución tumoral, hecho que hemos

comprobado *in vitro* al detectar una mayor proliferación de estas células respecto a la línea celular BCLC5 EpCAM *high* antes de ser implantada en ratón. Los datos obtenidos en modelo murino sustentan los obtenidos *in vitro* referentes a la capacidad invasiva, ya que las sublíneas derivadas no incrementan el potencial invasivo, hecho que refuerza la hipótesis de que EpCAM no es determinante en la invasión, sino en la generación de nuevos focos metastásicos en nuestras líneas celulares.

En cuanto a la localización de CLDN7, los resultados obtenidos confirman *in vivo* las diferentes localizaciones de esta proteína en función de la línea celular: los tumores generados por las líneas BCLC5 EpCAM *high* localizan CLDN7 en el núcleo y en el citoplasma celular, mientras que los tumores generados por las líneas BCLC9 localizan CLDN7 en la membrana citoplasmática. Estos datos confirman que la situación de CLDN7 depende de la línea celular y sugieren una estrecha relación de ésta con EpCAM.

Las CTCs pueden viajar individualmente o en grupo formando los denominados “clusters” de CTCs. En los “clusters” las células tumorales muestran características fenotípicas distintas que aumentan la eficiencia de la metástasis gracias a la cooperación entre ellas (Campbell, 2016; Lintz, 2017). Utilizando el sistema ImageStream AMNIS (Merck Millipore) hemos podido detectar agrupaciones celulares. Sin embargo, no podemos concluir si estas células corresponden a células tumorales que viajan conjuntamente o a agregados celulares formados durante el proceso de preparación de la muestra para su análisis. Esto supone una limitación en el estudio ya que no podemos establecer la relación entre los “clusters” observados y el diagnóstico de los pacientes. La falta de positividad para los marcadores analizados en estas células puede ser debida tanto a la ausencia de expresión de proteínas analizadas como a una limitación física que impida el reconocimiento del epítipo de interés por parte de los anticuerpos utilizados. Sin embargo, teniendo en cuenta nuestros resultados *in vitro* e *in vivo* que avalan el papel de EpCAM en la generación de nuevos focos metastásicos y no en la invasión ni en la migración celular, parece lógico pensar que la expresión de esta proteína tenga lugar cuando el “cluster” de CTCs o las CTCs individuales alcancen una nueva localización, lo que podría explicar la ausencia de detección de EpCAM en las CTCs y en los “clusters” de CTCs de los pacientes analizados.

El conjunto de estos resultados muestra las controversias de EpCAM en el desarrollo del CHC y ponen de manifiesto la necesidad de utilizar marcadores distintos para detectar CTCs en

pacientes con CHC. Hemos descrito un nuevo marcador para detectar CTCs, cuya validación puede ser clave para la detección de dichas células en pacientes con CHC en los que, como hemos visto, la utilización del marcador EpCAM es poco útil debido a la ausencia de expresión en muchas de las CTCs detectadas. La presencia de “clusters” de CTCs se relaciona con tumores más agresivos (Aceto, 2014). Sin embargo, las limitaciones de este estudio impiden caracterizar las células que forman dichos “clusters”. Por ello, sería interesante la realización de análisis más profundos que permitieran caracterizar estas células en base a distintos marcadores y relacionar la presencia de estas agrupaciones celulares con el pronóstico de los pacientes.

En este estudio hemos caracterizado la función de EpCAM en tres líneas celulares de CHC utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*, lo que nos ha permitido confirmar las discrepancias sobre el papel de esta proteína en la proliferación, la migración y la invasión celular. Hemos determinado la relación de esta proteína con CLDN7 en la membrana y en el núcleo celular. Ambas proteínas actúan de manera aditiva en la formación de esferoides tumorales. Hasta el momento los estudios que relacionan EpCAM con tumores más agresivos no analizan el efecto de la interacción de ésta con otras proteínas. Sin embargo, nosotros hemos visto que dicha interacción es relevante, por lo que tal vez, los resultados dispares entre los estudios publicados se podrían explicar si se analizara la relación que establece EpCAM con otras proteínas en las distintas etapas de la metástasis.

VII. CONCLUSIONES

Conclusiones

- Los pacientes cirróticos sin evidencia de tumor expresan niveles más elevados de los marcadores de CTCs analizados que la población de voluntarios sanos.
- EpCAM no es un buen marcador para detectar CTCs en nuestra población de pacientes cirróticos con CHC.
- El marcador MUC1 se asocia a la presencia de CTCs en pacientes con CHC. El número de CTCs positivas para MUC1 es significativamente mayor en aquellos pacientes con CHC avanzado.
- El sistema ImageStream AMNIS es el sistema más adecuado para la detección de CTCs dado que nos permite evaluar distintos marcadores simultáneamente y obtener el número de CTCs positivas en cada muestra de sangre.
- EpCAM no modifica la capacidad de proliferación celular en cultivos en 2D en normoxia ni supone ventajas proliferativas en condiciones de hipoxia. Sin embargo, es fundamental en el número y tamaño de los esferoides tumorales en cultivos 3D.
- EpCAM regula la expresión de VIM.
- La sobreexpresión de EpCAM limita la capacidad de migración de nuestras células.
- La presencia de EpCAM se asocia a una menor expresión de MMP9 y MMP14 en la línea celular BCLC5 y una menor expresión de MMP14 en la línea celular BCLC6.
- Ni la expresión de EpCAM ni de CLDN7 modifican la capacidad proliferativa ni invasiva de las células.
- CLDN7 interacciona con EpCAM en la membrana y en el núcleo de las líneas celulares estudiadas, mostrando diferentes niveles de expresión en función de la presencia de EpCAM. En el núcleo celular CLDN7 contacta directamente con EpiCD.
- El silenciamiento de CLDN7 en la línea BCLC5 se asocia a una menor expresión de MMP14.

Conclusiones

- La línea BCLC6 EpCAM localiza CLDN7 en la membrana celular cuando forma esferoides, del mismo modo que lo hace la línea BCLC9 parental. Ambas líneas incrementan el porcentaje de CLDN7 fosforilada cuando expresan EpCAM. BCLC5, en cambio, disminuye la proporción de CLDN7 fosforilada con expresión de EpCAM y mantiene su localización nuclear independientemente de EpCAM y de si crece en 2D o 3D.
- EpCAM se relaciona con la formación de mayor número de esferoides tumorales, siendo éstos de menor tamaño. En este proceso la presencia de CLDN7 tiene un efecto aditivo.
- Los cultivos celulares *in vitro* en 3D ponen de manifiesto interacciones proteicas en las células comparables a las que ocurren *in vivo* y que en cultivos 2D pasarían desapercibidas.
- La expresión de EpCAM *in vivo* determina que los tumores generados por la línea BCLC5 se empiecen a desarrollar antes que los originados por esta misma línea sin expresión de EpCAM.
- *In vivo*, la expresión de EpCAM en la línea celular BCLC5 se asocia con la formación de tumores más grandes, aunque las diferencias no son significativas.
- *In vivo*, la expresión de EpCAM en la línea BCLC5 se asocia a la pérdida de la expresión de CK19.
- La reinyección de células BCLC5 aisladas de tumores generados en ratones a un nuevo grupo de ratones conlleva la generación de tumores más grandes.
- La capacidad invasiva de líneas derivadas de tumores generados en ratones a partir de la línea celular BCLC5 EpCAM *high* no se modifica.
- Los tumores generados por la línea BCLC9 parental tienen un mayor tamaño que los obtenidos a partir de la línea BCLC9 EpCAM KD, aunque las diferencias no son significativas.

Conclusiones

- Todos los tumores analizados tienen actividad proliferativa, tal y como indica la expresión positiva de Ki67 y c-MYC.
- Los tumores generados a partir de las líneas celulares BCLC5 mantienen CLDN7 en el núcleo y en el citoplasma, igual que lo hacen en los cultivos *in vitro* en 2D y en 3D. Los tumores obtenidos tras la inyección de las líneas BCLC9 conservan la localización de CLDN7 en la membrana.
- EpCAM tal vez no tenga un papel en la migración ni en la invasión tumoral sino en generación de un nuevo foco tumoral.

VIII. ANEXO

1. Hoja de Consentimiento Informado para el paciente participante en el protocolo de investigación

Título: PAPEL DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES PARA PREDECIR DISEMINACIÓN TUMORAL EN EL CARCINOMA HEPATOCELULAR

Usted ha sido invitado a participar en un estudio de investigación destinado a evaluar la utilidad de la determinación de las células tumorales circulantes como herramienta para evaluar el riesgo de diseminación tumoral

Antes de otorgar su consentimiento es importante que Ud. lea atentamente los siguientes puntos. El médico le explicará cualquier duda que tenga.

Propósito del estudio:

En los pacientes con cáncer de hígado, el tratamiento se decide en parte de acuerdo al grado de extensión tumoral determinado por técnicas de imagen. Además, la eficacia del tratamiento se evalúa con criterios radiológicos que se basan en cambios del tamaño del tumor o en cambios del grado de captación de contraste, pero no se tienen en cuenta otros parámetros que posiblemente tengan un gran valor pronóstico. Adicionalmente, los pacientes que presentan progresión radiológica según los criterios de respuesta actuales presentan una supervivencia heterogénea. Por tal motivo, el objetivo de este estudio es investigar la utilidad de la determinación y caracterización de células tumorales circulantes para predecir el riesgo de diseminación tumoral. Centraremos nuestro estudio en aquellos pacientes diagnosticados de cáncer de hígado a los cuales se ofrecerá algún tratamiento establecido por las guías de práctica clínica. Evaluaremos si la determinación de las células tumorales circulantes constituye un marcador pronóstico fiable. Centraremos nuestro análisis especialmente en aquellos pacientes candidatos a trasplante hepático.

¿En qué consiste mi participación?

Se le realizarán los controles basales clínicos y analíticos habituales antes de iniciar el tratamiento. Durante el seguimiento se realizarán: controles clínicos y analíticos la semana

del tratamiento, el primer mes y cada tres meses. Estos controles son los habituales que se aplican en la práctica clínica habitual, por lo que no le supondrá ninguna molestia adicional. La extracción de muestras de sangre se realizará en el Hospital Clínic de Barcelona para valorar la función hepática, hemograma, función renal, y coagulación y el excedente se guardará en la colección del grupo de Oncología Hepática para realizar determinación de células tumorales circulantes. Las muestras de sangre serán codificadas y almacenadas en congeladores de -80°C localizados en las instalaciones del laboratorio de oncología hepática situado en el Centro Esther Koplowitz (CEK) en previsión de poder realizar estudios más amplios en un futuro. Estas muestras podrán ser usadas en otros proyectos de investigación siempre que hayan sido aprobados por el comité de Ética. Si Ud. no participa en el estudio se le realizarán los controles habituales, su tratamiento y seguimiento no se verá afectado.

¿Qué desventajas y riesgos tiene participar?

No tendrá desventajas, ya que no se modifica la práctica habitual.

¿Qué ventajas tiene participar?

Es posible que usted no obtenga un beneficio directo por su participación, pero mediante su participación colaborará para que los médicos puedan obtener datos para predecir de forma más apropiada el pronóstico del carcinoma hepatocelular.

¿Qué pasa si decido no participar?

Nada. Su participación es voluntaria y libre. Ud. podrá retirarse del estudio en cualquier momento sin que esto afecte la relación con su médico, pero le solicitamos que en este caso, le comente a su médico las razones de su decisión. Además, su tratamiento en el grupo de Oncología Hepática del Hospital Clínic, es el mismo, independientemente de si Ud. participa o no en este estudio.

Confidencialidad de sus datos personales.

La información de sus datos personales será conservada en forma confidencial y no será identificado personalmente en ningún informe científico y/o publicación derivados de este estudio de investigación.

¿Tendré que pagar o recibiré algún pago por mi participación?

No tendrá ningún costo adicional para el paciente ni su cobertura de salud y no recibirá pago alguno por su participación.

¿Con quién puedo contactar en caso de dudas referentes al estudio? En caso de cualquier duda relacionada con el presente estudio usted puede contactar con los responsables:

Dr. Jordi Bruix Tudó Tel: 932275400 #9803

Dr. Alejandro Forner González Tel.: 932275400 #3303

Grup Oncologia Hepàtica, Servei Hepatologia, Hospital Clínic de Barcelona.

Si está de acuerdo con participar del estudio, por favor firme al pie del siguiente enunciado:

“He leído los puntos 1 al 7 y con mi firma doy consentimiento a participar del estudio explicado. Entiendo que puedo dejar de participar cuando yo quiera y así lo haga saber por escrito, sin que ello resulte un cambio alguno de mi tratamiento. He recibido copia de este Consentimiento escrito”.

Autorizo la donación de 10 ml de sangre para investigación biomédica SI NO

Autorizo recibir la información relevante derivada de la investigación SI NO

Autorizo ser contactado en el caso de necesitar más información o SI NO

muestras adicionales

Autorizo incluir las muestras excedentes a la colección del grupo de SI NO
Oncología Hepática registrada en el Biobanco

.....
Firma del paciente Aclaración de la firma Lugar y Fecha

.....
Firma del testigo Aclaración de la firma Fecha

.....
Firma y aclaración o sello de la persona investigador Fecha

CUANDO EL PACIENTE NO PUEDA LEER ESTE CONSENTIMIENTO, EL TESTIGO LO LEERÁ EN VOZ ALTA Y DOCUMENTARÁ LA APROBACIÓN DEL PACIENTE CON SU FIRMA.

2. Sistema de estadificación BCLC

A. Forner et al. / Med Clin (Barc). 2016;xxx(xx):xxx.e1-xxx.e22

xxx.e7

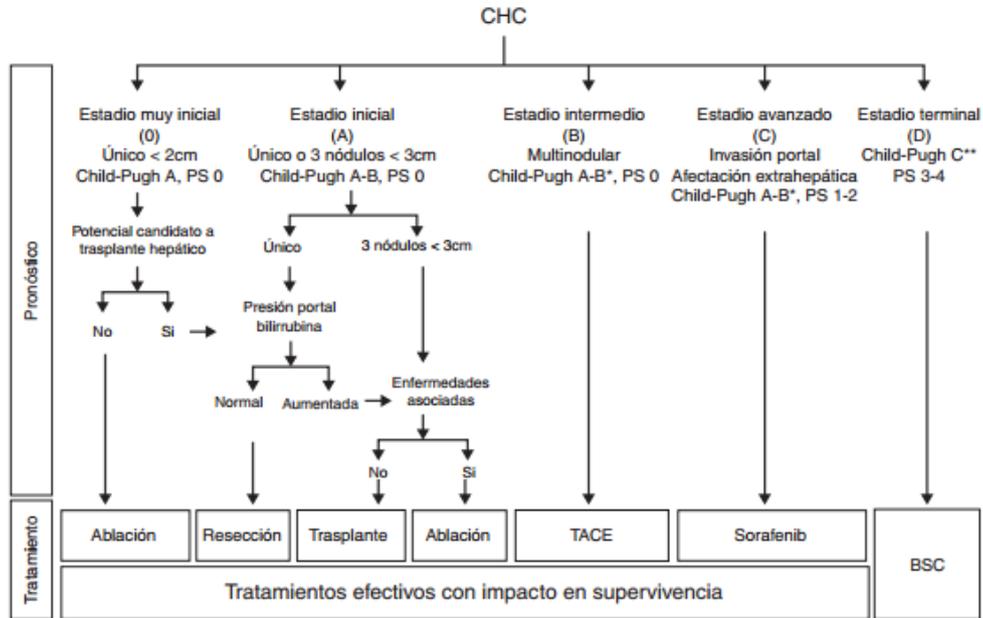


Figura 2. Sistema de estadificación Barcelona-Clinic-Liver-Cancer (BCLC). BSC: best supportive care; CHC: carcinoma hepatocelular; PS: performance status.
 * La clasificación Child-Pugh no identifica a todos los pacientes con disfunción hepática grave que precisan considerar la opción de trasplante hepático.
 ** Pacientes con cirrosis en estadio terminal debido a disfunción hepática grave (Child-Pugh C o estadios más iniciales con episodios predictores de mal pronóstico, puntuación MELD elevada) deben considerarse para trasplante hepático. En estos pacientes, la presencia de un CHC puede suponer una contraindicación para trasplante hepático si excede los criterios de inclusión.
 Adaptada de Bruix et al.¹⁶⁸.

Forner, 2016

IX. BIBLIOGRAFÍA

Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, Amadori D, Santoro A, Figer A, De Greve J, Douillard JY, Lathia C, Schwartz B, Taylor I, Moscovici M, Saltz LB. . Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*. 2006; 24(26):4293–300.

Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, Yu M, Pely A, Engstrom A, Zhu H, Brannigan BW, Kapur R, Stott SL, Shioda T, Ramaswamy S, Ting DT, Lin CP, Toner M, Haber DA, Maheswaran S. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* 158, 1110–1122 (2014).

Adami HO, Chow WH, Nyren O, Berne C, Linet MS, Ekblom A, et al. Excess risk of primary liver cancer in patients with diabetes mellitus. *J Natl Cancer Inst*. 1996; 88:1472–7.

Agrawal B, Krantz MJ, Parker J, Longenecker BM. Expression of MUC1 mucin on activated human T cells: implications for a role of MUC1 in normal immune regulation. *Cancer Res*. 1998 Sep 15;58(18):4079-81.

Ahmad R, Rajabi H, Kosugi M, Joshi M, Alam M, Vasir B et al. MUC1-C oncoprotein promotes STAT3 activation in an auto-inductive regulatory loop. *Sci Signal* 2011; 4: ra9.

Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Aug;11(8):545-55.

Alberti A, Chemello L, Benvegnù L. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 31 Suppl 1: 17-24.

Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem*. 2013 Jan;59(1):110-8.

Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer*. 2014 Sep;14(9):623-31.

Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AG, Uhr JW, Terstappen LW. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 2004; 10:6897–904.

Allan RK, Ratajczak T. Versatile TPR domains accommodate different modes of target protein recognition and function. *Cell Stress Chaperones*. 2011 Jul;16(4):353-67.

Almogy G, Lieberman S, Gips M, Pappo O, Edden Y, Jurim O, Simon Slasky B, Uzieli B, Eid A: Clinical outcomes of surgical resections for primary liver sarcoma in adults: results from a single centre. *Eur J Surg Oncol* 2004, 30:421-427.

Alpini G, Lenzi R, Sarkozi L, Tavoloni N. Biliary physiology in rats with bile ductular cell hyperplasia. Evidence for a secretory function of proliferated bile ductules. *J Clin Invest*. 1988;81(2):569-78.

Alpini G, Prall RT, LaRusso NF. The pathobiology of biliary epithelia. *The Liver; Biology & Pathobiology*, 4th Ed. I. M. Arias, J. L. Boyer, F. V. Chisari, N. Fausto, W. Jakoby, D. Schachter, and D. A. Shafritz, eds. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. 2001:421-35

Alpini G, Franchitto A, Demorrow S, Onori P, Gaudio E, Wise C, Francis H, Venter J, Kopriva S, Mancinelli R and others. Activation of alpha (1) -adrenergic receptors stimulate the growth of

small mouse cholangiocytes via calcium-dependent activation of nuclear factor of activated T cells 2 and specificity protein 1. *Hepatology* 2011; 53(2):628-39.

Andergassen U, Kölbl AC, Hutter S, Friese K, Jeschke U. Detection of Circulating Tumour Cells from Blood of Breast Cancer Patients via RT-qPCR. *Cancers (Basel)*. 2013 Sep 25;5(4):1212-20.

Aparicio LA, Blanco M, Castosa R, Concha Á, Valladares M, Calvo L, Figueroa A. Clinical implications of epithelial cell plasticity in cancer progression. *Cancer Lett*. 2015 Sep 28;366(1):1-10.

Apostolopoulos V, Stojanovska L, Gargosky SE. MUC1 (CD227): a multi-tasked molecule. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Dec;72(23):4475-500.

Armengol C, Tarafa G, Boix L, Solé M, Queralt R, Costa D, Bachs O, Bruix J, Capellá G. Orthotopic implantation of human hepatocellular carcinoma in mice: Analysis of tumor progression and establishment of the BCLC9 cell line. *Clin Cancer Res* 2004;10:2150-2157.

Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. 1869. *Aust Med J*.14:146-9.

Askgaard G, Grønbaek M, Kjær MS, Tjønneland A, Tolstrup JS. Alcohol drinking pattern and risk of alcoholic liver cirrhosis: a prospective cohort study. *J Hepatol*. 2015 May;62(5):1061-7.

Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem*. 1983 Jun 10;258(11):7155-60.

Au SH, Storey BD, Moore JC, Tang Q, Chen YL, Javaid S, Sarioglu AF, Sullivan R, Madden MW, O'Keefe R, Haber DA, Maheswaran S, Langenau DM, Stott SL, Toner M. Clusters of circulating tumor cells traverse capillary-sized vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 May 3; 113(18):4947-52.

Austinat M, Dunsch R, Wittekind C, Tannapfel A, Gebhardt R, Gaunitz F. Correlation between beta-catenin mutations and expression of Wnt-signaling target genes in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer* 2008; 7:21.

Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A, Schillert A, Vogel V, Klein C, Saini M, Bauerle T, Wallwiener M, Holland-Letz T, Hofner T, Sprick M, Scharpf M, Marme F, Sinn HP, Pantel K, Weichert W, Trumpp A, 2013. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat. Biotechnol*. 31, 539e544.

Baeuerle PA and Gires O (2007). EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br. J. Cancer* 96, 417-423.

Baffy G, Brunt E.M, Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: An emerging menace. *J. Hepatol*. 2012, 56, 1384–1391.

Bakewell SJ, Nestor P, Prasad S, Tomasson MH, Dowland N, Mehrotra M, Scarborough R, Kanter J, Abe K, Phillips D, et al. Platelet and osteoclast beta3 integrins are critical for bone metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:14205–14210.

- Baik M, Yu JH, Hennighausen L. Growth hormone–STAT5 regulation of growth, hepatocellular carcinoma, and liver metabolism. *Ann N Y Acad Sci.* 2011 Jul;1229:29-37.
- Balic M, Dandachi N, Hofmann G, Samonigg H, Loibner H, Obwaller A, van der Kooi A, Tibbe AG, Doyle GV, Terstappen LW, Bauernhofer T. Comparison of two methods for enumerating circulating tumor cells in carcinoma patients. *Cytometry B Clin Cytom.* 2005 Nov;68(1):25-30.
- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001 ; 357:539 – 45.
- Balzar M, Bakker HA, Briaire de Bruijn ih, Fleuren GJ, Warnaar SO, Litvinov SV, Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule, *Mol. Cell Biol* 18 (1998) 4833–4843.
- Becker FF, Wang XB, Huang Y, Pethig R, Vykoukal J, Gascoyne PR, 1995. Separation of human breast cancer cells from blood by differential dielectric affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 860e864.
- Bednarz-Knoll N, Alix-Panabières C, Pantel K. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer Metastasis Rev* (2012) 31:673–687.
- Begus-Nahrman Y, Hartmann D, Kraus J, Eshraghi P, Scheffold A, Grieb M, Rasche V, Schirmacher P, Lee HW, Kestler HA, Lechel A, Rudolph KL. Transient telomere dysfunction induces chromosomal instability and promotes carcinogenesis. *J Clin Invest.* 2012 Jun;122(6):2283-8.
- Benedetti A, Bassotti C, Rapino K, Marucci L, Jezequel AM. A orphometric study of the epithelium lining the rat intrahepatic biliary tree. *J Hepatol.* 1996;24(3):335-42.
- Benson EA, Page RE. A practical reappraisal of the anatomy of the extrahepatic bile ducts and arteries. *Br. J. Surg.* 63: 853-860, 1976.
- Berman H, Burnham J, Sheahan D. Fibrolamellar carcinoma of the liver: an immunohistochemical study of nineteen cases and a review of the literature. *Hum Pathol* 1988; 19: 784-93.
- Bertelsen EB, Chang L, Gestwicki JE, Zuiderweg ER. Solution conformation of wild-type *E. coli* Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 May 26;106(21):8471-6.
- Bhattacharyya S, Banerjee S, Guha C, Ghosh S, Sil PC. A 35 kDa *Phyllanthus niruri* protein suppresses indomethacin mediated hepatic impairments: Its role in Hsp70, HO-1, JNKs and Ca²⁺ dependent inflammatory pathways. *Food Chem Toxicol.* 2017 Apr;102:76-92.
- Bitler BG, Goverdhan A, Schroeder JA. MUC1 regulates nuclear localization and function of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Sci* 2010; 123: 1716–1723.
- Blanc JF, Lepreux S, Balaboud C et al. Histophysiologie Hépatique. *Encycl Méd Chir. Elsevier, Paris, Hépatologie* 7-005-A-10, 2002, 13pp.
- Blasco MA & Hahn WC. Evolving views of telomerase and cancer. *Trends Cell Biol* 13, 289-294 (2003).

- Borgen E, Beiske K, Trachsel S, et al. Immunocytochemical detection of isolated epithelial cells in bone marrow: non-specific staining and contribution by plasma cells directly reactive to alkaline phosphatase. *J Pathol* 1998; 185: 427–34.
- Borgen E, Pantel K, Schlimok G, et al. A European interlaboratory testing of three well-known procedures for immunocytochemical detection of epithelial cells in bone marrow. Results from analysis of normal bone marrow. *Cytometry B Clin Cytom* 2006; 70:400–9.
- Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: Worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*. 2004;127 5 Suppl 1:S5–16.
- Bosetti C, Levi F, Boffetta P, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Trends in mortality from hepatocellular carcinoma in Europe, 1980-2004. *Hepatology*. 2008 Jul;48(1):137-45.
- Bozkaya G, Korhan P, Cokaklı M, Erdal E, Sağol O, Karademir S, Korch C, Atabey N. Cooperative interaction of MUC1 with the HGF/c-Met pathway during hepatocarcinogenesis. *Mol Cancer*. 2012 Sep 11;11:64.
- Brad Q, Starley, Christopher J, Calcagno, Stephen A. Harrison Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: A weighty connection 12 February 2010
- Bradbear RA, Bain C, Siskind V, Schofield FD, Webb S, Axelsen EM, Halliday JW, Bassett ML, Powell LW: Cohort study of internal malignancy in genetic hemochromatosis and other chronic nonalcoholic liver diseases. *J Natl Cancer Inst* 1985;75:81–84.
- Braun, S. et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 353, 793–802 (2005).
- Brechot C, Gozuacik D, Murakami Y, Brechot PP. Molecular bases for the development of hepatitis B virus (HBV) –related hepatocellular carcinoma (HCC). *Semin Cancer Biol.* 2000;10: 211-31.
- Brechot C. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms. *Gastroenterology*. 2004;127:S56-61.
- Bridgewater J, Galle PR, Khan SA, Llovet JM, Park JW, Patel T, et al. Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 2014;60:1268–89.
- Brondello JM, McKenzie FR, Sun H, Tonks NK, Pouysségur J. Constitutive MAP kinase phosphatase (MKP-1) expression blocks G1 specific gene transcription and S-phase entry in fibroblasts. *Oncogene*. 1995 May 18;10(10):1895-904.
- Brugger W, Buhring HJ, Grunebach F, et al. Expression of MUC-1 epitopes on normal bone marrow: implications for the detection of micrometastatic tumor cells. *J Clin Oncol* 1999; 17:1535–44.
- Bruix J, Sherman M; Management of hepatocellular carcinoma. Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2005 Nov;42(5):1208-36.
- Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011;53(3):1020-2.

Bruix J, Merle P, Granito A, Huang, YH., Bodoky G, Yokosuka O, Han G (2016). LBA-03: Efficacy and safety of regorafenib versus placebo in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) progressing on sorafenib: results of the international, randomized phase 3 RESORCE trial. *Annals of Oncology*, 27(suppl 2), ii140-ii141)

Brunner A, Schaefer G, Veits L, Brunner B, Prelog M, Ensinger C. EpCAM overexpression is associated with high-grade urothelial carcinoma in the renal pelvis. *Anticancer Res.* 2008 Jan-Feb;28(1A):125-8.

Burnett W, Gairns FW, Bacsich P. Some observations on the innervation of the extrahepatic biliary system in man. *Ann Surg.* 159: 8-26, 1964.

Bugianesi E. Non-alcoholic steatohepatitis and cancer. *Clin Liver Dis* 2007;11:191-207, x-xi.

But DY, Lai CL, Yuen MF. Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2008;14:1652–6.

Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci.* 2006 Mar;31(3):164-72. Review.

Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med.* 2003;348:1625–38.

Calle EE, Kaaks S. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2004;4:79-91.

Calvisi DF. When good transforming growth factor- β turns bad in hepatocellular carcinoma: Axl takes the stage. *Hepatology.* 2015 Mar; 61(3):759-61.

Campbell K, Casanova J. A common framework for EMT and collective cell migration. *Development.* 2016 Dec 1;143(23):4291-4300.

Cao Y, Karsten U, Otto G, Bannasch P: Expression of MUC1, Thomsen-Friedenreich antigen, Tn, sialosyl-Tn, and alpha-2,6-linked sialic acid in hepatocellular carcinomas and preneoplastic hepatocellular lesions. *Virchows Arch* 1999, 434:503–509.

Čapoun O, Mikulová V, Jančíková M, Honová H, Kološtová K, Sobotka R, Michael P, Zima T, Hanuš T, Soukup V. Prognosis of Castration-resistant Prostate Cancer Patients - Use of the AdnaTest[®] System for Detection of Circulating Tumor Cells. *Anticancer Res.* 2016 Apr; 36(4):2019-26.

Cárcamo C, López S J. Tumores hepáticos benignos. *Cuad. Cir.* 2006; 20: 79-85

Cardinale V, Wang Y, Carpino G, et al., Multipotent stem/progenitor cells in human biliary tree give rise to hepatocytes, cholangiocyte, and pancreatic islets. *Hepatology* 2011; 54:2159-2172.

Carpino G, Cardinales V, Onori P, et al. Biliary tree stem/progenitor cells in glands of extrahepatica and intrahepatic bile ducts: an anatomical in situ yielding evidence of maturational lineages. *J Anat* 2012;220:186-199.

Cascales M, Bases moleculares y celulares de la regeneración hepática, Instituto de España, 2008.

- Castells L. Virus de la hepatitis B y carcinoma hepatocelular. *Gastroenterol Hepatol.* 2006;29(Supl 2):86-92.
- Cauley, C.E., Pitman, M.B., Zhou, J., Perkins, J., Kuleman, B., Liss, A.S., Fernandez-Del Castillo, C., Warshaw, A.L., Lillemoe, K.D., Thayer, S.P., 2015. Circulating epithelial cells in patients with pancreatic lesions: clinical and pathologic findings. *J. Am. Coll. Surg.*
- Cecchi F, Rabe DC, Bottaro DP: Targeting the HGF/Met signalling pathway in cancer. *Eur J Cancer* 2010, 46:1260–1270.
- Cequera A & García de León Méndez MC. Biomarcadores para fibrosis hepática, avances, ventajas y desventajas. *Revista de Gastroenterología de México.* 2014;79(3):187-199.
- Chaffer CL, Weinberg RA (2011) A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 331(6024):1559–1564
- Chang MH, Chen CJ, Lai MS, Hsu HM, Wu TC, Kong MS, et al. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *N Engl J Med.* 1997;336:1855–9.
- Chang MH, You SL, Chen CJ, Liu CJ, Lai MW, Wu TC, Wu SF, Lee CM, Yang SS, Chu HC, Wang TE, Chen BW, Chuang WL, Soon MS, Lin CY, Chiou ST, Kuo HS, Chen DS. Long-term Effects of Hepatitis B Immunization of Infants in Preventing Liver Cancer. Taiwan Hepatoma Study Group. *Gastroenterology.* 2016 Sep;151(3):472-480.e1.
- Chaves-Pérez A, Mack B, Maetzel D, Kremling H, Eggert C, Harréus U, Gires O. EpCAM regulates cell cycle progression via control of cyclin D1 expression. *Oncogene.* 2013 Jan 31;32(5):641-50.
- Chen X, Lingala S, Khoobyari S, Nolta J, Zern MA, Wu J. Epithelial mesenchymal transition and hedgehog signaling activation are associated with chemoresistance and invasion of hepatoma subpopulations. *J Hepatol.* 2011;55:838–45.
- Chen SL, Morgan TR. The Natural History of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *Int J Med Sci.*2006; 3:47–52.
- Cheng AL 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.
- Cho EH, Wendel M, Luttgen M, Yoshioka C, Marrinucci D, Lazar D, Schram E, Nieva J, Bazhenova L, Morgan A, et al. (2012). Characterization of circulating tumor cell aggregates identified in patients with epithelial tumors. *Phys. Biol.* 9, 016001.
- Chou SD, Prince T, Gong J, Calderwood SK. mTOR is essential for the proteotoxic stress response, HSF1 activation and heat shock protein synthesis. *PLoS One.* 2012;7(6):e39679.
- Christopher D, Byrne CD, Targher G. NAFLD: A multisystem disease. *J. Hepatol.* 2015, 62, S47–S64.
- Clawson GA, Kimchi E, Patrick SD, Xin P, Harouaka R, Zheng S, Berg A, Schell T, Staveley-O'Carroll KF, Neves RI, Mosca PJ, Thiboutot D. Circulating tumor cells in melanoma patients. *PLoS One.* 2012;7(7):e41052.

Clocchiatti A, Cora E, Zhang Y, Dotto GP. Sexual dimorphism in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016 May;16(5):330-9.

Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008; 26(19):3213–21.

Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al., Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer, *Ann. Oncol*. 20 (2009) 1223–1229.

Collins, K. & Mitchell, J.R. Telomerase in the human organism. *Oncogene* 21, 564-579 (2002).

Cotto JJ, Morimoto RI. Stress-induced activation of the heat-shock response: cell and molecular biology of heat-shock factors. *Biochem Soc Symp*. 1999;64:105-18. Review.

Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004; 351(8):781–91. Epub 2004/08/20.

Cubas R, Li M, Chen C, Yao Q. Trop2: a possible therapeutic target for late stage epithelial carcinomas. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Dec;1796(2):309-14. Review.

Cubas R, Zhang S, Li M, Chen C, Yao Q. Trop2 expression contributes to tumor pathogenesis by activating the ERK MAPK pathway. *Mol Cancer*. 2010 Sep 21;9:253.

Dabeva MD, Shafritz DA. Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration. *Am J Pathol* 1993;143:1606-1620.

Dasgeb B, Mohammadi TM, Mehregan DR. Use of Ber-EP4 and Epithelial Specific Antigen to Differentiate Clinical Simulators of Basal Cell Carcinoma. *Biomark Cancer*. 2013 Jun 25;5:7-11.

Davies MJ, Rayman G, Gray IP, Day JL, Hales CN. Insulin deficiency and increased plasma concentration of intact and 32/33 split proinsulin in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabet Med* 1993; 10:313-20.

De Albuquerque, A.; Kaul, S.; Breier, S.; Krabisch, P.; Fersis, N. Multimarker analysis of circulating tumor cells in peripheral blood of metastatic breast cancer patients: A step forward in personalized medicine. *Breast Care* 2012, 7, 7–12. 37.

De Albuquerque A, Kubisch I, Breier G, Stamminger G, Fersis N, Eichler A, Kaul S, Stölzel U. Multimarker gene analysis of circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: a feasibility study. *Oncology*. 2012;82(1):3-10.

De Albuquerque, A.; Kubisch, I.; Ernst, D.; Breier, G.; Stamminger, G.; Fersis, N.; Stölzel, U.; Boese-Landgraf, J.; Eichler, A.; Kaul, S. Development of a molecular multimarker assay for the analysis of circulating tumor cells in adenocarcinoma patients. *Clin. Lab*. 2012, 58, 373–384.

DeBaun M, Tucker M: Risk of cancer during the first four year of life in children from The Beckwith-Wiedemann syndrome Registry. *J Pediatr* 1998; 132: 398-400.

- de Boer CJ, van Krieken JH, Janssen-van Rhijn CM, Litvinov SV, Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver, *J. Pathol.* 188 (1999) 201–206.
- de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2008;14(19):6302–9. Epub 2008/10/03.
- de Oliveria Andrade LJ, D'Oliveira A, Melo RC, De Souza EC, Costa Silva CA, Paraná R. Association between hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *J Glob Infect Dis.* 2009 Jan;1(1): 33-7.
- Denzel S, Maetzel D, Mack B, Eggert C, Bähr G, Gires O. Initial activation of EpCAM cleavage via cell-to-cell contact. *BMC Cancer.* 2009 Nov 19;9:402.
- Devlin, T. Regulation of Gene Expression. In *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*; Devlin, T., Ed.; John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2010; p. 257.
- Di Tommaso L et al. The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2009;50(4):746-54.
- Diehl JA, Yang W, Rimerman RA, Xiao H, Emili A. Hsc70 regulates accumulation of cyclin D1 and cyclin D1-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol.* 2003 Mar;23(5):1764-74.
- Dolle L., Theise N.D., Schmelzer E., Boulter L., Gires O. and van Grunsven L.A. (2015a). EpCAM and the biology of hepatic stem/progenitor cells. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol.* 308, G233-G250.
- Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: The effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol.*2002;155:323–31.
- Domschke C, Diel IJ, Englert S, Kalteisen S, Mayer L, Rom J, Heil J, Sohn C, Schuetz F. Prognostic value of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with operable primary breast cancer: a long-term follow-up study. *Ann Surg Oncol.* 2013 Jun;20(6):1865-71.
- Duda DG, Duyverman AM, Kohno M, Snuderl M, Steller EJ, Fukumura D, Jain RK (2010). Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 21677–21682.
- Durnez A, Verslype C, Nevens F, Fevery J, Aerts R, Pirenne J, Lesaffre E, Libbrecht L, Desmet V, Roskams T. The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. *Histopathology* 2006;49:138–51.
- Dyson J, Jaques B, Chattopadhyay D, Lochan R, Graham J, Das D, et al. Hepatocellular cancer: The impact of obesity, type 2 diabetes and a multidisciplinary team. *J Hepatol.* 2014;60:110–7.
- EASL, EASD, EASO. Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*; 2016 Jun ;64(6):1388–402).

- EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. European Association For The Study Of The Liver; European Organisation For Research And Treatment Of Cancer. *J Hepatol.* 2012 Apr;56(4):908-43.
- ElSaadany S, Tepper M, Mao Y, Semenciw R, Giulivi A. An epidemiologic study of hepatocellular carcinoma in Canada. *Can J Public Heal.* 2002;93:443–6.
- El-Serag HB. Hepatocellular Carcinoma and Hepatitis C in the United States. *Hepatology.* 2002;36:S74–83.
- El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2004;126:460–8.
- El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2011;365:1118–27.
- El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2012;142:1264–73.
- El Sewedy T, Fornaro M, Alberti S. Cloning of the murine TROP2 gene: conservation of a PIP2-binding sequence in the cytoplasmic domain of TROP-2. *Int J Cancer.* 1998 Jan 19;75(2):324-30.
- El-Zayadi AR. Heavy smoking and liver. *World J Gastroenterol* 2006; 12(38): 6098-6101.
- Ema H, Douagi I, Cumano A, Kourilsky P. Development of T cell precursor activity in the murine fetal liver. *Eur J Immunol* 1998;28:1563-1569.
- Ema H, Nakauchi H. Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. *Blood* 2000; 95:2284-2288.
- Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 550–562.
- Erpenbeck L, Schön MP. Deadly allies: the fatal interplay between platelets and metastasizing cancer cells. *Blood.* 2010 Apr 29;115(17):3427-36.
- Ewing J: Lymphoepithelioma. *Am J Pathol* 1929, 5:99 –108.
- Fabisiewicz A, Grzybowska E. CTC clusters in cancer progression and metastasis. *Med Oncol.* 2017 Jan;34(1):12.
- Faltas B. Cornering metastases: therapeutic targeting of circulating tumor cells and stem cells. *Front Oncol.* 2012 Jul 3;2:68.
- Fan Y, Menon RK, Cohen P, et al. Liver-specific deletion of the growth hormone receptor reveals essential role of growth hormone signaling in hepatic lipid metabolism. *J Biol Chem.* 2009;284:19937–19944
- Farace F, Massard C, Vimond N, Drusch F, Jacques N, Billiot F, Laplanche A, Chauchereau A, Lacroix L, Planchard D, Le Moulec S, André F, Fizazi K, Soria JC, Vielh P. A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. *Br J Cancer.* 2011 Sep 6;105(6):847-53.

- Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 674–87.
- Faris RA, Konkin T, Halpert G. Liver stem cells: a potential source of hepatocytes for the treatment of human liver disease. *Artif Organs* 2001;25:513-521.
- Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*. 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S35-50.
- Fausto N, Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DA, eds. *The liver: Liver stem cells biology and pathobiology*. 3a ed. New York: Raven Press, Ltd, 1994:1501-1518.
- Fernando J, Malfettone A, Cepeda EB, Vilarrasa-Blasi R, Bertran E, Raimondi G, Fabra À, Alvarez-Barrientos A, Fernández-Salguero P, Fernández-Rodríguez CM, Giannelli G, Sancho P, Fabregat I. A mesenchymal-like phenotype and expression of CD44 predict lack of apoptotic response to sorafenib in liver tumor cells. *Int J Cancer* 2015;136: E161–E172.
- Ferreira MM, Ramani VC, Jeffrey SS. Circulating tumor cell technologies. *Mol Oncol*. 2016 Mar;10(3):374-94.
- Fidler IJ: Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 1978, 38:2651–2660.
- Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited *Nature Reviews Cancer* 3, 453-458 (June 2003) | doi: 10.1038/nrc1098
- Fidler IJ, Poste G. The "seed and soil" hypothesis revisited. *Lancet Oncol*. 2008 Aug; 9(8):808.
- Finkel GC, Tishkoff GH, Malignant cells in a peripheral blood smear: Report of a case. *N. Engl. J. Med.* 262, 187–188 (1960).
- Finkelstein SD, Marsh W, Demetris AJ, Swalsky PA, Sasatomi E, Bonham A, et al. Microdissection-based allelotyping discriminates de novo tumor from intrahepatic spread in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2003;37:871–9.
- Fong D, Moser P, Krammel C, Gostner JM, Margreiter R, Mitterer M, Gastl G, Spizzo G. High expression of TROP2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2008 Oct 21;99(8):1290-5.
- Forner A et al. Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008;47(1):97-104.
- Forner A, Vilana R, Ayuso C, Bianchi L, Sole M, Ayuso JR, et al. Diagnosis of hepatic nodules 20mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008;47(1):97–104.
- Forner A, Ayuso C, Isabel Real M, Sastre J, Robles R, Sangro B, Varela M, de la Mata M, Buti M, Martí-Bonmatí L, Bru C, Tabernero J, Llovet JM, Bruix J. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *bMed Clin (Barc)*. 2009 Feb 28;132(7):272-87.

- Forner, A., Reig, M. E., de Lope, C. R. & Bruix, J. Current strategy for staging and treatment: the BCLC update and future prospects. *Semin. Liver Dis.* 30, 61–74 (2010).
- Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 2012 Mar 31;379(9822):1245-55.
- Forner A, Reig M, Varela M, Burrel M, Feliu J, Briceño J, Sastre J, Mart-Bonmati L, Llovet JM, Bilbao JI, Sangro B, Pardo F, Ayuso C, Bru C, Tabernero J, Bruix J Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Update consensus document from the AEEH, SEOM, SERAM, SERVEI and SETH. *Med Clin (Barc).* 2016 -
- Foster JH, Berman MM. The malignant transformation of liver cell adenomas. *Arch Surg.* 1994b; 129:712–7.
- Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest* 2010;120:41–50.
- Franken B, de Groot MR, Mastboom WJB, Vermes I, van der Palen J, Tibbe AGJ, Terstappen LWMM, 2012. Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer. *Breast Cancer Res* 14, R133.
- Freeman RB, Edwards EB, Harper AM. Waiting list removal rates among patients with chronic and malignant liver diseases. *Am J Transplant* 2006; 6(6):1416-21.
- French AD, Fiori JL, Camilli TC, Leotlela PD, O'Connell MP, Frank BP, Subaran S, Indig FE, Taub DD, Weeraratna AT. PKC and PKA phosphorylation affect the subcellular localization of claudin-1 in melanoma cells. *Int J Med Sci.* 2009;6(2):93-101. Epub 2009 Mar 12.
- Friedl P, Locker J, Sahai E, Segall JE. Classifying collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol.* 2012 Aug; 14(8):777-83.
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* 2000;275:2247-50.
- Friedman SL, Bansal MB. Reversal of hepatic fibrosis—fact or fantasy? *Hepatology.* 2006;43(2)Suppl1:S82-8.
- Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology.* 2008;134:1655-69.
- Friemel J, Rechsteiner M, Frick L, Böhm F, Struckmann K, Egger M, Moc H1, HeikenwalderM, Weber A. Intratumor Heterogeneity in Hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res*; 21 (8), April, 2015.
- Friemel J, Frick L, Weber A. Intratumor heterogeneity in HCC. *AGING*, June 2015, Vol. 7, No 6.
- Fujimoto A, Totoki Y, Abe T, Boroevich KA, Hosoda F, Nguyen HH, Aoki M, Hosono N, Kubo M, Miya F. Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat Genet.* 2012;44:760-764.

Fujita K, Iwama H, Miyoshi H, Tani J, Oura K, Tadokoro T, Sakamoto T, Nomura T, Morishita A, Yoneyama H, Masaki T. Diabetes mellitus and metformin in hepatocellular carcinoma.

World J Gastroenterol. 2016 Jul 21; 22(27):6100-13.

Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Caron AW, Rits S, Shifrin VI, Sherman MY. J Biol Chem. 1997 Jul 18;272(29):18033-7. Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance.

Gaemers IC, Vos HL, Volders HH, van der Valk SW, Hilkens JA. STAT-responsive element in the promoter of the episialin/MUC1 gene is involved in its overexpression in carcinoma cells. J Biol Chem 2001; 276: 6191–6199

Gaggioli C. Collective invasion of carcinoma cells: when the fibroblasts take the lead. Cell Adh Migr. 2008 Jan-Mar;2(1):45-7. Epub 2008 Jan 6.

Galletti G, Sung MS, Vahdat, LT, Shah MA, Santana SM, Altavilla G, Kirby BJ, Giannakakou P, 2014. Isolation of breast cancer and gastric cancer circulating tumor cells by use of an anti HER2-based microfluidic device. Lab.

García MA, Carrasco E, Ramírez A, Jiménez G, López-Ruiz E, Perán M, Picón M, Campos J, Boulaiz H, Marchal JA (2012). Apoptosis as a Therapeutic Target in Cancer and Cancer Stem Cells: Novel Strategies and Futures Perspectives, Apoptosis and Medicine, Dr. Tobias Ntuli (Ed.), InTech.

García Buey L, González Mateo F, Moreno-Otero R. Cirrosis hepática. Medicine. 2012;11(11):625-33.

García-Tsao G, Friedman S, Iredale J, Pinzani M. Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis. Hepatology. 2010;51:1445-9.

Garg SK, Maurer H, Reed K, Selagamsetty R. Diabetes and cancer: two diseases with obesity as a common risk factor. Diabetes Obes Metab 2014; 16: 97-110.

Gasch C, Bauernhofer T, Pichler M, Langer-Freitag S, Reeh M, Seifert AM, Mauermann O, Izbicki JR, Pantel K, Riethdorf S. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor status and mutations of KRAS/PIK3CA in circulating tumor cells of patients with colorectal cancer. Clin Chem. 2013 Jan;59(1):252-60.

Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. Nat Rev Cancer. 2011;11:123–134.

Geng Y, Savage SM, Razani-Boroujerdi S, Sopori ML. Effects of nicotine on the immune response. II. Chronic nicotine treatment induces T cell anergy. J Immunol 1996; 156: 2384-2390.

Germani G, Pleguezuelo M, Gurusamy K, Meyer T, Isgro G, Burroughs AK. Clinical outcomes of radiofrequency ablation, percutaneous alcohol and acetic acid injection for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. J Hepatol 2010; 52: 380–8).

Giannelli G, Villa E, Lahn M. Transforming growth factor- β as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. Cancer Res. 2014 Apr 1;74(7):1890-4.

- Giannelli G1, Koudelkova P2, Dituri F3, Mikulits W4. Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2016 May 17. pii: S0168-8278(16)30193-3.
- Gires O. (2012). EpCAM in hepatocytes and their progenitors. *J. Hepatol.* 56, 490-492.
- Gires O, Stoecklein NH. Dynamic EpCAM expression on circulating and disseminating tumor cells: causes and consequences. *Cell Mol Life Sci.* 2014 Nov;71(22):4393-402.
- Glaser S, Gaudio E, Rao A, Pierce LM, Onori P, Franchitto A, Francis HL, Dostal DE, Venter JK, DeMorrow S and others. Morphological and functional heterogeneity of the mouse intrahepatic biliary epithelium. *Lab Invest.* 2009;89(4):456-69.
- Gold B, Cankovic M, Furtado LV, Meier F, Gocke CDD. Do circulating tumor cells, exosomes, and circulating tumor nucleic acids have clinical utility? A report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn.* 2015 May;17(3):209-24..
- Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB, Waked I, Taylor-Robinson SD. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors, and pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2008;14:4300-4308.
- Gomes da Silveira V. Ribeiro Filho J, *Anatomía y Fisiología Hepática*, 2013.
- Gong Y, Chippada-Venkata UD, Oh WK. Roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in prostate cancer progression. *Cancers (Basel).* 2014 Jun 27;6(3):1298-327.
- Gorges, T.M. et al. (2012) Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer* 12, 178.
- Gorges TM, Stein A, Quidde J, Hauch S, Röck K, Riethdorf S, Joosse SA, Pantel K. Improved Detection of Circulating Tumor Cells in Metastatic Colorectal Cancer by the Combination of the CellSearch® System and the AdnaTest®. *PLoS One.* 2016 May 16;11(5):e0155126.
- Gossett DR, Tse HTK, Lee SA, Ying Y, Lindgren AG, Yang OO, Rao J, Clark AT, Di Carlo D, 2012. Hydrodynamic stretching of single cells for large population mechanical phenotyping. *PNAS.*
- Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M. hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ.* 2004 Apr;11(4):390-402.
- Grando SA. Connections of nicotine to cancer. *Nat Rev Cancer* 2014 ; 14:419–29.
- Grompe M, Finegold M. Liver stem cells. En: Marshak D, Gardner R, Gottlieb D, eds. *Stem cell biology.* Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001:550.
- Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad IB, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Letexier M, Degos F. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2012;44:694-698.
- Győrffy B, Hatzis C, Sanft T, Hofstätter E, Aktas B, Pusztai L. Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast Cancer Res.* 2015 Jan 27;17:11. doi: 10.1186/s13058-015-0514-2.

Hamabe A, Uto H, Imamura Y, et al. Impact of cigarette smoking on onset of nonalcoholic fatty liver disease over a 10-year period. *J Gastroenterol* 2011; 46:769–78.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100:57–70. [PubMed: 10647931].

Hammoud GM, Ibdah JA. Are we getting closer to understanding intratumor heterogeneity in hepatocellular carcinoma? *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2016 Apr;5(2):188-90

Han Y, Glaser S, Meng F, Francis H, Marzioni M, McDaniel K, Alvaro D, Venter J, Carpino G, Onori P and others. Recent advances in the morphological and functional heterogeneity of the biliary epithelium. *Exp Biol Med*. (Maywood) 2013; 238(5):549-65.

Harouaka R, Nisic M, Zheng SY. Circulating tumor cell enrichment based on physical properties. *J Lab Autom*. 2013 Dec;18(6):455-68.

Harouaka R, Kang Z, Zheng SY, Cao L. Circulating tumor cells: advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications. *Pharmacol Ther*. 2014 Feb;141(2):209-21.

Harrington, L. Does the reservoir for self-renewal stem from the ends? *Oncogene* 23, 7283-7289 (2004).

Hartwell, H. J., Petrosky, K. Y., Fox, J. G., Horseman, N. D. & Rogers, A. B. Prolactin prevents hepatocellular carcinoma by restricting innate immune activation of c-Myc in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 111, 11455–11460 (2014).

Hasegawa K, Kokudo N, Makuuchi M, Izumi N, Ichida T, Kudo M, et al. Comparison of resection and ablation for hepatocellular carcinoma: A cohort study based on a Japanese nationwide survey. *J Hepatol*. 2013;58:724–9.

Hay ED. 1995. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 154:8–20.

He XC, Yin T, Grindley JC, Tian Q, Sato T, Tao WA, Dirisina R, Westpfahl KSP, Hembree M, Johnson T, Wiedemann LM, Barrett TA, Hood L, Wu H, Li L: PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nat Genet* 2007, 39:189–198.

Hegerfeldt, Y., Tusch, M., Brocker, E. B. & Friedl, P. Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res*. 62, 2125–2130 (2002).

Helen A, Vijayammal PL. Vitamin C supplementation on hepatic oxidative stress induced by cigarette smoke. *J Appl Toxicol* 1997; 17: 289-295.

Hemler ME, Tetraspanin functions and associated microdomains, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 6 (2005) 801–811.

Heneghan MA, Yeoman AD, Verma S, Smith AD, Longhi MS. Autoimmune hepatitis. *Lancet* 2013; 382(9902): 1433–1444.

Herlyn M, Steplewski Z, Herlyn D, et al. Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:1438–42.

Herrero JI. Criterios de trasplante hepático en el hepatocarcinoma, ¿pueden ampliarse? Trasplante hepático y tumores. GH CONTINUADA. mayo-junio 2011. Vol. 10 Nº 3.

Hoepfener AE, Swennenhuis JF, Terstappen LW. Immunomagnetic separation technologies. *Recent Results Cancer Res.* 2012; 195:43-58.

Hofman V, Ilie M, Long E, et al. (2014) Detection of circulating tumor cells from lung cancer patients in the era of targeted therapy: promises, drawbacks and pitfalls. *Curr Mol Med* 14:440–456.

Hofman P, Popper HH. Pathologists and liquid biopsies: to be or not to be? *Virchows Arch.* 2016 Aug 23. (2016).

Hong B, Zu Y (2013) Detecting circulating tumor cells: Current challenges and new trends. *Theranostics* 3(6):377–394.

Hoppler S, Kavanagh CL. Wnt signalling: variety at the core. *J Cell Sci* 2007; 120: 385–393

Horn TM, Bitler BG, Broka DM, Louderbough JM, Schroeder JA. MUC1 drives c-Met-dependent migration and scattering. *Mol Cancer Res.* 2012 Dec;10(12):1544-54.

Hosseini H, Obradović MM, Hoffmann M, Harper KL, Sosa MS, Werner-Klein M, Nanduri LK, Werno C, Ehrl C, Maneck M, Patwary N, Haunschild G, Gužvić M, Reimelt C, Grauvogl M, Eichner N, Weber F, Hartkopf AD, Taran FA, Brucker SY, Fehm T, Rack B, Spang R, Meister G, Aguirre-Ghiso JA, Klein CA. Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. *Nature.* 2016 Dec 14.

Hosui A, Kimura A, Yamaji D, Zhu BM, Na R, Hennighausen L. Loss of STAT5 causes liver fibrosis and cancer development through increased TGF- β and STAT3 activation. *J Exp Med.* 2009 Apr 13;206(4):819-31.

Hou JM, Krebs M, Ward T, Sloane R, Priest L, Hughes A, Clack G, Ranson M, Blackhall F, Dive C.

Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. *Am J Pathol.* 2011 Mar;178(3):989-96.

Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, Sloane R, Backen A, Swain RK, Priest LJC, Greystoke A, Zhou C, Morris K, Ward T, Blackhall FH, Dive C. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 30, 525–532 (2012).

Hsieh HB, Marrinucci D, Bethel K, et al. High-speed detection of circulating tumor cells. *Biosens Bioelectron* 2006; 21:1893–9.

Hsu YT, Osmulski P, Wang Y, Huang YW, Liu L, Ruan J, Jin VX, Kirma NB, Gaczynska ME, Huang TH. EpCAM-Regulated Transcription Exerts Influences on Nanomechanical Properties of Endometrial Cancer Cells That Promote Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cancer Res.* 2016 Nov 1;76(21):6171-6182.

Huang L, Chen D, Liu D, Yin L, Kharbanda S, Kufe D. MUC1 oncoprotein blocks GSK3 β -mediated phosphorylation and degradation of b-catenin. *Cancer Res* 2005; 65: 10413–10422.

- Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, Thompson EW. Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol.* 2007 Nov; 213(2):374-83.
- Huo LF, Tang JW, Huang JJ, Huang PT, Huang CF, Kung HF, Lin MC. Cancer immunotherapy targeting the telomerase reverse transcriptase. *Cell Mol Immunol.* 2006;3:1-11.
- Husain K, Scott BR, Reddy SK, Somani SM. Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. *Alcohol* 2001; 25: 89-97.
- Hwang GY, Lin CY, Huang LH, Wang YH, Wang JC, Hsu CT, et al. Detection of the hepatitis B virus X protein (HBx) antigen and anti-HBx antibodies in cases of human hepatocellular carcinoma. *J Clin Microbiol.* 2003;41:5598-603.
- Iakovlev VV, Goswami RS, Vecchiarelli J, Arneson NC, Done SJ. Quantitative detection of circulating epithelial cells by Q-RT-PCR. *Breast Cancer Res. Treat.* 2008, 107, 145-154.
- Ichikawa T, Yamamoto T, Uenishi T, Tanaka H, Takemura S, Ogawa M, Tanaka S, Suehiro S, Hirohashi K, Kubo S: Clinicopathological implications of immunohistochemically demonstrated mucin core protein expression in hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2006, 13:245-251.
- Ignatiadis M, Xenidis N, Perraki M, Apostolaki S, Politaki E, Kafousi M, Stathopoulos EN, Stathopoulos A, Lianidou E, Chlouverakis G, Sotiriou C, Georgoulas V, Mavroudis D. Different prognostic value of cytokeratin-19 mRNA positive circulating tumor cells according to estrogen receptor and HER2 status in early-stage breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2007, 25, 5194-5202
- Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia, M, Perraki M, Apostolaki S, Kafousi M, Chlouverakis G, Stathopoulos E, Lianidou E, Georgoulas V, Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2008, 14, 2593-2600
- Ignatiadis M, Sotiriou C, Pantel K. Minimal residual disease and circulating tumor cells in breast cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2012;195:3-9.
- Ikari A, Watanabe R, Sato T, Taga S, Shimobaba S, Yamaguchi M, Yamazaki Y, Endo S, Matsunaga T, Sugatani J. Nuclear distribution of claudin-2 increases cell proliferation in human lung adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Sep;1843(9):2079-88.
- Ilie M, Hofman V, Long E, et al. (2014) Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized medicine? *Ann Transl Med* 2:107.
- Imrich S, Hachmeister M, Gires O. EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adh Migr.* 2012 Jan-Feb;6(1):30-8.
- Ioannou GN, Bryson CL, Weiss NS, Miller R, Scott JD, Boyko EJ. The prevalence of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in patients with human immunodeficiency virus infection. *Hepatology.* 2013;57:249-57
- Ishizawa T et al. Neither multiple tumors nor portal hypertension are surgical contraindications for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008;134(7):1908-16.

Ilina O, Friedl P, Mechanisms of collective cell migration at a glance, 2009. *Journal of Cell Science* 122, 3203-3208.

Jacob K, Sollier C, Jabado N. Circulating tumor cells: detection, molecular profiling and future prospects. *Expert Rev Proteomics* 2007; 4:741–56.

Jakobsen KR, Demuth C, Sorensen BS, Nielsen AL. The role of epithelial to mesenchymal transition in resistance to epidermal growth factor receptortyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2016 Apr;5(2):172-82.

Jansen-Durr P, Meichle A, Steiner P, Pagano M, Finke K, Botz J et al. Differential modulation of cyclin gene expression by MYC. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3685–3689.

Jayachandran A, Dhungel B, Steel JC. Epithelial-to-mesenchymal plasticity of cancer stem cells: therapeutic targets in hepatocellular carcinoma. *J Hematol Oncol.* 2016 Aug 30;9(1):74.

Jochheim-Richter A, Rudrich U, Koczan D, Hillemann T, Tewes S, Petry M, Kispert A, Sharma AD, Attaran F, Manns MP, Ott M. Gene expression analysis identifies novel genes participating in early murine liver development and adult liver regeneration. *Differentiation* 2006;74:167173.

Johannessen M, Møller S, Hansen T, Moens U, Van Ghelue M. The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein FHL2. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Feb;63(3):268-84.

Jonas S et al. Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Hepatology* 2001;33(5):1080-6.

Joo M, Chi JG, Lee H. Expressions of HSP70 and HSP27 in hepatocellular carcinoma. *J Korean Med Sci.* 2005 Oct;20(5):829-34.

Joshi S, Kumar S, Choudhury A, Ponnusamy MP, Batra SK. Altered Mucins (MUC) trafficking in benign and malignant conditions. *Oncotarget.* 2014; 5: 7272-7284.

Julian J, Dharmaraj N, Carson DD. MUC1 is a substrate for gamma-secretase. *J Cell Biochem.* 2009 Nov 1;108(4):802-15.

Kaiser k, Medicine. Cancer's circulation problem, *Science* 327 (2010) 1072– 1074.

Kalluri, R. & Weinberg, R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119, 1420-1428 (2009).

Kamal SM. Acute hepatitis C: A systematic review. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:1283–97.

Kan Z, Zheng H, Liu X, Li S, Barber TD, Gong Z, Gao H, Hao K, Willard MD, Xu J. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in hepatocellular carcinoma. *Genome Res.* 2013;23:1422-1433.

Kanno N, LeSage G, Glaser S, Alvaro D, Alpini G. Functional heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *Hepatology* 2000;31(3):555-61.

Kaposi-Novak P, Lee JS, Gómez-Quiroz L, Coulouarn C, Factor VM, Thorgeirsson SS: Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *J Clin Invest* 2006, 116:1582–1595.

- Kato K, Uchino R, Lillehoj EP, Knox K, Lin Y, Kim KC. Membrane-Tethered MUC1 Mucin Counter-Regulates the Phagocytic Activity of Macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016 Apr;54(4):515-23.
- Kawai-Kitahata F, Asahina Y, Tanaka S, Kakinuma S, Murakawa M, Nitta S, Watanabe T, Otani S, Taniguchi M, Goto F. Comprehensive analyses of mutations and hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma with clinicopathological features. *J Gastroenterol*. 2016;51:473-486.
- Kerrigan JR & Rogol AD. The impact of gonadal steroid hormone action on growth hormone secretion during childhood and adolescence. *Endocr. Rev.* 13, 281–298 (1992).
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010 Apr 2;141(1):52-67. Review.
- Khalili K, Kim TK, Jang HJ, Haider MA, Khan L, Guindi M, Sherman M.. Optimization of imaging diagnosis of 1-2 cm hepatocellular carcinoma: an analysis of diagnostic performance and resource utilization. *J Hepatol* 2011;54(4):723-8.
- Khan SA, Taylor-Robinson SD, Toledano MB, Beck A, Elliott P, Thomas HC. Changing international trends in mortality rates for liver, biliary and pancreatic tumours. *J Hepatol*. 2002;37:806–13.
- Khodarev N, Ahmad R, Rajabi H, Pitroda S, Kufe T, McClary C et al. Cooperativity of the MUC1 oncoprotein and STAT1 pathway in poor prognosis human breast cancer. *Oncogene* 2010; 29: 920–929.
- Kido T, Lo RC, Li Y, Lee J, Tabatabai ZL, Ng IO, Lau YF. The potential contributions of a Y-located protooncogene and ts X homologue in sexualdimorphisms in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol*. 2014 Sep;45(9):1847-58. doi: 10.1016/j.humpath.2014.05.002. Epub 2014 May 23.
- Kido T, Lau YF. Roles of the Y chromosome genes in human cancers. *Asian J Androl*. 2015 May-Jun; 17(3): 373–380.
- Kim DY. Differentiation processes of oval cells into hepatocytes: proposals based on morphological and phenotypical traits in carcinogen-treated hamster liver. *J Comp Pathol* 2004; 131:1-9.
- Kim H, Choi GH, Na DC, Ahn EY, Kim GI, Lee JE, et al. Human hepatocellular carcinomas with “Stemness”-related marker expression: keratin 19 expression and a poor prognosis. *Hepatology* 2011;54:1707–1717.
- Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH, Norton L, Massagué J. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell*. 2009 Dec 24;139(7):1315-26.
- Kinlough CL, Poland PA, Bruns JB, Harkleroad KL, Hughey RP. MUC1 membrane trafficking is modulated by multiple interactions. *J Biol Chem* 2004; 279: 53071–53077.
- Klein C.E., Cordon-Cardo C., Soehnchen R., Cote R.J., Oettgen H.F., Eisinger M. and Old L.J. (1987). Changes in cell surface glycoprotein expression during differentiation of human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 89, 500-506.

- Koike K. Hepatitis C virus contributes to hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathways. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22:S108–11.
- Kojiro M, Roskams T. Early hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. *Semin Liver Dis*. 2005;25(2):133-42.
- Kojiro M, Wanless IR, Alves V, Badve S, Balabaud C, Bedossa P, Bhathal P, Bioulac-Sage P, Brunt EM, Burt AD, Craig JR, Dhillon A, Ferrell L, Geller SA, Goodman ZD, Gouw AS, Guido M, Guindi M, Hytiroglou P, Kage M, Kondo F, Kudo M, Lauwers GY, Nakano M, Paradis V, Park YN, Quaglia A, Roncalli M, Roskams T, Ruebner B, Sakamoto M, Saxena R, Theise ND, Thung S, Tiniakos D. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology*. 2009 Feb;49(2):658-64.
- Koprowski H., Steplewski Z., Mitchell K., Herlyn M., Herlyn D. and Fuhrer P. (1979). Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet*. 5, 957-971.
- Krebs MG, et al. (2014) Molecular analysis of circulating tumour cells—biology and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 11(3):129–144
- Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* 2014; 14:275-91.
- Krivacic RT, Ladanyi A, Curry DN, et al. A rare-cell detector for cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:10501–4.
- Kuhn S, Koch M, Nübel T, Ladwein M, Antolovic D, Klingbeil P, Hildebrand D, Moldenhauer G, Langbein L, Franke WW, Weitz J, Zöllner M. A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. *Mol Cancer Res*. 2007 Jun; 5(6):553-67.
- Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9: 874–885
- Kufe D. Oncogenic function of the MUC1 receptor subunit in gene regulation. *Oncogene*. 2010 Oct 21;29(42):5663-6.
- Kufe DW. MUC1-C oncoprotein as a target in breast cancer: activation of signalling pathways and therapeutic approaches. *Oncogene*. 2013 Feb 28;32(9):1073-81.
- Kulik LM et al. Safety and efficacy of 90Y radiotherapy for hepatocellular carcinoma with and without portal vein thrombosis. *Hepatology* 2008; 47(1):71-81.
- Labalette C, Nouet Y, Sobczak-Thépot J, Armengol C, Levillayer F, Gendron MC et al. The LIM-only protein FHL2 regulates cyclin D1 expression and cell proliferation. *J Biol Chem* 2008; 283: 15201–15208.
- Labelle, M., Begum, S. & Hynes, R. O. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell* 20, 576–590 (2011).
- Lacoste B, Raymond VA, Cassim S, Lapierre P, Bilodeau M. Highly tumorigenic hepatocellular carcinoma cell line with cancer stem cell-like properties. *PLoS One*. 2017 Feb 2;12(2): e0171215.

- LaGamba, D., Nawshad, A. & Hay, E.D. Microarray analysis of gene expression during epithelial-mesenchymal transformation. *Dev Dyn* 234, 132-142 (2005).
- Lai AZ, Abella JV, Park M: Crosstalk in Met receptor oncogenesis. *Trends Cell Biol* 2009, 19:542–551.
- Lammer J et al. Prospective Randomized Study of Doxorubicin-Eluting-Bead Embolization in the Treatment of Hepatocellular Carcinoma: Results of the PRECISION V Study. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2009.
- Leng Y, Cao C, Ren J, Huang L, Chen D, Ito M et al. Nuclear import of the MUC1-C oncoprotein is mediated by nucleoporin Nup62. *J Biol Chem* 2007; 282: 19321–19330.
- Lara O, Tong X, Zborowski M., Chalmers JJ, 2004. Enrichment of rare cancer cells through depletion of normal cells using density and flow-through, immunomagnetic cell separation. *Exp. Hematol.* 32, 891e904.
- Lazaridis KN, LaRRusso NF. The cholangiopathies. *Mayo Clin Proc* 2015;90:791-800
- Le Gal K, Ibrahim MX, Wiel C, Sayin VI, Akula MK, Karlsson C, Dalin MG, Akyürek LM, Lindahl P, Nilsson J, Bergo MO. . Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. *Sci. Transl. Med.* 7, 308re8 (2015).
- Le Naour F, André M, Boucheix C, Rubinstein E, Membrane microdomains and proteomics: lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts, *Proteomics* 6 (2006) 6447–6454.
- Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011;25:195-206.
- Lefton HB, Rosa A, Cohen M. Diagnosis and epidemiology of cirrhosis. *Med Clin North Am.* 2009; 93:787-99
- Lencioni R, Cioni D, Crocetti L, Franchini C, Pina CD, Lera J, Bartolozzi C. Early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: long-term results of percutaneous image-guided radiofrequency ablation. *Radiology* 2005; 234(3):961-7.
- Lemaigre F, Zaret KS. Liver development update: new embryo models, cell lineage control, and morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2004;14:582-590.
- Lemire JM, Shiojiri N, Fausto N, Yoon BI, Choi YK. Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. *Am J Pathol* 1991;139:535-552. 29.
- Lemon SM, McGivern DR. Is hepatitis C virus carcinogenic? *Gastroenterology.* 2012 May;142(6):1274-8.
- Levitin F, Stern O, Weiss M, Gil-Henn C, Ziv R, Prokocimer Z et al. The MUC1 SEA module is a self-cleaving domain. *J Biol Chem* 2005; 280: 33374–33386.
- Li J, Yu Y, Wang J, Yan Z, Liu H, Wang Y, Ding M, Cui L, Wu M, Jiang X, Qian Q. Establishment of a novel system for the culture and expansion of hepatic stem-like cancer cells. *Cancer Lett.* 2015; 360:177–86.

- Li L, Wang H. Heterogeneity of liver cancer and personalized therapy. *Cancer Lett* 2015.
- Li Z, White P, Tuteja G, Rubins N, Sackett S, Kaestner KH. Foxa1 and Foxa2 regulate bile duct development in mice. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1537-45.
- Li Z, Tuteja G, Schug J, & Kaestner K. H. Foxa1 and Foxa2 are essential for sexual dimorphism in liver cancer. *Cell* 148, 72–83 (2012)
- Li Y, Kuwahara H, Ren J, Wen G, Kufe D. The c-Src tyrosine kinase regulates signaling of the human DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen with GSK3b and b-catenin. *J Biol Chem* 2001; 276: 6061–6064.
- Li Y, Ren J, Yu W, Li G, Kuwahara H, Yin L et al. The EGF receptor regulates interaction of the human DF3/MUC1 carcinoma antigen with c-Src and b-catenin. *J Biol Chem* 2001; 276: 35239–35242.
- Li Y, Yi H, Yao Y, Liao X, Xie Y, Yang J et al. The cytoplasmic domain of MUC1 induces hyperplasia in the mammary gland and correlates with nuclear accumulation of beta-catenin. *PLoS One* 2011; 6: e19102.
- Lin DC, Mayakonda A, Dinh HQ, Huang P, Lin L, Liu X, Ding LW, Wang J, Berman B, Song E, Yin D, Koeffler HP. Genomic and epigenomic heterogeneity of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2017 Feb 20. pii: canres.2822.2016.
- Linnenbach AJ, Wojciorowski J, Wu S, Pyrc J, Ross AH, Dietzschold B, Speicher D, Koprowski H, Sequence investigation of the major gastrointestinal tumor-associated antigen gene family, GA733, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 (1989) 27–31.
- Linnenbach AJ, Seng BA, Wu S, Robbins S, Scollon M, Pyrc JJ, Druck T, Huebner K. Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes. *Mol Cell Biol*. 1993 Mar;13(3):1507-15.
- Lintz M, Muñoz A, Reinhart-King CA. The Mechanics of Single Cell and Collective Migration of Tumor Cells. *J Biomech Eng*. 2016 Nov 4.
- Lipinski M, Parks DR, Rouse RV, Herzenberg LA. Human trophoblast cell-surface antigens defined by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Aug;78(8):5147-50.
- Litvinov SV, van Driel W, van Rhijn CM, Bakker HA, van Krieken H, Fleuren GJ et al. Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation. *Am J Pathol* 1996; 148: 865–875.
- Liu L, Bailey SM, Okuka M, Muñoz P, Li C, Zhou L, Wu C, Czerwiec E, Sandler L, Seyfang A, Blasco MA, Keefe DL. Telomere lengthening early in development. *Nat Cell Biol* 9, 1436- 1441 (2007).
- Liu M, Zhu H, Yang S, Wang Z, Bai J, Xu N. c-Myc suppressed E-cadherin through miR-9 at the post-transcriptional level, *Cell Biol Int* 37. 2013 Jan 197–202.
- Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8: 627–644.
- Liu T, Liu Y, Bao X, Tian J, Liu Y, Yang X. Overexpression of TROP2 predicts poor prognosis of patients with cervical cancer and promotes the proliferation and invasion of cervical cancer

- cells by regulating ERK signaling pathway. *PLoS One*. 2013 Sep 27;8(9):e75864. doi: 10.1371/journal.pone.0075864. eCollection 2013.
- Llovet JM, Fuster J, Bruix J. Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. *Hepatology* 1999;30(6):1434-40.
- Llovet JM, Real MI, Montaña X, Planas R, Coll S, Aponte J, Ayuso C, Sala M, Muchart J, Solà R, Rodés J, Bruix J; Barcelona Liver Cancer Group. Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002 May 18;359(9319):1734-9.
- Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology* 2003;37(2):429-42.
- Llovet JM, Bruix J. Molecular Targeted Therapies in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*. 2008 October ; 48(4): 1312–1327.
- Llovet JM et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359(4): 378-90.
- Lok AS, Sterling RK, Everhart JE, Wright EC, Hoefs JC, Di Bisceglie AM, Morgan TR, Kim HY, Lee WM, Bonkovsky HL, Dienstag JL; HALT-C Trial Group. Des-gamma-carboxy prothrombin and alpha-fetoprotein as biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2010 Feb;138(2):493-502.
- Lorenti AS. Hepatic stem cells. *Medicina (B. Aires)* 2001; 61:614-620.
- Lu LC, Hsu CH, Hsu C, Cheng AL. Tumor Heterogeneity in Hepatocellular Carcinoma: Facing the Challenges. *Liver Cancer*. 2016 Apr;5(2):128-38.
- Lu TY, Lu RM, Liao MY, Yu J, Chung CH, Kao CF, Wu HC. Epithelial cell adhesion molecule regulation is associated with the maintenance of the undifferentiated phenotype of human embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 2010 Mar 19;285(12):8719-32.
- Maaser K, Borlak J. A genome-wide expression analysis identifies a network of EpCAM-induced cell cycle regulators. *Br J Cancer*. 2008 Nov 18;99(10):1635-43.
- Macao B, Johansson DG, Hansson GC, Hard T. Autoproteolysis coupled to protein folding in the SEA domain of the membrane-bound MUC1 mucin. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13: 71–76.
- MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009; 17: 9–26.
- MacDonald DC, Nelson M, Bower M, Powles T. Hepatocellular carcinoma, human immunodeficiency virus and viral hepatitis in the HAART era. *World J Gastroenterol*. 2008; 14:1657–63.
- Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, Kieu C, Papior P, Baeuerle PA, Munz M, Gires O. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol*. 2009 Feb;11(2):162-71.
- Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, Krawitt EL, Mieli-Vergani G, Vergani D, Vierling JM. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010; 51(6): 2193–2213.

- Marelli L et al. Transarterial therapy for hepatocellular carcinoma: which technique is more effective? A systematic review of cohort and randomized studies. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2007; (1):6-25.
- Matic, M. et al. Estrogen signalling and the metabolic syndrome: targeting the hepatic estrogen receptor alpha action. *PLoS ONE* 8, e57458 (2013).
- Morimoto O, Nagano H, Sakon M, Fujiwara Y, Yamada T, Nakagawa H, Miyamoto A, Kondo M, Arai I, Yamamoto T, Ota H, Dono K, Umeshita K, Nakamori S, Sasaki Y, Ishikawa O, Imaoka S, Monden M. Diagnosis of intrahepatic metastasis and multicentric carcinogenesis by microsatellite loss of heterozygosity in patients with multiple and recurrent hepatocellular carcinomas. *J Hepatol.* 2003 Aug;39(2):215-21.
- Marrero JA, Feng Z, Wang Y, Nguyen MH, Befeler AS, Roberts LR, Reddy KR, Harnois D, Llovet JM, Normolle D, Dalhgren J, Chia D, Lok AS, Wagner PD, Srivastava S, Schwartz M. Alpha-fetoprotein, des-gamma-carboxyprothrombin, and lectin-bound alpha-fetoprotein in early hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2009 Jul;137(1):110-8.
- Maser E. Significance of reductases in the detoxification of the tobacco-specific carcinogen NNK. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25:235–7.
- Mason PB Jr, Lis JT. Cooperative and competitive protein interactions at the hsp70 promoter. *J Biol Chem.* 1997 Dec 26;272(52):33227-33.
- Massagué J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature.* 2016 Jan 21; 529(7586):298-306.
- Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A. Liver transplantation for treatment of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *N Engl J Med.* 1996;334:693-9.
- Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R, Bhoori S, Schiavo M, Mariani L, Camerini T, Roayaie S, Schwartz ME, Grazi GL, Adam R, Neuhaus P, Salizzoni M, Bruix J, Forner A, De Carlis L, Cillo U, Burroughs AK, Troisi R, Rossi M, Gerunda GE, Lerut J, Belghiti J, Boin I, Gugenheim J, Rochling F, Van Hoek B, Majno P. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. *Lancet Oncol.* 2009 Jan;10(1):35-43.
- Mazzaferro V, Sposito C, Bhoori S, Romito R, Chiesa C, Morosi C, Maccauro M, Marchianò A, Bongini M, Lanocita R, Civelli E, Bombardieri E, Camerini T, Spreafico C. Yttrium-90 radioembolization for intermediate-advanced hepatocellular carcinoma: a phase 2 study. *Hepatology.* 2013 May;57(5):1826-37.
- Mazzoccoli G, Tarquini R, Valoriani A, Oben J, Vinciguerra M, Marra F. Management strategies for hepatocellular carcinoma: old certainties and new realities. *Clin Exp Med.* 2016 Aug;16(3):243-56.
- Megías M, Molist P, Pombal MA, Atlas de histología vegetal y animal, 2013 <http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>
- Mehlen P, Puisieux A, Metastasis: a question of life or death, *Nat. Rev. Cancer* 6 (2006) 449–458.

- Meloche S, Pouysségur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3227-39. Review.
- Merchante N, Merino E, López-Aldeguer J, Jover F, Delgado-Fernández M, Galindo MJ, et al. Increasing incidence of hepatocellular carcinoma in HIVinfected patients in Spain. *Clin Infect Dis*. 2013;56:143–50.
- Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60-66.
- Migita K, Miyazoe S, Maeda Y, et al. Cytokine gene polymorphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection-association. *Hepatology* 2003;37:64-71.
- Miles KA, Williams RE. Warburg revisited: imaging tumour blood flow and metabolism. *Cancer Imaging* 2008; 8: 81-86 [PMID: 18390391 DOI: 10.1102/1470-7330.2008.0011]
- Minguet S, Cortegano I, Gonzalo P, Martinez-Marin JA, de Andres B, Salas C, Melero D, Gaspar ML, Marcos MA. A population of c-Kit(low)(CD45/TER119)- hepatic cell progenitors of 11-day postcoitus mouse embryo liver reconstitutes cell-depleted liver organoids. *J Clin Invest* 2003;112:1152-1163.
- Mínguez B, Lachenmayer A. Diagnostic and prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *Dis Markers* 2011;31:181-90.
- Mittal S, El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: consider the population. *J Clin Gastroenterol*. 2013 Jul;47 Suppl:S2-6.
- Miyajima A, Tanaka M, Itoh T. Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming. *Cell Stem Cell* 14: 561–574, 2014.
- Mizukoshi E, Nakamoto Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Tsuji H, Kuzushima K, Takiguchi M, Kaneko S. Cytotoxic T cell responses to human telomerase reverse transcriptase in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2006;43:1284–1294. doi: 10.1002/hep.21203
- Mode, A. & Gustafsson, J. A. Sex and the liver — a journey through five decades. *Drug Metab. Rev.* 38, 197–207 (2006).
- Moeini A, Sia D, Bardeesy N, Mazzaferro V, Llovet JM. Molecular Pathogenesis and Targeted Therapies for Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2016 Jan 15;22(2):291-300.
- Mohammed FF, Khokha R: Thinking outside the cell: proteases regulate hepatocyte division. *Trends Cell Biol* 2005, 15:555–563.
- Moldenhauer G., Momburg F., Moller P., Schwartz R. and Hammerling G.J. (1987). Epithelium-specific surface glycoprotein of Mr 34,000 is a widely distributed human carcinoma marker. *Br. J. Cancer* 56, 714-721.
- Molina E, Hernandez A: Clinical manifestations of primary hepatic angiosarcoma. *Dig Dis Sci* 2003, 48:677-682.
- MolnarB, Ladanyi A, Tanko L, Sréter L, Tulassay Z (2001). Circulating tumor cell clusters in the peripheral blood of colorectal cancer patients. *Clin. Cancer Res*. 7, 4080–4085.

- Morano KA. New tricks for an old dog: the evolving world of Hsp70. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Oct;1113:1-14. Epub 2007 May 18.
- Moreira VF, López San Román A. Tumores hepáticos benignos. *Rev Esp Enferm Dig (Madrid)* Vol. 101. N.º 11, pp. 812, 2009
- Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2004; 127 5 Suppl 1:S87–96.
- Mostert B, Sleijfer S, Foekens JA, Gratama JW. Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2009 Aug; 35(5):463-74.
- Moszczyński P, Zabiński Z, Moszczyński P, Rutowski J, Słowiński S, Tabarowski Z. Immunological findings in cigarette smokers. *Toxicol Lett* 2001; 118: 121-127.
- Mühlmann G, Spizzo G, Gostner J, Zitt M, Maier H, Moser P, Gastl G, Zitt M, Müller HM, Margreiter R, Ofner D, Fong D. TROP2 expression as prognostic marker for gastric carcinoma. *J Clin Pathol.* 2009 Feb;62(2):152-8.
- Mueller KM, Kornfeld JW, Friedbichler K, Blaas L, Egger G, Esterbauer H, Hasselblatt P, Schleder M, Haindl S, Wagner KU, Engblom D, Haemmerle G, Kratky D, Sexl V, Kenner L, Kozlov AV, Terracciano L, Zechner R, Schuetz G, Casanova E, Pospisilik JA, Heim MH, Moriggl R. Impairment of hepatic growth hormone and glucocorticoid receptor signaling causes steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* 54, 1398–1409 (2011).
- Munz M, Kieu C, Mack B, Schmitt B, Zeidler R, Gires O. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene.* 2004 Jul 29; 23(34):5748-58.
- Munz M, Baeuerle PA, Gires O. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res.* 2009 Jul 15;69(14):5627-9.
- Munz M, Fellinger K, Hofmann T, Schmitt B, Gires O, Glycosylation is crucial for stability of tumour and cancer stem cell antigen EpCAM, *Front. Biosci.* 13 (2008) 5195–5201.
- Murphy ME. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis.* 2013 Jun;34(6):1181-8.
- Naghavi M. et al., Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015; 385: 117–71.
- Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A, Ryan P, Balis UJ, Tompkins RG, Haber DA, Toner M. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature.* 2007 Dec 20; 450(7173):1235-9.
- Nahon P, Zucman-Rossi J, Single nucleotide polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *J Hepatol* 2012;57:663-647.
- Nakamura T, Sakai K, Nakamura T, Matsumoto K: Hepatocyte growth factor twenty years on: much more than a growth factor. *J Gastroenterol Hepatol* 2011.

- Nakatsuka R, Taniguchi M, Hirata M, Shiota G, Sato K. Transient expression of bone morphogenic protein-2 in acute liver injury by carbon tetrachloride. *J Biochem* 2007;141:113-119.
- Nath S, Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol Med*. 2014; 20: 332–342.
- Naugler, W. E. et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* 317, 121–124 (2007).
- Nault JC, Mallet M, Pilati C, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Laurent C, Laurent A, Cherqui D, Balabaud C, Zucman-Rossi J. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat Commun*. 2013;4:2218.
- Nault JC, Calderaro J, Di Tommaso L, Balabaud C, Zafrani ES, Bioulac-Sage P, Roncalli M, Zucman-Rossi J. Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis. *Hepatology*. 2014;60:1983-1992.
- Naume B, Borgen E, Tossvik S, Pavlak N, Oates D, Nesland JM.. Detection of isolated tumor cells in peripheral blood and in BM: evaluation of a new enrichment method. *Cytotherapy* 2004; 6:244–52.
- Ng VY, Ang SN, Chan JX, Choo AB. Characterization of epithelial cell adhesion molecule as a surface marker on undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2010 Jan;28(1):29-35.
- Nishida N, Goel A. Genetic and epigenetic signatures in human hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Curr Genomics*. 2011 Apr;12(2):130-7.
- Niu ZS, Niu XJ, Wang WH. Genetic alterations in hepatocellular carcinoma: An update. *World J Gastroenterol*. 2016 Nov 7;22(41):9069-9095.
- Njei B. Changing pattern of epidemiology in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2014;60:1107–8.
- Nordenstedt H, White DL, El-Serag HB. The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis*. 2010;42 Suppl 3:S206–14.
- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194:23-8.
- Ntouroupi TG, Ashraf SQ, McGregor SB, Turney BW, Seppo A, Kim Y, Wang X, Kilpatrick MW, Tsipouras P, Tafas T, Bodmer WF. Detection of circulating tumour cells in peripheral blood with an automated scanning fluorescence microscope. *Br J Cancer*. 2008 Sep 2; 99(5):789-95.
- Nübel T, Preobraschenski J, Tuncay H, Weiss T, Kuhn S, Ladwein M, Langbein L, Zöller M, Claudin-7 regulates EpCAM-mediated functions in tumor progression, *Mol. Cancer Res*. 7 (2009) 285–299.

- Ogle LF, Orr JG, Willoughby CE, Hutton C, McPherson S, Plummer R, Boddy AV, Curtin NJ, Jamieson D, Reeves HL. Imagestream detection and characterisation of circulating tumour cells A liquid biopsy for hepatocellular carcinoma? *J Hepatol.* 2016 Aug;65(2):305-13
- Oertel M, Shafritz DA. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1782:61-74.
- Ohmachi T, Tanaka F, Mimori K, Inoue H, Yanaga K, Mori M. Clinical significance of TROP2 expression in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2006 May 15;12(10):3057-63.
- Okabe M, Tsukahara Y, Tanaka M, Suzuki K, Saito S, Kamiya Y, Tsujimura T, Nakamura K, Miyajima A. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver. *Development.* 2009 Jun;136(11):1951-60.
- Omachi T, Kawai Y, Mizuno R, Nomiyama T, Miyagawa S, Ohhashi T, Nakayama J. Immunohistochemical demonstration of proliferating lymphatic vessels in colorectal carcinoma and its clinicopathological significance. *Cancer Lett.* 2007 Feb 8;246(1-2):167-72.
- Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, Mitas M, Salem M, Hannun YA, Cole DJ, Gillanders WE. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res.* 2004 Aug 15;64(16):5818-24.
- Page JM, Harrison SA. NASH and HCC. *Clin Liver Dis* 2009;13: 631-647.
- Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* 1989 Aug; 8(2):98-101.
- Pak MG, Shin DH, Lee CH, Lee MK. Significance of EpCAM and TROP2 expression in non-small cell lung cancer. *World J Surg Oncol.* 2012 Apr 6;10:53.
- Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, Jirousková M, Degen JL. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood.* 2005 Jan 1;105(1):178-85. Epub 2004 Sep 14.
- Pandey P, Kharbanda S, Kufe D. Association of the DF3/MUC1 breast cancer antigen with Grb2 and the Sos/Ras exchange protein. *Cancer Res* 1995; 55: 4000–4003.
- Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells, *Nat. Rev. Cancer* 8 (2008) 329–340.
- Pantel K, Deneve E, Nocca D, Coffy A, Vendrell JP, Maudelonde T, Riethdorf S, Alix-Panabieres C, 2012. Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clin. Chem.* 58, 936e940.
- Pantel K, Alix-Panabières C (2013) Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction? *Cancer Res* 73:6384–6388.
- Pantel K, Alix-Panabières C. Bone marrow as a reservoir for disseminated tumor cells: a special source for liquid biopsy in cancer patients. *Bonekey Rep.* 2014 Nov 19;3:584.
- Papp V, Dezso K, Laszlo V, Nagy P, Paku S. Architectural changes during regenerative and ontogenic liver growth in the rat. *Liver Transpl* 2009;15:177-183.

Paradis V. Histopathology of hepatocellular carcinoma. J.-N. Vauthey and A. Brouquet (eds.), *Multidisciplinary Treatment of Hepatocellular Carcinoma, Recent Results in Cancer Research* 190.

Pardo J, Sola JJ, Panizo A, Clasificación y diagnóstico anatomopatológico de los tumores hepáticos benignos. *Gh continuada* 2009. vol. 8 n.º 1.

Park HS, Lee JS, Huh SH, Seo JS, Choi EJ. Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *EMBO J.* 2001 Feb 1;20(3):446-56.

Park HS, Cho SG, Kim CK, Hwang HS, Noh KT, Kim MS, Huh SH, Kim MJ, Ryoo K, Kim EK, Kang WJ, Lee JS, Seo JS, Ko YG, Kim S, Choi EJ. Heat shock protein hsp72 is a negative regulator of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol.* 2002 Nov;22(22):7721-30.

Parsian AJ, Sheren JE, Tao TY, Goswami PC, Malyapa R, Van Rheeden R, Watson MS, Hunt CR. The human Hsp70B gene at the HSPA7 locus of chromosome 1 is transcribed but non-functional. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Nov 15;1494(1-2):201-5.

Paterlini-Brechot P, Benali NL (2007) Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions. *Cancer Lett* 253(2):180–204.

Patriarca C, Macchi RM, Marschner AK, Mellstedt H, Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review, *Cancer Treat. Rev.* 38 (2012) 68–75.

Pauli C, Münz M, Kieu C, Mack B, Breinl P, Wollenberg B, Lang S, Zeidler R, Gires O. Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas. *Cancer Lett.* 2003 Apr 10;193(1):25-32.

Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol.* 2014 Mar;14(3):181-94.

Peng H, Wisse E, Tian Z. Liver natural killer cells: subsets and roles in liver immunity. *Cell Mol Immunol.* 2016 May;13(3):328-36.

Pessione F, Ramond MJ, Njapoum C, Duchatelle V, Degott C, Erlinger S, Rueff B, Valla DC, Degos F. Cigarette smoking and hepatic lesions in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001; 34: 121-125.

Philip R, Heiler S, Mu W, Büchler MW, Zöller M, Thuma F. Claudin-7 promotes the epithelial-mesenchymal transition in human colorectal cancer. *Oncotarget.* 2015 Feb 10;6(4):2046-63.

Pietrangelo A Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology.* 2010 Aug;139(2):393-408, 408.e1-2).

Piero MN, Nzaro GM, Njagi JM. Diabetes mellitus – a devastating metabolic disorder. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences;* 04 (40); 2014 ,1-7.

Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17: 45–51.

Pore M, Meijer C, de Bock GH, Boersma-van Ek W, Terstappen LW, Groen HJ, Timens W, Kruijt FA, Hiltermann TJ. Cancer Stem Cells, Epithelial to Mesenchymal Markers, and Circulating Tumor Cells in Small Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer.* 2016 Nov;17(6):535-542.

Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: A follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology*. 1990;11:74–80.

Prince MI, James OF. The epidemiology of primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis*. 2003;7:795–819. *AJR Am J Roentgenol*. Quaia E, De Paoli L, Pizzolato R, Angileri R, Pantano E, Degrassi F, Ukmar M, Cova MA. Predictors of dysplastic nodule diagnosis in patients with liver cirrhosis on unenhanced and gadobenate dimeglumine-enhanced MRI with dynamic and hepatobiliary phase. 2013 Mar;200(3):553-62.

Powell AA, Talasz AH, Zhang H, Coram MA, Reddy A, Deng G, Telli ML, Advani RH, Carlson RW, Mollick JA, Sheth S, Kurian AW, Ford JM, Stockdale FE, Quake SR, Pease RF, Mindrinos MN, Bhanot G, Dairkee SH, Davis RW, Jeffrey SS. Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. *PLoS One*. 2012;7(5):e33788.

Psaila, B. & Lyden, D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nature Rev. Cancer* 9, 285–293 (2009).

Pshennikova MG, Zelenina OM, Kruglov SB, Pokidyshev DA, Shimkovich MV, Malysheva IY. Synthesis of HSP70 in blood leukocytes as a marker of stress resistance during adaptation. *Bull Exp Biol Med*. 2007 Dec;144(6):764-7.

Qian Y, Yang L, Cao S. Telomeres and telomerase in T cells of tumor immunity. *Cell Immunol*. 2014;289:63–69.

Qu B, Jia Y, Liu Y, Wang H, Ren G, Wang H. The detection and role of heat shock protein 70 in various nondisease conditions and disease conditions: a literature review. *Cell Stress Chaperones*. 2015 Nov;20(6):885-92.

Quaia E, De Paoli L, Pizzolato R, Angileri R, Pantano E, Degrassi F, Ukmar M, Cova MA. Predictors of dysplastic nodule diagnosis in patients with liver cirrhosis on unenhanced and gadobenate dimeglumine-enhanced MRI with dynamic and hepatobiliary phase. *AJR Am J Roentgenol*. 2013 Mar;200(3):553-62.

Raimondi C, Gradilone A, Naso G, Vincenzi B, Petracca A, Nicolazzo C, Palazzo A, Saltarelli R, Spremberg F, Cortesi E, Gazzaniga P. Epithelial–mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients. *Breast Cancer Research & Treatment*. 2001. 130 (2), 449–455.

Raimondi C, Nicolazzo C, Gradilone A. Circulating tumor cells isolation: the "post-EpCAM era". *Chin J Cancer Res*. 2015 Oct;27(5):461-70. Review.

Raina D, Kharbanda S, Kufe D. The MUC1 oncoprotein activates the anti-apoptotic PI3K/Akt and Bcl-xL pathways in rat 3Y1 fibroblasts. *J Biol Chem* 2004; 279: 20607–20612.

Raina D, Ahmad R, Rajabi H, Panchamoorthy G, Kharbanda S, Kufe D. Targeting cysteine-mediated dimerization of the MUC1-C oncoprotein in human cancer cells. *Int J Oncol*. 2012 May;40(5):1643-9.

Rajabi H, Alam M, Takahashi H, Kharbanda A, Guha M, Ahmad R, Kufe D. MUC1-C oncoprotein activates the ZEB1/miR-200c regulatory loop and epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*. 2014 Mar 27;33(13):1680-9.

- Rajabi H, Kufe D. MUC1-C Oncoprotein Integrates a Program of EMT, Epigenetic Reprogramming and Immune Evasion in Human Carcinomas. *Biochim Biophys Acta*. 2017 Mar 14;1868(1):117-122.
- Ratziu V, Bonyhay L, di Martino V, Charlotte F, Cavallaro L, Sayegh-Tainturier MH, et al. Survival, liver failure, and hepatocellular carcinoma in obesity related cryptogenic cirrhosis. *Hepatology*. 2002; 35:1485–93.
- Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jäättelä M, Penninger JM, Garrido C, Kroemer G. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol*. 2001 Sep;3(9):839-43.
- Regimbeau JM, Colombat M, Mognol P, Durand F, Abdalla E, Degott C, et al. Obesity and diabetes as a risk factor for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl*. 2004; 10 2 Suppl 1:S69–73.
- Reichl P, Haider C, Grubinger M, Mikulits W. TGF- β in epithelial to mesenchymal transition and metastasis of liver carcinoma. *Curr Pharm Des*. 2012;18(27):4135-47.
- Remmerbach, T.W., Wottawah, F., Dietrich, J., Lincoln, B., Wittekind, C., Guck, J., 2009. Oral cancer diagnosis by mechanical phenotyping. *Cancer Res*. 69, 1728e1732.
- Ren J, Agata N, Chen D, Li Y, Yu W-H, Huang L et al. Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anti-cancer agents. *Cancer Cell* 2004; 5: 163–175.
- Ren J, Raina D, Chen W, Li G, Huang L, Kufe D. MUC1 oncoprotein functions in activation of fibroblast growth factor receptor signaling. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 873–883.
- Ribes J, Clèries R, Borràs J, Galceran J, Bosch FX. Time trends in incidence and mortality for chronic liver disease and liver cancer in the interval 1980-1997 in Catalonia, Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004 Sep; 16(9):865-72.
- Riegler JL. Preneoplastic conditions of the liver. *Semin Gastrointest Dis*. 1996 Apr;7(2):74-87
- Riethdorf S, Wikman H, Pantel K: Review: biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *Int J Cancer* 2008, 123:1991–2006.
- Riethdorf S, Wikman H, Pantel K: Review: biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *Int J Cancer* 2008, 123:1991–2006.
- Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA*. 2015 Jun 9;313(22):2263-73.
- Ring AE, Zabaglo L, Ormerod MG, Smith IE, Dowsett M. Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques. *Br J Cancer* 2005; 92:906–12.
- Rojkind M, Greenwel P. The extracellular matrix and the liver. En: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, et al., editores. *The liver: Biology and pathology*. 3th ed New York: Raven Press; 1994. p. 843---68.
- Rudic JS, Poropat G, Krstic MN, et al. Ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;12:CD000551.

- Sahin F, Kannangai R, Adegbola O, Wang J, Su G, Torbenson M. mTOR and P70 S6 kinase expression in primary liver neoplasms. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8421–25.
- Salmon-Ceron D, Rosenthal E, Lewden C, Bouteloup V, May T, Burty C, et al. Emerging role of hepatocellular carcinoma among liver-related causes of deaths in HIV-infected patients: The French national Mortalite 2005 study. *J Hepatol*. 2009;50:736–45.
- Sangiovanni A, Manini MA, Iavarone M, Romeo R, Forzenigo LV, Fraquelli M, Massironi S, Della Corte C, Ronchi G, Rumi MG, Biondetti P, Colombo M. The diagnostic and economic impact of contrast imaging techniques in the diagnosis of small hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Gut*. 2010 May;59(5):638-44.
- Sangro B, Carpanese L, Cianni R, Golfieri R, Gasparini D, Ezziddin S, Paprottka PM, Fiore F, Van Buskirk M, Bilbao JI, Ettore GM, Salvatori R, Giampalma E, Geatti O, Wilhelm K, Hoffmann RT, Izzo F, Iñarrairaegui M, Maini CL, Urigo C, Cappelli A, Vit A, Ahmadzadehfar H, Jakobs TF, Latoria S; European Network on Radioembolization with Yttrium 90 Resin Microspheres (ENRY). Survival after yttrium90 resin microsphere radioembolization of hepatocellular carcinoma across Barcelona clinic liver cancer stages: a European evaluation. *Hepatology*. 2011 Sep 2;54(3):868-78.
- Sankpal NV, Willman MW, Fleming TP, Mayfield JD, Gillanders WE. Transcriptional repression of epithelial cell adhesion molecule contributes to p53 control of breast cancer invasion. *Cancer Res*. 2009 Feb 1;69(3):753-7.
- Sankpal NV, Fleming TP, Sharma PK, Wiedner HJ, Gillanders WE. A double-negative feedback loop between EpCAM and ERK contributes to the regulation of epithelial-mesenchymal transition in cancer. *Oncogene*. 2017 Feb 13.
- Satelli, A., Brownlee, Z., Mitra, A., Meng, Q.H., Li, S., 2014. Circulating tumor cell enumeration with a combination of epithelial cell adhesion molecule- and cell-surface vimentin-based methods for monitoring breast cancer therapeutic response. *Clin. Chem*. 61, 259e266.
- Saucedo-Zeni N1, Mewes S, Niestroj R, Gasiorowski L, Murawa D, Nowaczyk P, Tomasi T, Weber E, Dworacki G, Morgenthaler NG, Jansen H, Propping C, Sterzynska K, Dyszkiewicz Saucedo-Zeni N, Mewes S, Niestroj R, Gasiorowski L, Murawa D, Nowaczyk P, Tomasi T, Weber E, Dworacki G, Morgenthaler NG, Jansen H, Propping C, Sterzynska K, Dyszkiewicz WW, Zabel M, Kiechle M, Reuning U, Schmitt M, Lücke K. A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *Int J Oncol*. 2012 Oct;41(4):1241-50.
- Saxena R, Theise N. Canals of Hering: recent insights and current knowledge. *Semin Liver Dis*. 2004 Feb;24(1):43-8.
- Sequist LV, Nagrath S, Toner M, Haber DA, Lynch TJ. The CTC-chip: an exciting new tool to detect circulating tumor cells in lung cancer patients. *J Thorac Oncol*. 2009 Mar; 4(3):281-3.
- Schaffner F, Popper H. Electron microscopic studies of normal and proliferated bile ductules. *Am J Pathol*. 1961; 38:393-410.
- Schlesinger S, Aleksandrova K, Pischon T, Jenab M, Fedirko V, Trepo E, et al. Diabetes mellitus, insulin treatment, diabetes duration, and risk of biliary tract cancer and hepatocellular carcinoma in a European cohort. *Ann Oncol*. 2013; 24:2449–55.

- Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, Wauthier E, Ludlow J, Yao HL, Moss N, Melhem A, McClelland R, Turner W, Kulik M, Sherwood S, Tallheden T, Cheng N, Furth ME, Reid LM. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med*. 2007 Aug 6;204(8):1973-87. Epub 2007 Jul 30.
- Schmucker DL. Liver function and phase I drug metabolism in the elderly: a paradox. *Drug & Aging*, 18: 837-851, 2001.
- Schnell U, Cirulli V, Giepmans BN. EpCAM: structure and function in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Aug; 1828(8):1989-2001.
- Schon MP, Schon M, Klein CE, Blume U, Bisson S, Orfanos CE. Carcinoma-associated 38-kD membrane glycoprotein MH 99/KS 1/4 is related to proliferation and age of transformed epithelial cell lines. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 987-991.
- Schulze A, Zerfass K, Spitkovsky D, Middendorp S, Berges J, Helin K et al. Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11264-11268.
- Shaker M, Tabbaa A, Albeldawi M, Alkhouri N. Liver transplantation for nonalcoholic fatty liver disease: new challenges and new opportunities. *World J Gastroenterol*. 2014 May 14;20(18):5320-30.
- Shastry S, Toft DO, Joyner MJ. HSP70 and HSP90 expression in leucocytes after exercise in moderately trained humans. *Acta Physiol Scand*. 2002 Jun;175(2):139-46.
- Scholten D, Osterreicher CH, Scholten A, Iwaisako K, Gu G, Brenner DA, Kisseleva T. Genetic labeling does not detect epithelial-to-mesenchymal transition of cholangiocytes in liver fibrosis in mice. *Gastroenterology*. 2010 Sep; 139(3):987-98.
- Shastry S, Toft DO, Joyner MJ. HSP70 and HSP90 expression in leucocytes after exercise in moderately trained humans. *Acta Physiol Scand*. 2002 Jun;175(2):139-46.
- Shen Q, Fan J, Yang XR, Tan Y, Zhao W, Xu Y, Wang N, Niu Y, Wu Z, Zhou J, Qiu SJ, Shi YH, Yu B, Tang N, Chu W, Wang M, Wu J, Zhang Z, Yang S, Gu J, Wang H, Qin W. Serum DKK1 as a protein biomarker for the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a large-scale, multicentre study. *Lancet Oncol*. 2012 Aug;13(8):817-26.
- Sheron N, Hawkey C, Gilmore I. Projections of alcohol deaths--a wake-up call. *Lancet* 2011; 377: 1297-1299.
- Shim, S., Stemke-Hale, K., Tsimberidou, A.M., Noshari, J., Anderson, T.E., Gascoyne, P.R.C., 2013. Antibody-independent isolation of circulating tumor cells by continuous-flow dielectrophoresis. *Biomicrofluidics* 7, 11807.
- Singh R; Bandyopadhyay D. MUC1: A target molecule for cancer therapy. *Cancer Biology & Therapy*, 2007, 6:4, 481-486
- Shiojiri N, Inujima S, Ishikawa K, Terada K, Mori M. Cell lineage analysis during liver development using the spf(ash)-heterozygous mouse. *Lab Invest* 2001; 81:17-25.
- Sibulesky L. Normal liver anatomy. *Clinical Liver Disease*, Vol. 2, No. S1, March 2013.

- Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J. Clin.* 65, 5–29 (2015).
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* 65, 87–108 (2015)
- Sieuwert AM1, Kraan J, Bolt J, van der Spoel P, Elstrodt F, Schutte M, Martens JW, Gratama JW, Sleijfer S, Foekens JA. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Jan 7;101(1):61-6.
- Singh PK, Hollingsworth MA: Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends Cell Biol* 2006, 16:467–476.
- Singh PK, Behrens ME, Eggers JP, Cerny RL, Bailey JM, Shanmugam K, Gendler SJ, Bennett EP, Hollingsworth MA: Phosphorylation of MUC1 by Met modulates interaction with p53 and MMP1 expression. *J Biol Chem* 2008, 283:26985–26995.
- Sirica AE. Ductular hepatocytes. *Histol Histopathol.* 1995 Apr;10(2):433-56.
- Sjö A, Magnusson KE, Peterson KH. Protein kinase C activation has distinct effects on the localization, phosphorylation and detergent solubility of the claudin protein family in tight and leaky epithelial cells. *J Membr Biol.* 2010; 236: 181-189.
- Sopori ML, Kozak W. Immunomodulatory effects of cigarette smoke. *J Neuroimmunol* 1998; 83: 148-156.
- Soucek T, Pusch O, Hengstschlager-Ottner E, Adams PD, Hengstschlager M. Deregulated expression of E2F-1 induces cyclin A- and E-associated kinase activities independently from cell cycle position. *Oncogene* 1997; 14: 2251–2257.
- Spizzo G, Obrist P, Ensinger C, Theurl I, Dünser M, Ramoni A, Gunsilius E, Eibl G, Mikuz G, Gastl G. Prognostic significance of Ep-CAM AND Her-2/neu overexpression in invasive breast cancer. *Int J Cancer.* 2002 Apr 20;98(6):883-8.
- Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem.* 2005 Nov 18;280(46):38729-39. Epub 2005 Sep 19.
- Steiner JW, Carruthers JS. Studies on the Fine Structure of the Terminal Branches of the Biliary Tree: I. The Morphology of Normal Bile Canaliculi, Bile Pre-ductules (Ducts of Hering) and Bile Ductules. *Am J Pathol.* 1961;38(6):639-61.
- Stickel F, Hampe J. Genetic determinants of alcoholic liver disease. *Gut* 2012; 61: 150-159 .
- Stoletov K, Kato H, Zardoujian E, Kelber J, Yang J, Shattil S, Klemke R. Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells. *J Cell Sci* 2010 123: 2332-2341; doi: 10.1242/jcs.069443.
- Stott SL, Hsu CH, Tsukrov D., Yu M, Miyamoto DT, Waltman BA, Rothenber S., Shah AM, Smas ME, Korir GK, et al. (2010). Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 18392–18397.
- Stoyanova T, Goldstein AS, Cai H, Drake JM, Huang J, Witte ON. Regulated proteolysis of Trop2 drives epithelial hyperplasia and stem cell self-renewal via β -catenin signaling. *Genes Dev.* 2012 Oct 15;26(20):2271-85. doi: 10.1101/gad.196451.112.

Suzuki A, Iwama A, Miyashita H, Nakauchi H, Taniguchi H. Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development* 2003;130:2513-2524.

Szala S, Kasai Y, Steplewski Z, Rodeck U, Koprowski H, Linnenbach AJ, Molecular cloning of cDNA for the human tumor-associated antigen CO-029 and identification of related transmembrane antigens, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (1990) 6833–6837.

Tabori U, Ma J, Carter M, Zielenska M, Rutka J, Bouffet E, Malkin D, Hawkins C. Human telomere reverse transcriptase expression predicts progression and survival in pediatric intracranial ependymoma. *J Clin Oncol.*2006;24:1522–1528.

Taira T, Narita T, Iguchi-Arigo SM, Ariga H. A novel G1-specific enhancer identified in the human heat shock protein 70 gene. *Nucleic Acids Res.* 1997 May 15;25(10):1975-83.

Tanaka M, Okabe M, Suzuki K, Kamiya Y, Tsukahara Y, Saito S, Miyajima A. Mouse hepatoblasts at distinct developmental stages are characterized by expression of EpCAM and DLK1: drastic change of EpCAM expression during liver development. *Mech Dev* 126: 665–676, 2009.

Tanimizu N, Mitaka T. Re-evaluation of liver stem/progenitor cells. *Organogenesis* 10: 208 – 215, 2014. Tarhuni A, Rufat P, Sutton A, et al. Impact of cytokine genes variants on the prediction and prognosis of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2014; 61:342-350.

Taura K, Miura K, Iwaisako K, Osterreicher CH, Kodama Y, Penz-Osterreicher M, Brenner DA. Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. *Hepatology.* 2010 Mar;51(3):1027-36.

Testino G. Alcoholic hepatitis. *J Med Life* 2013; 6: 161-167 [PMID: 23904876]

Testino G, Leone S, Borro P. Alcohol and hepatocellular carcinoma: a review and a point of view. *World J Gastroenterol.* 2014 Nov 21;20(43):15943-54.

Thiery, J.P. & Sleeman, J.P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 131-142 (2006).

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009 Nov 25;139(5):871-90.

Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med.* 2001;194:1395–406.

Tibbe AGJ, de Groot BG, Greve J, Dolan GJ, Rao C, Terstappen LWMM (2002) Magnetic field design for selecting and aligning immunomagnetic labeled cells. *Cytometry* 47:163–172

Torres-Fuenzalida J, Castronuovo C, Hidalgo A, Parada LA, Lorenti A. Isolation of fetal liver oval cells in physiologic conditions from their natural niche. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 2011 Mar; 41(1):36-46.

Toso C, Trotter J, Wei A, Bigam DL, Shah S, Lancaster J, Grant DR, Greig PD, Shapiro AM, Kneteman NM. Total tumor volume predicts risk of recurrence following liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2008;14(8):1107-15.

- Trautwein C, Friedman SL, Schuppan D, Pinzani M. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *J Hepatol.* 2015 Apr;62(1 Suppl):S15-24.
- Tremosini S, Bruix J. Diagnosis of early hepatocellular carcinoma: ideal goal, but not yet there. *Gastroenterology.* 2011 Jan;140(1):358-60.
- Tremosini S, Forner A, Boix L, Vilana R, Bianchi L, Reig M, Rimola J, Rodríguez-Lope C, Ayuso C, Solé M, Bruix J. Diagnosis of hepatocellular carcinoma (hcc) ≤ 2 cm: prospective validation of glypican 3, heat-shock protein 70 and glutamine synthetase staining in biopsy samples. *Journal of Hepatology* 2011; 54:S404.
- Trevisani F, D'Intino PE, Morselli-Labate AM, Mazzella G, Accogli E, Caraceni P, et al. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: Influence of HBsAg and anti-HCV status. *J Hepatol.* 2001;34(4):570–5.
- Trivedi PJ, Lammers WJ, van Buuren HR, Parés A, Floreani A, Janssen HL, Invernizzi P, Battezzati PM, Ponsioen CY, Corpechot C, Poupon R, Mayo MJ, Burroughs AK, Nevens F, Mason AL, Kowdley KV, Lleo A, Caballeria L, Lindor KD, Hansen BE, Hirschfield GM; Global PBC Study Group. Stratification of hepatocellular carcinoma risk in primary biliary cirrhosis: a multicentre international study. *Gut.* 2016 Feb;65(2):321-9.
- Trzpis M, McLaughlin PM, van Goor H, Brinker MG, van Dam GM, de Leij LM, Popa ER, Harmsen MC. Expression of EpCAM is up-regulated during regeneration of renal epithelia. *J Pathol.* 2008 Oct;216(2):201-8.
- Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet.* 2014 May 17;383(9930):1749-61.
- Tsuchiya K, Komuta M, Yasui Y, Tamaki N, Hosokawa T, Ueda K, et al. Expression of keratin 19 is related to high recurrence of hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation. *Oncology* 2011; 80:278–288.
- Turksen, Claudins, Methods and protocols in molecular biology, 762, 2011.
- Ueki T, Fujimoto J, Suzuki T, Yamamoto H, Okamoto E: Expression of hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met proto-oncogene, in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997, 25:619–623.
- Uen YH, Lin SR, Wu CH, Hsieh JS, Lu CY, Yu FJ, Huang TJ, Wang JY. Clinical significance of MUC1 and c-Met RT-PCR detection of circulating tumor cells in patients with gastric carcinoma. *Clin Chim Acta.* 2006 May;367(1-2):55-61. Epub 2006 Jan 5.
- van der Gun BT, Melchers LJ, Ruiters MH, de Leij LF, McLaughlin PM, Rots MG EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. *Carcinogenesis.* 2010 Nov;31(11):1913-21.
- van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res.* 2011 Jul-Oct; 728(1-2):23-34.
- Varela M, Real MI, Burrel M, Forner A, Sala M, Brunet M, Ayuso C, Castells L, Montañá X, Llovet JM, Bruix J.. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics. *J Hepatol* 2007;46(3):474-81.
- Vazquez RM, Nava G, Vegliione M, Yang T, Bragheri F, Minzioni P, Bianchi E, Di Tano M, Chiodi I, Osellame R, Mondello C, Cristiani I, 2015. Integrative biology. *Integr. Biol.* 7, 477e484.

- Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 55–76.
- Villanueva A, Chiang DY, Newell P, et al. Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008; 135: 1972–83.
- Villanueva A, Llovet JM. Targeted therapies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2011; 140(5):1410-26.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339:1546-1558.
- Wang B, Zhang Y, Xu DZ, Wang AH, Zhang L, Sun CS, Li LS. [Meta-analysis on the relationship between tobacco smoking, alcohol drinking and p53 alteration in cases with esophageal carcinoma]. *Zhonghua Liuxing Bingxue Zazhi* 2004; 25: 775-778
- Wang LY, Chen CJ, Zhang YJ, Tsai WY, Lee PH, Feitelson MA, Lee CS, Santella RM. 4-Aminobiphenyl DNA damage in liver tissue of hepatocellular carcinoma patients and controls. *Am J Epidemiol* 1998; 147: 315-323
- Wanless IR, Sapp H, Guindi M, Olshansky D, Takayama A The patho-genesis of focal nodular hyperplasia: an hypothesis based on histologic review of 20 lesions including 3 occurring in early biliary cirrhosis. *HEPA-TOLOGY* 2006;44:491A.
- Watanabe K, Eto K, Furuno K, Mori T, Kawasaki H, Gomita Y. Effect of cigarette smoke on lipid peroxidation and liver function tests in rats. *Acta Med Okayama* 1995; 49: 271-274.
- Weiskirchen R. Intratumor heterogeneity, variability and plasticity: questioning the current concepts in classification and treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2016 Apr; 5(2):183-7.
- Weiss L (1987) The hemodynamic destruction of circulating cancer cells. *Biorheology* 24(2):105–115.
- Wels, J, Kaplan R N, Rafii S, Lyden D. Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. *Genes Dev.* 22, 559–574 (2008).
- Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, Dirnhofer S. . (2004) Frequent EpCAM protein expression in human carcinomas. *Hum. Pathol.*, 35, 122–128.
- Westerheide SD, Anckar J, Stevens SM Jr, Sistonen L, Morimoto RI. Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science*. 2009 Feb 20;323(5917):1063-6
- Wicha MS, Hayes DF. Circulating tumor cells: not all detected cells are bad and not all bad cells are detected. *J Clin Oncol.* 2011 Apr 20;29(12):1508-11. doi: 10.1200/JCO.2010.34.0026. Epub 2011 Mar 21.
- Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Med Cancer Ther* 2008; 7 (10): 3129-3140.

Winter MJ a, Nagelkerken B, Mertens AE, Rees-Bakker HA, Briaire-de Bruijn IH, Litvinov SV. Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res.* 2003 Apr 15;285(1):50-8.

Winter MJ b, Nagtegaal ID, van Krieken JH, Litvinov SV. (2003) The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am. J. Pathol.*, 163, 2139–2148.

Winter MJ, Cirulli V, Briaire-de Bruijn IH, Litvinov SV. Cadherins are regulated by Ep-CAM via phosphatidylinositol-3 kinase. *Mol Cell Biochem.* 2007 Aug;302(1-2):19-26. Epub 2007 Feb 14.

Wu G, Osada M, Guo Z, Fomenkov A, Begum S, Zhao M, Upadhyay S, Xing M, Wu F, Moon C, Westra WH, Koch WM, Mantovani R, Califano JA, Ratovitski E, Sidransky D, Trink B. DeltaNp63alpha up-regulates the Hsp70 gene in human cancer. *Cancer Res.* 2005 Feb 1;65(3):758-66.

Wu Y, Wu PY. CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. *Stem Cells Dev.* 2009 Oct; 18(8):1127-34.

Xu P, Li L, Li G, Yu C, Li Y. Insight into the natural history of primary biliary cirrhosis: A systemic review of data from placebo-controlled clinical trials. *Turk J Gastroenterol.* 2016 Jul;27(4):342-8.

Yamada S, Okumura N, Wei L, Fuchs BC, Fujii T, Sugimoto H, et al. Epithelial to mesenchymal transition is associated with shorter disease-free survival in hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2014;21:3882–3890.

Yamashita T, Budhu A, Forgues M, Wang XW. Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2007 Nov 15; 67(22):10831-9.

Yamashita T, Forgues M, Wang W, Kim JW, Ye Q, Jia H, et al. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68:1451–61.

Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, Jia H, Ye Q, Qin LX, Wauthier E, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology.* 2009; 136:1012–24.

Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Hayashi T, Kondo M, Takatori H, et al. Discrete nature of EpCAM+ and CD90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2013;57:1484–97.

Yamamoto M, Bharti A, Li Y, Kufe D. Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and b-catenin in cell adhesion. *J Biol Chem* 1997; 272: 12492–12494.

Yamamoto, R., Tatsuta, M. & Terada, N. Suppression by oestrogen of hepatocellular tumorigenesis induced in mice by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Br. J. Cancer* 68, 303–307 (1993).

Yamamoto, R. Iishi H, Tatsuta M, Yamamoto T, Koike K, Kanda Y, Miyake A, Tsuji M, Terada N. Correlation between serum prolactin levels and hepatocellular tumorigenesis induced by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene in mice. *Br. J. Cancer* 72, 17–21 (1995).

- Yang JD, Mohamed HA, Cvinar JL, Gores GJ, Roberts LR, Kim WR. Diabetes Mellitus Heightens the Risk of Hepatocellular Carcinoma Except in Patients With Hepatitis C Cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 2016 Aug 16.
- Yang, L., Lang, J.C., Balasubramanian, P., Jatana, K.R., Schuller, D., Agrawal, A., Zborowski, M., Chalmers, J.J., 2009. Optimization of an enrichment process for circulating tumor cells from the blood of head and neck cancer patients through depletion of normal cells. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 521e534.
- Yang XR, Xu Y, Yu B, Zhou J, Qiu SJ, Shi GM, et al. High expression levels of putative hepatic stem/progenitor cell biomarkers related to tumour angiogenesis and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Gut* 2010;59: 953–62.
- Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, Chu PW, Lam CT, Poon RT, Fan ST. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell*. 2008;13:153–66.
- Yin Q, Li J, Xia Y, Zhang R, Wang J, Lu W, Zhou Y, Zheng Y, Abudumijiti H, Chen R, Chen K, Li S, Liu T, Wang F, Lu J, Zhou Y, Guo C. Systematic review and metaanalysis: bezafibrate in patients with primary biliary cirrhosis. *Drug Des Devel Ther*. 2015 Sep 30;9:5407-19.
- Yoo KS, Lim WT, Choi. Biology of Cholangiocytes: From bench to bedside. *Gut and Liver*, Vol. 10, No.5, September 2016, pp-687-698.
- Yoon SM, Gerasimidou D, Kuwahara R, Hytioglou P, Yoo JE, Park YN, Theise ND. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) marks hepatocytes newly derived from stem/progenitor cells in humans. *Hepatology*. 2011 Mar;53(3):964-73.
- Yoshida Y, Kanematsu T, Korenaga D, Sonoda T, Sugimachi K. DNA ploidy of primary hepatocellular carcinoma and pulmonary metastases. *Clin Exp Metastasis*. 1992 Sep;10(5):337-44.
- You H, Ding W, Dang H, Jiang Y, Rountree CB: C-Met represents a potential therapeutic target for personalized treatment in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2011. doi:10.1002/hep.24450.
- Yovchev MI, Grozdanov PN, Zhou H, Racherla H, Guha C, Dabeva MD. Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver. *Hepatology*. 2008; 47: 636-647.
- Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 798–809.
- Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, Isakoff SJ, Ciciliano JC, Wells MN, Shah AM, Concanon KF, Donaldson MC, Sequist LV, Brachtel E, Sgroi D, Baselga J, Ramaswamy S, Toner M, Haber DA, Maheswaran S. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science*. 2013 Feb 1;339(6119):580-4.
- Yu MW, Yang SY, Chiu YH, Chiang YC, Liaw YF, Chen CJ. A p53 genetic polymorphism as a modulator of hepatocellular carcinoma risk in relation to chronic liver disease, familial tendency, and cigarette smoking in hepatitis B carriers. *Hepatology* 1999; 29: 697-702.

- Yuan RH, Jeng YM, Hu RH, Lai PL, Lee PH, Cheng CC, et al. Role of p53 and beta-catenin mutations in conjunction with CK19 expression on early tumor recurrence and prognosis of hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Surg* 2011; 15:321–9.
- Yuan SF, Li KZ, Wang L, Dou KF, Yan Z, Han W, Zhang YQ: Expression of MUC1 and its significance in hepatocellular and cholangiocarcinoma tissue. *World J Gastroenterol* 2005, 11:4661–4666.
- Yuzugullu H, Benhaj K, Ozturk N, Senturk S, Celik E, Toylu A, Tasdemir N, Yilmaz M, Erdal E, Akcali KC, Atabey N, Ozturk M: Canonical Wnt signalling is antagonized by noncanonical Wnt5a in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer* 2009, 8:90.
- Zebisch M, Kolbl AC, Schindlbeck C, Neugebauer J, Heublein S, Illmer M, Rack B, Friese K, Jeschke U, Andergassen U. Quantification of breast cancer cells in peripheral blood samples by real-time rt-PCR. *Anticancer Res.* 2012, 32, 5387–5391.
- Zebisch M, Kölbl A, Andergassen U, Hutter S, Neugebauer J, Engelstädter V, Günthner-Biller M, Jeschke U, Friese K. Detection of circulating tumour cells on mRNA levels with established breast cancer cell lines. *Biomed. Rep.* 2013, doi:10.3892/br.2012.
- Zelenina OM, Kruglov SB, Pokidyshev DA, Shimkovich MV, Malysheva IY. Synthesis of HSP70 in blood leukocytes as a marker of stress resistance during adaptation. *Bull Exp Biol Med.* 2007 Dec;144(6):764-7.
- Zhang Y, Peng Z, Qiu G, Wang Z, Gu W. Overexpression of cyclin A in hepatocellular carcinoma and its relationship with HBx gene integration. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2002 Jul;24(4):353-5.
- Zhou X, Zhu H, Lu J. PTEN and hTERT gene expression and the correlation with human hepatocellular carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2015 Apr;211(4):316-9.
- Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, Hendrickson WA. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science.* 1996 Jun 14;272(5268):1606-14.
- Zhu WF, Li J, Yu LC, Wu Y, Tang XP, Hu YM, Chen YC. Prognostic value of EpCAM/MUC1 mRNA-positive cells in non-small cell lung cancer patients. *Tumour Biol.* 2014 Feb;35(2):1211-9.
- Zippelius, A.; Pantel, K. RT-PCR-based detection of occult disseminated tumor cells in peripheral blood and bone marrow of patients with solid tumors: An overview. *Ann. NY Acad. Sci.* 2000, 906, 110–123.
- Zöller M. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2009 Jan;9(1):40-55.
- Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology.* 2015 Oct;149(5):1226-1239.e4.
- Zulehner G, Mikula M, Schneller D, van ZF, Huber H, Sieghart W, et al. Nuclear beta-catenin induces an early liver progenitor phenotype in hepatocellular carcinoma and promotes tumor recurrence. *Am J Pathol* 2010;176:472–81.

