

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
**FACULTAD DE BIOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA**



**VNiVERSiDAD**  
**DE SALAMANCA**

---

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE

**UTILIDAD DEL TRANSPORTOMA EN LA BÚSQUEDA  
DE BIOMARCADORES DE QUIMIORRESISTENCIA Y EN  
EL DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE  
SENSIBILIZACIÓN A LA QUIMIOTERAPIA EN EL  
CÁNCER HEPÁTICO**

Memoria que presenta Dña. **Maitane Asensio Martín** para optar al Título de  
Doctor por la Universidad de Salamanca

24 de julio de 2019



---

D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada “Utilidad del transportoma en la búsqueda de biomarcadores de quimiorresistencia y en el desarrollo de estrategias de sensibilización a la quimioterapia en el cáncer hepático”, presentada por Dña. Maitane Asensio Martín para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección conjunta del Dr. D. José Juan García Marín, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología, la Dra. Dña. Rocío I. Rodríguez Macías, Profesora Titular del Departamento de Fisiología y Farmacología, y la Dra. Dña. Elisa Lozano Esteban, Investigadora Postdoctoral del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día 24 de julio de dos mil diecinueve.



Fdo. José Juan García Marín



---

Dña. M<sup>a</sup> ÁNGELES SERRANO GARCÍA, COORDINADORA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOPATOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada “Utilidad del transportoma en la búsqueda de biomarcadores de quimiorresistencia y en el desarrollo de estrategias de sensibilización a la quimioterapia en el cáncer hepático”, presentada por Dña. Maitane Asensio Martín para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección conjunta del Dr. D. José Juan García Marín, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología, la Dra. Dña. Rocío I. Rodríguez Macías, Profesora Titular del Departamento de Fisiología y Farmacología, y la Dra. Dña. Elisa Lozano Esteban, Investigadora Postdoctoral del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca, a día 24 de julio de dos mil diecinueve.



Fdo. M<sup>a</sup> Ángeles Serrano García



---

D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA, Dña. ROCÍO I. RODRÍGUEZ MACÍAS, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA, y Dña. ELISA LOZANO ESTEBAN, INVESTIGADORA POSTDOCTORAL DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

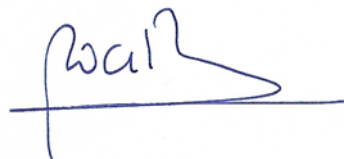
CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada “Utilidad del transportoma en la búsqueda de biomarcadores de quimiorresistencia y en el desarrollo de estrategias de sensibilización a la quimioterapia en el cáncer hepático”, presentada por Dña. Maitane Asensio Martín para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección conjunta en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

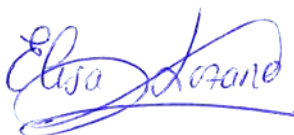
Y para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca, a 24 de julio de dos mil diecinueve.



Fdo. José Juan García Marín



Fdo. Rocío I. Rodríguez Macías



Fdo. Elisa Lozano Esteban

La doctoranda ha disfrutado durante la realización de esta Tesis Doctoral de un Contrato predoctoral para la Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte referencia BOE-A-2014-13539 y resolución con referencia BOE-A-2015-9456 del 28 de agosto de dos mil quince.

El desarrollo del trabajo experimental incluido en esta Memoria ha sido financiado, en parte, con cargo al CIBERehd (Instituto de Salud Carlos III), y a los siguientes Proyectos de Investigación:

Ministerio de Economía y Competitividad. Proyecto SAF2013-40620-R. "Implicación de los genes *NR1H4*, *BIRC5* y *SLC22A1* en la quimiorresistencia y la quimiosensibilización del cáncer hepático". Investigador Principal: José Juan García Marín. Periodo: 2014-2016.

Acciones Estratégicas CIBERehd. Proyecto EHD15PI05. "Búsqueda de nuevos marcadores en colangiocarcinoma". Investigador Principal: Rocío I. Rodríguez Macías. Periodo: 2016-2017.

Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III. Proyectos de investigación en salud (AES 2016). Modalidad proyectos en salud cofinanciados con Fondos FEDER. Proyecto PI16/00598 "Quimiorresistencia del adenocarcinoma gástrico: Caracterización de su huella genética y superación mediante edición genómica programada basada en CRISPR/Cas9". Investigador Principal: José Juan García Marín. Periodo: 2017-2019.

Ministerio de Economía y Competitividad. Proyecto SAF2016-75197-R. "Desarrollo de un modelo predictivo de la falta de respuesta a la quimioterapia en pacientes con hepatoblastoma". Investigador Principal: Rocío I. Rodríguez Macías. Periodo: 2017-2019.

Centro Internacional sobre el Envejecimiento (CENIE) en el marco del Programa de Cooperación Interreg V-A, España-Portugal, (POCTEP), 2014-2020, del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Proyecto 0348\_CIE\_6\_E. "Biomarcadores no invasivos de progresión de daño hepático y con utilidad como dianas para el tratamiento en pacientes ancianos". Investigador principal: Rocío I. Rodríguez Macías. Periodo: 2018-2020.

Fundación AECC Investigación contra el cáncer. Proyectos cáncer infantil y cáncer poco frecuente 2017. "Estudio multidisciplinar del colangiocarcinoma: diagnóstico, patogenia y nuevas terapias". Coordinador: Jesús María Bañales Asurmendi. Investigador principal de la Universidad de Salamanca: José Juan García Marín. Periodo: 2018-2020.



---

Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral han sido publicados como artículos en las siguientes revistas:

Marin JJG, Lozano E, Herraiez E, **Asensio M**, Di Giacomo S, Romero MR, Briz O, Serrano MA, Efferth T, Macias RIR. Chemoresistance and chemosensitization in cholangiocarcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*. 2018;1864(4 Pt B):1444-1453.

Marin JJG, Briz O, Herraiez E, Lozano E, **Asensio M**, Di Giacomo S, Romero MR, Osorio-Padilla LM, Santos-Llamas AI, Serrano MA, Armengol C, Efferth T, Macias RIR. Molecular bases of the poor response of liver cancer to chemotherapy. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2018;42(3):182-192.

Marin JJG, Cives-Losada C, **Asensio M**, Lozano E, Briz O, Macias RIR. Mechanisms of Anticancer Drug Resistance in Hepatoblastoma. *Cancers (Basel)*. 2019;11(3).

Lozano E, Macias RIR, Monte MJ, **Asensio M**, Del Carmen S, Sanchez-Vicente L, Alonso-Peña M, Al-Abdulla R, Munoz-Garrido P, Satriano L, O'Rourke CJ, Banales JM, Avila MA, Martinez-Chantar ML, Andersen JB, Briz O, Marin JJG. Causes of hOCT1-dependent cholangiocarcinoma resistance to sorafenib and sensitization by tumor-selective gene therapy. *Hepatology*. 2019, *en prensa*.

O se han enviado para su evaluación y están en revisión:

Lozano E, **Asensio M**, Perez-Silva L, Banales JM, Briz O, Marin JJG. Role of SOX17 downregulation in MRP3-mediated chemoresistance in cholangiocarcinoma. A potential target for chemosensitization. (*Hepatology*; en evaluación).

Los resultados de esta Tesis Doctoral se han publicado en forma de abstract en las siguientes revistas o libros de abstracts tras su presentación en congresos:

Lozano E, Briz O, **Asensio M**, Perez-Silva L, Monte MJ, Bujanda L, Banales JM, Marin JJG. SOX17 selectively sensitizes cholangiocarcinoma cells to anticancer drugs by interfering with the promoter activation of export pumps ABCC3 and ABCG2. EASL Monothematic Conference "Cholangiocytes in health and disease: from basic science to novel treatments". Entidad organizadora: EASL. 09-11 de junio de 2017, Oslo, Noruega. Tipo de comunicación: póster.

**Asensio M**, Lozano E, Perez-Silva L, Monte MJ, Peleteiro-Vigil A, Bujanda L, Banales JM, Briz O, Marin JJG. SOX17-induced selective enhanced sensitivity of cholangiocarcinoma cells to antitumor drugs by down-regulation of MRP3 and BCRP export pumps. The 1st FEBS3+ Joint Meeting of the French-Portuguese-Spanish Biochemical and Molecular Biology Societies, XL SEBBM Congress. Entidad organizadora: Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM) y Federación Europea de Sociedades Bioquímicas (FEBS). 23-26 de octubre de 2017, Barcelona, España. Tipo de comunicación: oral.

Lozano E, **Asensio M**, Briz O, Perez-Silva L, Herrera E, Romero MR, Perez MJ, Al-Abdula R, Alonso-Pena M, Peleteiro-Vigil A, Jimenez F, Monte MJ, Bujanda L, Banales JM, Marin JJG. Sensibilización del colangiocarcinoma a la quimioterapia por represión de las bombas exportadoras de fármacos ABCC3 y ABCG2 inducida por la sobreexpresión de SOX17. *Gastroenterología y Hepatología*, 2017, 41: 44. Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH), 21-23 de febrero de 2018, Madrid. Tipo de comunicación: póster.

Lozano E, Briz O, **Asensio M**, Perez-Silva L, Monte MJ, Perez MJ, Herrera E, Romero MR, Serrano MA, Macias RIR, Bujanda L, Banales JM, Marin JJG. Sensitization of cholangiocarcinoma to chemotherapy by SOX17-induced down-regulation of drug export pumps ABCC3 and ABCG2. *EASL, Journal of Hepatology*, 2018, 68(1): S679. The international liver congress, EASL, 11-15 de abril de 2018, Paris, Francia. Tipo de comunicación: póster.

Lozano E, Macias RIR, Monte MJ, **Asensio M**, del Carmen S, Sanchez-Vicente L, Alonso-Peña A, Al-Abdulla R, O'Rourke CJ, Banales JM, Avila MA, Martinez-Chantar ML, Geier A, Andersen JB, Briz O, Marin JJG. Genetic and epigenetic events in the regulation of the expression of organic cation transporter OCT1: Role in chemoresistance of liver cancer to sorafenib. *Journal of Physiology and Biochemistry*,

---

71: 46. XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas SECF, 18-21 de septiembre de 2018, Cádiz, España. Tipo de comunicación: póster.

**Asensio M**, Lozano E, Cives-Losada C, Carrillo J, Abete L, Briz O, Al-Abdulla R, Alonso-Pena A, Perez-Silva L, Armengol C, Marin JJG, Macias RIR. Role of transportome in chemoresistance of hepatoblastoma. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 71: 90. XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas SECF, 18-21 de septiembre de 2018, Cádiz, España. Tipo de comunicación: póster.

**Asensio M**, Lozano E, Al-Abdulla R, Macias RIR, Alonso-Peña A, Monte MJ, O'Rourke CJ, Briz O, Andersen JB, Marin JJG. Role of epigenetic events in hOCT1-dependent response of cholangiocarcinoma to sorafenib: Usefulness of selective chemosensitizing gene therapy. 8th meeting of the European Club for Liver Cell Biology (ECLCB-8). Entidad organizadora: European Club for Liver Cell Biology (ECLCB-8). 04-06 de octubre de 2018. Bonn, Alemania. Tipo de comunicación: oral.

**Asensio M**, Lozano E, Cives-Losada C, Carrillo J, Abete L, Briz O, Cairo S, Bruix J, Armengol C, Marin JJG, Macias RIR. Papel del transportoma en la falta de respuesta del hepatoblastoma a la quimioterapia convencional. *Gastroenterología y Hepatología*, 2019, 42(1): 49-50. 20-22 de febrero de 2019, Madrid, España. Tipo de comunicación: póster.

**Asensio M**, Lozano E, Cives-Losada C, Carrillo J, Abete L, Briz O, Cairo S, Bruix J, Armengol C, Marin JJG, Macias RIR. Role of drug transporters in the chemoresistance of hepatoblastoma. *EASL, Journal of Hepatology*, 2019, 70(1): S679. The international liver congress, EASL, 10-14 de abril de 2019, Viena, Austria. Tipo de comunicación: oral.



---

## AGRADECIMIENTOS:

Con estas líneas me gustaría expresar mi sincero agradecimiento a aquellas personas que con su apoyo científico y humano han colaborado en la realización de esta Tesis Doctoral, sin las cuales alcanzar la primera meta de mi carrera investigadora habrá sido mucho más complicado.

A mis directores de Tesis:

Al Dr. José Juan García Marín, por depositar su confianza en mí y haberme dado la oportunidad de entrar a formar parte de este gran equipo. Por su dedicación en el seguimiento de mi formación y sus consejos, tanto en lo personal como profesional, que me han permitido realizar un buen aprovechamiento del trabajo realizado y que esta Tesis llegara a buen término.

A la Dra. Rocío I. Rodríguez Macías, por todo el tiempo que ha dedicado a que mi trabajo y formación fueran de calidad, por inculcarme el arte de trabajar de forma ordenada y enseñarme que, a veces, parar dos minutos a pensar es buena idea. Gracias por haber sacado un minuto de su tiempo, aunque no lo tuviera, para resolver mis dudas y por hacerlo siempre con una sonrisa.

A la Dra. Elisa Lozano Esteban, por ser mi guía y mi compañera en el laboratorio durante estos últimos cinco años. De ella he aprendido a ser perseverante y muy crítica con el trabajo y a que el esfuerzo tiene su recompensa. Gracias por los buenos momentos que hemos pasado juntas haciendo experimentos, por ayudarme a tolerar los malos resultados y por nuestras conversaciones a última hora de la tarde, espalda con espalda, en el 129. Por su infinita paciencia, por resolver todas mis dudas y por la ayuda en la elaboración de este manuscrito.

Al resto del grupo HEVEFARM:

A la Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Serrano, por su amabilidad e interés en mi trabajo, por ser un ejemplo de esfuerzo y por la valiosa ayuda que me ha brindado en las gestiones administrativas que he tenido que hacer.

A la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Monte, por enseñarnos a respetar las normas que hacen de un laboratorio un buen lugar de trabajo y por facilitarme los trámites administrativos que pasaban por la dirección del Departamento.

Al Dr. Óscar Briz Sánchez, por su infinita paciencia, por ser la fuente de conocimiento más accesible de este laboratorio y por las horas en el citómetro de flujo que hemos compartido y que nos han dejado momentos muy divertidos. Gracias también por enseñarme a tener la mente abierta a nuevas ideas y hacer que lo difícil, parezca fácil.

A la Dra. Marta Rodríguez Romero, por su simpatía y amabilidad, por interesarse por los “peques” y por su ayuda en la organización del banco de células.

A la Dra. M<sup>a</sup> José Pérez, por su buen humor y ser un ejemplo del trabajo “bien hecho”.

A la Dra. Elisa Herráez Aguilar, por sus consejos, por hacerme preguntas difíciles que despertaban nuevas inquietudes respecto y por su valiosa gestión del laboratorio. Gracias por nuestras conversaciones a través de la pared, por las risas y los buenos momentos vividos. Aunque no sea una de “tus niñas”, me considero muy afortunada de tenerte como compañera y amiga.

Me gustaría agradecer también a toda la plantilla “junior” del grupo todo su apoyo y ayuda, por sus ganas de aprender y el buen entusiasmo que desprende. Especialmente, a Marta Alonso Peña, por haber compartido conmigo todas las fases de este proceso, desde el Máster hasta irnos de estancia al mismo país y en las mismas fechas. Gracias por tu alegría y por nuestras conversaciones de desahogo en los días más duros.

A Ana Peleteiro Vigil, por su energía, sus ocurrencias y por los divertidos momentos que hemos pasado dentro y fuera del laboratorio. A Laura, Ricky, Anabel, Paula, Meraris y Álvaro por fomentar el “buen rollo” en el equipo y, especialmente, a Candela, por todas las horas que hemos compartido dentro y fuera del trabajo, y a Bea, nuestra más reciente incorporación, por el apoyo que me has brindado en estos últimos meses.

Me gustaría también tener unas palabras de agradecimiento con todas las personas que han pasado por este laboratorio, especialmente, a las ya Dras. Faten Al-Aquil y Ruba Al-Abdulla por compartir conmigo los primeros años de la Tesis y a Lorena, por su dulzura y su compañerismo durante su estancia en este laboratorio.

A M<sup>a</sup> Isabel Hernández por su excelente trabajo en la secretaría. A los técnicos y auxiliares de laboratorio que han facilitado el trabajo día a día, en especial a Narci y Emilia por contagiar su alegría y su sentido del humor.

A los departamentos de Fisiología y Farmacología y Bioquímica y Biología Molecular por permitirme el uso de sus instalaciones.

Y a todas las personas que fuera del laboratorio han contribuido de una u otra manera a que este trabajo se complete. A mis amigos por haberme apoyado, en especial, a Idoia, Iratxe y Paula, por seguir mi día a día desde la distancia y confiar plenamente en mí, y a Macu y Bea, por sus palabras de apoyo y abrirme las puertas de Salamanca.

A Manuel, por su comprensión, por hacerme reír y por conseguir que un día duro en el trabajo se acabara convirtiendo en un buen día. Sin tu apoyo, este camino habría sido más difícil de recorrer.

Finalmente, me gustaría agradecer a mi familia, especialmente a mis padres, por su confianza y por apoyarme en cada paso que he dado, aunque implicara poner distancia entre nosotros. Sois el motor que impulsa mi camino y nunca podré agradecerlos suficiente.

A todos, ESKERRIK ASKO!

---

*Dedicada a:*

*Mis padres y a Manuel, por acompañarme y apoyarme siempre*





---

## ABREVIATURAS

**2-HG:** 2-Hidroxiglutarato

**5-FU:** 5-Fluorouracilo

**aa:** Aminoácidos

**AAD:** Antiviral de acción directa

**AAF:** Acetamidofluoreno

**ABC:** “ATP Binding Cassette”

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ADN complementario

**AFP:**  $\alpha$ -fetoproteína

**AFP-L3:** Fracción de lectina AFP

**ALT:** Alanina aminotransferasa

**APC:** “Adenomatous Polyposis Coli”

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** ARN mensajero

**ASBT:** Transportador de ácidos biliares dependiente de sodio

**ASGPR1:** “Asialoglycoprotein receptor 1”

**AST:** Aspartato aminotransferasa

**ATP:** Adenosín trifosfato

**BCLC:** “Barcelona Clinic Liver Cancer”

**BCRP:** “Breast Cancer Resistance Protein”

**BSEP:** Transportador de sales biliares dependiente de ATP

**BUN:** “Blood Urea Nitrogen”

**CA:** Antígeno carbohidrato

**CCA:** Colangiocarcinoma

**CEA:** Antígeno carcinoembrionario

**CER:** Colangiopancreatografía endoscópica retrógrada

**CK:** Citoqueratina

**CK1 $\gamma$ :** Caseína quinasa 1

**CMV:** Citomegalovirus

**CNT2:** Transportador de nucleósidos concentrativo 2

**CPT:** Colangiografía percutánea transarterial

**CTC:** Célula Tumoral Circulante

**CYFRA32:** Fragmento soluble de la CK-19

**DAC:** Decitabina

**dCCA:** Colangiocarcinoma distal

**DCP:** Des- $\gamma$ -carboxi protombina

**DEN:** Dietilnitrosamina

**DKK:** “Dickkopf-related protein”

**DRE:** Elemento de respuesta directo de SOX17

**eCCA:** Colangiocarcinoma extrahepático

**ECL:** “Enhanced ChemiLuminiscence”

**EEM:** Error Estándar de la Media

**EGFP:** “Enhanced Green Fluorescent Protein”

**EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epitelial

**EMT:** Transición Epitelio-Mesenquimal

**F:** “Forward primer”

**FDA:** “Food and Drug Administration”

**FGFR2:** Factor de crecimiento fibroblástico 2

**GOI:** “Gen of interest”

**GSK3 $\beta$ :** Glucógeno sintasa quinasa

**GST:** Glutación-S-transferasa

**HB:** Hepatoblastoma

---

**HCC:** Hepatocarcinoma

**HER2/neu o Neu:** Factor de crecimiento epidérmico humano 2

**HGF o c-MET:** Factor de crecimiento hepatocitario

**HMG:** “High Mobility Group”

**HNFA:** Factor nuclear 4 $\alpha$  de hepatocito

**HSP70:** “Heat Shock Protein 70”

**IC<sub>50</sub>:** Concentración inhibitoria 50

**iCCA:** Colangiocarcinoma intrahepático

**IDH:** Isocitrato deshidrogenasa

**IGF-1:** Factor de crecimiento insulinoide

**IL-6:** Interleuquina-6

**IRE:** Elemento de respuesta invertido de SOX17

**ITR:** “Inverted Terminal Repeats”

**LRP5/6:** Low-density lipoprotein Receptor-related Protein 5/6

**MDR:** Resistencia a múltiples fármacos

**miARN:** microARN

**MOC:** Mecanismos de quimiorresistencia

**MPP\*:** 1-metil-4-fenilpiridina

**MRP:** Proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos

**MTX:** Mitoxantrona

**MUC5AC:** Glicoproteína secretora mucina-5AC

**NAFLD:** enfermedad de hígado graso no alcohólica

**NASH:** esteatohepatitis no alcohólica

**NBD:** Dominio de unión a nucleótido

**NCAM:** “Neural cell adhesion molecule”

**NHC:** Colangiocitos humanos normales

**NT:** No tumoral

**NTCP:** Cotransportador de ácidos biliares acoplado al transporte de sodio

**OATP:** Polipéptido transportador de aniones orgánicos

**OCT:** Transportador de cationes orgánicos

**OCTN:** Transportadores de cationes orgánicos con un sitio de unión a los nucleótidos

**p.c.:** Peso corporal

**pb:** Pares de bases de nucleótidos

**PBS:** Tampón fosfato salino

**pCCA:** Colangiocarcinoma perihiliar

**PD-1:** "Programmed cell death protein-1"

**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PECAM-1:** Molécula de adhesión a célula endotelial de plaquetas 1

**PSA:** Antígeno prostático específico

**PSC:** Colangitis esclerosante primaria

**R:** "Reverse primer"

**RM:** Resonancia magnética

**SD:** Desviación estándar

**SFRP:** "Secreted Frizzled-Related Protein"

**shARN:** "short hairpin ARN"

**SHARP:** "Sorafenib Hepatocellular carcinoma Assessment Randomized Protocol"

**SLC:** "Solute Carrier protein"

**SNP:** "Single Nucleotide Polimorphism"

**SOX:** "Sry-related HMG box"

**Sry:** "Sex-determining region Y"

**STAT3:** Transductor de señal y activador de la transcripción 3

**TAA:** Tioacetamida

**TACE:** Quimioembolización transarterial

**TC:** Tomografía computarizada

---

**TCF/LEF:** “T-Cell Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor”

**TCGA:** “The Cancer Genome Atlas”

**TEA:** Tetraetilamonio

**TET:** “Ten-eleven translocation”

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante  $\beta$

**TK:** Tirosina quinasa

**TKI:** Inhibidor de tirosina quinasa

**TLDA:** “Taqman Low-Density Array”

**TMD:** Dominio transmembrana

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral

**TSS:** Sitio de inicio de la transcripción

**TU:** Unidades transductoras de virus

**UI:** Unidades Internacionales

**VE:** Vesículas Extracelulares

**VEGFR:** Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular

**VHB:** Virus de la hepatitis B

**VHC:** Virus de la hepatitis C



---

# ÍNDICE

<b>1. OBJETIVOS .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. SISTEMA HEPATOBILIAR.....</b>	<b>7</b>
2.1.1. Generalidades .....	7
2.1.2. Hepatocitos.....	7
2.1.3. Colangiocitos .....	8
2.1.4. Otros tipos celulares .....	10
<b>2.2. FUNCIONES DEL SISTEMA HEPATOBILIAR .....</b>	<b>11</b>
<b>2.3. CÁNCER HEPÁTICO.....</b>	<b>11</b>
2.3.1. Carcinoma hepatocelular (HCC) .....	12
2.3.1.1. Epidemiología.....	12
2.3.1.2. Factores de riesgo.....	12
2.3.1.3. Diagnóstico.....	13
2.3.1.4. Patogenia .....	13
2.3.1.5. Tratamiento .....	14
2.3.2. Colangiocarcinoma (CCA) .....	15
2.3.2.1. Epidemiología.....	16
2.3.2.2. Factores de riesgo.....	16
2.3.2.3. Diagnóstico.....	17
2.3.2.4. Biomarcadores de CCA.....	18
2.3.2.5. Patogenia .....	21
Genética y epigenética .....	21
Mediadores de la inflamación .....	22
Cascadas de señalización asociadas con el desarrollo embrionario .....	22
2.3.2.6. Tratamiento .....	<b>24</b>
<b>2.4. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SOX17 .....</b>	<b>26</b>
2.4.1. Familia génica de los factores SOX .....	26
2.4.2. Funciones del factor de transcripción SOX17 .....	28

2.4.3. Fisiopatología de SOX17 .....	28
2.4.4. Papel de SOX17 en cáncer.....	29
2.4.5. SOX17 como un inhibidor de la vía canónica Wnt/ $\beta$ -catenina .....	30
<b>2.5. PAPEL DEL TRANSPORTOMA EN LA RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL EN CÁNCER HEPÁTICO .....</b>	<b>31</b>
2.5.1. Transportadores implicados en la captación de fármacos (MOC-1a) .....	33
2.5.1.1. El transportador de ácidos biliares dependiente de sodio ASBT.....	34
Estructura del ASBT .....	34
Expresión del ASBT en el organismo.....	35
Papel fisiológico de ASBT.....	35
2.5.1.2. El transportador de cationes orgánicos OCT1 .....	37
Estructura de OCT1 .....	38
Expresión de OCT1 en el organismo .....	38
Función fisiológica de OCT1 .....	38
Papel de OCT1 en el transporte de fármacos antitumorales.....	39
2.5.2. Transportadores implicados en la expulsión de fármacos (MOC-1b) .....	40
<b>2.6. TERAPIAS DIRIGIDAS EN COLANGIOCARCINOMA .....</b>	<b>41</b>
2.6.1. Inhibidores de tirosina quinasas (TKIs) .....	43
2.6.1.1. Inhibidores de ErbB.....	44
2.6.1.2. Inhibidores de FGFR .....	44
2.6.1.3. Inhibidores de VEGFR y PDGFR.....	44
2.6.2. Otras terapias dirigidas para el tratamiento del CCA.....	45
2.6.3. El sorafenib como terapia dirigida contra el cáncer hepático.....	45
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1. MATERIAL BIOLÓGICO .....</b>	<b>50</b>
3.1.1. Muestras humanas .....	50
3.1.2. Modelos animales .....	51
3.1.3. Líneas celulares.....	52
3.1.4. Bacterias.....	52
<b>3.2. PRODUCTOS .....</b>	<b>53</b>
<b>3.3. MEDIOS INSTRUMENTALES .....</b>	<b>55</b>



<b>3.4. EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i></b> .....	58
3.4.1. Evaluación de estrategias de terapia génica para mejorar la respuesta antitumoral en el CCA <i>in vivo</i> .....	58
3.4.1.1. Efecto de OCT1 en la respuesta al sorafenib <i>in vivo</i> .....	58
3.4.1.2. Efecto de SOX17 en la respuesta al 5-FU <i>in vivo</i> .....	59
3.4.2. Modelo experimental de CCA en rata .....	60
3.4.3. Modelo experimental de HCC en rata .....	60
3.4.4. Recogida de muestras biológicas .....	60
<b>3.5. CULTIVOS CELULARES</b> .....	61
3.5.1. Cultivo celular para estudiar la expresión génica y la funcionalidad de proteínas transportadoras.....	61
3.5.2. Estudios de viabilidad celular .....	62
3.5.3. Transfección transitoria con lípidos catiónicos .....	62
<b>3.6. CULTIVO DE BACTERIAS</b> .....	62
3.6.1. Transformación de bacterias por choque térmico.....	63
3.6.2. Selección de colonias y crecimiento en medio líquido.....	63
3.6.3. Purificación del ADN plasmídico de cultivos de bacterias .....	63
<b>3.7. MÉTODOS COMUNES DE BIOLOGÍA MOLECULAR</b> .....	63
3.7.1. Soluciones empleadas de uso como en varias técnicas.....	63
3.7.2. PCR de alta fidelidad .....	64
3.7.3. Electroforesis en geles de agarosa no desnaturizante .....	64
3.7.4. Purificación del ADN contenido en geles de agarosa y reacciones enzimáticas.....	64
3.7.5. Digestión con enzimas de restricción .....	65
3.7.6. Secuenciación de ADN .....	65
<b>3.8. TÉCNICAS DE CLONACIÓN</b> .....	65
3.8.1. Clonación clásica .....	65
3.8.1.1. Clonación de la secuencia codificante de SOX17 y OCT1 en el plásmido de lentivirus pWPI .....	65
3.8.1.2. Clonación de los “short hairpin RNAs” (shARNs) para el silenciamiento de SOX2 y SOX9 .....	65
3.8.2. Clonación por recombinación Gateway.....	66
3.8.2.1. Fundamento .....	66

3.8.2.2. Clonación de los promotores de ABCC3 y ABCG2 para estudios de actividad luciferasa.....	67
Amplificación de los prABCC3 y prABCG2 .....	68
Clonación de los productos de PCR por recombinación BP.....	69
Recombinación LR “Multisite” .....	69
Modificación de los <i>prABCC3</i> y <i>prABCG2</i> para estudiar la potencial unión de SOX17.....	70
3.8.2.3. Clonación del prBIRC5 y prCMV para estudios de comparación de su actividad.....	71
3.8.2.4. Clonación de vectores adenovirales pAd-prCMV-SOX17, pAd-prBIRC5-SOX17 y pAd-prBIRC5-OCT1 .....	71
Amplificación de fragmentos de ADN.....	71
Reacción de recombinación BP .....	71
Generación del plásmido de expresión adenoviral.....	72
<b>3.9. PRODUCCIÓN DE VECTORES VIRALES .....</b>	<b>74</b>
3.9.1. Vectores lentivirales.....	74
3.9.1.1. Fundamento .....	74
3.9.1.2. Producción .....	75
3.9.2. Vectores adenovirales.....	76
3.9.2.1. Fundamento .....	76
3.9.2.2. Producción .....	76
3.9.2.3. Recogida y purificación .....	77
3.9.3. Titulación por citometría de flujo .....	78
3.9.4. Transducción de las células diana .....	79
<b>3.10. ESTUDIOS DE TRANSPORTE <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>79</b>
3.10.1. Soluciones empleadas .....	79
3.10.2. Experimentos de captación de compuestos fluorescentes .....	79
3.10.2.1. Captación de DHE para evaluar la actividad transportadora de OCT1 .....	79
3.10.2.2. Estudios de captación y eflujo de las bombas MRP3 y BCRP .....	80
3.10.3. Experimentos de captación de sorafenib.....	80
<b>3.11. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ARNm POR RT-PCR CUANTITATIVA.....</b>	<b>81</b>
3.11.1. Extracción del ARN total .....	81

---

3.11.2. Transcripción inversa (RT).....	81
3.11.3. Diseño de cebadores para PCR cuantitativa.....	81
3.11.4. PCR cuantitativa.....	83
3.11.5. Tarjetas microfluídicas.....	84
3.11.6. Cuantificación relativa.....	84
<b>3.12. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.....</b>	<b>85</b>
3.12.1. Soluciones empleadas.....	85
3.12.2. Obtención de homogenados de tejido o de cultivos celulares.....	85
3.12.3. Procedimiento.....	86
3.12.3.1. Electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	86
3.12.3.2. Transferencia.....	86
3.12.3.3. Inmunodetección.....	86
3.12.3.4. Revelado.....	87
<b>3.13. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA.....</b>	<b>87</b>
3.13.1. Soluciones empleadas.....	87
3.13.2. Preparación de las muestras.....	87
3.13.3. Inmunodetección.....	87
<b>3.14. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS.....</b>	<b>88</b>
3.14.1. Soluciones empleadas.....	88
3.14.2. Preparación de las muestras.....	88
3.14.3. Tinción de hematoxilina-eosina.....	88
3.14.4. Detección de proteínas por inmunohistoquímica.....	89
<b>3.15. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....</b>	<b>89</b>
3.15.1. Parámetros bioquímicos en suero.....	89
3.15.2. Valoración de proteínas totales.....	89
3.15.3. Determinación de la viabilidad celular.....	90
3.15.4. Medida de sorafenib por HPLC-MS/MS.....	90
3.15.5. Determinación de la actividad luciferasa.....	90
<b>3.16. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....</b>	<b>91</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>93</b>

**4.1. ESTUDIO DE LA POTENCIAL UTILIDAD DEL TRANSPORTADOR DE ÁCIDOS BILIARES ASBT EN EL DIAGNÓSTICO DEL CCA ... ¡Error! Marcador no definido.**

4.1.1. Expresión de ASBT humano en líneas celulares derivadas de CCA y HCC ..... **¡Error! Marcador no definido.**

4.1.2. Expresión de Asbt de rata en líneas celulares derivadas de CCA y HCC ..... **¡Error! Marcador no definido.**

4.1.3. Expresión de Asbt de rata en modelos animales de CCA y HCC ..... **¡Error! Marcador no definido.**

4.1.4. Expresión de ASBT humano en biopsias de CCA humano **¡Error! Marcador no definido.**

4.1.5. Expresión diferencial de ASBT humano en CCA y HCC **¡Error! Marcador no definido.**

**4.2. DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA DE TERAPIA GÉNICA PARA SUPERAR LA RESISTENCIA AL SORAFENIB EN EL CCA..... 95**

4.2.1. Evaluación de la expresión de OCT1 en iCCA y eCCA..... 96

4.2.2. Generación de modelos celulares de CCA con sobre-expresión de OCT1 97

4.2.3. Efecto de la expresión estable de OCT1 en líneas de CCA en el transporte y la sensibilidad del sorafenib ..... 99

4.2.4. Desarrollo de vectores adenovirales para inducir la expresión de OCT1 específicamente en el tejido tumoral..... 102

4.2.5. Efecto de OCT1 en la sensibilidad al sorafenib *in vivo* en un modelo de xenotrasplante ortotópico de CCA en el hígado ..... 109

**4.3. IMPLICACIÓN DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE SOX17 EN LA QUIMIORRESISTENCIA DEL CCA ..... ¡Error! Marcador no definido.**

4.3.1. Efecto de la expresión de SOX17 sobre la sensibilidad de células de CCA ..... **¡Error! Marcador no definido.**

4.3.2. Modulación de los mecanismos de quimiorresistencia (MOCs) mediada por SOX17..... **¡Error! Marcador no definido.**

4.3.3. Evaluación del mecanismo de quimiosensibilización de SOX17 ..... **¡Error! Marcador no definido.**

**4.4. UTILIDAD DE UNA ESTRATEGIA DE QUIMIOSENSIBILIZACIÓN DEL CCA BASADA EN LA SOBRE-EXPRESIÓN DE SOX17 MEDIANTE ADENOVIRUS ..... ¡Error! Marcador no definido.**

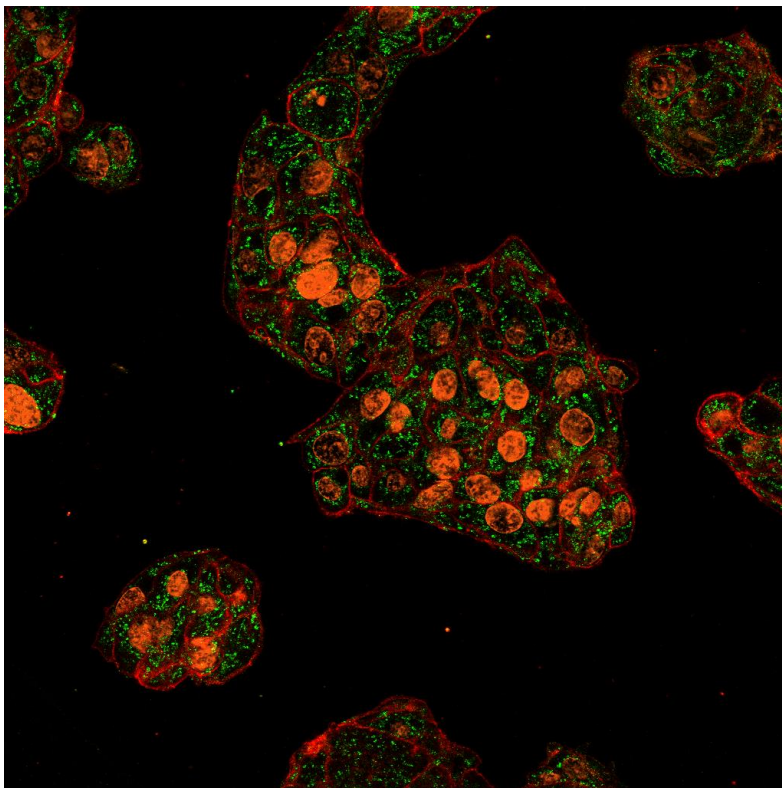
4.4.1. Evaluación de la eficacia de transducción *in vitro* de los adenovirus-*prBIRC5-SOX17*..... **¡Error! Marcador no definido.**

4.4.2. Efecto de SOX17 en la sensibilidad del CCA al 5-FU *in vivo*..... **¡Error! Marcador no definido.**

---

<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	110
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	110
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	110





# 1. Objetivos





El CCA derivado de los colangiocitos, es el segundo tipo de cáncer hepático primario maligno más frecuente, después del HCC. Presenta una incidencia creciente y una alta tasa de mortalidad debido, principalmente, a que se diagnostica en estadios avanzados de la enfermedad, cuando la resección quirúrgica del tumor no es posible. Además, el CCA se encuentra entre los tumores que peor responden a la quimioterapia disponible.

Identificar marcadores selectivos y diferenciales del CCA podría facilitar el diagnóstico precoz de estos pacientes, y así poder tomar a tiempo las medidas oportunas que hiciesen factible un mejor pronóstico. En este sentido, son candidatos con potencial como biomarcadores de CCA los transportadores de membrana que se expresa selectivamente en los colangiocitos, pero no en los hepatocitos sanos. Estudios preliminares han sugerido que uno de estos transportadores, el cotransportador apical de ácidos biliares y sodio ASBT, mantiene su expresión en las células colangiolares tumorales.

Por el contrario, un estudio previo de nuestro grupo de investigación ha descrito que en tumores hepáticos, tanto CCA como HCC, hay una caída de expresión del gen *SLC22A1*, que codifica para el transportador de cationes orgánicos OCT1 y que es el principal responsable de la captación de sorafenib. Este fármaco es un inhibidor de proteínas tirosina quinasas que se utiliza para el tratamiento del HCC. Debido a que la expresión de OCT1 es clave para la respuesta al sorafenib, restaurar su expresión en CCA podría ser una estrategia útil para mejorar la potencia antitumoral del fármaco en estos pacientes. Por otro lado, se ha descrito que el gen *BIRC5*, que codifica la proteína anti-apoptótica survivina, se encuentra sobre-expresado en los tumores hepáticos, mientras que su expresión en tejido sano es muy reducida. La diferente expresión de *BIRC5* entre tejido sano y tumoral sugiere que podrían desarrollarse estrategias de terapia génica dirigidas en las que la expresión del transgén de interés podría activarse específicamente en el tumor gracias al promotor de *BIRC5*.

El desarrollo del CCA está favorecido por la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas en los colangiocitos. Se ha demostrado que el factor de transcripción SOX17, antagonista de la vía de supervivencia Wnt/ $\beta$ -catenina y responsable de la diferenciación embrionaria del tracto biliar, actúa como gen supresor tumoral en CCA. De hecho, la restauración de sus niveles reprime el crecimiento tumoral del CCA tanto *in vitro* como *in vivo*. Puesto que se ha descrito un papel de otros miembros de la familia SOX como moduladores de la quimiorresistencia, sería

interesante estudiar si la caída de expresión de SOX17 está relacionada con la falta de respuesta a la quimioterapia en CCA.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos planteamos como **objetivo global de esta Tesis Doctoral** evaluar la utilidad de la proteína transportadora de membrana ASBT como marcador selectivo del CCA, así como investigar el potencial interés de restaurar los niveles de expresión de OCT1 y SOX17 mediante estrategias de terapia génica en este tipo de tumor para superar la quimiorresistencia.

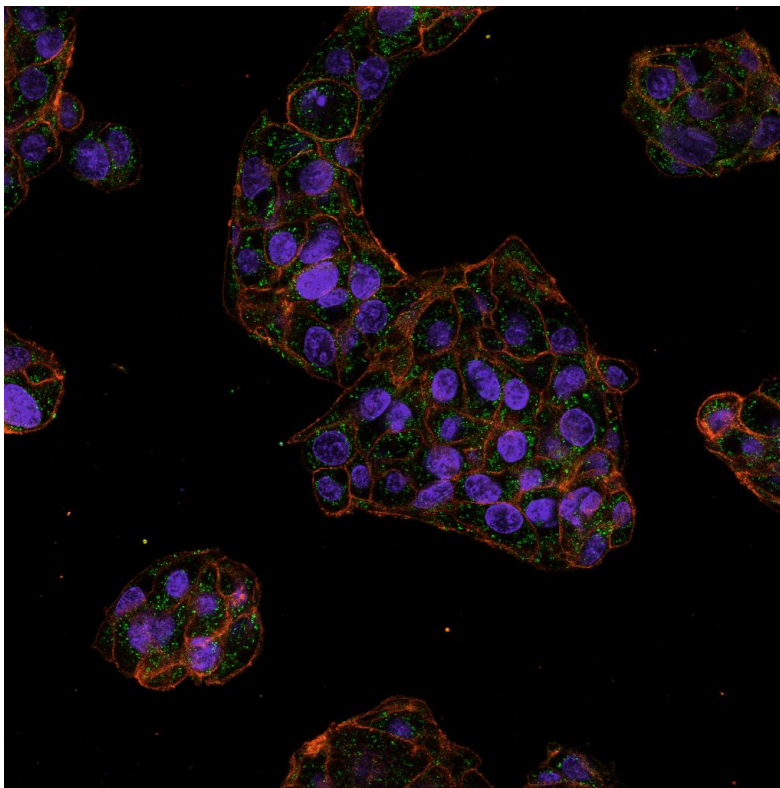
Para alcanzar dicho objetivo, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

**Objetivo 1:** Validar el papel de ASBT como marcador específico de CCA mediante el estudio de su presencia en tumores procedentes de modelos animales de CCA y HCC, así como en biopsias tumorales humanas de CCA y HCC.

**Objetivo 2:** Desarrollo y evaluación *in vivo* de una estrategia de terapia génica para la sobre-expresión controlada del transportador OCT1 con utilidad para mejorar la respuesta antitumoral al sorafenib en CCA.

**Objetivo 3:** Dilucidar el papel de SOX17 en la modulación de la sensibilidad a terapias antitumorales habituales en la clínica del CCA, así como su papel como regulador de la expresión de genes asociados a mecanismos de quimiorresistencia.

**Objetivo 4:** Desarrollo y evaluación *in vivo* de una estrategia de terapia génica para la sobre-expresión controlada de SOX17 con el fin de mejorar la respuesta del CCA a la quimioterapia.



## 2. Introducción



## 2.1. SISTEMA HEPATOBILIAR

### 2.1.1. Generalidades

El hígado es la víscera más voluminosa del organismo, representando alrededor del 2,5% del peso corporal total. Se trata de uno de los órganos con mayor actividad metabólica. Recibe sangre oxigenada de la arteria hepática, mientras que la vena porta provee sangre rica en nutrientes procedente del tracto gastrointestinal y del bazo. El hígado filtra esta sangre y después la devuelve a la circulación sistémica a través de la vena hepática.

Alrededor del 60% de las células del hígado son hepatocitos, células epiteliales parenquimales que se disponen dejando espacios vasculares heterogéneos denominados sinusoides. Las membranas plasmáticas de dos hepatocitos vecinos delimitan un pequeño espacio denominado canalículo biliar, donde se genera la bilis primaria que será finalmente vertida al conducto biliar. Otros tipos celulares importantes en el hígado son los colangiocitos, las células de Kupffer o macrófagos residentes hepáticos, las células endoteliales y las células hepáticas estrelladas, entre otros.

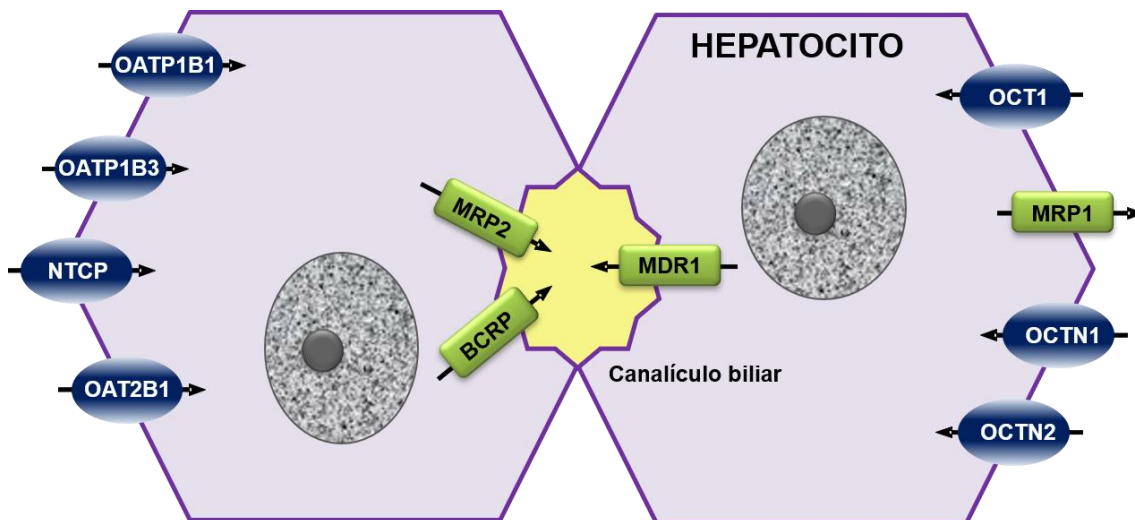
El sistema biliar está constituido por las unidades secretoras del hígado, el canalículo biliar, ductulos biliares (canales de Hering), los ductos biliares intrahepáticos y extrahepáticos, el conducto hepático común, el conducto cístico, la vesícula biliar y el conducto biliar común. Algunos vertebrados tienen vesícula biliar, cuya función es almacenar la bilis secretada por el hígado hasta que un estímulo activa su liberación al duodeno (Tabibian JH *et al.* 2013).

Anatómicamente, los conductos biliares están dispuestos de forma paralela con una rama de la vena porta y con una o dos ramas de la arteria hepática, dando sentido anatómico a la asociación representada en la microarquitectura hepática como la triada portal.

### 2.1.2. Hepatocitos

Los hepatocitos son las células mayoritarias del hígado y llevan a cabo la mayoría de las funciones metabólicas de este órgano. Presentan una polaridad muy marcada, distinguiéndose tres regiones morfológica y funcionalmente muy diferentes: i) la membrana sinusoidal o basolateral (orientada hacia el polo sanguíneo), ii) la membrana lateral (con estructuras de unión intercelular como “tight junctions” o desmosomas) y iii) la membrana canalicular o apical (con numerosas microvellosidades orientadas hacia la luz del canalículo biliar).

Los hepatocitos expresan un gran número de transportadores de membrana que participan en la captación o exportación de compuestos de diversa naturaleza tanto endógenos como xenobióticos, como por ejemplo los ácidos biliares o fármacos. En la membrana basolateral se encuentra el cotransportador de ácidos biliares acoplado al transporte de sodio (NTCP), los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP1B1, OATP1B3 y OATP2B1) (Hagenbuch B y Meier PJ 1994; Fahrmayr C *et al.* 2010), el transportador de cationes orgánicos 1 (OCT1), y los transportadores de cationes orgánicos con un sitio de unión a los nucleótidos (OCTN1 y OCTN2) (Jetter A y Kullak-Ublick GA 2019), entre otros (Figura I-1).



**Figura I-1.** Esquema de las proteínas transportadoras, tanto de entrada como de salida, expresadas en la membrana canalicular y basolateral de los hepatocitos humanos.

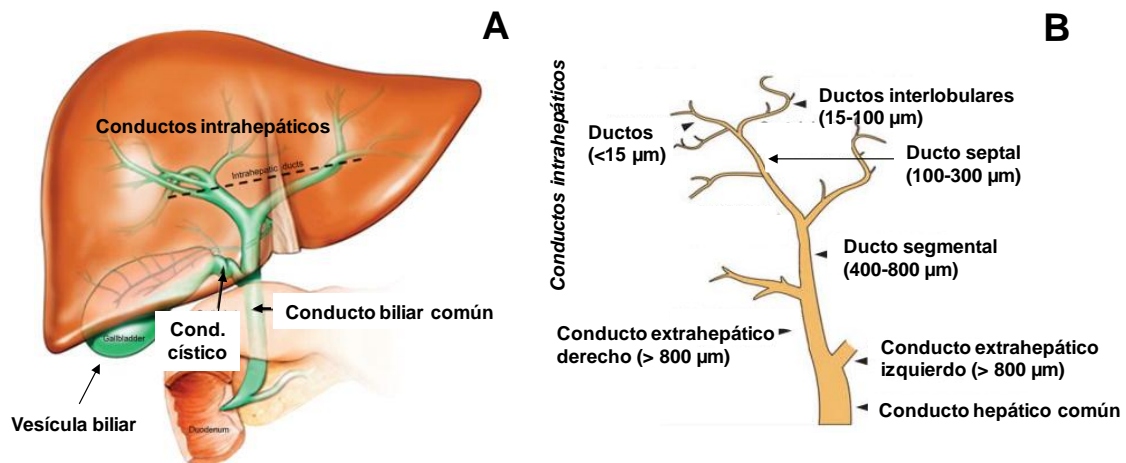
La membrana apical presenta un transportador de sales biliares dependiente de ATP (BSEP); el transportador de aniones orgánicos MRP2; los transportadores MDR1 y MDR3, y BCRP (Treyer A y Musch A 2013; Jetter A y Kullak-Ublick GA 2019) (Figura I-1).

### 2.1.3. Colangiocitos

Los colangiocitos son células epiteliales que recubren los conductos intrahepáticos y extrahepáticos del árbol biliar y representan una pequeña proporción de la población celular del hígado (entre un 3 y un 5%). Su principal función consiste en modificar la composición de la bilis derivada de los hepatocitos, un proceso complejo regulado por hormonas, péptidos, nucleótidos, neurotransmisores y otras moléculas (Tabibian JH *et al.* 2013).

El sistema biliar es un entramado tridimensional formado por conductos tubulares de diferente tamaño que están divididos en dos compartimentos anatómicos

y funcionales diferentes: el sistema intrahepático y extrahepático (Ludwig J 1987). Los ductos biliares intrahepáticos de menor calibre ( $<15 \mu\text{m}$ ) se fusionan para formar conductos de mayor diámetro (desde  $15 \mu\text{m}$  a  $>800 \mu\text{m}$ : ductos interlobulares>ductos septales>ductos segmentales) hasta que convergen en los ductos biliares extrahepáticos, los cuales finalmente vierten la bilis al conducto biliar común, a la vesícula biliar (excepto en rata y otros animales que carecen de ella) y, posteriormente, al intestino (Ludwig J 1987; Tabibian JH *et al.* 2013). Así, la estructura del epitelio biliar se puede asemejar a la forma de un árbol donde los conductos común y hepático representarían el tronco, los conductos intrahepáticos corresponderían a las ramas más grandes y los pequeños ductos serían las ramas más pequeñas (Masyuk TV *et al.* 2001) (Figura I-2).



**Figura I-2.** Arquitectura del sistema biliar. El sistema biliar se compone de conductos interconectados y divididos entre la región intrahepática (por encima de la línea discontinua) y extrahepática (por debajo de la línea discontinua) donde están el conducto biliar común y la vesícula (A). El árbol biliar comienza con los ductos intrahepáticos más pequeños ( $<15 \mu\text{m}$ ), que se fusionan entre sí para dar lugar a conductos intrahepáticos de distinto tamaño y llegar finalmente al conducto biliar común, que vierte la bilis al duodeno (B). (Adaptado de (Tabibian JH *et al.* 2013)).

El tamaño de los colangiocitos suele ser proporcional al calibre de los conductos que revisten. Los ductos intrahepáticos pequeños están rodeados por 4 ó 5 colangiocitos pequeños, mientras que los conductos intrahepáticos mayores y los extrahepáticos pueden estar revestidos por hasta 40 colangiocitos grandes (Tabibian JH *et al.* 2013). Otra diferencia entre colangiocitos intra- y extrahepáticos es su procedencia, ya que los primeros derivan de la diferenciación de los hepatoblastos (derivados de la parte superior del divertículo hepático del endodermo), al igual que los hepatocitos, mientras que los segundos proceden directamente de la región distal del divertículo hepático endodérmico (Raynaud P *et al.* 2011).

Los colangiocitos son células epiteliales con un núcleo multilobulado, numerosas vesículas en la región subapical, alta densidad de microvellosidades en la membrana apical, muchos lisosomas, y pocas mitocondrias (Benedetti A *et al.* 1996). Además, se ha descrito que los colangiocitos también poseen un cilio primario en su membrana apical (Ishii M *et al.* 1989; Larusso NF y Masyuk TV 2011) que desempeña funciones sensoriales y regula las actividades biológicas de estas células, incluyendo la diferenciación celular, la proliferación y la secreción (Masyuk TV *et al.* 2003).

Al igual que en los hepatocitos, en los colangiocitos también se distingue una membrana apical (orientada hacia la luz biliar) y una membrana basolateral (orientada hacia la circulación sanguínea); y entre células adyacentes se observan “tight junctions” que permiten preservar la polaridad de estas células (Vroman B y LaRusso NF 1996). Expresan diversos transportadores que permiten la captación y/o expulsión de iones, agua y otras moléculas para modificar la composición de la bilis. Concretamente, en la membrana apical de los colangiocitos se encuentra ASBT, el transportador de sales biliares dependiente de sodio del que se hablará más adelante en esta Tesis Doctoral.

#### **2.1.4. Otros tipos celulares**

En el hígado co-existen otros tipos celulares con los hepatocitos y los colangiocitos, que desempeñan funciones muy determinadas. Entre ellos se encuentran las células endoteliales fenestradas, que recubren los sinusoides hepáticos y permiten un intercambio directo entre la sangre y los hepatocitos, las células hepáticas estrelladas o células de Ito, que almacenan vitamina A, sintetizan diferentes proteínas del tejido conectivo y secretan diferentes factores de crecimiento; y las células de Kupffer, responsables de la fagocitosis de bacterias y sustancias extrañas que acceden al sinusoides (Hall JE 2016).



## 2.2. FUNCIONES DEL SISTEMA HEPATOBILIAR

El hígado desempeña múltiples funciones en el organismo, destacando su participación en el metabolismo:

- Metabolismo de los hidratos de carbono: homeostasis de la glucosa, catabolismo de hexosas, gluconeogénesis, glucogenolisis y glucogenogénesis.
- Metabolismo de lípidos: síntesis y catabolismo del colesterol, producción de triglicéridos y ácidos grasos, síntesis y metabolismo de lipoproteínas plasmáticas,  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y producción de cuerpos cetónicos durante el ayuno.
- Metabolismo de proteínas: síntesis de proteínas como la albúmina y las de fase aguda, además de proteínas de unión a hormonas o esteroides, transformación del amonio en urea, catabolismo de bases púricas y pirimidínicas e interconversión de aminoácidos (aa) no esenciales.

Además de las funciones metabólicas el hígado participa en:

- Producción de bilis: el hígado excreta la bilis al duodeno, donde desempeña un papel fundamental en la digestión y absorción de grasas y vitaminas liposolubles.
- Síntesis de factores de coagulación, como el fibrinógeno, factores III, V, VII, IX y XI, del grupo hemo y del factor de crecimiento IGF-1.
- Almacén de múltiples sustancias como glucosa en forma de glucógeno, vitamina B12, hierro y cobre.
- Destoxificación y otras reacciones de biotransformación.
- Función inmunitaria por la actividad de las células de Kupffer.

## 2.3. CÁNCER HEPÁTICO

El cáncer hepático es el quinto tipo de cáncer más frecuente y constituye la tercera causa de muerte por cáncer (Llovet JM *et al.* 2016; Torre LA *et al.* 2016). En general, los tumores hepáticos son más frecuentes en hombres que en mujeres y se pueden clasificar según su origen en: i) primarios, derivados de células hepáticas y; ii) secundarios, debidos a metástasis de tumores originados en otros tejidos, mayoritariamente tumores colorrectales (Benson AB, 3rd 2007). Entre los tumores hepáticos primarios se encuentran el carcinoma hepatocelular (HCC), derivado de

hepatocitos, el hepatoblastoma (HB), que procede de precursores hepáticos o hepatoblastos y que se desarrolla en niños, y el colangiocarcinoma (CCA), derivado de colangiocitos. En algunas ocasiones aparecen tumores mixtos HCC-CCA, que combinan características de ambos tipos, aunque su frecuencia es muy baja, entre un 1 y un 4% de los tumores hepáticos primarios (Aoki K *et al.* 1993; Maeda T *et al.* 1995).

Además, existen otros menos frecuentes, como el hemangioma, el adenoma colangiocelular, el cistadenoma biliar, el adenoma hepatocelular o el hemangioendotelioma infantil, entre otros.

### **2.3.1. Carcinoma hepatocelular (HCC)**

El HCC representa aproximadamente el 90% de los tumores hepáticos primarios (Llovet JM *et al.* 2016). Se caracteriza por tener un mal pronóstico, principalmente porque se suele diagnosticar en una fase avanzada de la enfermedad, es frecuente que haya una cirrosis subyacente y es muy resistente a la quimioterapia (McGlynn KA *et al.* 2015).

#### **2.3.1.1. Epidemiología**

El HCC es más común en hombres que en mujeres, con una proporción de 2,4:1 a nivel mundial. La edad media de los pacientes en el momento del diagnóstico del HCC es alrededor de los 50 años. La prevalencia del HCC es mayor en los países asiáticos y africanos y menor en los países más desarrollados, exceptuando algunos como Japón, Italia y Francia. La incidencia del HCC está aumentando en algunas regiones del mundo, en concreto, EE.UU. ha experimentado un incremento del 43%, pasando de 7,2 a 10,3 muertes por cada 100.000 habitantes entre 2000 y 2016 (Xu J 2018).

#### **2.3.1.2. Factores de riesgo**

La mayoría de los casos de HCC se desarrollan a partir de una enfermedad hepática crónica. La cirrosis alcohólica y las infecciones por virus de la hepatitis B y C (VHB y VHC) han sido globalmente consideradas como los principales factores de riesgo del HCC. Sin embargo, como consecuencia de la vacunación efectiva frente al VHB y del desarrollo de agentes antivirales de acción directa (AADs) contra el VHC, los casos de HCC por infecciones víricas están disminuyendo (Villanueva A 2019). A pesar de ello, algunos trabajos han sugerido que el tratamiento con AADs está asociado al desarrollo temprano de HCC. Recientemente se ha publicado un estudio que describe la relación entre el tratamiento con AAD en pacientes cirróticos con VHC y la aparición del HCC (Marino Z *et al.* 2019). Aunque un 95,2% de los pacientes respondieron completamente al tratamiento antiviral, la tasa de aparición de HCC a corto plazo

aumentó significativamente, ya que 72 pacientes desarrollaron HCC en apenas 10,3 meses de media tras el inicio de este tratamiento.

Con menor frecuencia, también se ha asociado el desarrollo de HCC con la exposición a aflatoxinas o a agua contaminada con toxinas de algas azulverdosas, con el consumo de nuez de betel y con el tabaquismo.

Se ha demostrado que el daño hepático crónico por consumo elevado de alcohol y el síndrome metabólico conducen secuencialmente a un mayor riesgo de esteatosis, esteatohepatitis, cirrosis y finalmente a HCC (Recio-Boiles A *et al.* 2019). De hecho, hay estudios que muestran que la incidencia del HCC por enfermedad de hígado graso no alcohólica/esteatohepatitis no alcohólica (NAFLD/NASH) está aumentando en la población occidental (Younossi ZM *et al.* 2015; Kim GA *et al.* 2017) y, por tanto, podría convertirse en el principal factor de riesgo de HCC.

### **2.3.1.3. Diagnóstico**

El HCC tiene una evolución silenciosa de forma que, en la mayoría de los casos, los síntomas cénicos (malestar general, dolor abdominal, hepatomegalia, ictericia, pérdida de peso y fiebre) aparecen en una etapa muy avanzada de la enfermedad (Llovet JM *et al.* 2008a).

El diagnóstico del HCC se basa principalmente en técnicas de imagen y pruebas de laboratorio, junto con el estudio de la historia clínica del paciente. Las técnicas de imagen más empleadas son la ecografía, la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM), siendo las dos últimas decisivas para diagnosticar el HCC en un paciente con cirrosis. Estas pruebas son habitualmente complementadas con la detección de marcadores tumorales en suero, como la  $\alpha$ -fetoproteína (AFP), la fracción de lectina AFP (AFP-L3) y la des- $\gamma$ -carboxiprotombina (DCP) y, cuando es posible obtener una biopsia del tumor, se realiza un análisis de anatomía patológica y se determinan por inmunohistoquímica marcadores para confirmar el diagnóstico, como HepPar-1, glicpican-3, "heat shock protein 70" (HSP70) y glutamina sintasa (Libbrecht L *et al.* 2006; Tremosini S *et al.* 2012).

### **2.3.1.4. Patogenia**

La hepatocarcinogénesis es un proceso complejo de varias etapas, que frecuentemente comienza en el contexto de una cirrosis hepática. El HCC puede originarse a partir de la transformación maligna de hepatocitos o de células madre y es el resultado de la acumulación de alteraciones somáticas del ADN en las células, incluyendo mutaciones y polimorfismos cromosómicos.

Entre las mutaciones somáticas destacan las que afectan al promotor del gen de la telomerasa, *TERT*, que se han descrito en el 60% de los HCC (Schulze K *et al.* 2016). Otras mutaciones afectan a genes relacionados con el ciclo celular, como el *TP53*, que se encuentran en el 30% de los HCCs, activación de cascadas de señalización como JAK/STAT o la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina (*CTNNB1* y *AXIN1*, en el 30% y 10% de HCCs, respectivamente), o modificaciones en la estructura de la cromatina y alteraciones epigenéticas (*ARID1A* y *ARID2*, en el 10% y 5% de los casos aproximadamente) (Llovet JM *et al.* 2016; Villanueva A 2019).

### 2.3.1.5. Tratamiento

Los tratamientos disponibles para el HCC se pueden dividir en dos tipos: potencialmente curativos (resección quirúrgica, trasplante hepático y ablación) o paliativos (quimioembolización transarterial (TACE) y quimioterapia).

La elección del tratamiento depende del estadio tumoral, habitualmente determinado siguiendo el sistema de estadificación BCLC, “Barcelona Clinic Liver Cancer”, propuesto por el Hospital Clínico de Barcelona (Bruix J y Sherman M 2011). Así, los pacientes con HCC en fases iniciales del desarrollo se someten a resección completa del tumor o trasplante de hígado, cuando hay donante. Sin embargo, las opciones terapéuticas para el HCC avanzado son limitadas; ya que estos pacientes no son elegibles para cirugía o trasplante hepático y no hay muchos tratamientos farmacológicos efectivos disponibles, puesto que estos tumores suelen presentar una elevada quimiorresistencia.

El sorafenib, un inhibidor oral de varios receptores con actividad tirosina quinasa, es actualmente el fármaco de elección para el tratamiento farmacológico del HCC avanzado (Llovet JM *et al.* 2008b). Otro inhibidor multi-quinasa, el lenvatinib, ha sido recientemente aprobado por la FDA (“Food and Drug Administration”) para el tratamiento del HCC no operable. En un ensayo clínico de fase III, los pacientes con HCC avanzado tratados con lenvatinib oral (8 mg/día en personas con un peso corporal <60 kg o 12 mg/día con peso corporal  $\geq$ 60 kg) mostraron una supervivencia de 13,6 meses, un poco superior a la que presentaron los pacientes tratados con sorafenib oral (12,6 meses) (Kudo M *et al.* 2018). Otros fármacos, como el regorafenib (Bruix J *et al.* 2013), cabozantinib (Abou-Alfa GK *et al.* 2018) y ramacicirumab (Zhu AX *et al.* 2019) han sido aprobados recientemente como segunda línea de tratamiento farmacológico para el HCC.

Finalmente, la inmunoterapia también está obteniendo buenos resultados en aquellos pacientes que no responden al sorafenib. El nivolumab es un anticuerpo

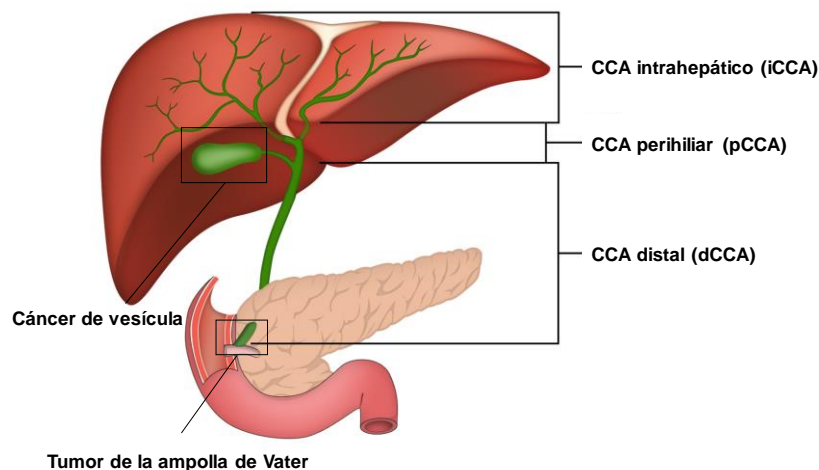
monoclonal humano diseñado frente al receptor PD-1 (“programmed cell death protein-1”) que, cuando interacciona con su ligando, el PD-L1, desencadena una cascada de señales que suprime la activación de los linfocitos T frente a agentes extraños, como las células tumorales. El nivolumab ha sido probado en personas con HCC avanzado en el ensayo clínico denominado CheckMate 040 (NCT01658878), en el que el 20% de los pacientes respondieron al tratamiento y el 45% mantuvo la enfermedad en fase estable (El-Khoueiry AB *et al.* 2017).

### 2.3.2. Colangiocarcinoma (CCA)

El colangiocarcinoma (CCA) incluye un grupo heterogéneo de tumores que derivan de células de las vías biliares y representa el segundo tipo de cáncer hepático primario más frecuente, después del HCC (Banales JM *et al.* 2016).

Según la localización anatómica del tumor se clasifican en i) CCA intrahepático (iCCA), producido a partir de pequeños conductos biliares en el hígado, y dos tipos de CCA extrahepático (eCCA), ambos producidos en el epitelio del árbol biliar extrahepático: ii) perihiliar (pCCA), desarrollado en el tramo de conductos a la salida del hígado y iii) distal (dCCA), en zonas del conducto biliar más alejadas del hígado. Además del CCA, existen otros dos tipos de cáncer que afectan al tracto biliar; el cáncer de vesícula y los tumores malignos de la ampolla de Vater (Figura I-3).

En base al patrón de crecimiento macroscópico del tumor, los CCAs se clasifican en: i) formadores de masa, ii) periductales infiltrantes, y iii) intraductales, siendo los primeros los más frecuentes.



**Figura I-3.** Clasificación de los tumores de las vías biliares en función de su localización anatómica en colangiocarcinoma intrahepático (iCCA), perihiliar (pCCA) y distal (dCCA), cáncer de vesícula y tumores de la ampolla de Vater.

El CCA es en general asintomático en los estadios iniciales, por lo que en la mayoría de los casos se diagnostica en etapas avanzadas de la enfermedad, cuando la cirugía, el único tratamiento potencialmente curativo, no es ya una opción factible. Aunque se ha investigado la eficacia del trasplante para pacientes con CCA con determinadas características, de momento, los pacientes con CCA avanzado no son los principales candidatos para esta técnica. La quimioterapia disponible no es muy efectiva debido a la marcada quimiorresistencia del CCA (Marin JJG *et al.* 2017). Todo ello explica por qué el pronóstico para estos pacientes es tan funesto en el momento del diagnóstico, con una supervivencia menor de 12 meses.

### **2.3.2.1. Epidemiología**

El CCA supone entre el 10-25% de las neoplasias hepatobiliares primarias y aproximadamente el 3% de todas las neoplasias gastrointestinales. Es ligeramente más común en hombres que en mujeres y, a nivel mundial, los pacientes diagnosticados son, normalmente, mayores de 65 años (Macias RI 2014; Banales JM *et al.* 2016).

Aunque en la mayoría de los países el CCA sea una enfermedad rara, con <3 casos por cada 100.000 habitantes, su incidencia es excepcionalmente más elevada en algunas regiones de Asia (Corea del Sur y Tailandia) y América del Sur (Chile) (Fitzmaurice C *et al.* 2018). Estas variaciones intercontinentales se deben principalmente a la mayor incidencia de ciertos factores de riesgo en dichas zonas.

En general, la tasa de mortalidad del iCCA en Europa ha experimentado un incremento progresivo en los últimos años, mientras que el número de muertes por eCCA, tanto pCCA como dCCA, tiende a decrecer (Fitzmaurice C *et al.* 2018). Este hecho puede asociarse a que cada vez el diagnóstico es más precoz, gracias al desarrollo de técnicas de imagen más potentes, a los avances en cirugía y a una mejor clasificación de los pacientes. De hecho, aún existen dificultades para diagnosticar de forma precisa el iCCA y esto podría haber subestimado la verdadera incidencia de este tipo de tumor (Blechacz BR y Gores GJ 2008).

### **2.3.2.2. Factores de riesgo**

Al contrario que el HCC, que habitualmente va ligado a la aparición previa de una cirrosis hepática, la mayoría de los CCAs se desarrollan *de novo*, sin una causa subyacente aparente (Forner A *et al.* 2019). A pesar de ello, se ha encontrado una asociación clara con varios factores de riesgo, algunos generales, como la edad (>65 años), la obesidad o el consumo del alcohol.

La colangitis esclerosante primaria (PSC) es el mayor factor predisponente para el CCA, especialmente el pCCA en Europa, aunque *a priori* sea una enfermedad rara. En concreto, el riesgo de padecer CCA para un paciente con PSC es del 13% (Ghourri YA *et al.* 2015). Las infecciones parasitarias por trematodos hepatobiliares de las especies *O. viverrini* y *C. sinensis* son otro de los factores de riesgo bien establecidos para el CCA. De hecho, la incidencia del CCA es elevada en regiones del este de Asia, donde la infección por estos parásitos es común (Macias RI 2014).

Estudios recientes han demostrado una asociación entre el CCA y el síndrome metabólico, lo que podría justificar el aumento en la incidencia del CCA en países occidentales, donde un porcentaje elevado de la población sufre de diabetes mellitus u obesidad (Welzel TM *et al.* 2011; Khan SA *et al.* 2019).

Por otro lado, el CCA también puede desarrollarse en un contexto de inflamación crónica, obstrucción de los conductos intrahepáticos biliares (hepatolitiasis) y malformaciones congénitas biliares, como la enfermedad de Caroli (Banales JM *et al.* 2016).

Finalmente, otros factores de riesgo incluyen las infecciones virales, procedimientos post-quirúrgicos, como anastomosis bilio-digestivas, y la exposición a factores químicos como asbestos o el agente de contraste thorotrast ya retirado del uso clínico por esta causa (Banales JM *et al.* 2016).

### 2.3.2.3. Diagnóstico

Las manifestaciones clínicas del CCA, que dependen de la localización del tumor y no son específicas, incluyen dolor abdominal, pérdida de peso y debilidad, además de ictericia, prurito y coluria relacionadas con la obstrucción biliar (Farhat MH *et al.* 2008). Si el CCA se localiza en el conducto biliar común o conducto hepático, la ictericia asociada con la obstrucción puede ocurrir en estadios iniciales, sin embargo, si se trata de iCCA o pCCA, generalmente la ictericia se manifiesta en estadios más tardíos.

La inespecificidad de los síntomas del CCA unido a que se manifiestan en etapas avanzadas del desarrollo tumoral hace que actualmente el diagnóstico temprano del CCA siga siendo un reto.

El diagnóstico del CCA se basa en la combinación de datos clínicos, radiológicos, bioquímicos e histológicos (Tabla I-1). Las técnicas de diagnóstico por imagen juegan un papel muy importante en el diagnóstico, estadificación, seguimiento y predicción de respuesta al tratamiento del CCA (Forner A *et al.* 2019). La más utilizada es la colangiografía, que es especialmente útil en el caso del eCCA (Gores GJ 2000).



La TC y RM son utilizadas para estudiar la localización y extensión del tumor y, en algunos casos, pueden ayudar a distinguir el iCCA del HCC en tumores de >2 cm (Rimola J *et al.* 2009).

**Tabla I-1.** Síntomas y métodos de diagnóstico para el iCCA, pCCA y dCCA.

	iCCA	pCCA	dCCA
<b>Síntomas</b>	No específicos: dolor abdominal, pérdida de peso y debilidad		
	Obstrucción biliar, ictericia, prurito y colangitis		
<b>Técnicas de imagen</b>	TC y RM		
		CPT	CER
<b>Marcadores</b>	No específicos, ni selectivos. En suero: CA 19-9, CEA y CA125 En tejido: CK-7, CK-19. Candidatos: CYFRA21-1, MUC5AC, CA242, etc.		

Abreviaturas: CA, antígeno carbohidrato; iCCA, colangiocarcinoma intrahepático; pCCA, colangiocarcinoma perihilar; dCCA, colangiocarcinoma distal; CEA, antígeno carcinoembrionario; CER, colangiopancreatografía endoscópica retrógrada; CK, citoqueratina; CPT, colangiografía percutánea transarterial; CYFRA32, fragmento soluble de la CK-19; MUC5AC, glicoproteína secretora mucina-5AC; RM, resonancia magnética; TC, tomografía computerizada.

#### 2.3.2.4. Biomarcadores de CCA

Actualmente, ninguno de los marcadores que se pueden determinar en el tejido tumoral o en los fluidos corporales tienen una elevada precisión para el diagnóstico del CCA. El antígeno carcinoembrionario (CEA) y los antígenos carbohidrato CA19-9 y CA125 que son utilizados en clínica como marcadores séricos del CCA, no son suficientemente específicos para un diagnóstico precoz (Macias RIR *et al.* 2018). El CA19-9 puede resultar útil en pacientes con PSC, puesto que niveles en suero >130 U/ml tiene una sensibilidad y especificidad del 79% y 98%, respectivamente, como indicadores de la presencia de CCA (Levy C *et al.* 2005). Sin embargo, este marcador puede elevarse también en casos de colestasis y obstrucción biliar benigna, y es además indetectable en pacientes que no presentan el antígeno Lewis sanguíneo (7% individuos) (Levy C *et al.* 2005).

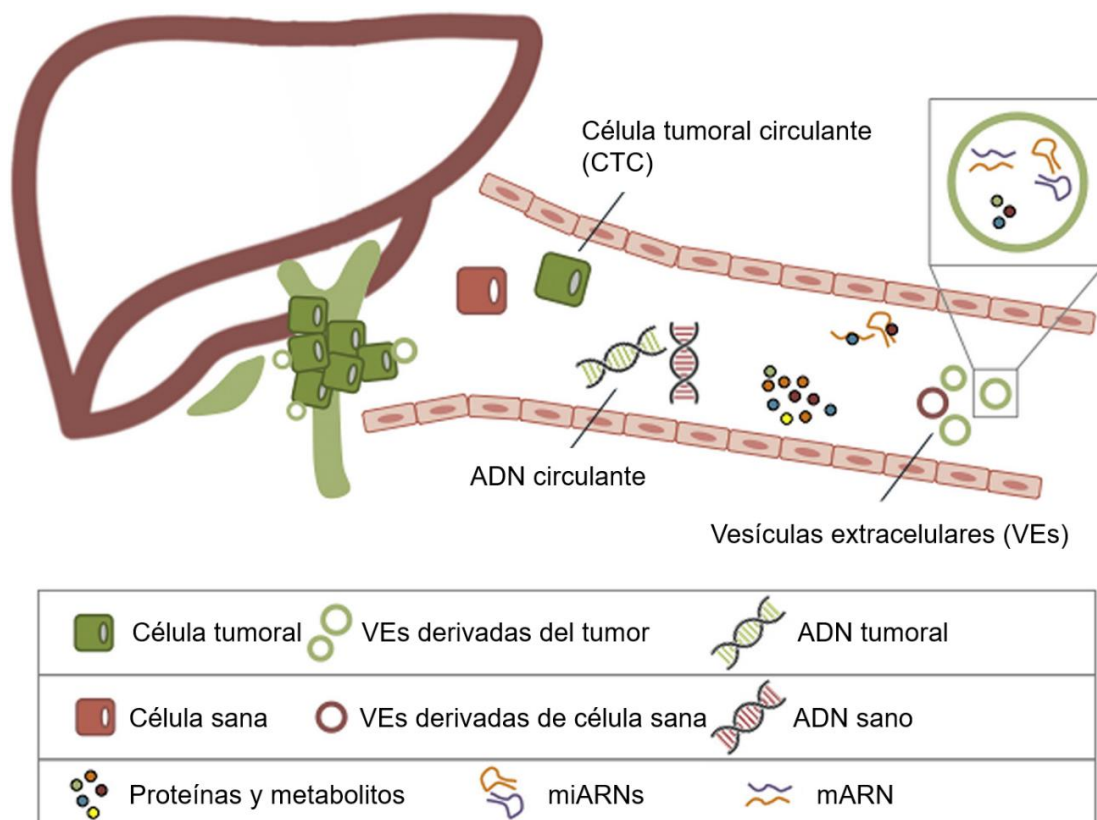
Otro aspecto importante de los biomarcadores es su capacidad de discriminar el iCCA del HCC y de otras hepatopatías (cáncer de vesícula o metástasis de páncreas). Los valores de CA19-9 y CA242 en suero tienden a ser superiores en CCA, mientras que la AFP y el glipican-3 aumentan en HCC (Tangkijvanich P *et al.* 2010; Tao LY *et al.* 2010). Asimismo, el análisis por inmunohistoquímica del perfil de expresión de



citoqueratinas (CK-7<sup>+</sup>, CK-19<sup>+</sup> y CK-20<sup>-</sup>) combinado con la expresión del marcador de hepatocitos HepPar-1 (negativo en CCA) puede ayudar a distinguir entre un CCA y un HCC (Banales JM *et al.* 2016).

Debido a la escasa utilidad de los biomarcadores disponibles para el diagnóstico del CCA, se están realizando muchos esfuerzos en identificar nuevos marcadores tumorales. Hasta la fecha, se han propuesto numerosos biomarcadores en suero (CYFRA 21-1, tripsinógeno-2, mucina-5AC) y en bilis (IGF-1, miARNs), pero ninguno de ellos ha resultado tener valores de sensibilidad y especificidad suficientes como para implantar su uso clínico (Alvaro D 2009; Andresen K *et al.* 2015).

Recientemente, se han desarrollado métodos de análisis a gran escala para cuantificar niveles de expresión génica, proteínas y metabolitos en tejido y fluidos biológicos. Estas nuevas tecnologías “ómicas” han permitido ampliar el concepto de biomarcador, comúnmente referido a la expresión de proteínas en tejido o metabolitos circulantes, a otras moléculas como miARNs, vesículas extracelulares (VEs), células tumorales circulantes (CTCs) o metabolitos (Figura I-4).



**Figura I-4.** Biomarcadores circulantes en CCA. Se pueden detectar diferentes tipos de biomarcadores en la circulación periférica: células tumorales circulantes (CTCs) que se han escindido del tumor, vesículas extracelulares (VEs), que pueden transportar ácidos nucleicos y proteínas, ADN y ARN libre-circulante, y proteínas y metabolitos secretados por las células tumorales. (Modificada de (Macias RIR *et al.* 2018)).

Se ha descrito una sobre-expresión significativa del miARN miR-21 en biopsias de CCA en comparación con hígado sano, que además se ha asociado con un peor pronóstico y menor supervivencia (Selaru FM *et al.* 2009; Wang LJ *et al.* 2015a). Asimismo, los niveles circulantes del miR-21 en suero ayudaron a discriminar entre pacientes con iCCA (n=74) e individuos sanos (n=74), con una sensibilidad del 87,8% y especificidad del 90,5% (Wang LJ *et al.* 2015a). Otros miARNs como el miR-26a en suero y el miR-150 en plasma también se encuentran elevados en CCA (Wang LJ *et al.* 2015b; Wang S *et al.* 2015).

Las VEs son vesículas de membrana secretadas por la célula que están presentes en los fluidos biológicos y contienen distintos tipos de moléculas, como ADN, miARNs, proteínas o lípidos. Según su tamaño pueden dividirse en exosomas (<150 nm), que se producen como resultado de la exocitosis de vesículas generadas dentro de la célula, microvesículas extracelulares (40 nm - 1 µm) procedentes de la membrana plasmática, y cuerpos apoptóticos (100 nm - 5 µm). Un estudio reciente ha identificado varias proteínas en las VEs procedentes del suero de pacientes con CCA que se expresan de forma diferencial al compararlas con el suero de pacientes de PSC, HCC o controles sanos y que han sido propuestas como nuevos potenciales marcadores (Arbelaiz A *et al.* 2017). En otro estudio reciente la concentración de microvesículas que expresan AnexinaV, EpCAM y ASGPR1 en el suero de pacientes con CCA y HCC fue significativamente distinta a la encontrada en muestras de pacientes con cirrosis e individuos sanos (Julich-Haertel H *et al.* 2017).

Recientemente nuestro grupo, en colaboración con otros centros, ha llevado a cabo un análisis masivo de los metabolitos presentes en el suero de pacientes con iCCA, HCC, PSC y sujetos sanos (Banales JM *et al.* 2018). Los resultados han permitido desarrollar un algoritmo basado en los niveles séricos de glicina, ácido aspártico, esfingomielina (42:3) y esfingomielina (43:2) que permite discriminar de forma precisa entre pacientes con iCCA y con HCC (sensibilidad: 75%, especificidad: 90%). Por otro lado, la combinación de fosfatidilcolina (34:3) e histidina permitía diferenciar PSC de iCCA con elevada sensibilidad: 100% y especificidad: 70% (Banales JM *et al.* 2018).

Aunque se haya evaluado poco la potencial utilidad de la presencia de CTCs para determinar el pronóstico de los pacientes de CCA, se ha descrito que el número de CTCs presentes en suero puede correlacionar con la supervivencia general del CCA (Yang JD *et al.* 2016; Iyer RV *et al.* 2018).

Cabe esperar que en los próximos años se conozca la posible utilidad de las CTCs y todas estas nuevas estrategias en el diagnóstico del CCA.

### 2.3.2.5. Patogenia

Los CCAs pueden tener distintas células de origen (Komuta M *et al.* 2012), como células “stem” hepáticas, colangiocitos inmaduros NCAM<sup>+</sup>, y células de las glándulas peribiliares (Cardinale V *et al.* 2012). Este tipo de tumor se ha considerado clásicamente como una enfermedad *de novo* ya que no se conocen con precisión los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del mismo.

Numerosos estudios apuntan a que la inducción del CCA está relacionada con alteraciones genéticas y epigenéticas presentes en las células tumorales, así como con cambios en el microambiente tumoral relacionados con la inflamación. Estas anomalías pueden desencadenar la activación aberrante de rutas de señalización responsables de la iniciación y progresión del CCA (Fouassier L *et al.* 2019).

#### Genética y epigenética

Mediante estudios de secuenciación masiva se han identificado en CCA mutaciones somáticas en oncogenes, como *KRAS*, *PI3KCA* y *MET*, y en genes supresores tumorales, como *TP53* o *SMAD4*, además de genes modificadores de la cromatina, como *ARID1A*, *BAP1* y *PBMR1* (Fouassier L *et al.* 2019). Recientemente, se han descrito mutaciones oncogénicas en la proteína de fusión del factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGFR2) exclusivamente en los pacientes con iCCA y con una incidencia del 10-15% (Rizvi S y Borad MJ 2016). También se ha encontrado un aumento en los niveles de expresión del receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) y de los receptores del factor de crecimiento epidérmico humano-2 (Neu/HER2) y hepatocitario (HGF o c-MET), especialmente en pacientes con mal pronóstico (Miyamoto M *et al.* 2011; Andersen JB *et al.* 2012; Pellat A *et al.* 2018).

Por otra parte, se han descrito varias mutaciones recurrentes en los genes que codifican la actividad enzimática isocitrato deshidrogenasa (*IDH1* e *IDH2*), exclusivamente en iCCA, con una prevalencia del 15-20% (Borger DR *et al.* 2012; Wang P *et al.* 2013). Como enzima clave del ciclo de Krebs, la IDH1/2 silvestre cataliza la conversión reversible del isocitrato a 2-oxoglutarato. Las mutaciones en IDH1/2 producen de forma no-reversible el 2-hidroxiglutarato (2-HG) (Dang L *et al.* 2009). Se ha sugerido que el 2-HG puede alterar la regulación epigenética de genes supresores tumorales y oncogenes, en parte, al bloquear la actividad de desmetilasas de histonas e hidroxilasas de 5-metilcitosinas como TET (“ten-eleven translocation”) y JmJc (Jumonji C) (Xu W *et al.* 2011). De hecho, se ha asociado la presencia de mutaciones en *IDH1/2* con una reducción en la expresión de moduladores de la cromatina, como *ARID1A*, en la serie de iCCA (n=18) del “The Cancer Genome Atlas” (TCGA) (Farshidfar F *et al.*

2017). Además, las variantes mutadas de *IDH1/2* también pueden suprimir la expresión del factor nuclear 4 $\alpha$  de hepatocito (*HNF4A*), promover un bloqueo en la diferenciación hepatocitaria e inducir cáncer de vías biliares (Saha SK *et al.* 2014). Estos hallazgos han promovido que se ponga en marcha un ensayo clínico para estudiar la eficacia del ivosidenib (AG-120), un potente inhibidor de la IDH1 mutada (NCT02989857), como tratamiento frente al CCA (Fan B *et al.* 2019).

#### Mediadores de la inflamación

Estudios del perfil de expresión del genoma completo en CCA han sugerido la división del iCCA en dos subtipos biológicos: i) el tipo inflamatorio (38%) y ii) el tipo proliferativo (62%), que se caracteriza por la activación de rutas de señalización oncogénica (Sia D *et al.* 2013a).

En el primero se ha encontrado activación de procesos inflamatorios, sobre-expresión de citoquinas y estimulación de STAT3. La IL-6, el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) regulan la proliferación del epitelio biliar (Maemura K *et al.* 2014). Se considera que la IL-6, que es secretada por las propias células tumorales, tiene un papel central en la patogenia del CCA (Park J *et al.* 1999; Isomoto H *et al.* 2005), ya que induce la proliferación de las células tumorales al sobre-expresar la proteína anti-apoptótica Mcl-1 a través de la activación de STAT3 (Isomoto H *et al.* 2005).

Por otro lado, los colangiocitos tumorales tienen niveles de TGF- $\beta$  muy elevados (Lu JP *et al.* 2003). TGF- $\beta$  induce la transformación epitelio-mesenquimal (EMT) en células de CCA mediante cambios en la expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales y, en consecuencia, afecta a la capacidad de migración e invasión del CCA (Banales JM *et al.* 2016).

#### Cascadas de señalización asociadas con el desarrollo embrionario

Otro factor que está implicado en la colangiocarcinogénesis es la desregulación de la actividad de vías del desarrollo embrionario, entre las que destacan las rutas de Notch, Sonic-Hedgehog y Wnt/ $\beta$ -catenina.

##### □ Rutas de Notch y Sonic-Hedgehog:

La vía de Notch está implicada en la diferenciación de los hepatoblastos a colangiocitos (Zong Y *et al.* 2009). Se ha descrito una expresión aberrante de los receptores de esta vía (NOTCH1-4) en todos los tipos de CCA, que en algunos casos se ha asociado con una menor supervivencia o peor pronóstico (Zhou Q *et al.* 2013; Wu

WR *et al.* 2014a; Aoki S *et al.* 2016). La activación constitutiva de esta vía también promueve la EMT y la migración de las células de CCA (Zhou Q *et al.* 2013; Wu WR *et al.* 2014b).

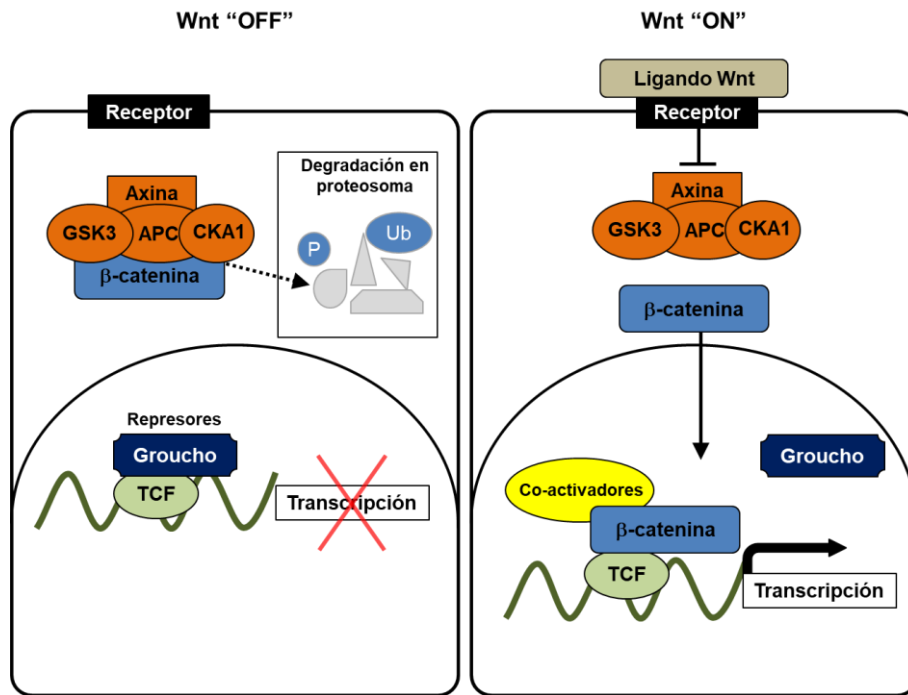
El ligando Sonic de la vía de señalización Hedgehog, fundamental en la organogénesis de los vertebrados, se encuentra sobre-expresado en biopsias de tejido y líneas celulares del CCA humano, y la inhibición de la ruta mediante ciclopamina reduce la proliferación y migración de las células de CCA *in vitro* y en un modelo de xenotrasplante subcutáneo de células TFK-1 *in vivo* (Al-Abdulla R *et al.* 2019).

### □ Ruta Wnt/ $\beta$ -catenina:

La vía de Wnt/ $\beta$ -catenina participa en el desarrollo del sistema hepatobiliar (Gordillo M *et al.* 2015) y está involucrada en la oncogénesis de distintos tipos de cáncer, incluido el CCA (Boulter L *et al.* 2015).

Las moléculas Wnt son proteínas de secreción que, tras la unión con un receptor de la familia Frizzled, desencadenan una serie de vías intracelulares divididas en dos grupos: i) la vía canónica Wnt/ $\beta$ -catenina (dependiente de  $\beta$ -catenina) y ii) las vías no canónicas de Wnt (independientes de  $\beta$ -catenina), implicadas en la determinación de la polaridad celular (Kato M 2005) y la regulación de los niveles intracelulares de calcio (Kohn AD y Moon RT 2005). La vía canónica de Wnt es la más estudiada y regula la transcripción de múltiples genes.

En la vía canónica de Wnt, la proteína  $\beta$ -catenina es el mensajero intracelular clave para la transducción de señales. En ausencia de Wnt,  $\beta$ -catenina es fosforilada por el complejo de destrucción compuesto por las proteínas: axina, APC (“Adenomatous Polyposis Coli”), GSK3 $\beta$  (Glucógeno sintasa quinasa) y CK1 $\gamma$  (Caseína quinasa 1), lo cual facilita su ubiquitinización y subsiguiente degradación proteosomal (Figura I-5). La unión de Wnt a su receptor Frizzled y co-receptor, LRP5 ó 6, induce el secuestro de todo el complejo de destrucción a la región intracelular del LRP, inhibiendo la degradación de la  $\beta$ -catenina. Así,  $\beta$ -catenina se transloca al núcleo e interacciona con el complejo TCF (“T-Factor Cell”)/LEF (“Lymphoid Enhancing Factor”) para activar la transcripción de genes diana relacionados con proliferación, diferenciación y migración (Kim W *et al.* 2013).



**Figura I-5.** Representación esquemática de la vía canónica Wnt/β-catenina. Cuando la ruta no está activa (Wnt "OFF") el complejo de destrucción fosforila β-catenina, lo que la prepara para su ubiquitinización (Ub) y posterior degradación proteosoma. Así, el factor de transcripción TCF interacciona con represores (Groucho) y se reprime la transcripción genética. La presencia de Wnt (Wnt "ON") activa la ruta e inhibe el secuestro de β-catenina por el complejo, de forma que ésta pueda entrar en el núcleo y estimular la transcripción de sus genes diana mediante la interacción con TCF/LCF y los co-activadores.

La activación aberrante de la vía Wnt/β-catenina es frecuente en CCA y se asocia con la proliferación y supervivencia celular (Tokumoto N *et al.* 2005; Yothaisong S *et al.* 2014). De hecho, se ha demostrado que el silenciamiento del ligando Wnt (*WNT2*) y β-catenina (*CTNNB1*) en líneas celulares de CCA humano reduce su capacidad de proliferación y estimula la apoptosis (Zhang KS *et al.* 2013). Se ha observado que la hiperactivación de la ruta en CCA se debe principalmente a alteraciones epigenéticas y mutaciones en genes de componentes de la vía: *AXIN1* (4%), *APC* (2%) y *CTNBB1* (1,5%), y menos frecuentemente: *DVL2*, *DVL3*, *FZD10*, *WNT10B* Y *WNT8B* (~1%) (Perugorria MJ *et al.* 2019). Por último, la hipermetilación aberrante del promotor de diversos antagonistas de la vía Wnt/β-catenina, como *SOX17*, *WNT3A*, *DKK2*, *SFRP1* and *SFRP2*, también contribuye a la estimulación de esta ruta en CCA. El factor de transcripción *SOX17* tiene un papel central en esta Tesis Doctoral y por ello le hemos dedicado el apartado 2.4. de la Introducción.

### 2.3.2.6. Tratamiento

La resección quirúrgica es la única terapia potencialmente curativa para el CCA y es el tratamiento de elección cuando es posible realizarla. Desafortunadamente, la



mayoría de los pacientes con CCA ya no son candidatos para cirugía cuando son diagnosticados y, además, una parte de los aceptados para resección (10-45%) son descartados tras la laparotomía (Konstadoulakis MM *et al.* 2008).

Por otro lado, el trasplante hepático no es recomendable como monoterapia para el CCA debido a las altas tasas de recurrencia y a la baja supervivencia a largo plazo. Recientemente, la quimiorradiación neoadyuvante seguida del trasplante hepático se ha propuesto como un tratamiento eficaz para el pCCA. Las tasas de recurrencia son del 20% y la supervivencia a 5 años sin recurrencia alcanza el 68% (Darwish Murad S *et al.* 2012). Se pueden aplicar terapias loco-regionales, como ablación por radiofrecuencia, radioterapia, TACE, o radioterapia intraarterial selectiva, pero ninguna ha demostrado un beneficio claro en la supervivencia de estos pacientes (Boehm LM *et al.* 2015).

La quimioterapia es recomendada en CCA avanzado como tratamiento paliativo, aunque su eficacia es limitada por la elevada refractariedad de este tipo de tumor a los fármacos antitumorales (Marin JJG *et al.* 2018b). La administración combinada de gemcitabina y cisplatino es el tratamiento de elección. En el ensayo clínico ABC-02 (NCT00262769), la administración combinada de cisplatino (25 mg/m<sup>2</sup> p.c.) y gemcitabina (1000 mg/m<sup>2</sup> p.c.) mejoró la tasa de supervivencia de los 204 pacientes con CCA (11,7 meses), en comparación con la monoterapia de gemcitabina que recibieron 206 pacientes (8,1 meses) (Valle J *et al.* 2010). Este régimen también demostró dar buenos resultados en otro estudio independiente con pacientes con cáncer de las vías biliares, incluido CCA (Okusaka T *et al.* 2010).

Cuando la administración de cisplatino está contraindicada, como en pacientes con insuficiencia renal, la combinación GEMOX (gemcitabina y oxaliplatino), representa una alternativa como quimioterapia de primera elección (Andre T *et al.* 2008).

Desafortunadamente, no se han establecido tratamientos farmacológicos de segunda línea. En general, cuando un paciente no responde adecuadamente a la gemcitabina, se administran combinaciones de fármacos que incluyen principalmente fluoropirimidinas como el 5-fluororacilo (5-FU) (Lamarca A *et al.* 2014). Por ello, se ha puesto en marcha un ensayo clínico en fase III (ABC-06, NCT01926236) que pretende validar la combinación de 5-FU, ácido folínico y oxaliplatino (mFOLFOX) como tratamiento de segunda elección en pacientes que no responden bien a la administración de gemcitabina-cisplatino.

## 2.4. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SOX17

El gen humano *SOX17* se localiza en el locus 8q11.23, consta de 2962 pb y está formado por dos exones y un intrón. Da lugar a la proteína SOX17, un factor de transcripción que es miembro de la familia génica SOX y que participa en numerosos procesos del desarrollo y diferenciación celular, principalmente, modulando vías de señalización como Wnt/ $\beta$ -catenina.

Aunque se expresa de forma muy generalizada en todo el organismo (corazón, pulmón, bazo, testículos, ovarios, riñón, placenta e hígado), destaca su elevada expresión en el tracto gastrointestinal, principalmente en el esófago, estómago e intestino delgado (Katoh M 2002).

### 2.4.1. Familia génica de los factores SOX

La familia génica de las proteínas SOX (“Sry-related HMG box”) está compuesta por genes que codifican factores de transcripción que participan en la regulación del desarrollo embrionario y en el control de la homeostasis de los tejidos adultos (Wegner M 2010). El gen *Sry* (“Sex-determining Region Y”) fue el primer miembro de la familia identificado y desempeña un papel importante en el desarrollo embrionario de los testículos (Gubbay J *et al.* 1990). Hasta la fecha, se han identificado hasta 20 miembros de la familia SOX en mamíferos (Tabla I-2), que, en base a la homología de secuencias, localización cromosómica y organización genómica, han sido divididos en 9 subgrupos, clasificados de la A a la H (Bowles J *et al.* 2000; Schepers GE *et al.* 2002).

La distribución de las distintas subfamilias de los genes SOX es muy amplia (Tabla I-2). Las subfamilias SOXB, SOXC, SOXD, SOXE y SOXF se encuentran en casi todos los organismos, mientras otros, como SOXA, son específicos de mamíferos. A menudo se observa que los miembros de la misma subfamilia comparten funciones equivalentes y se expresan en los mismos tejidos durante el desarrollo (por ejemplo, proteínas SOXB1 en el sistema nervioso central y SOXF en el sistema vascular) (Tabla I-2), aunque sus patrones de expresión temporal y espacial en el tejido difieren ligeramente. Esta situación crea una redundancia funcional entre los miembros del grupo, lo cual protege los procesos del desarrollo frente a las variaciones genéticas entre individuos. Por otro lado, muchos de los genes SOX no son específicos de tejido, sino que varios se expresan en más de un tipo celular desempeñando distintas funciones.

Debido a la similitud de la secuencia dentro de una misma subfamilia, las propiedades bioquímicas y la función suelen ser similares (Bowles J *et al.* 2000; Wilson M y Koopman P 2002).



**Tabla I-2.** Clasificación de los factores SOX, su localización tisular y su función.

Subfamilia de genes	Proteínas SOX	Tejido	Posible función <sup>a</sup>
SOXA	SRY	Células de Sertoli (gónadas)	Determinación testicular
SOXB1	SOX1 SOX2 SOX3	Tubo neural embrionario Células madre embrionarias Hipófisis Células progenitoras del cerebro adulto Cristalino	Determinación neural (desarrollo del cristalino) Inducción neural Pluripotencialidad
SOXB2	SOX14 SOX21	Precusores de neuronas	Neurogénesis Patrón sistema nervioso central
SOXC	SOX4 SOX11 SOX12	Células madre embrionarias Neuronas Riñón	Desarrollo del sistema cardiovascular e inmune Maduración de la glía Desarrollo de muchos tejidos
SOXD	SOX5 SOX6 SOX13	Oligodendrocitos Condrocitos	Condrogénesis Desarrollo de la pared arterial
SOXE	SOX8 SOX9 SOX10	Células madre neuronales Células de la glía Gónadas Cresta neural Oligodendrocitos Condrocitos	Desarrollo de muchos tejidos Determinación del sexo Condrogénesis Especificación de la cresta neural
SOXF	SOX7 SOX17 SOX18	Endodermo Endotelio vascular Endotelio linfático Sistema biliar	Desarrollo del tejido vascular Especificación del endodermo, desarrollo biliar Desarrollo vascular
SOXG	SOX15	Células satélite musculares	Miogénesis
SOXH	SOX30	Células germinales masculinas	Maduración de células germinales masculinas
SOX <sup>J</sup> SOX <sup>J</sup>	SOX31 SOXJ		

<sup>a</sup> Algunas funciones han sido demostradas en humanos y ratones, mientras que otras se deducen del patrón de expresión génica.

<sup>b</sup> Estas familias no están presentes en mamíferos, son características de insectos.

Todos los genes SOX descritos son factores de transcripción que se unen a través de su dominio HMG (“High Mobility Group”) al ADN (Harley VR *et al.* 1994). Este dominio está altamente conservado entre especies y permite que todos los factores SOX reconozcan la secuencia consenso 5’-A/T A/T CAA A/T G-3’. De esta forma, pueden activar o reprimir la expresión de sus genes diana. Sin embargo, no solo actúan como moduladores de la expresión, sino que además a través de su dominio HMG son capaces de formar complejos multiproteicos, entre sí o con otras proteínas, y así modificar la biodisponibilidad de otros factores de transcripción y cofactores. Son estas

interacciones las que determinan qué genes se expresan en cada circunstancia y tipo celular (Kondoh H y Kamachi Y 2010).

#### 2.4.2. Funciones del factor de transcripción SOX17

Este miembro de la subfamilia SOXF regula la expresión génica en diferentes procesos del desarrollo y la determinación del destino celular. Destaca su implicación en la diferenciación del endodermo (Kanai-Azuma M *et al.* 2002; Engert S *et al.* 2013), de los oligodendrocitos (Chew LJ *et al.* 2011) y de las vías biliares (Spence JR *et al.* 2009; Uemura M *et al.* 2010).

Se ha observado que embriones de ratones deficientes en la proteína Sox17 presentaban anomalías durante el desarrollo del endodermo y dejaban de ser viables a partir del día 10,5 de gestación (Kanai-Azuma M *et al.* 2002). Asimismo, la pérdida total del gen *Sox17* en embriones de ratones (*Sox17*<sup>-/-</sup>) impide el desarrollo de la vesícula biliar y del conducto cístico durante la morfogénesis del tracto gastrointestinal (Spence JR *et al.* 2009; Uemura M *et al.* 2010), lo cual pone de manifiesto la relevancia de SOX17 en la diferenciación del sistema biliar extrahepático. Además, las ratas, que no tienen vesícula biliar, no expresan *Sox17* en el primordio hepatobiliar durante la morfogénesis, mientras que sí se expresa en ratones (Higashiyama H *et al.* 2018).

Por otro lado, SOX17 también participa en la formación del epitelio arterial (Corada M *et al.* 2013), en la regulación de la angiogénesis durante el desarrollo embrionario (Lee SH *et al.* 2014a), en el desarrollo de células hematopoyéticas (Nakajima-Takagi Y *et al.* 2013) y en la regulación de la secreción de insulina postnatal (Jonatan D *et al.* 2014).

#### 2.4.3. Fisiopatología de SOX17

Debido a su papel en el desarrollo embrionario, las alteraciones en la expresión o función de SOX17 pueden dar lugar a defectos en la formación de algunos tejidos, como es el caso del tracto urinario. De hecho, el gen humano SOX17 también recibe el nombre de *VUR3*, ya que mutaciones en este gen han sido encontradas en una patología congénita denominada “enfermedad por reflujo vesicouretral 3”, que afecta al desarrollo de los uréteres. Esta patología se caracteriza por el reflujo de la orina desde la vejiga a los uréteres, e incluso a los riñones, siendo un importante factor de riesgo de infecciones en todo el tracto urinario (Gimelli S *et al.* 2010).

La atresia biliar es un trastorno congénito de las vías biliares que se manifiesta en niños recién nacidos y que se caracteriza por la presencia de estructuras biliares

extrahepáticas poco o nada desarrolladas. La haploinsuficiencia de *Sox17* en ratones genera defectos en el desarrollo de la vesícula y epitelio biliares, y desencadena el desarrollo de atresia biliar congénita y subsiguiente hepatitis aguda en fases tardías del desarrollo fetal (Uemura M *et al.* 2013).

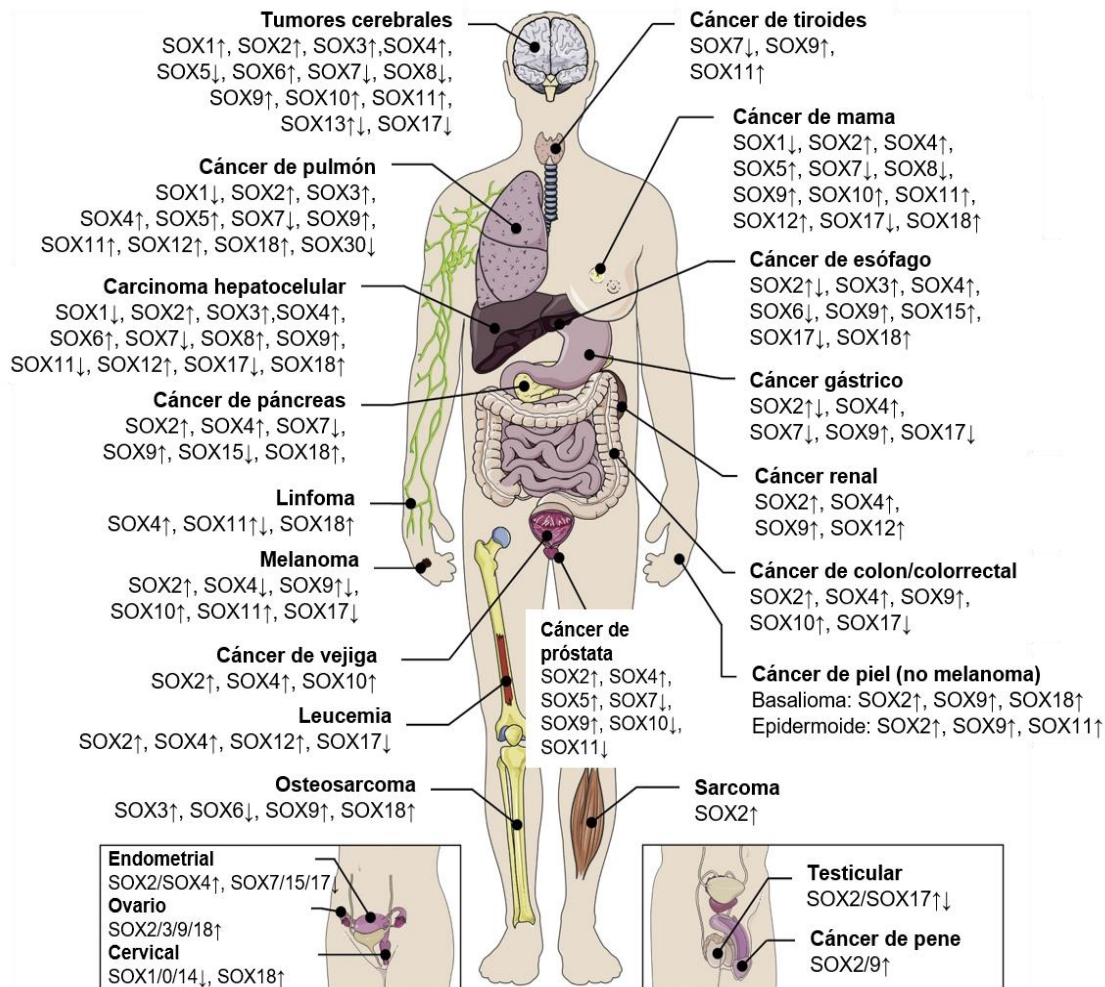
En los últimos años se han publicado muchos estudios que analizan la potencial implicación de este factor de transcripción en procesos de proliferación celular y cáncer. Los datos publicados hasta el momento están relacionados con su función como antagonista de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina, que desempeña un papel clave en el desarrollo embrionario, la diferenciación, la proliferación celular y la apoptosis.

#### **2.4.4. Papel de SOX17 en cáncer**

Mientras que la expresión y el silenciamiento de los factores SOX en el tejido sano están estrictamente regulados, en los tumores habitualmente se desregula a nivel de transcripción, traducción y post-traducción. Además, el gen SOX que se altera y el tipo de cambio que se produce en su expresión (aumento o disminución) es tumor-específico (Figura I-6). Esto se debe a que, dependiendo del tipo celular, los factores SOX pueden actuar como oncogenes o como genes supresores tumorales (Grimm D *et al.* 2019).

Se ha demostrado que SOX17 actúa como un gen supresor tumoral en distintos tipos de cáncer (Figura I-6), especialmente en los gastrointestinales. En concreto, en estadios iniciales de la carcinogénesis gastrointestinal y en neoplasias benignas intestinales, la expresión de SOX17 es elevada, mientras que se reduce durante la progresión maligna de la enfermedad, promoviendo así la actividad de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina (Du YC *et al.* 2009).

Se ha descrito una caída de la expresión de SOX17 en una gran variedad de tumores, como el cáncer gástrico (Du YC *et al.* 2009), el cáncer colorrectal (Zhang W *et al.* 2008), el HCC (Jia Y *et al.* 2010) y el CCA (Goepfert B *et al.* 2014; Merino-Azpitarte M *et al.* 2017), causada por la hipermetilación de su promotor. De hecho, ensayos *in vitro* con líneas celulares de CCA demostraron que el tratamiento con decitabina (DAC, 5-aza-2'-desoxicitidina), un inhibidor de metil-transferasas, restaura los niveles de expresión de *SOX17*, lo que induce un bloqueo de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina y por tanto reduce el crecimiento tumoral (Du YC *et al.* 2009; Jia Y *et al.* 2010).



**Figura I-6.** Implicación de los factores SOX en distintos tipos de cáncer humano. Las flechas describen el sentido del cambio de expresión: ↑, aumento; ↓, descenso. (Modificada de (Grimm D *et al.* 2019).

Tras estos indicios, se ha profundizado en el estudio del papel del factor SOX17 en el desarrollo del CCA. Como se ha comentado, los niveles de expresión de este factor de transcripción son menores en el tejido tumoral en comparación con el tejido sano, y dicha caída se relaciona con una menor supervivencia en pacientes de CCA (Merino-Azpitarte M *et al.* 2017). El silenciamiento experimental de SOX17 en colangiocitos humanos sanos, que ocurre en la desdiferenciación de estas células durante el desarrollo del CCA, induce la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina y promueve su proliferación. Por el contrario, la sobre-expresión de SOX17 humano en células de CCA reduce el crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo* (Merino-Azpitarte M *et al.* 2017), lo cual pone de manifiesto el potencial terapéutico de este factor de transcripción en CCA.

#### 2.4.5. SOX17 como un inhibidor de la vía canónica Wnt/ $\beta$ -catenina

La activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina ha sido descrita como uno de los principales mecanismos de inducción de tumores en distintos tipos de cáncer, incluido el cáncer

hepático (Perugorria MJ *et al.* 2019). Una de las funciones de SOX17 como gen supresor tumoral es la inhibición de esta ruta de señalización. Sin embargo, el mecanismo por el que este factor inhibe la ruta no se conoce en detalle.

En contraste con otros antagonistas de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, como SFRPs (“Secreted frizzled-related protein”) y DKKs (“Dickkopf-related protein”), probablemente SOX17 inhiba la ruta a nivel nuclear. Algunos autores afirman que SOX17 puede interactuar con el complejo TCF/LEF y/o con  $\beta$ -catenina (Sinner D *et al.* 2007; Zhang W *et al.* 2008) para formar complejos SOX17/ $\beta$ -catenina/TCF sin actividad transcripcional. Este hecho reprimiría la expresión de genes diana de la vía Wnt relacionados con el ciclo celular y la proliferación (Chew LJ *et al.* 2011; Chen HL *et al.* 2013). Además, la formación de los complejos SOX17/ $\beta$ -catenina/TCF en líneas celulares de cáncer colorrectal favorece la degradación proteosómica de TCF y  $\beta$ -catenina (Sinner D *et al.* 2007), reduciendo así los niveles de  $\beta$ -catenina libre y antagonizando la ruta.

## **2.5. PAPEL DEL TRANSPORTOMA EN LA RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL EN CÁNCER HEPÁTICO**

La presencia de mecanismos de quimiorresistencia (MOC) antes de la exposición a los agentes quimioterápicos (resistencia primaria) o su desarrollo o potenciación durante el tratamiento (resistencia adquirida) constituyen un problema clínico común en el tratamiento del cáncer (Marin JJG *et al.* 2018a). Además, el desarrollo de MOC tras el tratamiento con un fármaco antitumoral determinado frecuentemente induce resistencia frente a otros agentes, lo cual se conoce como “resistencia a múltiples fármacos” (MDR).

El cáncer hepático se encuentra entre los tumores con menor sensibilidad a la terapia farmacológica debido a varios mecanismos que contribuyen a la quimiorresistencia y que se han clasificado en 7 grupos de MOCs (Marin JJG *et al.* 2018a) (Briz O *et al.* 2017) (Figura I-7) que se definen brevemente a continuación:

□ **MOC-1:** Se refiere a los mecanismos que promueven una disminución de la concentración intracelular de los fármacos, ya sea i) mediante la reducción de la captación de los fármacos (MOC-1a) o ii) mediante el aumento de la expulsión de los mismos (MOC-1b).

□ **MOC-2:** Incluye los mecanismos que disminuyen la cantidad de fármaco activo intracelular, bien porque reprimen la actividad de las enzimas responsables de la activación de profármacos a compuestos activos, o bien porque incrementan la actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo de los fármacos para producir metabolitos inactivos.

□ **MOC-3:** Hace referencia a cambios en la expresión o mutaciones en las dianas de los fármacos.

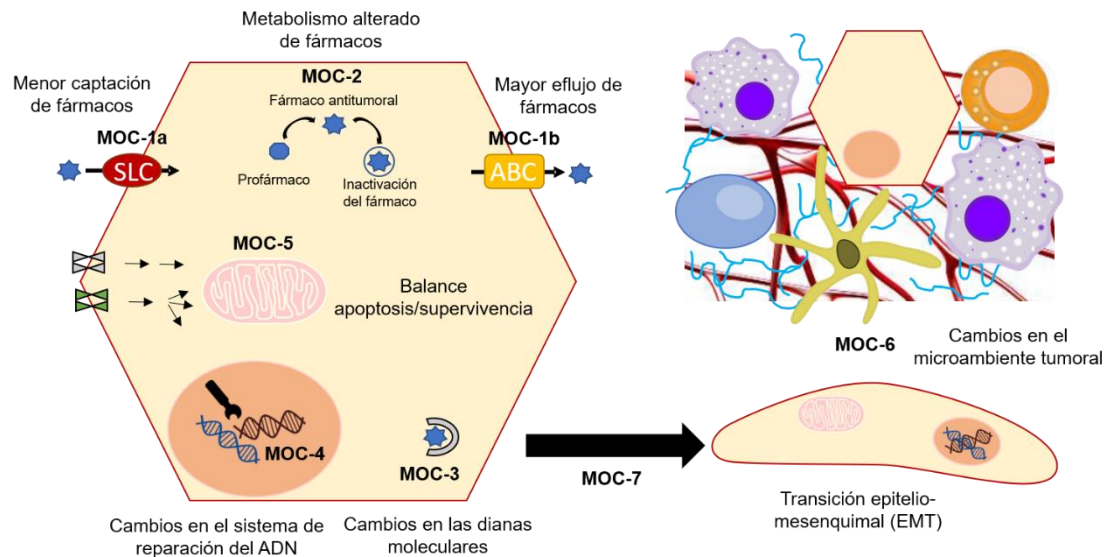
□ **MOC-4:** Engloba los mecanismos que aumentan la capacidad de reparación del ADN en las células tumorales, lo que promueve la aparición de resistencia a los agentes antitumorales cuyo mecanismo de acción se basa en la alteración del ADN.

□ **MOC-5:** Incluye los procesos que desregulan el balance apoptosis/supervivencia, como aquellos que inducen la activación del crecimiento celular mediante la reducción de apoptosis (MOC-5a) o el aumento de las vías de supervivencia (MOC-5b).

□ **MOC-6:** Mecanismos debidos a cambios en el microambiente tumoral, entre los que se incluyen la hipoxia y la acidificación, que pueden reducir la repuesta a la quimioterapia.

□ **MOC-7:** Se refiere a los mecanismos que regulan EMT de las células tumorales; un proceso en el cual las células epiteliales del tumor pierden su polaridad y adquieren un fenotipo con características mesenquimales, lo que aumenta su capacidad de migración, metástasis y quimiorresistencia.





**Figura I-7.** Representación esquemática de los mecanismos de quimiorresistencia (MOC) presentes en una célula tumoral: reducción de la concentración intracelular del agente antitumoral, por una disminución de la captación (MOC-1a) o un aumento de su expulsión (MOC-1b); alteraciones en el metabolismo de los fármacos, por menor activación del profármaco o mayor metabolismo del agente citotóxico (MOC-2); alteraciones en las dianas moleculares (MOC-3); cambios en el sistema de reparación del ADN (MOC-4); desregulación de las rutas que desencadenan la apoptosis o implicadas en la supervivencia celular (MOC-5); cambios en el microambiente tumoral (MOC-6) y transición epitelio-mesenquimal (EMT) (MOC-7). SLC, “solute carrier protein”; ABC, “ATP-binding cassette”.

### 2.5.1. Transportadores implicados en la captación de fármacos (MOC-1a)

El concepto de “transportoma” hace referencia al conjunto de las proteínas transportadoras expresadas en un momento dado en cada célula y que determinan la concentración intracelular de sus sustratos, entre los que pueden encontrarse fármacos antitumorales (Huang Y *et al.* 2004). En general, los agentes antineoplásicos llevan a cabo su acción farmacológica en el interior de la célula, por lo que cualquier mecanismo que reduzca sus niveles intracelulares puede disminuir la respuesta a un tratamiento antitumoral. Por ello, los cambios en la expresión del transportoma durante la carcinogénesis y durante el tratamiento farmacológico pueden tener un papel importante en la eficacia terapéutica de los agentes antitumorales.

Muchos fármacos antitumorales poseen un elevado peso molecular y son poco lipofílicos, por lo que su capacidad para difundir a través de la membrana plasmática es reducida y requieren de transportadores específicos para entrar en la célula (Chandra P y Brouwer KL 2004). Estos transportadores de entrada pertenecen a la superfamilia de proteínas SLC (“solute carrier proteins”), que consta de más de 400 miembros organizados en 52 familias (Perland E y Fredriksson R 2017). Son proteínas transmembrana que se expresan en distintos tejidos, entre ellos el hígado, y que

participan en el transporte de numerosos compuestos orgánicos e inorgánicos, como metabolitos endógenos y xenobióticos (toxinas y fármacos).

A parte de las diferencias de expresión de los SLC que pueda haber entre el tumor y el tejido hepático adyacente, la existencia de polimorfismos (Lozano E *et al.* 2018) y variantes de “splicing” (Herraez E *et al.* 2013; Park JE *et al.* 2017) también determina grandes diferencias interindividuales en la captación de fármacos. Además, como ya se ha comentado, la expresión de estas proteínas en los tejidos neoplásicos puede cambiar durante el desarrollo tumoral y particularmente tras el tratamiento farmacológico.

Por la importancia que tienen en esta Tesis Doctoral, describiremos detalladamente los transportadores ASBT, y OCT1.

#### **2.5.1.1. El transportador de ácidos biliares dependiente de sodio ASBT**

El transportador de ácidos biliares dependiente de sodio ASBT (también llamado ISBT e IBAT) pertenece a la familia de proteínas SLC10A, que contiene 7 miembros, entre los que se incluyen el principal transportador de ácidos biliares en hígado NTCP (Anwer MS y Stieger B 2014). ASBT está codificado por el gen *SLC10A2*, que contiene seis exones y se localiza en el cromosoma 13q33.

##### Estructura del ASBT

ASBT es una proteína compuesta por 348 aa, con un peso molecular observado de 43 kDa, que difiere del peso molecular teórico de 38 kDa debido a su glicosilación (Wong MH *et al.* 1995). Recientemente, se ha demostrado que el proceso de glicosilación es esencial para la función y estabilidad del ASBT humano (Muthusamy S *et al.* 2015). Según modelos de predicción de estructura, consta de 7 dominios transmembrana (TMD) teóricos, al igual que su homólogo hepático NTCP, con el que guarda un 35% de identidad genética y un 63% de similitud en la secuencia de aa (Dawson PA y Oelkers P 1995). Además, tiene el extremo N-terminal extracelular y el C-terminal citoplasmático (Zhang EY *et al.* 2004).

Distintos estudios han contribuido a la idea de que ASBT funciona como un monómero en humanos, aunque algunas evidencias sugieren la posibilidad de que también pueda formar dímeros. En estudios de western blot con homogenados de colangiocitos o íleon de rata se han descrito dos bandas de Asbt de 43 kDa y 92 kDa, aproximadamente, que se corresponden con su forma monomérica y dimérica, respectivamente (Shneider BL *et al.* 1995; Lazaridis KN *et al.* 1997). Recientemente Chothe *et al.* han demostrado que el ASBT humano puede formar homodímeros de



proteínas funcionales (72 kDa) que se expresan en la membrana plasmática de células transfectadas (Chothe PP *et al.* 2018).

### Expresión del ASBT en el organismo

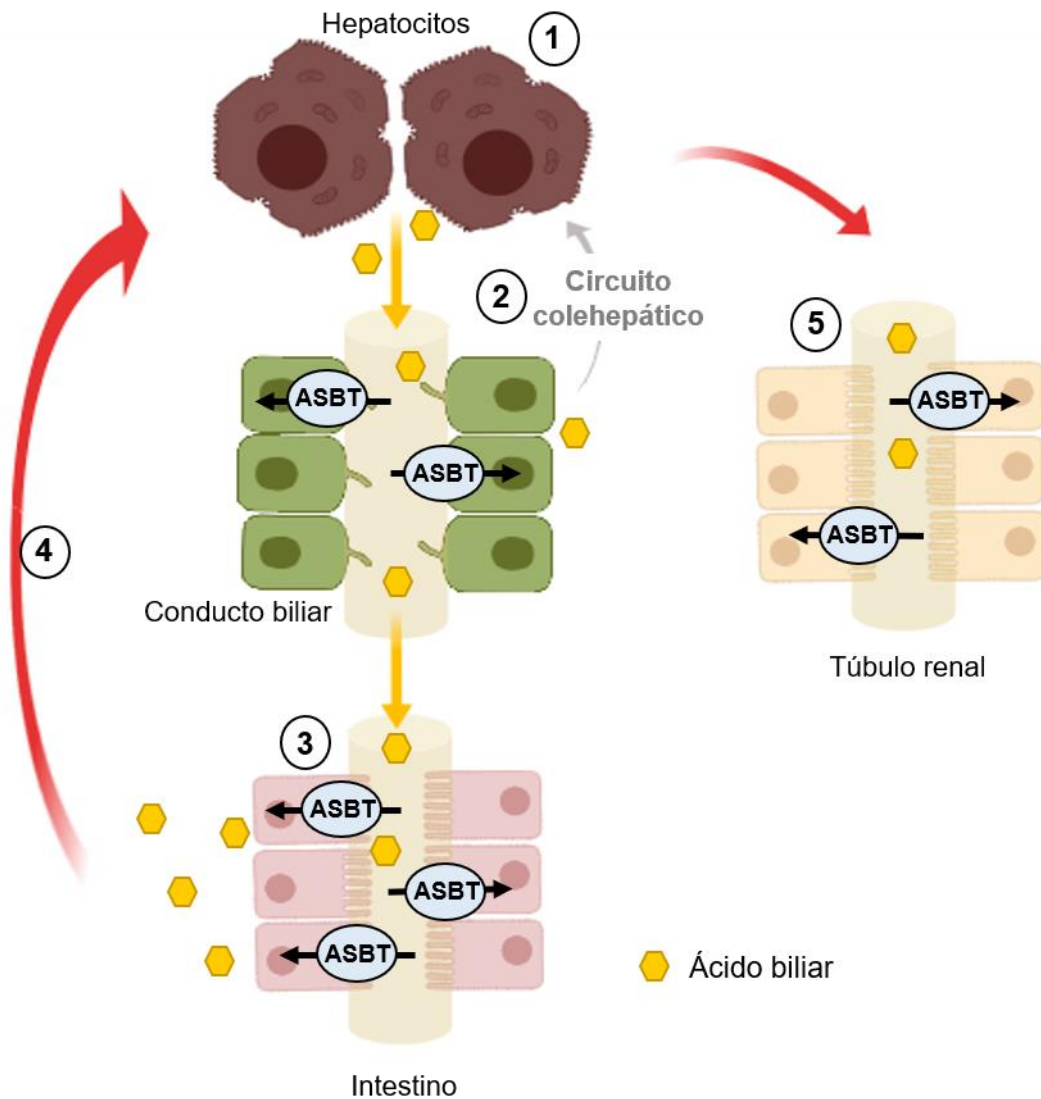
Dentro del sistema hepatobiliar, ASBT se expresa exclusivamente en los colangiocitos y no en hepatocitos. En rata se han detectado niveles de ARNm y proteína de *Asbt* solamente en la membrana apical de los colangiocitos grandes, pero no en los colangiocitos intrahepáticos pequeños (Alpini G *et al.* 1997; Luo ZL *et al.* 2019).

Además, ASBT presenta una elevada expresión en el íleon terminal (Lazaridis KN *et al.* 1997; Drozdik M *et al.* 2014) y en los túbulos proximales de riñón en rata (Craddock AL *et al.* 1998).

### Papel fisiológico de ASBT

ASBT lleva a cabo un transporte electrogénico y dependiente de sodio (similar al descrito para NTCP) con una estequiometría de 2:1, es decir dos moléculas de sodio transportadas por cada molécula de ácido biliar (Weinman SA *et al.* 1998). Tanto los ácidos biliares conjugados (primarios y secundarios), como los no conjugados, son sustratos de ASBT, aunque se ha descrito una mayor preferencia por los ácidos biliares conjugados con taurina y glicina (Craddock AL *et al.* 1998). Al contrario que NTCP, que puede transportar algunos sustratos diferentes de ácidos biliares, la especificidad de sustrato para ASBT parece estar más limitada a éstos.

Como transportador de ácidos biliares, ASBT tiene un papel crucial en la circulación enterohepática (Figura I-8). Los ácidos biliares se sintetizan en los hepatocitos a partir del colesterol, mediante una serie de reacciones de oxidación y conjugación, son secretados a la bilis y se almacenan en la vesícula biliar. Ante un estímulo (ingesta de comida), los ácidos biliares son liberados al intestino, donde desempeñan su función de emulsión, digestión y absorción de grasas de la dieta. El 95% de los ácidos biliares se reabsorbe en las células epiteliales del íleon terminal a través de ASBT para pasar a sangre portal y finalmente ser re-captados por los hepatocitos, completándose así la circulación enterohepática de los ácidos biliares. De esta forma, sólo se pierden diariamente en heces menos del 5% del total de ácidos biliares. Por otro lado, en el riñón ASBT previene la excreción en orina de los ácidos biliares que son filtrados a través del glomérulo.



**Figura I-8.** Representación esquemática del papel de ASBT en la circulación enterohepática. Los ácidos biliares son sintetizados por los hepatocitos y secretados al canalículo biliar (1). La bilis circula a través de los conductos biliares, donde su composición será modificada por los colangiocitos. Los ácidos biliares pueden ser reabsorbidos por los colangiocitos a través de ASBT (2), para pasar a los sinusoides hepáticos y volver a los hepatocitos de nuevo, donde pueden ser secretados de nuevo a bilis, promoviendo una secreción biliar adicional. Este circuito intrahepático se denomina "circuito colehepático". Cuando los ácidos biliares alcanzan el intestino delgado, el 95% de estas moléculas son re-captadas por ASBT en los enterocitos (3) para ser liberadas a sangre portal y volver así al hígado (4). ASBT también participa en la excreción renal de los ácidos biliares mediante la reabsorción de los mismos en los conductos renales (5).

Distintos estudios han puesto en evidencia que ASBT es el transportador principal de ácidos biliares en intestino. De hecho, mutaciones en este transportador han sido asociadas con el síndrome de malabsorción intestinal de ácidos biliares, que se caracteriza porque los pacientes sufren diarrea, esteatorrea y niveles bajos de colesterol en sangre (Oelkers P *et al.* 1997). Además, 16 pacientes con enfermedad de

Crohn, que también cursa con malabsorción intestinal de ácidos biliares, presentaban una expresión reducida de ASBT en el íleon (69%) en comparación con el intestino sano (Jung D *et al.* 2004). Por último, el silenciamiento genético de *Asbt* en ratones (“*Asbt-null*”), considerado modelo animal para malabsorción intestinal, indujo un aumento de la excreción de ácidos biliares en las heces y, como mecanismo de compensación, un incremento en la síntesis hepática de estas moléculas (Dawson PA *et al.* 2003).

Por otro lado, el bloqueo de ASBT puede resultar beneficioso para pacientes con hipercolesterolemia, puesto que el mecanismo compensatorio de síntesis hepática de ácidos biliares, inducido por la menor reabsorción de estas moléculas en el intestino, puede reducir los niveles de colesterol (Bhat BG *et al.* 2003). Así, se ha demostrado que derivados de ácidos biliares conjugados con poliaminas inhiben la captación intestinal de los ácidos biliares en modelos animales (Vicens M *et al.* 2007a; Vicens M *et al.* 2007b).

Respecto al papel de ASBT en los colangiocitos, no se conoce mucho. Estudios realizados en ratas demostraron que la expresión de *Asbt* en los colangiocitos es siete veces menor que la encontrada en los enterocitos del íleon (Alpini G *et al.* 1997), por lo que se ha propuesto que la función fisiológica podría ser diferente y estar relacionada con la señalización mediada por los ácidos biliares. También se ha descrito que ASBT participa en la captación intrahepática de los ácidos biliares que llevan a cabo los colangiocitos en el denominado “circuito colehepático” (Figura I-8), que podría ser importante en condiciones de colestasis crónica, sirviendo como ruta alternativa excretora en presencia de una obstrucción biliar para evitar la acumulación hepatocelular de ácidos biliares tóxicos, o mejorar el flujo biliar desde el hígado (Alpini G *et al.* 2005).

### **2.5.1.2. El transportador de cationes orgánicos OCT1**

El transportador de cationes orgánicos OCT1 (gen *SLC22A1*) es un miembro de la familia SLC, del subgrupo SLC22A, que contiene 3 miembros principales: OCT1, OCT2 y OCT3. Los miembros de esta familia transportan cationes orgánicos endógenos y exógenos, como algunos fármacos. Muchos de los compuestos orgánicos que alcanzan el hígado presentan carga positiva a pH fisiológico, lo cual les impide atravesar la membrana plasmática libremente y necesitan sistemas de transporte como OCT1 para alcanzar el interior celular (Lozano E *et al.* 2013). El gen humano *SLC22A1* se localiza en el cromosoma 6q26 y contiene 11 exones y 10 intrones.

### Estructura de OCT1

La estructura terciaria de OCT1 no ha sido cristalizada aún. Los estudios de predicción sugieren que OCT1 tendría una estructura similar a la descrita para otros miembros de la familia SLC22A: 12 TMD con estructura de  $\alpha$ -hélices que además contienen extremos N-terminal y C-terminal citoplasmáticos, un lazo extracelular largo entre los TMD1 y TMD2, con sitios susceptibles de glicosilación, y otro lazo intracelular entre TMD6 y TMD7, con sitios susceptibles de fosforilación (Wright SH 2005). Se ha descrito que los residuos cisteína presentes en el lazo extracelular podrían estar implicados en la homo-oligomerización de Oct1 en rata (Keller T *et al.* 2011), aunque no parece que afecte a su afinidad y transporte de sustratos. Recientemente se ha descrito que Oct1 podría tener hasta tres sitios de unión de sustratos solapantes (Keller T *et al.* 2019).

Además de la forma silvestre de OCT1, se han descrito variantes formadas por SNPs, y variantes debidas a “splicing” aberrante que pueden dar lugar a la formación de proteínas truncadas no-funcionales (Hayer M *et al.* 1999; Herraiz E *et al.* 2013; Lozano E *et al.* 2018).

### Expresión de OCT1 en el organismo

OCT1 se expresa principalmente en la membrana sinusoidal de los hepatocitos humanos (Gorboulev V *et al.* 1997) y de rata (Meyer-Wentrup F *et al.* 1998). También se ha detectado expresión de OCT1 en los colangiocitos, aunque en menor medida (Nies AT *et al.* 2009). Además de su expresión en el hígado, OCT1 también se encuentra en la membrana apical de las células epiteliales que recubren los túbulos proximal y distal de la nefrona (Tzvetkov MV *et al.* 2009), y en los enterocitos del intestino delgado (Han TK *et al.* 2013), así como en corazón, cerebro, placenta, glándulas mamarias, ojo, tejido adiposo y en células del sistema inmune (Hyrsova L *et al.* 2016).

### Función fisiológica de OCT1

El transporte de compuestos a través de OCT1 se clasifica como difusión facilitada independiente de sodio, cloro o gradiente de protones (Koepsell H 2011). Además, el transporte de los sustratos puede ocurrir en ambas direcciones a través de la membrana plasmática, de forma que OCT1 no sólo participa en la captación, sino también en el eflujo de sus sustratos (Meijer DK *et al.* 1990).

Teniendo en cuenta su localización hepática, la función principal de OCT1 es la retirada de cationes orgánicos endógenos, además de fármacos catiónicos, mediando su transporte desde la sangre hacia los hepatocitos a través la membrana sinusoidal de

los mismos (Jonker JW y Schinkel AH 2004). En el intestino OCT1 está implicado en la absorción y secreción de los cationes orgánicos (Koepsell H *et al.* 2007), mientras que en el riñón participa en la reabsorción de los compuestos filtrados (Jonker JW y Schinkel AH 2004). Además, OCT1 puede mediar el transporte de fármacos a través de los bronquios en el pulmón y la barrera hematoencefálica (Higaki J *et al.* 1989; Lin CJ *et al.* 2010).

La mayoría de los sustratos de OCT1 son aminas terciarias que tienen carga positiva a pH fisiológico, y aminas cuaternarias que tienen una carga positiva independientemente del pH. En base a características estructurales, los sustratos de OCT1 se clasifican en dos tipos: I y II (Meijer DK *et al.* 1990). El tipo I incluye cationes orgánicos pequeños y muy hidrofílicos, con una masa molecular menor de 500 g/mol. Entre los sustratos típicos del tipo I se encuentran el tetraetilamonio (TEA) y el 1-metil-4-fenilpiridino (MPP<sup>+</sup>). El tipo II incluye cationes de mayor tamaño, más hidrofóbicos y, con frecuencia, polivalentes. Entre los sustratos típicos del tipo II de encuentran la d-tubocurarina y la quinina (van Montfoort JE *et al.* 2001).

La tiamina, las monoaminas como la colina, creatinina, L-carnitina, guanidina, el metabolito de L-arginina (agmatina), histidil-prolina dicetopiperazina, y poliaminas como putrescina o espermidina son sustratos endógenos típicos de OCT1. En el sistema nervioso el OCT1 participa en la recaptación de neurotransmisores como catecolaminas (dopamina, adrenalina y noradrenalina), serotonina e histamina por las neuronas presinápticas desde el espacio sináptico (Lozano E *et al.* 2013).

### Papel de OCT1 en el transporte de fármacos antitumorales

Se ha descrito que OCT1 está implicado en el transporte de un gran número de fármacos antitumorales, como la mitoxantrona (MTX) (Koepsell H *et al.* 2007), el inhibidor de survivina YM 155 (Minematsu T *et al.* 2009), el irinotecán y el paclitaxel (Gupta S *et al.* 2012). Algunos derivados de platino también son transportados por OCT1. Se ha demostrado que los niveles intracelulares de oxaliplatino y picoplatino, pero no de cisplatino y carboplatino, aumentaban en células que sobre-expresaban OCT1 (Zhang S *et al.* 2006; More SS *et al.* 2010).

Varios trabajos han sugerido que OCT1 es uno de los transportadores principales de fármacos inhibidores de tirosina-quinasa (TKIs), como el sorafenib. Nuestro grupo de investigación ha demostrado que líneas celulares de CCA o HCC humano transfectadas con OCT1 presentan una mayor sensibilidad a este TKI que las células control (Herraez E *et al.* 2013). Además, en un modelo *in vivo* de xenotrasplante de HCC en ratón, la administración de sorafenib ralentizó el crecimiento tumoral solamente en

los tumores derivados de células con sobre-expresión de OCT1, mientras que apenas tuvo efecto en los tumores control (Al-Abdulla R *et al.* 2019). Por otro lado, se ha sugerido un potencial papel del OCT1 como marcador pronóstico para determinar la respuesta al sorafenib en pacientes con HCC. Así, mientras Grimm *et al.* proponen que evaluar los niveles de ARNm de OCT1 es útil para predecir la respuesta al sorafenib (Grimm D *et al.* 2016), en otro estudio retrospectivo con pacientes de HCC tratados con sorafenib se describió que la localización en la membrana plasmática de OCT1 en las células tumorales, y no su expresión, correlacionaba con una mayor supervivencia de estos pacientes (Geier A *et al.* 2017).

### **2.5.2. Transportadores implicados en la expulsión de fármacos (MOC-1b)**

Los miembros de la superfamilia de proteínas ABC desempeñan un papel importante entre los MOC que aparecen durante la carcinogénesis o que se potencian en las células tumorales durante el tratamiento de estos pacientes y dificultan el éxito de los regímenes farmacológicos. Las bombas ABC actúan como transportadores activos primarios que utilizan la energía liberada por la hidrólisis de ATP para expulsar medicamentos antitumorales, de forma que impiden que dicho fármaco alcance concentraciones terapéuticas en el interior de la célula tumoral.

La superfamilia ABC incluye el mayor número de proteínas transmembrana descritas. En nuestra especie, existen 48 genes ABC, que se han clasificado en 7 familias que van de la ABCA a la ABCG de acuerdo con la homología de sus secuencias y la organización estructural de los dominios intracelulares para la interacción del ATP o dominios de unión a nucleótidos (NBD), sin apenas incidir en las diferencias entre los TMDs o en la estructura global de la proteína, que puede formarse por un solo péptido con dos NBDs (transportadores completos) o dos semitransportadores similares (homodiméricos) o diferentes (heterodiméricos) con un NBD cada uno (Locher KP 2016).

MDR1 (símbolo del gen: *ABCB1*), también conocido como glicoproteína-P, pertenece a la subfamilia ABCB y se expresa ampliamente en los epitelios de los tejidos considerados clásicamente una barrera fisiológica, como la barrera hematoencefálica o el epitelio intestinal. Es una de las bombas ABCs más estudiadas en quimiorresistencia debido a que puede transportar una gran variedad de fármacos antitumorales (Marin JJ *et al.* 2009).

Varios miembros de la familia ABCC participan en la quimiorresistencia y se les conoce como proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos (MRPs). Entre ellas, las más importantes con respecto a la refractariedad de los tumores humanos son

MRP1 (*ABCC1*), MRP2 (*ABCC2*), MRP3 (*ABCC3*) y MRP4 (*ABCC4*). Se ha establecido una clara relación entre MRP1 y la resistencia a muchos agentes antineoplásicos, como la doxorubicina y la vincristina, según estudios *in vitro* realizados con líneas celulares (Grant CE *et al.* 1994). MRP2 tiene una elevada expresión en la membrana canalicular de los hepatocitos y juega un papel importante en la resistencia a derivados de platino, ya que puede reducir las concentraciones intracelulares del cisplatino (Cui Y *et al.* 1999). Esta proteína está elevada en HCC, donde su expresión presenta una relación inversa con el éxito del tratamiento con cisplatino (Korita PV *et al.* 2010). Por otro lado, se ha sugerido que la expresión de MRP3 en CCA podría contribuir al fenotipo intrínseco MDR característico de este tipo de cáncer (Rau S *et al.* 2008); en este sentido se ha encontrado que la expresión de MRP3 en líneas celulares se relaciona con resistencia a etopósido, doxorubicina y pararubicina (Marin JJG *et al.* 2018b). MRP4 transporta distintos tipos de fármacos antitumorales como las antraciclinas, análogos de purina, metotrexato o camptotecinas (Marin JJ *et al.* 2009).

La familia de genes ABCG incluye un importante transportador que es responsable del fracaso de la quimioterapia en muchos tumores: *ABCG2*, que también se conoce como proteína de resistencia del cáncer de mama (BCRP). La expresión de *ABCG2* puede ser un marcador selectivo de la eficacia de los regímenes farmacológicos en el tratamiento de algunos tipos de cáncer, como el carcinoma colorrectal (Lin PC *et al.* 2013), y carcinoma escamoso esofágico (Tsunoda S *et al.* 2006).

## 2.6. TERAPIAS DIRIGIDAS EN COLANGIOCARCINOMA

Ante la baja eficacia de la quimioterapia convencional frente al CCA, basada en la combinación de gemcitabina y cisplatino, varios ensayos clínicos han evaluado la utilidad de agentes específicamente diseñados para inhibir dianas moleculares activas en este tipo de tumor, lo cual se conoce como terapia dirigida. Las terapias dirigidas más frecuentes en cáncer son las que emplean TKIs frente a EGFR o del endotelio vascular (VEGFR), aunque desafortunadamente no han dado buenos resultados en CCA (Simile MM *et al.* 2019).

En los últimos años se han identificado nuevas alteraciones moleculares en el CCA, que participan en el desarrollo y la progresión de este tumor y que emergen como dianas prometedoras para su tratamiento. Algunas de estas nuevas dianas ya han sido comentadas en el apartado 2.3.2.5. de la Introducción, como las variantes mutadas del IDH1/IDH2, las proteínas de fusión del FGFR2 o las mutaciones en los genes de las proteínas responsables del remodelado de la cromatina (Mertens JC *et al.* 2018; Simile MM *et al.* 2019).



**Tabla I-3.** Terapias dirigidas contra el CCA avanzado que se encuentran actualmente en ensayos clínicos.

Tratamiento	Diana(s)	Fase	Identificador
Gemcitabina + oxaliplatino + capecitabine vs. gemcitabina + oxaliplatino + capecitabina + <b>panitumumab</b>	EGFR	II	NCT00779454
Gemcitabina + oxaliplatino + capecitabina + <b>panitumumab</b> o <b>bevacizumab</b>	EGFR - VEGFR	II	NCT01206049
<b>Trastuzumab + tipifarnib</b>	HER2/neu + RAS	I	NCT00005842
<b>Varlitinib</b>	EGFR	II	NCT02609958
Gemcitabina + oxaliplatino + <b>cetuximab + trastuzumab + gefitinib + lapatinib + sorafenib + crizotinib</b>	Múltiples dianas	I/II	NCT02836847
<b>Afatinib</b> + capecitabina	EGFR	I	NCT02451553
<b>LY2801653 + cetuximab</b> o cisplatino o gemcitabina o <b>ramucirumab</b>	Múltiples dianas	I	NCT01438554
<b>Pazopanib + GSK1120212</b>	Múltiples dianas	I	NCT01438554
<b>Sunitinib</b>	Múltiples dianas	II	NCT01718327
Gemcitabina + <b>pazopanib</b>	Múltiples dianas	II	NCT01855724
<b>Regorafenib</b>	Múltiples dianas	II	NCT02053376 NCT02162914
Gemcitabina + oxaliplatino + <b>regorafenib</b>	Múltiples dianas	II	NCT02386397
<b>Ramucirumab</b>	VEGFR	II	NCT02520141
<b>Sorafenib</b>	VEGFR/PDGFR/BRAF	II	NCT00238212
<b>Sorafenib</b> + oxaliplatino/capecitabina	VEGFR/PDGFR/BRAF	I/II	NCT00634751
<b>Ponatinib</b>	FGFR	II	NCT02265341
<b>BGJ398</b>	FGFR2	II	NCT02150967
<b>ARQ087</b>	FGFR2	II	NCT01752920
<b>PLX8394</b>	BRAF	I/II	NCT02428712 NCT02012231
<b>Trametinib</b> vs. 5-FU o capecitabina	MEK	II	NCT02042443
Gemcitabina + <b>MEK162</b>	MEK	II	NCT01828034
<b>Cabozantinib</b>	MEK	II	NCT01954745
<b>Everolimus</b> + gemcitabina	mTOR	I	NCT00949949
Sirolimus + gemcitabina	mTOR	I	NCT01888302
Gemcitabina + <b>selumetinib</b> vs. gemcitabina	MEK	II	NCT02151084
<b>AG-120</b>	IDH	I	NCT02073994
<b>AG-120</b>	IDH	III	NCT02989857
<b>BBI-503</b>	STAT3	II	NCT02232633
<b>Nivolumab</b> o <b>ipilimumab</b>	PD1/CTL4	II	NCT02834013

Se resaltan en negrita los inhibidores de las dianas moleculares. (Modificada de Simile MM *et al.*, 2019). EGFR, receptor del factor de crecimiento epitelial; FGFR, receptor del factor de crecimiento de fibroblastos; IDH, isocitrato deshidrogenasa-1 mutada; PDGFR, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas; STAT3, Transductor de señal y activador de la transcripción 3; VEGFR, receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular.

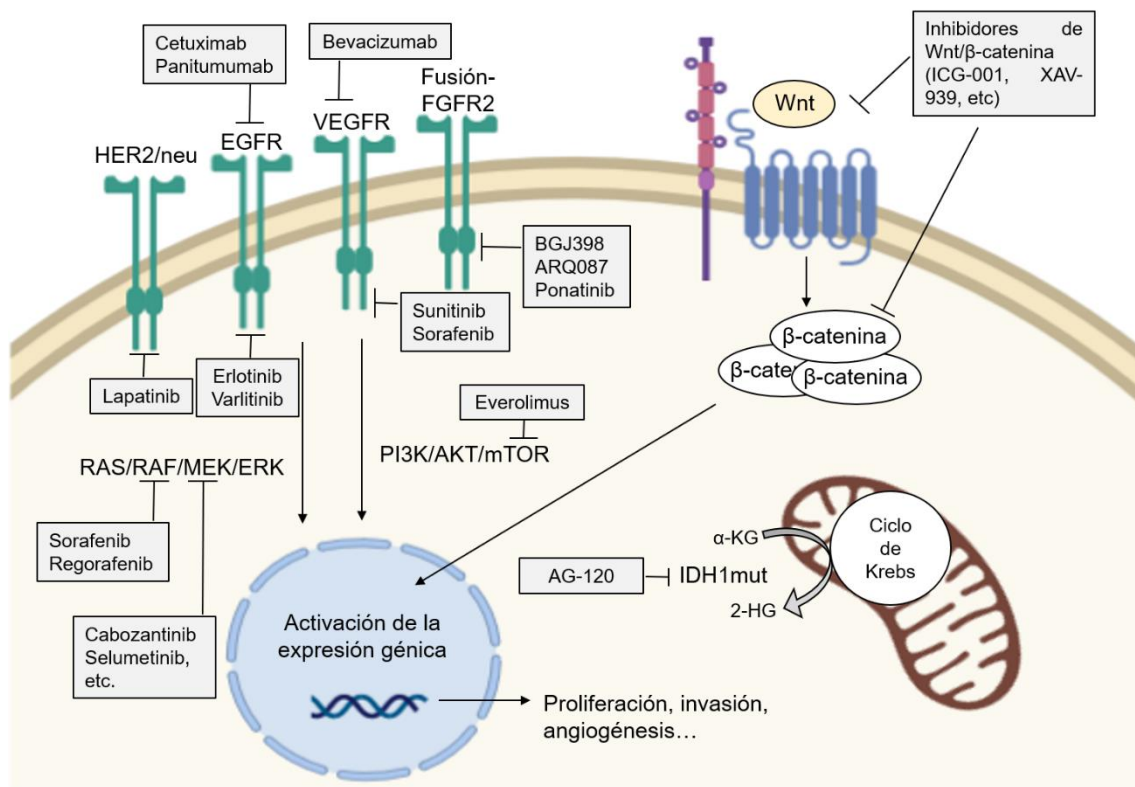


El descubrimiento de nuevas dianas ha fomentado el desarrollo de fármacos que pueden inhibirlas directamente o indirectamente al bloquear las vías de señalización en las que participan y que actualmente se están probando en ensayos clínicos con pacientes de CCA (Tabla I-3).

### 2.6.1. Inhibidores de tirosina quinasa (TKIs)

La familia de proteínas con actividad tirosina quinasa (TK) regula distintas rutas de señalización implicadas en la comunicación celular, por lo que mutaciones en estas proteínas se asocian con la iniciación y la progresión del cáncer. Las rutas de señalización de TK más relevantes son la vía RAS/RAF/MEK/ERK (o vía MAPK), que participa en la modulación del crecimiento, la diferenciación, supervivencia y apoptosis de las células; y la ruta de VEGF, proteína esencial para la activación de la angiogénesis. La familia de TK incluye otros miembros como EGFR, HER2/neu, PDGFR y FGFR2.

En los últimos años se ha demostrado la implicación de las TKs en la patogenia del CCA y, en consecuencia, se consideran dianas prometedoras para el tratamiento de este tipo de tumor (Figura I-9)



**Figura I-9.** Representación esquemática de las terapias dirigidas frente a las dianas terapéuticas más relevantes del CCA. EGFR, receptor del factor de crecimiento epitelial; FGFR, receptor del factor de crecimiento de fibroblastos; HER2/neu, factor de crecimiento epidérmico humano 2; 2-HG, 2-hidroxiglutarato; IDH1mut, isocitrato deshidrogenasa-1 mutada; α-KG, alfa-cetoglutarato; VEGFR, receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular.

### 2.6.1.1. Inhibidores de ErbB

EGFR es una proteína transmembrana de la familia de receptores ErbB, a la que también pertenece HER2/neu. La unión del ligando (EGF o TGF- $\alpha$ ) a estos receptores induce su dimerización y consecuente activación de cascadas de señalización como RAS/RAF/MEK/ERK, JAK/STAT o PI3K/AKT/mTOR, que afectan a la proliferación y migración celular, entre otros procesos (Sirica AE 2008).

Se ha descrito una sobre-expresión de EGFR y HER2/neu en el 10-32% de iCCA (Sirica AE 2008; Sia D *et al.* 2013b). En estudios preclínicos en los que se utilizaron agentes anti-EGFR o anti-HER2/neu se obtuvieron resultados prometedores (Zhang Z *et al.* 2010), y también en ensayos clínicos de fase II donde se trataron pacientes de CCA avanzado con erlotinib (inhibidor de EGFR) o cetuximab (anticuerpo monoclonal anti-EGFR) (Philip PA *et al.* 2006; Gruenberger B *et al.* 2010) (Figura I-9). Sin embargo, en otro ensayo de fase II no se observó un beneficio terapéutico relevante en términos de supervivencia global entre pacientes con cáncer de vías biliares avanzado que fueron tratados con erlotinib combinado con gemcitabina y oxaliplatino y pacientes tratados con la quimioterapia solamente (Lee J *et al.* 2012). Actualmente, se están llevando a cabo ensayos clínicos para evaluar el potencial de otros TKIs anti-ErbB en combinación con quimioterapia (Tabla I-3).

### 2.6.1.2. Inhibidores de FGFR

Como ya se comentó en el apartado 2.3.2.5. de la Introducción, la producción de proteínas de fusión aberrantes con FGFR2 se considera una alteración específica del iCCA. Se han desarrollado inhibidores selectivos y no-selectivos, así como anticuerpos monoclonales frente a FGFR2. BGJ398, un inhibidor no-específico de FGFR, desencadenó la muerte celular y limitó el crecimiento tumoral en un modelo animal de xenotrasplante derivado de CCA humano (Rizvi S y Borad MJ 2016). Ponatinib es un TKI cuyas dianas son BCR-ABL y varias isoformas del FGFR; este fármaco se ha utilizado con éxito en dos pacientes con CCA que no respondían a quimioterapia. Actualmente, se está investigando la eficacia del ponatinib y de los inhibidores BGJ398 y ARQ087 en pacientes con CCA (Tabla I-3) (Figura I-).9

### 2.6.1.3. Inhibidores de VEGFR y PDGFR

Los datos bibliográficos apuntan a que el receptor VEGFR se encuentra generalmente elevado en CCA. Así, en una serie de 236 tumores, se observó una sobre-expresión de VEGF en el 54% de los iCCA y 60% de los eCCA (Yoshikawa D *et al.* 2008). Por otro lado, los niveles de PDGF son elevados en las líneas celulares de CCA

y en biopsias humanas, y dicho aumento ha sido asociado con el estadio de la enfermedad, metástasis y mal pronóstico (Boonjaraspinyo S *et al.* 2012).

Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal contra el VEGF (Figura I-9) que puede bloquear la vascularización y crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo* (Vaeteewoottacharn K *et al.* 2016). La combinación del bevacizumab con gemcitabina y oxaliplatino consiguió una supervivencia media de 12,7 meses en 35 pacientes con CCA irresecable (Zhu AX *et al.* 2010).

### 2.6.2. Otras terapias dirigidas para el tratamiento del CCA

El uso de inhibidores frente a las variantes mutadas de IDH1/2 se ha propuesto como una alternativa terapéutica para el iCCA. Un 56% de los pacientes de iCCA tratados con el inhibidor de la variante mutada de IDH1 (AG-120) presentaron enfermedad estable, y un 6%, una respuesta parcial al tratamiento (Lowery MA *et al.* 2017) (Figura I-9). En consecuencia, se ha puesto en marcha un ensayo clínico para estudiar la eficacia del AG-120 como tratamiento frente al CCA (Tabla I-3) (Fan B *et al.* 2019).

Respecto a las terapias dirigidas frente a la vía de señalización RAS/RAF/MEK/ERK, se han probado inhibidores de B-RAF y MEK en CCA. PLX8394, un inhibidor oral de las formas silvestre y mutada de B-RAF, está siendo evaluado en pacientes con tumores sólidos, incluido CCA (Tabla I-3). Por otro lado, el inhibidor de las proteínas MEK1/2, selumetinib (Figura I-9), ha sido probado como monoterapia o en combinación con quimioterapia en grupos pequeños de pacientes con CCA, consiguiendo mantener la estabilidad de la enfermedad en un 60-75% de los casos (Simile MM *et al.* 2019). En la actualidad, se pretende estudiar su eficacia en combinación con gemcitabina (Tabla I-3). Otros agentes bloqueantes de MEK, como el cabozantinib, trametinib y MEK162 están actualmente en ensayos clínicos (Tabla I-3).

Otras terapias dirigidas que se comienzan a investigar para el tratamiento del CCA son los inhibidores de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina, la vía PI3K/AKT, bloqueantes de los fibroblastos asociados al cáncer, que ayudan al tumor a crecer, y la inmunoterapia (Figura I-9) (Mertens JC *et al.* 2018; Adeva J *et al.* 2019).

### 2.6.3. El sorafenib como terapia dirigida contra el cáncer hepático

El sorafenib, N-(3-trifluorometil-4-clorofenil)-N'-(4-[2-metilcarbamoil piridina-4-yl] oxifenil) urea, (también conocido como BAY43-9006 o Nexavar®), es una bi-aril urea, que se administra en forma de tosilato de sorafenib, y que presenta actividad inhibidora

multiquinasas. Sus dianas son algunas de las proteínas de la ruta RAS/RAF/MEK/ERK como C-RAF, la forma silvestre de B-RAF y la B-RAF mutada V600E, MEK y ERK (Liu L *et al.* 2006). Además, puede desencadenar la apoptosis celular por el bloqueo de la proteína Mcl-1 (Liu L *et al.* 2006). También inhibe la angiogénesis a través del bloqueo de VEGFR, PDGFR, c-KIT, FLT-3 y el receptor RET (Wilhelm SM *et al.* 2004) (Figura I-9).

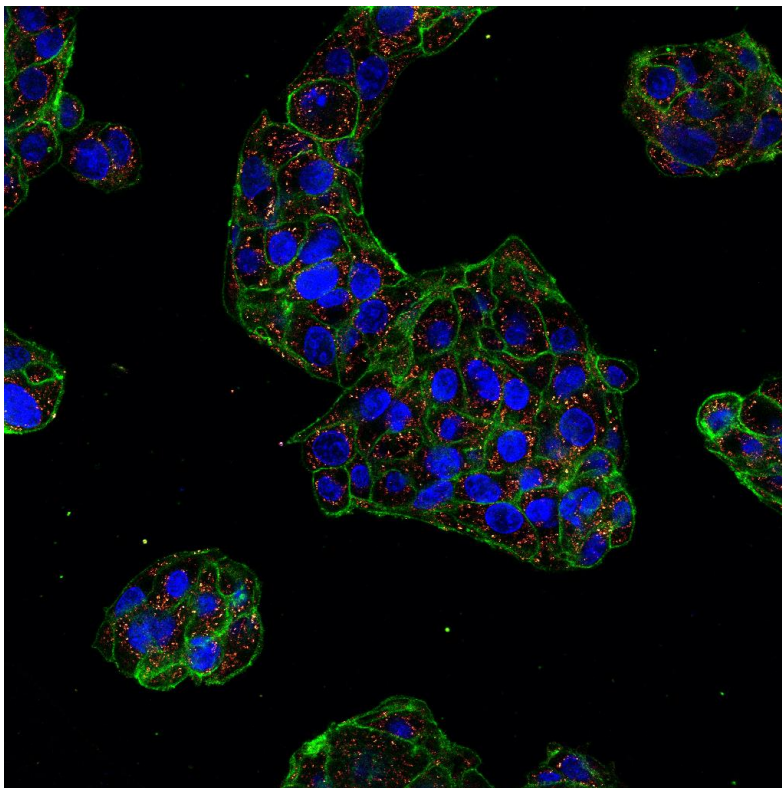
Como se ha comentado anteriormente, el sorafenib es utilizado como terapia sistémica de primera elección en el HCC avanzado, administrándose por vía oral a dosis de 400 mg dos veces al día (Bolondi L *et al.* 2015). El ensayo clínico SHARP (“Sorafenib Hepatocellular carcinoma Assessment Randomized Protocol”) fue el primer ensayo donde una terapia sistémica prolongó la vida media de pacientes con HCC. En este ensayo, la supervivencia media de los pacientes tratados con sorafenib fue de 10,7 meses, en comparación con los 7,9 meses de supervivencia del grupo que recibió placebo (Llovet JM *et al.* 2008b). Más adelante, el ensayo Asia-Pacific (AP) consiguió prolongar la supervivencia desde 4,2 meses en el grupo placebo a 6,5 meses en el grupo de sorafenib (Bolondi L *et al.* 2015). Además, algunos casos clínicos han mostrado una remisión completa de la enfermedad a largo plazo (Park JG *et al.* 2017).

A pesar de los beneficios terapéuticos que se obtienen en HCC con el sorafenib, los datos disponibles respecto a la utilidad de este TKI en CCA son controvertidos. El sorafenib inhibe la ruta de las MAPK en líneas celulares de CCA humano, lo cual induce la parada del ciclo celular y su acción antitumoral (Huether A *et al.* 2007). Aunque el sorafenib es, generalmente, bien tolerado por los pacientes con CCA (Pan TT *et al.* 2017), el efecto sobre la supervivencia no es aún concluyente. En pacientes de CCA se ha descrito una actividad antitumoral del sorafenib nula o baja en ensayos clínicos de fase II (Bengala C *et al.* 2010; El-Khoueiry AB *et al.* 2012; Luo X *et al.* 2017), una acción moderada en dos pacientes (LaRocca RV *et al.* 2007) y, en algún caso aislado, una potente actividad con aumento de supervivencia (Pinter M *et al.* 2011). La combinación del sorafenib con otro TKI, el erlotinib, no obtuvo el resultado esperado, consiguiendo una supervivencia media de apenas 6 meses, mientras que la administración conjunta del sorafenib con gemcitabina-cisplatino consiguió prolongar la vida media a 14,4 meses (Lee JK *et al.* 2013; El-Khoueiry AB *et al.* 2014).

En general, el tratamiento con sorafenib en pacientes con tumores hepáticos tiene efectos beneficiosos moderados y transitorios, cuya eficacia frecuentemente se reduce por la presencia de MOCs. Además, presenta algunos efectos tóxicos, afectaciones dérmicas, como el “síndrome mano-pie”, hipertensión, fatiga, proteinuria o

diarrea y, más raramente, efectos cardiovasculares adversos muy graves (Li Y *et al.* 2015). Sin embargo, en un estudio retrospectivo con pacientes de HCC que habían sido previamente tratados con sorafenib se asoció la aparición de reacciones dérmicas con una mejor respuesta al tratamiento farmacológico (Rimola J *et al.* 2018).





### 3. Materiales y Métodos

### 3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

#### 3.1.1. Muestras humanas

Las muestras de tejido hepático de pacientes con CCA y HCC se obtuvieron a través de los bancos de tumores de los Hospitales Universitarios de Salamanca (“Serie de Salamanca”) (Tabla MM-1), y de San Sebastián (“Serie de San Sebastián”) (Tabla MM-2). Todos los pacientes habían firmado el consentimiento informado para el uso de las muestras en investigación. Los datos personales fueron tratados con confidencialidad y seguridad, de acuerdo con la normativa que se recoge en el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, y los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del área de Salud de cada uno de los hospitales de procedencia.

**Tabla MM-1.** Características de los pacientes y tumores incluidos en la “Serie de Salamanca”.

ID	Edad	Género	Tipo	Estadio tumoral	ID	Edad	Género	Tipo	Estadio tumoral
1	52	H	iCCA	II	17	80	M	dCCA	II
2	76	M	iCCA	IV	18	82	H	dCCA	II
3	65	M	iCCA	II	19	65	H	dCCA	I
4	58	H	iCCA	I	20	72	H	dCCA	II
5	75	H	iCCA	ND	21	71	H	iCCA	II
6	50	M	iCCA	ND	22	71	H	iCCA	I
7	56	M	pCCA	II	23	73	H	dCCA	II
8	81	M	iCCA	II	24	63	H	iCCA	ND
9	83	M	iCCA	II	25	64	H	iCCA	II
10	50	H	iCCA	II	26	69	H	iCCA	I
11	48	M	pCCA	II	27	71	H	pCCA	ND
12	62	H	iCCA	II	28	71	H	pCCA	ND
13	72	H	pCCA	IV	29	70	H	iCCA	ND
14	79	H	dCCA	II	30	71	H	iCCA	ND
15	75	M	dCCA	II	31	63	H	eCCA	ND
16	70	M	iCCA	I	32	63	H	eCCA	ND

dCCA, colangiocarcinoma distal; iCCA, colangiocarcinoma intrahepático; pCCA, colangiocarcinoma perihiliar; H, hombre; ID, número de identificación del paciente; M, mujer; ND, no disponible.



**Tabla MM-2.** Características de los pacientes y tumores hepáticos incluidos en la “Serie de San Sebastián”.

ID	Edad	Género	Tipo	ID	Edad	Género	Tipo
1	85	H	CCA	1	55	H	HCC
2	62	H	iCCA	2	73	M	HCC
3	78	M	CCA	3	54	H	HCC
4	70	H	iCCA	4	52	M	HCC
5	82	M	CCA	5	53	H	HCC
6	61	H	iCCA	6	71	H	HCC
7	64	M	CCA	7	55	H	HCC
8	ND	ND	CCA	8	54	H	HCC
9	80	H	iCCA	9	49	H	HCC
10	68	H	iCCA	10	54	H	HCC
11	60	H	iCCA	11	65	H	HCC
12	64	H	eCCA	12	48	H	HCC
				13	75	H	HCC
				14	68	H	HCC
				15	66	H	HCC
				16	77	H	HCC
				17	46	H	HCC
				18	76	H	HCC
				19	70	M	HCC
				20	75	H	HCC
				21	58	H	HCC

eCCA, colangiocarcinoma extrahepático; iCCA, colangiocarcinoma intrahepático; H, hombre; HCC, hepatocarcinoma; ID, identificación del paciente; M, mujer; ND, no disponible.

### 3.1.2. Modelos animales

Para los modelos animales de desarrollo de CCA y HCC se utilizaron ratas macho de la raza Wistar, entre 280-300 g, procedentes del animalario situado en el Edificio Departamental de la Universidad de Salamanca. Para llevar a cabo los estudios de quimiosensibilización *in vivo* se utilizaron ratones nude atómicos hembra (lco: *Swiss-nu/nu*) (Harlan Laboratories, Barcelona), que se mantuvieron en aisladores ubicados en salas con condiciones controladas para garantizar un ambiente estéril.

Los animales recibieron bebida y comida (pienso granulado comercial) *ab libitum* y se mantuvieron en habitaciones con temperatura (20°C-25°C) y humedad relativa (40%-70%) controladas, dotadas de un sistema de iluminación regulable que establecía un ciclo de luz/oscuridad (12 h/12 h) constante.

Los animales fueron manipulados según las especificaciones establecidas por la Unión Europea (Directiva 63/2010/UE) y la normativa española vigente para el uso y cuidado de animales utilizados en experimentación (Real Decreto 53/2013). Todos los protocolos experimentales empleados fueron aprobados por el Comité de Bioética para el uso de animales de laboratorio de la Universidad de Salamanca.

### 3.1.3. Líneas celulares

En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- Proporcionadas por la American Type Culture Collection (ATCC, LGC Standards, Barcelona): de HCC humano, Alexander o PCL/PRF/5 (CRL 8024), de HCC de rata, McA-RH7777 (CRL-1601) y células embrionarias de riñón humano, HEK-293T (CRL-3216).
- Proporcionadas por la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Alemania): de eCCA humano, TFK-1 (ACC 344) y EGI-1 (ACC 385); y de CCA de rata, NT-92 (ACC 639).
- Proporcionadas por Thermo Fisher: células embrionarias de riñón humano, HEK-293A (R70507).
- Las células HuH6 de HB humano fueron cedidas por la Dra. Carolina Armengol del Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud Germans Trias i Pujol (IGTP), Barcelona. Las células HuH7 de HCC humano fueron cedidas por el Dr. Pedro Majano del Hospital Universitario de la Princesa, Madrid. Las células humanas HuCCT1 de iCCA y Witt de eCCA fueron cedidas por el Dr. Jesús Bañales del Instituto de Investigación BioDonostia, San Sebastián.
- Las células REUSAL-C44 y -C49 fueron desarrolladas en nuestro grupo de investigación a partir de CCA de rata (Lozano E *et al.* 2015).

### 3.1.4. Bacterias

Se utilizaron bacterias de la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*, químicamente competentes, proporcionadas por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca para la producción de plásmidos.

Las bacterias *E. coli* "One Shot ccdB Survival-T1<sup>R</sup>" competentes (Invitrogen, Barcelona), de elevada eficacia de transformación, se utilizaron para propagar los vectores donadores y de destino para la clonación Gateway.

### 3.2. PRODUCTOS

Los productos utilizados en este trabajo se obtuvieron de las siguientes casas comerciales:

- Abbot Laboratorios (Madrid): isofluorano (Forane®) y pentobarbital sódico (Nembutal N.R.).
- Air Liquide (Valladolid): CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> líquido.
- AppliChem (Madrid): ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico (HEPES), eosina, glicina y leche descremada liofilizada.
- B. Braun (Melsungen, Alemania): sutura de seda.
- BD Biosciences (Madrid): fluido envolvente FACS Flow para citometría de flujo y colágeno tipo I de cola de rata.
- Biomers.net (Ulm, Alemania): algunos “primers”.
- Bio-Rad (Madrid): acrilamida, membranas de nitrocelulosa, persulfato de amonio, tampón Tris 0,5 M pH 6,8, tampón Tris 1,5 M pH 8,8 y tetrametiletilendiamina (TEMED).
- Cell Biolabs (San Diego, EE.UU.): kit de purificación de adenovirus “ViraBind™ Adenovirus Miniprep Kit” (VPK-099).
- Condalab (Madrid): agar, extracto de levaduras y triptona.
- Dako Diagnósticos (Barcelona): medio de montaje para fluorescencia.
- GE Healthcare (Barcelona): Reactivos de detección ECL (“Enhanced ChemoLuminescence”) que incluyen los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa y los reactivos de detección 1 y 2, kit “GFX PCR DNA & Gel Band Purification”, kit “PlasmidPrep Mini Spin” y el kit “illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit”.
- Leo Laboratorios S.A. (Madrid): heparina.
- Menarini Diagnostics (Barcelona): portaobjetos Optiplus™ y kits de química seca “Spotchem II Liver-1” y “Spotchem II Kidney-3”.
- Merck (Barcelona): acetato sódico anhidro, ácido fórmico, ácido fosfomolibdico, cloruro sódico, etanol, formaldehído, glicerol, hidróxido sódico, isopropanol, β-mercaptoetanol, metanol, reactivo de Folin Ciocalteau y tartrato disódico.

- Millipore (Waters Corporation, Madrid): filtros “Steritop™” para la esterilización de medios de cultivo.
- Promega Corporation (Madison, Wisconsin, EE.UU.): algunas enzimas de restricción, T4 ADN ligasa, kit “Bright-Glo Luciferase Assay System” y plásmidos pGEM®-T Easy y pGL4.10- [Luc2].
- Pronadisa (Hispalab S.A., Madrid): agarosa de baja electroendósmosis, agarosa de alta resolución MS-8 y agarosa de bajo punto de fusión.
- Qiagen (Izasa, Barcelona): kit de extracción de ADN “DNeasy Blood & Tissue kit”.
- Roche (Barcelona): algunas enzimas de restricción.
- Sigma-Aldrich (Madrid): ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), albúmina sérica bovina (fracción V), ampicilina, azul de bromofenol, azul de Tripán, bicarbonato sódico, cis-diaminodicloroplatino II (cisplatino), clorhidrato de quinina, cloroquina, cloruro de colina, D-glucosa, dietilpirocarbonato (DEPC), sal sódica de diclofenaco (DICLO), dimetilsulfóxido (DMSO), ditioneitol (DTT), dodecil sulfato sódico (SDS), 5-fluorouracilo (5-FU), fumitremorgina C (FTC), isotiocianato de fluoresceína (FITC), yoduro de propidio (IP), medio de cultivo “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM)-high glucose”, DMEM/F12 (“Nutrient Mixture F12”), mezcla de inhibidores de proteasas (4-(2-aminoetil) bencenosulfonilfluoruro 104 mM, pepstatina A 1,5 mM, E-64 1,64 mM, bestatina 4 mM, leupeptina 2 mM y aprotinina 80 μM), mitoxantrona (MTX), N-dietilnitrosamina (DEN), paraformaldehído, polibreno (bromuro de hexadimetrina), polietilenimina (PEI), piruvato sódico, SN-38, tioacetamida (TAA), tripsina de páncreas porcino, Tris (trishidroximetil aminometano) base (Trizma) o clorhidrato (Tris-HCl) y Triton X-100.
- Takara (Laboratorios Conda, Madrid): algunas enzimas de restricción.
- Thermo Fisher Scientific (Madrid): Accuprime®*Pfx* ADN polimerasa de alta fidelidad, aminoácidos no esenciales 100x, anticuerpos secundarios fluorescentes anti-IgG de ratón, de conejo y de cabra marcados con AlexaFluor® 594 o AlexaFluor® 488, calceína acetoximetil éster (calceína-AM), mezcla de antibióticos (penicilina/estreptomina) y antimicótico (anfotericina B), 4,6-diamidino-2-fenilindol (Dapi), enzimas de restricción “FastDigest™”, suplemento de glutamina GlutaMAX, kanamicina, kits comerciales para la transcripción reversa (RT) “SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit” y “High-Capacity cDNA

Reverse Transcription Kit”, “Lipofectamine™ LTX Reagent” y “Plus™ Reagent”, líquido estabilizador “RNA<sub>later</sub>”, marcadores de peso molecular de ADN (25, 100 y 500 pb y 1 kb plus), marcador de peso molecular de proteínas “Page Ruler”, medios de cultivo Opti-MEM, RPMI 1640 con Glutamax™-I, medio SOC, mezclas enzimáticas “Gateway BP Clonase II” y “Gateway LR Clonase II”, plásmidos donador pDONOR 221 y de destino pcDNA6.2-DEST y pAd/pL-DEST, proteinasa K, suero bovino fetal (FBS), SYBR Green I para teñir ADN en geles de agarosa (“SYBR Safe”), “SYBR Green I PCR Master Mix”, kit de ARN ribosómico 18S “TaqMan™ Ribosomal RNA Control Reagents”, T4 polinucleótido quinasa, “Taqman® Universal PCR Master Mix” y tarjetas microfluídicas o TLDA.

- VWR Internacional (Barcelona): ácido acético glacial, ácido clorhídrico, carbonato sódico, cloroformo, cloruro cálcico, cloruro magnésico, cloruro potásico, dihidrógeno fosfato potásico, fosfato ácido potásico, fosfato disódico, indicador universal de pH, medio de montaje Entellan®, mezcla de glicoles y resinas para realizar cortes en el criostato Tissue-Tek® O.C.T. (“Optimum Cutting Temperature”), sulfato magnésico y Tween® 20.
- Whatman (Madrid): papel Whatman para la transferencia en western blot.

El tosilato de sorafenib (Nexavar®) fue proporcionado por el Servicio de Farmacia del Hospital Universitario de Salamanca.

Los plásmidos lentivirales pWPI, psPAX2 y pMD2.G fueron cedidos por el Dr. Ángel Hernández Hernández de la Universidad de Salamanca.

Todos los demás reactivos utilizados fueron del grado requerido para cada caso.

### 3.3. MEDIOS INSTRUMENTALES

Las pesadas se realizaron en balanzas electrónicas digitales Precisa 125 A y Sartorius BL 150S (Grupo Taper, Madrid). Para pesar los animales se utilizó también una balanza electrónica digital Precisa, modelo 600 C (Grupo Taper).

Para las determinaciones de pH se utilizó un electrodo Crison PH BASIC 20 (Crison Instruments, Barcelona).

El agua destilada y el agua ultrapura se obtuvieron con equipos de purificación de agua del Sistema MiliQ Integral 3 (Millipore-Merck, Madrid).

Las incubaciones se llevaron a cabo en un baño termostático LAUDA Ecoline StarEdition RE106 y en un bloque térmico QBA2 Grant (Thermo Fisher).

Las centrifugaciones se realizaron en centrífugas refrigeradas 5417R y 5810R marca Eppendorf (Hamburgo, Alemania), Beckam Avanti J-20, y L8-M Ultracentrifuge y rotor SW 28 Ti (Beckman). También se utilizaron picofugas Stratagene (VWR International Eurolab).

Las medidas espectrofotométricas se hicieron con un espectrofotómetro Hitachi U-2000 (Grupo Taper) y para la determinación de la viabilidad celular se utilizó un lector de ELISA modelo ELx808 (BioTek). Las determinaciones espectrofotométricas de la concentración de ADN y ARN se realizaron con un NanoDrop 1000 (Thermo Fisher) y se analizaron con el programa informático correspondiente.

Para hacer filtraciones a vacío se empleó una bomba Millipore modelo XX5522050 (Millipore Ibérica). Para la esterilización de materiales sólidos y líquidos, y material de cultivos celulares se empleó un autoclave, modelo Tuttnaver 2340 M (Duerolab, Salamanca).

Para llevar a cabo las PCR analíticas y para la RT se utilizó un termociclador Eppendorf Mastercycle egradient (Thermo Fisher). Los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real en tubos de 0,2 ml se realizaron en un equipo ABI PRISM® 7300 Sequence Detection System, de Applied Biosystems. Para las tarjetas microfluídicas se utilizó el modelo ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System de la misma compañía.

Para la visualización de las secuencias y diseño de estudios de restricción de los plásmidos se usó el programa Gene Construction kit 2.5.13 para MacOS X (Textco, New Hampshire, EE.UU.).

La secuenciación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca.

La electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa se realizó en un sistema de geles horizontales sumergidos modelo MT-1001 de la casa Ecogen (Madrid), acoplado a una fuente Bio-Rad Power Pac 3000 (Bio-Rad).

La electroforesis de proteínas se llevó a cabo en un sistema de electroforesis modelo Mini-Protean II Cell con fuente de alimentación modelo PowerPac 300. La transferencia electroforética a membranas de nitrocelulosa se realizó en un sistema Trans-Blot Cell II, todo procedente de la casa comercial Bio-Rad.

Para la visualización de la fluorescencia de los geles de ácidos nucleicos y la luminiscencia de las membranas de western blot se empleó un equipo de análisis de imagen Fujifilm LAS- 4000 (TDI, Madrid). La captura de imágenes se llevó a cabo con

una cámara refrigerada del equipo, sin filtros y con una apertura del diafragma del objetivo de f 0,8 cuando se trataba de quimioluminiscencia, y con filtro Y515 y diafragma del objetivo f 1,5 para SYBR Green, con luz azul como fuente de excitación. Las imágenes se analizaron con el programa informático MultiGauge v3.0 (Fujifilm).

Las homogeneizaciones de tejidos se realizaron con los homogeneizadores Polytron Typ PT 10/35 Kinemática GMBH (Lucerna, Suiza) o “Bullet Blender Storm” de Next Advance (NY, EE.UU.), o con un sonicador tipo baño Ultrasonic Cleaner 400 W, 30 kHz (Fungilab S.A., Barcelona), en el caso de compuestos poco solubles.

Para la manipulación de los cultivos celulares se utilizó una campana de flujo laminar modelo AV-30/70 (Telstar, Barcelona); las células se mantenían a 37°C en un incubador termostatzado con atmósfera de CO<sub>2</sub> humidificada modelo Hepa Class 100 (Thermo Fisher), y se observaban a través de un microscopio Leitz Fluovert FS (Leitz). Los viales de almacenamiento de las distintas líneas celulares se conservaban en un contenedor de N<sub>2</sub> líquido (Thermo Fisher). Se utilizaron placas de cultivo y frascos Roux de cuello inclinado de la marca TPP (Biotech S.L., Madrid) para el cultivo de las líneas celulares. Para algunas líneas celulares se utilizaron frascos de cultivo con colágeno a la concentración de 0,5 mg/ml. La esterilización de las soluciones se hizo mediante filtro Sterivex de 0,2 µm (Millipore Ibérica). Para contar las células se utilizaron cámaras Thoma.

Los cortes histológicos se realizaron con un criostato (Leica Biosystems, modelo 1900UV, Barcelona) para muestras congeladas y un microtomo (Leica Biosystems, modelo RM2125 RTS) para muestras incluidas en parafina. Para visualizar la fluorescencia se utilizó un microscopio Nikon Eclipse TE 2000-S (Nikon, Duerolab) o un microscopio confocal modelo TCS SP2 (Leica) perteneciente al Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca.

Para el cultivo de bacterias se utilizó una estufa termostatzada a 37°C modelo S-20 (Selecta, Barcelona).

El análisis por citometría de flujo de la captación o eflujo de compuestos fluorescentes se realizó en un citómetro FACScalibur, de la casa BD Biosciences. El programa informático utilizado para la adquisición y análisis de datos fue el CellQuestPro, de la misma casa comercial.

También se utilizó un sistema cromatográfico acoplado a un detector de masas, HPLC-MS/MS, de la casa Agilent Technologies (Santa Clara, EE.UU.). Este sistema se compone de un equipo de HPLC serie 1200 formado por: una bomba cuaternaria con

desgasificador de vacío (modelo G12354A); un inyector de 20 µl de capacidad (modelo G1328B); un detector ultravioleta/visible (modelo G1314B) de longitud de onda variable y programable y una columna de fase reversa Zorbax C18 de 30 mm x 2,1 mm, 3,5 µm de tamaño de poro termostaticada a 35°C (Agilent Technologies). El Detector de Masas Triple Cuadrupolo (modelo G6410A) está acoplado a una fuente de ionización a presión atmosférica (API) serie 6000 (modelo G1948B). Todo el sistema se controló desde un ordenador Pentium IV (modelo HP LP2065) utilizando el software Q-TOF, QQQ, TOF (Agilent Technologies) que permite, tanto el control del HPLC, como del detector de masas.

Las determinaciones de parámetros bioquímicos indicadores de daño hepático y renal en suero se llevaron a cabo mediante los kits de química seca “Spotchem II Liver-1” y “Spotchem II Kidney-3” compatibles con el analizador automatizado “Spotchem EZ SP-4430” (Arkray Factory, A. Menarini Diagnostics, Badalona).

Se contó con pequeño equipamiento, como agitadores magnéticos Selecta (DueroLab), agitadores Vortex de Ika Works (Wilmington, EE.UU.) y micropipetas Gilson (Prosisa, Salamanca).

Las muestras se conservaron en congeladores a -20°C y -80°C marca Revco (Pacisa).

### **3.4. EXPERIMENTOS *IN VIVO***

#### **3.4.1. Evaluación de estrategias de terapia génica para mejorar la respuesta antitumoral en el CCA *in vivo***

Se utilizaron diferentes modelos de xenotransplante en ratones atómicos (*Swiss-nu/nu*) hembra para validar las estrategias de quimiosensibilización en el CCA.

##### **3.4.1.1. Efecto de OCT1 en la respuesta al sorafenib *in vivo***

En un ratón donante, se realizó un implante subcutáneo de  $1 \cdot 10^6$  de células EGI-1 silvestres resuspendidas en PBS. Siete semanas después, se utilizó este ratón para llevar a cabo un implante ortotópico en el hígado de otros ratones *nude*. Para ello, bajo anestesia con pentobarbital del ratón donante, se obtuvo una parte del tumor subcutáneo desarrollado, se cortó en pequeños fragmentos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> y se colocó uno en el hígado de cada uno de los ratones receptores previamente anestesiados (Dominguez MF *et al.* 2001). Al día siguiente de la intervención quirúrgica los animales se dividieron en 4 grupos:



- “Ad-*prBIRC5-Mock*”: ratones (n=5) tratados con una administración i.v. cada 5 días de  $5 \cdot 10^6$  TU de adenovirus *prBIRC5-EGFP* purificados. Representa el grupo control.
- “Sorafenib”: ratones (n=6) que recibieron una inyección i.p. de sorafenib (10 mg/kg p.c.) dos días por semana.
- “Ad-*prBIRC5-OCT1*”: ratones (n=4) que recibieron una inyección i.v. de adenovirus *prBIRC5-OCT1* purificados ( $5 \cdot 10^6$  TU) cada 5 días.
- “Ad-*prBIRC5-OCT1*+Sorafenib”: ratones (n=7) con tratamiento farmacológico y adenoviral combinado.

Los grupos “Control” y “Ad-*prBIRC5-OCT1*” también recibieron mediante inyección i.p. solución salina dos veces por semana. El tratamiento se prolongó durante dos meses y finalizó con el sacrificio animal.

#### 3.4.1.2. Efecto de SOX17 en la respuesta al 5-FU *in vivo*

Se realizaron dos implantes subcutáneos por ratón (un implante en cada flanco) de  $1 \cdot 10^6$  de células EGI-1 silvestres resuspendidas en PBS. Aproximadamente 15 días después, los primeros tumores se hicieron visibles y los animales fueron divididos en cuatro grupos:

- “Control”: ratones que recibieron solución salina i.p. (n=9 tumores).
- “5-FU”: ratones que recibieron 5-FU i.p. (20 mg/kg p.c.) dos veces por semana (n=11 tumores).
- “Ad-*prBIRC5-SOX17*”: ratones a los que se les administraron  $5 \cdot 10^6$  TU de adenovirus *prBIRC5-SOX17* purificados, i.v. por la vena de la cola cada 5 días (n=18 tumores).
- “Ad-*prBIRC5-SOX17*+5-FU”: ratones tratados con una combinación de adenovirus y el fármaco antitumoral (n=12 tumores).

En paralelo, se trató otro grupo de ratones con adenovirus *prCMV-SOX17* (n=9 tumores) con el fin de comparar la especificidad del *prBIRC5* en este modelo *in vivo*.

Se realizó un seguimiento del peso de los animales y del tamaño tumoral dos días a la semana durante todo el periodo experimental. Se determinó el volumen del tumor mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen tumoral} = \frac{(D \cdot d)^2}{2}$$

donde “D” representa el diámetro largo y “d”, el diámetro corto.

El ensayo concluyó con el sacrificio de los ratones tras 19 días desde el inicio del tratamiento, cuando uno de los animales presentó un tumor cuyo volumen superaba ~1,5 cm<sup>3</sup> (límite máximo establecido por el Comité de Bioética de Experimentación Animal).

#### **3.4.2. Modelo experimental de CCA en rata**

Se utilizaron ratas Wistar macho a las que se les administró TAA disuelta en el agua de bebida a la dosis de 0,05% (p/v) durante 36 semanas, según se había establecido previamente en nuestro grupo (Lozano E *et al.* 2014). Como animales control se utilizaron ratas del mismo sexo y edad, que no recibieron el compuesto.

#### **3.4.3. Modelo experimental de HCC en rata**

Se llevó a cabo siguiendo una modificación del modelo clásico de iniciación-promoción-progresión descrito por Solt y Farber (Solt D y Farber E 1976), previamente adaptado en trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación (Monte MJ *et al.* 1999; Al-Abdulla R *et al.* 2019).

Se utilizaron ratas Wistar macho que recibieron una dosis de DEN (200 mg/kg p.c., i.p.) que marcó el inicio del tratamiento, una inyección de 2-acetamidofluoreno (2-AAF; 50 mg/kg p.c., s.c.) dos veces por semana entre los días 14 y 35 y, finalmente, el día 21 de tratamiento los animales fueron sometidos a una hepatectomía parcial. Los animales fueron sacrificados bajo anestesia al final de la semana 32.

#### **3.4.4. Recogida de muestras biológicas**

En todos los modelos *in vivo*, al final del periodo experimental se anestesiaron los animales con pentobarbital sódico (50 mg/kg p.c, i.p.) y se recogieron muestras de tejido hepático no-tumoral (NT) y de los tumores desarrollados, que se colocaban en *RNAlater*® (para extraer ARN) o se congelaban en N<sub>2</sub> líquido (para realizar estudios histológicos, western blot o inmunofluorescencia). En los modelos de quimiosensibilización, también se recogieron muestras de tejidos no-hepáticos (pulmón) para estudiar el tropismo de los vectores adenovirales empleados. Asimismo, se recogieron muestras de sangre que se procesaron para obtener suero que sería utilizado en posteriores análisis.

### 3.5. CULTIVOS CELULARES

Los medios de cultivo utilizados para cada tipo celular fueron los siguientes:

- Alexander, HepG2 y NT-92: MEM suplementado con 2,2 g/l de bicarbonato sódico y 110 mg/l de piruvato sódico.
- EGI-1: DMEM suplementado con 2,2 g/l de bicarbonato sódico, 2,38 g/l de HEPES, y un 1% del cocktail comercial de aa no esenciales.
- HEK-293T, HuH6 y HuH7: DMEM suplementado con 1% GlutaMAX™.
- HEK-293A: DMEM suplementado con 2% GlutaMAX™ y 1% de aminoácidos no esenciales.
- HuCCT1 y TFK-1: RPMI-1640 con 1% GlutaMAX™.
- McA-RH7777: DMEM suplementado con 1% GlutaMAX™.
- REUSAL-C44 y C-49: Williams suplementado (Lozano E *et al.* 2015).
- Witt: DMEM/F12 suplementado (Salter KD *et al.* 2000).

Todos los medios fueron suplementados con un 10% de FBS inactivado (56°C durante 30 min) y 1% de una mezcla de antibióticos que contiene penicilina (20 U/ml) y estreptomicina (0,02 mg/ml). El medio de las Alexander fue suplementado con la misma mezcla de antibióticos a la que se añadió un antimicótico (anfotericina B 0,05 µg/ml).

Los cultivos celulares se mantuvieron en incubadores a 37°C, en atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> en aire y humedad relativa del 80%. Las células HEK-293T fueron cultivadas en superficies recubiertas con 0,5 mg/ml colágeno tipo I.

Para realizar los pases del cultivo o sembrar células para los experimentos pertinentes, se realizaba una tripsinización (0,25% de tripsina y 20 mM de EDTA en PBS) de las células y se recogían en medio de cultivo.

#### 3.5.1. Cultivo celular para estudiar la expresión génica y la funcionalidad de proteínas transportadoras

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos en un volumen final de 3 ml/pocillo a una densidad celular adecuada en función de la línea celular. Tras el tiempo adecuado para cada experimento, las células se recogían y se procesaban para la obtención de ARN total (apartado 3.11.1.) o proteínas totales (apartado 3.12.2.) o para realizar estudios de transporte (apartado 3.10.).

### 3.5.2. Estudios de viabilidad celular

Para analizar el efecto de fármacos antitumorales en las distintas líneas celulares empleadas en esta Tesis Doctoral, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a la densidad adecuada en función de la línea celular. A las 24 h se añadían los agentes citostáticos, a los que se exponían las células un tiempo variable dependiendo del tipo de experimento, y a las 72 h desde el inicio de la adición de los fármacos se realizaba el test de formazán (apartado 3.15.3.).

### 3.5.3. Transfección transitoria con lípidos catiónicos

El modelo experimental utilizado en este trabajo fue el de transfección transitoria de líneas celulares con “Lipofectamine™ LTX Reagent” y “Plus™ Reagent”. Cuando las células son transfectadas de forma transitoria con un transgén, el plásmido recombinante no se integra en el genoma de la célula huésped, es extracromosómico y se pierde durante la división.

Las condiciones óptimas para llevar a cabo la transfección de las células que se han empleado en esta Tesis Doctoral con el lípido catiónico Lipofectamina LTX habían sido previamente determinadas en nuestro grupo de investigación; consisten en relaciones lípidos:ADN con las que se conseguía la mayor eficacia de transfección y menos toxicidad celular.

Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos, a la densidad apropiada según la línea celular, y 24 h después fueron transfectadas. Se realizaron mezclas de 100 ng de plásmido, 0,1 µl de reactivo plus y 20 µl de Opti-MEM, que se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min, tiempo suficiente para que el reactivo plus interaccione con el ADN y favorezca la formación de liposomas. Transcurrido el tiempo, se añadió la lipofectamina en una proporción ADN:LTX adecuada según el tipo celular. A las 24 h se retiraron los complejos de transfección y se añadió medio nuevo y a las 48 h post-transfección se determinó la actividad luciferasa (apartado 3.15.5).

## 3.6. CULTIVO DE BACTERIAS

Medios de cultivo empleados:

Medio Luria-Bertani (LB): 10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levaduras y 10 g/l NaCl; pH 7,0. Las placas de medio LB-agar tenían 15 g/l de agar.

Medio SOC: 20 g/l triptona, 5 g/l extracto de levaduras, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> y 20 mM glucosa; pH 7,0.

### 3.6.1. Transformación de bacterias por choque térmico

Se mezclaron 2 µl (5-10 ng DNA) del plásmido de interés en 50 µl de suspensión bacteriana, que se incubó durante 30 min en hielo. Para facilitar la entrada del plásmido, las bacterias se sometieron a un choque térmico, que consistió en elevar la temperatura a 42°C durante un tiempo variable dependiendo de la cepa bacteriana (30 s para “One Shot ccdB Survival T1-R” y 2 min para DH5α). A continuación, se mantuvo la mezcla en hielo durante 2 min. Se añadieron 250 µl de medio SOC sobre dicha mezcla y se realizó una incubación en agitación durante 1 h a 37°C. Posteriormente, alrededor de un tercio del volumen se sembró en condiciones de esterilidad por extensión con un asa de vidrio en una placa con medio LB y agar suplementado con el antibiótico de selección (100 µg/ml de ampicilina, 50 µg/ml kanamicina o 50 µg/ml blasticidina). Se incubaron en una estufa a 37°C durante 16 h.

### 3.6.2. Selección de colonias y crecimiento en medio líquido

Se seleccionaron colonias aisladas de bacterias que habían crecido en la placa en la ausencia de colonias satélite alrededor. Se rasparon con una punta de pipeta estéril y se inocularon en 6 ml de medio LB suplementado con el antibiótico de selección apropiado. Finalmente, se incubaron 16 h en agitación a 37°C.

### 3.6.3. Purificación del ADN plasmídico de cultivos de bacterias

Se utilizó el kit comercial “illustra PlasmidPrep Mini Spin”, diseñado para la rápida y eficaz extracción del ADN plasmídico de cultivos de *E. coli* y que utiliza columnas de sílice que adsorben el ADN y permite su posterior elución. El ADN plasmídico purificado se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm en un NanoDrop. Se realizó un estudio de restricción (apartado 3.7.5.) con el fin de comprobar la identidad del clon seleccionado.

## 3.7. MÉTODOS COMUNES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### 3.7.1. Soluciones empleadas de uso como en varias técnicas

Tampón TAE pH 8,3: 40 mM Tris base, 1 mM EDTA y 20 mM ácido acético.

Tampón TE pH 8,0: 10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA.

Solución de carga: sacarosa 40% (p/v), azul de bromofenol 0,25 % (p/v) y xileno cianol 0,25 % (p/v).

### 3.7.2. PCR de alta fidelidad

La PCR de alta fidelidad se llevó a cabo con el kit “AccuPrime Pfx SuperMix”. Se preparó una mezcla con el ADN molde y los reactivos suministrados por el kit, que contenía la ADN polimerasa Pfx de alta fidelidad,  $MgCl_2$  y dNTPs, solución tampón y los “primers” a una concentración final de 200 nM. Una vez preparada la mezcla de reacción, los tubos se incubaron en un termociclador con las siguientes condiciones: un ciclo a 95°C durante 5 min; más 40 ciclos de 95°C 15 s, 58°C 30 s y 68°C durante un tiempo variable (1 min por cada kb del amplicón); y un ciclo final de extensión a 68°C durante 10 min. En algunos casos se utilizó un gradiente de temperatura de anillamiento para la elección de la temperatura más adecuada.

Los productos obtenidos en la PCR se visualizaron en una electroforesis de geles de agarosa y las bandas de los tamaños adecuados se purificaron por extracción del ADN contenido en la agarosa (apartado 3.7.4.).

### 3.7.3. Electroforesis en geles de agarosa no desnaturalizante

Para preparar los geles de agarosa se mezcló tampón TAE con 1-2% de agarosa (p/v), dependiendo del tamaño de los amplicones a analizar. Se llevó la mezcla a ebullición para disolver la agarosa y se añadió SYBR Green I para teñir el ADN. Tras polymerizar, el gel se colocó en la cubeta de electroforesis con tampón TAE. Las muestras se mezclaron con la solución de carga, relación 1:10 (v/v), antes de depositarlas en los pocillos del gel. Como patrón de tamaños moleculares de ADN se empleó un estándar de 1 kb o 100 pb, según el caso. El resultado de la electroforesis se visualizó en un equipo de análisis de imagen LAS-4000.

### 3.7.4. Purificación del ADN contenido en geles de agarosa y reacciones enzimáticas

Tras su visualización, en ocasiones fue necesario recuperar el producto de PCR separado por electroforesis en gel de agarosa. Para ello, se cortó el fragmento del gel que contenía la banda de ADN de interés. Se usó el kit “illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification” para extraer y purificar el ADN siguiendo las instrucciones del proveedor. La agarosa se disolvió calentando la solución correspondiente a 60°C durante 15 min, el ADN se purificó en una columna y se eluyó con tampón TE o agua, dependiendo de su aplicación posterior.

El ADN resultante de una reacción enzimática se purificó usando columnas del mismo kit, aplicando el protocolo correspondiente.

### 3.7.5. Digestión con enzimas de restricción

El ADN se mezcló con el tampón de reacción adecuado para la enzima usada, la enzima de restricción (5 U/ $\mu$ g de ADN) y agua ultrapura. Cuando la casa comercial lo recomendaba, también se añadía albúmina bovina sérica al 1% a la mezcla. La reacción de restricción se incubó 3 h a 37°C para enzimas clásicas o 20 min a 37°C para las enzimas “Fast Digest™”. Los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en un gel de agarosa.

### 3.7.6. Secuenciación de ADN

La identidad de los plásmidos clonados y de los productos de PCR se estudió mediante secuenciación de terminación de la cadena de tipo Sanger en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca. Se envió una mezcla de 500 ng de ADN plasmídico y 3,3 pmol de un “primer” específico disueltos en 8  $\mu$ l de agua ultrapura. El análisis de los cromatogramas tras la electroforesis capilar se realizó con el programa informático FinchTV 1.4 (Geospiza, PerkinElmer, Seattle, EE.UU.) y para la visualización de las secuencias de ADN se usó el programa Gene Construction Kit.

## 3.8. TÉCNICAS DE CLONACIÓN

### 3.8.1. Clonación clásica

#### 3.8.1.1. Clonación de la secuencia codificante de SOX17 y OCT1 en el plásmido de lentivirus pWPI

Los plásmidos pWPI-SOX17 y pWPI-OCT1 fueron desarrollados en trabajos previos a esta Tesis Doctoral (Pérez-Silva L 2014; Sánchez-Vegazo R 2014). Brevemente, la secuencia codificante de la ORF del gen SOX17 humano fue amplificada a partir del ADN complementario (ADNc) de colangiocitos humanos sanos (NHC2) mediante PCR de alta fidelidad (apartado 3.7.2.) y se clonó en el sitio de *PacI* del vector pWPI de lentivirus. La secuencia codificante del gen *SLC22A1* para el transportador OCT1 humano, fue clonada a partir de ADNc obtenido de ARN total de hígado humano sano.

#### 3.8.1.2. Clonación de los “short hairpin RNAs” (shARNs) para el silenciamiento de SOX2 y SOX9

Las secuencias de los shARNs frente a SOX2 y SOX9 habían sido previamente publicadas (Jeon HM *et al.* 2011; Lin SC *et al.* 2016). En base a ello, se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos (F y R) para obtener los shARNs de interés con extremos

cohesivos para las enzimas de restricción *MluI* y *Clal* (Tabla MM-3), que fueron posteriormente hibridadas y ligadas con el plásmido lentiviral pLVTHM (Addgene) en los sitios de *Clal* y *MluI*. A continuación, se transformaron, por choque térmico, bacterias DH5 $\alpha$  con 2  $\mu$ l del producto de ligación como se describe en el apartado 3.6.1. Se sembraron en placas con medio LB y agar, suplementados con ampicilina como antibiótico de selección. Algunas de las colonias se crecieron en medio LB líquido suplementado con el antibiótico y se extrajo el ADN plasmídico (apartado 3.6.3.). La identidad de los clones seleccionados se confirmó con un estudio de restricción utilizando las enzimas *EcoRI* y *XbaI* y, finalmente, mediante secuenciación usando el oligonucleótido SP6 (5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3') disponible en el Servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca (apartado 3.7.6.). El plásmido control pLVTHM-*shLuc2* se había clonado previamente en el laboratorio siguiendo la misma estrategia.

**Tabla MM-3:** Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para clonar los *shSOX2*, *shSOX9* y *shLuc2*.

shARN	Secuencia 5' – 3'	Tipo
<i>shSOX2</i>	CGCGTAACCAAGACGCTCATGAAGAATTAAGTTCTCTAATTCTTCAT GAGCGTCTTGGTTTTTTGGAAAT	F
	CGATTTCCAAAAACCAAGACGCTCATGAAGAATTAGAGAACTTAA TTCTTCATGAGCGTCTTGGTTA	R
<i>shSOX9</i>	CGCGTGCGGAGGAAGTCGGTGAAGAATTCAAGAGATTCTTCACCG ACTTCTCCGCTTTTTGGAAAT	F
	CGATTTCCAAAAGCGGAGGAAGTCGGTGAAGAATCTCTTGAATTC TTCACCGACTTCTCCGCA	R
<i>shLuc2</i>	CGCGTCTGACGCGGAATACTTCGATTCAAGAGATCGAAGTATTCCG CGTCAGTTTTTTGGAAATCG	F
	CGATTTCCAAAAGTACGCGGAATACTTCGATCTCTTGAATCGAA GTATTCCGCGTCAGACGCG	R

F, forward; R, reverse.

### 3.8.2. Clonación por recombinación Gateway

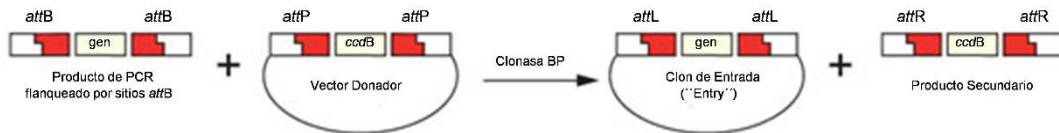
#### 3.8.2.1. Fundamento

La tecnología de clonación Gateway está basada en la capacidad recombinante del bacteriófago lambda (Hartley JL *et al.* 2000). Esta técnica permite intercambiar de forma direccional y reversible fragmentos de ADN entre diferentes vectores, manteniendo la orientación y el marco de lectura. Las reacciones de recombinación Gateway son procesos de intercambio y ligación (reacciones BP y LR) que tienen lugar gracias a la existencia en los extremos del fragmento de ADN que se intercambia de unas secuencias específicas denominadas sitios *att*, que aportan direccionalidad y



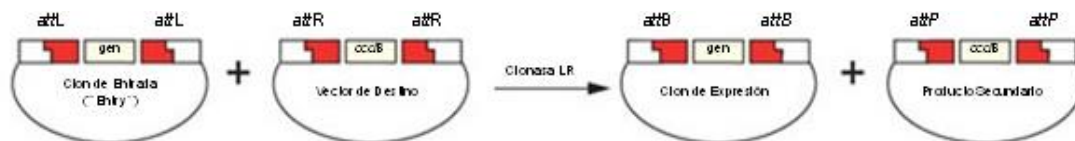
especificidad a la reacción. Es un método de clonación más rápido y eficaz que los basados en el uso de enzimas de restricción.

En la reacción BP (Figura MM-1), un fragmento de ADN, flanqueado por sitios *attB*, reacciona con un vector donador (pDONR), con sitios *attP*, para dar lugar a un vector denominado "Entry", con sitios *attL*, y un producto secundario con sitios *attR*.



**Figura MM-1.** Esquema de la reacción de recombinación BP.

En la reacción LR (Figura MM-2) un vector "Entry", con el ADN de interés flanqueado por sitios *attL*, reacciona con un vector de destino (pDEST), con sitios *attR*, para dar lugar a un vector útil para ser empleado en el sistema de expresión correspondiente y un producto secundario.



**Figura MM-2.** Esquema de la reacción de recombinación LR.

Como elemento de selección negativa se utiliza el gen *ccdB*, que da lugar a una toxina que interfiere con la girasa bacteriana, impidiendo la proliferación de las colonias que contienen estos vectores. Los productos secundarios de las reacciones BP y LR, y los vectores pDONR y pDEST no recombinados poseen este gen, lo cual inhibe el crecimiento de las bacterias que posean dichos vectores que no son deseados. Para la propagación y amplificación de los vectores que contienen el gen *ccdB* se utilizaron bacterias "One Shot *ccdB* Survival T1-R", resistentes a la toxicidad del producto de este gen.

### 3.8.2.2. Clonación de los promotores de ABCC3 y ABCG2 para estudios de actividad luciferasa

Se diseñaron plásmidos que contenían el gen de la luciferasa de luciérnaga, *Luc2*, fusionado con el promotor de BCRP (*prABCG2*) o MRP3 (*prABCC3*) para transfectar células y estudiar la actividad transcripcional de dichos promotores determinando la actividad luciferasa (apartado 3.15.5.).

Amplificación de los prABCC3 y prABCG2

Se amplificó mediante PCR de alta fidelidad una región de 1180 pb “aguas arriba” del inicio de la transcripción del gen *ABCC3* (NM\_003786), usando como molde ADN genómico de células EGI-1 extraído con el kit “illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification”.

El *prABCG2* se obtuvo a partir del ADN de células LS174T de adenocarcinoma de colon usando el “DNeasy Blood & Tissue kit” de Qiagen. En concreto, se amplificó una región de 4320 pb “aguas arriba” de la región 5’ del inicio de la transcripción con (*Z1-prABCG2*) o sin (*Z0-prABCG2*) un fragmento de ADN no codificante de 474 pb que se encuentra aguas arriba del inicio de la transcripción y que ha sido denominado “exón 1” de *ABCG2* (NM\_004827).

En todos los casos se diseñaron “primers” específicos (Tabla MM-4 y MM-5) para amplificar el fragmento de ADN diana e introducir sitios *attB* en los extremos de las secuencias (Tabla MM-6).

**Tabla MM-4.** “Primers” diseñados para la clonación y secuenciación del promotor de *ABCC3* silvestre (*prABCC3-WT*).

Aplicación	Secuencia 5’ – 3’	Tipo
Amplificación del promotor	CCAGGGAAGATTTGCCAGGGA	F1
	GGGGCCGAGGCGC	R1
Secuenciación	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	T7FF

F, forward; R, reverse. T7F, “primer” universal T7 forward proporcionado por el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca.

**Tabla MM-5.** “Primers” diseñados para la clonación y secuenciación del promotor de *ABCG2* completo (*prABCG2-Z1*).

Aplicación	Secuencia 5’ – 3’	Tipo
Amplificación del <i>prABCG2-Z1</i>	GTGCACATAGCCTCTCTTCCACTGT	F1
	TCAGCTTAATAGAGCTCGGTCTTAACCAAAGG	R1
Secuenciación	CACTGCCTCCCAATGTAACCTTTAGTTAGCAA	F
	GCGAAGGACATGAACAGACACTTCTCA	F
	GTAGGGACATGGATGAAATTGGAAACCATCA	F
	GGATTACAGGCATGAGCCACCAT	F
	AGTAGAGGCAGGGTTTCACCATGT	F

F, forward; R, reverse.

**Tabla MM-6.** Secuencia de los adaptadores Gateway *attB*.

Adaptador	Secuencia 5' – 3'
<i>attB1</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTNN
<i>attB2</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTN
<i>attB5r</i>	GGGGACAACCTTTGTATACAAAGTTGN
<i>attB5</i>	GGGGACAACCTTTGTATACAAAAGTTGNN

En el extremo 3' de los "primers" se añadieron uno o dos nucleótidos adicionales (N) para mantener la fase de lectura con la región *attB*.

#### Clonación de los productos de PCR por recombinación BP

Las secuencias de los promotores *prABCC3-WT*, *prABCG2-Z0* y *prABCG2-Z1*, flanqueados por sitios *attB1* y *attB5r*, fueron insertadas en un plásmido pDONR221 P1-P5r mediante una reacción BP, catalizada por enzimas contenidas en la mezcla "Gateway BP Clonase II", siguiendo las indicaciones del proveedor. Estas reacciones se detuvieron por digestión con proteinasa K. Se transformaron bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  por choque térmico con el producto obtenido en cada reacción BP. A continuación, se sembraron en placas con medio LB y agar suplementado con kanamicina, el antibiótico de selección adecuado al uso de los plásmidos "Entry". Se seleccionaron algunas de las colonias y se crecieron en medio LB líquido suplementado con kanamicina para extraer su ADN plasmídico. La identidad de los plásmidos obtenidos se confirmó con un estudio de restricción y por secuenciación, utilizando los "primers" cuya secuencia se muestra en las Tablas MM-4 y MM-5.

#### Recombinación LR "Multisite"

Con el fin de obtener un vector de expresión en el que se clonaran de forma direccional la secuencia de un promotor con la secuencia codificante de la luciferasa, la recombinación LR se produjo entre dos plásmidos Entry (pEntry-*prABCC3* o -*prABCG2* y pEntry-*Luc2*), obtenidos en el desarrollo de este trabajo o previamente en nuestro laboratorio, y el vector de destino pcDNA6.2-pL-DEST.

Las reacciones LR fueron catalizadas por la mezcla enzimática "Gateway LR Clonase II" y se detuvieron por tratamiento con proteinasa K.

Con el producto obtenido en cada reacción LR, se transformaron bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante choque térmico y posteriormente se siguió el mismo protocolo que se ha descrito en el apartado anterior, utilizando ampicilina como antibiótico de selección de las colonias transformadas. La identidad de los plásmidos obtenidos se confirmó con un estudio de restricción y por secuenciación, utilizando los "primers" cuya secuencia se muestra en las Tablas MM-4 y MM-5.

Modificación de los *prABCC3* y *prABCG2* para estudiar la potencial unión de SOX17

Para poder estudiar en profundidad el efecto de SOX17 en la actividad de estos promotores se modificaron los plásmidos 6.2.-*prABCC3/ABCG2-Luc2* para eliminar los potenciales sitios de unión de SOX17 mediante clonación clásica.

En el caso del *prABCC3*, se eliminó el único potencial sitio de unión de SOX17 que se encontró, concretamente, en la posición -417 “aguas arriba”. Para ello, se dividió el plásmido 6.2.-*prABCC3-WT-Luc2* en dos amplicones, Bla1 y Bla2, por PCR de alta fidelidad utilizando “primers” específicamente diseñados para dejar fuera del amplicón la región de unión a SOX17 e insertar un sitio de corte para la enzima “Fast Digest” *PspPPI* en el gen de resistencia a la blasticina (Tabla MM-7). El producto de PCR purificado fue sometido a una digestión con la enzima de restricción *PspPPI* durante 15 min a 37°C para generar así dos extremos cohesivos. En el otro extremo de los amplicones, donde se había eliminado el sitio de unión a SOX17, que finalizaba en extremos romos, se llevó a cabo una reacción de fosforilación catalizada por la T4 “proteína kinasa” con el fin de facilitar la posterior ligación. El producto de la reacción de purificó por columna (“GFX PCR DNA & Gel Band Purification kit”, GE Healthcare).

**Tabla MM-7.** “Primers” diseñados para la mutación del promotor de *ABCC3* (*prABCC3-Mut*) y la clonación de variantes cortas del promotor de *ABCG2* (*prABCG2-Z0, Z2, Z4 y Z5*).

Plásmido	Amplicón	Secuencia 5' – 3'	Tipo
6.2.- <i>prABCC3-Mut-Luc2</i>	Bla1	AAATCCCTCTCCCTACGTCCCCTA	FM1
		CCAGTAAAATGATATA	RM1
	Bla2	TGTGCAGAACTCGT	FM2
		CTTTCCTAGTAAAAAAGGAATCTTTG AGAAGGTCACG	RM2
6.2.- <i>prABCG2-Z2/Z4/Z5-Luc2</i>	Z2-Bla1	GTCGGTGTGGCGATTCTCA	FZ2
		CCAGTAAAATGATATA	RZ
	Z4-Bla1	GACACAGGAAGGGGAATATCACAC	FZ4
		CCAGTAAAATGATATA	RZ
	Z5- Bla1	CCCTGTGTTGCCTAGGCTTGT	FZ5
		CCAGTAAAATGATATA	RZ
Bla2	TGTGCAGAACTCGT TGATAGCTTAACTAGCCAGCTTGGG	FZ RZ2	

RM1, FM2, RZ y FZ contienen un sitio de unión a *PsPPI*.

Finalmente, los fragmentos Bla1 y Bla2 fosforilados fueron sometidos a una reacción de ligación catalizada por la enzima T4 ligasa. Se transformaron bacterias DH5α con el producto de la reacción, una vez inactivada a 65°C durante 10 min, utilizando 50 µg/ml de blasticidina como antibiótico de selección. En base a la estrategia de clonación, esperaba que solamente los vectores resultantes de una ligación exitosa y que incluyeran ambos amplicones pudiesen crecer. La identidad del plásmido

resultante, 6.2.-*prABCC3-Mut-Luc2*, fue comprobada por digestión con enzimas de restricción y secuenciación (Tabla MM-4).

En el caso del *prABCG2*, se utilizó la misma estrategia para clonar fragmentos del *prABCG2* que contuviesen distintas regiones del mismo, de forma que se fueran eliminando de forma secuencial los potenciales sitios de unión de SOX17. Se utilizó el 6.2.-*prABCG2-Z1-Luc2* de molde y oligonucleótidos específicos (Tabla MM-7) para amplificar las regiones Bla1 y Bla2, siendo Bla1 una región 5' del *prABCG2* cada vez más corta. En la Tabla MM-7 se detallan las secuencias de los "primers" que se emplearon para la secuenciación de los plásmidos resultantes 6.2.-*prABCG2-Z2/Z4/Z5-Luc2*.

### **3.8.2.3. Clonación del *prBIRC5* y *prCMV* para estudios de comparación de su actividad**

Se generaron plásmidos que contenían el promotor de *BIRC5* (*prBIRC5*) o de citomegalovirus (*prCMV*) seguido por el gen *Luc2* que se utilizó como reportero con el fin de comparar la actividad transcripcional de ambos promotores mediante ensayos de actividad luciferasa determinada en células transfectadas (apartado 3.5.3.).

Mediante PCR de alta fidelidad (apartado 3.7.2.) se amplificó una región de 1147 pb "aguas arriba" del inicio de la transcripción de *BIRC5* (secuencia de referencia U75285) a partir del ADN genómico de células Alexander de HCC humano, y utilizando oligonucleótidos específicos que insertaron adaptadores *attB* (Tabla MM-8). El *prBIRC5* flanqueado por sitios *attB* se clonó en el vector pDONR221 P1-P5r para dar lugar a un plásmido "Entry" que fue recombinado en una reacción LR "Multisite" con otro "Entry" que contenía el gen *Luc2* y con el plásmido de destino pcDNA-6.2.-pL-DEST, sin promotor. El 6.2.-*prCMV-Luc2* se había clonado previamente en el laboratorio.

### **3.8.2.4. Clonación de vectores adenovirales pAd-*prCMV-SOX17*, pAd-*prBIRC5-SOX17* y pAd-*prBIRC5-OCT1***

#### Amplificación de fragmentos de ADN

Las secuencias de los genes *SOX17* y *SLC22A1* se amplificaron mediante PCR usando los vectores pWPI-SOX17 y pWPI-OCT1 (apartado 3.8.1.1.) como molde y "primers" con los correspondientes adaptadores *attB* (Tabla MM-8).

#### Reacción de recombinación BP

El promotor de *BIRC5* flanqueado por sitios *attB1* y *attB5r* se clonó en el pDONR221 P1-P5r (apartado 3.8.2.3.), mientras que las secuencias codificantes de

SOX17 y OCT1 flanqueadas por sitios *attB5* y *attB2* se clonaron en el pDONR221 P5-P2.

#### Generación del plásmido de expresión adenoviral

Los plásmidos pEntry-*prBIRC5* y pEntry-SOX17 u -OCT1 se recombinaron en una reacción LR “Multisite” con el plásmido de destino pcDNA-6.2.-pL-DEST para dar lugar al pcDNA-6.2.-*attB1-prBIRC5-attB5-SOX17/OCT1-attB2*. Para eliminar el sitio *attB5* intermedio se procedió a amplificar dos regiones por separado (Amp1 y Amp2) de dicho plásmido por PCR de alta fidelidad, utilizando los correspondientes “primers”, y se re-ligaron para obtener el vector pcDNA-6.2.-*attB1-prBIRC5-SOX17/OCT1-attB2*.

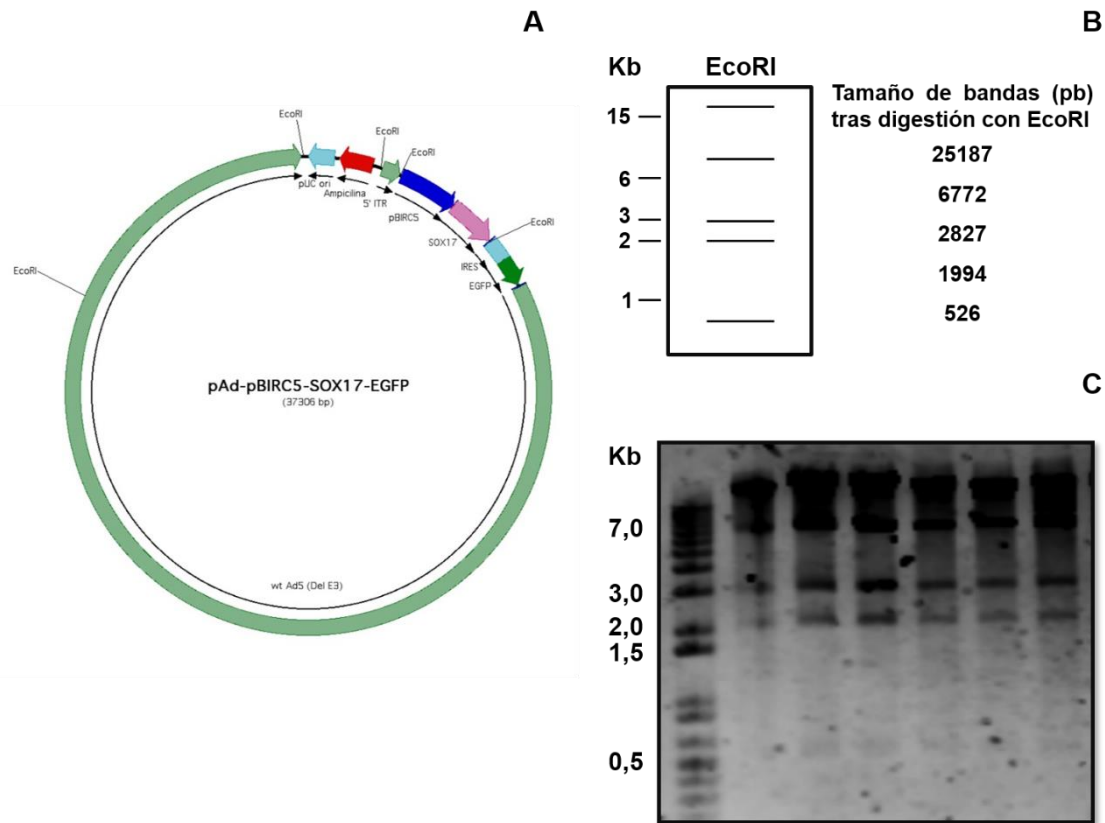
**Tabla MM-8.** “Primers” diseñados para la clonación de la ORF de OCT1 y SOX17 junto con el promotor de *BIRC5*.

Aplicación	Secuencia 5' – 3'	Tipo
Amplificación del <i>prBIRC5</i>	AAATTGACATCGGGCCGGG	F
	GCCGCCGCC	R
Secuenciación del <i>prBIRC5</i>	GGGCGATAGAGCGAGACTCAGT	F
	GGTGTGCCGGGAGTTGTAGT	R
Amplificación de la ORF de OCT1	ATGCCACCGTGGA	F
	GGTGCCCGAGGGTTCTG	R
Secuenciación de la ORF de OCT1	GCCCGAGGGTTCTGAGGTTT	R
	GAAGGGCTCAGCTTTTTCGGTGA	R
	GAAGGGCTCAGCTTTTTCGGTGA	F
	CAGGTGCCCGAGGGTTCT	R
	GGCTCCAGCCACAGCG	R
Amplificación de la ORF de SOX17	ATGAGCAGCCCGGATGCG	F
	CACGTCAGGATAGTTGCAGT	R
Secuenciación de la ORF de SOX17	CCAGCGCCCTTCACGTGTACTA	F
	TCATGGTGTGGGCTAAGGACGA	F
	CGCGGCCGGTACTTGTAGTT	R
	GGTGCTGGTGCTGGTGCT	R
Amplificación del IRES-EGFP	GGGCTGCAGGAATTCCGC	F
	CTAGCTACTAGCTAGTCGAGATCTGAGTCC	R
Secuenciación de vectores adenovirales de expresión (pAd)	GACTTTGACCGTTTACGTGGAGAC	pAdF
	CCTTAAGCCACGCCACACATTTC	pAdR

Los oligonucleótidos pAdF y pAdR son “primers” comercialmente disponibles para la secuenciación de cualquier construcción clonada en el pAd/pL-DEST™. F, forward; R, reverse.

Utilizando dicho vector como molde, se amplificó la construcción *prBIRC5-SOX17/OCT1* por PCR para añadirle los sitios *attB1* y *attB5r* apropiados y se subclonó en una reacción BP, dando lugar a un plásmido “Entry” que fue utilizado en una posterior reacción LR “Multisite” en la que se recombinó con otro “Entry” que contenía la

secuencia IRES-EGFP y con el plásmido de destino de adenovirus pAd/pL-DEST™, del “ViraPower Adenoviral Expression System”. La identidad del pAd-*prBIRC5-SOX17/OCT1-IRES-EGFP* fue confirmada por estudio de restricción (Figura MM-3) y secuenciación (Tabla MM-8).



**Figura MM-3.** Esquema del plásmido adenoviral pAd-*prBIRC5-SOX17* obtenido tras la reacción LR “Multisite” entre el pEntry-*prBIRC5-SOX17*, pEntry-*IRES-EGFP* y el vector de destino pAd/pL-DEST. Se muestran los sitios de corte de EcoRI (A). Representación teórica del estudio de restricción del vector pAd-*prBIRC5-SOX17* con EcoRI (B) y tamaño de las bandas de ADN esperadas (B). Electroforesis de gel de agarosa al 1% tras tinción con SYBR Green I de los productos obtenidos tras a digestión enzimática. La primera calle representa el patrón de tamaños moleculares de ADN (C). Todos los clones estudiados fueron positivos.

En el caso del pAd-*prCMV-SOX17*, se utilizó un plásmido “Entry” que contenía exclusivamente el gen *SOX17* y se recombinó en una reacción LR “Multisite” usando el “Entry” que contenía *IRES-EGFP* y el pAd/*prCMV/V5-DEST*™ del “ViraPower Adenoviral Expression System”.

Finalmente, siguiendo la misma estrategia de clonación se generaron plásmidos de expresión de adenovirus que contenían el *prBIRC5* o *prCMV* seguidos de los genes reporteros *EGFP* y *LacZ*, respectivamente, y que fueron empleados para producir adenovirus control.



### 3.9. PRODUCCIÓN DE VECTORES VIRALES

Durante el transcurso de esta Tesis Doctoral se han empleado dos tipos de vectores virales, con distinta aplicación: lentivirus y adenovirus. En ambos casos se utilizaron vectores virales con el genoma viral modificado de forma que las partículas virales generadas no tuvieran capacidad replicativa.

Para los estudios *in vitro* se emplearon preferiblemente lentivirus, que son retrovirus cuyo genoma se compone de un ARN lineal monocatenario. Pueden transducir, tanto células que se dividen, como células que no están destinadas a dividirse. Además, su genoma se integra en el genoma de la célula huésped, permitiendo así una expresión estable y de larga duración del transgén de interés. Esto los hace vectores idóneos para realizar estudios *in vitro* con el fin de estudiar el efecto de la sobre-expresión o silenciamiento de un gen de interés. Sin embargo, también constituye la principal desventaja del uso de lentivirus puesto que la inserción del ADN viral no es específica y puede dar lugar a oncogénesis.

Los adenovirus son virus sin envuelta que contienen ADN bicatenario. Al igual que los lentivirus, pueden infectar tanto células quiescentes como células en división. Los adenovirus pueden albergar insertos de ADN mayores de 6 kb y tienen una gran eficacia de transducción expresando altas cantidades del transgén. Sin embargo, no requieren de integración en su ciclo infectivo, por lo que el material génico portado por estos vectores se expresa de forma episomal transitoria. Por todas estas propiedades, además del hecho de que no se han descrito en humanos patologías graves asociadas a adenovirus silvestres, a su baja toxicidad como vectores y a su alta bioseguridad, se consideran uno de los mejores vectores para la terapia génica *in vivo*. Por otro lado, su alta inmunogenicidad puede suponer un inconveniente para ciertos usos *in vivo*, ya que puede desencadenar una fuerte respuesta inmune en el hospedador.

#### 3.9.1. Vectores lentivirales

##### 3.9.1.1. Fundamento

Para llevar a cabo distintos experimentos *in vitro* se han producido lentivirus recombinantes defectivos en los que se han eliminado los genes de las proteínas virales y se han sustituido por el transgén de interés.

Para producir estos virus se necesita una línea celular empaquetadora que se co-transfecta con tres plásmidos: dos que codifican las proteínas estructurales del lentivirus y un plásmido recombinante que contiene el gen de interés flanqueado por las secuencias LTR (“long terminal repeats”) y por la señal de empaquetamiento, además



de otros elementos necesarios en *cis* como el TSS (sitio de inicio de transcripción), y el tracto polipurínico necesario para la síntesis de la segunda cadena. De esta manera, se generarán partículas lentivirales defectivas que pueden ser purificadas y concentradas a partir de los sobrenadantes del cultivo celular (Kuroda H *et al.* 2009).

### 3.9.1.2. Producción

Se sembraron  $1 \cdot 10^7$  células empaquetadoras HEK-293T en placas de 10 cm de diámetro recubiertas con colágeno. A continuación, se transfectaron con 1 mg/ml polietilenimina (PEI), 25 mM HEPES y 150 mM NaCl, pH 7,5 y los siguientes plásmidos:

- Los vectores de transferencia pWPI-SOX17, pWPI-OCT1 o pLVTHM que portaba el shARN de interés. Todos contenían el gen reportero EGFP (“Enhanced Green Fluorescence Protein”), que permite el seguimiento de la fluorescencia de las células transducidas, tanto por microscopía de fluorescencia como por citometría de flujo, y el transgén de interés, separados por un elemento IRES. De forma paralela, se realizaba la transfección con los plásmidos lentivirales pWPI o pLVTHM-sh*Luc2*, que codifican la EGFP y se utilizaron para producir virus control.
- El plásmido psPAX2, que codifica proteínas estructurales del virus.
- El vector de expresión pMD2.G, que codifica la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular.

La mezcla PEI:plásmidos se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y se añadió a la placa de cultivo de células HEK-293T. Para mejorar la eficacia de transfección se añadió al cultivo cloroquina a 25  $\mu$ M, ya que inhibe la degradación del ADN plasmídico en los lisosomas y aumenta así el rendimiento del proceso de producción de algunos tipos de virus (Gavrilescu LC y Van Etten RA 2007). A las 24 h se retiró el medio de cultivo con los complejos PEI:ADN y se sustituyó por medio nuevo. Se recogió el medio de cultivo de las placas a las 48 h, 56 h y 72 h después de la transfección, que se purificó utilizando filtros de 0,45  $\mu$ m de tamaño de poro y se ultracentrifugó a 53.000  $xg$ , a 16°C durante 130 min para concentrar las partículas lentivirales. El precipitado se resuspendió en medio de cultivo RPMI y se conservó a -80°C hasta su uso.

### 3.9.2. Vectores adenovirales

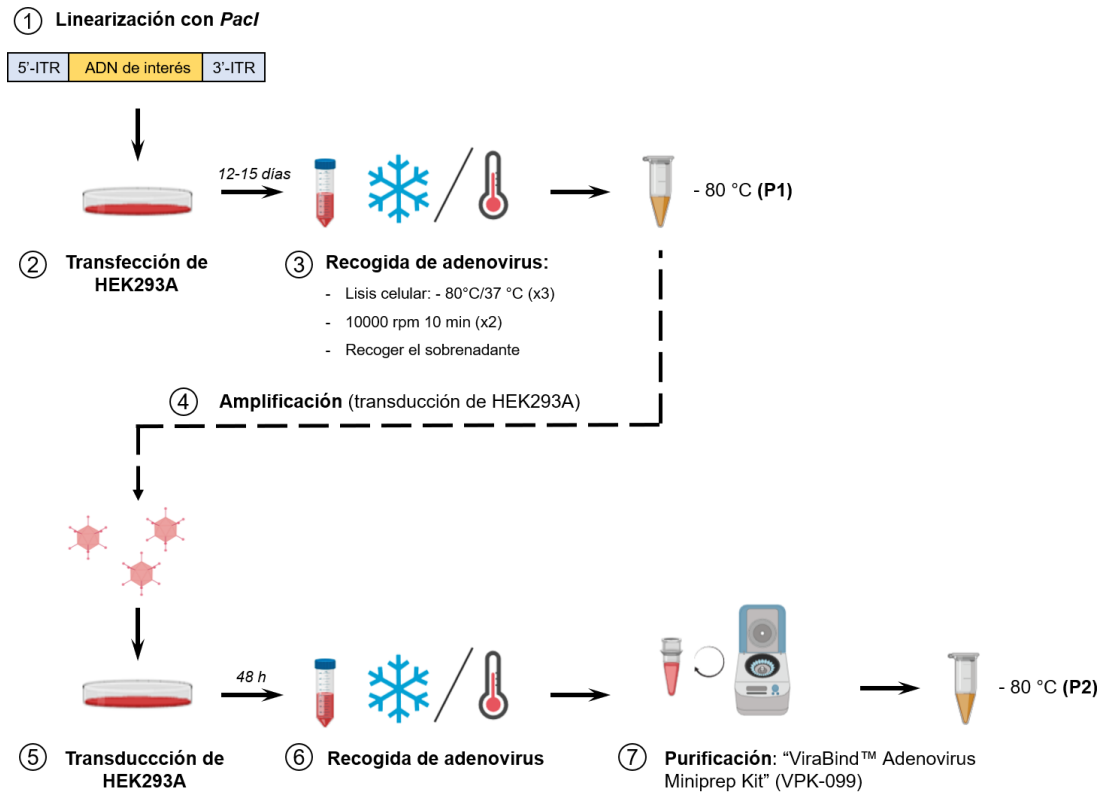
#### 3.9.2.1. Fundamento

Para poder llevar a cabo estudios de terapia génica *in vivo* se desarrollaron adenovirus recombinantes (Ad5) utilizando vectores a los que se les han eliminado los genes E1 y E3, que codifican para proteínas necesarias para la replicación viral, y en su lugar se puede introducir el transgén de interés. De esta manera, se generaron virus defectivos sin capacidad de amplificación viral en las células diana.

Como células empaquetadoras se seleccionaron las células HEK-293A, ya que cuentan con una copia del gen adenoviral E1 en su genoma. A diferencia de los lentivirus, para la producción de adenovirus las células HEK-293A son transfectadas con un único plásmido recombinante que contiene la secuencia codificante del transgén de interés y toda la información necesaria para generar las proteínas de la cápside del virus, flanqueadas por los sitios ITR (“Inverted Terminal Repeats”). Este plásmido tiene que ser previamente linealizado para exponer los ITR y fomentar así la correcta replicación y empaquetamiento viral en las HEK-293A. Tras 10-15 días de cultivo, se recoge la primera producción de adenovirus que habitualmente tiene un rendimiento bajo. Por ello, se amplifican nuevas producciones mediante la transducción de las HEK-293A con dicha primera producción.

#### 3.9.2.2. Producción

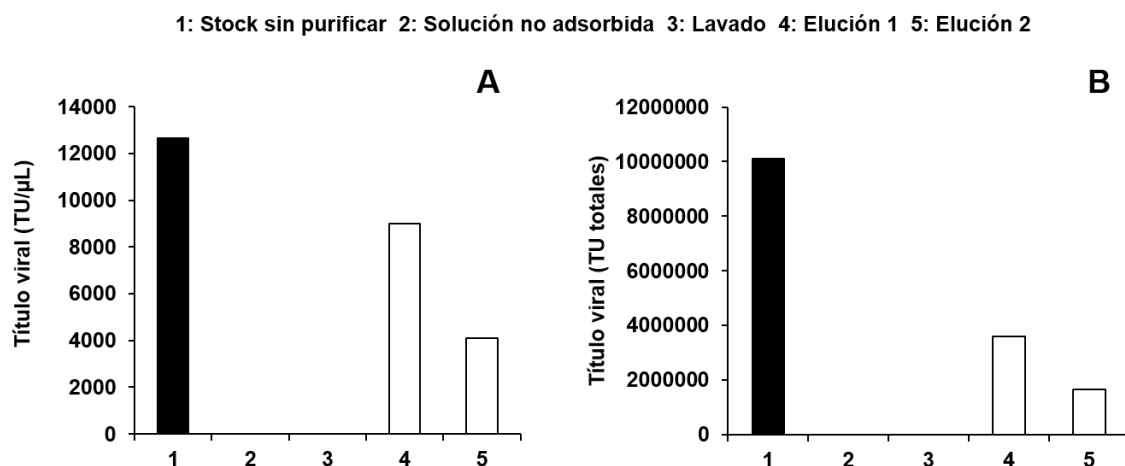
Como paso previo a la producción, se realizó una digestión del plásmido de expresión (por ejemplo, el pAd-*prBIRC5-SOX17*) con la enzima *PacI* para linealizar el vector y exponer los sitios ITR, siguiendo las instrucciones del proveedor. Se purificó el producto de la digestión mediante extracción por fenol-cloroformo seguido de una precipitación en etanol (recomendado para plásmidos de tamaño mayor de 10 kb). Las células HEK-293A fueron sembradas en una placa de 10 cm de diámetro y se sometieron a una transfección transitoria con el plásmido recombinante y Lipofectamina LTX (apartado 3.5.3.). A los 10-15 días post-transfección se recogía la primera producción de adenovirus (apartado 3.9.2.3.), que denominamos P1. Para amplificar el número de vectores virales, se transdujeron  $1 \cdot 10^7$  de células HEK-293A con 120  $\mu$ l de la solución P1. Tras 6 h, se retiraba el medio con los virus y se añadían 9 ml de medio nuevo. A las 48 h, se recogía la segunda producción (P2) (apartado 3.9.2.3.) y se purificaba siguiendo las instrucciones del kit de purificación de adenovirus “ViraBind™ Adenovirus Miniprep Kit” (VPK-099) (Figura MM-4).



**Figura MM-4.** Esquema del procedimiento llevado a cabo en esta Tesis Doctoral para producir y purificar adenovirus recombinantes defectivos. P1, primera producción de adenovirus; P2, segunda producción de adenovirus.

### 3.9.2.3. Recogida y purificación

Cuando las HEK-293A, durante una producción de adenovirus, presentaban fluorescencia verde derivada de la expresión del gen reportero EGFP y comenzaba a observarse un aumento de la muerte de celular ligado a la producción viral, se procedía a la recogida de las partículas virales. El precipitado de células se lisó mediante tres ciclos de congelación y descongelación y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min dos veces para eliminar los restos de membrana celular. A continuación, se purificó la solución usando el kit de purificación de adenovirus "ViraBind™ Adenovirus Miniprep Kit" (VPK-099). Para validar y poner a punto este kit comercial, se recogieron todas las soluciones intermedias generadas en el proceso de purificación, así como la solución final y se determinó la concentración de adenovirus de cada una de ellas (Figura MM-5).



**Figura MM-5.** Puesta a punto de la purificación de adenovirus usando el kit de purificación “ViraBind™ Adenovirus Miniprep Kit” de Cell Biolabs. Se sembraron 10.000 células EGI-1 en una placa de 96 pocillos y se transdujeron usando diluciones seriadas de la producción adenoviral de pAd-*prBIRC5-OCT1* antes y después de purificar, así como de las soluciones intermedias recogidas durante el proceso de purificación. Tras 48 h, se determinó el título viral por citometría de flujo (apartado 3.9.3.) y se representó como concentración viral (A, TU/ml) y partículas infectivas totales (B). TU, unidades transductoras.

### 3.9.3. Titulación por citometría de flujo

Las células diana fueron sembradas en placas de 96 pocillos a la densidad celular apropiada. Dos días después, se prepararon diluciones crecientes de la solución viral recogida con medio de cultivo y se añadieron a la placa, que era centrifugada a 1800 xg durante 90 min a 32°C. En el caso de los lentivirus, 16 h después, se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por medio nuevo. Cuatro días tras la transducción, se determinó el porcentaje de células EGFP<sup>+</sup> por citometría de flujo. En el caso de los adenovirus, se retiraba el medio de cultivo y sustituía por medio nuevo 3 h después de la centrifugación. A las 48 h, se detectaron las células EGFP<sup>+</sup> en el citómetro de flujo.

La concentración de partículas virales se calculó por la fórmula:

$$\text{Título (TU/ml)} = \frac{10^{-ED_{50}} * 2 * N^{\circ} \text{ células}}{\text{Vol}}$$

donde,

ED<sub>50</sub> es el log<sub>10</sub> de la dilución de la suspensión viral que consiguió traducir el 50% de las células.

TU: unidades transformantes (partículas virales infectivas)

Vol: volumen del medio de cultivo (ml)

### 3.9.4. Transducción de las células diana

Se sembraron las células en placas de 24 pocillos y se transdujeron a las 24 h con los lentivirus recombinantes en presencia de polibreno según la MOI óptima para cada línea celular. Se centrifugaron las placas a 1800  $xg$  durante 90 min a 32°C. A las 24 h se retiró el medio de cultivo y se añadió medio nuevo. Cuatro días tras la transducción para los lentivirus, o dos días para los adenovirus, se determinó el porcentaje de células fluorescentes que expresaban la EGFP por citometría de flujo.

## 3.10. ESTUDIOS DE TRANSPORTE *IN VITRO*

### 3.10.1. Soluciones empleadas

Medio de captación pH 7,4: NaCl 96 mM, KCl 5,3 mM,  $KH_2PO_4$  1 mM,  $MgSO_4$  0,8 mM,  $CaCl_2$  1,8 mM, D-glucosa 11 mM, y HEPES 50 mM.

Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 137 mM, KCl 3 mM,  $Na_2HPO_4$  0,5 mM,  $KH_2PO_4$  1,5 mM,

### 3.10.2. Experimentos de captación de compuestos fluorescentes

Para estudiar la funcionalidad del transportador OCT1 o de las bombas MRP3 y BCRP se llevaron a cabo experimentos donde las células se incubaban con sustratos fluorescentes e inhibidores específicos para cada proteína (Tabla MM-9) y se determinaba el contenido intracelular de dichos sustratos por citometría de flujo.

**Tabla MM-9.** Sustratos fluorescentes e inhibidores específicos empleados para estudiar la actividad transportadora de las proteínas indicadas por citometría de flujo.

Proteína	Sustrato fluorescente	Inhibidor
BCRP	Mitoxantrona (MTX) 25 $\mu$ M	Fumitremorgina C (FTC) 2,5 $\mu$ M
MRP3	Carboxifluoresceína diacetato (CF) 1 $\mu$ M	Diclofenaco (DICLO) 100 $\mu$ M
OCT1	Dihidroetidio (DHE) 1 $\mu$ M	Quinina 100 $\mu$ M

#### 3.10.2.1. Captación de DHE para evaluar la actividad transportadora de OCT1

Para estos experimentos se utilizaron células de CCA (EGI-1, HuCCT1 y TFK-1) transducidas con lentivirus-OCT1 (MOI 10) y sus respectivos controles. Tras la tripsinización, aproximadamente  $1 \cdot 10^5$  células se resuspendieron en medio de captación y se incubaron con 5  $\mu$ M de DHE durante 15 min a 37°C en presencia o ausencia de

250  $\mu\text{M}$  de quinina, un inhibidor de OCT1. El transporte se detenía añadiendo 1 ml de medio de captación frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ).

### **3.10.2.2. Estudios de captación y eflujo de las bombas MRP3 y BCRP**

Se emplearon células EGI-1 y TFK-1 transducidas con lentivirus portadores de SOX17 para analizar la actividad de las bombas exportadoras MRP3 y BCRP, 5 días post-transducción.

Para los estudios de captación o carga, las células en suspensión fueron incubadas con el sustrato fluorescente específico a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 10 min para MRP3 y 30 min para BCRP, en presencia o ausencia del correspondiente inhibidor (Tabla MM-9). El transporte se detenía añadiendo 1 ml de medio de captación frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ).

Para estudiar el eflujo mediado por estas bombas, tras el periodo de carga, la suspensión celular se diluía con medio de captación a  $37^{\circ}\text{C}$  solo o con el inhibidor específico para cada bomba, y se determinaba el contenido intracelular del sustrato (carga inicial). El eflujo se evaluaba tras otros 30 min de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  y se representaba como porcentaje respecto a la carga inicial.

### **3.10.3. Experimentos de captación de sorafenib**

Las células derivadas de CCA se sembraron en placas de 24 pocillos a subconfluencia. Al día siguiente, se realizaba una incubación de 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$  con 5  $\mu\text{M}$  de sorafenib en medio de cultivo. Algunas células se incubaron en las mismas condiciones con la combinación de sorafenib y quinina (250  $\mu\text{M}$ ). El transporte se detenía realizando lavados con medio de cultivo base y PBS fríos ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Después, se lisaban las células con agua destilada a  $4^{\circ}\text{C}$  y se determinaba el contenido de sorafenib por HPLC-MS/MS (apartado 3.15.4.). Además, algunos pocillos se incubaron en ausencia de sorafenib y quinina para utilizarlos como blancos de captación.

### 3.11. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ARNm POR RT-PCR CUANTITATIVA

#### 3.11.1. Extracción del ARN total

Para extraer el ARN de los homogenados de células o de tejidos se utilizó el kit comercial “illustraRNAspin Mini RNA Isolation Kit”, que se basa en la elución del ARN adsorbido a membranas de sílice. No más de 5 millones de células o 30 mg de tejido se procesaron siguiendo las recomendaciones del proveedor.

El ARN purificado se cuantificó espectrofotométricamente determinando la absorción a  $\lambda=260$  nm en el NanoDrop.

#### 3.11.2. Transcripción inversa (RT)

El ADNc que se utilizó como molde en la PCR se conseguía mediante una RT de 2  $\mu$ g de ARN total, utilizando la mezcla de reactivos “SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit” o “High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit”. Estos kits contienen la transcriptasa inversa de un virus de la leucemia murina de Moloney recombinante (rMoMuLV) optimizada y “random primers”. La reacción se llevó a cabo en un termociclador.

#### 3.11.3. Diseño de cebadores para PCR cuantitativa

Para diseñar los “primers” específicos de cada uno de los genes estudiados en esta Tesis Doctoral, cuyas secuencias se muestran en las Tablas MM-10 y MM-11, se empleó el programa on-line OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/Oligoanalyzer>) (Integrated DNA Technologies, Coralville, EE.UU.). Su especificidad se comprobó con el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los “primers” se diseñaron, siempre que fue posible, a caballo entre dos exones codificantes utilizando como molde la secuencia del ARNm publicada en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) específica para cada gen.

**Tabla MM-10.** “Primers” forward (F) y reverse (R) utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes humanos por RT-PCR cuantitativa.

Proteína	Gen	Primers	Tipo	Amplicón (pb)	Número de acceso
ABCA2	ABCA2	CACGCGATGACTTCCTGTTTGTC	F	139	NM_001606
		ATGGTCTTCATCACCTCCTTGAGC	R		
ABCA3	ABCA3	ACTTCTCTAGCAGCACTGGGC	F	101	NM_001089
		ACTGAATCTTCAAGCGGAGCCAGA	R		
ABCA6	ABCA6	AGCTTATTGGAATGGGGCCTCTCA	F	103	NM_080284.2
		GATTCTGAGGAGCCATTCCAGGAACT	R		
ABCA8	ABCA8	GGCAGGTAAGAGGTCTTGGGACT	F	172	NM_007168
		AGCTGTATGGTCCTTGTGCTCCTT	R		
β-Actina	ACTB	AGCACAATGAAGATCAAGATCATTGCTCC	F	127	NM_001101.3
		ACTCGTCATACTCTGCTTGCTGAT	R		
ASBT	SLC10A2	GGAATCATGCCCTCACAGGATTCAT	F	156	NM_000452
		GCTGACGCTCAGGTCCATGT	R		
BCRP	ABCG2	CCCAGGCCTCTATAGCTCAGATCATT	F	161	NM_004827
		CACGGCTGAAACACTGCTGAAACA	R		
c-Myc	MYC	CAGCGACTCTGAGGAGGAACAA	F	249	NM_002467
		ACTCTGACACTGTCCAATTGACC	R		
CK-7	KRT7	AGGAGGAGAGCGAGCAGATCAA	F	71	NM_005556.3
		CAGAAACCGCACCTTGTGCGATGAA	R		
Claudina-4	CLDN4	CCTTCATCGGCAGCAACATTGTCA	F	109	NM_001305.4
		GCGAGTCGTACACCTTGCACT	R		
CNT2	SLC28A2	CCACCCAGCACATTCAGAGGATAACA	F	128	NM_004212.3
		CTCAAGGTTCCGACTTCCATGAGC	R		
CYP1A1	CYP1A1	CAGTACCTCAGCCACCTCCAA	F	126	NM_000499
		CTTGAGGCCCTGATTACCCAGAAT	R		
CYP1A2	CYP1A2	ACCTGCCTCTACAGTTGGTACAGA	F	118	NM_000761
		CTCAAACCTTGAGCACCCAGAAT	R		
EGFR	EGFR	AGGAGAACTGCCAGAACTGACCA	F	151	NM_005228
		AATTTGCGGCAGACCAGGCA	R		
GAPDH	GAPDH	TGAGCCCGCAGCCTCC	F	138	NM_002046
		TACGACCAAATCCGTTGACTCC	R		
HPRT1	HPRT1	ATGGACAGGACTGAACGTCTTGCT	F	79	NM_000194
		TGAGCACACAGAGGGCTACAATGT	R		
IAP3	BIRC3	CCTCTGGGCAGCAGGTTTACAA	F	135	NM_001165
		CTACCTCCCGAGATTAGACTAAGTCCCTT	R		
Livina	BIRC7	GTCCTAGGCCAGGTGCCAT	F	112	NM_139317
		ACACCAGCTCTGCCATCCTCA	R		
MDR1	ABCB1	GCGCGAGGTCGGAATGGAT	F	198	NM_000927
		CCATGGATGATGGCAGCCAAAGTT	R		
MRP3	ABCC3	CCAAGTTCTGGGACTCCAACCTG	F	160	NM_003786
		ATGATGTAGCCACGACAATGGTGC	R		
OCT1	SLC22A1	TGCAGACAGGTTTGGCCGT	F	187	NM_003057
		GCCCCAGCCAACAAATTCTGTGAT	R		
OCTN1	SLC22A4	CCGTCGTGACCGAGTGGAATC	F	198	NM_000927
		GTACAGCCATGGTTGCGAAGAGA	R		



Proteína	Gen	Primers	Tipo	Amplicón (pb)	Número de acceso
SOX2	SOX2	CGCAAGATGGCCCAGGAGAA	F	121	NM_003106.3
		GCCGCTTAGCCTCGTCGAT	R		
SOX4	SOX4	AGCAAACCAACAATGCCGAGAACA	F	90	NM_003107.2
		GAGCTGGGAATCGCCTCCT	R		
SOX8	SOX8	GCCACAGCGACTCCGACT	F	120	NM_014587.4
		GGGTCTGCCCTGTGTGGT	R		
SOX9	SOX9	TGGGCAAGCTCTGGAGACTTCT	F	95	NM_000346.3
		CGGGTGGTCCTTCTTGTGCT	R		
SOX17	SOX17	TCATGGTGTGGGCTAAGGACGA	F	196	NM_022454
		CGCGGCCGGTACTTGTAGTT	R		
Survivina	BIRC5	CCAGATGACGACCCCATAGAGGAA	F	190	NM_001168
		GCACTTTCTCCGAGTTTCTCA	R		
UGT1A	UGT1A	TGTTTGGGAGTGCGGGATTCAA	F	230	NM_000463
		CTCAGTGCACTCCAAGCCATTCAT	R		

**Tabla MM-11.** “Primers” forward (F) y reverse (R) utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes de rata y ratón por RT-PCR cuantitativa.

Proteína	Gen	Primers	Tipo	Amplicón (pb)	Número de acceso
Asbt	Slc10a2	TCAGTTTGAATCATGCCTCTCA	F	306	NM_017222
		ACAGGAATAACAAGCGCAACCA	R		
β-Actina	Actb	GCCACCAGTTGCCATGGAT	F	121	NM_031144
		CCCACGATGGAGGGGAAGA	R		
Bsep	Abc11	GCCATTGTGCGAGATCCTAAA	F	118	NM_031760
		TGCAGGTCCGACCCTCTCT	R		
Cd163	Cd163	GTGCTGGGTCTCCCGGTT	F	109	NM_001107887
		TTCTTCCTTCAGGAGCCTGAGT	R		
CK-7	Krt7	CTCAAGACCCTTCACGAGACAGAGTTA	F	129	NM_001047870
		CTGGGCTTTGACGTCAGCAATGAT	R		
Claudina-4	Cldn4	CTGGGAAGGCCTGTGGATGAA	F	140	NM_001012022
		GAGCACCACGATGATGCTGAT	R		
Gstpi	Gstpi	GCAGCAGCTATGCCACCGTA	F	164	NM_012577.2
		TGCCCATACAGACAAGTGGACTTGA	R		
HER/Neu	ErbB2	TGTCAGATCTTGACTGGCACCATCT	F	132	NM_017003.2
		GCAGGCCAGGCAGTCAGAA	R		
Oatp4	Slco1b2	AGACGTTCCCATCACAACCAC	F	68	NM_031650.3
		GCCTCTGCAGTTTCTTCTGA	R		

### 3.11.4. PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa a tiempo real es una variante de la PCR analítica que permite cuantificar de forma absoluta o relativa el producto amplificado durante la reacción mediante la detección de fluorescencia. Se utilizó el fluorocromo SYBR Green

I, un componente de la mezcla de reactivos “Power SYBR Green PCR Master Mix” o “Select SYBR Green PCR Master Mix” utilizada.

Las condiciones de tiempo y temperatura para la PCR fueron: una primera incubación de las muestras de 2 min a 50°C, seguida de 10 min a 95°C y, por último, 40 ciclos de 15 s a 95°C y de 1 min a 60°C. La abundancia del ARN problema se corrigió con la del normalizador *GAPDH*, *β-actina* o *18S*, según el caso. Las determinaciones se realizaron siempre por duplicado. Concretamente, las determinaciones de los niveles de expresión del gen normalizador ARNr *18S* se realizaron utilizando los reactivos comerciales “Taqman™ Ribosomal RNA Control Reagents Kit” y la mezcla de reacción “Taqman™ Universal PCR Master Mix”.

### 3.11.5. Tarjetas microfluídicas

Las tarjetas microfluídicas o TaqMan Low Density Arrays (TLDA) son placas multipocillo que permiten realizar 384 reacciones de PCR al mismo tiempo, ya que cada pocillo de la placa contiene liofilizados la sonda TaqMan y los primers específicos para cada gen de interés. Las TLDA utilizadas fueron del formato de 96; en cada TLDA se cargaban dos muestras por duplicado, de manera que para cada muestra se analizaban 93 genes de interés, relacionados con mecanismos de quimiorresistencia, más los controles endógenos que fueron: ARNr *18S*, *GAPDH*, y *ACTB*.

Para cargar la TLDA se mezclaba cada uno de los ADNc obtenidos en la reacción de RT (100 ng/puerto) con la mezcla de reactivos TaqMan Master Mix, y se cargaba la muestra en cada uno de los 8 puertos de la TLDA. Después, se centrifugaba la placa dos veces a 300 *xg* durante 1 min. Finalmente, se sellaba y se desencadenaba la reacción de PCR en el aparato ABI Prism 7900HT Sequence Detection System. El análisis de los resultados se describe en el apartado 3.7.6. y se realizó una doble normalización con los genes *GAPDH* y *ACTB*.

### 3.11.6. Cuantificación relativa

La cuantificación relativa se basa en el método de comparación del ciclo umbral o Ct. Se utiliza un control endógeno como elemento normalizador, de forma que la relación entre el Ct del gen diana y el Ct del gen control endógeno resulta un valor de Ct normalizado del gen diana. Además, se utilizó un calibrador, que es una muestra que sirve como base para comparar los resultados, es decir, a la que se le otorga el valor 1 de expresión. La expresión del gen diana, normalizada frente al control endógeno, y relativa al calibrador/muestra control, viene dada por:

$$2^{-\Delta\Delta Ct},$$

donde

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  muestra -  $\Delta Ct$  calibrador, normalizados; y  $\Delta Ct = Ct$  diana -  $Ct$  control endógeno.

### 3.12. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

#### 3.12.1. Soluciones empleadas

Tampón RIPA: 1% IGEPAL CA-630, 0,5% desoxicolato sódico y 0,1% SDS disueltos en PBS.

Solución de carga Laemmli 2x: 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 10%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,004% azul de bromofenol.

Tampón de migración: 25 mM Tris, 192 mM L-glicina y 1% SDS.

Tampón de transferencia: 25 mM Tris, 192 mM L-glicina y 20% metanol.

Tampón Tris salino (TBS): 2,42 g/l Tris base, 8 g/l NaCl, pH 7,6.

TBS-T: TBS suplementado con 0,1% de Tween-20 (v/v).

#### 3.12.2. Obtención de homogenados de tejido o de cultivos celulares

Para obtener un homogenado total de proteínas partiendo de tejido congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  se pesaron entre 50 y 100 mg de tejido que se homogenizó en una mezcla de tampón RIPA y un cóctel de inhibidores de proteasas al 1% (v/v) utilizando el "Bullet Blender Storm". Se emplearon las condiciones de tiempo y velocidad adecuadas para cada tipo de tejido, siguiendo las especificaciones de la casa comercial.

Cuando se partía de un cultivo celular, se tripsinizaron las células y se resuspendieron en el volumen deseado de RIPA más inhibidor de proteasas al 1% (100  $\mu\text{l}$  de mezcla para cada millón de células).

En ambos casos, tras incubar el homogenado durante 20 min en hielo, agitando cada 10 min, se centrifugó a 20.000  $xg$  durante 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante (homogenado tisular/celular) se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se determinó la concentración de proteínas (apartado 3.15.2.).

### **3.12.3. Procedimiento**

#### **3.12.3.1. Electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Se prepararon geles separadores de poliacrilamida del 5-12% (p/v), dependiendo del tamaño molecular de la proteína de interés, en Tris-HCl utilizando el soporte del sistema "Mini-Protean II Cell". Una vez que el gel separador había polimerizado, se depositó encima el gel concentrador (4% de poliacrilamida) y se dejó polimerizar a temperatura ambiente sin retirar el peine.

Se mezcló el homogenado de proteínas con la solución de carga 2x y  $\beta$ -mercaptoetanol (5%, v/v) y se dejó a temperatura ambiente o se calentó durante 5 min a 100°C, según las recomendaciones para la detección de la proteína de interés. Se cargaron 20-50  $\mu$ g de proteínas en cada pocillo y se desencadenó la electroforesis vertical en una cubeta con solución de migración a una corriente constante de 15 mA para el gel concentrador y 30 mA para el gel separador.

#### **3.12.3.2. Transferencia**

Terminada la electroforesis, se llevó a cabo la transferencia de proteínas del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa en una cubeta con tampón de transferencia con corriente constante (250 mA) durante 90-120 min, en frío (4°C) y agitación.

#### **3.12.3.3. Inmunodetección**

Tras la transferencia, se utilizó leche descremada al 5% (p/v) disuelta en TBS-T para el bloqueo de los sitios inespecíficos de unión durante 1 h en agitación. Después, se incubó la membrana con el anticuerpo primario específico frente a la proteína de interés disuelto en leche al 1-5%, durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios empleados en esta Tesis Doctoral se resumen en la Tabla MM-12.

Posteriormente, se realizaron tres lavados de 15 min con TBS-T y se incubó la membrana durante 1 h con el anticuerpo secundario correspondiente (1:2000), conjugado con la peroxidasa (HRP). Tras otros tres lavados con TBS-T, se procedió al revelado de la membrana.

**Tabla MM-12.** Anticuerpos primarios empelados para detectar proteínas humanas o de rata.

<b>Antígeno</b>	<b>Referencia</b>	<b>Especie de origen</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>
BCRP	ab3380	ratón	1:500	Abcam
CK-7	sc-23876	ratón	1:300	Santa Cruz Biotechnology
Claudina-4	329400	ratón	1:200	Invitrogen
GAPDH	sc-32233	ratón	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
MRP3	M0318	conejo	1:500	Sigma-Aldrich
SOX17	AF1924	cabra	1:1000	R&D
STAT3	ab7966	conejo	1:1000	Abcam
p-STAT3	9145s	conejo	1:1000	Cell Signaling
Survivina	sc-17779	ratón	1:200	Santa Cruz Biotechnology

Para la detección del transportador ASBT humano, se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo cedido por el Dr. Paul A. Dawson, del *Emory University School of Medicine*.

#### **3.12.3.4. Revelado**

La membrana se incubó brevemente con los reactivos de detección ECL (“Enhanced ChemiLuminiscence”) y se llevó a cabo el revelado de la misma en el equipo de análisis LAS-4000 durante el tiempo necesario para obtener una señal detectable con el menor ruido de fondo.

### **3.13. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA**

#### **3.13.1. Soluciones empleadas**

Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, pH 7,4.

#### **3.13.2. Preparación de las muestras**

A partir de los fragmentos de tejido almacenados a -80°C se obtuvieron cortes de 5 µm en un criostato a una temperatura entre -20°C y -15°C, que se colocaron en portas, y se guardaron a -20°C hasta su utilización.

Las células se sembraron en pocillos de placa de 24 pocillos sobre cubreobjetos circulares y a la densidad óptima según la línea celular, con 500 µl de medio de cultivo en cada pocillo.

#### **3.13.3. Inmunodetección**

La fijación/permeabilización se llevó a cabo por incubación durante 1 min con metanol puro almacenado a -20°C o, en el caso del marcaje de BCRP, la fijación se realizó con 4% de paraformaldehído en PBS a temperatura ambiente durante 20 min y

la permeabilización con Triton x-100 al 0,01% durante 4 min. Tras bloquear las uniones inespecíficas con el anticuerpo, se incubaron las muestras con FBS al 5% (v/v) durante 30 min. Seguidamente, se incubaron las muestras durante 1 h con los anticuerpos primarios correspondientes, incluidos en la Tabla MM-13. A continuación, se realizaron tres lavados de 10 min con PBS y se llevó a cabo la incubación, durante 1 h en oscuridad, con el anticuerpo secundario apropiado: anti-IgG de ratón o conejo conjugado con Alexa Fluor-488® o Alexa Fluor-594® (dilución 1:1000) y con DAPI para teñir los núcleos (dilución 1:5000). Después de tres lavados de 10 min con PBS, se añadió medio de montaje, se colocó el cubreobjetos y se selló con esmalte de uñas. La visualización del marcaje se realizó en un microscopio confocal.

**Tabla MM-13.** Anticuerpos primarios empelados para detectar proteínas humanas o de rata por inmunofluorescencia.

Antígeno	Referencia	Especie de origen	Dilución	Casa comercial
ASBT	sc-27493	cabra	1:50	Santa Cruz Biotechnology
ASBT	LS-B7368	cabra	1:50	Life Span
CD31	clone MEC 13.3	rata	1:50	BD Pharmigen
CK-7	sc-23876	ratón	1:200	Santa Cruz Biotechnology
MRP3	ab3375	ratón	1:50	Abcam
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa	ab2871	ratón	1:100	Abcam
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa	ab76020	conejo	1:100	Abcam
OCT1	LS-C161155	conejo	1:50	Life Span

### 3.14. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

#### 3.14.1. Soluciones empleadas

Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, pH 7,4.

#### 3.14.2. Preparación de las muestras

Los cortes de tejido se realizaron con un microtomo (3 µm) en el caso de los bloques de parafina o con un criostato (5 µm) para el tejido congelado en OCT (“Optimal cutting temperature”).

#### 3.14.3. Tinción de hematoxilina-eosina

Los cortes se desparafinaron calentando a 60°C durante toda la noche y, posteriormente, se rehidrataron por inmersión en xilol seguido de soluciones

decrecientes de alcohol y finalmente PBS. Se realizó la fijación con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 min, y se tiñeron por el método clásico de hematoxilina-eosina. Los cortes se deshidrataron por inmersión en soluciones crecientes de alcohol y por último en xilol, y se realizó el montaje con entellán para su estudio al microscopio óptico.

### **3.14.4. Detección de proteínas por inmunohistoquímica**

Para el marcaje de proteínas por inmunohistoquímica en cortes de CCA y HCC humanos se utilizó el sistema automatizado “BOND III” (Leica) del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca. Se desparafinaron los cortes calentando a 60°C durante toda la noche y posteriormente, se rehidrataron con lavados consecutivos de soluciones con proporción decrecientes de alcohol:agua. Tras un paso intermedio de desenmascaramiento del epítipo y bloqueo de señales inespecíficas con suero, se incubaron los cortes con el anticuerpo primario adecuado durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación, se realizó un lavado con PBS y se incubó la muestra con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa durante 8 min. Después, se añadió el sustrato de la peroxidasa DAB durante 10 min. Finalmente se realizó una tinción de hematoxilina para teñir los núcleos, se deshidrató el tejido y se llevó a cabo el montaje con entellán. Para visualizar el resultado se utilizó un microscopio óptico.

## **3.15. DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

### **3.15.1. Parámetros bioquímicos en suero**

Se determinaron parámetros bioquímicos de daño hepático y renal en suero mediante métodos de química seca con el analizador automatizado “Spotchem EZ SP-4430”. Como marcadores de daño hepático se midió: proteínas totales, albúmina, bilirrubina, AST (aspartato aminotransferasa) y ALT (alanina aminotransferasa) y de daño renal: ácido úrico, y nitrógeno ureico (BUN).

### **3.15.2. Valoración de proteínas totales**

Para medir la concentración total de proteínas se utilizó una modificación del método de Lowry (Markwell MA *et al.* 1978), que se basa en la reducción de las proteínas con cobre en medio alcalino y la posterior reducción del ácido fosfomolibdico fosfotúngstico con las proteínas tratadas. El producto resultante se determina espectrofotométricamente. Como patrón se utilizó albúmina bovina sérica.

### 3.15.3. Determinación de la viabilidad celular

El test de formazán es un método colorimétrico utilizado para cuantificar el número de células vivas en ensayos de proliferación o quimiosensibilidad celular. Su fundamento se basa en la transformación por las deshidrogenasas mitocondriales del MTT, una sal de tetrazolio de coloración amarilla, en formazán, un compuesto insoluble de color violeta. La cantidad de formazán producido se cuantifica espectrofotométricamente y es directamente proporcional al número de células vivas.

### 3.15.4. Medida de sorafenib por HPLC-MS/MS

Se siguió una modificación del método descrito por Sparidans (Sparidans RW *et al.* 2009) para la medida de sorafenib por HPLC-MS/MS.

La separación cromatográfica se realizó empleando una columna Zorbax C18 (30 mm x 2,1 mm; 3,5  $\mu$ m) termostalizada a 35°C, y como fase móvil una mezcla de metanol:agua (70:30), conteniendo ambos constituyentes 5 mM de acetato amónico y 0,1% de ácido fórmico, pH 4,6. El flujo de trabajo fue de 0,3 ml/min y el volumen de inyección de 1  $\mu$ l en todos los casos.

Las condiciones de trabajo para la fuente iónica fueron: temperatura del gas ( $N_2$ ) 350°C, flujo del gas 10 ml/min, presión del nebulizador 20 psi, voltaje 2500 V.

La presencia de sorafenib en el lisado de las células se confirmó empleando el modo de trabajo MRM siguiendo la transición específica del ion precursor (ion molecular -  $H^+$ ) 465,1 m/z a los iones producto 270 y 252 m/z.

Se construyó una recta patrón de sorafenib con soluciones preparadas en metanol con concentraciones de 0,3 a 40  $\mu$ M. El tiempo de retención del fármaco fue de 1,15 min.

La concentración de sorafenib en las muestras se corrigió por la recuperación obtenida del estándar interno prednisolona (5  $\mu$ M) añadido en la solución de lisis celular.

### 3.15.5. Determinación de la actividad luciferasa

Se empleó el sistema “Bright-Glo” de Promega para determinar la actividad luciferasa de luciérnaga expresada en células. El kit comercial contiene un tampón para lisar las células y la luciferina, que se mezclaban y almacenaban a -80°C. La luz se visualizó en el equipo de análisis de imagen LAS-4000.

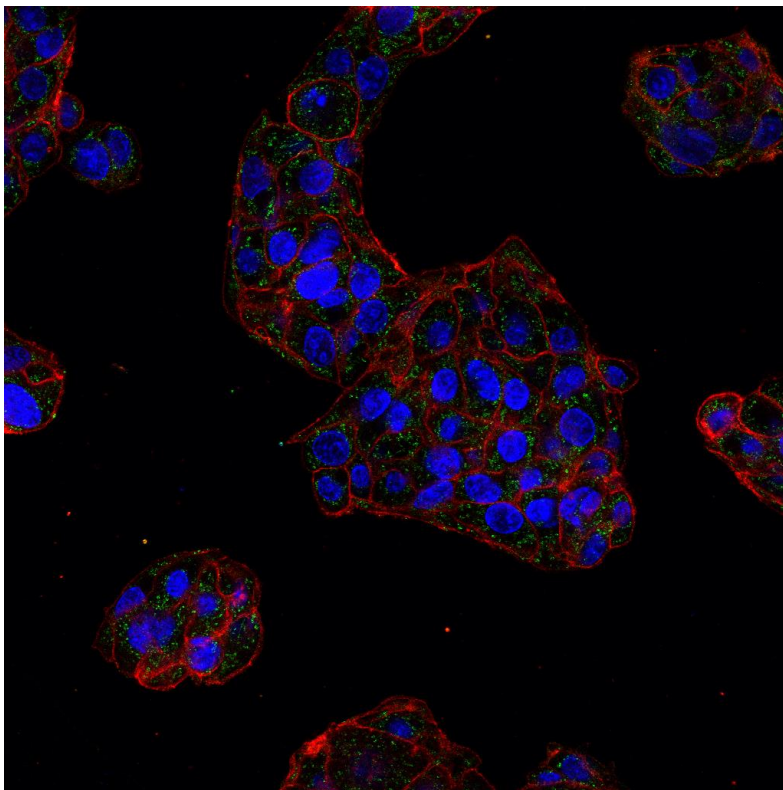


### 3.16. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para la expresión de los resultados se ha calculado la media y la desviación estándar (SD) o el error estándar de la media (EEM).

Para calcular la significación estadística de las diferencias al comparar dos medias se utilizó el test de la  $t$  de Student de valores pareados o no pareados, según el caso. Para las comparaciones entre varios grupos se utilizó el test de comparaciones múltiples de Bonferroni tras un previo análisis de la varianza (ANOVA).





## 4. Resultados



## 4.2. DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA DE TERAPIA GÉNICA PARA SUPERAR LA RESISTENCIA AL SORAFENIB EN EL CCA

Una de las principales características del CCA es su marcada refractariedad frente a la quimioterapia convencional. La mayoría de los pacientes no responden adecuadamente a la quimioterapia y la supervivencia general es menor de un año. Todo ello pone de manifiesto la necesidad de identificar los mecanismos responsables de la quimiorresistencia del CCA para poder desarrollar nuevas estrategias terapéuticas más eficaces.

Como se ha comentado en la Introducción, el sorafenib es el fármaco de elección para el tratamiento del HCC desde que se publicaron los resultados del ensayo clínico SHARP (Llovet JM *et al.* 2008b) en el que por primera vez un fármaco consiguió prolongar la vida de los pacientes con HCC avanzado. Este TKI inhibe la proliferación de células tumorales mediante el bloqueo de la actividad de las Raf quinasas (Raf-1 y B-Raf) y otras quinasas que participan en la ruta Ras/Raf/MEK/ERK. Además, puede frenar la angiogénesis al inhibir VEGFR2-3, PDGFR, c-KIT, FLT-3 y RET en células endoteliales (Wilhelm SM *et al.* 2004; Carlomagno F *et al.* 2006).

A pesar de que el sorafenib ha demostrado tener actividad antitumoral en modelos experimentales de CCA *in vitro* e *in vivo*, los ensayos clínicos en pacientes con CCA han dado resultados contradictorios que han impedido que sea aprobado como tratamiento del CCA. En casos aislados, el sorafenib consiguió prolongar la vida de pacientes con CCA irreseccable y resistente a otros agentes quimioterápicos de primera y segunda línea (Pinter M *et al.* 2011; Chakunta HR *et al.* 2013), y en un ensayo clínico en pacientes con iCCA avanzado que no habían recibido tratamiento previo, 4 de 15 pacientes respondieron parcialmente al tratamiento con sorafenib, mientras que en otros 7 pacientes se consiguió estabilizar la enfermedad (Pan TT *et al.* 2017). Sin embargo, en varios ensayos clínicos de fase II en pacientes con CCA avanzado no se consiguió demostrar un efecto terapéutico beneficioso tras un tratamiento con sorafenib, ni en monoterapia, ni en combinación con otros fármacos (El-Khoueiry AB *et al.* 2012; Lee JK *et al.* 2013; El-Khoueiry AB *et al.* 2014).

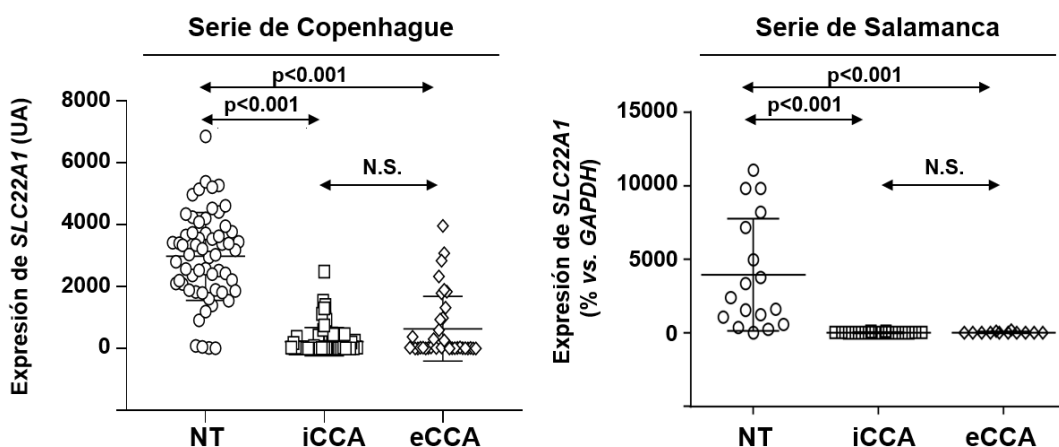
La falta de respuesta del CCA al sorafenib podría ser el resultado de la acción combinada de diferentes MOCs. Nuestro grupo de investigación ha demostrado anteriormente que el transportador hepático OCT1 juega un papel clave en la captación del sorafenib (Herraez E *et al.* 2013), lo cual lo convierte en un factor determinante para la eficacia terapéutica de este TKI, ya que su actividad depende de que alcance sus

dianas intracelulares. Además, nuestro equipo ha descrito que la expresión de OCT1 desciende a nivel de ARNm en HCC, CCA y HB (Martinez-Becerra P *et al.* 2012) y que no todo el ARNm de OCT1 que se transcribe en estos tumores se traduce en proteína funcional debido a la gran proporción de variantes aberrantes de “splicing” y SNPs presentes en el tejido tumoral (Herraez E *et al.* 2013).

En base a estos antecedentes, se estableció como **segundo objetivo** de esta Tesis Doctoral estudiar el papel de OCT1 en el transporte y en el efecto antitumoral del sorafenib en CCA, así como desarrollar una estrategia de terapia génica basada en la inducción de la expresión de OCT1 para mejorar la respuesta del CCA a este TKI.

#### 4.2.1. Evaluación de la expresión de OCT1 en iCCA y eCCA

A pesar de que varios trabajos han demostrado que la expresión de OCT1 sufre una caída a nivel de ARNm en el CCA, ningún estudio ha valorado si esta reducción de expresión puede depender del tipo de CCA, clasificados según su localización anatómica en iCCA y eCCA. Por ello, determinamos los niveles de ARNm de *SLC22A1* en dos cohortes de biopsias pareadas de CCA y tejido adyacente NT: i) la “Serie de Copenhague”, cuyas medidas de expresión se realizaron por transcriptómica en el marco de una colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Jesper Andersen; y ii) la “Serie de Salamanca”, donde se analizó la expresión de OCT1 por RT-qPCR. Las muestras de CCA fueron divididas en iCCA o eCCA en ambas series de muestras (Figura 16). Hay que señalar que debido a su particular localización fuera del hígado la mayoría de las muestras de eCCA no tenían tejido hepático adyacente pareado.



**Figura 16.** Expresión de OCT1 (gen *SLC22A1*) en CCA intrahepático (iCCA), CCA extrahepático (eCCA) y en tejido hepático adyacente no-tumoral (NT) en la “Serie de Copenhague” (iCCA, n=68; eCCA, n=36; NT, n=60) (A) y en la “Serie de Salamanca” (iCCA, n=16; eCCA, n=12; NT, n=17) (B). Los valores son media±EEM. N.S., no significativo ( $p>0,05$ ); UA, unidades arbitrarias.

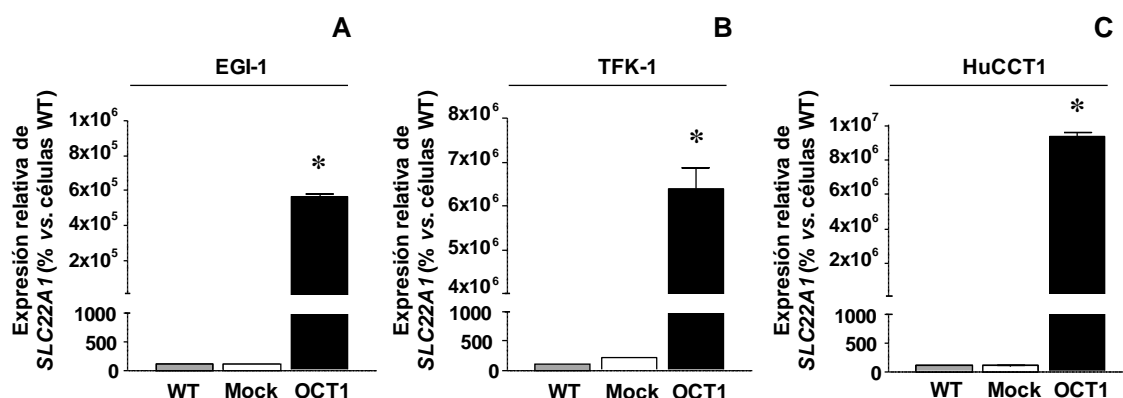
Se observó que en las dos series la expresión de *SLC22A1* disminuía significativamente en iCCA y eCCA en comparación con el tejido hepático NT ( $p < 0,001$ ), donde la expresión era elevada (Figura 16). Además, no existían diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de ARNm que presentaban los iCCAs frente a los eCCAs, lo cual indica que la localización anatómica de este tipo de tumor no afecta a la expresión de OCT1.

#### 4.2.2. Generación de modelos celulares de CCA con sobre-expresión de OCT1

Estudios preliminares de nuestro grupo de investigación en un modelo *in vitro* en células TFK-1 de CCA humano transfectadas con OCT1 demostraron que la presencia de este transportador aumentaba la sensibilidad al sorafenib (Herraez E *et al.* 2013). Con el fin de validar este hallazgo en otro modelo celular más robusto, se desarrollaron líneas de CCA que sobre-expresaban OCT1 de forma estable utilizando como herramienta de transducción celular los vectores lentivirales. Los lentivirus consiguen una expresión duradera del transgén de interés, ya que integran con eficacia su genoma en el ADN de la célula huésped; de esta manera se evitan los problemas de temporalidad de la expresión que hay que tener en cuenta en modelos de transfección transitoria.

Dado que en los dos tipos de CCA (iCCA y eCCA) existe una caída de expresión de OCT1 similar (Figura 16), se utilizaron células HuCCT1 de iCCA y células EGI-1 y TFK-1 de eCCA como modelos *in vitro*. Se transdujeron estas líneas celulares con lentivirus pWPI vacíos (Mock) o lentivirus pWPI-OCT1 (OCT1) utilizando una MOI de 25 para EGI-1 y TFK-1 y MOI de 10 para HuCCT1. En concreto, las células EGI-1-Mock/OCT1 y TFK-1-Mock/OCT1 fueron generadas previamente durante un Trabajo Fin de Máster realizado en nuestro grupo (Sánchez-Vegazo R 2014), mientras que la transducción en las células HuCCT1 fue llevada a cabo durante esta Tesis Doctoral.

Para comenzar, se determinaron los niveles de ARNm del gen *SLC22A1* mediante RT-qPCR en nuestros modelos celulares. Se observó que en las tres líneas derivadas de CCA la expresión endógena de *SLC22A1* era  $< 0,1\%$  respecto al hígado humano sano, tejido que presenta una elevada expresión de OCT1 (Ct=18-19). Por otro lado, la transducción con lentivirus Mock no modificó la expresión de *SLC22A1* en ninguna de las tres líneas celulares, en comparación con la expresión de células WT (Figura 17). Sin embargo, las células transducidas con lentivirus OCT1 presentaban niveles de ARNm de *SLC22A1* significativamente mayores que las células Mock (Figura 17).

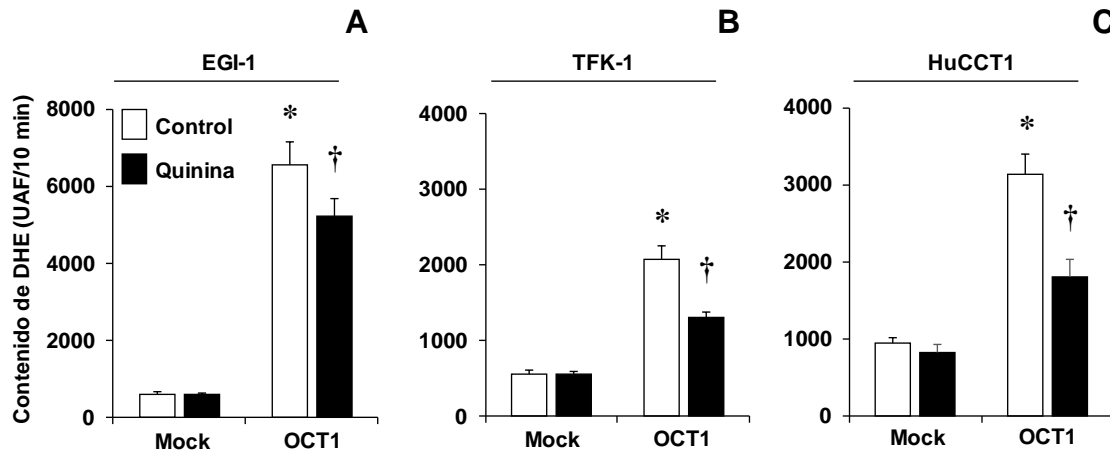


**Figura 17.** Cuantificación de los niveles de expresión del ARNm de SLC22A1, determinados por RT-qPCR, en células EGI-1 (A), TFK-1 (B) y HuCCT1 (C) silvestres (WT) y transducidas con lentivirus vacíos (Mock) o que contienen la secuencia codificante del OCT1 humano (OCT1). Las medidas se realizaron 4 días después de la transducción. Los valores son media±EEM de 6 pocillos por condición determinados en 3 cultivos diferentes. \*,  $p < 0,05$ , comparado con células Mock.

Para confirmar la funcionalidad del OCT1 en las células transducidas se llevaron a cabo, mediante citometría de flujo, ensayos de captación de DHE, un compuesto catiónico que es sustrato de este transportador (Al-Abdulla R *et al.* 2019). Para realizar el experimento las células Mock o con sobre-expresión de OCT1 fueron incubadas en suspensión con DHE en presencia o ausencia de quinina, un inhibidor específico de OCT1. Observamos que las células transducidas con los lentivirus portadores de la ORF de OCT1 mostraban una captación superior de DHE a la de las células Mock (Figura 18C). Además, encontramos que la presencia de quinina inhibía significativamente la captación de DHE en las células con sobre-expresión de OCT1 (Figura 18), lo cual confirmaba que la captación estaba mediada por este transportador.

Resultó llamativa la diferencia en el contenido de DHE entre las distintas células Mock, observándose que las células HuCCT1 de iCCA mostraban una mayor capacidad para acumular este compuesto, a pesar de la baja expresión de OCT1 (Figura 18C). Sin embargo, la co-incubación con quinina no afectó a la captación de DHE de las células Mock en ninguna de las tres líneas celulares, lo cual descartaba la participación de OCT1 en la entrada de DHE.



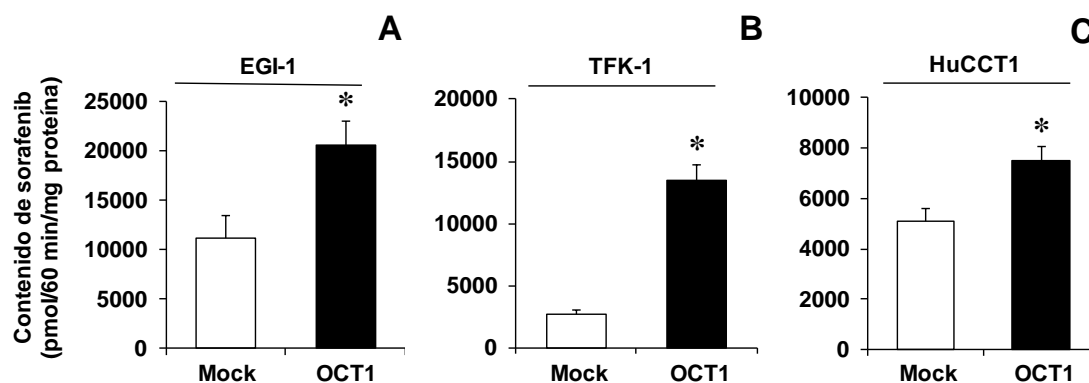


**Figura 18.** Captación de dihidroetidio (DHE, 5 µM) en células EGI-1 (A), TFK-1 (B) y HuCCT1 (C) transducidas con lentivirus vacíos (Mock) o que contienen la secuencia codificante del OCT1 humano (OCT1). El contenido de DHE se determinó por citometría de flujo tras la incubación con el compuesto durante 10 minutos en presencia o ausencia de quinina (250 µM). Los valores son media±EEM de 6 pocillos por condición determinados en 3 cultivos diferentes. \*,  $p < 0,05$  comparando Mock con OCT1; †,  $p < 0,05$ , comparando la captación de DHE en presencia y ausencia de quinina. UAF, unidades arbitrarias de fluorescencia.

Estos resultados nos permitieron confirmar la actividad transportadora del OCT1 sobre-expresado en las líneas EGI-1, TFK-1 y HuCCT1, de forma que validamos su uso como modelos celulares para estudiar el papel de OCT1 en el transporte del sorafenib.

#### 4.2.3. Efecto de la expresión estable de OCT1 en líneas de CCA en el transporte y la sensibilidad del sorafenib

Una vez confirmada la funcionalidad de OCT1 en las líneas celulares de CCA transducidas con este transportador, utilizamos estos modelos para evaluar si la sobre-expresión experimental de OCT1 podría ser útil para investigar estrategias de quimiosensibilización al sorafenib. Para ello, en primer lugar, se llevaron a cabo ensayos de captación de sorafenib en las células de CCA transducidas con lentivirus Mock u OCT1. Así, incubamos las células con sorafenib durante 1 h y analizamos el contenido intracelular del fármaco mediante HPLC-MS/MS. La sobre-expresión de OCT1 en las tres líneas celulares estudiadas inducía una captación significativamente mayor de sorafenib que la que presentaban las células Mock (Figura 19). Cabe destacar que, al igual que ocurría en el transporte del compuesto catiónico DHE (Figura 18), encontramos una marcada variabilidad entre líneas celulares en cuanto a su capacidad de acumular sorafenib en las células Mock (Figura 19). Así, las células TFK-1 fueron las que presentaron menor contenido de sorafenib, las HuCCT1 acumularon el doble de sorafenib que las TFK-1 y las EGI-1 fueron las que presentaron mayor capacidad para acumular fármaco (Figura 19C).

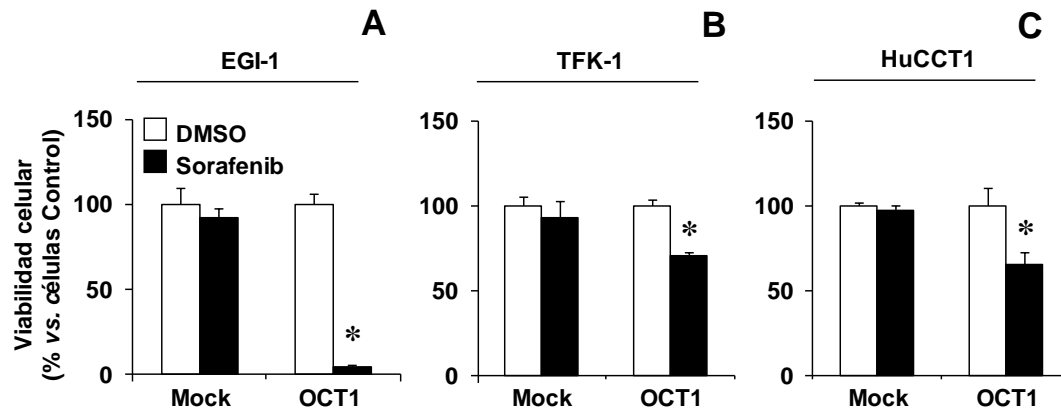


**Figura 19.** Captación de sorafenib en células EGI-1 (A), TFK-1 (B) y HuCCT1 (C) transducidas con lentivirus vacíos (Mock) o que contienen la secuencia codificante de OCT1 humano (OCT1). Las células se incubaron durante 1 h con 5  $\mu$ M de sorafenib. Los valores son media  $\pm$  EEM de 12 pocillos por condición determinados en 3 cultivos diferentes. \*,  $p < 0,05$ , comparando Mock con OCT1.

Tras confirmar que en las células transducidas con lentivirus portadores de OCT1 la capacidad de captación de sorafenib estaba aumentada, evaluamos si la expresión estable de este transportador aumentaba también la sensibilidad de las células de CCA al sorafenib. Estudios previos de nuestro laboratorio, en los que se investigó el efecto del sorafenib sobre la viabilidad de células transfectadas con OCT1 y tratadas con el fármaco durante diferentes tiempos, recomendaban utilizar tiempos cortos de exposición para estudiar el efecto de la expresión de transportadores de entrada en la acción farmacológica de este TKI; probablemente porque cuando se realizaban incubaciones con sorafenib durante 72 h se producía la entrada del fármaco en la célula por otros mecanismos que enmascaraban la ventaja que suponía el transporte mediado por OCT1 (Herraez E *et al.* 2013). En base a esta información, se incubaron las líneas de CCA Mock y OCT1 con sorafenib durante 6 h y se determinó la viabilidad celular utilizando el test de formazán 66 h después de retirar el fármaco.

Como se puede observar en la Figura 20, la sobre-expresión de OCT1 indujo un aumento de la sensibilidad al sorafenib, respecto a las células Mock. Este efecto fue especialmente marcado en las células EGI-1-OCT1, en las que la viabilidad caía por debajo del 10% del control (Figura 20A); en el caso de TFK-1 (Figura 20B) y HuCCT1 (Figura 20C) transducidas con OCT1 también se observó un descenso en la viabilidad celular tras la exposición al sorafenib, aunque de manera más moderada. Estos resultados son concordantes con los datos obtenidos en los experimentos de captación de sorafenib (Figura 19), donde las EGI-1-OCT1 acumularon más sorafenib (~20.000 pmol/60 min/mg proteína) que las TFK-1 (~13.500 pmol/60 min/mg proteína) y HuCCT1 (~7.000 pmol/60 min/mg proteína). Por otro lado, observamos que el tratamiento con sorafenib a la concentración utilizada no alteraba el crecimiento de ninguna de las

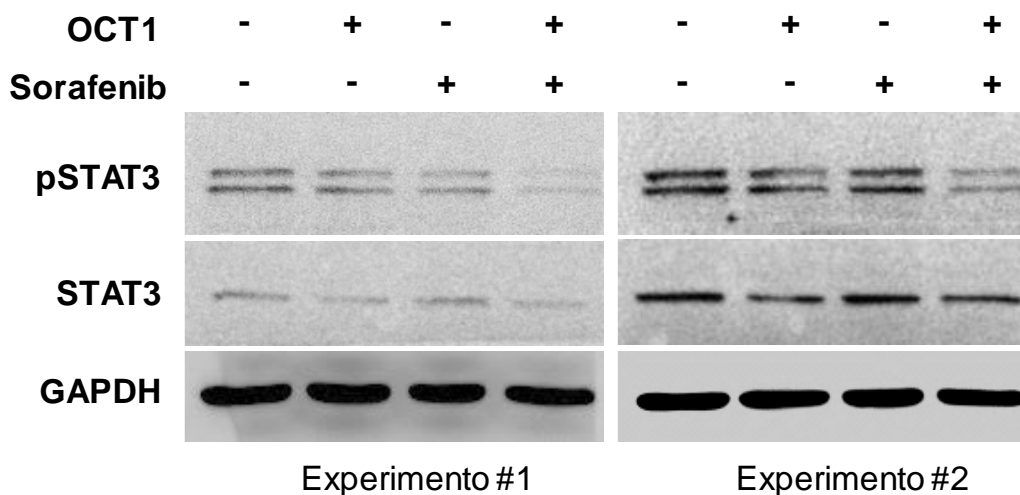
células Mock empleadas. Además, comprobamos que la expresión de OCT1 no afectaba al crecimiento del cultivo celular; para ello evaluamos la viabilidad de las células Mock y OCT1 sin recibir ningún tipo de tratamiento y observamos que no había diferencias significativas en el crecimiento de estos cultivos (datos no mostrados).



**Figura 20.** Sensibilidad al sorafenib en células EGI-1 (A), TFK-1 (B) y HuCCT1 (C) transducidas con lentivirus vacíos (Mock) o que contienen la secuencia codificante del OCT1 humano (OCT1). La viabilidad celular se determinó a las 72 h tras incubación con 5  $\mu$ M de sorafenib durante 6 h. Los valores son media  $\pm$  EEM de 9 pocillos por condición determinados en 3 cultivos diferentes. \*,  $p < 0,05$ , comparando Mock con OCT1.

Tras confirmar que la sobre-expresión de OCT1 potenciaba el efecto citotóxico del sorafenib, decidimos analizar si había una alteración en las dianas moleculares del sorafenib tras el tratamiento con este fármaco en células de CCA con sobre-expresión o no de OCT1. Estudiamos la inhibición de la ruta JAK/STAT3 mediada por sorafenib, ya que varios trabajos han descrito que el sorafenib ejerce su acción antitumoral en el iCCA mediante el bloqueo de esta ruta de señalización (Blechacz BR *et al.* 2009). En concreto, el sorafenib inhibe la fosforilación de STAT3 inducida por IL-6 en líneas celulares de CCA, lo cual resulta en una reducción de la expresión de la proteína anti-apoptótica Mcl-1 en estas células (Blechacz BR *et al.* 2009; Sugiyama H *et al.* 2011).

Incubamos las células TFK-1-Mock o con sobre-expresión de OCT1 con 5  $\mu$ M de sorafenib durante 4 h a 37°C. Posteriormente, se mantenían con medio fresco durante la noche y se lisaban para obtener un homogenado de proteínas totales. El western blot reveló que la sobre-expresión de OCT1 favorecía la fosforilación de STAT3 mediada por sorafenib (Figura 21) y, además, se observó un ligero descenso en la expresión de STAT3 total. Sin embargo, los niveles de STAT3 total y su forma fosforilada (pSTAT3) no se alteraban en las células Mock incubadas con sorafenib ni en las células con sobre-expresión de OCT1 sin tratar (Figura 21). Estos datos sugerían que la inhibición de la fosforilación de STAT3 que ejercía el sorafenib era dependiente de la expresión de OCT1.



**Figura 21.** Detección por western blot de la proteína STAT3 total y fosforilada (pSTAT3) y GAPDH en TFK-1 transducidas con lentivirus vacíos (OCT1 -) o que contenían la secuencia codificante de OCT1 (OCT1 +). Las células se incubaron con 5  $\mu$ M de sorafenib durante 4 h y después se mantuvieron con medio libre de fármaco durante 20 h adicionales. Se presenta el resultado obtenido en dos experimentos independientes.

#### 4.2.4. Desarrollo de vectores adenovirales para inducir la expresión de OCT1 específicamente en el tejido tumoral

Teniendo en cuenta los resultados descritos en el apartado anterior, en los que se demuestra *in vitro* que las células de CCA que sobre-expresan OCT1 son más sensibles al sorafenib que las células Mock, se decidió desarrollar una estrategia de terapia génica para sobre-expresar OCT1 en CCA, y analizar si esta manipulación mejoraba la respuesta antitumoral del sorafenib *in vivo*.

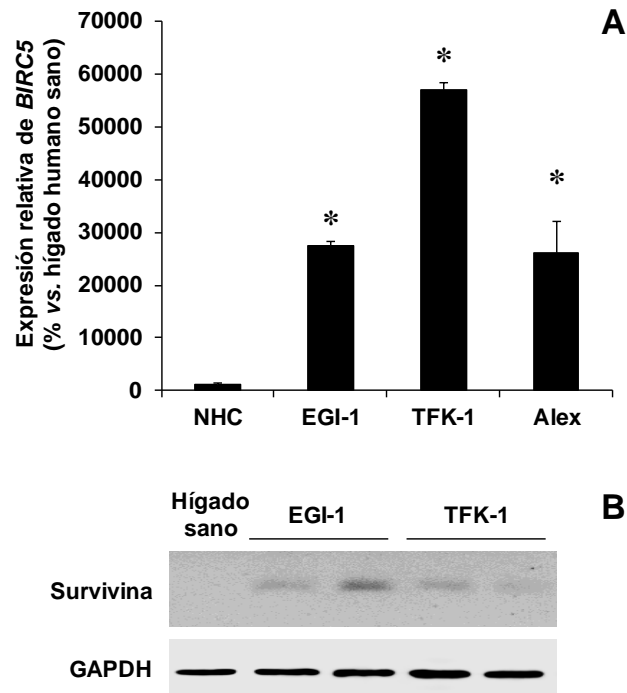
Para inducir de forma exógena la expresión de OCT1 en las células tumorales colangiulares, que apenas expresan este transportador, se escogieron los adenovirus del serotipo 5 (Ad5) como vector. A diferencia de los lentivirus, que integran su genoma viral en el ADN de la célula huésped, los adenovirus no se integran, sino que mantienen su información genética de forma episomal en la célula hospedadora, lo que reduce la probabilidad de inducir mutaciones no deseadas en el genoma huésped. Este hecho, junto con su gran eficacia de transducción, justifica que hayan sido frecuentemente elegidos como vectores virales en terapias génicas *in vivo*. Además, otra ventaja para nuestro objetivo fue que los Ad5 presentan un fuerte tropismo hepático (Waddington SN *et al.* 2008).

Uno de los principales obstáculos que impide el uso de terapias génicas en clínica es que los vectores que se utilizan inducen la expresión del transgén de interés (GOI, "gene of interest") no solo en las células tumorales, sino también en tejidos sanos.

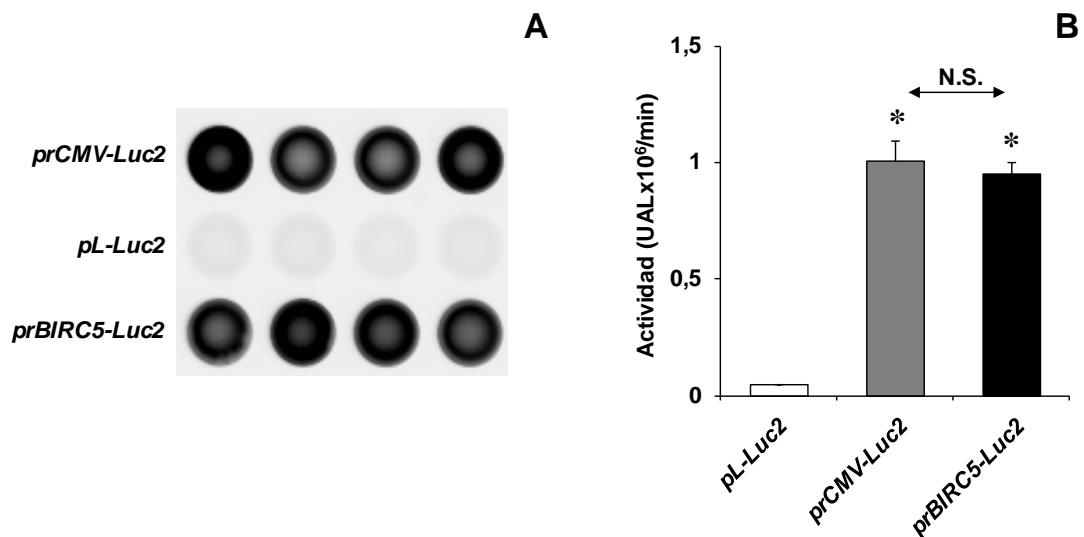
Conseguir una transducción selectiva en las células tumorales ha sido un reto para muchos investigadores en las últimas décadas. Numerosos trabajos apoyan la idea de utilizar promotores “tumor-específicos” para controlar la expresión del GOI de forma que la transcripción génica se lleve a cabo exclusivamente en el tejido neoplásico. En base al aumento de expresión del gen *BIRC5*, que codifica para la survivina, descrito en CCA (Martinez-Becerra P *et al.* 2012), en este trabajo nos propusimos diseñar una estrategia de terapia génica para quimiosensibilizar el CCA al sorafenib, donde el promotor de la survivina (*prBIRC5*) controlaría la expresión génica del GOI, que en nuestro caso era la ORF de OCT1.

Con el fin de comprobar la especificidad tumoral del *prBIRC5* en nuestras líneas celulares de cáncer hepático, se determinó la expresión de este gen mediante RT-qPCR en EGI-1 y TFK-1 de CCA humano y Alexander (Alex) de HCC humano, así como en NHC. Como se muestra en la Figura 22A, los niveles de ARNm de *BIRC5* eran significativamente superiores en las líneas de cáncer hepático (TFK-1>EGI-1=Alex) que en las células NHC o en el hígado humano sano. Por otro lado, se estudió mediante western blot el nivel de expresión de la proteína survivina en las líneas celulares derivadas de CCA humano (Figura 22B). Observamos que mientras que el hígado humano sano no presentaba expresión de survivina, ésta era evidente en las células EGI-1 y TFK-1 (Figura 22B).

A continuación, clonamos el *prBIRC5* en un plásmido de expresión que contenía la secuencia codificante del gen reportero *Luc2* (apartado 3.8.2.3. de Materiales y Métodos). Para estudiar la actividad transcripcional del *prBIRC5*, transfectamos células Alexander con los plásmidos que contenían el *prBIRC5-Luc2* o el *prCMV-Luc2*, siendo este último utilizado como control positivo, ya que la expresión de *Luc2* está controlada por el promotor constitutivo CMV. Asimismo, se utilizó como control negativo otro vector que contenía exclusivamente el gen *Luc2*, sin promotor (*pL-Luc2*). En un primer momento se llevaron a cabo estos ensayos en células de CCA humano. Desafortunadamente estas células tenían una eficacia de transfección muy baja (<10%) lo que dificultaba la interpretación de los resultados; por ello, estos ensayos de actividad del *prBIRC5* se llevaron a cabo utilizando células Alexander, en las cuales la transfección es más eficaz (>60%). Así, observamos que la actividad del *prBIRC5* era muy elevada y similar a la del *prCMV*, ya que los niveles de señal emitida por *Luc2* eran similares cuando la expresión de este gen reportero estaba controlada por el *prBIRC5* (Figura 23). Este resultado indicaba que la actividad del *prBIRC5* era comparable a la de un promotor potente y que dirige una expresión constitutiva, como el *prCMV*.



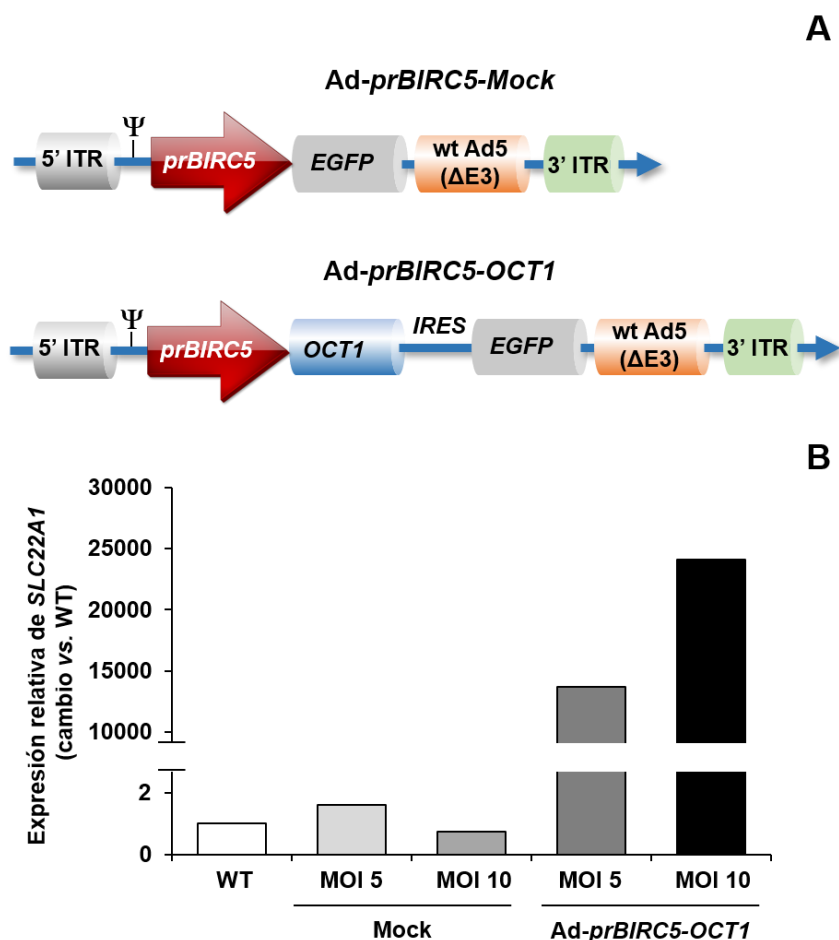
**Figura 22.** Expresión del gen *BIRC5* medido por RT-qPCR (A) en colangiocitos humanos sanos (NHC), en células EGI-1 y TFK-1 de CCA humano y en células Alexander (Alex) de HCC humano, expresada respecto a hígado humano sano. Los valores son media±EEM de 6 pocillos por condición determinados en 3 cultivos diferentes. \*,  $p < 0,05$  comparado con NHC. Imágenes representativas de la expresión de survivina medida por western blot (B) en líneas celulares de CCA humano. Se utilizó GAPDH como control de carga.



**Figura 23.** Imagen representativa (A) y actividad del promotor de *BIRC5* (B) determinada en células Alexander 48 h después de haber sido transfectadas con los plásmidos *prCMV-Luc2*, *pL-Luc2* y *prBIRC5-Luc2*. Los valores son media±EEM de al menos 12 pocillos por condición determinados en 3 cultivos diferentes. \*,  $p < 0,01$  comparado con *pL-Luc2*. UAL, unidades arbitrarias de luminiscencia; N.S., no significativo ( $p > 0,05$ ).

En base a estos antecedentes decidimos generar adenovirus no-replicativos que contenían la construcción quimérica *prBIRC5-OCT1*, esto es, el promotor de *BIRC5* humano seguido de la secuencia codificante del gen *SLC22A1* (*Ad-prBIRC5-OCT1*) (Figura 24A). Además, insertamos aguas abajo del gen *SLC22A1* la secuencia codificante de *EGFP*, separada por una secuencia IRES de reconocimiento del ribosoma, que nos serviría como gen reportero para estudiar la eficacia de transducción de estos adenovirus. En paralelo, se desarrollaron vectores adenovirales *prBIRC5-Mock* (*Ad-prBIRC5-Mock*) que contenían el *prBIRC5* seguido de la ORF de *EGFP*, y que utilizamos como adenovirus control (Figura 24A).

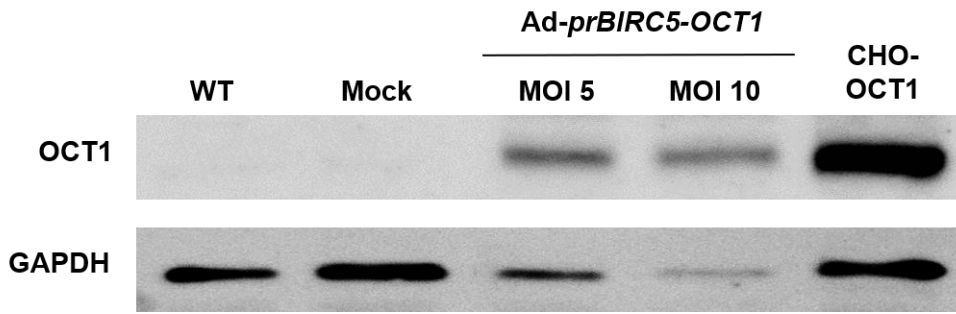
Tras la producción de estos vectores virales, determinamos su funcionalidad *in vitro*. Para comenzar, realizamos una transducción de células Alexander de HCC humano con MOIs crecientes de *Ad-prBIRC5-OCT1* o *Ad-prBIRC5-Mock* (Mock) y 48 h después analizamos la expresión de OCT1 mediante RT-qPCR (Figura 24B). En este caso, observamos que la expresión de OCT1 aumentaba de forma MOI dependiente a nivel de ARNm en las células Alexander transducidas con *Ad-prBIRC5-OCT1* (Figura 24B). La expresión de OCT1 en células Mock era muy similar a la de las células Alexander silvestres (WT), tanto a MOI 5 como a MOI 10, lo cual indica que la transducción viral no altera los niveles de expresión de OCT1. Sin embargo, la transducción con *Ad-prBIRC5-OCT1* usando una MOI 5 indujo un aumento de la abundancia del ARNm de OCT1 de 15.000 veces respecto a WT y usando una MOI 10 se alcanzaron niveles aún mayores y comparables con la expresión que presentaba el hígado humano sano (Figura 24B).



**Figura 24.** Esquema de las construcciones portadoras del GOI contenidas en los adenovirus controles (*Ad-prBIRC5-Mock*) y en los adenovirus que incluían la secuencia codificante de OCT1 (*Ad-prBIRC5-OCT1*) (A). Expresión relativa de *SLC22A1* normalizada con GAPDH en células Alexander silvestres (WT), transducidas con adenovirus *prBIRC5-Mock* (Mock) (MOI 10) o con MOIs crecientes de adenovirus *prBIRC5-OCT1* (B). Valores obtenidos de un experimento por duplicado.

Mediante western blot se comprobó la sobre-expresión de OCT1 en Alexander transducidas con *Ad-prBIRC5-OCT1* (Figura 25). Como control positivo se utilizaron células CHO, derivadas de ovario de hámster chino, que habían sido previamente transducidas con lentivirus pWPI-OCT1. Ni las células Alexander WT, ni las Mock, presentaban expresión detectable de este transportador, mientras que en los western blots realizados con las células transducidas con *Ad-prBIRC5-OCT1* se apreciaba una banda de la proteína correspondiente a OCT1 (~65 kDa) (Figura 25).

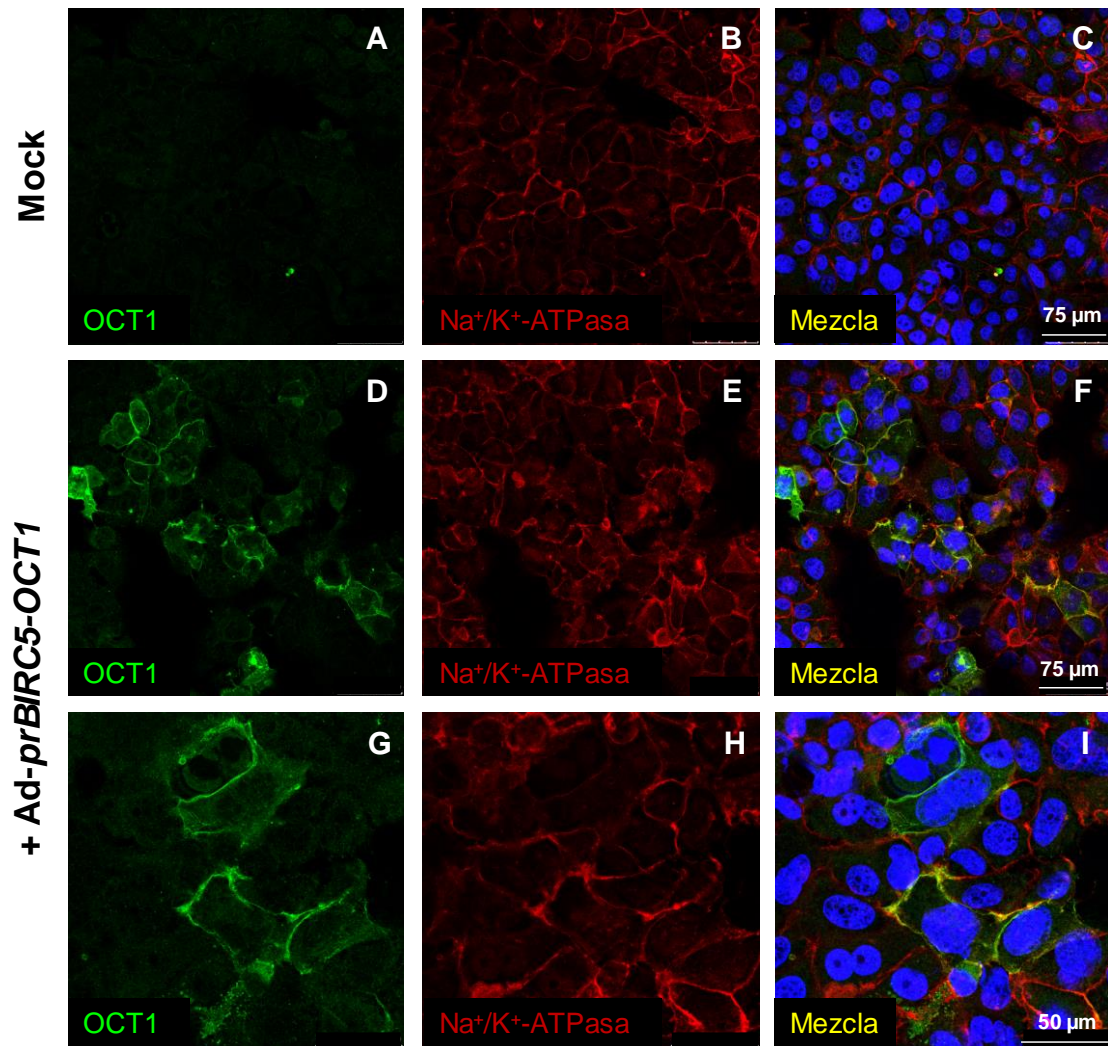




**Figura 25.** Expresión de OCT1 en células Alexander silvestres (WT), transducidas con adenovirus *prBIRC5-Mock* (Mock) (MOI 10) o con MOI 5 y MOI 10 de adenovirus *prBIRC5-OCT1*, medida por western blot 48 h post-transducción. Se incluyeron células CHO derivadas de ovario de hámster chino con sobre-expresión estable de OCT1 (CHO-OCT1) como control positivo. Se usó GAPDH como control de carga.

Para que el transportador OCT1 pueda realizar su función debe encontrarse correctamente insertado en la membrana plasmática de las células. Se ha descrito en CCA y HCC la presencia de SNPs de OCT1 que impiden su translocación a la membrana celular y dan como resultado proteínas no funcionales (Herraez E *et al.* 2013). Por ello, evaluamos mediante inmunofluorescencia la localización de OCT1 en las células Alexander transducidas con los *Ad-prBIRC5-OCT1* o *Ad-prBIRC5-Mock* usando una MOI de 10. El resultado confirmó que las células Alexander Mock no expresan OCT1, mientras que en un elevado porcentaje de las células transducidas con los adenovirus portadores de OCT1 se pudo co-localizar este transportador junto con la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, confirmando así su correcta localización en la membrana plasmática (Figura 26).

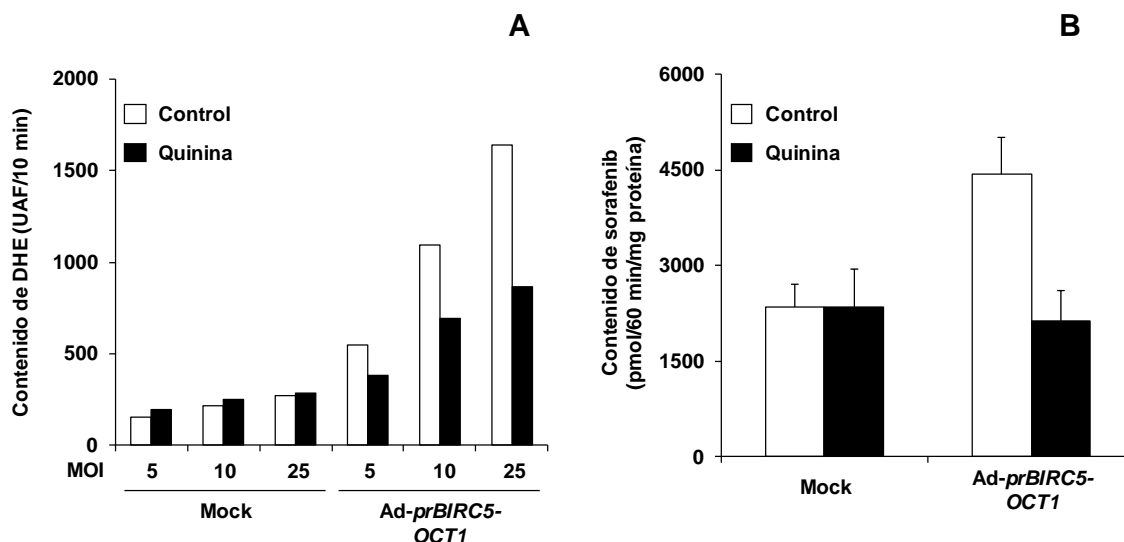
Para completar la evaluación funcional de los adenovirus Mock y OCT1 se llevaron a cabo dos tipos de ensayos de transporte: i) captación de DHE medido por citometría de flujo y ii) captación de sorafenib analizado por HPLC-MS/MS. Tras incubar las células Alexander transducidas con MOIs crecientes de *Ad-prBIRC5-Mock* (Mock) o *Ad-prBIRC5-OCT1* con DHE durante 15 min, se determinó el contenido intracelular de este compuesto fluorescente por citometría de flujo (Figura 27A). Encontramos que la captación de DHE aumentaba progresivamente a medida que aumentaba la MOI en las células *Ad-prBIRC5-OCT1*, siendo dicho aumento atenuado en presencia del inhibidor específico de OCT1, quinina. Sin embargo, en las células Mock el contenido de DHE era escaso y no se modificó sustancialmente con ninguna de las MOIs empleadas. Además, los niveles de DHE tampoco se alteraban en las células Mock cuando la captación se llevaba a cabo en presencia de quinina.



**Figura 26.** Imágenes representativas del marcaje de OCT1 (en verde) (A, D, G) y  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (en rojo) (B, E, H) en células Alexander transducidas con adenovirus *prBIRC5-OCT1* (MOI 10), mediante inmunofluorescencia acoplada a microscopía confocal. Se incluyeron células transducidas con los adenovirus *prBIRC5-Mock* (A-C). Las imágenes C, F e I corresponden al solapamiento de las señales, con los núcleos teñidos con Dapi.

Por otro lado, la determinación del contenido intracelular de sorafenib por HPLC-MS/MS puso de manifiesto que las células Alexander transducidas con *Ad-prBIRC5-OCT1* tenían mayor capacidad para acumular sorafenib que las células Mock (Figura 27B). Además, el aumento de la captación de sorafenib se inhibía parcialmente con quinina en las células que sobre-expresaban OCT1, lo cual sugería que el transporte de sorafenib estaba mediado por OCT1 en estas células (Figura 27B).

En base a los resultados descritos anteriormente, se concluyó que los adenovirus *prBIRC5-OCT1* desarrollados en esta Tesis Doctoral eran capaces de inducir la expresión de OCT1 *in vitro*, dando lugar a la expresión de una proteína completamente funcional y capaz de transportar sorafenib.

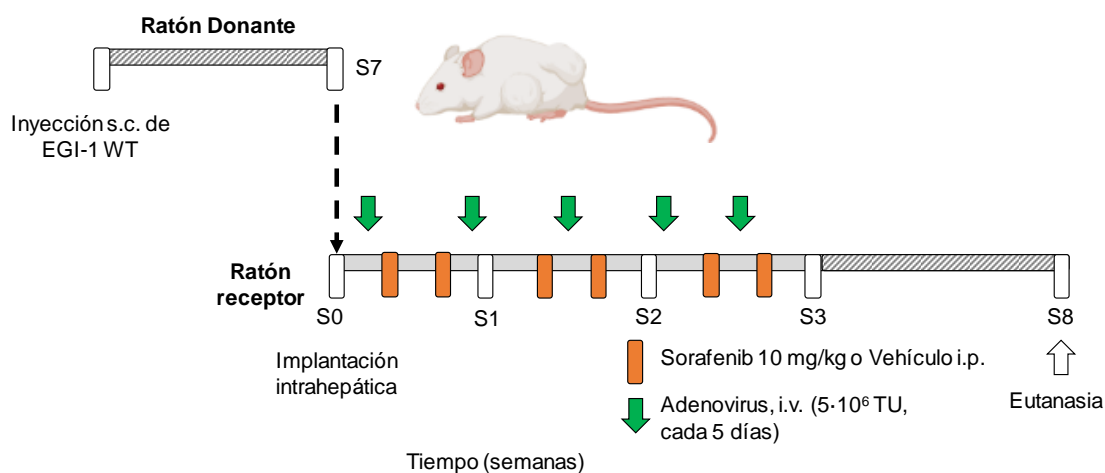


**Figura 27.** Captación de DHE (A) y sorafenib (B) en Alexander transducidas con adenovirus *prBIRC5-Mock* (Mock) o *prBIRC5-OCT1*, determinada por citometría de flujo o HPLC-MS/MS, respectivamente, 48 h post-transducción. Para la captación de DHE se transdujeron las células con MOIs crecientes de adenovirus *prBIRC5-Mock* o *prBIRC5-OCT1*, mientras que, para la captación de sorafenib, se utilizó MOI 10. Los valores son media $\pm$ SD de cuatro determinaciones.

#### 4.2.5. Efecto de OCT1 en la sensibilidad al sorafenib *in vivo* en un modelo de xenotrasplante ortotópico de CCA en el hígado

Tras comprobar que la sobre-expresión de OCT1 *in vitro* aumenta la sensibilidad de las líneas celulares de CCA al sorafenib y que los adenovirus *prBIRC5-OCT1* desarrollados eran funcionales, el siguiente paso fue llevar a cabo un ensayo de quimiosensibilización del CCA *in vivo* basado en la inducción de la expresión de OCT1.

La figura 28 muestra los detalles del diseño experimental que llevamos a cabo. Se utilizó un modelo de xenotrasplante en ratones *nude* inmunodeprimidos siguiendo un protocolo puesto a punto previamente en nuestro laboratorio (Dominguez MF *et al.* 2001). Realizamos un implante subcutáneo de células EGI-1 de CCA humano en un ratón, que cuando alcanzó el tamaño deseado ( $\sim 0,75$  cm<sup>3</sup>), se utilizó como donante para llevar a cabo implantes ortotópicos de pequeños fragmentos de tumor en el hígado de otros ratones receptores. Al día siguiente de la operación, los animales se dividieron en cuatro grupos experimentales: “Control”, que recibió solución salina i.p. (vehículo); “Sorafenib”, tratado con 10 mg/kg p.c. del TKI; “Ad-*prBIRC5-OCT1*”, que recibió una dosis de adenovirus *prBIRC5-OCT1* i.v. cada 5 días; y “Ad-*prBIRC5-OCT1* + sorafenib”, que recibió el tratamiento farmacológico combinado con la terapia viral. Los ratones de los grupos “Control” y “Sorafenib” también recibieron inyecciones i.v. de Ad-*prBIRC5-Mock* cada 5 días.



**Figura 28.** Esquema ilustrativo del modelo experimental utilizado para estudiar el efecto de la sobre-expresión de OCT1 en la sensibilidad al sorafenib *in vivo*. Se generó un tumor subcutáneo de células EGI-1 en un ratón *nude*, que después se empleó como donante para realizar implantes de pequeños fragmentos del tumor en el hígado de ratones *nude* receptores. Se administraron adenovirus vacíos (*Ad-prBIRC5-Mock*) o adenovirus que contenían la secuencia codificante de OCT1 (*Ad-prBIRC5-OCT1*) (i.v.) cada 5 días durante dos meses. Los animales recibieron solución salina (Vehículo) o sorafenib (10 mg/kg p.c., i.p.) dos días por semana.

Tras dos meses de tratamiento, se sacrificaron los animales bajo anestesia y se recogieron muestras de suero y de los tumores intrahepáticos que se habían desarrollado, así como el tejido adyacente NT.

Se observó que, ni la administración de adenovirus, ni el sorafenib modificaron el peso corporal de los animales comparado con los ratones no tratados (datos no mostrados). Tampoco se observaron alteraciones significativas en los parámetros bioquímicos de daño hepático y renal que se analizaron en las muestras de suero de ninguno de los grupos de animales en comparación con los datos obtenidos en ratones *nude* que no recibieron tratamiento alguno (Tabla 2).

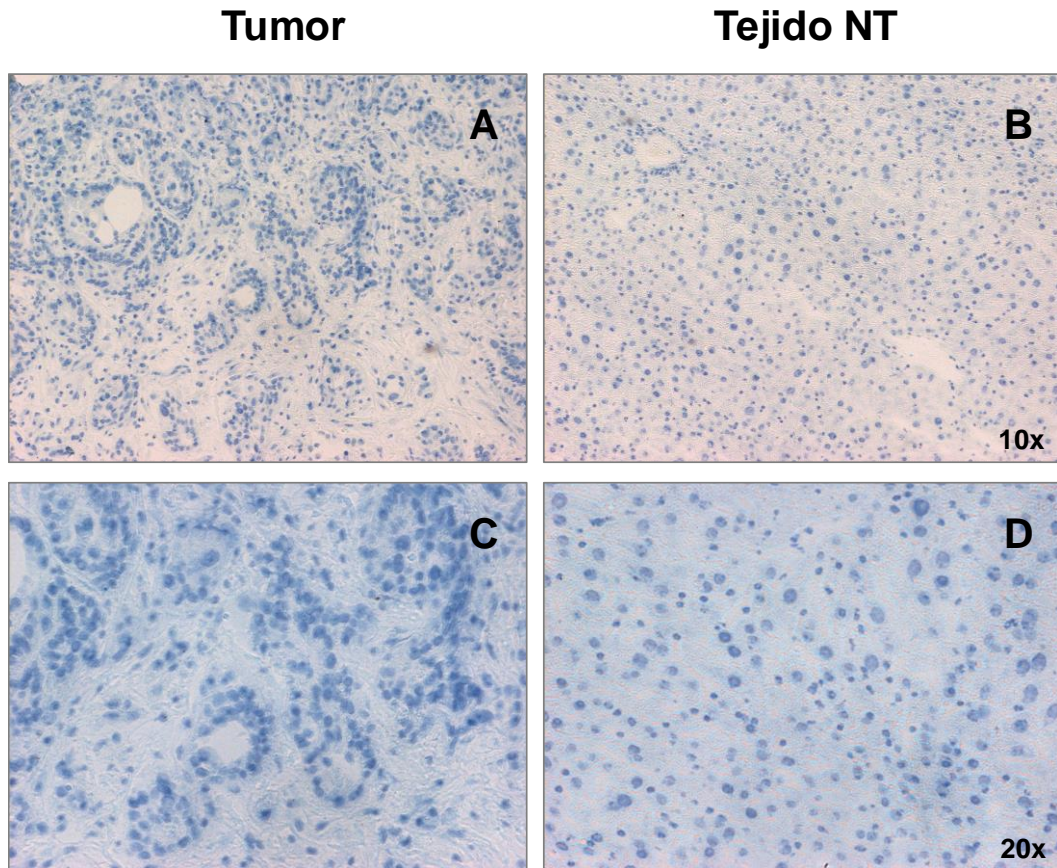
**Tabla 2.** Efecto de la terapia génica con adenovirus recombinantes y del tratamiento con sorafenib sobre los parámetros séricos indicadores de funcionalidad hepática y renal en ratones.

Parámetros bioquímicos	Control	Ad- <i>prBIRC5-Mock</i>	Ad- <i>prBIRC5-Mock + Sor</i>	Ad- <i>prBIRC5-OCT1</i>	Ad- <i>prBIRC5-OCT1 + Sor</i>
Proteína total (g/dl)	3,7±0,1	3,7±0,3	4,1±0,2	3,0±0,9	4,0±0,7
Albumina (g/dl)	1,9±0,1	1,9±0,1	2,0±0,3	1,9±0,1	1,9±0,1
Bilirrubina total (mg/dl)	0,4±0,1	0,4±0,1	0,4±0,1	0,3±0,1	0,4±0,1
AST (UI/l)	86±52	79±47	82±52	51±8	57±25
ALT (UI/l)	16±9	12±4	10±1	11±2	10±1
BUN (mg/dl)	25±4	20±1	23±1	22±4	22±3
Urea (mg/dl)	1,3±0,1	1,4±0,7	1,2±0,4	1,6±0,6	1,5±0,5
Creatinina (mg/dl)	0,5±0,1	0,4±0,1	0,4±0,1	0,4±0,1	0,6±0,1

Se utilizó suero de los ratones que recibieron adenovirus vacíos y vehículo (*Ad-prBIRC5-Mock*; n=3), adenovirus vacíos y sorafenib (*Ad-prBIRC5-Mock + Sor*; n=4), adenovirus *prBIRC5-OCT1* y vehículo (*Ad-prBIRC5-OCT1*; n=3) o adenovirus *prBIRC5-OCT1* y sorafenib (*Ad-prBIRC5-OCT1+Sor*; n=4). Los valores son media±EEM. Los valores séricos de ratones no tratados sirvieron como referencia (Control; n=5). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $p>0,05$ ). AST, aspartato-aminotransferasa; ALT, alanina-aminotransferasa; BUN, nitrógeno ureico en sangre; UI, unidades internacionales.

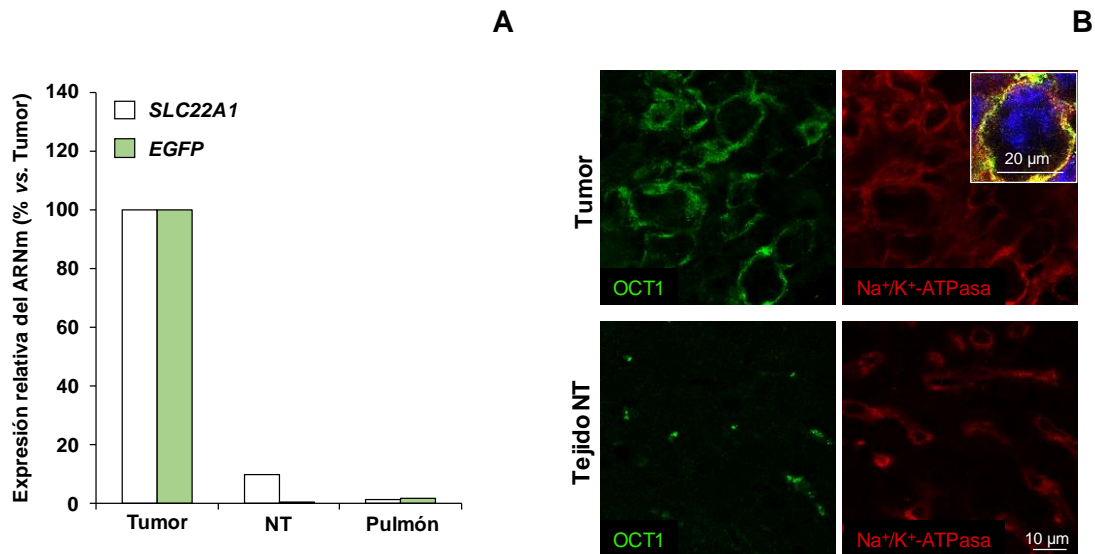
Posteriormente, se realizó un análisis histológico del tejido tumoral y no tumoral (NT) de animales que pertenecientes a grupos experimentales diferentes (Figura 29). Observamos que el tejido hepático adyacente NT de los ratones mantenía una arquitectura tisular normal propia de un hígado sano (Figuras 29B y 29D), mientras que el tumor derivado de células EGI-1 presentaba una morfología más desordenada, con presencia de estructuras ductulares (Figuras 29A y 29C) similares a las que se observan en tumores derivados de CCA humano.





**Figura 29.** Imágenes representativas de cortes histológicos de los tumores (A, C) y del tejido hepático adyacente no-tumoral (NT) (B, D) obtenidos en el modelo *in vivo* de sensibilidad al sorafenib en CCA, teñidos con hematoxilina-eosina, observados al microscopio óptico. A, B: objetivo 10x; C, D: objetivo 20x.

Con el fin de estudiar si el *prBIRC5* potenciaba la expresión de OCT1 selectivamente en el tejido tumoral se determinó el nivel de ARNm de OCT1 y del gen reportero *EGFP*, mediante RT-qPCR en el tumor, el tejido NT y como tejido sano de referencia, pulmón de un ratón representativo del grupo “Ad-*prBIRC5-OCT1*” (Figura 30A). Se comprobó que la expresión de OCT1 humano (Ct=25) y EGFP (Ct=25,1) eran elevadas en el tumor, mientras que resultaron ser muy bajas o nulas en el tejido hepático NT y en el pulmón. El análisis por inmunofluorescencia de OCT1 confirmó el resultado obtenido por RT-qPCR. Así, observamos que la administración de adenovirus *prBIRC5-OCT1* inducía la expresión de OCT1 en la membrana plasmática de las células tumorales, mientras que no se detectó señal de OCT1 en las células hepáticas del tejido NT (Figura 30B). Estos resultados mostraban que el *prBIRC5* inducía una expresión selectiva de OCT1 en el tejido tumoral y no, en el tejido hepático extratumoral ni en tejidos sanos.



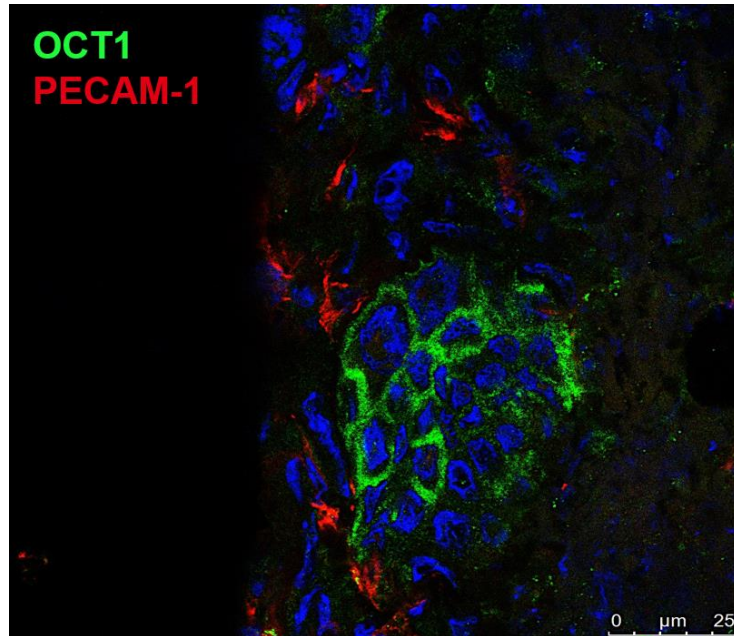
**Figura 30.** Inducción de la expresión de OCT1 en el modelo *in vivo* de sensibilidad al sorafenib en CCA. Expresión relativa de *SLC22A1* y *EGFP* determinada por RT-qPCR en el tejido tumoral (T), tejido hepático adyacente no tumoral (NT) y tejido pulmonar (control negativo) de un ratón tratado con adenovirus *prBIRC5-OCT1*. El inserto muestra una imagen representativa del hígado de un ratón con un tumor implantado ortotópicamente y tratado con adenovirus *prBIRC5-OCT1* (A). Imágenes representativas de la localización por inmunofluorescencia de OCT1 (en verde) en el tumor y en el tejido hepático adyacente no-tumoral (NT) de ratones tratados con adenovirus *prBIRC5-OCT1*. Se utilizó la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa como marcador de membrana plasmática (en rojo). Los núcleos fueron teñidos con Dapi. La imagen ampliada muestra la co-localización de OCT1 y Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa.

Como el sorafenib no solo actúa inhibiendo rutas de señalización celular que promueven la proliferación, sino que también puede bloquear la angiogénesis a través de su interacción con VEGFR, PDGFR y otras proteínas, decidimos analizar si la administración de adenovirus *prBIRC5-OCT1* afectaba a la vascularización del tumor.

Para comenzar, estudiamos por inmunofluorescencia si la administración de Ad-*prBIRC5-OCT1* también podía aumentar la expresión de OCT1 en células endoteliales. Para ello, realizamos un marcaje doble de OCT1 y de un marcador endotelial, el PECAM-1 (molécula de adhesión a célula endotelial de plaquetas), también conocido como CD31, en los tumores que se desarrollaron en el hígado de los ratones que recibieron adenovirus *prBIRC5-OCT1*. El resultado mostró que no existía co-localización entre OCT1 y PECAM-1 (Figura 31), lo cual sugería que el tratamiento viral no inducía la expresión del transportador de sorafenib en las células endoteliales.

Por otro lado, analizamos el grado de densidad vascular de los tumores del grupo “Ad-*prBIRC5-OCT1*” (Control) y “Ad-*prBIRC5-OCT1* + Sorafenib” (Sorafenib) (Figura 32). Para ello también recurrimos al marcaje con PECAM-1 por inmunofluorescencia y cuantificamos la proporción del tejido tumoral que presentaba marcaje positivo para esta proteína, lo cual fue considerado como un índice de la cantidad de vasos sanguíneos

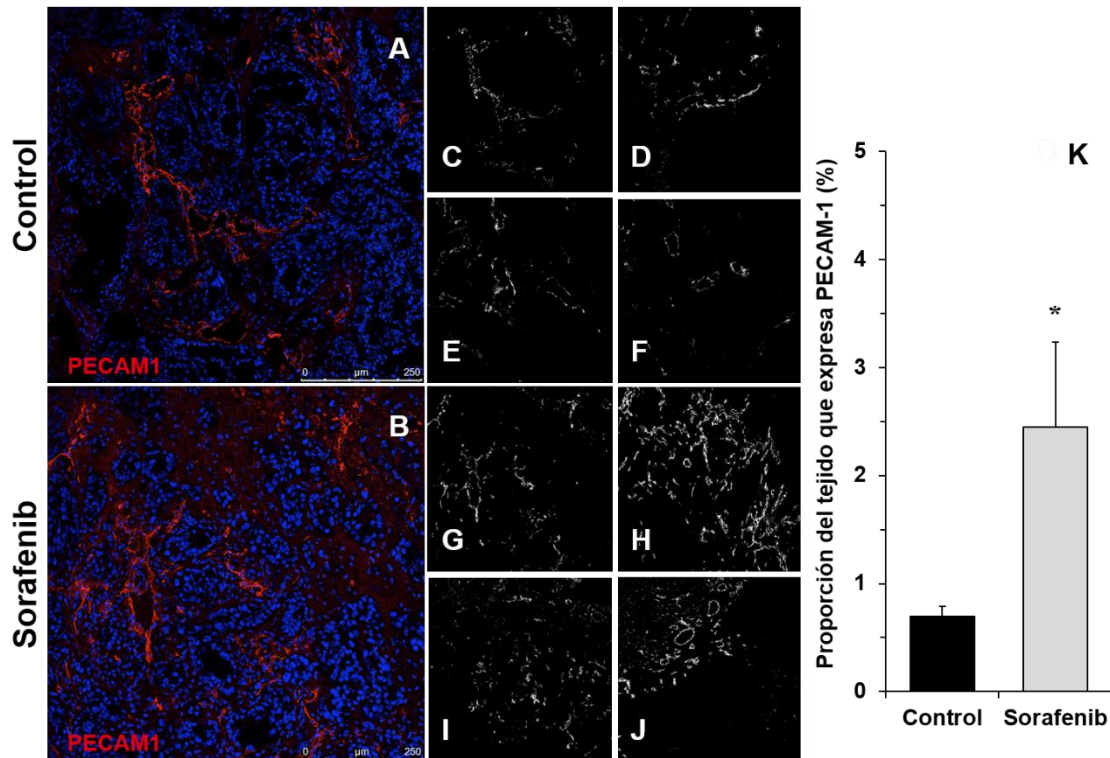
por unidad de superficie que había en los tumores. El resultado muestra que el grado de densidad vascular tumoral en los ratones que recibieron la terapia génica combinada con sorafenib era significativamente superior (aproximadamente 2,5 veces) a la del grupo que no recibió sorafenib (Figura 32).



**Figura 31.** Marcaje por inmunofluorescencia de OCT1 humana (en verde) y del marcador de células endoteliales PECAM-1 (en rojo) en tumores desarrollados en el hígado de los ratones en el modelo *in vivo* de sensibilidad al sorafenib en CCA, tras la administración de *Ad-prBIRC5-OCT1* (i.v.) cada 5 días. Se utilizó un anticuerpo secundario marcado con cianina-5 (Cy5) para detectar OCT1 y se convirtió la señal artificialmente a verde. Se tiñeron los núcleos con Dapi.

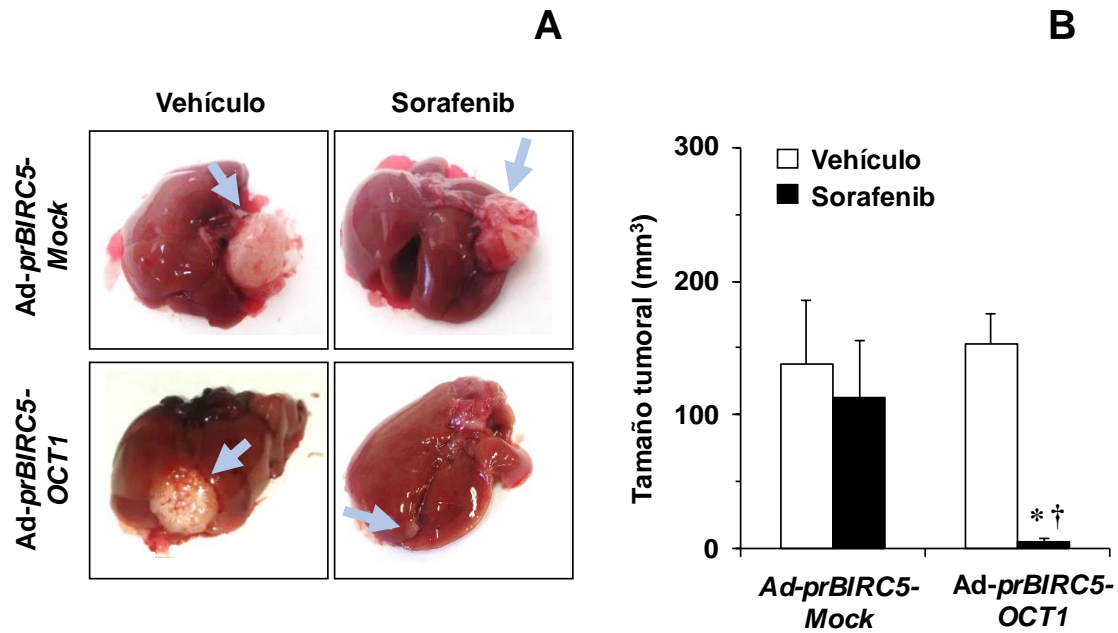
Estos resultados se interpretaron como que la potenciación del efecto antitumoral del sorafenib mediada por OCT1 en nuestro modelo *in vivo* no era debido a una inhibición de la angiogénesis en el tumor, sino que, más bien, el descenso de proliferación celular acompañado de una angiogénesis activada por las señales procedentes del tumor daba como resultado una mayor proporción de células endoteliales frente a las células tumorales.





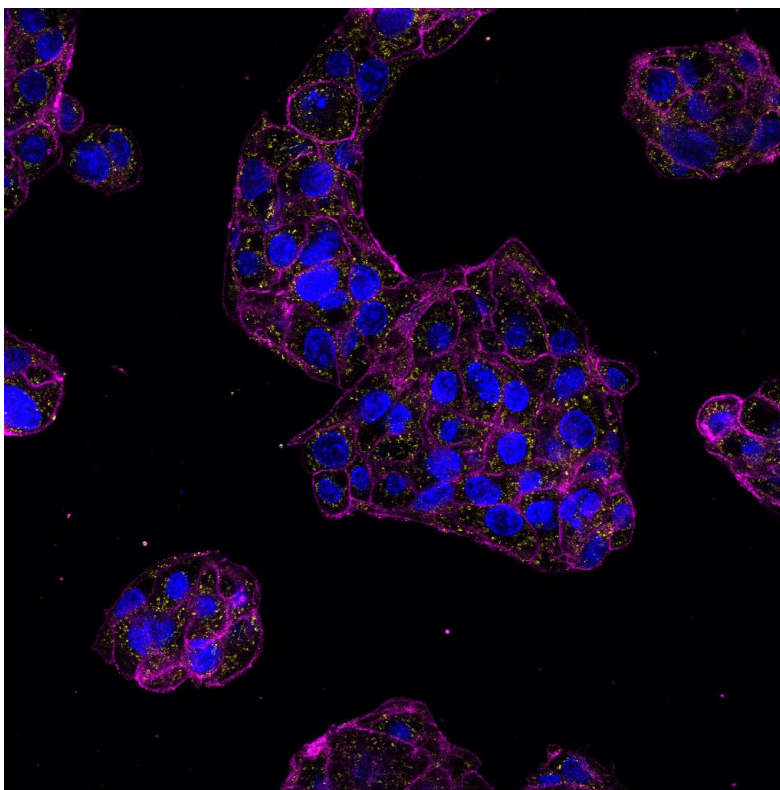
**Figura 32.** Efecto del sorafenib en la densidad vascular. Imágenes representativas de la localización por inmunofluorescencia de PECAM-1 (en rojo; A, B) en tumores desarrollados en el hígado de los ratones del modelo *in vivo* de sensibilidad al sorafenib en CCA, tras la administración de *Ad-prBIRC5-OCT1* (i.v.) cada 5 días. Los animales recibieron sorafenib (10 mg/kg p.c.) o solución salina (Control) por vía i.p. dos días por semana. Los núcleos se tiñeron con Dapi (azul). Se aisló la señal roja de PECAM-1 (C-J) para poder determinar la proporción del área marcada (K). \*,  $p < 0,05$  comparando el grupo Control (n=5) y Sorafenib (n=5).

Por último, para evaluar el efecto quimiosensibilizante de OCT1 en la respuesta al sorafenib se determinó el tamaño de los tumores al final del periodo experimental. Como se puede observar en la Figura 33A, donde se recogen imágenes representativas de los hígados de cada grupo de animales, los ratones del grupo “Control” (vehículo + *Ad-prBIRC5-Mock*), “Sorafenib” (sorafenib + *Ad-prBIRC5-Mock*) y “*Ad-prBIRC5-OCT1*” (vehículo + *Ad-prBIRC5-OCT1*) desarrollaron tumores perfectamente visibles en el hígado, mientras que los tumores encontrados en los ratones “*Ad-prBIRC5-OCT1* + sorafenib” presentaban un tamaño mucho menor y a veces casi imperceptibles. Cuando representamos el tamaño de los tumores en una gráfica se observa que la monoterapia con sorafenib no consiguió reducir el crecimiento tumoral en comparación con el grupo Control (Figura 33B). La administración de los adenovirus *prBIRC5-OCT1* solos tampoco afectó al desarrollo de tumores. Sin embargo, la terapia viral combinada con el sorafenib presentó una actividad antitumoral significativa, ya que indujo un descenso en el crecimiento de los tumores en comparación con el grupo “Control” y “Sorafenib” (Figura 33B).



**Figura 33.** Efecto de la expresión de OCT1 en la respuesta al sorafenib en un modelo *in vivo* de CCA ortotópico. Imágenes de la apariencia macroscópica del hígado de un ratón representativo de cada grupo experimental (A). Las flechas muestran el tumor desarrollado tras el implante/tratamiento. Tamaño tumoral medido al final del periodo experimental en ratones tratados con Ad-prBIRC5-Mock y vehículo (n=5), con Ad-prBIRC5-Mock y sorafenib (n=6), con Ad-prBIRC5-OCT1 y vehículo (n=4) y el grupo que recibió la terapia combinada de Ad-prBIRC5-OCT1 y sorafenib (n=7) (B). Los valores son media±EEM. \*, p<0,05, comparando Ad-prBIRC5-OCT1 tratados con sorafenib vs. solución salina. †, p<0,05, comparando Ad-prBIRC5-OCT1 vs. Ad-prBIRC5-Mock tratados ambos con sorafenib.

En conjunto, todos los resultados obtenidos en este estudio mostraron que la sobre-expresión de OCT1 humano inducida selectivamente en las células tumorales de CCA mediante adenovirus que portan la secuencia del *prBIRC5* potencia el efecto antitumoral del sorafenib *in vivo*.



## 5. Discusión



La elevada tasa de mortalidad del CCA junto con el hecho de que su incidencia haya aumentado en los últimos años ha suscitado el interés por investigar sobre temas relacionados con los dos principales factores que pueden mejorar el pronóstico de estos pacientes: la búsqueda de marcadores que permitan el diagnóstico temprano y mejorar el conocimiento de los mecanismos de quimiorresistencia. En esta Tesis Doctoral hemos trabajado en ambos aspectos, por un lado, evaluando la posibilidad de utilizar la detección del transportador de ácidos biliares ASBT como marcador selectivo del CCA frente al HCC y, por otro lado, desarrollando diferentes estrategias de terapia génica con el fin de superar la resistencia a la quimioterapia en el CCA.

La identificación de nuevas alteraciones genéticas en las rutas de señalización involucradas en la carcinogénesis del CCA, junto con el fracaso terapéutico de la quimioterapia convencional, ha suscitado un gran interés por el desarrollo de ensayos clínicos que investigan terapias dirigidas en el CCA, como es el caso del sorafenib (Simile MM *et al.* 2019).

Aunque el sorafenib es el fármaco de referencia utilizado en el tratamiento del HCC avanzado, los datos sobre la eficacia de este y otros TKIs en pacientes con CCA son controvertidos, ya que se ha descrito tanto un efecto beneficioso (LaRocca RV *et al.* 2007; Pinter M *et al.* 2011; Chakunta HR *et al.* 2013) como una escasa eficacia contra este tipo de cáncer de hígado (Bengala C *et al.* 2010; El-Khoueiry AB *et al.* 2012; Luo X *et al.* 2017), lo cual es de esperar si se tiene en cuenta la importante resistencia a múltiples fármacos (MDR) presente en el CCA. Nuestro grupo y otros han identificado varios MOCs que contribuyen a la falta de respuesta al sorafenib (Marin JJG *et al.* 2018b); entre ellos se encuentran la sobreexpresión de proteínas ABC, como MDR1, BCRP o MRP3, que reducen el contenido intracelular de los fármacos antitumorales (MOC-1b); la mayor inactivación del fármaco por un aumento en la actividad de la uridina glucuronosil transferasa 1A (MOC-2); o la aparición de variantes genéticas en las dianas intracelulares del sorafenib (MOC-3) (Rosenzweig SA 2012; Marin JJG *et al.* 2018b).

Dado que en las células tumorales la captación del sorafenib, mediada principalmente por OCT1, es un requisito esencial para que este TKI alcance sus dianas intracelulares y lleve a cabo su efecto farmacológico, los cambios en la expresión y/o actividad de este transportador pueden conducir a una respuesta deficiente al sorafenib (Herraez E *et al.* 2013). De acuerdo con los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación (Martinez-Becerra P *et al.* 2012; Lozano E *et al.* 2015), en este trabajo también se ha observado que la expresión de OCT1 disminuye significativamente en el CCA humano, al igual que ocurre en el HCC (Martinez-Becerra

P *et al.* 2012), y que esta menor expresión es independiente de la localización intra- o extrahepática del tumor. Asimismo, las líneas celulares EGI-1 y TFK-1 de eCCA y HuCCT1 de iCCA expresan niveles de ARNm de *SLC22A1* similares entre ellas y muy inferiores a los que presenta el hígado humano sano (<0,1%).

Los ensayos *in vitro* llevados a cabo en este trabajo en líneas de iCCA y eCCA han demostrado que el aumento de la expresión de OCT1 inducida de forma exógena, con vectores virales, tiene como resultado una mayor captación y sensibilidad al sorafenib. Además del efecto citostático del sorafenib se demostró que las células tratadas con sorafenib y que sobre-expresaban OCT1 tenían inhibidas las rutas de señalización sobre las que actúa este fármaco, como es el caso de la ruta de supervivencia JAK/STAT3 (Blechacz BR *et al.* 2009; Sugiyama H *et al.* 2011). Así, se observó una reducción de la forma fosforilada de STAT3 en las células que sobre-expresaban OCT1 y que fueron tratadas con sorafenib.

Estudios recientes de nuestro laboratorio indicaban que el tratamiento con el agente desmetilante DAC también conseguía restaurar la expresión de OCT1 en células de CCA humano, mejorando así la captación de sorafenib (Lozano E *et al.* 2019). Esto es debido a que el descenso de OCT1 en los tumores hepáticos está relacionado con una hipermetilación anormal del promotor de *SLC22A1* (Schaeffeler E *et al.* 2011; Lozano E *et al.* 2019). Este hecho, junto con que la DAC inhiba el crecimiento del CCA *in vivo* (Wang B *et al.* 2014), sugiere que la terapia combinada de DAC y sorafenib en pacientes con CCA podría ser útil para mejorar la respuesta a este TKI. Además, esta combinación farmacológica ha resultado tener un efecto antitumoral sinérgico en la leucemia mieloide aguda (Muppidi MR *et al.* 2015). No obstante, la generación de isoformas no funcionales por splicing aberrante y la presencia de SNPs inactivantes de OCT1 en el CCA (Herraez E *et al.* 2013) limitarían el efecto quimiosensibilizante del tratamiento con DAC al sorafenib.

Por todo ello, decidimos evaluar una estrategia terapéutica alternativa basada en inducir la expresión de OCT1 *in vivo* de forma exógena por transducción viral en el CCA. Como prueba de concepto, se han desarrollado adenovirus como vehículo para terapia génica, ya que pueden transducir diferentes tipos de células humanas con una elevada eficacia de transferencia génica (Alemany R *et al.* 1999; Curiel DT 1999) y se han propuesto para el tratamiento de enfermedades neoplásicas, incluyendo el CCA (Nagi P *et al.* 2003).

En este caso, hemos utilizado adenovirus de serotipo 5 (Ad5) porque se trata del sistema más popular en terapia viral. El hecho de que los Ad5 tengan hepatotropismo

(Waddington SN *et al.* 2008) es una ventaja para la selección de este órgano, pero podría ser un obstáculo parcial para su aplicación en tumores hepáticos como el CCA. Para superar este problema, hemos utilizado una estrategia en la que la expresión del gen de interés está controlada por un promotor con alta actividad en las células tumorales en comparación con las células sanas (Saukkonen K y Hemminki A 2004). La especificidad tumoral de diversos promotores ha sido evaluada con anterioridad, como la de los promotores de la AFP o la albúmina en HCC (Wooddell CI *et al.* 2008; Jin L *et al.* 2009), el promotor del antígeno prostático específico (PSA) para el cáncer de próstata (Lee SE *et al.* 2000) o el promotor de la ciclooxigenasa-2 en cáncer gastrointestinal (Yamamoto M *et al.* 2001).

La survivina (*BIRC5*) es un miembro de la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis que intervienen en el control de la progresión mitótica y en la prevención de la muerte celular. Estudios anteriores han demostrado que la región promotora *prBIRC5* puede ser de gran utilidad en terapias dirigidas a tumores (Zhu ZB *et al.* 2005; Shepelev MV *et al.* 2016), incluso para el CCA (Zhu ZB *et al.* 2006), puesto que la expresión de *BIRC5* es muy elevada en distintos tipos de células cancerosas, mientras que no se expresa en células diferenciadas de tejidos sanos, excepto en el timo, placenta, células madre CD43<sup>+</sup> y células epiteliales del colon (Mita AC *et al.* 2008). En esta Tesis Doctoral se ha puesto de manifiesto que la actividad transcripcional del *prBIRC5* es muy potente, tan alta como la que presenta el promotor constitutivo *prCMV*. Además, la expresión de survivina en las células EGI-1 y TFK-1 de CCA es significativamente mayor que en los NHCs, a nivel de ARNm, o que en hígado sano, a nivel de proteína, lo cual explicaría la mayor actividad transcripcional del *prBIRC5*. Asimismo, en el modelo experimental de xenotrasplante en el hígado de CCA se demostró la selectividad de la construcción *prBIRC5-OCT1* empleada en el tejido tumoral, observándose que OCT1 se localizaba correctamente en la membrana plasmática de las células tumorales y no en el parénquima hepático de los ratones. De hecho, un estudio previo en el que utilizaron una variante más corta del *prBIRC5* humano (-230 a +30 pb), había demostrado que la actividad de este promotor era significativamente inferior que el *prCMV* en el tejido hepático no tumoral de ratones 48 h después de haber recibido una dosis intravenosa de adenovirus portadores de estas secuencias promotoras (Zhu ZB *et al.* 2004).

Como consecuencia de la transducción con los adenovirus *prBIRC5-OCT1*, la sobre-expresión del transportador OCT1 en las células tumorales potenció marcadamente el efecto antitumoral del sorafenib. Concretamente, se observó que el tamaño de los tumores de tipo colangiolar que se desarrollaban en el hígado de los ratones era significativamente menor en los animales que recibían la terapia combinada



de sorafenib y adenovirus portadores de a ORF de OCT1 que en los ratones tratados solamente con sorafenib. Además, el crecimiento tumoral fue similar en los animales control y los que recibieron sorafenib, lo cual ponía de manifiesto que en nuestro modelo animal de CCA se refleja la marcada quimiorresistencia que caracteriza este tipo de tumor.

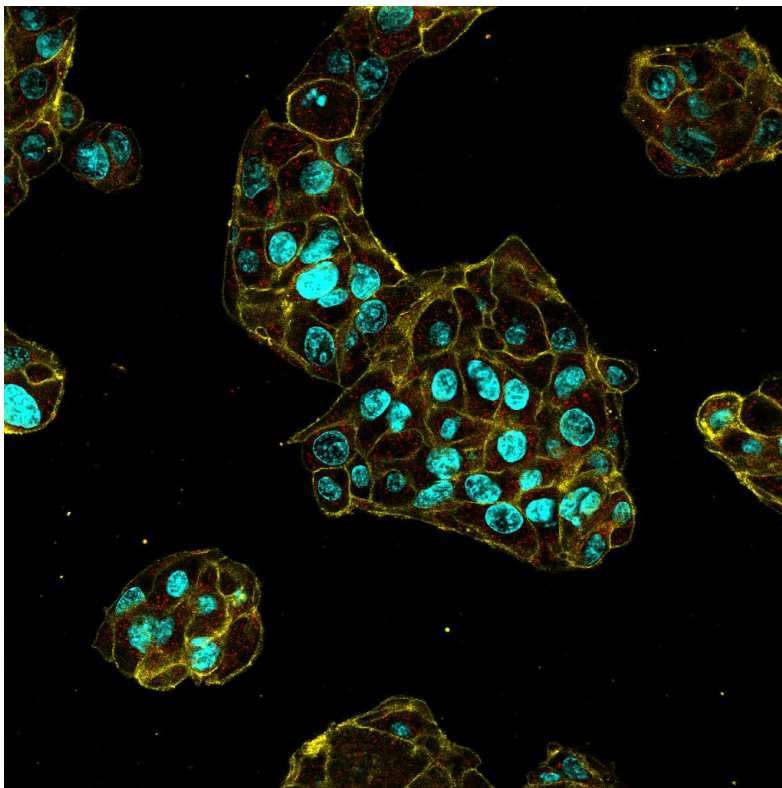
Por otro lado, la inhibición del crecimiento tumoral mediada por el sorafenib en los ratones tratados con los adenovirus portadores de OCT1 no estaba acompañada del bloqueo de la angiogénesis que ha sido observado en otros trabajos tras un tratamiento con sorafenib (Sugiyama H *et al.* 2011). La falta de efecto anti-angiogénico podía deberse a que los vectores adenovirales utilizados sobre-expresaban el transportador OCT1 solo en las células tumorales y no en las endoteliales, no viéndose potenciada, por tanto, la entrada del fármaco a las células formadoras de nuevos vasos sanguíneos. Así, en nuestro modelo experimental *in vivo*, encontramos un aumento en la densidad de vasos sanguíneos en la región tumoral de los ratones que recibieron adenovirus *prBIRC5-OCT1* y sorafenib, en comparación con los tratados con la combinación de dichos vectores virales y solución salina. Este inesperado resultado podría explicarse porque ante una potenciación del efecto antitumoral del sorafenib por el OCT1, la proliferación de las células tumorales disminuiría, lo cual acompañado de una persistente activación de señales pro-angiogénicas, resultaría en una mayor proporción de células endoteliales en el tejido tumoral.

En resumen, la restauración de la expresión de OCT1 en el CCA facilitó la entrada del sorafenib al interior de las células tumorales y potenció su efecto anti-proliferativo *in vitro* e *in vivo*.









## 6. Conclusiones



**CONCLUSIÓN PRIMERA:**

En CCA la expresión del transportador de ácidos biliares ASBT es mayor que en el tejido adyacente no tumoral, mientras que en HCC la expresión de esta proteína es muy baja, por lo que la inmunodetección de ASBT junto al marcador de tejido colangiolar CK-7 podría ser de gran utilidad en el diagnóstico diferencial del CCA y el HCC.

**CONCLUSIÓN SEGUNDA:**

La expresión mediante terapia génica de OCT1 inducida específicamente en el tejido tumoral, pero no en el tejido hepático adyacente no tumoral ni otros tejidos sanos, constituye, al menos en modelos animales, una estrategia eficaz para potenciar la respuesta antiproliferativa de las células de CCA al sorafenib.

**CONCLUSIÓN TERCERA:**

El factor de transcripción SOX17 está implicado en la quimiorresistencia del CCA, aumentando la sensibilidad de las células a fármacos antitumorales mediante la disminución de la expresión y actividad transportadora de las proteínas de exportación de fármacos MRP3 (gen *ABCC3*) y BCRP (gen *ABCG2*), lo cual favorece la acumulación de los agentes activos dentro de las células del tumor y potencia su actividad farmacológica.

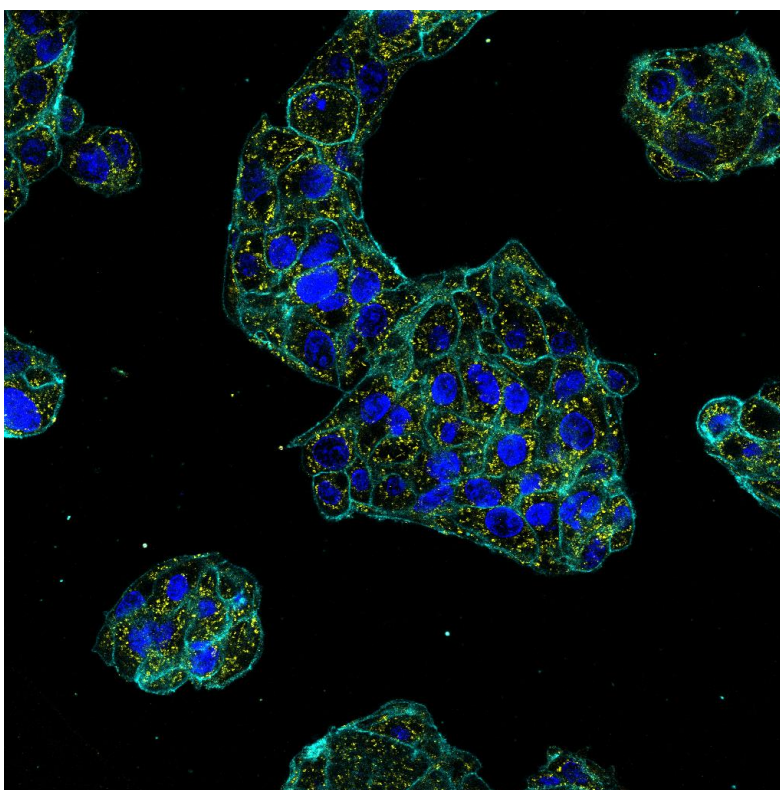
**CONCLUSIÓN CUARTA:**

La inhibición de la expresión de MRP3 y BCRP mediada por SOX17 puede deberse a una interacción doble directa e indirecta de este factor de transcripción con las regiones promotoras de los genes *ABCC3* y *ABCG2*. Además, la actividad transcripcional del promotor de *ABCC3* también está regulada por otros miembros de la familia SOX, como SOX2 y SOX9, que presentan acciones antagónicas con SOX17 y cuya expresión en CCA, a diferencia de la de SOX17, se encuentra muy elevada.

**CONCLUSIÓN QUINTA:**

El restablecimiento de la expresión de SOX17 en el CCA mediante terapia génica constituye una aproximación terapéutica eficaz al presentar un efecto doble debido a que SOX17 actúa como supresor tumoral y como potenciador de la respuesta farmacológica selectiva a agentes quimioterapéuticos que son sustratos de MRP3, como es el caso del 5-FU.





## 7. Bibliografía





- Abou-Alfa GK, Meyer T, Cheng AL, El-Khoueiry AB, Rimassa L, *et al.* (2018). Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* **379**(1): 54-63.
- Adeva J, Sangro B, Salati M, Edeline J, La Casta A, *et al.* (2019). Medical treatment for cholangiocarcinoma. *Liver Int* **39 Suppl 1**: 123-142.
- Al-Abdulla R, Lozano E, Macias RIR, Monte MJ, Briz O, *et al.* (2019). Epigenetic events involved in organic cation transporter 1-dependent impaired response of hepatocellular carcinoma to sorafenib. *Br J Pharmacol* **176**(6): 787-800.
- Alemanly R, Gomez-Manzano C, Balague C, Yung WK, Curiel DT, *et al.* (1999). Gene therapy for gliomas: molecular targets, adenoviral vectors, and oncolytic adenoviruses. *Exp Cell Res* **252**(1): 1-12.
- Alpini G, Glaser S, Baiocchi L, Francis H, Xia X, *et al.* (2005). Secretin activation of the apical Na<sup>+</sup>-dependent bile acid transporter is associated with cholehepatic shunting in rats. *Hepatology* **41**(5): 1037-1045.
- Alpini G, Glaser SS, Rodgers R, Phinizy JL, Robertson WE, *et al.* (1997). Functional expression of the apical Na<sup>+</sup>-dependent bile acid transporter in large but not small rat cholangiocytes. *Gastroenterology* **113**(5): 1734-1740.
- Alvaro D (2009). Serum and bile biomarkers for cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* **25**(3): 279-284.
- Andersen JB, Spee B, Blechacz BR, Avital I, Komuta M, *et al.* (2012). Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors. *Gastroenterology* **142**(4): 1021-1031 e1015.
- Andre T, Reyes-Vidal JM, Fartoux L, Ross P, Leslie M, *et al.* (2008). Gemcitabine and oxaliplatin in advanced biliary tract carcinoma: a phase II study. *Br J Cancer* **99**(6): 862-867.
- Andresen K, Boberg KM, Vedeld HM, Honne H, Jebsen P, *et al.* (2015). Four DNA methylation biomarkers in biliary brush samples accurately identify the presence of cholangiocarcinoma. *Hepatology* **61**(5): 1651-1659.
- Anwer MS, Stieger B (2014). Sodium-dependent bile salt transporters of the SLC10A transporter family: more than solute transporters. *Pflugers Arch* **466**(1): 77-89.
- Aoki K, Takayasu K, Kawano T, Muramatsu Y, Moriyama N, *et al.* (1993). Combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma: clinical features and computed tomographic findings. *Hepatology* **18**(5): 1090-1095.
- Aoki S, Mizuma M, Takahashi Y, Haji Y, Okada R, *et al.* (2016). Aberrant activation of Notch signaling in extrahepatic cholangiocarcinoma: clinicopathological features and therapeutic potential for cancer stem cell-like properties. *BMC Cancer* **16**(1): 854.

- Arbelaiz A, Azkargorta M, Krawczyk M, Santos-Laso A, Lapitz A, *et al.* (2017). Serum extracellular vesicles contain protein biomarkers for primary sclerosing cholangitis and cholangiocarcinoma. *Hepatology* **66**(4): 1125-1143.
- Asensio M (2015). Desarrollo de una estrategia de terapia génica basada en el uso de vectores virales para superar la quimiorresistencia tumoral. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Salamanca.
- Ballester MR, Monte MJ, Briz O, Jimenez F, Gonzalez-San Martin F, *et al.* (2006). Expression of transporters potentially involved in the targeting of cytostatic bile acid derivatives to colon cancer and polyps. *Biochem Pharmacol* **72**(6): 729-738.
- Banales JM, Cardinale V, Carpino G, Marzioni M, Andersen JB, *et al.* (2016). Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **13**(5): 261-280.
- Banales JM, Inarrairaegui M, Arbelaiz A, Milkiewicz P, Muntane J, *et al.* (2018). Serum Metabolites as Diagnostic Biomarkers for Cholangiocarcinoma, Hepatocellular Carcinoma, and Primary Sclerosing Cholangitis. *Hepatology*. In press.
- Benedetti A, Bassotti C, Rapino K, Marucci L, Jezequel AM (1996). A morphometric study of the epithelium lining the rat intrahepatic biliary tree. *J Hepatol* **24**(3): 335-342.
- Bengala C, Bertolini F, Malavasi N, Boni C, Aitini E, *et al.* (2010). Sorafenib in patients with advanced biliary tract carcinoma: a phase II trial. *Br J Cancer* **102**(1): 68-72.
- Benson AB, 3rd (2007). Epidemiology, disease progression, and economic burden of colorectal cancer. *J Manag Care Pharm* **13**(6 Suppl C): S5-18.
- Bhargava P, Jani CR, Savarese DM, O'Donnell JL, Stuart KE, *et al.* (2003). Gemcitabine and irinotecan in locally advanced or metastatic biliary cancer: preliminary report. *Oncology (Williston Park)* **17**(9 Suppl 8): 23-26.
- Bhat BG, Rapp SR, Beaudry JA, Napawan N, Butteiger DN, *et al.* (2003). Inhibition of ileal bile acid transport and reduced atherosclerosis in apoE<sup>-/-</sup> mice by SC-435. *J Lipid Res* **44**(9): 1614-1621.
- Billington S, Ray AS, Salphati L, Xiao G, Chu X, *et al.* (2018). Transporter Expression in Noncancerous and Cancerous Liver Tissue from Donors with Hepatocellular Carcinoma and Chronic Hepatitis C Infection Quantified by LC-MS/MS Proteomics. *Drug Metab Dispos* **46**(2): 189-196.
- Blechacz BR, Gores GJ (2008). Cholangiocarcinoma. *Clin Liver Dis* **12**(1): 131-150, ix.
- Blechacz BR, Smoot RL, Bronk SF, Werneburg NW, Sirica AE, *et al.* (2009). Sorafenib inhibits signal transducer and activator of transcription-3 signaling in

- cholangiocarcinoma cells by activating the phosphatase shatterproof 2. *Hepatology* **50**(6): 1861-1870.
- Bledsoe JR, Shinagare SA, Deshpande V (2015). Difficult Diagnostic Problems in Pancreatobiliary Neoplasia. *Arch Pathol Lab Med* **139**(7): 848-857.
- Boehm LM, Jayakrishnan TT, Miura JT, Zacharias AJ, Johnston FM, *et al.* (2015). Comparative effectiveness of hepatic artery based therapies for unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Surg Oncol* **111**(2): 213-220.
- Bolondi L, Craxi A, Trevisani F, Daniele B, Di Costanzo GG, *et al.* (2015). Refining sorafenib therapy: lessons from clinical practice. *Future Oncol* **11**(3): 449-465.
- Boonjaraspinyo S, Boonmars T, Wu Z, Loilome W, Sithithaworn P, *et al.* (2012). Platelet-derived growth factor may be a potential diagnostic and prognostic marker for cholangiocarcinoma. *Tumour Biol* **33**(5): 1785-1802.
- Borger DR, Tanabe KK, Fan KC, Lopez HU, Fantin VR, *et al.* (2012). Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping. *Oncologist* **17**(1): 72-79.
- Boulter L, Guest RV, Kendall TJ, Wilson DH, Wojtacha D, *et al.* (2015). WNT signaling drives cholangiocarcinoma growth and can be pharmacologically inhibited. *J Clin Invest* **125**(3): 1269-1285.
- Bowles J, Schepers G, Koopman P (2000). Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol* **227**(2): 239-255.
- Briz O, Perez MJ, Marin JJ (2017). Further understanding of mechanisms involved in liver cancer chemoresistance. *Hepatoma Research* **3**: 22-26.
- Bruix J, Sherman M (2011). Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* **53**(3): 1020-1022.
- Bruix J, Tak WY, Gasbarrini A, Santoro A, Colombo M, *et al.* (2013). Regorafenib as second-line therapy for intermediate or advanced hepatocellular carcinoma: multicentre, open-label, phase II safety study. *Eur J Cancer* **49**(16): 3412-3419.
- Bunthot S, Obchoei S, Kraiklang R, Pirojkul C, Wongkham S, *et al.* (2012). Overexpression of claudin-4 in cholangiocarcinoma tissues and its possible role in tumor metastasis. *Asian Pac J Cancer Prev* **13 Suppl**: 71-76.
- Cao L, Duchrow M, Windhovel U, Kujath P, Bruch HP, *et al.* (1998). Expression of MDR1 mRNA and encoding P-glycoprotein in archival formalin-fixed paraffin-embedded gall bladder cancer tissues. *Eur J Cancer* **34**(10): 1612-1617.
- Cardinale V, Carpino G, Reid L, Gaudio E, Alvaro D (2012). Multiple cells of origin in cholangiocarcinoma underlie biological, epidemiological and clinical heterogeneity. *World J Gastrointest Oncol* **4**(5): 94-102.

- Carlomagno F, Anaganti S, Guida T, Salvatore G, Troncone G, *et al.* (2006). BAY 43-9006 inhibition of oncogenic RET mutants. *J Natl Cancer Inst* **98**(5): 326-334.
- Carnicero I (2015). Utilidad de la proteína ASBT en el diagnóstico de colangiocarcinoma. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Salamanca.
- Cirqueira CS, Felipe-Silva AS, Wakamatsu A, Marins LV, Rocha EC, *et al.* (2018). Immunohistochemical Assessment of the Expression of Biliary Transportation Proteins MRP2 and MRP3 in Hepatocellular Carcinoma and in Cholangiocarcinoma. *Pathol Oncol Res.* In press.
- Corada M, Orsenigo F, Morini MF, Pitulescu ME, Bhat G, *et al.* (2013). Sox17 is indispensable for acquisition and maintenance of arterial identity. *Nat Commun* **4**: 2609.
- Craddock AL, Love MW, Daniel RW, Kirby LC, Walters HC, *et al.* (1998). Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am J Physiol* **274**(1): G157-169.
- Cui Y, Konig J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, *et al.* (1999). Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol* **55**(5): 929-937.
- Curiel DT (1999). Strategies to adapt adenoviral vectors for targeted delivery. *Ann N Y Acad Sci* **886**: 158-171.
- Chakunta HR, Sunderkrishnan R, Kaplan MA, Mostofi R (2013). Cholangiocarcinoma: treatment with sorafenib extended life expectancy to greater than four years. *J Gastrointest Oncol* **4**(4): E30-32.
- Chandra P, Brouwer KL (2004). The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts. *Pharm Res* **21**(5): 719-735.
- Chen F, Shyu AB, Shneider BL (2011). Hu antigen R and tristetraprolin: counter-regulators of rat apical sodium-dependent bile acid transporter by way of effects on messenger RNA stability. *Hepatology* **54**(4): 1371-1378.
- Chen HL, Chew LJ, Packer RJ, Gallo V (2013). Modulation of the Wnt/beta-catenin pathway in human oligodendroglioma cells by Sox17 regulates proliferation and differentiation. *Cancer Lett* **335**(2): 361-371.
- Chen X, Xie R, Gu P, Huang M, Han J, *et al.* (2019). Long Noncoding RNA LBCS Inhibits Self-Renewal and Chemoresistance of Bladder Cancer Stem Cells through Epigenetic Silencing of SOX2. *Clin Cancer Res* **25**(4): 1389-1403.
- Chew LJ, Shen W, Ming X, Senatorov VV, Jr., Chen HL, *et al.* (2011). SRY-box containing gene 17 regulates the Wnt/beta-catenin signaling pathway in oligodendrocyte progenitor cells. *J Neurosci* **31**(39): 13921-13935.

- Choe C, Kim H, Min S, Park S, Seo J, *et al.* (2018). SOX2, a stemness gene, induces progression of NSCLC A549 cells toward anchorage-independent growth and chemoresistance to vinblastine. *Onco Targets Ther* **11**: 6197-6207.
- Chothe PP, Czuba LC, Moore RH, Swaan PW (2018). Human bile acid transporter ASBT (SLC10A2) forms functional non-covalent homodimers and higher order oligomers. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1860**(3): 645-653.
- Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, *et al.* (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* **462**(7274): 739-744.
- Darwish Murad S, Kim WR, Therneau T, Gores GJ, Rosen CB, *et al.* (2012). Predictors of pretransplant dropout and posttransplant recurrence in patients with perihilar cholangiocarcinoma. *Hepatology* **56**(3): 972-981.
- Dawson PA, Haywood J, Craddock AL, Wilson M, Tietjen M, *et al.* (2003). Targeted deletion of the ileal bile acid transporter eliminates enterohepatic cycling of bile acids in mice. *J Biol Chem* **278**(36): 33920-33927.
- Dawson PA, Oelkers P (1995). Bile acid transporters. *Curr Opin Lipidol* **6**(2): 109-114.
- Dominguez MF, Macias RI, Izco-Basurko I, de La Fuente A, Pascual MJ, *et al.* (2001). Low in vivo toxicity of a novel cisplatin-ursodeoxycholic derivative (Bamet-UD2) with enhanced cytostatic activity versus liver tumors. *J Pharmacol Exp Ther* **297**(3): 1106-1112.
- Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, *et al.* (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26): 15665-15670.
- Drozdik M, Groer C, Penski J, Lapczuk J, Ostrowski M, *et al.* (2014). Protein abundance of clinically relevant multidrug transporters along the entire length of the human intestine. *Mol Pharm* **11**(10): 3547-3555.
- Du YC, Oshima H, Oguma K, Kitamura T, Itadani H, *et al.* (2009). Induction and down-regulation of Sox17 and its possible roles during the course of gastrointestinal tumorigenesis. *Gastroenterology* **137**(4): 1346-1357.
- Dvorak K, Watts GS, Ramsey L, Holubec H, Payne CM, *et al.* (2009). Expression of bile acid transporting proteins in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* **104**(2): 302-309.
- El-Khoueiry AB, Rankin C, Siegel AB, Iqbal S, Gong IY, *et al.* (2014). S0941: a phase 2 SWOG study of sorafenib and erlotinib in patients with advanced gallbladder carcinoma or cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* **110**(4): 882-887.
- El-Khoueiry AB, Rankin CJ, Ben-Josef E, Lenz HJ, Gold PJ, *et al.* (2012). SWOG 0514: a phase II study of sorafenib in patients with unresectable or metastatic gallbladder carcinoma and cholangiocarcinoma. *Invest New Drugs* **30**(4): 1646-1651.

- El-Khoueiry AB, Sangro B, Yau T, Crocenzi TS, Kudo M, *et al.* (2017). Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet* **389**(10088): 2492-2502.
- Engert S, Burtscher I, Liao WP, Dulev S, Schotta G, *et al.* (2013). Wnt/beta-catenin signalling regulates Sox17 expression and is essential for organizer and endoderm formation in the mouse. *Development* **140**(15): 3128-3138.
- Fahrmayr C, Fromm MF, König J (2010). Hepatic OATP and OCT uptake transporters: their role for drug-drug interactions and pharmacogenetic aspects. *Drug Metab Rev* **42**(3): 380-401.
- Fan B, Mellinghoff IK, Wen PY, Lowery MA, Goyal L, *et al.* (2019). Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of ivosidenib, an oral, targeted inhibitor of mutant IDH1, in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*. In press.
- Farhat MH, Shamseddine AI, Tawil AN, Berjawi G, Sidani C, *et al.* (2008). Prognostic factors in patients with advanced cholangiocarcinoma: role of surgery, chemotherapy and body mass index. *World J Gastroenterol* **14**(20): 3224-3230.
- Farshidfar F, Zheng S, Gingras MC, Newton Y, Shih J, *et al.* (2017). Integrative Genomic Analysis of Cholangiocarcinoma Identifies Distinct IDH-Mutant Molecular Profiles. *Cell Rep* **18**(11): 2780-2794.
- Fitzmaurice C, Akinyemiju TF, Al Lami FH, Alam T, Alizadeh-Navaei R, *et al.* (2018). Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol* **4**(11): 1553-1568.
- Flahaut M, Meier R, Coulon A, Nardou KA, Niggli FK, *et al.* (2009). The Wnt receptor FZD1 mediates chemoresistance in neuroblastoma through activation of the Wnt/beta-catenin pathway. *Oncogene* **28**(23): 2245-2256.
- Fornier A, Vidili G, Rengo M, Bujanda L, Ponz-Sarvisé M, *et al.* (2019). Clinical presentation, diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Liver Int* **39 Suppl 1**: 98-107.
- Fouassier L, Marzioni M, Afonso MB, Dooley S, Gaston K, *et al.* (2019). Signalling networks in cholangiocarcinoma: Molecular pathogenesis, targeted therapies and drug resistance. *Liver Int* **39 Suppl 1**: 43-62.
- Garros-Regulez L, Aldaz P, Arrizabalaga O, Moncho-Amor V, Carrasco-Garcia E, *et al.* (2016). mTOR inhibition decreases SOX2-SOX9 mediated glioma stem cell activity and temozolomide resistance. *Expert Opin Ther Targets* **20**(4): 393-405.
- Gavrilescu LC, Van Etten RA (2007). Production of replication-defective retrovirus by transient transfection of 293T cells. *J Vis Exp*. In press.(10): 550.



- Geier A, Macias RI, Bettinger D, Weiss J, Bantel H, *et al.* (2017). The lack of the organic cation transporter OCT1 at the plasma membrane of tumor cells precludes a positive response to sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **8**(9): 15846-15857.
- Ghouri YA, Mian I, Blechacz B (2015). Cancer review: Cholangiocarcinoma. *J Carcinog* **14**: 1.
- Gimelli S, Caridi G, Beri S, McCracken K, Bocciardi R, *et al.* (2010). Mutations in SOX17 are associated with congenital anomalies of the kidney and the urinary tract. *Hum Mutat* **31**(12): 1352-1359.
- Goeppert B, Konermann C, Schmidt CR, Bogatyrova O, Geiselhart L, *et al.* (2014). Global alterations of DNA methylation in cholangiocarcinoma target the Wnt signaling pathway. *Hepatology* **59**(2): 544-554.
- Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbach U, *et al.* (1997). Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol* **16**(7): 871-881.
- Gordillo M, Evans T, Gouon-Evans V (2015). Orchestrating liver development. *Development* **142**(12): 2094-2108.
- Gores GJ (2000). Early detection and treatment of cholangiocarcinoma. *Liver Transpl* **6**(6 Suppl 2): S30-34.
- Grant CE, Valdimarsson G, Hipfner DR, Almquist KC, Cole SP, *et al.* (1994). Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res* **54**(2): 357-361.
- Grimm D, Bauer J, Wise P, Kruger M, Simonsen U, *et al.* (2019). The role of SOX family members in solid tumours and metastasis. *Semin Cancer Biol.* In press.
- Grimm D, Lieb J, Weyer V, Vollmar J, Darstein F, *et al.* (2016). Organic Cation Transporter 1 (OCT1) mRNA expression in hepatocellular carcinoma as a biomarker for sorafenib treatment. *BMC Cancer* **16**: 94.
- Gruenberger B, Schueller J, Heubrandtner U, Wrba F, Tamandl D, *et al.* (2010). Cetuximab, gemcitabine, and oxaliplatin in patients with unresectable advanced or metastatic biliary tract cancer: a phase 2 study. *Lancet Oncol* **11**(12): 1142-1148.
- Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, *et al.* (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* **346**(6281): 245-250.
- Gupta S, Wulf G, Henjakovic M, Koepsell H, Burckhardt G, *et al.* (2012). Human organic cation transporter 1 is expressed in lymphoma cells and increases susceptibility to irinotecan and paclitaxel. *J Pharmacol Exp Ther* **341**(1): 16-23.

- Hagenbuch B, Meier PJ (1994). Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter. *J Clin Invest* **93**(3): 1326-1331.
- Hall JE (2016). Guyton y Hall. Tratado de fisiología medica. 13ª Edición.
- Han TK, Everett RS, Proctor WR, Ng CM, Costales CL, *et al.* (2013). Organic cation transporter 1 (OCT1/mOct1) is localized in the apical membrane of Caco-2 cell monolayers and enterocytes. *Mol Pharmacol* **84**(2): 182-189.
- Harley VR, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1994). Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res* **22**(8): 1500-1501.
- Hartley JL, Temple GF, Brasch MA (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* **10**(11): 1788-1795.
- Hayer M, Bonisch H, Bruss M (1999). Molecular cloning, functional characterization and genomic organization of four alternatively spliced isoforms of the human organic cation transporter 1 (hOCT1/SLC22A1). *Ann Hum Genet* **63**(Pt 6): 473-482.
- He J, Shi J, Zhang K, Xue J, Li J, *et al.* (2017). Sox2 inhibits Wnt-beta-catenin signaling and metastatic potency of cisplatin-resistant lung adenocarcinoma cells. *Mol Med Rep* **15**(4): 1693-1701.
- Herraez E, Lozano E, Macias RI, Vaquero J, Bujanda L, *et al.* (2013). Expression of SLC22A1 variants may affect the response of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma to sorafenib. *Hepatology* **58**(3): 1065-1073.
- Higaki J, Matsui T, Ikenishi Y, Hirata M (1989). Glutathione conjugation of synthetic steroids in isolated rat hepatocytes. *Steroids* **54**(3): 345-354.
- Higashiyama H, Uemura M, Igarashi H, Kurohmaru M, Kanai-Azuma M, *et al.* (2018). Anatomy and development of the extrahepatic biliary system in mouse and rat: a perspective on the evolutionary loss of the gallbladder. *J Anat* **232**(1): 134-145.
- Hsu C, Huang CL, Hsu HC, Lee PH, Wang SJ, *et al.* (2002). HER-2/neu overexpression is rare in hepatocellular carcinoma and not predictive of anti-HER-2/neu regulation of cell growth and chemosensitivity. *Cancer* **94**(2): 415-420.
- Huang Y, Anderle P, Bussey KJ, Barbacioru C, Shankavaram U, *et al.* (2004). Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res* **64**(12): 4294-4301.
- Huether A, Hopfner M, Baradari V, Schuppan D, Scherubl H (2007). Sorafenib alone or as combination therapy for growth control of cholangiocarcinoma. *Biochem Pharmacol* **73**(9): 1308-1317.
- Hyrsova L, Smutny T, Trejtnar F, Pavek P (2016). Expression of organic cation transporter 1 (OCT1): unique patterns of indirect regulation by nuclear receptors and hepatospecific gene regulation. *Drug Metab Rev* **48**(2): 139-158.



- Ishii M, Vroman B, LaRusso NF (1989). Isolation and morphologic characterization of bile duct epithelial cells from normal rat liver. *Gastroenterology* **97**(5): 1236-1247.
- Isomoto H, Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Guicciardi ME, *et al.* (2005). Interleukin 6 upregulates myeloid cell leukemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* **42**(6): 1329-1338.
- Iyer RV, Pokuri VK, Groman A, Ma WW, Malhotra U, *et al.* (2018). A Multicenter Phase II Study of Gemcitabine, Capecitabine, and Bevacizumab for Locally Advanced or Metastatic Biliary Tract Cancer. *Am J Clin Oncol* **41**(7): 649-655.
- Jeon HM, Sohn YW, Oh SY, Kim SH, Beck S, *et al.* (2011). ID4 imparts chemoresistance and cancer stemness to glioma cells by derepressing miR-9\*-mediated suppression of SOX2. *Cancer Res* **71**(9): 3410-3421.
- Jetter A, Kullak-Ublick GA (2019). Drugs and hepatic transporters: A review. *Pharmacol Res.* In press.
- Jia Y, Yang Y, Liu S, Herman JG, Lu F, *et al.* (2010). SOX17 antagonizes WNT/beta-catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *Epigenetics* **5**(8): 743-749.
- Jin L, Long L, Green MA, Spear BT (2009). The alpha-fetoprotein enhancer region activates the albumin and alpha-fetoprotein promoters during liver development. *Dev Biol* **336**(2): 294-300.
- Jonatan D, Spence JR, Method AM, Kofron M, Sinagoga K, *et al.* (2014). Sox17 regulates insulin secretion in the normal and pathologic mouse beta cell. *PLoS One* **9**(8): e104675.
- Jonker JW, Schinkel AH (2004). Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J Pharmacol Exp Ther* **308**(1): 2-9.
- Julich-Haertel H, Urban SK, Krawczyk M, Willms A, Jankowski K, *et al.* (2017). Cancer-associated circulating large extracellular vesicles in cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **67**(2): 282-292.
- Jung D, Fantin AC, Scheurer U, Fried M, Kullak-Ublick GA (2004). Human ileal bile acid transporter gene ASBT (SLC10A2) is transactivated by the glucocorticoid receptor. *Gut* **53**(1): 78-84.
- Kanai-Azuma M, Kanai Y, Gad JM, Tajima Y, Taya C, *et al.* (2002). Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Development* **129**(10): 2367-2379.
- Kang KW, Im YB, Go WJ, Han HK (2009). C-myc amplification altered the gene expression of ABC- and SLC-transporters in human breast epithelial cells. *Mol Pharm* **6**(2): 627-633.

- Katoh M (2002). Molecular cloning and characterization of human SOX17. *Int J Mol Med* **9**(2): 153-157.
- Katoh M (2005). WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol Rep* **14**(6): 1583-1588.
- Keller T, Egenberger B, Gorboulev V, Bernhard F, Uzelac Z, *et al.* (2011). The large extracellular loop of organic cation transporter 1 influences substrate affinity and is pivotal for oligomerization. *J Biol Chem* **286**(43): 37874-37886.
- Keller T, Gorboulev V, Mueller TD, Dotsch V, Bernhard F, *et al.* (2019). Rat Organic Cation Transporter 1 Contains Three Binding Sites for Substrate 1-Methyl-4-phenylpyridinium per Monomer. *Mol Pharmacol* **95**(2): 169-182.
- Khan SA, Tavolari S, Brandi G (2019). Cholangiocarcinoma: Epidemiology and risk factors. *Liver Int* **39 Suppl 1**: 19-31.
- Kim GA, Lee HC, Choe J, Kim MJ, Lee MJ, *et al.* (2017). Association between non-alcoholic fatty liver disease and cancer incidence rate. *J Hepatol*. In press.
- Kim W, Kim M, Jho EH (2013). Wnt/beta-catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem J* **450**(1): 9-21.
- Koepsell H (2011). Substrate recognition and translocation by polyspecific organic cation transporters. *Biol Chem* **392**(1-2): 95-101.
- Koepsell H, Lips K, Volk C (2007). Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res* **24**(7): 1227-1251.
- Kohn AD, Moon RT (2005). Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium* **38**(3-4): 439-446.
- Komuta M, Govaere O, Vandecaveye V, Akiba J, Van Steenberg W, *et al.* (2012). Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes. *Hepatology* **55**(6): 1876-1888.
- Kondoh H, Kamachi Y (2010). SOX-partner code for cell specification: Regulatory target selection and underlying molecular mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol* **42**(3): 391-399.
- Konstadoulakis MM, Roayaie S, Gomatos IP, Labow D, Fiel MI, *et al.* (2008). Fifteen-year, single-center experience with the surgical management of intrahepatic cholangiocarcinoma: operative results and long-term outcome. *Surgery* **143**(3): 366-374.
- Korita PV, Wakai T, Shirai Y, Matsuda Y, Sakata J, *et al.* (2010). Multidrug resistance-associated protein 2 determines the efficacy of cisplatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* **23**(4): 965-972.

- Kormish JD, Sinner D, Zorn AM (2010). Interactions between SOX factors and Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Dev Dyn* **239**(1): 56-68.
- Kudo M, Finn RS, Qin S, Han KH, Ikeda K, *et al.* (2018). Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* **391**(10126): 1163-1173.
- Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ (2004). Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* **126**(1): 322-342.
- Kuo IY, Huang YL, Lin CY, Lin CH, Chang WL, *et al.* (2019). SOX17 overexpression sensitizes chemoradiation response in esophageal cancer by transcriptional down-regulation of DNA repair and damage response genes. *J Biomed Sci* **26**(1): 20.
- Kuroda H, Kutner RH, Bazan NG, Reiser J (2009). Simplified lentivirus vector production in protein-free media using polyethylenimine-mediated transfection. *J Virol Methods* **157**(2): 113-121.
- Lamarca A, Hubner RA, David Ryder W, Valle JW (2014). Second-line chemotherapy in advanced biliary cancer: a systematic review. *Ann Oncol* **25**(12): 2328-2338.
- Lapitz A, Arbelaiz A, Olaizola P, Aranburu A, Bujanda L, *et al.* (2018). Extracellular Vesicles in Hepatobiliary Malignancies. *Front Immunol* **9**: 2270.
- LaRocca RV, Hicks MD, Mull L, Foreman B (2007). Effective palliation of advanced cholangiocarcinoma with sorafenib: a two-patient case report. *J Gastrointest Cancer* **38**(2-4): 154-156.
- Larsen FO, Markussen A, Diness LV, Nielsen D (2018). Efficacy and Safety of Capecitabine, Irinotecan, Gemcitabine, and Bevacizumab as Second-Line Treatment in Advanced Biliary Tract Cancer: A Phase II Study. *Oncology* **94**(1): 19-24.
- Larusso NF, Masyuk TV (2011). The role of cilia in the regulation of bile flow. *Dig Dis* **29**(1): 6-12.
- Lau SK, Prakash S, Geller SA, Alsabeh R (2002). Comparative immunohistochemical profile of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and metastatic adenocarcinoma. *Hum Pathol* **33**(12): 1175-1181.
- Lazaridis KN, Pham L, Tietz P, Marinelli RA, deGroen PC, *et al.* (1997). Rat cholangiocytes absorb bile acids at their apical domain via the ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Clin Invest* **100**(11): 2714-2721.
- Lee J, Azzaroli F, Wang L, Soroka CJ, Gigliozzi A, *et al.* (2001). Adaptive regulation of bile salt transporters in kidney and liver in obstructive cholestasis in the rat. *Gastroenterology* **121**(6): 1473-1484.

- Lee J, Park SH, Chang HM, Kim JS, Choi HJ, *et al.* (2012). Gemcitabine and oxaliplatin with or without erlotinib in advanced biliary-tract cancer: a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* **13**(2): 181-188.
- Lee JK, Capanu M, O'Reilly EM, Ma J, Chou JF, *et al.* (2013). A phase II study of gemcitabine and cisplatin plus sorafenib in patients with advanced biliary adenocarcinomas. *Br J Cancer* **109**(4): 915-919.
- Lee SE, Jin RJ, Lee SG, Yoon SJ, Park MS, *et al.* (2000). Development of a new plasmid vector with PSA-promoter and enhancer expressing tissue-specificity in prostate carcinoma cell lines. *Anticancer Res* **20**(1A): 417-422.
- Lee SH, Lee S, Yang H, Song S, Kim K, *et al.* (2014a). Notch pathway targets proangiogenic regulator Sox17 to restrict angiogenesis. *Circ Res* **115**(2): 215-226.
- Lee SH, Oh SY, Do SI, Lee HJ, Kang HJ, *et al.* (2014b). SOX2 regulates self-renewal and tumorigenicity of stem-like cells of head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* **111**(11): 2122-2130.
- LeSage G, Glaser S, Alpini G (2001). Regulation of cholangiocyte proliferation. *Liver* **21**(2): 73-80.
- Levy C, Lymp J, Angulo P, Gores GJ, Larusso N, *et al.* (2005). The value of serum CA 19-9 in predicting cholangiocarcinomas in patients with primary sclerosing cholangitis. *Dig Dis Sci* **50**(9): 1734-1740.
- Li Y, Gao ZH, Qu XJ (2015). The adverse effects of sorafenib in patients with advanced cancers. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **116**(3): 216-221.
- Libbrecht L, Severi T, Cassiman D, Vander Borght S, Pirenne J, *et al.* (2006). Glypican-3 expression distinguishes small hepatocellular carcinomas from cirrhosis, dysplastic nodules, and focal nodular hyperplasia-like nodules. *Am J Surg Pathol* **30**(11): 1405-1411.
- Lin CJ, Tai Y, Huang MT, Tsai YF, Hsu HJ, *et al.* (2010). Cellular localization of the organic cation transporters, OCT1 and OCT2, in brain microvessel endothelial cells and its implication for MPTP transport across the blood-brain barrier and MPTP-induced dopaminergic toxicity in rodents. *J Neurochem* **114**(3): 717-727.
- Lin PC, Lin HH, Lin JK, Lin CC, Yang SH, *et al.* (2013). Expression of ABCG2 associated with tumor response in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line FOLFOX therapy--preliminary evidence. *Int J Biol Markers* **28**(2): 182-186.
- Lin SC, Chou YT, Jiang SS, Chang JL, Chung CH, *et al.* (2016). Epigenetic Switch between SOX2 and SOX9 Regulates Cancer Cell Plasticity. *Cancer Res* **76**(23): 7036-7048.
- Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, *et al.* (2006). Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell

- apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res* **66**(24): 11851-11858.
- Locher KP (2016). Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat Struct Mol Biol* **23**(6): 487-493.
- Lowery MA, Abou-Alfa GK, Burris HA, Janku F, Shroff RT, *et al.* (2017). Phase I study of AG-120, an IDH1 mutant enzyme inhibitor: Results from the cholangiocarcinoma dose escalation and expansion cohorts. *Journal of Clinical Oncology* **25**(15): 4015.
- Lozano E, Briz O, Macias RIR, Serrano MA, Marin JJG, *et al.* (2018). Genetic Heterogeneity of SLC22 Family of Transporters in Drug Disposition. *J Pers Med* **8**(2).
- Lozano E, Herraes E, Briz O, Robledo VS, Hernandez-Iglesias J, *et al.* (2013). Role of the plasma membrane transporter of organic cations OCT1 and its genetic variants in modern liver pharmacology. *Biomed Res Int* **2013**: 692071.
- Lozano E, Macias RIR, Monte MJ, Asensio M, Del Carmen S, *et al.* (2019). Causes of hOCT1-Dependent Cholangiocarcinoma Resistance to Sorafenib and Sensitization by Tumor-Selective Gene Therapy. *Hepatology*. In press.
- Lozano E, Monte MJ, Briz O, Hernandez-Hernandez A, Banales JM, *et al.* (2015). Enhanced antitumour drug delivery to cholangiocarcinoma through the apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT). *J Control Release* **216**: 93-102.
- Lozano E, Sanchez-Vicente L, Monte MJ, Herraes E, Briz O, *et al.* (2014). Cocarcinogenic effects of intrahepatic bile acid accumulation in cholangiocarcinoma development. *Mol Cancer Res* **12**(1): 91-100.
- Lu JP, Mao JQ, Li MS, Lu SL, Hu XQ, *et al.* (2003). In situ detection of TGF betas, TGF beta receptor II mRNA and telomerase activity in rat cholangiocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* **9**(3): 590-594.
- Ludwig J (1987). New concepts in biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* **7**(4): 293-301.
- Luo X, Jia W, Huang Z, Li X, Xing B, *et al.* (2017). Effectiveness and safety of sorafenib in the treatment of unresectable and advanced intrahepatic cholangiocarcinoma: a pilot study. *Oncotarget* **8**(10): 17246-17257.
- Luo ZL, Cheng L, Wang T, Tang LJ, Tian FZ, *et al.* (2019). Bile Acid Transporters Are Expressed and Heterogeneously Distributed in Rat Bile Ducts. *Gut Liver*. In press.
- Llovet JM, Di Bisceglie AM, Bruix J, Kramer BS, Lencioni R, *et al.* (2008a). Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **100**(10): 698-711.

- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, *et al.* (2008b). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* **359**(4): 378-390.
- Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, Sangro B, Schwartz M, *et al.* (2016). Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* **2**: 16018.
- Macias RI (2014). Cholangiocarcinoma: Biology, Clinical Management, and Pharmacological Perspectives. *ISRN Hepatol* **2014**: 828074.
- Macias RIR, Banales JM, Sangro B, Muntane J, Avila MA, *et al.* (2018). The search for novel diagnostic and prognostic biomarkers in cholangiocarcinoma. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1864**(4 Pt B): 1468-1477.
- Maeda T, Adachi E, Kajiyama K, Sugimachi K, Tsuneyoshi M (1995). Combined hepatocellular and cholangiocarcinoma: proposed criteria according to cytokeratin expression and analysis of clinicopathologic features. *Hum Pathol* **26**(9): 956-964.
- Maemura K, Natsugoe S, Takao S (2014). Molecular mechanism of cholangiocarcinoma carcinogenesis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* **21**(10): 754-760.
- Marin JJ, Briz O, Perez MJ, Romero MR, Monte MJ (2009). Hepatobiliary transporters in the pharmacology and toxicology of anticancer drugs. *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**: 4257-4280.
- Marin JJG, Briz O, Herraes E, Lozano E, Asensio M, *et al.* (2018a). Molecular bases of the poor response of liver cancer to chemotherapy. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **42**(3): 182-192.
- Marin JJG, Lozano E, Briz O, Al-Abdulla R, Serrano MA, *et al.* (2017). Molecular Bases of Chemoresistance in Cholangiocarcinoma. *Curr Drug Targets* **18**(8): 889-900.
- Marin JJG, Lozano E, Herraes E, Asensio M, Di Giacomo S, *et al.* (2018b). Chemoresistance and chemosensitization in cholangiocarcinoma. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1864**(4 Pt B): 1444-1453.
- Marino Z, Darnell A, Lens S, Sapena V, Diaz A, *et al.* (2019). Time association between hepatitis C therapy and hepatocellular carcinoma emergence in cirrhosis: Relevance of non-characterized nodules. *J Hepatol* **70**(5): 874-884.
- Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* **87**(1): 206-210.
- Martinez-Becerra P, Vaquero J, Romero MR, Lozano E, Anadon C, *et al.* (2012). No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors. *Mol Pharm* **9**(6): 1693-1704.



- Masyuk TV, Huang BQ, Ward CJ, Masyuk AI, Yuan D, *et al.* (2003). Defects in cholangiocyte fibrocystin expression and ciliary structure in the PCK rat. *Gastroenterology* **125**(5): 1303-1310.
- Masyuk TV, Ritman EL, LaRusso NF (2001). Quantitative assessment of the rat intrahepatic biliary system by three-dimensional reconstruction. *Am J Pathol* **158**(6): 2079-2088.
- McGlynn KA, Petrick JL, London WT (2015). Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability. *Clin Liver Dis* **19**(2): 223-238.
- Meijer DK, Mol WE, Muller M, Kurz G (1990). Carrier-mediated transport in the hepatic distribution and elimination of drugs, with special reference to the category of organic cations. *J Pharmacokinet Biopharm* **18**(1): 35-70.
- Merino-Azpitarte M, Lozano E, Perugorria MJ, Esparza-Baquer A, Erice O, *et al.* (2017). SOX17 regulates cholangiocyte differentiation and acts as a tumor suppressor in cholangiocarcinoma. *J Hepatol* **67**(1): 72-83.
- Mertens JC, Rizvi S, Gores GJ (2018). Targeting cholangiocarcinoma. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1864**(4 Pt B): 1454-1460.
- Meyer-Wentrup F, Karbach U, Gorboulev V, Arndt P, Koepsell H (1998). Membrane localization of the electrogenic cation transporter rOCT1 in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* **248**(3): 673-678.
- Minematsu T, Iwai M, Sugimoto K, Shirai N, Nakahara T, *et al.* (2009). Carrier-mediated uptake of 1-(2-methoxyethyl)-2-methyl-4,9-dioxo-3-(pyrazin-2-ylmethyl)-4,9-dihydro-1H-naphtho[2,3-d]imidazolium bromide (YM155 monobromide), a novel small-molecule survivin suppressant, into human solid tumor and lymphoma cells. *Drug Metab Dispos* **37**(3): 619-628.
- Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ (2008). Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* **14**(16): 5000-5005.
- Miyamoto M, Ojima H, Iwasaki M, Shimizu H, Kokubu A, *et al.* (2011). Prognostic significance of overexpression of c-Met oncoprotein in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* **105**(1): 131-138.
- Monte MJ, Dominguez S, Palomero MF, Macias RI, Marin JJ (1999). Further evidence of the usefulness of bile acids as molecules for shuttling cytostatic drugs toward liver tumors. *J Hepatol* **31**(3): 521-528.
- Morak MJ, van der Gaast A, Incrocci L, van Dekken H, Hermans JJ, *et al.* (2008). Adjuvant intra-arterial chemotherapy and radiotherapy versus surgery alone in resectable pancreatic and periampullary cancer: a prospective randomized controlled trial. *Ann Surg* **248**(6): 1031-1041.

- More SS, Li S, Yee SW, Chen L, Xu Z, *et al.* (2010). Organic cation transporters modulate the uptake and cytotoxicity of picoplatin, a third-generation platinum analogue. *Mol Cancer Ther* **9**(4): 1058-1069.
- Muppidi MR, Portwood S, Griffiths EA, Thompson JE, Ford LA, *et al.* (2015). Decitabine and Sorafenib Therapy in FLT-3 ITD-Mutant Acute Myeloid Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* **15** Suppl: S73-79.
- Muthusamy S, Malhotra P, Hosameddin M, Dudeja AK, Borthakur S, *et al.* (2015). N-glycosylation is essential for ileal ASBT function and protection against proteases. *Am J Physiol Cell Physiol* **308**(12): C964-971.
- Nagi P, Vickers SM, Davydova J, Adachi Y, Takayama K, *et al.* (2003). Development of a therapeutic adenoviral vector for cholangiocarcinoma combining tumor-restricted gene expression and infectivity enhancement. *J Gastrointest Surg* **7**(3): 364-371.
- Nakajima-Takagi Y, Osawa M, Oshima M, Takagi H, Miyagi S, *et al.* (2013). Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. *Blood* **121**(3): 447-458.
- Nies AT, Koepsell H, Winter S, Burk O, Klein K, *et al.* (2009). Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology* **50**(4): 1227-1240.
- Oelkers P, Kirby LC, Heubi JE, Dawson PA (1997). Primary bile acid malabsorption caused by mutations in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene (SLC10A2). *J Clin Invest* **99**(8): 1880-1887.
- Okusaka T, Nakachi K, Fukutomi A, Mizuno N, Ohkawa S, *et al.* (2010). Gemcitabine alone or in combination with cisplatin in patients with biliary tract cancer: a comparative multicentre study in Japan. *Br J Cancer* **103**(4): 469-474.
- Pan TT, Wang W, Jia WD, Xu GL (2017). A single-center experience of sorafenib monotherapy in patients with advanced intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncol Lett* **13**(5): 2957-2964.
- Park J, Tadlock L, Gores GJ, Patel T (1999). Inhibition of interleukin 6-mediated mitogen-activated protein kinase activation attenuates growth of a cholangiocarcinoma cell line. *Hepatology* **30**(5): 1128-1133.
- Park JE, Ryoo G, Lee W (2017). Alternative Splicing: Expanding Diversity in Major ABC and SLC Drug Transporters. *AAPS J* **19**(6): 1643-1655.
- Park JG, Tak WY, Park SY, Kweon YO, Jang SY, *et al.* (2017). Long-term follow-up of complete remission of advanced hepatocellular carcinoma following sorafenib therapy: A case report. *Oncol Lett* **14**(4): 4853-4856.
- Pellat A, Vaquero J, Fouassier L (2018). Role of ErbB/HER family of receptor tyrosine kinases in cholangiocyte biology. *Hepatology* **67**(2): 762-773.



- Pérez-Silva L (2014). Papel del factor de transcripción SOX17 en el desarrollo de quimiorresistencia en tumores hepáticos y digestivos. Fisiología y Farmacología. Universidad de Salamanca.
- Perland E, Fredriksson R (2017). Classification Systems of Secondary Active Transporters. *Trends Pharmacol Sci* **38**(3): 305-315.
- Perugorria MJ, Olaizola P, Labiano I, Esparza-Baquer A, Marzioni M, *et al.* (2019). Wnt-beta-catenin signalling in liver development, health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **16**(2): 121-136.
- Philip PA, Mahoney MR, Allmer C, Thomas J, Pitot HC, *et al.* (2006). Phase II study of erlotinib in patients with advanced biliary cancer. *J Clin Oncol* **24**(19): 3069-3074.
- Pinter M, Sieghart W, Reisinger M, Wrba F, Peck-Radosavljevic M (2011). Sorafenib in unresectable intrahepatic cholangiocellular carcinoma: a case report. *Wien Klin Wochenschr* **123**(1-2): 61-64.
- Ramirez-Merino N, Aix SP, Cortes-Funes H (2013). Chemotherapy for cholangiocarcinoma: An update. *World J Gastrointest Oncol* **5**(7): 171-176.
- Rau S, Autschbach F, Riedel HD, König J, Kulaksiz H, *et al.* (2008). Expression of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human cholangiocellular carcinomas. *Eur J Clin Invest* **38**(2): 134-142.
- Raynaud P, Carpentier R, Antoniou A, Lemaigre FP (2011). Biliary differentiation and bile duct morphogenesis in development and disease. *Int J Biochem Cell Biol* **43**(2): 245-256.
- Recio-Boiles A, Waheed A, Babiker HM (2019). Cancer, Liver. [StatPearls](#). Treasure Island (FL). In press.
- Rimola J, Diaz-Gonzalez A, Darnell A, Varela M, Pons F, *et al.* (2018). Complete response under sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma: Relationship with dermatologic adverse events. *Hepatology* **67**(2): 612-622.
- Rimola J, Forner A, Reig M, Vilana R, de Lope CR, *et al.* (2009). Cholangiocarcinoma in cirrhosis: absence of contrast washout in delayed phases by magnetic resonance imaging avoids misdiagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **50**(3): 791-798.
- Rizvi S, Borad MJ (2016). The rise of the FGFR inhibitor in advanced biliary cancer: the next cover of time magazine? *J Gastrointest Oncol* **7**(5): 789-796.
- Rosenzweig SA (2012). Acquired resistance to drugs targeting receptor tyrosine kinases. *Biochem Pharmacol* **83**(8): 1041-1048.
- Rost D, König J, Weiss G, Klar E, Stremmel W, *et al.* (2001). Expression and localization of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human gallbladder epithelia. *Gastroenterology* **121**(5): 1203-1208.

- Saha SK, Parachoniak CA, Ghanta KS, Fitamant J, Ross KN, *et al.* (2014). Mutant IDH inhibits HNF-4alpha to block hepatocyte differentiation and promote biliary cancer. *Nature* **513**(7516): 110-114.
- Salter KD, Roman RM, LaRusso NR, Fitz JG, Doctor RB (2000). Modified culture conditions enhance expression of differentiated phenotypic properties of normal rat cholangiocytes. *Lab Invest* **80**(11): 1775-1778.
- Sánchez-Vegazo R (2014). Desarrollo de líneas celulares que expresen establemente OCT1 para el estudio de la resistencia al sorafenib en cáncer hepático. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Salamanca.
- Sato K, Marzioni M, Meng F, Francis H, Glaser S, *et al.* (2019). Ductular Reaction in Liver Diseases: Pathological Mechanisms and Translational Significances. *Hepatology* **69**(1): 420-430.
- Saukkonen K, Hemminki A (2004). Tissue-specific promoters for cancer gene therapy. *Expert Opin Biol Ther* **4**(5): 683-696.
- Schaeffeler E, Hellerbrand C, Nies AT, Winter S, Kruck S, *et al.* (2011). DNA methylation is associated with downregulation of the organic cation transporter OCT1 (SLC22A1) in human hepatocellular carcinoma. *Genome Med* **3**(12): 82.
- Schellens JH, Maliepaard M, Scheper RJ, Scheffer GL, Jonker JW, *et al.* (2000). Transport of topoisomerase I inhibitors by the breast cancer resistance protein. Potential clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* **922**: 188-194.
- Schepers GE, Teasdale RD, Koopman P (2002). Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Dev Cell* **3**(2): 167-170.
- Schulze K, Nault JC, Villanueva A (2016). Genetic profiling of hepatocellular carcinoma using next-generation sequencing. *J Hepatol* **65**(5): 1031-1042.
- Selaru FM, Olaru AV, Kan T, David S, Cheng Y, *et al.* (2009). MicroRNA-21 is overexpressed in human cholangiocarcinoma and regulates programmed cell death 4 and tissue inhibitor of metalloproteinase 3. *Hepatology* **49**(5): 1595-1601.
- Shen DY, Zhang W, Zeng X, Liu CQ (2013). Inhibition of Wnt/beta-catenin signaling downregulates P-glycoprotein and reverses multi-drug resistance of cholangiocarcinoma. *Cancer Sci* **104**(10): 1303-1308.
- Shepelev MV, Kopantzev EP, Vinogradova TV, Sverdlov ED, Korobko IV (2016). hTERT and BIRC5 gene promoters for cancer gene therapy: A comparative study. *Oncol Lett* **12**(2): 1204-1210.
- Shneider BL, Dawson PA, Christie DM, Hardikar W, Wong MH, *et al.* (1995). Cloning and molecular characterization of the ontogeny of a rat ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Clin Invest* **95**(2): 745-754.

- Sia D, Hoshida Y, Villanueva A, Roayaie S, Ferrer J, *et al.* (2013a). Integrative molecular analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma reveals 2 classes that have different outcomes. *Gastroenterology* **144**(4): 829-840.
- Sia D, Tovar V, Moeini A, Llovet JM (2013b). Intrahepatic cholangiocarcinoma: pathogenesis and rationale for molecular therapies. *Oncogene* **32**(41): 4861-4870.
- Simile MM, Bagella P, Vidili G, Spanu A, Manetti R, *et al.* (2019). Targeted Therapies in Cholangiocarcinoma: Emerging Evidence from Clinical Trials. *Medicina (Kaunas)* **55**(2).
- Sinner D, Kordich JJ, Spence JR, Opoka R, Rankin S, *et al.* (2007). Sox17 and Sox4 differentially regulate beta-catenin/T-cell factor activity and proliferation of colon carcinoma cells. *Mol Cell Biol* **27**(22): 7802-7815.
- Sirica AE (2008). Role of ErbB family receptor tyrosine kinases in intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* **14**(46): 7033-7058.
- Solt D, Farber E (1976). New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* **263**(5579): 701.
- Sparidans RW, Vlaming ML, Lagas JS, Schinkel AH, Schellens JH, *et al.* (2009). Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for sorafenib and sorafenib-glucuronide in mouse plasma and liver homogenate and identification of the glucuronide metabolite. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**(3): 269-276.
- Spence JR, Lange AW, Lin SC, Kaestner KH, Lowy AM, *et al.* (2009). Sox17 regulates organ lineage segregation of ventral foregut progenitor cells. *Dev Cell* **17**(1): 62-74.
- Sugiyama H, Onuki K, Ishige K, Baba N, Ueda T, *et al.* (2011). Potent in vitro and in vivo antitumor activity of sorafenib against human intrahepatic cholangiocarcinoma cells. *J Gastroenterol* **46**(6): 779-789.
- Sun Q, Li J, Wang G, Xie Y (2014). Role of the embryonic protein SOX2 in cholangiocarcinoma. *Cell Biochem Biophys* **70**(2): 1311-1316.
- Sun R, Jiang B, Qi H, Zhang X, Yang J, *et al.* (2015). SOX4 contributes to the progression of cervical cancer and the resistance to the chemotherapeutic drug through ABCG2. *Cell Death Dis* **6**: e1990.
- Tabibian JH, Masyuk AI, Masyuk TV, O'Hara SP, LaRusso NF (2013). Physiology of cholangiocytes. *Compr Physiol* **3**(1): 541-565.
- Takeda K, Mizushima T, Yokoyama Y, Hirose H, Wu X, *et al.* (2018). Sox2 is associated with cancer stem-like properties in colorectal cancer. *Sci Rep* **8**(1): 17639.

- Tangkijvanich P, Chanmee T, Komtong S, Mahachai V, Wisedopas N, *et al.* (2010). Diagnostic role of serum glypican-3 in differentiating hepatocellular carcinoma from non-malignant chronic liver disease and other liver cancers. *J Gastroenterol Hepatol* **25**(1): 129-137.
- Tao LY, Cai L, He XD, Liu W, Qu Q (2010). Comparison of serum tumor markers for intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Am Surg* **76**(11): 1210-1213.
- Tepsiri N, Chaturat L, Sripa B, Namwat W, Wongkham S, *et al.* (2005). Drug sensitivity and drug resistance profiles of human intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* **11**(18): 2748-2753.
- Tokumoto N, Ikeda S, Ishizaki Y, Kurihara T, Ozaki S, *et al.* (2005). Immunohistochemical and mutational analyses of Wnt signaling components and target genes in intrahepatic cholangiocarcinomas. *Int J Oncol* **27**(4): 973-980.
- Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A (2016). Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **25**(1): 16-27.
- Tremosini S, Forner A, Boix L, Vilana R, Bianchi L, *et al.* (2012). Prospective validation of an immunohistochemical panel (glypican 3, heat shock protein 70 and glutamine synthetase) in liver biopsies for diagnosis of very early hepatocellular carcinoma. *Gut* **61**(10): 1481-1487.
- Treyer A, Musch A (2013). Hepatocyte polarity. *Compr Physiol* **3**(1): 243-287.
- Tsunoda S, Okumura T, Ito T, Kondo K, Ortiz C, *et al.* (2006). ABCG2 expression is an independent unfavorable prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology* **71**(3-4): 251-258.
- Tzvetkov MV, Vormfelde SV, Balen D, Meineke I, Schmidt T, *et al.* (2009). The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3 on the renal clearance of metformin. *Clin Pharmacol Ther* **86**(3): 299-306.
- Uemura M, Hara K, Shitara H, Ishii R, Tsunekawa N, *et al.* (2010). Expression and function of mouse Sox17 gene in the specification of gallbladder/bile-duct progenitors during early foregut morphogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **391**(1): 357-363.
- Uemura M, Ozawa A, Nagata T, Kurasawa K, Tsunekawa N, *et al.* (2013). Sox17 haploinsufficiency results in perinatal biliary atresia and hepatitis in C57BL/6 background mice. *Development* **140**(3): 639-648.
- Vaeteewoottacharn K, Kariya R, Dana P, Fujikawa S, Matsuda K, *et al.* (2016). Inhibition of carbonic anhydrase potentiates bevacizumab treatment in cholangiocarcinoma. *Tumour Biol* **37**(7): 9023-9035.

- Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthony A, *et al.* (2010). Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med* **362**(14): 1273-1281.
- Valle JW, Furuse J, Jitlal M, Beare S, Mizuno N, *et al.* (2014). Cisplatin and gemcitabine for advanced biliary tract cancer: a meta-analysis of two randomised trials. *Ann Oncol* **25**(2): 391-398.
- van Montfoort JE, Muller M, Groothuis GM, Meijer DK, Koepsell H, *et al.* (2001). Comparison of "type I" and "type II" organic cation transport by organic cation transporters and organic anion-transporting polypeptides. *J Pharmacol Exp Ther* **298**(1): 110-115.
- Vicens M, Macias RI, Briz O, Rodriguez A, El-Mir MY, *et al.* (2007a). Inhibition of the intestinal absorption of bile acids using cationic derivatives: mechanism and repercussions. *Biochem Pharmacol* **73**(3): 394-404.
- Vicens M, Medarde M, Macias RI, Larena MG, Villafaina A, *et al.* (2007b). Novel cationic and neutral glycocholic acid and polyamine conjugates able to inhibit transporters involved in hepatic and intestinal bile acid uptake. *Bioorg Med Chem* **15**(6): 2359-2367.
- Villanueva A (2019). Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* **380**(15): 1450-1462.
- Vroman B, LaRusso NF (1996). Development and characterization of polarized primary cultures of rat intrahepatic bile duct epithelial cells. *Lab Invest* **74**(1): 303-313.
- Waddington SN, McVey JH, Bhella D, Parker AL, Barker K, *et al.* (2008). Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell* **132**(3): 397-409.
- Wang B, Li H, Yang R, Zhou S, Zou S (2014). Decitabine inhibits the cell growth of cholangiocarcinoma in cultured cell lines and mouse xenografts. *Oncol Lett* **8**(5): 1919-1924.
- Wang LJ, He CC, Sui X, Cai MJ, Zhou CY, *et al.* (2015a). MiR-21 promotes intrahepatic cholangiocarcinoma proliferation and growth in vitro and in vivo by targeting PTPN14 and PTEN. *Oncotarget* **6**(8): 5932-5946.
- Wang LJ, Zhang KL, Zhang N, Ma XW, Yan SW, *et al.* (2015b). Serum miR-26a as a diagnostic and prognostic biomarker in cholangiocarcinoma. *Oncotarget* **6**(21): 18631-18640.
- Wang M, Wang X, Yuan J, Guo L (2013). Expression of the breast cancer resistance protein and 5-fluorouracil resistance in clinical breast cancer tissue specimens. *Mol Clin Oncol* **1**(5): 853-857.
- Wang P, Dong Q, Zhang C, Kuan PF, Liu Y, *et al.* (2013). Mutations in isocitrate dehydrogenase 1 and 2 occur frequently in intrahepatic cholangiocarcinomas and share hypermethylation targets with glioblastomas. *Oncogene* **32**(25): 3091-3100.

- Wang S, Yin J, Li T, Yuan L, Wang D, *et al.* (2015). Upregulated circulating miR-150 is associated with the risk of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncol Rep* **33**(2): 819-825.
- Wang W, Zhang J, Zhan X, Lin T, Yang M, *et al.* (2014). SOX4 is associated with poor prognosis in cholangiocarcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* **452**(3): 614-621.
- Wegner M (2010). All purpose Sox: The many roles of Sox proteins in gene expression. *Int J Biochem Cell Biol* **42**(3): 381-390.
- Weinman SA, Carruth MW, Dawson PA (1998). Bile acid uptake via the human apical sodium-bile acid cotransporter is electrogenic. *J Biol Chem* **273**(52): 34691-34695.
- Welzel TM, Graubard BI, Zeuzem S, El-Serag HB, Davila JA, *et al.* (2011). Metabolic syndrome increases the risk of primary liver cancer in the United States: a study in the SEER-Medicare database. *Hepatology* **54**(2): 463-471.
- Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, *et al.* (2004). BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* **64**(19): 7099-7109.
- Wilson M, Koopman P (2002). Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. *Curr Opin Genet Dev* **12**(4): 441-446.
- Wong MH, Oelkers P, Dawson PA (1995). Identification of a mutation in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene that abolishes transport activity. *J Biol Chem* **270**(45): 27228-27234.
- Wooddell CI, Reppen T, Wolff JA, Herweijer H (2008). Sustained liver-specific transgene expression from the albumin promoter in mice following hydrodynamic plasmid DNA delivery. *J Gene Med* **10**(5): 551-563.
- Wright SH (2005). Role of organic cation transporters in the renal handling of therapeutic agents and xenobiotics. *Toxicol Appl Pharmacol* **204**(3): 309-319.
- Wu WR, Shi XD, Zhang R, Zhu MS, Xu LB, *et al.* (2014a). Clinicopathological significance of aberrant Notch receptors in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* **7**(6): 3272-3279.
- Wu WR, Zhang R, Shi XD, Zhu MS, Xu LB, *et al.* (2014b). Notch1 is overexpressed in human intrahepatic cholangiocarcinoma and is associated with its proliferation, invasiveness and sensitivity to 5-fluorouracil in vitro. *Oncol Rep* **31**(6): 2515-2524.
- Xia X, Roundtree M, Merikhi A, Lu X, Shentu S, *et al.* (2004). Degradation of the apical sodium-dependent bile acid transporter by the ubiquitin-proteasome pathway in cholangiocytes. *J Biol Chem* **279**(43): 44931-44937.



- Xian ZH, Zhang SH, Cong WM, Wu WQ, Wu MC (2005). Overexpression/amplification of HER-2/neu is uncommon in hepatocellular carcinoma. *J Clin Pathol* **58**(5): 500-503.
- Xiao S, Li Y, Pan Q, Ye M, He S, *et al.* (2019). MiR-34c/SOX9 axis regulates the chemoresistance of ovarian cancer cell to cisplatin-based chemotherapy. *J Cell Biochem* **120**(3): 2940-2953.
- Xie SL, Fan S, Zhang SY, Chen WX, Li QX, *et al.* (2018). SOX8 regulates cancer stem-like properties and cisplatin-induced EMT in tongue squamous cell carcinoma by acting on the Wnt/beta-catenin pathway. *Int J Cancer* **142**(6): 1252-1265.
- Xu J (2018). Trends in Liver Cancer Mortality Among Adults Aged 25 and Over in the United States, 2000-2016. *NCHS Data Brief*. In press.(314): 1-8.
- Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, *et al.* (2011). Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* **19**(1): 17-30.
- Yamamoto M, Alemany R, Adachi Y, Grizzle WE, Curiel DT (2001). Characterization of the cyclooxygenase-2 promoter in an adenoviral vector and its application for the mitigation of toxicity in suicide gene therapy of gastrointestinal cancers. *Mol Ther* **3**(3): 385-394.
- Yang JD, Campion MB, Liu MC, Chaiteerakij R, Giama NH, *et al.* (2016). Circulating tumor cells are associated with poor overall survival in patients with cholangiocarcinoma. *Hepatology* **63**(1): 148-158.
- Yoshikawa D, Ojima H, Iwasaki M, Hiraoka N, Kosuge T, *et al.* (2008). Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* **98**(2): 418-425.
- Yothaisong S, Thanee M, Namwat N, Yongvanit P, Boonmars T, *et al.* (2014). Opisthorchis viverrini infection activates the PI3K/ AKT/PTEN and Wnt/beta-catenin signaling pathways in a Cholangiocarcinogenesis model. *Asian Pac J Cancer Prev* **15**(23): 10463-10468.
- Younossi ZM, Otgonsuren M, Henry L, Venkatesan C, Mishra A, *et al.* (2015). Association of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) with hepatocellular carcinoma (HCC) in the United States from 2004 to 2009. *Hepatology* **62**(6): 1723-1730.
- Yu Z, Zhang C, Wang H, Xing J, Gong H, *et al.* (2014). Multidrug resistance-associated protein 3 confers resistance to chemoradiotherapy for rectal cancer by regulating reactive oxygen species and caspase-3-dependent apoptotic pathway. *Cancer Lett* **353**(2): 182-193.
- Yuan X, Li J, Coulouarn C, Lin T, Sulpice L, *et al.* (2018). SOX9 expression decreases survival of patients with intrahepatic cholangiocarcinoma by conferring chemoresistance. *Br J Cancer* **119**(11): 1358-1366.

- Zhang EY, Phelps MA, Banerjee A, Khantwal CM, Chang C, *et al.* (2004). Topology scanning and putative three-dimensional structure of the extracellular binding domains of the apical sodium-dependent bile acid transporter (SLC10A2). *Biochemistry* **43**(36): 11380-11392.
- Zhang KS, Zhou Q, Wang YF, Liang LJ (2013). Inhibition of Wnt signaling induces cell apoptosis and suppresses cell proliferation in cholangiocarcinoma cells. *Oncol Rep* **30**(3): 1430-1438.
- Zhang S, Lovejoy KS, Shima JE, Lagpacan LL, Shu Y, *et al.* (2006). Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity. *Cancer Res* **66**(17): 8847-8857.
- Zhang W, Glockner SC, Guo M, Machida EO, Wang DH, *et al.* (2008). Epigenetic inactivation of the canonical Wnt antagonist SRY-box containing gene 17 in colorectal cancer. *Cancer Res* **68**(8): 2764-2772.
- Zhang Y, Jiang F, Bao W, Zhang H, He X, *et al.* (2016). SOX17 increases the cisplatin sensitivity of an endometrial cancer cell line. *Cancer Cell Int* **16**: 29.
- Zhang Z, Oyesanya RA, Campbell DJ, Almenara JA, Dewitt JL, *et al.* (2010). Preclinical assessment of simultaneous targeting of epidermal growth factor receptor (ErbB1) and ErbB2 as a strategy for cholangiocarcinoma therapy. *Hepatology* **52**(3): 975-986.
- Zhang ZM, Wu JF, Luo QC, Liu QF, Wu QW, *et al.* (2016). Pygo2 activates MDR1 expression and mediates chemoresistance in breast cancer via the Wnt/beta-catenin pathway. *Oncogene* **35**(36): 4787-4797.
- Zhou Q, Wang Y, Peng B, Liang L, Li J (2013). The roles of Notch1 expression in the migration of intrahepatic cholangiocarcinoma. *BMC Cancer* **13**: 244.
- Zhu AX, Kang YK, Yen CJ, Finn RS, Galle PR, *et al.* (2019). Ramucirumab after sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma and increased alpha-fetoprotein concentrations (REACH-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **20**(2): 282-296.
- Zhu AX, Meyerhardt JA, Blaszkowsky LS, Kambadakone AR, Muzikansky A, *et al.* (2010). Efficacy and safety of gemcitabine, oxaliplatin, and bevacizumab in advanced biliary-tract cancers and correlation of changes in 18-fluorodeoxyglucose PET with clinical outcome: a phase 2 study. *Lancet Oncol* **11**(1): 48-54.
- Zhu ZB, Chen Y, Makhija SK, Lu B, Wang M, *et al.* (2006). Survivin promoter-based conditionally replicative adenoviruses target cholangiocarcinoma. *Int J Oncol* **29**(5): 1319-1329.
- Zhu ZB, Makhija SK, Lu B, Wang M, Kaliberova L, *et al.* (2004). Transcriptional targeting of tumors with a novel tumor-specific survivin promoter. *Cancer Gene Ther* **11**(4): 256-262.



Zhu ZB, Makhija SK, Lu B, Wang M, Rivera AA, *et al.* (2005). Incorporating the survivin promoter in an infectivity enhanced CRAd-analysis of oncolysis and anti-tumor effects in vitro and in vivo. *Int J Oncol* **27**(1): 237-246.

Zong Y, Panikkar A, Xu J, Antoniou A, Raynaud P, *et al.* (2009). Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. *Development* **136**(10): 1727-1739.



**UNIVERSITY OF SALAMANCA**  
**FACULTY OF BIOLOGY**  
**DEPARTMENT OF PHISIOLOGY AND PHARMACOLOGY**



**VNiVERSiDAD**  
**D SALAMANCA**

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE

**USEFULNESS OF TRANSPORTOME IN THE SEARCH  
OF CHEMORESISTANCE BIOMARKERS AND IN THE  
DEVELOPMENT OF STRATEGIES TO SENSITIZE LIVER  
TUMORS TO CHEMOTHERAPY**

Presented by **Maitane Asensio** to obtain PhD in the University of Salamanca

2019

## Abbreviations

**5-FU:** 5-Fluorouracil

**ABC:** ATP-binding cassette transporter

**ASBT:** Apical sodium and bile acid transporter

**CCA:** Cholangiocarcinoma

**CF:** Carboxyfluorescein

**CK-7:** Cytokeratin 7

**Ct:** Cycle threshold

**FTC:** Fumitremorgin C

**GBC:** Gallbladder adenocarcinoma

**GOI:** Gene of interest

**HB:** Hepatoblastoma

**HCC:** Hepatocellular carcinoma

**IC<sub>50</sub>:** Inhibitory concentration 50

**MOC:** Mechanism of chemoresistance

**MTX:** Mitoxantrone

**NHC:** Normal human cholangiocyte

**NT:** Non-tumor

**OCT1:** Organic cation transporter 1

**PDAC:** Pancreatic ductal adenocarcinoma

**RNA:** Ribonucleic acid

**RT-qPCR:** Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction

**SOX17:** Sry-related HMG box 17

**T:** Tumor

**TAA:** Thioacetamide

**TKI:** Tyrosin kinase inhibitor

**TLDA:** Taqman Low-Density Arrays

**TTP:** Tristetraprolin

**WT:** Wild type

## Aims

Cholangiocarcinoma (CCA) is the second most frequent type of primary liver cancer after hepatocellular carcinoma (HCC). It is a highly malignant tumor arising from the biliary epithelium, whose incidence is increasing worldwide. CCA is characterized by a high mortality rate, mainly because it is diagnosed in advanced stages of the disease, when surgical resection of the tumor is not possible, and it is among the tumors with more unsatisfactory response to chemotherapy due to the presence of different mechanisms of chemoresistance (MOC).

Identifying selective and specific biomarkers of CCA could facilitate the early diagnosis of these patients and improve their prognosis. In this sense, membrane transporters selectively expressed in cholangiocytes, but not in hepatocytes, could be potential candidates as CCA biomarkers. Preliminary studies carried out by our group have suggested that the expression of the apical sodium and bile acids transporter (ASBT) is preserved in CCA.

Sorafenib is a cationic tyrosine kinase inhibitor (TKI) used for the treatment of advanced HCC. Despite the antitumor efficacy of this TKI against some patients with HCC, the first clinical studies with CCA patients did not show a beneficial effect. Interestingly, our research group has previously demonstrated that the organic cation transporter 1 (OCT1) mediates sorafenib uptake by liver tumor cells and that in both CCA and HCC there is a strong decrease in the expression of this transporter. Our group has also described that the *BIRC5* gene, which encodes the anti-apoptotic protein survivin, is overexpressed in liver tumors, whereas its expression in healthy tissue is very low. The differential expression of *BIRC5* between healthy and tumor tissue could be useful to develop gene therapy strategies in which the expression of the gene of interest (GOI) could be specifically activated in the tumor using the *BIRC5* promoter (*BIRC5pr*).

The development of CCA is favored by the accumulation of genetic and epigenetic alterations in cholangiocytes. The transcription factor SOX17, a well-known inhibitor of the Wnt/ $\beta$ -catenin survival pathway, acts as a tumor suppressor gene in CCA. Moreover, although it is known that other members of the SOX family could modulate the response to chemotherapy in different types of cancers, the role of SOX17 in CCA chemoresistance has not been elucidated yet.

Taking into account this background, we defined as the **global aim** of this Doctoral Thesis the evaluation of the usefulness of the membrane transport protein ASBT as a selective marker of CCA, as well as to investigate the potential interest of

restoring the expression levels of OCT1 and SOX17 in CCA through gene therapy strategies to overcome the marked chemoresistance of this cancer.

To achieve this goal, the following **partial aims** were proposed:

**Aim 1:** To validate the role of ASBT as a specific biomarker of CCA by studying its presence in tumors from animal models of CCA and HCC, as well as in human biopsies of CCA and HCC.

**Aim 2:** To develop and evaluate a gene therapy strategy, based on the overexpression of OCT1 selectively in tumor cells, aimed at improving the response of CCA to sorafenib.

**Aim 3:** To elucidate the effect of SOX17 on the sensitivity of CCA cells to antitumor therapies that are commonly used in clinic for the treatment of this type of cancer, as well as its role in the regulation of the genes involved in MOCs.

**Aim 4:** To develop and evaluate a gene therapy strategy for the tumor-specific overexpression of SOX17 in order to improve the response of CCA to 5-fluorouracil.

## Summary

Cholangiocarcinoma (CCA) is a heterogeneous group of tumors derived from the biliary tract. It is the second most frequent primary liver cancer after hepatocellular carcinoma (HCC). According to their anatomical location, CCAs are classified into: i) intrahepatic CCA (iCCA), derived from cells lining small intrahepatic bile ducts, and two types of extrahepatic CCA (eCCA), both produced in the epithelium of the extrahepatic biliary tract: ii) perihilar and iii) distal CCA (Macias RI 2014; Banales JM *et al.* 2016).

During most part of its development, CCA is generally asymptomatic and, in most cases, it is diagnosed in advanced stages. Late diagnosis limits the effective therapeutic options, which are based on surgical resection of the tumor or liver transplantation. Moreover, CCA patients usually do not respond to the available chemotherapy due to the marked chemoresistance of this type of tumor (Marin JJG *et al.* 2018). As a consequence, these patients have a very bad prognosis with an overall survival <12 months.

Diagnosis of CCA is based on a combination of clinical, biochemical, radiological and histological information but, in some cases, it is not possible to discriminate between iCCA and HCC or between dCCA and pancreatic ductal adenocarcinoma (Macias RI 2014; Bledsoe JR *et al.* 2015). Differential diagnosis of CCA is essential to ensure that patients receive the most appropriate treatment. Unfortunately, specific biomarkers for CCA have not been found yet.

The ASBT protein (*SLC10A2* gene) is a bile acid transporter mainly expressed in the ileum, where it carries out the reabsorption of these molecules from the intestinal lumen into portal blood circulation. Within the hepatobiliary system, ASBT is expressed exclusively in cholangiocytes, but not in hepatocytes (Alpini G *et al.* 1997; Luo ZL *et al.* 2019). Preliminary studies of our group suggested that, unlike other hepatic transporters whose expression usually decreases during tumor development (Kullak-Ublick GA *et al.* 2004) (Ballesterro MR *et al.* 2006), ASBT mRNA levels are preserved in CCA (Lozano E *et al.* 2015).

Together with the late diagnosis, another reason for the adverse prognosis of CCA patients is the lack of response to chemotherapy. This fact highlights the need to identify the mechanisms of chemoresistance (MOCs) in CCA in order to develop new and more effective therapeutic strategies.

Sorafenib is a tyrosine kinase inhibitor (TKI) used as the drug of choice for the treatment of advanced HCC (Llovet JM *et al.* 2008). Regarding CCA, sorafenib has shown antitumor activity in experimental *in vitro* and *in vivo* CCA models; however, contradictory results have been reported in clinical trials in patients with CCA, which justifies why the FDA has not approved its use for this type of tumor. The lack of response of CCA to sorafenib could be the result of the combined action of different MOCs. Our group has previously demonstrated that the organic cation transporter 1 (OCT1) (*SLC22A1* gene), a protein that is expressed in the basolateral membrane of hepatocytes (Gorboulev V *et al.* 1997) and cholangiocytes (Nies AT *et al.* 2009), mediates the uptake of sorafenib (Herraez E *et al.* 2013), but OCT1 gene expression is downregulated in HCC, CCA and hepatoblastoma (HB) (Martinez-Becerra P *et al.* 2012).

SOX17 is a transcription factor that participates in the differentiation of cholangiocytes during embryonic development. It is known that SOX17 expression decreases in CCA mainly due to the aberrant hypermethylation of its promoter in tumor cells. On the other hand, experimental restoration of its expression blocks tumor growth *in vivo*, by activating apoptosis and inhibiting the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, which suggests that SOX17 acts as a tumor suppressor in CCA (Merino-Azpitarte M *et al.* 2017). Although the role of other members of SOX family in drug resistance is well-known, whether SOX17 modulates CCA chemoresistance has not been elucidated.

In this Doctoral Thesis, we have investigated the potential use of ASBT expression as a specific biomarker for CCA and we have designed different gene therapy strategies, based on the upregulation of OCT1 or SOX17 gene levels, to overcome CCA chemoresistance. The results of this work can be summarized as follows:

## **2. Development of a gene therapy strategy to overcome the lack of response of CCA to sorafenib:**

In a first step, we have demonstrated that *SLC22A1* downregulation in human CCA is not dependent on its anatomical location since the expression of the OCT1 gene was significantly reduced in iCCA and eCCA compared with NT tissue, whereas no significant differences were found between the two types of CCA. Accordingly, we decided to use EGI-1 and TFK-1 cells from eCCA and HuCCT1 cells from iCCA as *in vitro* models. To demonstrate the previously described role of OCT1 in sorafenib uptake (Herraez E *et al.* 2013) in a more robust cell model, we transduced three cell lines with lentiviral vectors encoding human OCT1 (OCT1 cells) or empty vectors (Mock cells). RT-qPCR analysis confirmed the overexpression of *SLC22A1*, and its transport activity was



determined by measuring the ability of cells to take up dihydroethidium (DHE), a cationic substrate of OCT1, by flow cytometry (Al-Abdulla R *et al.* 2019). Intracellular DHE accumulation was higher in OCT1 expressing cells in comparison with Mock cells and was specifically inhibited by co-incubation with quinine, a specific OCT1 inhibitor. Besides, OCT1 overexpression was accompanied by an increased ability of these CCA cells to take up sorafenib, in comparison with Mock cells. To demonstrate that the presence of OCT1 increases intracellular sorafenib content and thus its cytostatic effect *in vitro*, Mock and OCT1 overexpressing cells were incubated with this drug for only 6 h and cell viability was determined 66 h later. We observed that OCT1 cells were significantly more sensitive to sorafenib than Mock cells.

Based on these results, we decided to develop a gene therapy strategy to restore OCT1 expression in CCA in order to improve sorafenib antitumor activity. One of the main limitations of gene therapy is the unspecific induction of the GOI in extra-tumor tissues. To avoid this problem, we developed adenoviral vectors encoding the human OCT1 gene under the transcriptional control of a tumor-specific promoter: *BIRC5* promoter (*BIRC5pr*) (*Ad-prBIRC5-OCT1*). *BIRC5* gene encodes survivin, an anti-apoptotic protein overexpressed in liver tumors, including CCAs (Martinez-Becerra P *et al.* 2012). In this work we have demonstrated that levels of *BIRC5* gene and protein are significantly higher in CCA cell lines than in NHCs and healthy liver, respectively, where a low expression of this gene was found. In addition, luciferase-reporter assays revealed that *BIRC5pr* is as active as the potent and constitutive promoter *CMVpr*.

To evaluate the ability of the adenoviral vector *Ad-BIRC5pr-OCT1* to induce OCT1 expression *in vitro*, cells were transduced with increasing concentrations of these adenoviruses. Cells transduced with *Ad-BIRC5pr-EGFP* (empty) vectors were used as control cells (Mock cells). RT-qPCR and western blot analyses showed that *Ad-BIRC5pr-OCT1* increased OCT1 expression both at mRNA and protein levels. OCT1 transporter was correctly located in the plasma membrane in these cells, as revealed by immunofluorescence analysis. Finally, cells transduced with *Ad-BIRC5pr-OCT1* were able to take up more sorafenib than Mock cells. Therefore, we concluded that the adenoviruses bearing *BIRC5pr-OCT1* construct were capable of inducing the expression of OCT1 *in vitro*, resulting in the translation of a fully functional protein that transports sorafenib.

Finally, we carried out an *in vivo* chemosensitization approach based on the induction of OCT1 expression in CCA. We performed subcutaneous implantation of human CCA EGI-1 cells in a nude mouse. When the tumor reached the desired size

(approximately, 0,75 cm<sup>3</sup>), it was used as a donor to perform orthotopic implants of small tumor fragments into the liver of other recipient mice. The day after, the animals were divided into four experimental groups: "Control", which received saline solution i.p.; "Sorafenib", treated with 10 mg/kg b.w. of this drug; "Ad-*BIRC5pr-OCT1*", which received adenovirus *BIRC5pr-OCT1* i.v. every 5 days; and "Ad-*BIRC5pr-OCT1* + sorafenib", which received pharmacological treatment combined with viral therapy. "Control" and "Sorafenib" groups also received i.v. injections of empty adenoviruses. After two months of treatment, animals were sacrificed.

In order to study whether *BIRC5pr* induced the expression of OCT1 exclusively in tumor tissue, mRNA levels of this transporter were determined by RT-qPCR in tumor and NT tissue. Overexpression of OCT1 was found only in tumors in comparison with the hepatic NT region. Besides, immunofluorescence analysis showed that the administration of adenovirus *Ad-BIRC5pr-OCT1* induced the expression of the transporter in the plasma membrane of tumor cells, whereas no OCT1 signal was detected in adjacent NT liver. These results demonstrated that *BIRC5pr* effectively induced a selective expression of OCT1 in CCA tumors. We also showed that OCT1 overexpression did not enhance the antiangiogenic activity of sorafenib. OCT1 overexpression was not found in endothelial cells and vascular density was not reduced in tumors after treatment with *Ad-BIRC5pr-OCT1* plus sorafenib, in comparison with tumors receiving *Ad-BIRC5pr-OCT1* alone. Regarding the antiproliferative action of sorafenib, treatment with this TKI or the administration of *Ad-BIRC5pr-OCT1* alone did not affect tumor growth *in vivo*. However, combined treatment of sorafenib and adenoviral vectors encoding OCT1 significantly inhibited tumor growth, which suggests that OCT1 overexpression improves the response of CCA to sorafenib *in vivo* (Lozano E *et al.* 2019).

## Conclusions

### First conclusion:

In CCA the expression of the bile acid transporter ASBT is higher than in adjacent non-tumor tissue, whereas this protein is poorly expressed in HCC. Accordingly, immunodetection of ASBT together with another cholangiolar marker, such as CK-7 might be useful for the differential diagnosis of CCA and HCC.

### Second conclusion:

Gene therapy-induced selective expression of OCT1 in CCA cells but not in adjacent non-tumor liver tissue or other healthy organs, constitutes, at least in animal models, an effective strategy to improve the antiproliferative response of CCA cells to sorafenib.

### Third conclusion:

The transcription factor SOX17 is involved in the chemoresistance of CCA by enhancing the sensitivity of CCA cells to antitumor drugs due to downregulation and subsequent reduction in the transport activity of the drug export pumps MRP3 (*ABCC3* gene) and BCRP (*ABCG2* gene), which favors the accumulation of active agents in tumor cells and subsequently enhances their pharmacological activity.

### Fourth conclusion:

SOX17-induced MRP3 and BCRP downregulation is due in part to both direct and indirect interaction of this transcription factor with the promoter region of *ABCC3* and *ABCG2* genes. Moreover, the transcriptional activity of *ABCC3* promoter is regulated by other members of the SOX family, such as SOX2 and SOX9 that act in an antagonistic manner with SOX17, and whose expression in CCA, in contrast to that of SOX17, is markedly high.

### Fifth conclusion:




Restoring SOX17 expression in CCA cells by gene therapy constitutes an efficient therapeutic approach to treat this cancer owing to the double activity of SOX17, able to induce both tumor suppression and selective enhancement of the pharmacological activity of anticancer drugs that are substrate of MRP3, such as 5-FU.

## References

- Al-Abdulla R, Lozano E, Macias RIR, Monte MJ, Briz O, *et al.* (2019). Epigenetic events involved in organic cation transporter 1-dependent impaired response of hepatocellular carcinoma to sorafenib. *Br J Pharmacol* **176**(6): 787-800.
- Alpini G, Glaser SS, Rodgers R, Phinizy JL, Robertson WE, *et al.* (1997). Functional expression of the apical Na<sup>+</sup>-dependent bile acid transporter in large but not small rat cholangiocytes. *Gastroenterology* **113**(5): 1734-1740.
- Ballesterro MR, Monte MJ, Briz O, Jimenez F, Gonzalez-San Martin F, *et al.* (2006). Expression of transporters potentially involved in the targeting of cytostatic bile acid derivatives to colon cancer and polyps. *Biochem Pharmacol* **72**(6): 729-738.
- Banales JM, Cardinale V, Carpino G, Marzioni M, Andersen JB, *et al.* (2016). Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **13**(5): 261-280.
- Bledsoe JR, Shinagare SA and Deshpande V (2015). Difficult Diagnostic Problems in Pancreatobiliary Neoplasia. *Arch Pathol Lab Med* **139**(7): 848-857.
- Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbach U, *et al.* (1997). Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol* **16**(7): 871-881.
- Grimm D, Bauer J, Wise P, Kruger M, Simonsen U, *et al.* (2019). The role of SOX family members in solid tumours and metastasis. *Semin Cancer Biol*. In press.
- Herraez E, Lozano E, Macias RI, Vaquero J, Bujanda L, *et al.* (2013). Expression of SLC22A1 variants may affect the response of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma to sorafenib. *Hepatology* **58**(3): 1065-1073.
- Kullak-Ublick GA, Stieger B and Meier PJ (2004). Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* **126**(1): 322-342.
- Lozano E, Macias RIR, Monte MJ, Asensio M, Del Carmen S, *et al.* (2019). Causes of hOCT1-Dependent Cholangiocarcinoma Resistance to Sorafenib and Sensitization by Tumor-Selective Gene Therapy. *Hepatology*. In press.
- Lozano E, Monte MJ, Briz O, Hernandez-Hernandez A, Banales JM, *et al.* (2015). Enhanced antitumour drug delivery to cholangiocarcinoma through the apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT). *J Control Release* **216**: 93-102.
- Lozano E, Sanchez-Vicente L, Monte MJ, Herraez E, Briz O, *et al.* (2014). Cocarcinogenic effects of intrahepatic bile acid accumulation in cholangiocarcinoma development. *Mol Cancer Res* **12**(1): 91-100.
- Luo ZL, Cheng L, Wang T, Tang LJ, Tian FZ, *et al.* (2019). Bile Acid Transporters Are Expressed and Heterogeneously Distributed in Rat Bile Ducts. *Gut Liver*. In press.

- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, *et al.* (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* **359**(4): 378-390.
- Macias RI (2014). Cholangiocarcinoma: Biology, Clinical Management, and Pharmacological Perspectives. *ISRN Hepatol* **2014**: 828074.
- Marin JJG, Lozano E, Herraes E, Asensio M, Di Giacomo S, *et al.* (2018). Chemoresistance and chemosensitization in cholangiocarcinoma. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1864**(4 Pt B): 1444-1453.
- Martinez-Becerra P, Vaquero J, Romero MR, Lozano E, Anadon C, *et al.* (2012). No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors. *Mol Pharm* **9**(6): 1693-1704.
- Merino-Azpitarte M, Lozano E, Perugorria MJ, Esparza-Baquer A, Erice O, *et al.* (2017). SOX17 regulates cholangiocyte differentiation and acts as a tumor suppressor in cholangiocarcinoma. *J Hepatol* **67**(1): 72-83.
- Monte MJ, Dominguez S, Palomero MF, Macias RI and Marin JJ (1999). Further evidence of the usefulness of bile acids as molecules for shuttling cytostatic drugs toward liver tumors. *J Hepatol* **31**(3): 521-528.
- Nies AT, Koepsell H, Winter S, Burk O, Klein K, *et al.* (2009). Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology* **50**(4): 1227-1240.
- Takeda K, Mizushima T, Yokoyama Y, Hirose H, Wu X, *et al.* (2018). Sox2 is associated with cancer stem-like properties in colorectal cancer. *Sci Rep* **8**(1): 17639.
- Yuan X, Li J, Coulouarn C, Lin T, Sulpice L, *et al.* (2018). SOX9 expression decreases survival of patients with intrahepatic cholangiocarcinoma by conferring chemoresistance. *Br J Cancer* **119**(11): 1358-1366.

# Causes of hOCT1-Dependent Cholangiocarcinoma Resistance to Sorafenib and Sensitization by Tumor-Selective Gene Therapy

Elisa Lozano,<sup>1,7</sup> Rocío I.R. Macías <sup>1,7</sup>, Maria J. Monte,<sup>1,7</sup> Maitane Asensio,<sup>1</sup> Sofia del Carmen,<sup>2</sup> Laura Sanchez-Vicente,<sup>1</sup> Marta Alonso-Peña,<sup>1</sup> Ruba Al-Abdulla,<sup>1</sup> Patricia Munoz-Garrido,<sup>3</sup> Letizia Satriano,<sup>3</sup> Colm J. O'Rourke,<sup>3</sup> Jesus M. Banales,<sup>4,7</sup> Matias A. Avila,<sup>5,7</sup> Maria L. Martinez-Chantar,<sup>6,7</sup> Jesper B. Andersen <sup>3</sup>, Oscar Briz,<sup>1,7</sup> and Jose J.G. Marin <sup>1,7</sup>

Although the multi-tyrosine kinase inhibitor sorafenib is useful in the treatment of several cancers, cholangiocarcinoma (CCA) is refractory to this drug. Among other mechanisms of chemoresistance, impaired uptake through human organic cation transporter type 1 (hOCT1) (gene *SLC22A1*) has been suggested. Here we have investigated the events accounting for this phenotypic characteristic and have evaluated the interest of selective gene therapy strategies to overcome this limitation. Gene expression and DNA methylation of *SLC22A1* were analyzed using intrahepatic (iCCA) and extrahepatic (eCCA) biopsies (Copenhagen and Salamanca cohorts; n = 132) and The Cancer Genome Atlas (TCGA)-CHOL (n = 36). Decreased *hOCT1* mRNA correlated with hypermethylation status of the *SLC22A1* promoter. Treatment of CCA cells with decitabine (demethylating agent) or butyrate (histone deacetylase inhibitor) restored hOCT1 expression and increased sorafenib uptake. MicroRNAs able to induce *hOCT1* mRNA decay were analyzed in paired samples of TCGA-CHOL (n = 9) and Copenhagen (n = 57) cohorts. Consistent up-regulation in tumor tissue was found for miR-141 and miR-330. High proportion of aberrant *hOCT1* mRNA splicing in CCA was also seen. Lentiviral-mediated transduction of eCCA (EGI-1 and TFK-1) and iCCA (HuCCT1) cells with hOCT1 enhanced sorafenib uptake and cytotoxic effects. In chemically induced CCA in rats, reduced rOCT1 expression was accompanied by impaired sorafenib uptake. In xenograft models of eCCA cells implanted in mouse liver, poor response to sorafenib was observed. However, tumor growth was markedly reduced by cotreatment with sorafenib and adenoviral vectors encoding hOCT1 under the control of the *BIRC5* promoter, a gene highly up-regulated in CCA. **Conclusion:** The reason for impaired hOCT1-mediated sorafenib uptake by CCA is multifactorial. Gene therapy capable of selectively inducing hOCT1 in tumor cells can be considered a potentially useful chemosensitization strategy to improve the response of CCA to sorafenib. (HEPATOLOGY 2019;0:1-16).

**B**iliary tract cancers are a type of heterogeneous tumors that include cholangiocarcinoma (CCA), both intrahepatic (iCCA) and extrahepatic (eCCA), and gallbladder cancer, with diverse phenotypic characteristics.<sup>(1)</sup> CCA, whose incidence is increasing worldwide, is currently the

*Abbreviations:* CCA, cholangiocarcinoma; DAC, decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine); eCCA, extrahepatic CCA; DHE, dihydroethidium; DMSO, Dimethyl sulfoxide; EGFP, enhanced green fluorescent protein; HCC, hepatocellular carcinoma; hOCT1, human organic cation transporter type 1; HDAC, histone deacetylases; iCCA, intrahepatic CCA; miR-seq, miRNA-sequencing; MOC, mechanism of chemoresistance; NT, nontumor; OCT1, organic cation transporter 1; RBPs, RNA binding proteins; SNP, single nucleotide polymorphism; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; T, tumor; TAA, thioacetamide; TCGA, The Cancer Genome Atlas; TEA, tetraethylammonium; TKI, tyrosine kinase inhibitor; TSA, trichostatin A; UTR, untranslated region.

Received June 27, 2018; accepted April 4, 2019.

Additional Supporting Information may be found at [onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.30656/supinfo](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.30656/supinfo).

Supported by the Carlos III Institute of Health, Spain (Grants PI15/00179, PI16/00598 and PI18/01075 cofinanced by European Regional Development Fund); Ministry of Science and Innovation, Spain (SAF2013-40620-R and SAF2016-75197-R); "Asociación Española Contra el Cáncer," Spain (AECC-2017); "Junta de Castilla y León," Spain (SA015U13 and SA063P17); "Fundación Samuel Solórzano Barruso," Spain (FS/10-2014, FS/08-2017 and FS/13-2017); "Fundación Mutua Madrileña," Spain (Call 2015); "Fundación Vasca de Innovación e Investigación Sanitarias," Spain (Bioef BIO15/CA/011); "Ministerio de Economía, Industria y Competitividad," Spain (SAF2017-87301-R); "Gobierno Vasco-Departamento de Salud," Spain (2013111114); and Basque Foundation for Innovation and Health Research: EiTB Maratoia,

second most frequent primary hepatic malignancy after hepatocellular carcinoma (HCC). Surgical resection constitutes the best option for complete cure. However, owing to the lack of accurate noninvasive CCA markers and to the fact that these tumors grow up asymptotically, they are often detected at an unresectable advanced stage.<sup>(2,3)</sup> This partly accounts for the very poor prognosis of this cancer, from which most patients die within 12 months after diagnosis. Classical chemotherapy offers a 5-year survival rate lower than 10%, which is due to the negligible degree of response of all types of CCA to available chemotherapeutic regimens.<sup>(4,5)</sup> Gemcitabine plus cisplatin has become the reference regimen for systemic chemotherapy in patients with biliary tract cancers<sup>(6)</sup>; nonetheless, this chemotherapy is poorly effective. Therefore, it is essential to understand the molecular bases of the strong chemoresistance of CCA and to seek new therapeutic approaches. Despite their heterogeneity regarding several clinical and biological aspects, biliary cancers share their marked chemoresistance. Among the so-called targeted therapies, sorafenib, a multitargeted tyrosine kinase inhibitor (TKI) that blocks the activity of Raf serine/threonine kinase isoforms, as well as vascular endothelial growth factor receptor-2/3, platelet-derived growth factor receptor, c-KIT, FLT-3, and RET, to inhibit

tumor angiogenesis and tumor cell proliferation,<sup>(7,8)</sup> has been approved for the treatment of HCC.<sup>(9)</sup> Sorafenib is one of the few TKIs that is active even against mutated BRAF, which appears with a high frequency in CCA, especially in iCCA. Moreover, sorafenib has been reported to have some anticancer activity against CCA in experimental models both *in vitro* and *in vivo*, which has not been consistently confirmed in clinical studies.<sup>(10-14)</sup> The lack of response of patients with CCA to sorafenib may be the result of the combined action of several mechanisms of chemoresistance (MOCs).<sup>(5)</sup> We have demonstrated that the organic cation transporter 1 (hOCT1, *SLC22A1* gene) can play a key role in sorafenib effectiveness because the mechanism of action of this drug depends on its access to the intracellular domains of the tyrosine kinases that are inhibited by sorafenib.<sup>(15)</sup> Moreover, hOCT1 mediates the uptake of this drug by target cells.<sup>(15)</sup> Of note, it has been demonstrated that decreased expression of hOCT1 constitutes a shared characteristic of liver tumors (HCC, CCA, and hepatoblastoma).<sup>(16)</sup> In addition, not all synthesized *hOCT1* mRNA is translated into functional protein because of the high proportion of inactive variants that are generated as a result of alternative splicing mechanisms or single-nucleotide polymorphisms (SNPs).<sup>(15)</sup>

*Spain (BIO15/CA/016/BD). E.L. was supported by a postdoctoral contract by "University of Salamanca," Spain (2018). M.A. and M.A.P. were supported by a predoctoral contract by "Ministry of Education, Culture and Sports," Spain (BOE-A-2015-9456). R.A.A. was supported by a predoctoral contract funded by the "Junta de Castilla y León, Fondo Social Europeo" (EDU/828/2014). J.B.A. is supported by the Danish Cancer Society (R98-A6446); Novo Nordisk Foundation (14040); P.M.G.: European Association for the Study of the Liver (EASL) individual Sheila Sherlock Postdoc Fellowship, Marie Skłodowska-Curie Fellowships (MirChol and Epi-Target). C.J.O. is funded by MSCA postdoc fellowship.*

© 2019 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).

DOI 10.1002/hep.30656

Potential conflict of interest: Nothing to report.

## ARTICLE INFORMATION:

From the <sup>1</sup>Experimental Hepatology and Drug Targeting (HEVEFARM), IBSAL, University of Salamanca, Salamanca, Spain; <sup>2</sup>Salamanca University Hospital, IBSAL, University of Salamanca, Salamanca, Spain; <sup>3</sup>Biotech Research and Innovation Centre, Department of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark; <sup>4</sup>Department of Hepatology and Gastroenterology, Biodonostia Health Research Institute, Donostia University Hospital, University of the Basque Country (UPV/EHU), Ikerbasque, San Sebastian, Spain; <sup>5</sup>Hepatology Programme, Center for Applied Medical Research (CIMA), IDISNA, University of Navarra, Pamplona, Spain; <sup>6</sup>Liver Disease Laboratory, CIC bioGUNE, Technology Park of Vizcaya, Vizcaya, Spain; <sup>7</sup>National Institute for the Study of Liver and Gastrointestinal Diseases (CIBERehd), Carlos III National Health Institute, Madrid, Spain.

## ADDRESS CORRESPONDENCE AND REPRINT REQUESTS TO:

Jose J.G. Marin, Ph.D.  
Department of Physiology and Pharmacology  
Campus Miguel de Unamuno E.I.D. S-09

37007 Salamanca, Spain  
E-mail: [jjgmarin@usal.es](mailto:jjgmarin@usal.es)  
Tel.: +1-34-663182872

In the present study, we have evaluated the hypothesis that mechanisms that cause impaired hOCT1 expression/function in CCA may be involved in the lack of response of these tumors to sorafenib, and we have investigated the usefulness of epigenetic manipulation and gene therapy in order to sensitize CCA to this drug by selectively enhancing hOCT1 expression in cancer cells under the control of a tumor-specific promoter.

## Materials and Methods

### HUMAN SAMPLES AND DATA

Whole transcriptome profiling was performed using human *Ref-8v2 BeadChips* (Illumina) on 68 iCCA and 36 eCCA surgical specimens (T) and 60 samples from adjacent nontumor tissue (NT), as described (GEO: GSE26566; “Copenhagen cohort” of patients).<sup>(17)</sup> For a subset of these patients (T = 48, NT = 41), DNA methylation profiling was performed using *Infinium HumanMethylation27 BeadChip* (Illumina). The methylation status of the hOCT1 promoter was measured using beta ( $\beta$ )-value metric (range: 0-1; 0%-100% methylation) (see detailed description in Supporting Information). To further investigate the degree of DNA hypermethylation in hOCT1, level 1 *Infinium HumanMethylation450 BeadChip* (Illumina Inc.) data (T = 36 and NT = 9) obtained from The Cancer Genome Atlas (TCGA)-CHOL consortium<sup>(18)</sup> were analyzed. For an extended subset of the “Copenhagen cohort,” miRNA-sequencing (miR-seq) data were also available for 57 paired T and NT samples and 22 normal livers. For some analyses, we have used specimens of iCCA (n = 16) and eCCA (n = 12) and paired NT samples (n = 17) obtained after tumor resection at University Hospital of Salamanca (“Salamanca cohort,” see Supporting Table S1). Research protocols were approved by the Ethical Committees for Clinical Research of supporting institutions, and all patients signed written consents for the use of their samples for biomedical research.

### ANIMALS AND *IN VIVO* EXPERIMENTS

Male Wistar rats (University of Salamanca Animal House) and female nude mice (Swiss *nu/nu*; Charles

River Laboratories, Barcelona) were used. Nude mice were maintained under pathogen-free environment and handled under stringent sterile conditions. The animals were fed on standard rat or mouse chow (Panlab, Madrid) and water *ad libitum*. Temperature (20°C) and the light/dark cycle (12 hours:12 hours) were controlled and the protocols were approved by the Ethical Committee of the University of Salamanca. To study sorafenib uptake by CCA, this tumor was induced in rats by including 0.05% thioacetamide (TAA) in the drinking water for 30 weeks<sup>(19)</sup> (Supporting Information). Xenografts of CCA in nude mice were generated by subcutaneous injection of  $\approx 1 \times 10^6$  human EGI-1 eCCA cells to donor nude mice under isoflurane anesthesia. EGI-1 cells were selected because of their acceptable tumorigenesis ability *in vivo* as compared with TFK-1 and HuCCT1 cells. Seven weeks later, generated CCA tumors were resected and dissected into  $\sim 1 \text{ mm}^3$  pieces that were implanted under anesthesia in the livers of several host nude mice.<sup>(20)</sup> The following day, the animals were randomly divided into four groups for the coadministration of control adenoviruses (Ad-Mock: Ad-*BIRC5pr*-enhanced green fluorescent protein [EGFP]) or adenoviruses containing Ad-*BIRC5pr*-hOCT1-EGFP plus sorafenib or the vehicle alone (saline). Additional control mice were used to measure serum levels of routine biochemical parameters for comparative purposes. Adenoviral particles (VP) were injected every 5 days ( $4 \times 10^7$  VP/mice in each administration, intravenously through the tail vein). Sorafenib (10 mg/kg body weight) or saline were administered (intraperitoneally) twice per week. At the end of the experiment (after 2 months), the animals were anesthetized with sodium pentobarbital to measure the tumor volume and to collect tissues and blood samples. Serum levels of routine biochemical parameters were determined in a dry chemistry automated analyzer Spotchem EZ SP-4430 (Arkray Factory, A. Menarini Diagnostics, Badalona, Spain).

### LENTIVIRAL AND ADENOVIRAL VECTORS

The human OCT1 open reading frame (ORF) was amplified from total RNA isolated from healthy liver by reverse transcription followed by high-fidelity PCR using AccuPrime Pfx DNA polymerase (Life Technologies) and specific primers (Supporting Table S2). OCT1 ORF



was cloned into the *PacI* site of the pWPI lentiviral vector (that contains the constitutive EF1 $\alpha$  promoter). Recombinant lentiviruses production and lentiviral transduction are described in the Supporting Information.

The promoter region of the *BIRC5* gene (*BIRC5pr*, 1467-bp zone of the 5'-flanking region) was cloned from human hepatoma PLC/PRF/5 (Alexander) cells using AccuPrime Pfx DNA polymerase, and specific oligonucleotide primers (Supporting Table S2). The cloning procedure is described in detail in the Supporting Information.

## IN VITRO EXPERIMENTS

Cells transduced with lentiviral vectors (Lent-MOCK or Lent-OCT1) were seeded onto 96-well plates at subconfluence (5,000 to 7,500 cells/dish). After 24 hours, the cells were exposed to 5  $\mu$ M sorafenib for 6 hours. The formazan test using thiazolyl blue tetrazolium bromide (Sigma-Aldrich) was used to determine cell viability 66 hours later.

The transport function of hOCT1 was measured by the uptake of organic cations, such as dihydroethidium (DHE, 5  $\mu$ M) by flow cytometry and [<sup>14</sup>C]-tetraethylammonium (TEA; 150  $\mu$ M) by radioactivity determination. Specific hOCT1 inhibition was determined using quinine (250  $\mu$ M). Sorafenib (5  $\mu$ M) uptake was also determined using an adaptation of a published method using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS).<sup>(15)</sup> In uptake experiments, the results were corrected by protein content.<sup>(21)</sup>

The role of miRNAs potentially involved in regulating hOCT1 expression was studied in EGI-1 and TFK-1 cells, using lentivirus designed to mimic the pre-miRNA (hsa-mir-141/330/1468) sequence including the loop (Supporting Information).

## QUANTITATIVE RT-PCR (RT-QPCR)

Total RNA extraction from cells and tissues and retro-transcription were performed as described<sup>(16)</sup> (Supporting Information). The primer oligonucleotide sequences to carry out QPCR are described in Supporting Table S3. The results of mRNA abundance of target genes in each sample were normalized on the basis of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), hypoxanthine-guanine phos-

phoribosyltransferase (*HPRT1*), or *rat*  $\beta$ -actin (*ACTB*) mRNA abundance.

## IMMUNOFLUORESCENCE AND IMMUNOBLOTTING ASSAYS

Immunofluorescent staining was performed on tissue cryosections air-dried and fixed in cold methanol using appropriate antibodies against hOCT1, platelet/endothelial cell adhesion molecule 1, and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Confocal laser-scanning microscopy was performed using a Leica TCS SP2 confocal microscope. Immunoblotting analyses of cell lysates were carried out in 10–12% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, loading 30  $\mu$ g of protein per lane. Appropriate primary antibodies for survivin and GAPDH were diluted in phosphate-buffered saline-Tween. Immunoreactive protein bands were visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech) after incubation with appropriate secondary antibodies (immunoglobulin G-horseradish peroxidase linked). See Supporting Information for antibodies characteristics and conditions.

## DETERMINATION OF ALTERNATIVE SPLICING

Based on previous reports of alternative spliced hOCT1 variants,<sup>(15)</sup> we designed primers annealing in exon 6 (Forward) and exon 11 (Reverse) that are shared by all hOCT1 isoforms (Supporting Table S3). PCR was carried out with Platinum-Taq DNA polymerase (Life Technologies) using 30 cycles of amplification. The presence and size of the PCR products were determined by gel electrophoresis, and a semi-quantitative determination of the amount of each splicing variant was carried out by densitometry of the bands using a LAS-4000 luminescent image analyzer.

## STATISTICAL ANALYSES

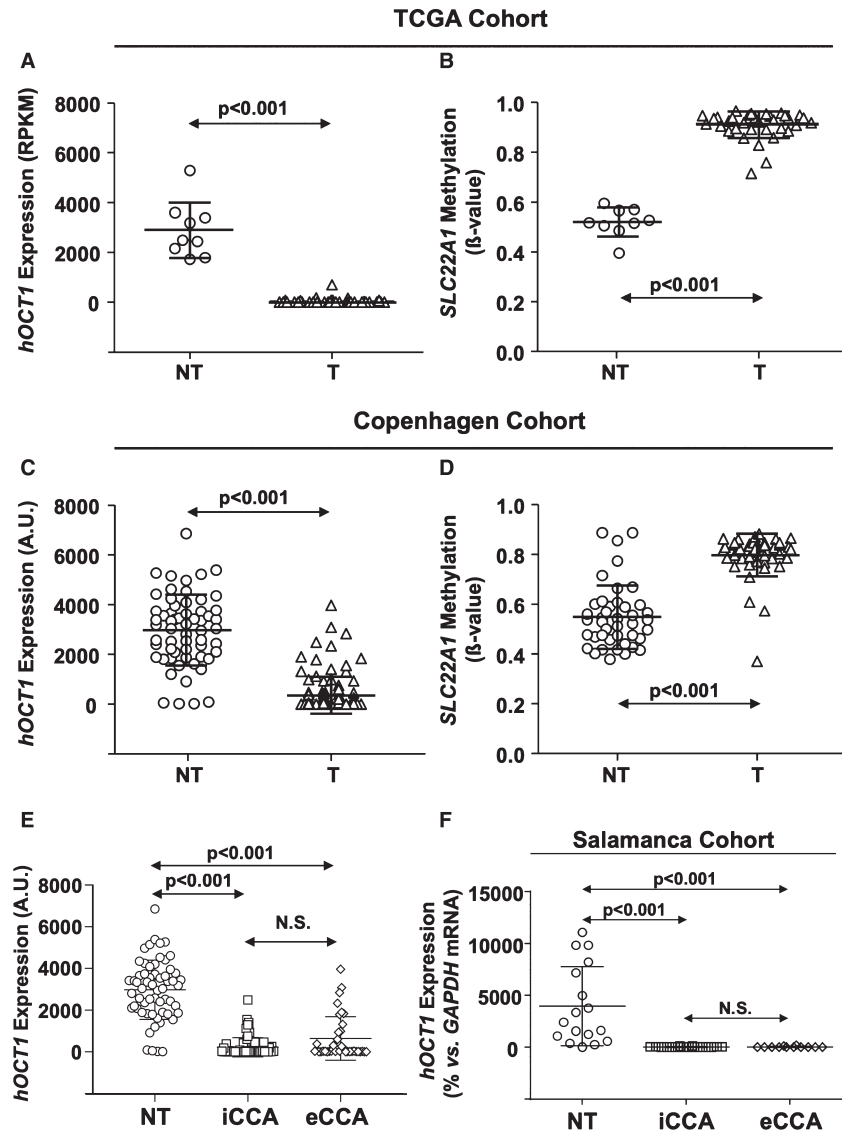
Results were statistically analyzed using GraphPad program. For comparisons between two groups, parametric paired *t* test or Student *t* test and nonparametric Mann-Whitney U test were used. After analysis of variance, Bonferroni method of multiple-range testing was used to calculate the statistical significance of differences among groups.

## Results

### ROLE OF DNA METHYLATION IN HOCT1 DOWN-REGULATION

The relationship between hOCT1 expression and the methylation status of the *SLC22A1* promoter was analyzed in resected CCA specimens from two

different cohorts of patients: (1) TCGA-CHOL, including TCGA Infinium 450k data, and (2) the “Copenhagen cohort.” We have confirmed hOCT1 down-regulation in CCA versus peritumor tissue in both cohorts (Fig. 1A,C). hOCT1 promoter was significantly hypermethylated in CCA (using the probe cg27292431, corresponding to exon 1 of *SLC22A1*) compared with peritumor tissue (Fig. 1B,D). Owing



**FIG. 1.** *hOCT1* expression and promoter methylation in CCA. Levels of *hOCT1* mRNA (A,C) determined by microarray and methylation status (B,D) in tumor (T) compared with paired non-tumor (NT) tissue analyzed in (A,B) TCGA-CHOL (NT, n = 9; T, n = 36) and (C,D) Copenhagen cohort (NT, n = 60; T, n = 104). Methylation was determined using cg27292431 probe at exon 1 of *SLC22A1*. Values are individual measurements of T (open triangles) and NT (open circles) samples or mean ± SD (solid lines). Comparison between T and NT was carried out using Mann-Whitney U test. Separate analysis of hOCT1 expression in iCCA and eCCA tumors and adjacent NT liver tissue in (E) the Copenhagen cohort (iCCA, n = 68; eCCA, n = 36; NT, n = 60) and (F) the Salamanca cohort (iCCA, n = 16; eCCA, n = 12; NT, n = 17). Values are represented as mean ± SD. Abbreviations: A.U., arbitrary units; RPKM, reads per kilobase mapped. N.S., no significant difference ( $P > 0.05$ ).

to the importance of the location of CpG dinucleotide hypermethylation in relationship to gene expression, we analyzed 450k data from TCGA-CHOL, which provides increased hOCT1 promoter coverage. Accordingly, we uncovered three additional hypermethylated probes mapping to the transcriptional start site and 5'-untranslated region (UTR) of hOCT1 (Supporting Fig. S1). When, both in the "Copenhagen cohort" (Fig. 1E) and the "Salamanca cohort" (Fig. 1F), hOCT1 expression was analyzed separately in iCCA and eCCA, similar marked down-regulation in both types of tumors was found.

### IN VITRO hOCT1 EXPRESSION

To investigate the functional impact of *SLC22A1* hypermethylation, CCA cell lines also with markedly reduced *hOCT1* mRNA levels<sup>(15,16)</sup> were treated with decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) (DAC). This DNA demethylating agent restored hOCT1 expression in EGI-1 (Fig. 2A) and TFK-1 (Fig. 2B) cells. Because acetylation of histones facilitates gene expression and histone deacetylases (HDACs) are overexpressed in CCA cells, which leads to a reduced expression of genes involved in differentiation,<sup>(22)</sup> we evaluated whether HDAC inhibitors (HDACI) could affect *hOCT1* mRNA expression in CCA cells. Sodium butyrate induced hOCT1 up-regulation in both EGI-1 (Fig. 2C) and TFK-1 (Fig. 2D) cells. The magnitude of the effect after 5 days of treatment was DAC>butyrate in EGI-1 cells but butyrate>DAC in TFK-1 cells. Other HDACIs, such as phenyl butyrate, increased *hOCT1* mRNA levels, but only in TFK-1 cells and to a lesser extent than butyrate, whereas trichostatin A had no significant effect in any of these cell lines (Fig. 2C,D). Using EGI-1, in which DAC effect was stronger, it was demonstrated that the recovery of hOCT1 expression was accompanied by enhanced sorafenib uptake (Fig. 2E).

### ROLE OF microRNA IN hOCT1 DOWN-REGULATION

In a separate study, we have carried out *in silico* analysis of microRNA-induced *hOCT1* mRNA decay. Among six selected microRNAs, only three showed activity in HepG2 hepatoma cells.<sup>(23)</sup> Here, we have shown that the same microRNAs, i.e., 141, 1468, and 330, reduced *hOCT1* mRNA in EGI-1 (Fig. 2F) and TFK-1 (Fig. 2G) cells. The expression of these three

microRNAs in paired T and NT specimens from both TCGA-CHOL and the extended "Copenhagen cohort" was analyzed and compared with that of *hOCT1* (Fig. 3). Both miR-141 and miR-330 were consistently up-regulated in both groups of CCA. In the same paired specimens, *hOCT1* mRNA was consistently decreased (Fig. 3F,L). In contrast, there was a discrepancy between both series regarding changes in miR-1468 expression (Fig. 3B,H).

### ABERRANT SPLICING

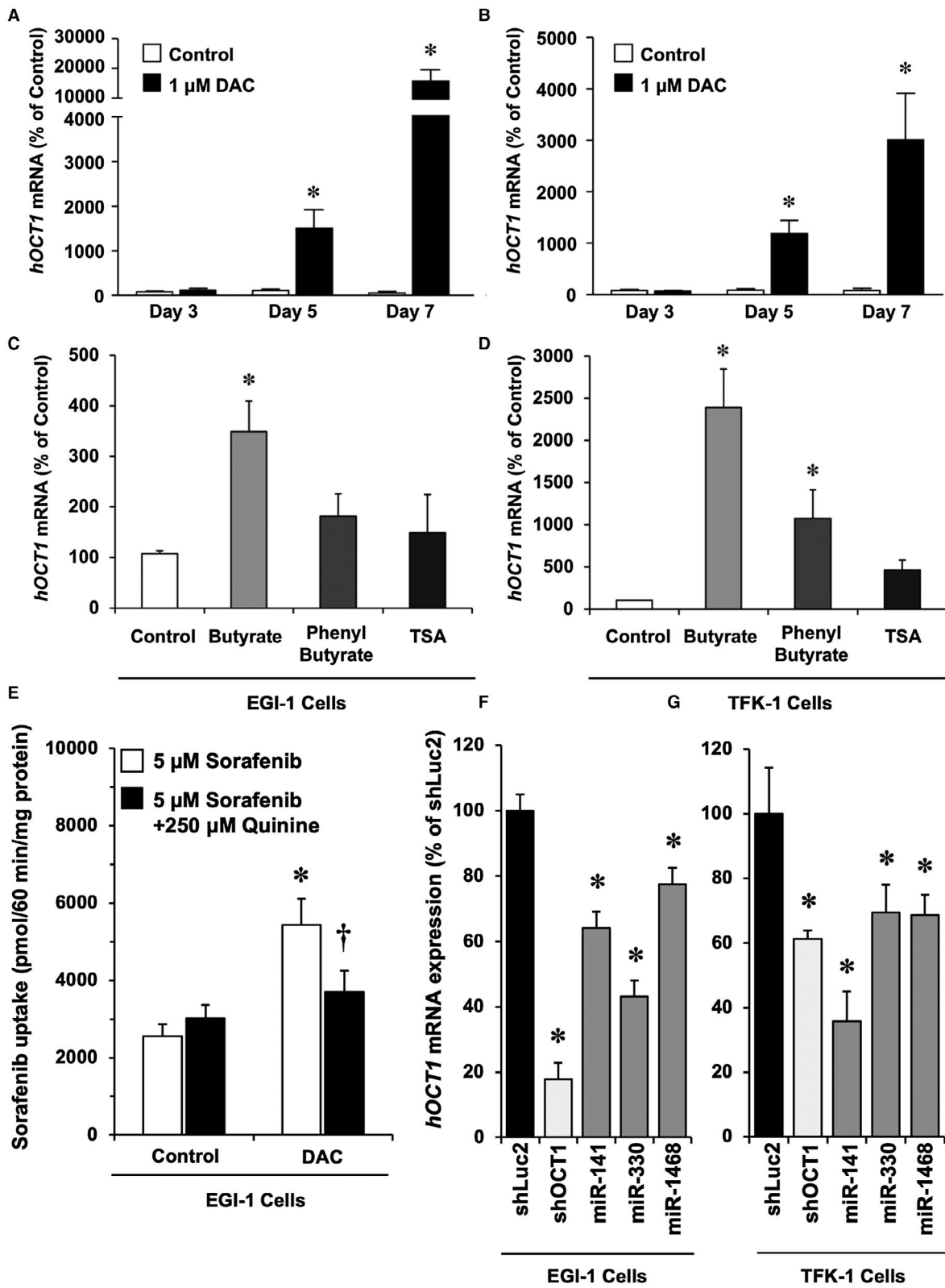
To quantify the importance of aberrant splicing in overall hOCT1 expression/function, we evaluated the presence of splicing variants by PCR using specific primers to amplify the hOCT1 amplicon between the exons 6 and 11 (Fig. 4A). The length of the amplified fragment was used to distinguish wild-type from shorter variants (Fig. 4B,C). Measurement by densitometry of the abundance of splicing variants revealed a higher proportion of aberrant forms in CCA (both in biopsies and in cell lines) than in healthy liver. Interestingly, aberrant splicing was also present in peritumor tissue (Fig. 4D).

### ROLE OF mRNA STABILITY/DECAY PROTEINS

To investigate whether changes in the balance of RNA binding proteins (RBPs) involved in mRNA stability/decay could affect the levels of *hOCT1* mRNA in CCA, the expression of genes involved in mRNA decay (*AUF1*, *BRF1*, *BRF2*, *CUGBP*, *FBP2*, and *TTP*) or mRNA stability (*HuR*) was measured in paired samples of tumor and peritumor tissue ("Salamanca cohort"). We found no significant difference between T and NT tissue for any of these genes (Supporting Fig. S2A-F), except for that encoding tristetraprolin (TTP) (Supporting Fig. S2G), that was down-regulated in CCA samples. Similar results were found when the expression levels of RBP genes were determined in CCA cell lines (data not shown).

### hOCT1 DOWN-REGULATION CORRELATES WITH DECREASED SORAFENIB UPTAKE BY CCA TUMORS

A rat model of chemically induced CCA<sup>(19)</sup> was used to study whether down-regulation of this





**FIG. 2.** Effect of hypomethylating agents and histone deacetylase inhibitors on hOCT1 expression/function. *hOCT1* mRNA levels in (A) EGI-1 and (B) TFK-1 CCA cells were measured after exposure to 1  $\mu$ M of DAC for 3, 5, or 7 days. In Control groups, a similar amount of the vehicle (dimethyl sulfoxide, DMSO) alone was added to the culture medium. *hOCT1* mRNA levels in (C) EGI-1 and (D) TFK-1 CCA cells after incubation with histone deacetylase inhibitors: 5 mM sodium butyrate, 5 mM phenyl butyrate, or 150 nM trichostatin A (TSA). (E) To evaluate the effect of DAC treatment (1  $\mu$ M for 5 days) on the ability of EGI-1 cells to take up sorafenib, EGI-1 cells were incubated with 5  $\mu$ M sorafenib with or without 250  $\mu$ M quinine for 1 hour, and its levels in the cells were measured by HPLC-MS/MS. Evaluation of the ability of three miRNAs to induce *hOCT1* mRNA decay in (F) EGI-1 and (G) TFK-1 cells. CCA cells were transduced with lentiviral vectors able to induce the expression of short-hairpin RNA against luciferase (sh-Luc2, Control), or against hOCT1 (sh-hOCT1), or one of the three microRNA selected from their predicted interaction with pre-mRNA by *in silico* analysis, and 1 day after transduction, cells were treated with 1  $\mu$ M DAC for 5 days to maximize hOCT1 expression. Values are mean  $\pm$  SD (n = 4). \*,  $P < 0.05$  on comparing with control. †,  $P < 0.05$  on comparing with results obtained in absence of quinine.

transporter results in impaired uptake of sorafenib by CCA tumors *in vivo* (Fig. 5). Sorafenib was intravenously administered to CCA-bearing rats. Samples from both T and NT tissue were collected 1 hour later, and their sorafenib content was determined using HPLC-MS/MS. The results indicated that peritumor tissue, which maintained higher Oct1 levels in comparison with CCA (Fig. 5D), was able to efficiently take up sorafenib (Fig. 5E). In contrast, in the tumors, the reduced expression of Oct1 (Fig. 5D) was accompanied with a consistent and significant decrease in sorafenib content (Fig. 5E).

## RELATIONSHIP BETWEEN hOCT1 EXPRESSION AND SORAFENIB UPTAKE/ACTIVITY

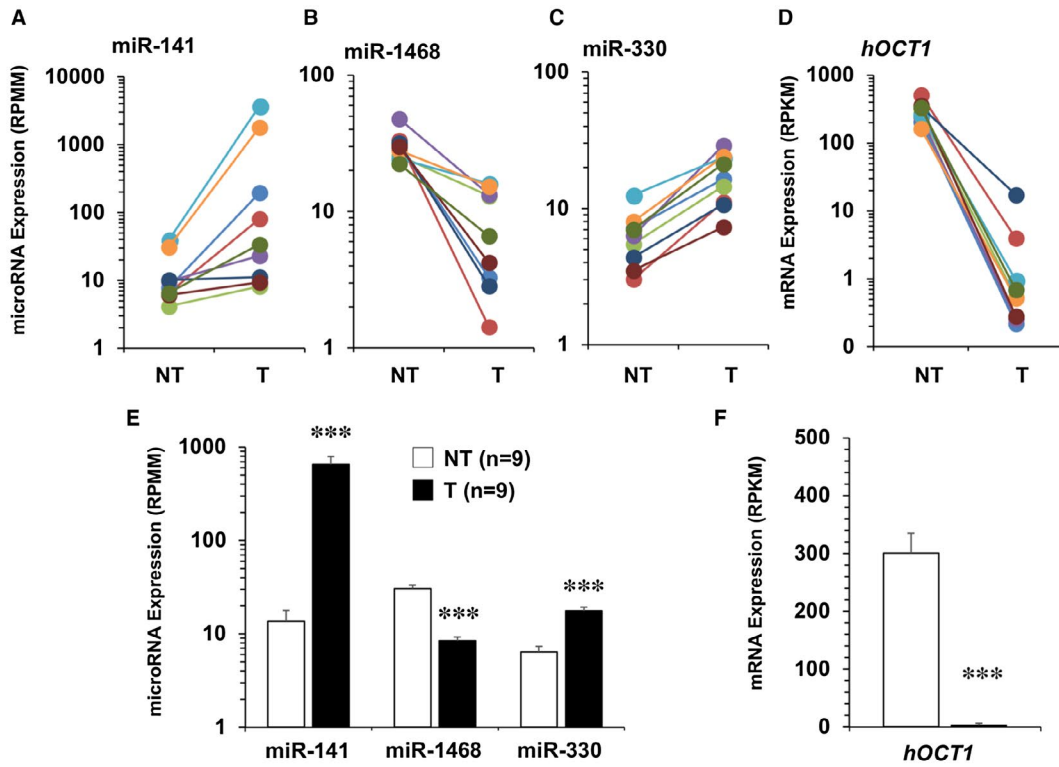
To evaluate whether the experimental overexpression of hOCT1 could be used to increase the cytotoxic effect of sorafenib, eCCA (TFK-1 and EGI-1) and iCCA (HuCCT1) cells were transduced using lentivirus, either empty (MOCK) or containing hOCT1 coding sequence (Lent-OCT1). The high efficacy of transduction, as analyzed by counting EGFP-positive cells ( $\approx 95\%$ ,  $\approx 60\%$ , and  $\approx 80\%$  in TFK-1, EGI-1, and HuCCT1 cells, respectively), resulted in a marked increase in *hOCT1* mRNA expression (Fig. 6A-C). Consequently, hOCT1-transduced cells showed enhanced ability to take up, in a quinine-sensitive manner, organic cations, such as DHE (Fig. 6D-F) and TEA (Supporting Fig. S3). Moreover, in comparison with MOCK-transduced cells, hOCT1-expressing CCA cells showed higher ability to take up (Fig. 6G-I) and respond (Fig. 6J-L) to sorafenib. Enhanced cytotoxic effect of sorafenib in CCA cells overexpressing hOCT1 was consistent with the inhibition of the phosphorylation of the sorafenib-known target signal transducer and

activator of transcription 3 (STAT3) as revealed by immunoblot analysis (Supporting Fig. S4).

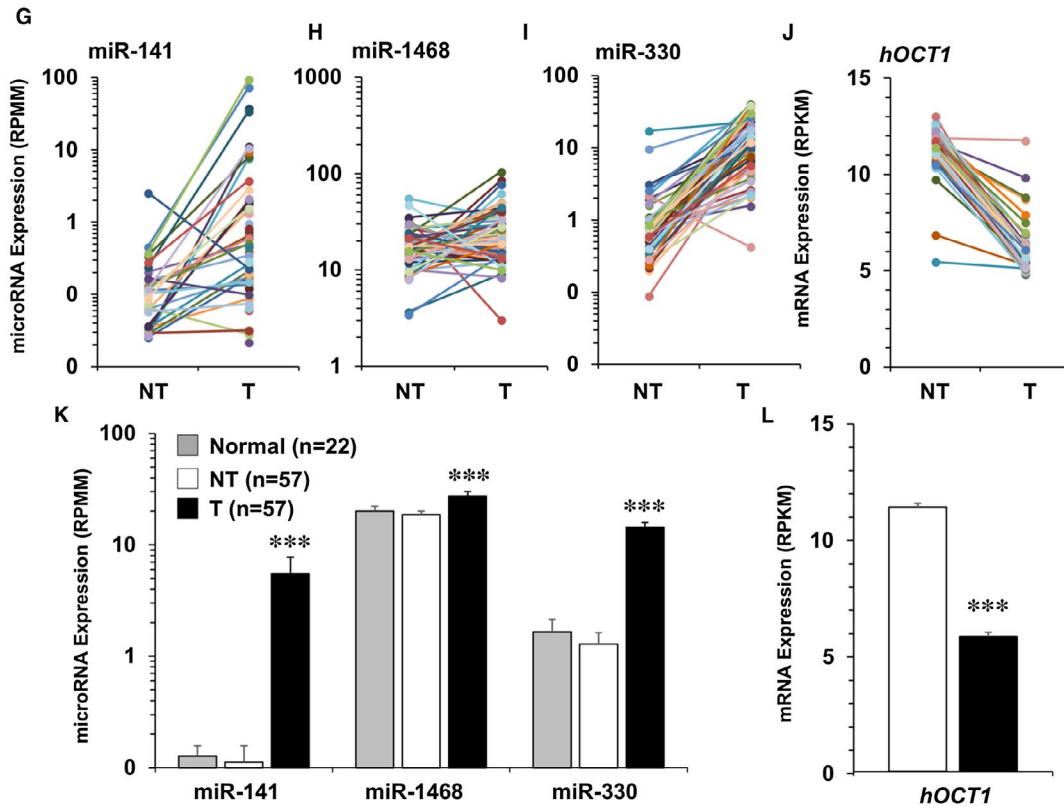
## TUMOR-SELECTIVE CHEMOSENSITIZATION BY GENE THERAPY

In order to restrict transgene expression to tumor cells, we designed an adenoviral vector in which hOCT1 expression was driven by *BIRC5pr*, due to the high activity of this promoter found in clinical CCA specimens.<sup>(24)</sup> As it has been reported<sup>(16)</sup> and we have confirmed here, the levels of both *BIRC5* mRNA and survivin protein were greatly increased in CCA cells compared with healthy liver and normal human cholangiocytes (Fig. 7A,B). Promoter activity was evaluated in transfection experiments with Alexander cells using vectors encoding firefly luciferase (Luc2) under the control of either *CMVpr* or *BIRC5pr*. Both promoters were similarly potent in stimulating Luc2 expression (Fig. 7C,D). Based on these results, adenoviruses bearing *BIRC5pr-EGFP* (Ad-MOCK) (Fig. 7E) or *BIRC5pr-hOCT1-EGFP* (Ad-hOCT1) (Fig. 7F) were used to treat nude mice with intrahepatic CCA xenograft (Fig. 8). Gene therapy resulted in selective overexpression of hOCT1 at the plasma membrane of tumor cells, whereas no detectable expression in adjacent peritumor tissue (Fig. 8C-F) or endothelial cells (Supporting Fig. S5) was found. In mice treated with Ad-MOCK, sorafenib treatment failed to affect tumor growth (Fig. 8G,H). In contrast, coadministration of sorafenib plus Ad-hOCT1 resulted in a marked antitumor effect (Fig. 8G,H), which was not accompanied by decreased vascularization (Supporting Fig. S6). Interestingly, in the absence of treatment with sorafenib, the administration of these vectors did not affect tumor growth. Moreover,

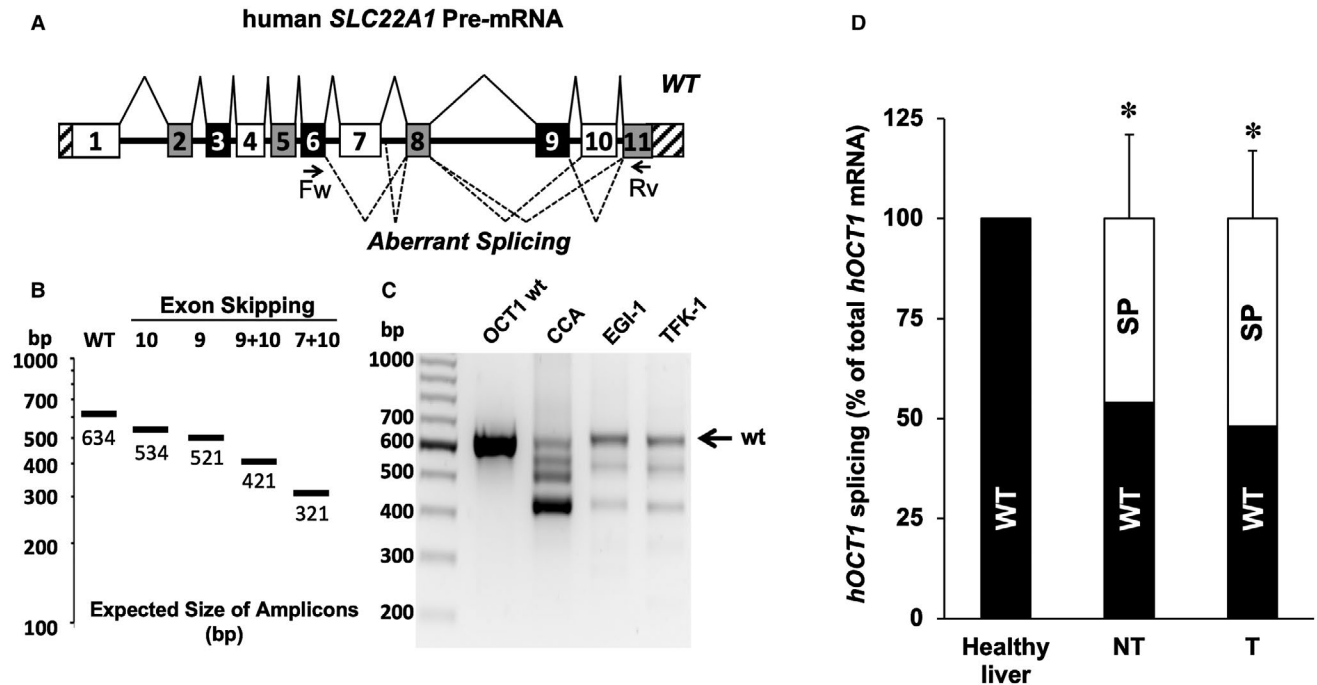
TCGA Cohort



Copenhagen Cohort



**FIG. 3.** Expression of microRNAs with potential role in *hOCT1* mRNA modulation in CCA. (A-F) Individual values of expression levels of (A) miR-141, (B) miR-1468, (C) miR-330, and (D) *hOCT1* mRNA in nine paired samples of tumor (T) tissue and adjacent non-tumor (NT) tissue as downloaded from TCGA-CHOL. (G-L) Similar analysis was carried out on 57 paired T and NT samples and 22 normal livers included in the Copenhagen cohort. Average values (mean  $\pm$  SEM) and statistical comparisons are shown in E, F, K, and L. \*\*\*,  $P < 0.001$ , on comparing T and NT by paired  $t$  test. Abbreviations: RPKM, reads per kilobase mapped; RPMM, reads per million miRNA mapped.



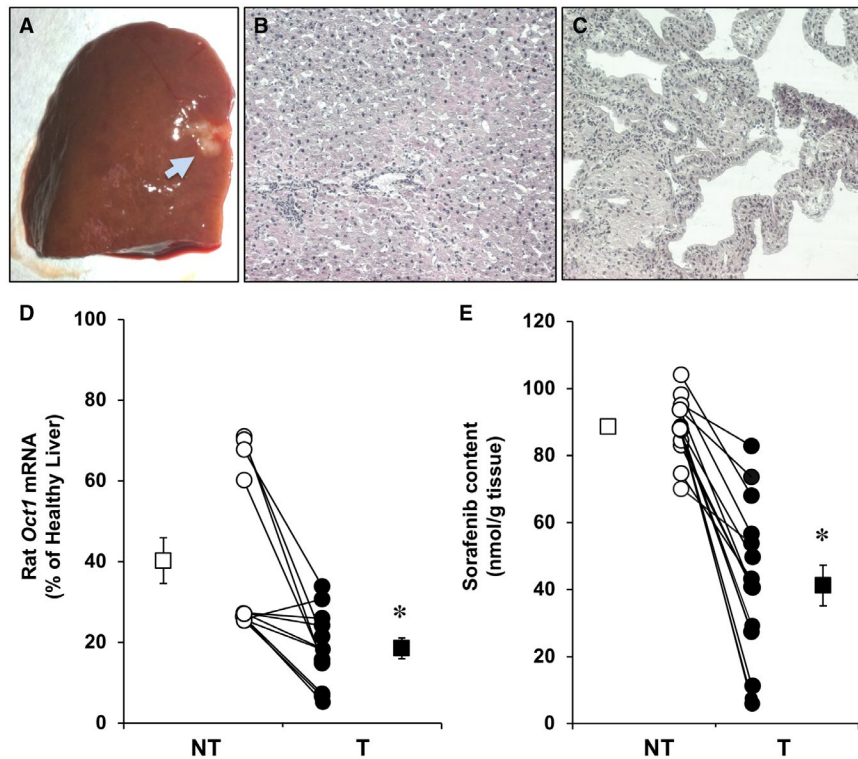
**FIG. 4.** Alternative splicing of human *hOCT1* mRNA in CCA. Scheme of human *OCT1* pre-mRNA showing exons (1-11 boxes), introns (horizontal lines), and untranslated regions (striped boxes). Dashed lines indicate exon skipping or intron retention variants due to aberrant splicing. (A) The locations of Fw and Rv primers used to detect spliced forms are depicted. (B) Expected size of amplicons resulting from PCR using Fw and Rv primers. (C) Representative separation by gel electrophoresis of PCR products obtained using as template: complete *hOCT1* mRNA (from a plasmid), CCA tumor tissue, and CCA cells (EGI-1 and TFK-1). (D) Densitometric analysis of the semiquantitative PCR of spliced forms of *hOCT1* mRNA in healthy liver, paired peritumor tissue (NT,  $n = 5$ ), and CCA tumor tissue (T,  $n = 9$ ). \*,  $P < 0.05$ , on comparing T or NT with healthy liver. Comparison of T with NT was  $P > 0.05$ . Abbreviations: Fw, forward; Rv, reverse; SP, aberrant splicing; WT, wild-type OCT1.

signs of renal or hepatic toxicity were not found (Supporting Table S4).

## Discussion

At present, sorafenib is the reference drug used in the pharmacological treatment of HCC. The high proportion of genetic alterations in critical signaling pathways involved in cell proliferation in CCA has led to an interest in the development of clinical trials investigating targeted therapies including sorafenib.<sup>(1)</sup> However, data on the effectiveness of sorafenib, and other TKIs, in patients with CCA are

controversial, reporting both beneficial effect<sup>(12,25,26)</sup> and poor activity against this type of liver cancer.<sup>(27,28)</sup> The latter is not surprising considering the strong multidrug resistance (MDR) phenotype of CCA, in which several MOCs involved in the lack of response to sorafenib have been identified.<sup>(5)</sup> These include the overexpression of ABC proteins, such as MDR1 and BCRP, which reduce intracellular drug content (MOC-1b); enhanced drug inactivation by uridine glucuronosyl transferase 1A (MOC-2); or the appearance of genetic variants in the intracellular targets of sorafenib (MOC-3).<sup>(29)</sup> In addition, we have reported that because cell uptake, which is mediated mainly by *hOCT1*, is an essential requirement for sorafenib



**FIG. 5.** Relationship between *rOct1* expression and sorafenib uptake in rat CCA. Macroscopic view of (A) tumors (arrow) and histological images by hematoxylin and eosin staining under light-field microscope with  $\times 10$  magnification of (B) adjacent liver parenchyma and (C) tumor tissue in rats after 30 weeks of continuous administration of 0.05% TAA in the drinking water. (D) Relative expression of *rOct1* in tumor (T) and paired non-tumor (NT) liver tissue of rats ( $n = 12$ ) with chemically induced CCA. (E) Sorafenib content (measured by HPLC-MS/MS) in T ( $n = 15$ ) and NT ( $n = 10$ ) tissues 60 minutes after administration of sorafenib (10 mg/kg body weight, intravenously). Results are shown as individual values (circles) or as means  $\pm$  SD (squares). \*,  $P < 0.05$ , on comparing T with NT.

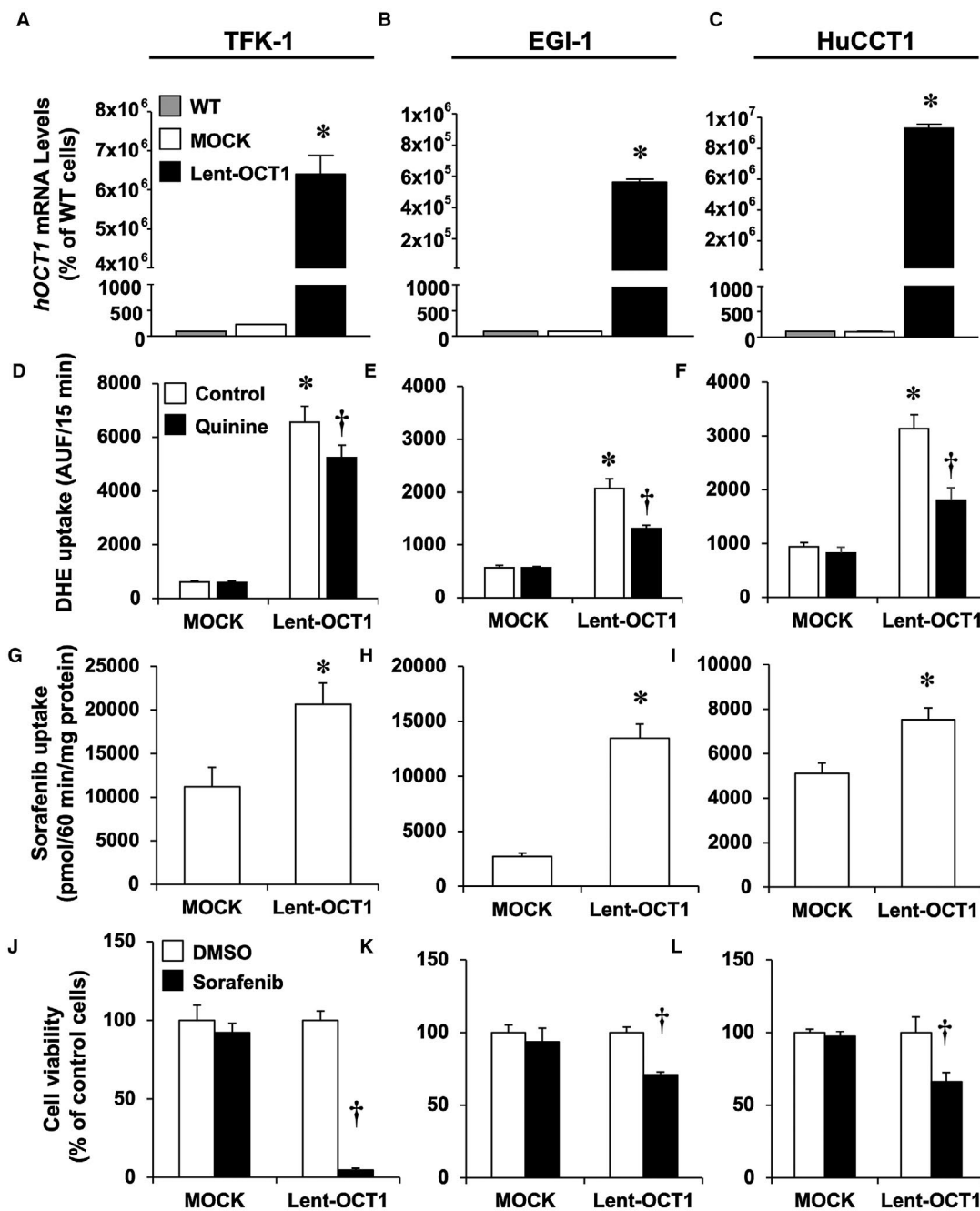
to reach its intracellular targets and carry out its pharmacological effect, changes in the expression/activity of this carrier can lead to poorer response to sorafenib.<sup>(15)</sup> As a natural continuation of this line of research, in the present study, we have analyzed the causes of hOCT1 down-regulation in CCA, and we have explored strategies to restore its expression and hence increase its sensitivity to sorafenib.

We have reported that hOCT1 expression is reduced in HCC<sup>(16)</sup> and CCA.<sup>(30)</sup> In CCA, epigenetic abnormalities, including DNA hypermethylation, have been described.<sup>(31)</sup> Moreover, hypermethylation of *SLC22A1* promoter in HCC has been reported<sup>(32)</sup> and, as we have demonstrated here, these changes also occur in CCA. An inverse behavior regarding *hOCT1* mRNA expression and hypermethylation status of three critical CpG regions (5'-UTR, transcriptional start site, and exon 1) has been found. This is

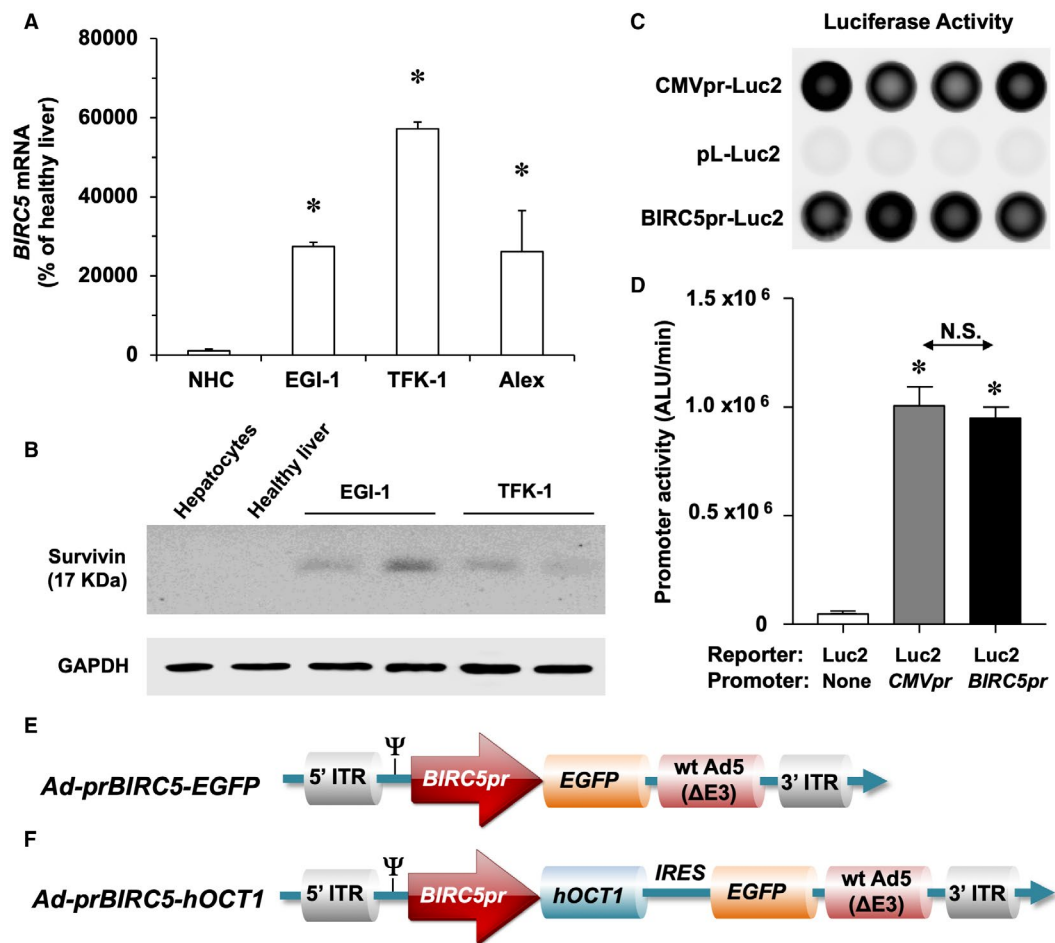
consistent with the concept that methylation of the first exon correlates with transcriptional silencing of *SLC22A1* gene.<sup>(33)</sup> Although further studies are needed, our data suggest that methylation of *SLC22A1* could be a prognostic biomarker in CCA, as has been proposed in HCC.<sup>(32)</sup>

As suggested by our results, DAC treatment is an efficient strategy to restore OCT1 expression in CCA cell lines, which enhances sorafenib uptake. These findings support that demethylating agents could be useful in restoring hOCT1 expression in CCA tumors and hence improving sorafenib uptake/response. Moreover, clinical data indicate that DAC treatment retards CCA tumor growth.<sup>(34)</sup> Thus, combination therapy of DAC plus sorafenib should be explored in patients with CCA. In support of this view, treatment of acute myeloid leukemia with DAC plus sorafenib has shown synergistic antitumor effect.<sup>(35)</sup>





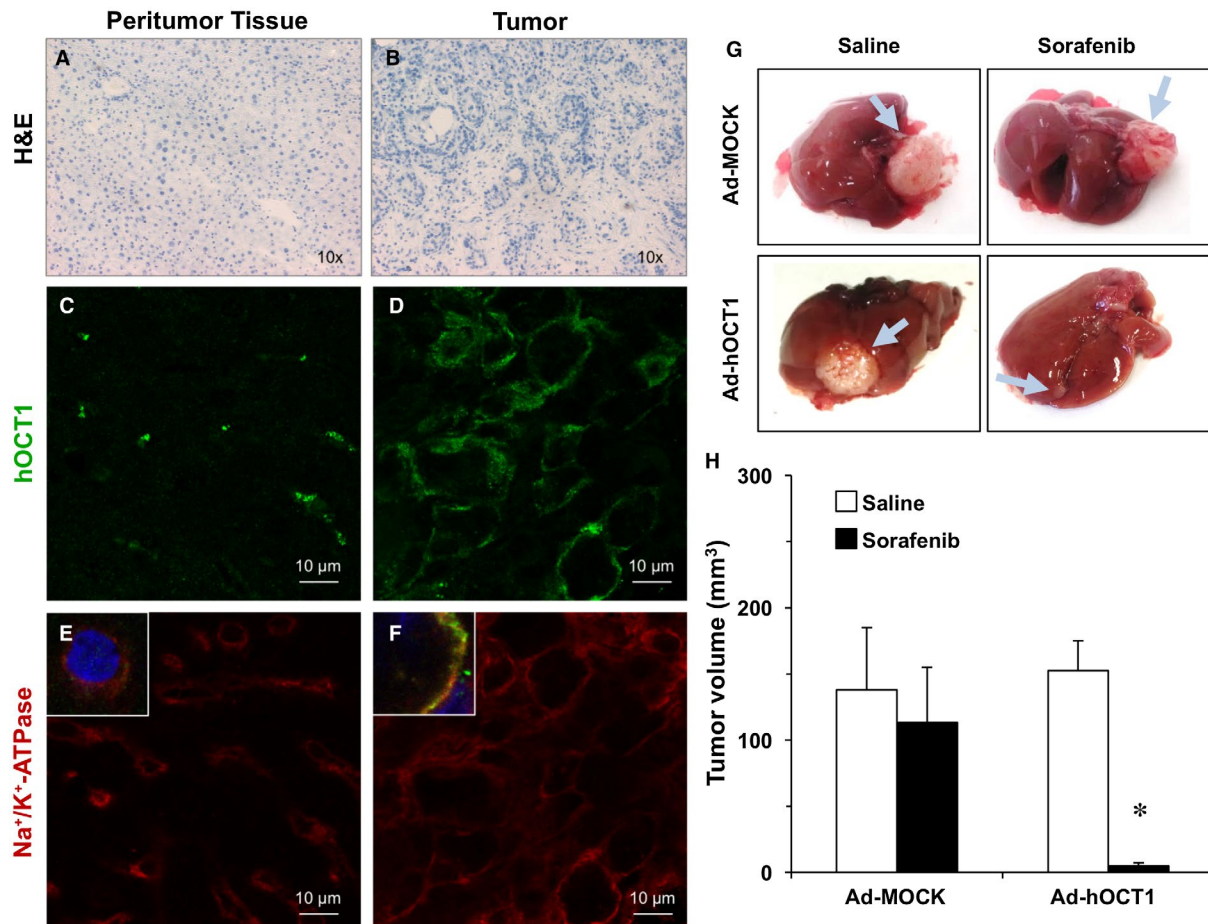
**FIG. 6.** Role of hOCT1 in sorafenib uptake and response *in vitro*. Extrahepatic (TFK-1 and EGI-1) and intrahepatic (HuCCT1) CCA cells were transduced with control lentivirus (MOCK) or hOCT1 lentivirus (Lent-OCT1). (A-C) Relative *hOCT1* mRNA levels were evaluated in WT-, MOCK-, or OCT1-transduced cells. Measurements were carried out 4 days after transduction. (D-F) MOCK or Lent-OCT1 CCA cells were incubated with 5  $\mu$ M DHE in the absence (Control) or the presence of 250  $\mu$ M quinine for 15 minutes to determine hOCT1 function. (G-I) MOCK or Lent-OCT1 CCA cells were incubated with 5  $\mu$ M sorafenib for 1 hour, and its levels in the cells were measured by HPLC-MS/MS. (J-L) Cell viability was evaluated in MOCK or Lent-OCT1 CCA after incubation with 5  $\mu$ M sorafenib for 6 hours, and cell viability was measured 66 hours later to evaluate sorafenib response. Values are mean  $\pm$  SD from nine wells of three different cultures in each cell line. \*,  $P < 0.05$ , on comparing with MOCK cells. †,  $P < 0.05$ , on comparing cells incubated with (D-F) quinine or (J-L) sorafenib with their corresponding Control/DMSO groups. AUF, arbitrary units of fluorescence.



**FIG. 7.** Tumor-selective gene therapy strategy design. (A) Relative levels of *BIRC5* mRNA in NHC, EGI-1, and TFK-1 CCA cells, and in Alexander HCC cells (Alex). (B) Representative immunoblots of survivin and GAPDH in human hepatocytes, healthy liver, and CCA cell lines (EGI-1 and TFK-1). Representative (C) experiment and (D) average values of *BIRC5* promoter (*BIRC5pr*) activity determined 48 hours after transient transfection of Alexander cells with *BIRC5pr-Luc2*, *CMVpr-Luc2*, or *pL-Luc2* (negative control, without promoter) plasmids. Values are mean  $\pm$  SD from at least three experiments performed in triplicate. \*,  $P < 0.01$ , as compared with *pL-Luc2*. Partial scheme of (E) control adenovirus *Ad-prBIRC5-EGFP* (Ad-MOCK) and (F) adenoviral vector containing *hOCT1* ORF (*Ad-prBIRC5-hOCT1*). Abbreviations: ALU, arbitrary luminescence units; NHC, normal human cholangiocytes; N.S., no significant differences.

Although the up-regulation induced by DAC in EGI-1 cells was strong ( $\approx 15$ -fold) (Fig. 2A), the impact of this change in the functional experiments was modest (Fig. 2E). This could be partly due to the fact that a fraction of the synthesized *hOCT1* pre-mRNA was processed to inactive variants by an aberrant splicing that was quantitatively important in both CCA tumors and cell lines (Fig. 4C). In a previous study on a low number of specimens of CCA, several variants of aberrant splicing of *hOCT1* pre-mRNA were identified.<sup>(15)</sup> This is pharmacologically

relevant because these variants encode truncated non-functional proteins. Interestingly, here we have found aberrant variants in both tumor and peritumor tissues, whereas this was negligible in healthy liver. The presence of enhanced alternative splicing in the mRNA of some genes has been described to occur during early stages of several liver diseases.<sup>(36)</sup> An ongoing study on liver samples from patients with different liver diseases, without cancer, suggests a heterogeneous degree of aberrant splicing of *hOCT1* pre-mRNA, which is lower than in CCA (data not shown).



**FIG. 8.** Antitumor effect of sorafenib on xenograft CCA tumors selectively expressing hOCT1. Nude mice were used to generate subcutaneous CCA tumors with EGI-1 cells. These were used as donors for subsequent intrahepatic implantation in different animals. Histological appearance of adjacent (A) nontumor tissue and (B) CCA tumor tissue as observed by hematoxylin and eosin staining under light-field microscope with  $\times 10$  magnification. These animals were treated with adenoviruses injected every 5 days (intravenously through tail vein at  $4 \times 10^7$  VP/mice in each administration). (C,D) Adenoviral vector *Ad-prBIRC5-hOCT1* was used to induce hOCT1 expression as seen by immunofluorescence detection by confocal microscopy (cyanin-5 fluorescence was artificially converted into green).  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (red) was used as a plasma membrane marker in adjacent (E) nontumor liver tissue and (F) implanted CCA tumors. The insets are amplified details of merge images showing the nuclei stained with DAPI (blue). Animals injected with *Ad-prBIRC5-hOCT1* (Ad-hOCT1) or control *Ad-prBIRC5-EGFP* (Ad-MOCK) vectors were treated with saline or sorafenib (10 mg/kg body weight, intraperitoneally twice a week). (G) Representative images of gross appearance of livers of a mouse from each group showing the implanted tumor (arrows). (H) Tumor volume was determined at the end of the experimental period (2 months), when the animals were slaughtered and tumors were excised and measured. Values are mean  $\pm$  SD from four experimental groups; Ad-MOCK + saline (n = 5), Ad-MOCK + sorafenib (n = 6), Ad-hOCT1 + saline (n = 4), Ad-hOCT1 + sorafenib (n = 7). \*,  $P < 0.05$ , on comparing the Ad-hOCT1 group treated with sorafenib with the group that received saline alone. Abbreviation: H&E, hematoxylin and eosin.

Other epigenetic mechanisms, such as histone deacetylation, seem to also play a role in the modulation of hOCT1 expression, although to a lesser extent. RBPs, which bind AU-rich elements in the 3' UTR of many mRNAs and target them for stabilization or rapid decay,<sup>(37)</sup> might also be involved in hOCT1 mRNA decay. As the only change observed

was a decreased expression of TTP, which participates in mRNA decay, our results do not support a role of RBPs in hOCT1 mRNA down-regulation. However, this cannot be ruled out because the complex regulation of the function of RBPs has not been explored in depth here. In contrast, *in vitro* activity measurements together with analysis of microRNA expression

in CCA samples suggest a possible role of miR-141 and miR-330 in *hOCT1* mRNA modulation in CCA.

Although epigenetic therapies such as DAC administration may be useful for recovering *hOCT1* mRNA levels, the generation of aberrant isoforms and the presence of inactivating SNPs that appear in CCA<sup>(15)</sup> would limit the gaining of hOCT1 function. In contrast, *in vitro* studies clearly demonstrate that enhanced expression of exogenous hOCT1 results in higher sorafenib uptake and sensitivity. One of the mechanisms accounting for sorafenib antitumor activity involves inhibition of survival Janus kinase/STAT3 signaling pathway that includes reduced STAT3 phosphorylation.<sup>(10,38)</sup> Immunoblot analysis revealed that treatment of TFK-1 cells with sorafenib induced a marked reduction in the proportion of phosphorylated STAT3 only if the cells overexpressed hOCT1 (Supporting Fig. S4).

Prompted by these findings, we have evaluated the alternative of inducing hOCT1 expression by viral transduction in CCA cells. Thus, as a proof of concept, we have assayed an *in vivo* strategy of gene therapy using adenoviruses, which can infect a broad range of human cells with high gene transfer efficiency<sup>(39,40)</sup> and have been proposed for the treatment of neoplastic diseases, including CCA.<sup>(41)</sup> We have used adenoviruses serotype 5 (Ad5), which has become the most popular system in virotherapy. The fact that Ad5 has hepatotropic properties is an advantage for targeting this organ, but it could be a partial obstacle for its successful application in liver tumors such as CCA. To overcome this problem, we have used a transcriptional targeting strategy that exploits the activity of tumor-specific promoters that are preferentially active in tumor cells in comparison with normal cells.<sup>(42)</sup> Survivin (*BIRC5* gene), a member of the inhibitor of apoptosis family that is involved in controlling mitotic progression and preventing cell death, is overexpressed in many cancers, including CCA, but not in normal adult tissues.<sup>(43-45)</sup> Previous studies have suggested the interest of *BIRC5pr* for tumor-targeted therapy<sup>(46)</sup> because of its high tumor activity, as high as *CMVpr* (Fig. 7), and low activity in healthy cells.<sup>(47)</sup> This accounts for the specific transduction reached in the experimental model of orthotopic CCA xenograft. Accordingly, the expression of hOCT1 at the plasma membrane of tumor cells dramatically improved the antitumor effect of sorafenib.

Taken together, our study demonstrates that events such as promoter hypermethylation, microRNA-mediated degradation, and aberrant splicing lead to decreased *hOCT1* mRNA and sorafenib uptake/response in CCA. Gene therapy able to selectively induce hOCT1 expression in tumor cells, but not in adjacent healthy liver tissue, is a useful chemosensitization strategy to improve the response of CCA to sorafenib.

## REFERENCES

- Ahn DH, Bekaii-Saab T. Biliary cancer: intrahepatic cholangiocarcinoma vs. extrahepatic cholangiocarcinoma vs. gallbladder cancers: classification and therapeutic implications. *J Gastrointest Oncol* 2017;8:293-301.
- Lazaridis KN, Gores GJ. Cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 2005;128:1655-1667.
- Banales JM, Cardinale V, Carpino G, Marziani M, Andersen JB, Invernizzi P, et al. Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016;13:261-280.
- Khan SA, Davidson BR, Goldin RD, Heaton N, Karani J, Pereira SP, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. *Gut* 2012;61:1657-1669.
- Marin JJG, Lozano E, Herrera E, Asensio M, Di Giacomo S, Romero MR, et al. Chemoresistance and chemosensitization in cholangiocarcinoma. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018;1864:1444-1453.
- Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthony A, Maraveyas A, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med* 2010;362:1273-1281.
- Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, et al. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:835-844.
- Carlomagno F, Anaganti S, Guida T, Salvatore G, Troncone G, Wilhelm SM, et al. BAY 43-9006 inhibition of oncogenic RET mutants. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:326-334.
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378-390.
- Sugiyama H, Onuki K, Ishige K, Baba N, Ueda T, Matsuda S, et al. Potent *in vitro* and *in vivo* antitumor activity of sorafenib against human intrahepatic cholangiocarcinoma cells. *J Gastroenterol* 2011;46:779-789.
- Huether A, Hopfner M, Baradari V, Schuppan D, Scherubl H. Sorafenib alone or as combination therapy for growth control of cholangiocarcinoma. *Biochem Pharmacol* 2007;73:1308-1317.
- LaRocca RV, Hicks MD, Mull L, Foreman B. Effective palliation of advanced cholangiocarcinoma with sorafenib: a two-patient case report. *J Gastrointest Cancer* 2007;38:154-156.
- Pan TT, Wang W, Jia WD, Xu GL. A single-center experience of sorafenib monotherapy in patients with advanced intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncol Lett* 2017;13:2957-2964.
- Luo X, Jia W, Huang Z, Li X, Xing B, Jiang X, et al. Effectiveness and safety of sorafenib in the treatment of unresectable and advanced intrahepatic cholangiocarcinoma: a pilot study. *Oncotarget* 2017;8:17246-17257.



- 15) Herraes E, Lozano E, Macias RI, Vaquero J, Bujanda L, Banales JM, et al. Expression of SLC22A1 variants may affect the response of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma to sorafenib. *HEPATOLOGY* 2013;58:1065-1073.
- 16) Martinez-Becerra P, Vaquero J, Romero MR, Lozano E, Anadon C, Macias RI, et al. No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors. *Mol Pharm* 2012;9:1693-1704.
- 17) Andersen JB, Spee B, Blechacz BR, Avital I, Komuta M, Barbour A, et al. Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors. *Gastroenterology* 2012;142:1021-1031 e1015.
- 18) Farshidfar F, Zheng S, Gingras MC, Newton Y, Shih J, Robertson AG, et al. Integrative genomic analysis of cholangiocarcinoma identifies distinct IDH-mutant molecular profiles. *Cell Rep* 2017;18:2780-2794.
- 19) Lozano E, Sanchez-Vicente L, Monte MJ, Herraes E, Briz O, Banales JM, et al. Cocarcinogenic effects of intrahepatic bile acid accumulation in cholangiocarcinoma development. *Mol Cancer Res* 2014;12:91-100.
- 20) Dominguez MF, Macias RI, Izco-Basurko I, de La Fuente A, Pascual MJ, Criado JM, et al. Low in vivo toxicity of a novel cisplatin-ursodeoxycholic derivative (Bamet-UD2) with enhanced cytostatic activity versus liver tumors. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:1106-1112.
- 21) Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978;87:206-210.
- 22) Morine Y, Shimada M, Iwahashi S, Utsunomiya T, Imura S, Ikemoto T, et al. Role of histone deacetylase expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surgery* 2012;151:412-419.
- 23) Al-Abdulla R, Lozano E, Macias RIR, Monte MJ, Briz O, O'Rourke CJ, et al. Epigenetic events involved in organic cation transporter 1-dependent impaired response of hepatocellular carcinoma to sorafenib. *Br J Pharmacol* 2019;176:787-800.
- 24) Zhu ZB, Chen Y, Makhija SK, Lu B, Wang M, Rivera AA, et al. Survivin promoter-based conditionally replicative adenoviruses target cholangiocarcinoma. *Int J Oncol* 2006;29:1319-1329.
- 25) Pinter M, Sieghart W, Reisinger M, Wrba F, Peck-Radosavljevic M. Sorafenib in unresectable intrahepatic cholangiocellular carcinoma: a case report. *Wien Klin Wochenschr* 2011;123:61-64.
- 26) Chakunta HR, Sunderkrishnan R, Kaplan MA, Mostofi R. Cholangiocarcinoma: treatment with sorafenib extended life expectancy to greater than four years. *J Gastrointest Oncol* 2013;4:E30-E32.
- 27) El-Khoueiry AB, Rankin CJ, Ben-Josef E, Lenz HJ, Gold PJ, Hamilton RD, et al. SWOG 0514: a phase II study of sorafenib in patients with unresectable or metastatic gallbladder carcinoma and cholangiocarcinoma. *Invest New Drugs* 2012;30:1646-1651.
- 28) Bengala C, Bertolini F, Malavasi N, Boni C, Aitini E, Dealis C, et al. Sorafenib in patients with advanced biliary tract carcinoma: a phase II trial. *Br J Cancer* 2010;102:68-72.
- 29) Rosenzweig SA. Acquired resistance to drugs targeting receptor tyrosine kinases. *Biochem Pharmacol* 2012;83:1041-1048.
- 30) Lozano E, Monte MJ, Briz O, Hernandez-Hernandez A, Banales JM, Marin JJ, et al. Enhanced antitumour drug delivery to cholangiocarcinoma through the apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT). *J Control Release* 2015;216:93-102.
- 31) **Jusakul A, Cutcutache I, Yong CH, Lim JQ, Huang MN, Padmanabhan N, et al.** Whole-genome and epigenomic landscapes of etiologically distinct subtypes of cholangiocarcinoma. *Cancer Discov* 2017;7:1116-1135.
- 32) Schaeffeler E, Hellerbrand C, Nies AT, Winter S, Kruck S, Hofmann U, et al. DNA methylation is associated with down-regulation of the organic cation transporter OCT1 (SLC22A1) in human hepatocellular carcinoma. *Genome Med* 2011;3:82.
- 33) Brenet F, Moh M, Funk P, Feierstein E, Viale AJ, Socci ND, et al. DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PLoS One* 2011;6:e14524.
- 34) Wang B, Li H, Yang R, Zhou S, Zou S. Decitabine inhibits the cell growth of cholangiocarcinoma in cultured cell lines and mouse xenografts. *Oncol Lett* 2014;8:1919-1924.
- 35) Muppidi MR, Portwood S, Griffiths EA, Thompson JE, Ford LA, Freyer CW, et al. Decitabine and sorafenib therapy in FLT-3 ITD-mutant acute myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2015;15(Suppl. 15):S73-S79.
- 36) Webster NJG. Alternative RNA splicing in the pathogenesis of liver disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017;8:133.
- 37) Sanchez-Diaz P, Penalva LO. Post-transcription meets post-genomic: the saga of RNA binding proteins in a new era. *RNA Biol* 2006;3:101-109.
- 38) Blechacz BR, Smoot RL, Bronk SF, Werneburg NW, Sirica AE, Gores GJ. Sorafenib inhibits signal transducer and activator of transcription-3 signaling in cholangiocarcinoma cells by activating the phosphatase shatterproof 2. *HEPATOLOGY* 2009;50:1861-1870.
- 39) Alemany R, Gomez-Manzano C, Balague C, Yung WK, Curiel DT, Kyritsis AP, et al. Gene therapy for gliomas: molecular targets, adenoviral vectors, and oncolytic adenoviruses. *Exp Cell Res* 1999;252:1-12.
- 40) Curiel DT. Strategies to adapt adenoviral vectors for targeted delivery. *Ann N Y Acad Sci* 1999;886:158-171.
- 41) Nagi P, Vickers SM, Davydova J, Adachi Y, Takayama K, Barker S, et al. Development of a therapeutic adenoviral vector for cholangiocarcinoma combining tumor-restricted gene expression and infectivity enhancement. *J Gastrointest Surg* 2003;7:364-371.
- 42) Saukkonen K, Hemminki A. Tissue-specific promoters for cancer gene therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:683-696.
- 43) Lu B, Makhija SK, Nettelbeck DM, Rivera AA, Wang M, Komarova S, et al. Evaluation of tumor-specific promoter activities in melanoma. *Gene Ther* 2005;12:330-338.
- 44) Chen JS, Liu JC, Shen L, Rau KM, Kuo HP, Li YM, et al. Cancer-specific activation of the survivin promoter and its potential use in gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2004;11:740-747.
- 45) Ulasov IV, Rivera AA, Sonabend AM, Rivera LB, Wang M, Zhu ZB, et al. Comparative evaluation of survivin, midkine and CXCR4 promoters for transcriptional targeting of glioma gene therapy. *Cancer Biol Ther* 2007;6:679-685.
- 46) Garg H, Salcedo R, Trinchieri G, Blumenthal R. Improved non-viral cancer suicide gene therapy using survivin promoter-driven mutant Bax. *Cancer Gene Ther* 2010;17:155-163.
- 47) Zhu ZB, Makhija SK, Lu B, Wang M, Kaliberova L, Liu B, et al. Transcriptional targeting of tumors with a novel tumor-specific survivin promoter. *Cancer Gene Ther* 2004;11:256-262.

Author names in bold designate shared co-first authorship.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found at [onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.30656/supinfo](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.30656/supinfo).