

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA



VNiVERSIDAD  
D SALAMANCA

PAPEL DEL *SPLICING* ALTERNATIVO DE *SLC22A1* Y LA CAPACIDAD DE  
TRANSPORTE MEDIADO POR OCT3 EN LA QUIMIORRESISTENCIA DEL  
CARCINOMA HEPATOCELULAR AL SORAFENIB

TESIS DOCTORAL

MERARIS SOTO MUÑIZ

2020

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA



VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA

PAPEL DEL *SPLICING* ALTERNATIVO DE *SLC22A1* Y LA CAPACIDAD DE  
TRANSPORTE MEDIADO POR OCT3 EN LA QUIMIORRESISTENCIA DEL  
CARCINOMA HEPATOCELULAR AL SORAFENIB

Memoria que presenta **Dña. Meraris Soto Muñiz** para optar al Título de Doctor por la  
Universidad de Salamanca

Salamanca, 28 de febrero de 2020

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

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "Papel del *splicing* alternativo de *SLC22A1* y la capacidad de transporte mediado por OCT3 en la quimiorresistencia del carcinoma hepatocelular al sorafenib" presentada por D<sup>a</sup>. Meraris Soto Muñiz para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. D. José Juan García Marín, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología, la Dra. Dña. María Ángeles Serrano, Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular y la Dra. Dña. Ruba Al-Abdulla Investigadora en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDEBE) en la Universidad Miguel Hernández.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día veintiocho de febrero de dos mil veinte

Fdo. José Juan García Marín

D<sup>a</sup>. 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 "Papel del *splicing* alternativo de *SLC22A1* y la capacidad de transporte mediado por OCT3 en la quimiorresistencia del carcinoma hepatocelular al sorafenib" presentada por D<sup>a</sup>. Meraris Soto Muñiz para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. D. José Juan García Marín, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología, la Dra. Dña. María Ángeles Serrano, Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular y la Dra. Dña. Ruba Al-Abdulla Investigadora en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDEBE) en la Universidad Miguel Hernández.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día veintiocho de febrero de dos mil veinte

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

D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA, D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> ÁNGELES SERRANO GARCÍA, COORDINADORA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOPATOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA, y D<sup>a</sup>. RUBA AL-ABDULLA, INVESTIGADORA EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN, DESARROLLO E INNOVACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA SANITARIA DE ELCHE (IDEBE) EN LA UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada "Papel del *splicing* alternativo de *SLC22A1* y la capacidad de transporte mediado por OCT3 en la quimiorresistencia del carcinoma hepatocelular al sorafenib" presentada por D<sup>a</sup>. Meraris Soto Muñiz para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. D. José Juan García Marín, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología, la Dra. Dña. María Ángeles Serrano, Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular y la Dra. Dña. Ruba Al-Abdulla Investigadora en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDEBE) en la Universidad Miguel Hernández.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día veintiocho de febrero de dos mil veinte

Fdo. José Juan García Marín

Fdo. María Ángeles Serrano García

Fdo. Ruba Al-Abdulla

La doctoranda ha disfrutado durante la realización de esta tesis doctoral de una Beca del Programa de Movilidad para realizar estudios de doctorado en la Universidad de Salamanca destinadas a estudiantes latinoamericanos.

El desarrollo del trabajo experimental incluido en esta Memoria ha sido financiado en parte con cargo al CIBERehd (Instituto de Salud Carlos III) (EHD15PI05/2016), y a los siguientes Proyectos de Investigación:

Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional. 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.

Consejería de Educación, Junta de Castilla y León. Proyecto SA063P17. “Deficiencia parcial de ACOX2 (APD): una nueva enfermedad rara (OMIM-601641) que cursa con riesgo oculto de lesión hepática”. Investigador Principal: José Juan García Marín. Periodo: 2017-2019.

Ministerio de Economía y Empresa. 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.

Asociación española Contra el Cáncer. Proyectos cáncer infantil y cáncer poco frecuentes. “Estudio multidisciplinar del colangiocarcinoma: diagnóstico, patogenia y nuevas terapias”. Investigador Responsable: Jesús María Bañales Asurmendi. Periodo: 2018-2020.

- Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis doctoral han sido publicados como artículos en las siguientes revistas:

Marta Alonso-Peña, Anabel Sanchez-Martin, Paula Sanchon-Sanchez, **Meraris Soto-Muñiz**, Ricardo A. Espinosa-Escudero, Jose J.G. Marin. Pharmacogenetics of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Cancer Drug Resistance*. 2019; 2:680-709.

Marta Alonso-Peña, Ricardo A. Espinosa-Escudero, **Meraris Soto-Muñiz**, Paula Sanchon-Sanchez, Anabel Sanchez-Martin, Jose J.G. Marin. Role of transportome in pharmacogenomics of hepatocellular carcinoma and hepatobiliary cancer. *Pharmacogenomics*. 2019; 20 (13) 957-970.

**Meraris Soto**, María Reviejo, Ruba Al-Abdulla, Marta R. Romero, Rocio I.R Macias, Loreto Boix, Jordi Bruix, Maria A. Serrano, Jose J.G. Marin. Relationship between changes in the exon-recognition machinery and *SLC22A1* alternative splicing in hepatocellular carcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*. 2020; 1866(5):165687.

- Han sido presentados en los siguientes congresos:

1ª Reunión de Hepatología Traslacional: Status Quo y nuevos horizontes en el estudio del hígado. San Sebastián, 3-5 de octubre 2019. **Meraris Soto**, Ruba Al-Abdulla, María A. Serrano, Rocío I.R. Macías, Elisa Herraes, Elisa Lozano, Jesús M. González-Santiago, Ma Isabel Martín Arribas, Óscar Briz, José J.G Marín. Papel del transportador de cationes orgánicos OCT3 en la sensibilidad del carcinoma hepatocelular a la terapia antitumoral basada en TKIs. TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. ÁMBITO: Nacional.

Workshop: Primary Liver Cancer-Emerging Concepts and Novel Treatments (Falk Foundation). Mainz, Alemania, 13-14 de febrero 2020. Candela Cives-Losada, **Meraris Soto**, María reviejo, Ruba Al-Abdulla, Marta Rodríguez-Romero, Rocío I Rodríguez-Macias, Loreto Boix, Jordi Bruix, María A. Serrano, José J.G Marín. Relationship between the aberrant splicing of SLC22A1 and changes in the exon-recognition machinery in hepatocelular carcinoma. TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. ÁMBITO: Internacional.

45º Congreso anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). Madrid, 2-14 de febrero 2020. Oscar Briz, Mª Isabel Martín Arribas, Meraris Soto, María Reviejo, Rocío I. Rodríguez Macías, Marta Rodríguez Romero, María A. Serrano, José J.G. Marin. Relación entre los cambios en la expresión de la maquinaria de reconocimiento de exones y el splicing alternativo del gen SLC22A1 en el carcinoma hepatocelular. TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. ÁMBITO: nacional.

## AGRADECIMIENTOS:

*La gratitud puede transformar días comunes en días de acción de gracias, por lo tanto, puede hacer de la rutina laboral un día con alegría y de las oportunidades, bendiciones<sup>1</sup> y como siempre hay que encontrar tiempo para agradecer a las personas que hacen una diferencia en nuestras vidas<sup>2</sup>, aquí van mis agradecimientos:*

A mis directores de Tesis:

Al Dr. José Juan García Marín, por haberme dado la oportunidad de pertenecer a este maravilloso grupo sin haberme conocido con anterioridad. Por haber tenido un voto de confianza en mi persona y pos su dirección en este trabajo. A la Dra. María Ángeles Serrano, por haber tenido siempre tiempo para mi en cada una de mis dudas, tanto a nivel científico, educativo, administrativo y personal. A la Dra. Ruba Al-Abdulla, por haber tenido la paciencia de enseñarme todas las técnicas que conozco, por haber sugerido el tema de OCT3, y por aún a través de la distancia seguir ayudando y contestando todas mis dudas.

Al resto del grupo HEVEFARM:

Al Dr. Óscar Briz Sánchez, en una charla se dijo una vez “busca un maestro (no es fácil, pero los hay)”, y considero que tu has sido eso para mi; gracias por ser esa persona que te enseña a buscar soluciones. A la Dra. Elisa Herráez Aguilar, por tu sabiduría e inmensa ayuda, gracias por ser voz de razón. A la Dra. Rocío I. Rodríguez Macías, por haber sacado de su tiempo y haber hecho posible mis primeros contactos con este equipo. A la Dra. María Jesús Monte Río, por su ejemplo de profesionalidad. A la Dra. Marta Rodríguez Romero, gracias por acompañarme en mis primeros pasos por el laboratorio, haciéndome pensar que este lugar era especial. A la Dra. Elisa Lozano Esteban, por sacar siempre momentos para enseñarme cosas nuevas y aclarar todas mis dudas.

A mis compañeros, Bea, por levantarme siempre el ánimo, por hacerme reír, por tener interés en mi cultura y por mostrarte como una amiga. A Paula, porque tu fuerza de voluntad fue lo suficientemente grande para transformar la mía. Anabel, por haberme

---

<sup>1</sup> William Arthur Ward

<sup>2</sup> John F. Kennedy

ayudado en todas mis dudas sobre genética, por ser tan humilde y buena persona. Tus gestos desinteresados alegraron mis días muchas veces. A Candela, por el apoyo brindado y por tener ese espíritu valiente que siempre hace falta en cada equipo. Ricky, por las tardes divertidas y por haber hecho de ángel guardián varias veces. Ana, por tus ocurrencias que me hicieron reír en muchas ocasiones y por traer buena suerte. Laura, por enseñarme a hacer las cosas del modo correcto una gran cantidad de veces. A Álvaro, por las buenas charlas rellenando el nitrógeno. Por tu chispa e ingenio, que hicieron que las tareas fueran más divertidas y a María por no dejarme sola con el tema del *splicing*. A Maitane, por tu positivismo, por tomarte el tiempo de dibujarme algunos procedimientos, por tu buen rollo, y sobre todo por equilibrar un poco mi dramatismo natural. El 129 no hubiese sido lo mismo sin ti. A Marta, por tu infinita paciencia y alegría pegadiza. Eres del tipo de personas que puede iluminar un lugar con su presencia. Y Emilia por ser una persona tan carismática y transformar todo a su paso en algo mejor. Gracias por su compañía, por hacer de este viaje uno repleto de hermosos recuerdos, más que mis compañeros se han comportado como amigos.

A personas especiales:

A mis amigos, los que están en Puerto Rico, y los que hice en este país, que me apoyaron, me escucharon y en aquellos momentos de desanimo y frustración, brindaron palabras de motivación, que me hicieron volver a la batalla con más energías que nunca. A Juan, Sioly y Alice por estar en los momentos cruciales de este proceso. A José M. por aportar sabiduría. A mi amiga de toda la vida Kathia, que nunca me abandonó. A mi amigo Samuel, que siempre creyó en mi y me lo dejó saber una y otra vez. A Javier, por ayudarme en este proceso, por escucharme todos los días y por motivarme sin cansancio. A mi madre y a mi padre, que me enseñaron el amor por la lectura, la resiliencia, a nunca darme por vencida y por ser los fieles compañeros de todas mis batallas.

*Dedicada a:*

*Los que buscan  
Aunque no encuentren*

*A los que avanzan  
Aunque se pierdan*

*Por: Mario Benedetti*

## ABREVIATURAS:

**3´SS:** *Splice site acceptor*

**5´SS:** *Splice site donador*

**5-FU:** 5-Fluoruracilo

**A:** Adyacente al tumor

**Ab:** Anticuerpo

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario.

**AFP:**  $\alpha$ -fetoproteína

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** ARN mensajero

**BCLC:** *Barcelona Clinic Liver Cancer*

**BCN:** Biopsia proveniente del hospital de Barcelona

**BP:** Punto de ramificación

**c-Met:** Factor de crecimiento hepatocitario

**CCA:** Colangiocarcinoma

**CDH17:** Cadherina 17

**CEP:** Colangitis esclerosante primaria

**CYP:** Citocromo P450.

**Dapi:** 4', 6-diamidino-2-fenilindol

**DB:** Base/s de datos

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

**DMSO:** Dimetil sulfóxido

**DNMT3b4:** DNA metiltransferasa 3b4

**dNTP:** Desoxinucleótido trifosfato

**eCCA:** Colangiocarcinoma extrahepático

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico

**EGFP:** Proteína verde fluorescente

**EEM:** Error estándar de la media.

**EMT:** Transición epitelio-mesénquima

**ES:** Omisión de exón

**ESE:** *Exonic splicing enhancer*

**ESS:** *Exonic Splicing silencer*

**F:** *Forward Primer*

**FBS:** Suero bovino fetal

**FDA:** *Food and Drug Administration*

**FGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos

**GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**HCC:** Carcinoma hepatocellular

**HCl:** Ácido Clorhídrico

**HNF4 $\alpha$ :** *Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$*

**HPLC-MS/MS:** Cromatografía líquida de alta presión acoplado a espectrometría de masas en tándem

**iCCA:** Colangiocarcinoma intrahepático

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

**ISE:** *Intronic splicing enhancer*

**ISS:** *Intronic splicing silencer*

**Kb:** Kilobase

**KDa:** Kilodalton

**MAPK:** *Mitogen-activated Protein Kinases*

**MEM:** *Minimum Essential Medium*

**MOC:** Mecanismos de quimiorresistencia

**MOCK:** Control transducido con vectores vacíos

**MRP2:** *Multidrug resistance-associated protein 2*

**MPP+:** 1-metil-4-fenilopiridina

**MTT:** Metil tetrazolio

**nm:** nanómetros

**NT:** No tumoral

**mM:** millimolar

**NAFLD:** *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*

**OCT1:** *Organic cation transporter 1*

**OCT3:** *Organic Cation transporter 3*

**ORF:** *Open reading frame*

**pb:** pares de bases

**PBS:** Tampón fosfato salino

**pCCA:** Colangiocarcinoma perihilar

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

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

**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas 1

**Proteínas SR:** proteínas ricas en serina/arginina, que favorecen el *splicing* corto

**Proteínas hnRNP:** proteínas silenciadoras, que favorecen el *splicing* largo

**PSI:** *Calculate percent spliced-in*

**PT:** Región de polipirimidina  
**pWPI:** Control transducido con vectores vacíos  
**RFA:** Ablación por radiofrecuencia  
**RRM:** *RNA recognition motif*  
**RT:** Transcripción reversa.  
**RT-qPCR:** PCR cuantitativa  
**SD:** Desviación estándar  
**SDS:** Dodecilsulfato sódico  
**SLC:** Solute Carrier Protein  
**SNCA:** Alfa-sinucleína  
**SNP:** Polimorfismo de nucleótido único.  
**SQTL:** Síndrome de QT-largo  
**STAT:** *Signal Transducer and Activator of Transcription.*  
**T:** Tejido tumoral  
**TC:** Tomografía computarizada  
**TACE:** Quimioembolización transarterial  
**TCGA:** Atlas del Genoma del Cáncer  
**TEA:** Tetraetilamonio  
**TEMED:** Tetrametiletilendiamina  
**TKI:** Inhibidor de tirosina quinasa  
**TLDA:** *Taqman Low-Density Array*  
**TMD:** Dominio transmembrana  
**UAF:** Unidades arbitrarias de fluorescencia  
**USAL:** Universidad de Salamanca  
**UTR:** *untranslated region*  
**VEGFR:** Receptor de factor de crecimiento de endotelio vascular  
**VHB:** Virus de la hepatitis B  
**VHC:** Virus de la hepatitis c  
**WB:** *Western blot.*  
**WT:** *Wild type.*



# ÍNDICE

<b>1. Objetivos</b> .....	1
<b>2. Introducción</b> .....	5
<b>2.1. Sistema hepatobiliar</b> .....	6
2.1.1. Generalidades .....	6
2.1.2. Hepatocitos .....	6
2.1.3. Colangiocitos .....	6
2.1.4. El sistema biliar .....	7
2.1.5. Otros tipos de células hepáticas .....	7
<b>2.2. Funciones del sistema hepatobiliar</b> .....	8
2.2.1. Funciones metabólicas .....	8
2.2.2. Funciones no metabólicas .....	9
<b>2.3. Cáncer hepático</b> .....	9
2.3.1. Carcinoma hepatocelular .....	9
2.3.2. Colangiocarcinoma .....	14
<b>2.4. Papel de los inhibidores de tirosina quinasa en la terapia antitumoral en cáncer hepático</b> .....	17
2.4.1. Ruta ERK .....	17
2.4.2. Fármacos antitumorales inhibidores de tirosina quinasas .....	18
2.4.2.1. Sorafenib .....	19
2.4.2.2. Otros fármacos de la familia TKIs .....	21
<b>2.5. Resistencia a la quimioterapia antitumoral en cáncer hepático</b> .....	22
2.5.1. Papel del transportoma en la disminución de la concentración intracelular de fármacos (MOC-1) .....	24
<b>2.6. Transportador de Cationes Orgánicos OCT1 (gen <i>SLC22A1</i>)</b> .....	25
2.6.1. Estructura del OCT1 .....	25
2.6.2. Expresión de OCT1 .....	26
2.6.3. Función de OCT1 .....	26
2.6.4. Regulación de la expresión de OCT1 .....	27
2.6.5. Variantes de OCT1 .....	27

<b>2.7. Transportador de Cationes Orgánicos OCT3 (gen <i>SLC22A3</i>)</b> .....	<b>28</b>
2.7.1. Estructura del OCT3 .....	<b>28</b>
2.7.2. Expresión de OCT3 .....	<b>29</b>
2.7.3. Función de OCT3 .....	<b>29</b>
2.7.4. Regulación de la expresión de OCT3 .....	<b>30</b>
2.7.5. Variantes de OCT3 .....	<b>30</b>
<b>2.8. Splicing</b> .....	<b>31</b>
2.8.1. Definición de splicing .....	<b>31</b>
2.8.2. Estructura del pre-ARNm y su maduración .....	<b>31</b>
2.8.3. Tipos de intrones sometidos al splicing .....	<b>32</b>
2.8.4. El espliceosoma .....	<b>32</b>
2.8.4.1. El espliceosoma mayor .....	<b>33</b>
2.8.4.2. El espliceosoma menor .....	<b>34</b>
2.8.4.3. Reacción bioquímica del splicing .....	<b>35</b>
2.8.5. Proteínas implicadas en los complejos del splicing .....	<b>36</b>
2.8.6. Regulación del splicing .....	<b>37</b>
2.8.6.1. Secuencias reguladoras de splicing .....	<b>37</b>
2.8.6.2. Proteínas reguladoras del splicing .....	<b>39</b>
2.8.7. Splicing alternativo .....	<b>42</b>
2.8.8. Splicing en la enfermedad .....	<b>42</b>
<b>3. Material y Métodos</b> .....	<b>45</b>
<b>3.1. Material biológico</b> .....	<b>46</b>
3.1.1. Muestras humanas .....	<b>46</b>
3.1.2. Líneas celulares .....	<b>47</b>
<b>3.2 Productos</b> .....	<b>48</b>
<b>3.3. Medios instrumentales</b> .....	<b>51</b>
<b>3.4. Soluciones comunes utilizadas</b> .....	<b>53</b>
<b>3.5. Cultivos celulares</b> .....	<b>54</b>
3.5.1. Cultivo de células para estudios de expresión génica .....	<b>55</b>
3.5.2. Cultivo de células para estudios de funcionalidad de proteínas transportadoras .....	<b>55</b>
3.5.3. Estudios de viabilidad celular .....	<b>56</b>

2.5.3.1. Determinación de la viabilidad celular .....	56
<b>3.6. Determinación de la expresión génica a nivel de ARNm .....</b>	<b>57</b>
3.6.1. Analisis de los niveles de ARNm por RT-qPCR .....	57
3.6.1.1. Extracción de ARN total .....	57
3.6.1.2. Transcripción de reverse (RT) .....	58
3.6.2. Diseño de cebadores o primers .....	58
2.6.2.1. PCR cuantitativa (qPCR) .....	60
2.6.2.2. Cuantificación relativa .....	60
3.6.3. Taqman Low Density Arrays (TLDA) o Tarjetas microfluídicas .....	61
<b>3.7. Métodos aplicados en los estudios de splicing .....</b>	<b>63</b>
3.7.1. Ensayo in silico para determinar la expresión de los genes del espliceosoma .....	63
3.7.2. Ensayo in silico para determinar la determinación de splicing en el pre- ARNm de SLC22A1 .....	67
<b>3.8. Determinación de splicing en muestras de HCC en diferentes enfermedades hepáticas .....</b>	<b>69</b>
3.8.1. Obtención de ADNc del gen SLC22A1 .....	69
2.8.1.1. Detección de variantes de OCT1 generadas por splicing alternativo .....	70
2.8.1.2. PCR Analítica .....	70
2.8.1.3. Electroforesis en gel de agarosa .....	70
2.8.1.4. Visualización de los amplicones de OCT1 .....	70
<b>3.9. Producción de vectores lentivirales .....</b>	<b>70</b>
3.9.1. Fundamento .....	70
3.9.2. Producción de las partículas virales .....	71
3.9.3. Determinación del titulo viral .....	71
3.9.4. Determinación de la multiplicidad de infección (MOI) .....	72
3.9.5. Transducción de las células diana .....	72
<b>3.10. Detección de proteínas por Western blot .....</b>	<b>72</b>
3.10.1. Obtención de las muestras .....	72
3.10.1.1 Lisado de líneas celulares .....	72
3.10.1.2 Obtención de crudos de membrana .....	73

3.10.2. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) ...	73
3.10.2.1 Preparación de los geles .....	73
3.10.2.2 Preparación de las muestras .....	73
3.10.2.3 Condiciones de la electroforesis y de la transferencia .....	73
3.10.2.4 Soluciones utilizadas .....	73
3.10.3. Inmunodetección .....	74
<b>3.11. Detección de proteínas por Inmunofluorescencia .....</b>	<b>75</b>
3.11.1. Preparación de muestras .....	75
3.11.2. Inmunodetección .....	75
<b>3.12. Detección de proteínas por Inmunohistoquímica .....</b>	<b>76</b>
<b>3.13. Estudios de citometría de flujo .....</b>	<b>76</b>
3.13.1. Fundamento .....	76
3.13.2. Procedimiento .....	79
<b>3.14. Medida de sorafenib, regorafenib y cabozantinib por HPLC-MS/MS. 79</b>	
3.14.1. Captación de sorafenib, regorafenib y cabozantinib en células .....	79
3.14.2. Preparación de muestras para las medidas de captación por HPLC-MS/MS .....	79
<b>3.15. Estudio clínico retrospectivo para evaluar el papel del OCT3 sobre la respuesta al sorafenib .....</b>	<b>80</b>
<b>3.16. Tratamiento estadístico .....</b>	<b>82</b>
<b>4. Resultados .....</b>	<b>83</b>
<b>4.1. Splicing aberrante del gen SLC22A1 en enfermedades hepáticas ....</b>	<b>84</b>
<b>4.2. Relación entre los cambios de la maquinaria de reconocer exones y el splicing alternativo en HCC .....</b>	<b>87</b>
4.2.1. El complejo E .....	89
4.2.1.1 Elementos U1 .....	89
4.2.1.2 Proteínas Sm .....	94
4.2.1.3 Factores de reconocimiento de exones del complejo E .....	100
4.2.2. El complejo B .....	104
4.2.3. Genes que favorecen el splicing corto: proteínas SR .....	111
4.2.4. Genes que favorecen el splicing largo: proteínas hnRNP .....	125
4.2.5. Quinasas / Fosfatasas .....	136

<b>4.3. Efecto de la expresión del transportador OCT3 en la respuesta al tratamiento con sorafenib en pacientes con HCC .....</b>	<b>145</b>
4.3.1. Detección de OCT3 en la membrana plasmática .....	147
4.3.2. Relación entre expresión de OCT3 y la respuesta al sorafenib en HCC ..	149
<b>4.4. Papel de OCT3 en la captación de fármacos antitumorales y sensibilidad de los tumores hepáticos a estos fármacos: selección de sublíneas celulares CHO con expresión estable de OCT1 o OCT3 ..</b>	<b>150</b>
4.4.2. Screening in vitro para la selección los fármacos antitumorales por OCT3 .....	156
4.4.3. Papel de la expresión estable de OCT3 en la captación de TKIs .....	157
4.4.4. Expresión de OCT3 en líneas celulares de tumores hepáticos humanas (HCC y CCA) .....	159
4.4.5. Viabilidad celular frente a fármacos antitumorales en el modelo de células HepG2 de expresión endógena de OCT3 .....	160
4.4.6. Uso de vectores lentivirales para la expresión estable de OCT3 en las células TFK1 .....	162
<b>5. Discusión .....</b>	<b>166</b>
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>183</b>
<b>6. Bibliografía .....</b>	<b>186</b>

## 1. Objetivos



Los tumores hepáticos primarios, principalmente el carcinoma hepatocelular (HCC) y el colangiocarcinoma (CCA), se caracterizan por un alto índice de mortalidad. La mejor opción curativa para los pacientes con este tipo de tumores es la resección quirúrgica. Sin embargo, una limitación para la aplicación clínica de la cirugía es que el diagnóstico se realiza normalmente cuando el tumor se encuentra en estadios muy avanzados.

Tanto el CCA como el HCC se caracterizan por su baja sensibilidad a los fármacos antitumorales debido a que presentan *a priori* o desarrollan durante el tratamiento resistencia a la quimioterapia. Entre los mecanismos de quimiorresistencia (MOC) destacan los implicados en la reducción del contenido intracelular de fármacos, por alteración de los niveles de expresión o funcionalidad de las proteínas implicadas en su captación por las células tumorales. Los inhibidores de tirosina quinasas (TKIs), como el sorafenib, regorafenib, lenvatinib y cabozantinib, son utilizados actualmente en el tratamiento de varios tipos de cáncer. Entre ellos, el sorafenib es un fármaco de primera línea para el tratamiento del HCC avanzado. Sin embargo, la eficacia clínica de estos fármacos es muy baja y sólo se consigue una ligera prolongación de la supervivencia de los pacientes que responden al tratamiento.

Para que los TKIs alcancen su diana y ejerzan su función intracelular, tienen que alcanzar el interior celular, lo que se cree que ocurre mayoritariamente por mecanismos de transporte específicos y eficientes, ya que debido a su peso molecular y/o su polaridad no pueden atravesar fácilmente la membrana plasmática por difusión simple. Nuestro grupo de investigación demostró que el transportador de cationes orgánicos 1 (OCT1, gen *SLC22A1*) es capaz de transportar sorafenib y que cambios en los niveles de su expresión y/o en la función modifican la respuesta al sorafenib. Por otra parte, se ha descrito que en HCC y CCA hay una menor expresión del OCT1 que en las células sanas. En el estudio clínico TRANSFER, se encontró que la presencia de OCT1 en la membrana plasmática, es mejor marcador para predecir la respuesta al sorafenib en los pacientes con HCC, que la determinación de valores totales de ARNm de OCT1. En este mismo estudio llamó la atención la existencia de un grupo de pacientes que presentaban respuesta al sorafenib sin que OCT1 se encontrase expresado en la membrana plasmática de las células tumorales. Esto sugería la presencia de otros transportadores capaces de mediar la captación de sorafenib en ausencia de OCT1.

En la familia de transportadores *SLC22A*, existen principalmente tres miembros, OCT1, OCT2 y OCT3. Mientras que OCT2 se expresa en el riñón y sus niveles en el hígado son muy bajos,



OCT3 se expresa en varios tejidos, incluido el hígado. Por todo ello, OCT3 podría ser el transportador implicado en la captación de sorafenib en ausencia de OCT1.

En otro estudio realizado previamente en nuestro laboratorio, se determinó el nivel de expresión de OCT1 total y de la forma silvestre en HCC y en el tejido adyacente no tumoral y se demostró que, mientras que el ARNm total de OCT1 disminuye en el HCC comparando con el tejido adyacente no tumoral, la forma silvestre de este ARNm era menos abundante en el tejido adyacente no tumoral comparado con el hígado sano. Este hecho puede ser indicativo de que este ocurriendo un proceso de *splicing* alternativo del pre-ARNm de OCT1 que puede además ser un evento pre-tumoral asociado a diferentes enfermedades hepáticas entre ellas la cirrosis.

El *splicing* se lleva a cabo mediante dos complejos macromoleculares nominados espliceosoma mayor y menor. Se trata de un proceso dinámico de múltiples etapas que implica alrededor de 300 proteínas que llevan a cabo diferentes funciones. Diversos estudios han encontrado que los eventos de *splicing* alternativo en HCC pueden ser utilizados como marcadores de diagnóstico y/o pronóstico. Además, y como ya se ha mencionado, la presencia de formas de *splicing* alternativo en HCC puede afectar la función de OCT1 y la respuesta al tratamiento con sorafenib.

Teniendo en cuenta estos antecedentes nos planteamos como **objetivo global** de esta tesis doctoral investigar mediante estudios experimentales e *in silico* los cambios en la expresión de las proteínas implicadas en el espliceosoma mayor y la relación entre estos cambios y el grado de *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. Asimismo, investigamos el valor predictivo y terapéutico de la proteína OCT3 en la respuesta al tratamiento con TKIs, de uso actual en clínica, en pacientes con cáncer hepático primario.



Para llevar a cabo este objetivo global se plantearon los siguientes objetivos parciales:

**Objetivo 1:** Evaluar la presencia de *splicing* alternativo en el gen *SLC22A1* en patologías hepáticas no tumorales comparando la situación en tejido sano, cirrótico y con HCC, para determinar la etapa en la que aparece el *splicing* aberrante de OCT1.

**Objetivo 2:** Investigar experimentalmente e *in silico*, en HCC y el tejido adyacente no tumoral, la relación entre el nivel de expresión de las formas de *splicing* alternativo de *SLC22A1* y la expresión de los genes implicados en la maquinaria de reconocimiento de exones, tanto los componentes del espliceosoma como los reguladores del *splicing*.

**Objetivo 3:** Evaluar retrospectivamente en pacientes con HCC tratados con sorafenib, dentro del estudio TRANSFER, la relación entre la respuesta de estos pacientes al tratamiento con sorafenib y la expresión del OCT3 y su localización en la membrana plasmática de las células tumorales.

**Objetivo 4:** Evaluar en modelos celulares, el papel de OCT3 en la captación y respuesta al sorafenib y otros TKIs.



## 2. Introducción

## 2.1. Sistema hepatobiliar

### 2.1.1. Generalidades

El hígado es la víscera más grande del cuerpo, constituyendo aproximadamente el 2 % del peso corporal, siendo el lóbulo derecho más grande que el izquierdo. El ligamento falciforme divide los lóbulos y fija el hígado con la pared anterior del abdomen junto con las venas suprahepáticas. El hígado recibe un suministro de sangre dual desde la vena porta hepática y las arterias hepáticas (Abdel-Misih SR & Bloomston M., 2010). Alrededor del 80 % del volumen del hígado está formado por los hepatocitos, células epiteliales parenquimales que se unen entre sí dejando espacios vasculares libres heterogéneos denominados sinusoides. Entre los hepatocitos adyacentes se encuentra un pequeño espacio formado por la invaginación del polo apical de sus propias membranas plasmáticas, lo que constituye el canalículo biliar, en el cual se forma la bilis primaria o canalicular y se vierte al conducto biliar.

### 2.1.2. Hepatocitos

Los hepatocitos son células epiteliales poligonales de 25 a 30  $\mu\text{m}$ , organizadas en placas tridimensionales que irradian desde la vena central hacia las ramas de la vena porta. Los hepatocitos liberan sustancias: i) hacia los capilares sinusoidales, y ii) hacia los canalículos biliares (Weiss L & Greep RO., 1982). En los hepatocitos se considera apical a la membrana que forma los canalículos biliares y sinusoidal a la membrana orientada al polo sanguíneo (figura I-1). En la parte apical se encuentran los transportadores que son responsables de la secreción de fármacos o sus metabolitos en la bilis. Por otro lado, los transportadores hepáticos expresados en la parte basolateral o sinusoidal median la captación de los fármacos desde la sangre hasta el hígado; otros transportadores expresados en el área basolateral pueden secretar algunos fármacos o metabolitos de vuelta a la sangre para una eliminación secundaria a nivel renal (Meier PJ., 1988). La membrana basolateral presenta un elevado número de transportadores de moléculas, entre los que se encuentran los transportadores de cationes orgánicos (OCT1, OCT3, OCTN1 y OCTN2) (Yabuuchi H. I *et al.*, 1999) (Wu X *et al.*, 1998), entre otros.

### 2.1.3. Colangiocitos

Los colangiocitos son células epiteliales, que constituyen aproximadamente el 5 % de la población total del hígado, recubriendo el árbol biliar tanto intra como extrahepático. Los hepatocitos generan la bilis en el canalículo biliar (Boyer JL., 1971), mientras que

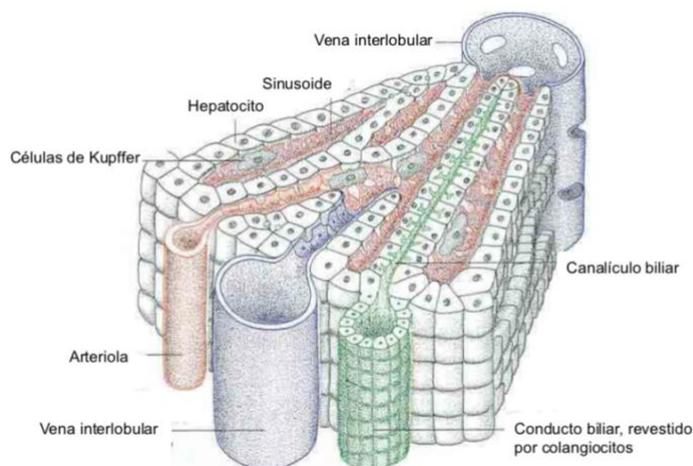


los colangiocitos diluyen y alcalinizan el fluido biliar (Kanno N *et al.*, 2001). Los colangiocitos tienen una membrana basolateral que encara la circulación y una apical orientada hacia el espacio biliar (figura I.1) (Schaffner & Popper., 1961) (Carruthers JS & Steiner JW., 1961).

Los transportadores que se encuentran en los colangiocitos se pueden expresar en la membrana apical o en la basolateral, para facilitar el movimiento de electrolitos, agua y solutos, modificando así el volumen y composición final de la bilis (Lazaridis KN & LaRusso NF, 2015).

#### 2.1.4. El sistema biliar

El sistema biliar es un complejo entramado que se forma por la unión de los ductos biliares intrahepáticos, formando conductos de mayor tamaño que convergen en los ductos biliares extrahepáticos, los cuales finalmente vierten la bilis a la vesícula biliar y, posteriormente, al intestino (Ludwig J *et al.*, 1987). Así, la estructura del sistema biliar se puede asemejar a la forma de un árbol, donde los conductos común y hepático corresponderían al tronco, los conductos biliares intrahepáticos corresponderían a las ramas más grandes y los pequeños dúctulos a las más pequeñas (Masyuk TV *et al.*, 2001).



**Figura I-1:** Organización tridimensional de un lóbulo hepático (Adaptación de Adams DH *et al.*, 2006)

#### 2.1.5. Otros tipos de células hepáticas

En el hígado podemos encontrar otras células, que llevan a cabo diferentes funciones. Las células de Kupffer son histiocitos que desempeñan un importante papel inmunitario y son responsables de la fagocitosis de bacterias y sustancias extrañas que puedan

acceder al sinusoides (Dixon LJ *et al.*, 2013). A través de las células endoteliales, los componentes viajan de la sangre hacia la membrana sinusoidal de los hepatocitos. También se encuentran en el parénquima las células de Ito (células estrelladas), que almacenan vitamina A en el citoplasma. Y las células de Pit (*natural killer*), que expresan antígenos de reconocimiento intercelular en su superficie (Nakatani K *et al.*, 2004).

## 2.2. Funciones del sistema hepatobiliar

La sangre que sale del intestino pasa a través del hígado antes de llegar al resto del cuerpo. El hígado participa en el metabolismo de los nutrientes y los fármacos absorbidos en el intestino (Bogdanos DP *et al.*, 2013). Además de las funciones metabólicas, el hígado desempeña múltiples funciones no metabólicas.

### 2.2.1. Funciones metabólicas

- Metabolismo de proteínas. El hígado regula la disponibilidad de los aminoácidos en la circulación general y el metabolismo de proteínas como la transformación del amonio en urea y la interconversión de aminoácidos no esenciales. Asimismo, regula la síntesis de varias proteínas, entre ellas la albúmina y las de fase aguda, además de proteínas de unión a hormonas o esteroides, entre otras (Menche N., 2012).
- Metabolismo de hidratos de carbono, que incluye vías como la glucogenolisis y la gluconeogénesis, las vías que controlan la homeostasis de la glucosa, el catabolismo de hexosas, etc (Ozougwu JC., 2017).
- Metabolismo de lípidos: síntesis de triglicéridos y ácidos grasos. Además, la síntesis y catabolismo del colesterol, lipoproteínas plasmáticas, producción de cetoácidos, etc.
- Metabolismo de sustancias tóxicas, como el alcohol y las toxinas, a través de complejos procesos de detoxificación.
- Metabolismo de fármacos. Muchos fármacos se administran como profármacos y requieren activación metabólica por enzimas que se encuentran en el hígado. Las mismas se dividen en enzimas de fase I, que participan en la oxidación de sustratos, y enzimas de fase II, que participan en la conjugación con grupos poliatómicos (Marin JJ *et al.*, 2010).



### 2.2.2. Funciones no metabólicas

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 de grasas y vitaminas liposolubles. Los colangiocitos llevan a cabo procesos de secreción y absorción de agua, electrolitos y otros solutos orgánicos de la bilis, modificando así su composición durante el tránsito de la misma a través de los conductos biliares (Alpini G *et al.*, 2001).
- Síntesis de factores de coagulación, como el fibrinógeno, los factores III, V, VII, IX y XI y del factor de crecimiento IGF-1 entre otros (Ohisson C *et al.*, 2009).
- Almacén de múltiples sustancias, como la glucosa en forma de glucógeno, la vitamina B12, el hierro y el cobre (Senoo H *et al.*, 2010).
- Función inmunitaria por la actividad de las células Kupffer.

### 2.3. Cáncer hepático

El cáncer, es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. El cáncer de hígado primario más común es el carcinoma hepatocelular (HCC), siendo más del 90 % de todos los cánceres del hígado, seguido del colangiocarcinoma y hepatoblastoma (Chedid MF *et al.*, 2017). 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). Los tumores hepáticos pueden ser también secundarios, debidos a las frecuentes metástasis de tumores originados en otros tejidos, frecuentemente tumores colorrectales (Benson AB *et al.*, 2007).

#### 2.3.1. Carcinoma hepatocelular

##### Etiología

Aunque el HCC rara vez puede ocurrir sin factores de riesgo reconocidos (Chedid MF *et al.*, 2017), la mayoría de los casos de HCC surgen de una lesión hepática crónica e inflamación inducida por distintas causas, tales como el alcoholismo, la exposición a hepatotoxinas, trastornos genéticos o metabólicos e infecciones virales, sobre todo con los virus de las hepatitis B y C (Huang YT *et al.*, 2016). La cirrosis y la fibrosis hepáticas se consideran condiciones premalignas, que acontecen por la presencia de hepatocitos poco diferenciados que se dividen en un intento de restablecer la masa funcional perdida, creando, en consecuencia, células displásicas rodeadas de tejido cirrótico



(Chedid MF *et al.*, 2017). Este microambiente asociado a la cirrosis favorece el desarrollo de mutaciones y alteraciones genéticas que están en el origen de la transformación maligna de los hepatocitos (Berasain C *et al.*, 2010).

### **Epidemiología**

El HCC ocurre, en general, en personas de 50 a 60 años, mayormente en hombres. Según la Sociedad Americana contra el cáncer, el HCC es mucho más común en los países del África subsahariana y del sudeste asiático (Conrad R *et al.*, 2013). Aunque la incidencia del HCC está aumentando en otras regiones del mundo, incluidos los EE.UU, donde se ha incrementado en casi 4 veces entre los años 1980 y 2011 (Ghoury YA *et al.*, 2017). Además, aunque el número de afectados con HCC aumenta con la edad, se ha observado que en las áreas con alta incidencia existe una tendencia a desarrollar este tipo de tumor a una edad más temprana (Dimitroulis D *et al.*, 2017).

### **Patogenia**

La hepatocarcinogénesis es un proceso complejo, con múltiples pasos, en la cual diversas vías de señalización celular pueden estar alteradas, lo que contribuye a que esta enfermedad tenga un perfil molecular heterogéneo.

Durante la última década se han identificado varios genes que codifican proteínas implicadas en la patogénesis de HCC, incluidos P53, P16, P73, APC, PTEN, IGF-2, BRCA2, SMAD2, SOCS,  $\beta$ -catenina, proteínas de retinoblastoma, c-myc y ciclina D1 (Brito AF *et al.*, 2012) (Shearn CT & Petersen DR., 2015) (Daher S *et al.*, 2018). P53 se encuentra entre los genes más comúnmente mutados de los que se expresan en HCC (Gomes AR *et al.*, 2015). Aparte de las mutaciones específicas observadas en HCC, hay varias vías de señalización y angiogénicas involucradas en el desarrollo de HCC que implican genes como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), angiopoyetinas, factor de crecimiento de hepatocitos y endogлина (CD105) entre otros. Estos factores proangiogénicos activan las tirosina quinasas de células endoteliales, la señalización intracelular y las vías de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) / Akt / mTOR que conducen a la angiogénesis (Mekuria AN & Abdi AD., 2017) (Daher S *et al.*, 2018). La vía MAPK, otra ruta implicada en el desarrollo de HCC, actúa a través de la proteína Ras. La proteína Ras se activa por medio de su fosforilación, que posibilita el envío de señales



al núcleo a través de los componentes posteriores de la vía, como son ERK1, RAF y MEK (Villanueva A & Llovet JM., 2011) (Delire B & Stärkel P., 2015) (Daher S *et al.*, 2018).

La epigenética del HCC está relacionada con la progresión del tumor, la invasión y la metástasis. Las alteraciones epigenéticas en el HCC incluyen la hiper-/hipometilación de ADN, la ruptura de histonas y los ARN no codificantes, como se manifiesta por la expresión alterada de varios micro-ARN (Ma L *et al.*, 2014) (Zhang Y., 2015) (Daher S *et al.*, 2018). La presencia de estos cambios epigenéticos puede usarse con fines diagnósticos y pronósticos. Otro factor importante es la aparición de *splicing* alternativo, que puede provocar alteraciones en el ARNm por medio de la maquinaria del espliceosoma, dando como resultado la codificación de proteínas aberrantes, lo que puede desembocar en hepatocarcinogénesis y quimiorresistencia.

### Diagnóstico

Debido a que la mayoría de los pacientes con HCC no presentan síntomas en las primeras etapas del cáncer, el diagnóstico normalmente se realiza cuando la enfermedad se encuentra ya en un estado avanzado. Las técnicas de imagen más utilizadas en el diagnóstico son la ecografía, la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM). Las técnicas diagnósticas incluyen marcadores serológicos, entre los que el más común es la alfa-fetoproteína 1 (AFP-1), aunque esta proteína también se puede encontrar elevada en suero de pacientes con otros tipos de cáncer y en patologías hepáticas no tumorales, como la cirrosis (Chedid MF *et al.*, 2017). Además, está el examen citológico de lesiones sospechosas mediante punción de aguja fina (FNA) cuya eficacia depende en gran medida del tamaño y diámetro de la lesión (França AV *et al.*, 2004).

### Estadificación

La estadificación tumoral es un factor crítico para el pronóstico de la enfermedad y para optimizar el tratamiento en cada caso. Sin embargo, el pronóstico para los pacientes con HCC no solo se asocia con el estadio de la enfermedad, sino que también depende de la función hepática subyacente y del estado funcional de cada paciente, teniendo en cuenta que la mayoría de los pacientes de HCC sufren también otras enfermedades hepáticas, como la cirrosis (Llovet JM *et al.*, 2003). El sistema de estadificación del HCC, denominado BCLC y propuesto por el Hospital Clínico de Barcelona (BCLC *Barcelona Clinic Liver Cancer*), es uno de los más aceptados. Surgió de la identificación de factores



pronósticos en varios ensayos clínicos. Ello llevó a proponer una clasificación con cinco estadios teniendo en cuenta el tamaño y número de tumores, la función hepática subyacente y el estado funcional general del paciente (tabla I.1) (Bruix J *et al.*, 2001) (De Lope CR *et al.*, 2012).

**Tabla I.1.** Estadificación del HCC (BCLC *Barcelona Clinic Liver Cancer*).

Estadio	PS	Características del tumor	Función hepática
0	0	Único $\leq$ 2 cm	Child-Pugh A
A	0	Único o hasta 3 nódulos $\leq$ 3 cm	Child-Pugh A-B
B (HCC intermedio)	0	Múltiples nódulos y grandes	Child-Pugh A-B
C (HCC avanzado)	1-2	Invasión vascular o extensión extrahepática	Child-Pugh A-B
D (HCC estadio final)	3-4	Cualquiera	Child-Pugh C

PS: del inglés *Performance Status*

La escala Child-Pugh (CP) es un sistema de clasificación simple y ampliamente utilizado para valorar la función hepática (tabla I.2) (Subramaniam S *et al.*, 2013) que permite definir el grado de deterioro que acompaña a la enfermedad hepática. El sistema CP se define de acuerdo a 5 medidas clínicas (bilirrubina total, albúmina, tiempo de protrombina, grado de ascitis y grado de encefalopatía) y en función de la puntuación conjunta de estas medidas clínicas se puede predecir la tasa de supervivencia de los pacientes entre 1 y 5 años (Kamath PS *et al.*, 2001).

**Tabla I.2.** El sistema CP (Child-Pugh) (A: menor severidad – C: mayor severidad).

Grado	Puntos	Tasa de supervivencia de 1 a 5 años
A: enfermedad bien compensada.	5-6	95 %
B: compromiso funcional significativo.	7-9	75 %
C: enfermedad descompensada.	10-15	50 %

## Tratamiento

El estadio del tumor juega un papel esencial en la orientación de las decisiones del tratamiento. Los pacientes en los primeros estadios de HCC sin cirrosis son generalmente candidatos ideales para las resecciones hepáticas parciales (Llovet JM *et al.*, 2005) y tienen una probabilidad mucho mayor de respuesta curativa con diferentes opciones de tratamiento. El tratamiento definitivo para el HCC es el trasplante hepático, que permite tanto el tratamiento de la enfermedad hepática subyacente como la cura



del HCC (Cucchetti A *et al.*, 2014); sin embargo, son pocos los pacientes que cumplen los requisitos para el trasplante (Mazzaferro V *et al.*, 1996). La tasa de supervivencia a 4 años de los pacientes trasplantados es aproximadamente de un 75 % (Mazzaferro V *et al.*, 1996) aunque, después de un trasplante, la mitad de los pacientes desarrollan cirrosis (Bruix J *et al.*, 2011) (Wörns MA & Galle PR., 2010) (Daher S *et al.*, 2018).

Las terapias ablativas, que consisten en la administración de calor con radiofrecuencia o frío (crioablación) para eliminar el tejido tumoral, presentan un pequeño potencial de curación en HCC, siendo solo aplicables en el caso de tumores de tamaño inferior a 2 cm y en etapas muy tempranas del desarrollo tumoral (Bruix J *et al.*, 2016) (Chedid MF *et al.*, 2017). Otra opción es la quimioembolización por catéter transarterial (TACE), un tratamiento paliativo para pacientes con HCC inoperables, con lesiones grandes o multinodulares limitadas al hígado y con una función hepática adecuada (Facciorusso A *et al.*, 2016). Consiste en administrar localmente la quimioterapia junto con un agente que restringe el aporte de sangre al tumor (Lencioni R *et al.*, 2012).

La radioterapia conformada tridimensional (CRT) permite crear una imagen tridimensional del tumor y administrar la mayor dosis de radiación posible al tumor sin afectar al tejido sano. Ha mostrado buenos resultados a dosis entre 40 y 60 Gy y en pacientes con HCC avanzado, con una tasa media de respuesta del 45 % y una mediana de supervivencia de 10 a 15 meses (Tsai CL *et al.*, 2016).

Debido a la resistencia a la quimioterapia, las opciones quimioterapéuticas del HCC avanzado son limitadas. De hecho, debido a la disfunción hepática subyacente y otras complicaciones los pacientes tienen una tolerancia limitada a tratamientos con poliquimioterapia (Kim DW *et al.*, 2017) (Matsumoto K *et al.*, 2008). En este sentido, la combinación de los fármacos cisplatino, interferón, adriamicina y fluorouracilo (PIAF) se mostró prometedora en un estudio clínico de fase II (Leung TW *et al.*, 1999), pero en un estudio clínico de fase III no demostró eficacia en comparación con el tratamiento solo con doxorubicina (Yeo W *et al.*, 2005). Además, los pacientes mostraron mielotoxicidad severa al régimen terapéutico PIAF (Yeo W *et al.*, 2005).

Los avances en el campo del tratamiento del HCC han adaptado estrategias de combinación novedosas e identificado nuevas dianas terapéuticas. El fármaco sorafenib, un inhibidor de uso oral de las multiquinasas, fue aprobado por la FDA para el tratamiento de HCC avanzado y sigue siendo actualmente la terapia de primera



opción para el HCC avanzado (Llovet JM., 2008) (Llovet JM *et al.*, 2018). Desde hace ya algunos años se ha propuesto que otro inhibidor de multiquinasas, el regorafenib, podría ser otra opción para pacientes que no responden o no toleran el sorafenib (Bruix J *et al.*, 2013). Además, se han desarrollado varios fármacos dirigidos a controlar la angiogénesis, como son: sunitinib, brivanib, linifanib, vatalanib, TSU-68, cediranib, bevacizumab y ramucirumab. También se están desarrollando otras terapias, incluyendo inhibidores del factor de crecimiento epidérmico tales como erlotinib y lapatinib. Así mismo se han comenzado ensayos con un inhibidor competitivo de MEK1 / 2 (selumetinib), un antagonista de mTOR (everolimus) e inhibidores de multiquinasas (nintedanib); sin embargo, todos estos fármacos aún se encuentran en estudios preclínicos y clínicos tempranos (Daher S *et al.*, 2018).

### 2.3.2. Colangiocarcinoma

El colangiocarcinoma (CCA) es la neoplasia biliar maligna más frecuente y la segunda neoplasia maligna hepática primaria más común. Dependiendo de su lugar anatómico el CCA puede ser clasificado en intrahepático (iCCA), perihilar (pCCA) y distal (dCCA) (Blechacz B., 2017).

#### Etiología

La etiología del CCA no está clara, aunque se ha encontrado una asociación con varios factores de riesgo. En este sentido, en algunos parásitos (*Clonorchis sinensis* y *Opisthorchis viverrini*), la litiasis intrahepática y la colangitis esclerosante son factores predisponentes (Kurathong S *et al.*, 1985) (Tyson GL & El-Serag HB., 2011) (Rizvi S *et al.*, 2014). El factor de riesgo más frecuente en el mundo occidental es la colangitis esclerosante primaria (CEP), caracterizada por la inflamación crónica del tracto biliar y por lesión hepática (Pérez-Navarro JV *et al.*, 2014). Otros factores de riesgo son la enfermedad fibropoliquística congénita del sistema biliar (se asocian en un 10 a 15 % con CCA) y la enfermedad de Caroli (Shaib YH *et al.*, 2005) (Pérez-Navarro JV *et al.*, 2014). Además de estos factores de riesgo establecidos, se han asociado con el CCA algunas otras condiciones, como la colangitis recurrente, la colelitiasis, la cirrosis hepática alcohólica, la cirrosis biliar, la cirrosis idiopática, la diabetes, la tirotoxicosis y la pancreatitis crónica (Shaib YH *et al.*, 2005) (Pérez-Navarro JV *et al.*, 2014).



## Epidemiología

Los pacientes con colangiocarcinoma suelen estar en la sexta o séptima década de la vida, siendo más comunmente varones. El CCA es más frecuente en Asia mientras que su distribución más baja se encuentra en Australia (Jung KW *et al.*, 2012) (Kim KW *et al.*, 2013). Su incidencia anual es de, aproximadamente, 1 por 100.000 habitantes en EE.UU, 7,3 por 10.000 en Japón y 2 por 100 en Inglaterra y Gales. Su prevalencia difiere según el grupo racial y étnico; en EE.UU, las poblaciones con mayor prevalencia son los hispanos y los japoneses (2,8 - 3,3/100.000) (McLean L & Patel T., 2006) (Shaib Y & El-Serag HB *et al.*, 2004) (Khan SA., 2002) (Pérez-Navarro JV *et al.*, 2014). El CCA es un cáncer de curso agresivo que presenta una media de supervivencia de menos de 24 meses después del diagnóstico (Farley DR *et al.*, 1995) (Rizvi S., 2014).

## Patogenia

El CCA puede surgir por inflamación crónica, lo que sugiere que la inflamación promueve la carcinogénesis al transmitir señales de supervivencia e inducir la aparición de aberraciones genéticas. Las vías inflamatorias no solo son componentes clave en la carcinogénesis, sino que también promueven la invasión y migración tumoral (Rizvi S & Gores GJ., 2013) (Rizvi S *et al.*, 2014). Las células inflamatorias promueven el estrés oxidativo, que favorece la producción de alteraciones genéticas. La activación de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la acción de citoquinas inflamatorias contribuyen al estrés nitrosativo por la generación de un exceso de NO. En consecuencia, la activación de iNOS da como resultado la inhibición de proteínas reparadoras del ADN y la aparición de lesiones oxidativas en el ADN (Jaiswal M *et al.*, 2000). La sobreexpresión de iNOS se observa no solo en CCA sino también en otros tipos de tumores, lo que indica que debe estar involucrada en la formación y progresión de los mismos (Jaiswal M *et al.*, 2001) (Rizvi S *et al.*, 2014).

Por otra parte, la actividad de la ciclooxigenasa-2 se induce por varias citoquinas proinflamatorias y se ha implicado en el CCA (Yoon JH *et al.*, 2002). Los oxisteroles, los ácidos biliares y la iNOS estimulan la sobreexpresión de la ciclooxigenasa-2 (Yoon JH *et al.*, 2002) (Yoon JH *et al.*, 2004). De hecho, los ácidos biliares secundarios en la bilis también pueden contribuir a la biología de CCA ya que, además de inducir a la ciclooxigenasa-2, activan receptores tirosina quinasa, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que media la proliferación celular (Yoon JH *et al.*, 2002).



Adicionalmente, se han identificado mutaciones somáticas en genes conocidos por su asociación con neoplasias malignas, como el homólogo del oncogén viral del sarcoma de Kristen Ras (KRAS), que se ha visto mutado en un 17 % de los pacientes con CCA, asociándose también con una menor supervivencia, y como la proteína tumoral 53 (P53), mutada en un 44,4 % de los casos en CCA. El gen SMAD4 (factor de transcripción y supresor tumoral) se ha visto mutado en el 16,7 % de los casos de CCA estudiados. Además, se han encontrado mutaciones en otros oncogenes recientemente implicados en CCA, incluyendo MLL3 (mutado en 14,8 % de los casos), PEG3 (5,6 %), RNF43 (9,3 %), ROBO2 (9,3 %), y GNAS (9,3 %). Las funciones biológicas de los oncogenes mencionados incluyen la desactivación de los modificadores de histonas, la activación de proteínas G y la pérdida de estabilidad genómica (Ong CK., 2012).

### Diagnóstico

Los diferentes tipos de CCA no están asociados a síntomas específicos en etapas tempranas y no suelen diagnosticarse durante exámenes físicos (Carriga MT & Henson DE., 1995). No obstante, el CCA suele presentarse con ictericia, prurito, heces de coloración arcilla (hipocólicas) y una orina hiperpigmentada (coluria) (Khan SA *et al.*, 2002). En el CCA los niveles de CA 19-9 y de CEA están significativamente elevados. En las células tumorales, a diferencia del HCC, AFP es negativo y la tinción con mucicarmina es positiva (Conrad R *et al.*, 2013).

Los análisis de imagen, como la tomografía computarizada (CT), son esenciales para el diagnóstico; la CT de triple fase se utiliza tanto para el diagnóstico como para la determinación del estadio tumoral (Valls C *et al.*, 2000). También se utilizan la resonancia magnética (MRI) y la colangiopancreatografía por resonancia magnética (MRCP) (Romagnuolo J *et al.*, 2003). El CCA intrahepático por otra parte es difícil de distinguir de otras masas intrahepáticas sólidas, debido a la falta de características específicas en la ecografía (Blom CM *et al.*, 1999) (Slattery JM & Sahani DV., 2006).

### Tratamiento

La resección quirúrgica es la única opción curativa cuando es aplicable. Sin embargo, la tasa de supervivencia general a 5 años, después de la resección quirúrgica es del 33,1 % para cánceres del conducto biliar y del 41,6 % para el cáncer de la vesícula biliar (Miyakawa S *et al.*, 2009). El pronóstico para el CCA continúa siendo poco favorecedor, inclusive después de una resección quirúrgica extensa, debido a la alta tasa de



recurrencia. Por ello, se requiere una terapia adyuvante eficiente para ampliar la supervivencia de los pacientes con CCA. El 5-fluorouracilo (5-FU) y la gemcitabina son los fármacos de uso más común para CCA (Horgan AM *et al.*, 2012) (Neoptolemos JP *et al.*, 2012) (Kim KW *et al.*, 2013) (Eckel F & Schmid RM., 2007). La combinación de gemcitabina con cisplatino ha sido utilizada en el tratamiento estándar para pacientes con buen estado general y ha mostrado mejores resultados que la utilización única de gemcitabina (Vogel A *et al.*, 2014) (Valle J *et al.*, 2010). Por otro lado, la combinación de cisplatino con 5-FU resulta en un aumento del 24 % en la tasa de supervivencia. Mientras que una combinación triple de cisplatino, epirubicina y 5-FU producen una tasa de respuesta del 40 % con un tiempo medio de supervivencia de 11 meses (Thongprasert S., 2005).

Respecto a la utilidad de inhibidores de tirosina quinasas (TKIs) para el CCA, los ensayos clínicos realizados hasta la fecha han demostrado un efecto beneficioso limitado del sorafenib (Luo X *et al.*, 2017).

#### **2.4. Papel de los Inhibidores de tirosina quinasa en la terapia antitumoral en cáncer hepático**

Las tirosina quinasas (TKs) son enzimas con una subunidad catalítica que transfiere el fosfato del ATP a un residuo tirosina de otras proteínas, produciendo modificaciones conformacionales que transmiten señales intracelulares. Esta cascada de señalización desemboca en la regulación de la actividad de muchas proteínas implicadas en diversos procesos celulares (Manning G *et al.*, 2002). La actividad anormal de las tirosina quinasas se ha comprobado que puede contribuir al desarrollo de procesos cancerosos.

##### **2.4.1. Ruta ERK**

La ruta de señalización mediada por las MAP quinasas ERK1 y 2 desempeña un papel importante en el control de la diferenciación, proliferación y supervivencia celulares en condiciones fisiológicas. La desregulación de esta ruta favorece la transformación celular y está involucrada en el avance tumoral.

Las proteínas Ras GTPasas con actividad oncogénica incluyen, receptores tirosina quinasas, como EGF y PDGF, receptores de integrinas acoplados a proteínas G y receptores de citoquinas (Hancock JF., 2003). Los genes RAS codifican cuatro proteínas (H-Ras, K-Ras4A, K-Ras4B y N-Ras), que están unidas a la cara interna de



la membrana plasmática (Barbacid M., 1987). La activación de las proteínas RAS se asocia con la activación mediante fosforilación de las proteínas RAF (BRAF, RAF1), MEK1A1/MEK1A2 y, por último, ERK1/ERK2, que son miembros de la vía RAS/MAPK, responsables del control del ciclo celular y que están implicados en la regulación de la transcripción, lo que desemboca en la modificación de la expresión de distintos genes (Dance M *et al.*, 2008).

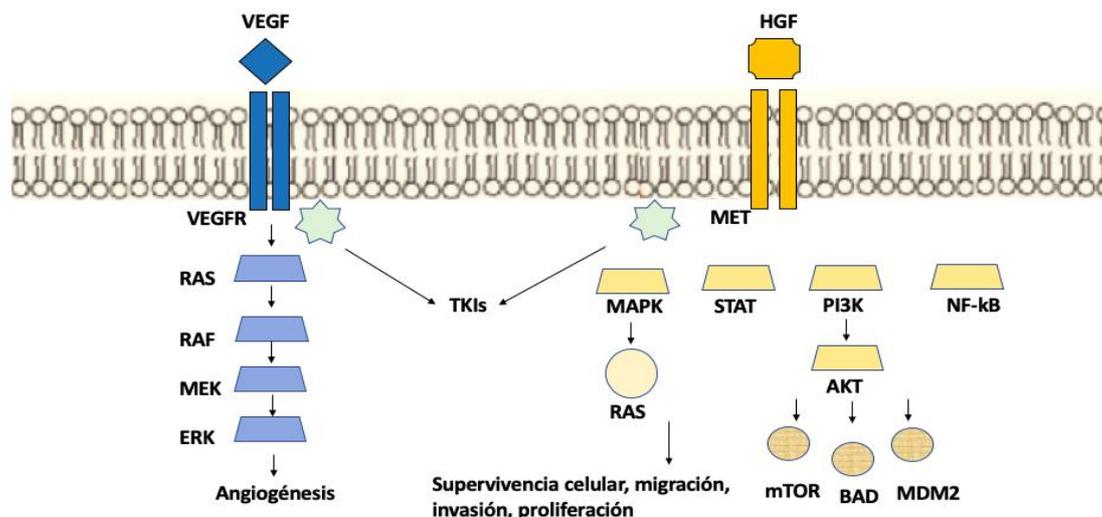
Las proteínas Ras oncogénicas presentan mutaciones que las mantienen en estado de activación, potenciando de esta manera diversas rutas de señalización intracelular (Campbell SL *et al.*, 1998). Por otro lado, Ras es un efector clave del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que se encuentra activado y/o sobreexpresado en varios cánceres. La activación de ERK también promueve la expresión de los ligandos EGFR, induciendo un ciclo de control autocrino crítico para el desarrollo del tumor. Esta red de señalización EGFR-Ras-Raf-MEK-ERK ha sido objeto de intensa investigación farmacológica para identificar nuevas dianas terapéuticas (Roberts PJ & Der CJ., 2007).

Actualmente, el fármaco más prometedor dirigido a las quinasas Raf/Ras es el sorafenib. Sin embargo, el sorafenib no es específico de estas quinasas, ya que una parte significativa de su actividad antitumoral se debe a su efecto sobre el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y sobre el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Wilhelm S & Chen 2002). En este sentido, hay que tener en cuenta que el cáncer hepático es, normalmente, un tumor altamente vascularizado, con intensa actividad angiogénica, lo que implica alta expresión de VEGF.

#### **2.4.2. Fármacos antitumorales inhibidores de tirosina quinasas**

Los inhibidores de tirosina quinasas (TKIs) forman un grupo de moléculas pequeñas diseñadas para interferir en las vías oncogénicas dependientes de tirosina quinasas. Estas ofrecen una opción terapéutica que presenta menor toxicidad en comparación con la quimioterapia convencional (Lodish MB & Stratakis CA., 2010) (Bielski LY *et al.*, 2016,). Los TKIs previenen la fosforilación de diversos receptores de tirosina quinasas, compitiendo con la unión del ATP al dominio catalítico por semejanza estructural (Arora A & Scholar EM., 2005). Debido a que el dominio catalítico de estos receptores está sumamente conservado, varios TKIs pueden desarrollar su efecto inhibitor sobre un gran espectro de tirosina quinasas, afectando de este modo múltiples vías de señalización (Lodish MB & Stratakis CA., 2010) (Bielski LY *et al.*, 2016) (figura I-2).





**Figura I-2.** Mecanismos de acción propuestos de los inhibidores de tirosina quinasa (TKIs) (Adaptación de Schlessinger., 2004) (Milano *et al.*, 2007).

#### 2.4.2.1. Sorafenib

El sorafenib, *N*-(3-trifluorometil-4-clorofenil)-*N'*-(4-[2-metilcarbamoilpiridina-4-yl] oxifenil) urea, (Nexavar<sup>®</sup>), es un inhibidor multiquinasa que bloquea la proliferación de células tumorales y se utiliza por vía oral en la forma de tosilato de sorafenib (Sampat KR & O'Neil B., 2013). El sorafenib inhibe la vía de transducción de la señal RAF/MEK/ERK, suprimiendo directamente el crecimiento del tumor. Además, bloquea la angiogénesis tumoral mediante la inhibición de VEGFR y PDGF, que suprimen indirectamente el crecimiento del tumor (Peck-Radosavljevic M., 2014) (Zhang B *et al.*, 2015).

El mecanismo molecular de acción del sorafenib se basa en la inhibición competitiva del dominio catalítico de unión al ATP de las quinasa, ya que el anillo piridil distal del sorafenib interacciona directamente con 3 aminoácidos del bolsillo de unión al ATP de estas proteínas, lo que evita su fosforilación y su activación (Wan PT *et al.*, 2004).

La dosis recomendada de sorafenib en adultos es de 400 mg (dos comprimidos de 200 mg) tomados dos veces al día. Después de su administración oral, se absorbe rápidamente desde el tracto gastrointestinal y llega al hígado a través de la vena porta (Strumberg D *et al.*, 2007) (Gong L *et al.*, 2017). La unión *in vitro* del sorafenib a proteínas plasmáticas humanas es del 99,5 %. Se metaboliza principalmente en el hígado, por metabolismo oxidativo a través de la acción de la enzima CYP3A4, así como por glucuronización mediada por la enzima UGT1A9. El principal metabolito circulante

del sorafenib en plasma es el n-óxido de piridina, que presenta una potencia *in vitro* similar a la del sorafenib. La semivida de eliminación es de 25-48 h (Gong L *et al.*, 2017).

La aprobación del sorafenib en el contexto de HCC se basó en los resultados del estudio SHARP, un ensayo multicéntrico de fase III controlado con placebo. Se comparó el tratamiento con sorafenib y con placebo en 602 individuos con cáncer avanzado o HCC metastásico y enfermedad hepática clase A de Child-Pugh. Este estudio mostró que este fármaco prolongaba la supervivencia media comparado con el grupo de pacientes que recibieron el placebo (10,7 meses vs. 7,9 meses) y el tiempo de progresión en pacientes con HCC avanzado (Llovet JM *et al.*, 2008). Los resultados del estudio SHARP representaron un avance en el manejo clínico del HCC, considerando al sorafenib como la primera terapia sistémica para prolongar la supervivencia de estos pacientes (Llovet JM *et al.*, 2008). El efecto beneficioso del sorafenib en el ensayo SHARP se confirmó en otro estudio de fase III realizado en la región de Asia-Pacífico. Este ensayo encontró que la supervivencia de los pacientes tratados con sorafenib aumentaba de 4,2 meses en el grupo placebo a 6,5 meses en el grupo de sorafenib. Además, el tiempo de progresión fue de 2,8 meses en el grupo de sorafenib vs. 1,4 meses en el grupo placebo (Cheng AL *et al.*, 2009).

Otro análisis reciente reveló que los efectos adversos relacionados con el tratamiento con sorafenib fueron similares en pacientes con enfermedad hepática de nivel Child-Pugh A y B; sin embargo, un mayor porcentaje de pacientes con disfunción hepática de nivel Child-Pugh B tuvo que suspender el tratamiento debido a los efectos adversos (38 % frente a 23 %). En la población tratada (1.614 pacientes), la supervivencia preliminar fue de 10,5 meses en el grupo de Child-Pugh A y de 4,8 meses en el grupo de Child-Pugh B. Este estudio sugiere que el uso de sorafenib en pacientes con un mayor grado de disfunción hepática requiere mucha atención a los efectos secundarios (Sampat KR & O'Neil B., 2013). Debido a la aparición de resistencia al sorafenib se ha propuesto el combinar el sorafenib con la quimioterapia convencional, en un esfuerzo por mejorar los resultados terapéuticos.

Ya se ha mencionado que el sorafenib supone un gran avance en el tratamiento del HCC; sin embargo, el efecto de este fármaco en el tratamiento del CCA no resulta tan claro. Algunos estudios preclínicos *in vitro* han mostrado una fuerte actividad antitumoral en pacientes con CCA, mediante la inhibición de la ruta de las MAPK y la parada del ciclo celular (Huether *et al.*, 2007). En un estudio de 44 pacientes con iCCA avanzado no operable tratados con sorafenib, se observó que el control de la enfermedad fue del



15,9 %, la supervivencia libre de progresión fue de 3,2 meses y la supervivencia promedio fue de 5,7 meses. Estos resultados permitieron concluir que el sorafenib puede ser utilizado como parte del tratamiento paliativo en el CCA (Luo X *et al.*, 2017). Sin embargo, se han llevado a cabo otros ensayos clínicos con pacientes con CCA tratados con sorafenib que no han sido concluyentes. Así, los ensayos de Bengala y El-Khoueiry, respectivamente, encontraron que la actividad antitumoral del sorafenib en los pacientes era baja o nula (Bengala C *et al.*, 2010) (El-Khoueiry *et al.*, 2012). No obstante, en otro estudio se vio un efecto moderado del sorafenib en pacientes con CCA (LaRocca RV *et al.*, 2007), mientras que en el caso de un paciente con CCA el sorafenib mostró una fuerte actividad, aliviando los síntomas, mejorando la funcionalidad hepática y aumentando la supervivencia hasta 24 meses después del tratamiento (Pinter *et al.*, 2011). En general, se puede afirmar que el tratamiento con sorafenib en pacientes con tumores hepáticos tiene efectos beneficiosos moderados y transitorios, debido a una pérdida de su eficacia causada por la activación de mecanismos de resistencia.

#### 2.4.2.2. Otros fármacos de la familia TKIs

**Regorafenib.** Es un inhibidor de las quinasas implicadas en las vías de señalización de las señales angiogénicas y de crecimiento tumoral, incluidos los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR1, 2 y 3), el factor de crecimiento derivado de plaquetas beta (PDGFR- $\beta$ ) y el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGFR1) (Tsai JJ, *et al.*, 2017). El regorafenib se utiliza como segunda línea de tratamiento en HCC. Los datos del ensayo RESORCE, un estudio de fase III controlado con placebo que evaluó la eficacia y seguridad de este fármaco en pacientes con HCC, mostró una ligera mejoría de la supervivencia en el grupo de tratamiento con regorafenib en comparación con el de placebo (10,6 meses vs. 7,8 meses) (Trojan J *et al.*, 2016).

**Sunitinib.** Se trata de un fármaco dirigido a la inhibición de la angiogénesis. El sunitinib es un TKI de uso oral con actividad anti VEGFR-1, VEGFR-2, c-KIT, FLT3, PDGFR-alpha, PDGFR-beta y otras quinasas (Mendel DB *et al.*, 2003). Se utiliza en los pacientes con HCC avanzado que no toleran o no responden al sorafenib. En un ensayo aleatorizado de fase III para comparar el efecto de sunitinib vs. sorafenib en HCC, la mediana de supervivencia fue de 7,9 meses en el grupo de sunitinib y de 10,2 meses en el de sorafenib (Cheng AL *et al.*, 2013).

**Brivanib.** Es un inhibidor de uso oral, selectivo y dual del receptor de FGF (FGFR) y VEGFR, que ha demostrado potentes efectos antitumorales y antiangiogénicos en



modelos preclínicos de diversos tipos de tumores, incluido el HCC (Huynh H *et al.*, 2008) (Bhide RS *et al.*, 2010). El brivanib también se ha asociado con retraso en el crecimiento del tumor y aumento de la supervivencia en un modelo de xenoinjerto de HCC con resistencia adquirida al sorafenib (Tovar V *et al.*, 2011) (Sampat KR & O'Neil B., 2013).

**Cabozantinib (XL184).** Es un TKI cuyas dianas son c-Met y VEGFR2 (Zhang GN *et al.*, 2017). Este compuesto se utiliza como tratamiento de segunda línea para el HCC con alta expresión de c-MET (Kudo M, 2018) (Zhang B *et al.*, 2015). Utilizando células de HCC en cultivo, xenoinjertos en ratón y modelos metastásicos, el fármaco cabozantinib bloqueó la angiogénesis, la metástasis y provocó la regresión tumoral en varios modelos tumorales como el HCC (Xiang Q *et al.*, 2014). El cabozantinib también se está utilizando en el tratamiento de primera línea del cáncer renal y tiene un futuro prometedor en el tratamiento y eficacia para otros tipos de neoplasias, dada la eficacia observada y el mecanismo único de acción del mismo (Abdelaziz A & Vaishampayan U., 2017).

**Lenvatinib.** Es un inhibidor de tirosina multiquinasa (Song E *et al.*, 2020), que se dirige a VEGFR1-3, FGFR1-4, PDGFR, RET y KIT (Ikeda K *et al.* 2017) y que se esta comenzando a utilizar como fármaco de primera línea en el HCC (Raoul JL, *et al.*, 2019). En un estudio de fase III con un total de 954 pacientes con HCC no operable se compararon los tratamientos con lenvatinib (478 pacientes) y con sorafenib (476 pacientes) y se observó que la supervivencia media total fue de 13,2 meses con levatinib vs. 12,3 meses con sorafenib. Los resultados de este estudio mostraron que la mediana de supervivencia libre de progresión, el tiempo de progresión y la tasa de respuesta fueron significativamente mejores con lenvatinib que con sorafenib (Kudo M *et al.*, 2018).

**Tivantinib (ARQ 197).** Es un inhibidor selectivo de la tirosina quinasa MET. Los estudios de fase I y II han mostrado su potencial en el tratamiento del HCC cuando los pacientes no responden al sorafenib o cuando no es bien tolerado por ellos (Pievsky D *et al.*, 2016).

## 2.5. Resistencia a la quimioterapia antitumoral en cáncer hepático

La supervivencia en pacientes con HCC se ha visto mejorada gracias al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Sin embargo, desgraciadamente, la recurrencia sigue siendo un problema debido al fenómeno de quimiorresistencia, que puede ser primaria o adquirida durante el tratamiento. Los mecanismos de resistencia se han clasificado en 7 grupos o MOCs (del inglés, *mechanisms of chemoresistance*) (figura I.2) (Marin JJ *et al.*, 2009) (Marin JJ *et al.*, 2010) ( Briz. O *et al.*, 2017):



**MOC-1. Transportoma.** El transportoma comprende un grupo de proteínas expresadas, que llevan a cabo el tráfico de moléculas a través de la membrana plasmática de las células tumorales. Este mecanismo de quimiorresistencia afecta a los genes que codifican los transportadores implicados en la captación (MOC-1a) o la expulsión de fármacos (MOC-1b).

**MOC-2. Metabolismo de fármacos.** Es el mecanismo de quimiorresistencia que implica cambios en el metabolismo de los fármacos, ya sea por activación del profármaco o por su inactivación del agente activo, lo que puede conducir a la menor respuesta al tratamiento.

**MOC-3. Dianas moleculares.** Es un mecanismo provocado por cambios en la actividad y/o expresión de las dianas moleculares de los agentes farmacológicos.

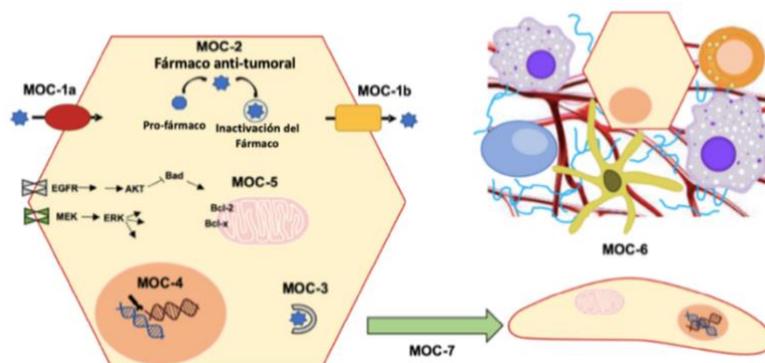
**MOC-4. Reparación del ADN.** Ocurre por diversos mecanismos mediante los cuales las células cancerosas pueden reparar los daños al ADN inducidos por fármacos antitumorales.

**MOC-5. Supervivencia y apoptosis.** Desregulación en el equilibrio entre la supervivencia y las vías apoptóticas, mediante la reducción de la expresión/función de las proteínas apoptóticas (MOC-5a) o la expresión/función mejorada de las proteínas antiapoptóticas (MOC-5b).

**MOC-6. Microambiente tumoral.** Mecanismos derivados de cambios en el microambiente tumoral, entre los que se incluyen la reprogramación metabólica como consecuencia de la adaptación a la hipoxia y la acidificación, que pueden reducir la respuesta a la quimioterapia.

**MOC-7. Transición fenotípica (epitelio-mesénquima).** EMT es el mecanismo que conduce a una diferenciación transitoria y reversible de las células epiteliales a un fenotipo mesenquimatoso, lo que aumenta su capacidad de invasión, metástasis y su resistencia a fármacos.





**Figura I-2:** Estructura representativa de los mecanismos de quimiorresistencia (MOCs): reducción de la concentración intracelular de fármacos activos (MOC-1 y MOC-2), cambios en las dianas moleculares (MOC-3), reparación del ADN (MOC-4), desregulación en el equilibrio entre la supervivencia y vías apoptóticas (MOC-5), microambiente tumoral (MOC-6) y transición fenotípica (epitelio-mesenquimal) (MOC-6) (Adaptación de Alonso-Peña M *et al.*, 2019).

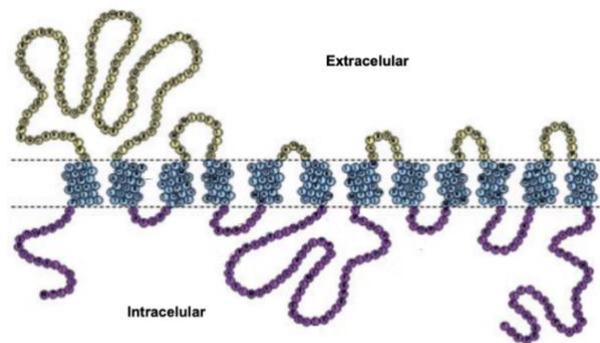
### 2.5.1. Papel del transportoma en la disminución de la concentración intracelular de fármacos (MOC-1)

Como ya se ha mencionado, el transportoma comprende un conjunto de genes relacionados con el transporte de fármacos, cuyos cambios de expresión pueden determinar la respuesta a algunos tratamientos farmacológicos antitumorales mediante la regulación del balance entre su captación y su expulsión (Huang Y *et al.*, 2004). La mayoría de los fármacos no pueden atravesar la membrana plasmática por difusión, debido a su bajo carácter lipofílico y, por ello, requieren la participación de transportadores específicos (Chandra P *et al.*, 2004). La captación de un gran número de moléculas a través de la membrana plasmática se realiza mediante un grupo de transportadores de la familia SLC (*Solute Carriers*), mientras que la expulsión del fármaco puede estar mediada por la actividad de proteínas ABC (*ATP-binding cassette*). Las células hepáticas expresan varias proteínas de las familias SLC y ABC, lo que puede ser un factor determinante de la concentración intracelular y, en consecuencia, de la actividad antitumoral de varios fármacos (Okabe M *et al.*, 2008). Además, pueden existir diferencias en la expresión y/o la función de los transportadores en el tejido tumoral en comparación con el tejido no tumoral. Estos cambios pueden ocurrir durante el desarrollo tumoral o tras la quimioterapia (Kerb R *et al.*, 2001) (Suzuki H *et al.*, 2002). En esta tesis doctoral, nos centramos en el papel de los transportadores de cationes orgánicos expresados en el hígado, OCT1 y OCT3, (figura I.3).



## 2.6. Transportador de Cationes Orgánicos OCT1 (gen *SLC22A1*)

El transportador de cationes orgánicos OCT1 es un miembro de la familia SLC, del subgrupo *SLC22A*, que contiene 3 miembros principales OCT1, OCT2 y OCT3, que muestran una identidad en su secuencia de aminoácidos entre el 50 y el 70 % (You G & Morris ME., 2014) (figura I.3). OCT1 y OCT3 están expresados en el hígado mientras que el OCT2 se encuentra principalmente en el riñón. Los miembros de esta familia transportan cationes orgánicos endógenos y xenobióticos. Alrededor del 40 % de los fármacos son cationes orgánicos y, por ello, son potenciales sustratos de OCT1 (Nies AT *et al.*, 2009). El mecanismo de transporte de compuestos a través OCT1 se clasifica como de difusión facilitada independiente de sodio, cloro o gradiente de protones (Koepsell H *et al.*, 2011).



**Figura I-3:** OCT1 y OCT3 contienen un 50-70 % de aminoácidos idénticos, además revelan la misma topología de membrana. El lazo extracelular está glicosilado y contiene seis residuos de cisteína que forman tres puentes disulfuro, que se supone estabilizan la estructura terciaria del lazo. El lazo intracelular contiene sitios de fosforilación dependientes de quinasas; la fosforilación de estos sitios modifica la selectividad hacia los sustratos (Engler JR *et al.*, 2011) (You G & Morris ME., 2014).

### 2.6.1. Estructura del OCT1

El gen *SLC22A1*, que codifica la proteína OCT1, está localizado en el brazo largo del cromosoma 6, en el locus 6q26. El ARNm inmaduro contiene 11 exones y 10 intrones. La OCT1 es una proteína integral de la membrana plasmática con 554 aminoácidos, contiene doce dominios transmembrana (TMD), posee una estructura de  $\alpha$ -hélice y una región amino y otra carboxilo-terminal hacia el mismo lado de la membrana (Nies AT *et al.*, 2011) (Boyer JL., 2013). Entre los TMD 1 y 2 hay un lazo extracelular grande, que posee sitios de glicosilación. Además, la OCT1 tiene también otro lazo intracelular entre los TMD 6 y 7 que presenta sitios de fosforilación (Zhang L *et al.*, 1997). El peso molecular de la proteína OCT1 es aproximadamente de 61 kDa (Koepsell H *et al.*, 2007) (Lozano E *et al.*, 2013). Además de la forma silvestre (variante 1) de OCT1 se han

descrito variantes formadas por la presencia de SNPs y variantes debidas a la ocurrencia de *splicing* alternativo (Herraez E *et al.*, 2013).

### 2.6.2. Expresión de OCT1

La proteína transportadora OCT1 se expresa en la membrana sinusoidal de los hepatocitos y, en menor medida, en los colangiocitos. Además, se expresa en algunas neuronas, corazón, músculo esquelético, pulmón y granulocitos basófilos (Jonker JW & Schinkel AH., 2004) (Koepsell H., 2004). La expresión de OCT1 presenta una variabilidad interindividual muy alta, tanto a nivel de ARNm como de proteína (Nies AT *et al.*, 2009) (Kim MH *et al.*, 2012).

En algunos estudios se ha visto una expresión baja de *SLC22A1* en HCC, la cual se asocia a un mayor número de tumores, un mayor diámetro del tumor y una peor supervivencia del paciente, correspondientes a estadios avanzados de HCC (Heise M *et al.*, 2012).

### 2.6.3. Función de OCT1

El papel fisiológico del OCT1 es la captación de varios sustratos endógenos como son catecolaminas y prostaglandinas, y de sustratos exógenos, que incluyen fármacos anticancerosos como los inhibidores de tirosinas quinasas (p. ej. sorafenib) (Lozano E *et al.*, 2013) (Grimm D *et al.*, 2016).

El transportador OCT1 es bidireccional, por lo que no solo se comporta como un transportador de captación extrayendo sustratos de la sangre en el hepatocito, sino que también participa en el eflujo y la eliminación hepática de sustratos farmacológicos. El OCT1 media el transporte, facilitado e independiente de Na<sup>+</sup>, de cationes orgánicos de Tipo I (moléculas protonadas) tales como tetraetilamonio (TEA<sup>+</sup>), 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>), N1-metilnicotinamida (NMN), dopamina y colina, así como algunos cationes Tipo II (moléculas más grandes) como la quinina y la quinidina (Koepsell H., 1998). En general, los cationes del tipo I son transportados por el OCT1 mientras que los del tipo II no se transportan por OCT1 sino que actúan como inhibidores de esta proteína transportadora.



#### 2.6.4. Regulación de la expresión de OCT1

El nivel de expresión de los transportadores de cationes orgánicos es importante, tanto para el metabolismo de fármacos de naturaleza catiónica orgánica como para la respuesta a los mismos en los hepatocitos (Hysova L *et al.*, 2016). El transportador OCT1 es el que tiene la mayor expresión entre los transportadores de fármacos en hepatocitos humanos y presenta una gran variedad interindividual (Hysova L *et al.*, 2016). Al ser el transportador más expresado en las células hepáticas, se ha sugerido que la expresión de *SLC22A1* está mayormente controlada por un factor de transcripción de los enriquecidos en el hepatocito. Este grupo está compuesto por el factor nuclear de hepatocitos  $4\alpha$ , otros factores de transcripción tales como las proteínas de unión CCAAT/potenciador  $\alpha$  y  $\beta$ , los factores nucleares de hepatocitos  $1\alpha$  (HNF1 $\alpha$ ) y  $3\gamma$  (HNF3 $\gamma$ , FOXA3) y los factores LEFT (Castell JV *et al.*, 2006) (Kamiyama Y *et al.*, 2007) (Hysova L *et al.*, 2016). El factor de transcripción más importante en el control de la expresión del OCT1 es el factor nuclear de hepatocitos  $4\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ), que pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares (NR) de esteroides tiroideos (Kamiyama Y *et al.*, 2007) (Rulcova A *et al.*, 2013) (Saborowski M *et al.*, 2006). En estudios donde se ha silenciado el gen HNF4 $\alpha$  se ha observado que OCT1 es el transportador más afectado (Kamiyama *et al.*, 2007).

Además, se han identificado factores activadores del promotor, como son USF1 y USF2, que regulan la expresión hepática basal de OCT1 a través de E-box (secuencia 50-CACGTG-30) localizada en la región *upstream* del promotor. La activación de estos factores aumenta la expresión de OCT1 mediante la activación de HNF4  $\alpha$  (Hysova L *et al.*, 2016). Otros factores importantes que juegan un papel en la regulación de la expresión de OCT1 son los receptores nucleares PXR, FXR y el receptor de glucocorticoides, que cumplen su acción a través de HNF4 $\alpha$  (Rulcova *et al.*, 2013). También se puede regular la expresión de OCT1 por mecanismos epigenéticos, ya que la metilación en las islas CpG localizadas en el promotor inhibe la expresión del gen (Kajiwara *et al.*, 2008).

#### 2.6.5. Variantes de OCT1

Las mutaciones en el gen *SLC22A1* no solo pueden conducir a una menor expresión de la proteína transportadora sino que también modifican las características cinéticas del transportador (Ahlin G *et al.*, 2011), (Choi MK & Song IS., 2012), (Nies AT *et al.*, 2009). Se han identificado más de 1000 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), de los



cuales 22 tienen relevancia clínica para los fármacos que son sustratos de OCT1 (Arimany-Nardi CH *et al.*, 2015).

Por otro lado, se han descrito seis variantes (R61C, F160L, P341L, M408C, G465R y el 160151834C>A intrónico) que son SNP con frecuencias alélicas superiores al 1 % en algunas poblaciones (Arimany-Nardi *et al.*, 2015). También se encontraron cuatro isoformas de OCT1 (G506L, G483del, G353del y G554L) en una línea celular de glioma humano, mientras que en el ADNc de hígado humano solo se detectaron dos isoformas (G554L y G506L). Al comparar estas estructuras con la estructura OCT1 *wild type*, se sugiere que estas isoformas son variantes provocadas por *splicing* alternativo (Hayer M *et al.*, 1999).

En nuestro grupo se describió la presencia en HCC de 3 nuevos SNPs no reportados hasta el momento: c.181delCGinsT (R61S fs\*10), c.262delT (C88A fs\*16) y c.589C>T (P197S). Dos de estas variantes (R61S y P197S) también estaban presentes en algunas biopsias de CCA (Herraez E *et al.*, 2013).

Muchos de los SNPs descritos dan lugar a una proteína no funcional o con una actividad transportadora menor, como es el caso de las variantes M420del, C88R, L160F, P341L o M408V. Sin embargo, otros SNPs, como la S14F (F408V), presentan una mayor capacidad transportadora de MPP<sup>+</sup> (Shu Y *et al.*, 2003), pero menor para metformina (Shu Y *et al.*, 2007) y sin cambios en la captación de TEA (Herraez E *et al.*, 2013). Por otro lado, se han detectado isoformas truncadas y no funcionales causadas por mecanismos de *splicing* alternativo, que aparecen con mayor frecuencia en tumores hepáticos, tanto HCC como CCA (Hayer M *et al.*, 1999) (Herraez E *et al.*, 2013).

## 2.7. Transportador de cationes orgánicos OCT3 (gen *SLC22A3*)

### 2.7.1. Estructura del OCT3

El gen *SLC22A3* es uno de los genes similares a *SLC22A1*, ubicados en un clúster en el cromosoma 6 (figura I.3). Su localización es q25.3 y su ARNm inmaduro consta de 15 exones. La proteína codificada (OCT3) es una proteína integral de membrana plasmática que contiene doce dominios transmembrana putativos. La OCT3 está formada por 556 aminoácidos y se pueden encontrar 6 isoformas (GeneBank).



### 2.7.2. Expresión de OCT3

En contraste con OCT1 y OCT2, que se expresan mayormente en los principales órganos excretores, la OCT3 tiene una distribución tisular mucho más amplia. Primeramente, se detectó OCT3 a nivel de ARNm en el hígado, la corteza cerebral y el corazón. En un estudio más extenso, se detectaron niveles altos de ARNm de OCT3 en aorta, glándula suprarrenal, próstata, músculo esquelético, glándula salival, hígado, placenta y pulmón fetal (Jonker JW & Schinkel AH., 2004).

El transportador OCT3 se encuentra localizado en la membrana basolateral de los trofoblastos en la placenta, en la membrana sinusoidal de los hepatocitos, en la membrana basolateral del riñón y en la membrana luminal del epitelio bronquial y de los enterocitos del intestino delgado (Sata R *et al.*, 2005) (Jonker JW & Schinkel AH., 2004).

### 2.7.3. Función de OCT3

Este transportador está involucrado en la biodisponibilidad de muchos compuestos endógenos y exógenos, incluidos varios fármacos (Zhu HJ *et al.*, 2010). Su amplio perfil de sustrato se solapa con el de OCT1 y OCT2. El OCT3 transporta varios neurotransmisores del tipo monoaminas, incluyendo dopamina (DA), norepinefrina (NE) y serotonina (5-HT (Gründemann D *et al.*, 1998) (Amphoux A *et al.*, 2006) (Zhu HJ *et al.*, 2010), además de hormonas y esteroides (Wu X *et al.*, 1998). En algunos estudios se ha visto que el OCT3 modula la acción farmacológica de la metformina (Chen L *et al.*, 2010).

En la placenta, el OCT3 es responsable de la liberación de acetilcolina y de la regulación colinérgica no neuronal en la gestación (Wessler I *et al.*, 2001) (Koepsell H & Endou H., 2004). En general, los transportadores de la familia SLC, como el OCT3, facilitan principalmente la captación de moléculas hidrófilas por las células trofoblásticas (Staud F *et al.*, 2012) (Ahmadimoghaddam D *et al.*, 2013). En el intestino delgado, la absorción de fármacos catiónicos y xenobióticos del lumen intestinal puede estar mediada por OCT3 y/o OCTN1-2 (Koepsell H & Endou H., 2004). El OCT3 está también involucrado en la excreción biliar de fármacos catiónicos.

Por último, algunos estudios han sugerido que el *SLC22A3* puede ser un gen supresor de tumores (Grisanzio *et al.*, 2012) (Fu L *et al.*, 2017). En este sentido, en el trabajo de



Fu L *et al* se demostró que el *SLC22A3* suprime la metástasis del carcinoma de células escamosas en el esófago (Fu L *et al.*, 2017).

#### 2.7.4. Regulación de la expresión de OCT3

La regulación de los transportadores OCT parece variar según el transportador, la especie y la localización del tejido. Aunque no hay definido un claro proceso de regulación, se ha observado que la actividad de OCT3 se ve alterada tanto por la ruta MAP quinasa como por la ruta calcio-calmodulina (Roth M *et al.*, 2012). Por otro lado, algunos estudios han revelado que la metilación en la región promotora basal de OCT3 se asocia con niveles bajos de expresión del mismo en el cáncer de próstata (Chen L *et al.*, 2013).

#### 2.7.5. Variantes de OCT3

En un estudio realizado por Chen L *et al.* se llegaron a identificar un total de cinco polimorfismos en el promotor basal del transportador OCT3, en la región 5'UTR (g. +2T>insGCGGGCG (N/A); g.-2G>A; g.-81G> delGA; g.-124 C>G y g.-146 C>G). En este estudio se ha encontrado que la variante g.-2G>A se asocia con un mayor nivel de expresión de OCT3 en muestras de hígado (Chen L *et al.*, 2013). En otro estudio se encontraron cuatro variantes de OCT3 (G>A,C [rs2292334], T>C [rs2048327], C>T [rs1810126], G>A [rs3088442]) asociadas a una reducción en el ARNm de OCT3. A su vez, la expresión de OCT3 se encontró reducida en pacientes colestáticos (Nies AT *et al.*, 2009). Por otro lado, se observó que el SNP intrónico rs518295 presentaba una asociación positiva con los niveles de ARNm del OCT3 (Schadt EE *et al.*, 2008).

Otras isoformas de OCT3, que afectan la captación de fármacos, son las variantes T44M (c.131C>T), T400I (c.1199C>T) y V423F (c.1267G>T). Las variantes T400I y V423F, muestran una captación reducida del sustrato metformina y de algunas catecolaminas, mientras que la variante T44M muestra un aumento en la captación de este sustrato (Chen L *et al.*, 2010). Por último, han sido detectadas otras variantes (A116S y A439V), que contribuyen a una variación en la captación de ciertos sustratos, como la histamina y el MPP+ (Sakata T *et al.*, 2009).



## 2.8. *Splicing*

El *splicing* alternativo se descubrió por primera vez en 1977 por Richard Roberts y Phillip Sharp, durante una investigación sobre la regulación genética y estructura del adenovirus (Berget SM *et al.*, 1977) (Chow LT *et al.*, 1977). Ambos investigadores ganaron el premio Nobel en Fisiología o Medicina en 1993 por este descubrimiento.

### 2.8.1. Definición de *splicing*

El *splicing* es una parte del proceso de maduración del precursor de ARNm (pre-ARNm) durante el cual los intrones se eliminan del pre-ARNm y los exones se unen formando el ARNm maduro. Se distinguen dos tipos de *splicing*: constitutivo y alternativo. En el *splicing* constitutivo se eliminan los intrones por el espliceosoma para que los exones se unan, mientras que el *splicing* alternativo ocurre en sitios alternativos del *splicing*, lo que resulta en la eliminación o retención posible de algunos exones o fragmentos de estos (van den Hoogenhof MM *et al.*, 2016).

El *splicing* alternativo conduce a un incremento en la diversidad proteica de las células, permitiendo que un solo gen codifique múltiples isoformas de proteínas, que pueden ser estructural y funcionalmente distintas (Mthembu NN *et al.*, 2017). La información sobre los eventos de *splicing* existentes en las células ha aumentado enormemente durante las últimas décadas. En los 80s, se decía que solo el 5 % de los genes eran sometidos a *splicing* alternativo. A principios del 2000, el número de estos genes había aumentado hasta el 60 % y hasta más del 95 % en estudios posteriores (Van Den Hoogenhof MM *et al.*, 2016).

### 2.8.2. Estructura del pre-ARNm y su maduración

El primer proceso durante la maduración de ARNm es el *capping* del extremo 5', que requiere tres actividades enzimáticas: ARN trifosfatasa (TPasa), ARN guanililtransferasa (GTasa) y guanina-N7-metiltransferasa (guanina-N7 MTasa). Primeramente, la ARN trifosfatasa actúa en el terminal nucleófilo para eliminar el  $\gamma$ -fosfato del trifosfato 5', para generar un ARN difosfato 5' (Hocine S *et al.*, 2010). La ARN guanililtransferasa transfiere GMP desde GTP al difosfato 5' para formar un enlace trifosfato 5' - 5', a través de un intermedio covalente lisina-GMP. Luego, la guanosina es metilada por una guanina-N7-metiltransferasa. Esto se denomina caperuza 7-metilguanosina (m7G). Las funciones del *capping* son varias, ya que: i) es necesario para el *splicing* eficiente del



pre-ARNm, ii) para la salida del ARNm al citoplasma, y iii) para estabilidad del ARNm (Ramanathan A *et al.*, 2016).

El segundo paso durante la maduración del ARNm es el *splicing*, proceso donde se eliminan los intrones a través de una maquinaria llama espliceosoma, que se detalla más adelante.

Por último, la adición de poli (A) en el extremo 3'. Esta cola de poli (A) es importante para la estabilidad y eficiencia de la traducción del ARNm (Proudfoot N., 2004) (Hocine S *et al.*, 2010).

### 2.8.3. Tipos de intrones sometidos al *splicing*

Existen cuatro tipos de intrones:

**Intrones del grupo I.** Pueden encontrarse en algunos genes de ARN ribosómicos (ARNr) y cuya eliminación ocurre mediante una reacción autocatalítica.

**Intrones del grupo II.** Son intrones móviles que pueden invadir secuencias de ADN mediante dos procesos llamados orientación a los alelos intrónicos y transposición a sitios no alélicos (Dujon B., 1989) (Lambowitz AM & Belfort M., 1993) (Belfort M & Perlman PS., 1995). Al igual que los intrones del grupo I, su eliminación ocurre autocatalíticamente. Estos se encuentran en ARNr, ARNt, y ARNm de los orgánulos de los hongos, plantas y protistas.

**Intrones del grupo III.** Son intrones nucleares. Estos intrones son eliminados mediante un complejo multicomponente llamado espliceosoma (Csank C *et al.*, 1990). En esta tesis doctoral se estudiará el *splicing* de este tipo de intrones.

**Intrones del grupo IV.** Son intrones de transferencia, encontrados en los ARNt. Estos necesitan endonucleasas y ligasas para ser eliminados (Hayashi S *et al.*, 2019).

### 2.8.4. El espliceosoma

Generalmente, la eliminación de un intrón está definida por su secuencia y estructura. En este sentido, hay dos secuencias específicas en la unión intrón-exón, denominadas sitio 5' donador (GU) y sitio 3' aceptor (AG), además de la secuencia interna llamada sitio de ramificación (*branch point*, *BP* del inglés) o CURAY que está localizada a 18-40 nt del sitio 3'. Los intrones eliminados por el espliceosoma se pueden clasificar como

tipo U2 o U12, dependiendo del tipo de espliceosoma implicado en su escisión. El *splicing* del tipo U2 se realiza mediante el espliceosoma mayor, mientras que el espliceosoma menor es responsable del *splicing* de los intrones del tipo U12 (Rübsamen H *et al.*, 1976) (Patel AA & Steitz JA., 2003).

#### 2.8.4.1. Espliceosoma mayor

El espliceosoma mayor es una estructura dinámica que varía según va ocurriendo la reacción de *splicing*; el mismo procesa el 95,5 % de todos los intrones. Las secuencias reconocidas por esta maquinaria son GU y AG (Chen M & Manley JL., 2009). La composición del espliceosoma mayor incluye los complejos representados en la figura I-4 (Chen M & Manley JL., 2009).

**Complejo E.** Este complejo establece el comienzo del *splicing*. En el inicio del proceso, hay emparejamiento de bases snRNP U1 en el sitio de *splicing* (SS) 5' y unión del factor de *splicing* 1 (sf1) al punto de ramificación de una manera independiente de ATP. El complejo E temprano se puede formar por medio del reclutamiento del heterodímero U2 (U2AF) (que comprende U2AF65 y U2AF35) al tracto de polipirimidina y al AG terminal 3' (Zhang Y *et al.*, 2013).

**Complejo A.** A continuación de lo descrito para el complejo E, la snRNP-U2 desplaza la proteína sf1 en un proceso dependiente de ATP, en el punto de ramificación, formando así el complejo A. Este proceso está catalizado por las helicasas de ARN (Prp5 y Sub2). La Prp5 ayuda a la interacción para la unión de la subunidad U2 y la subunidad U1 (Xu YZ *et al.*, 2004). La Sub2 es necesaria para estabilizar la interacción entre la subunidad U2 y el punto de ramificación del ARN (Fredericks AM *et al.*, 2015).

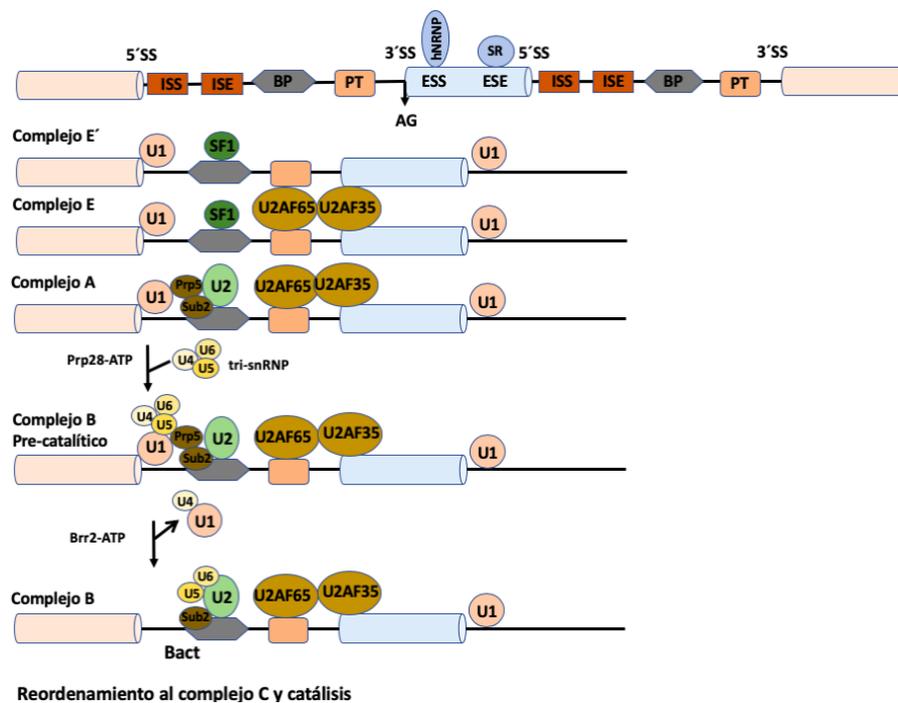
**Complejo B.** En primer lugar ocurre el reclutamiento de U4/ U6-U5 tri-snRNP al sitio donador, formando el complejo B precatalítico (Complejo B1), U5 se une al 5' del exón y U6 se une a U2. En segundo lugar, ocurre la liberación de snRNPs U1 y U4, lo que da lugar al espliceosoma activado (es decir, el complejo B activado o complejo B2), donde U5 se mueve a un intrón y U6 se une al extremo 5' SS. La activación catalítica subsiguiente por el ARN *DEAH-box* Prp28 genera el complejo B que media el primer paso del *splicing*, produciendo los intermediarios del corte del exón 5' y del lazo del intrón 3', formando el complejo C (Sidarovich A, 2017). Los factores de procesamiento de pre-ARNm 3, 4, 6, 8 y 31 (*PRPF3, PRPF4, PRPF6, PRPF8, PRPF31*), participan en el *splicing* del pre-ARNm como componentes del complejo tri-snRNP U4 / U6-U5 y como



componentes del complejo B del espliceosoma (genecards.org) (Makarova OV *et al.*, 2002).

**Complejo C.** Brr2 libera U1 y ayuda a retener U5 y U6. Brr2 y Snu114 se ensamblan con el snRNA U5 para producir el snRNP U5. Prp2 entonces desestabiliza la unión de ARN - espliceosoma para catalizar el cambio conformacional del complejo B al complejo C1 (Zhang L *et al.*, 2017) (Nancollis V *et al.*, 2013) (Wlodaver AM & Staley JP., 2014).

Este complejo es catalíticamente activo. U6 y U2 catalizan el segundo paso que, por reacciones de transesterificación, unirá los exones y eliminará el intrón con la estructura del lazo.



**Figura I-4:** El proceso de *splicing*, mediado por el espliceosoma mayor. Formación de los complejos E, A y B. (Chen M & Manley JL, 2009) (Xu YZ *et al.*, 2004) (Max Planck Institute for Biophysical Chemistry) (Becerra S *et al.*, 2016).

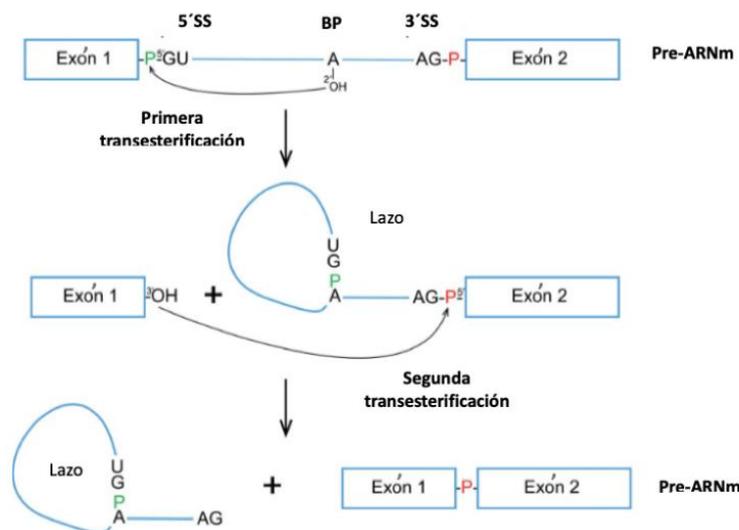
#### 2.8.4.2. Espliceosoma menor

El espliceosoma E menor procesa el 4,5 % de todos los intrones y consta de las ribonucleoproteínas U11, U12, U4atac, U5 y U6atac. A diferencia del espliceosoma mayor, el espliceosoma menor elimina pocos intrones y las secuencias reconocidas en este espliceosoma son las AT y las AC para los extremos 3' y 5' (Tarn WY & Steitz JA., 1997) (Patel AA & Steitz JA., 2003).

### 2.8.4.3. Reacción bioquímica del *splicing*

El *splicing* consiste en dos reacciones de transesterificación secuenciales (figura I-5). Cada una implica un ataque nucleofílico en los enlaces fosfodiéster terminales del intrón. (Black DL., 2003) (Whal MC *et al.*, 2009) (Chen M & Manley JL., 2009). Primero, los complejos de proteínas asociadas a U2, SF3a y SF3b se liberan y exponen el punto de ramificación (Lardelli RM *et al.*, 2010). Esto permite que se produzca un ataque nucleofílico del sitio de *splicing* 5' (5'SS) por la adenosina mediante el hidroxilo 2' localizado en el punto de ramificación (BP) del intrón situado *downstream* del sitio 5'. El resultado es la formación de un lazo intrónico, con un enlace 2', 5'-fosfodiéster (complejo C1) (Black DL., 2003) (Moore MJ., 1993).

El segundo paso es el promovido por la proteína Prp8 que enlaza los U5 y U6 snRNP (Galej WP *et al.*, 2013). Luego ocurre un ataque mediado por el 3' OH del 5' SS, que ataca al 3' SS, formando el complejo C2. Los snRNPs restantes y los factores asociados se separan, los exones se ligan, se elimina el lazo intrónico, el intrón se libera y se degrada rápidamente por la célula (Fica SM *et al.*, 2013) (Jacquier A., 1990) (Will CL & Lührmann R., 2011).



**Figura I-5:** Reacciones secuenciales de transesterificación que sufre el ARNm en el *splicing*. Primero el grupo 2'-hidroxilo de la adenosina del sitio de ramificación lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el fosfato (verde). El producto de esta reacción es el lazo intrónico. Segundo, el grupo 3'-hidroxilo del exón 1 realiza un segundo ataque nucleofílico sobre el fosfato (rojo). Los productos son el ARN maduro y el lazo intrónico (Adaptación de Pérez-Valle & Vilardell J., 2012).

### 2.8.5. Proteínas implicadas en los complejos de *splicing*

Debido a la importancia del *splicing* alternativo en el HCC, tema tratado en este trabajo de tesis doctoral, se explicarán con mayor detalle algunas de las proteínas implicadas en los distintos complejos del espliceosoma. Gran parte de la información está disponible en bases de datos públicos, como gencards.org y uniprot.org

**Proteínas del elemento U1** - Son componentes esenciales del espliceosoma que median la catálisis en el *splicing* del ARNm (Will & Lührmann., 1997) (Urlaub H *et al.*, 2001). Los elementos U1 definen el sitio de *splicing* 5' funcional (We T & Fu XD., 2015) y son:

- U1 snRNP 70kDa (*SNRNP70*). Es esencial para el reconociendo del 5'SS y para el posterior ensamblaje del espliceosoma (Pomeranz-Krummel DA *et al.*, 2009). *SNRNP70* se une a la región del *loop I* de U1-snRNA (Query CC *et al.*, 1989).

- U1A snRNP (*SNRPA*). Está asociada al *loop II* de U1, que se une al sitio de 5'SS del pre-ARNm. Esta proteína se autorregula a sí misma por medio de la inhibición de la poliadenilación de su propio ARNm. U1 snRNP es la primera proteína que interactúa con el pre-ARNm, lo que es necesario para la unión subsiguiente de U2 snRNP y U4/U6/U5 tri-snRNP.

- U1C snRNP (*SNRPC*). Estabiliza el acoplamiento del snRNA U1 y el 5'SS, estimulando la formación temprana del complejo E.

**Proteínas Sm** - Estas proteínas son necesarias para la biogénesis, el transporte y la función de las partículas snRNP (Schümperli D & Pillai RS., 2004). Después de la exportación del núcleo al citoplasma, los snRNA U1, U2, U4 y U5 se asocian cada uno a un conjunto de proteínas sm para generar, así, la partícula central snRNP (smrn RNP). smrn RNP es importante para la estabilidad metabólica de las snRNP (Plessel *et al.*, 1994).

- sm-B/B1 (*SNRPB/B1*). Se encuentran en común en las U1, U2, U4/U6 y U5 snRNPs. También son componentes del complejo B precatalítico y del complejo C activado (Jurica MS *et al.*, 2002).

-sm-D1 (*SNRPD1*). Esta proteína juega un papel en las interacciones SNRP-ARN, y SNRNP-SNRNP.



-sm-E (*SNRPE*). Interviene en el procesamiento del extremo 3' en las transcripciones de histonas.

-sm-F (*SNRPF*). Implicada en procesos menores en el *splicing*.

-sm-G (*SNRPG*). Puede ser parte de U7 y también participa del procesamiento del extremo 3' de las transcripciones de las histonas.

-sm-N (*SNRPN*). Puede contribuir al *splicing* alternativo específico de tejidos.

**Proteínas de unión al sitio de ramificación** – Son las proteínas que se unen a la secuencia del sitio de ramificación (BP). Cuando el intrón se corta, la adenosina en el extremo 3' se une a la guanosina en el extremo 5' del intrón (Maniatis T., 1991). Entre estas proteínas se encuentra el factor de *splicing* 1 (*SF1*), que es una proteína necesaria para el primer paso dependiente de ATP de la formación del espliceosoma. También desempeña un papel en la retención del pre-ARNm nuclear y en la represión transcripcional.

**Proteínas de unión al sitio 3' de *splicing* (3'SS)** – El sitio 3' de *splicing* (el sitio aceptor) es importante en el proceso. Entre las proteínas que se unen al 3'SS se encuentra U2AF1 que media las interacciones proteína-proteína y las interacciones proteína-ARN esenciales para la selección precisa del 3'SS. También media las interacciones entre U2AF2 y las proteínas unidas a los potenciadores de *splicing*. Además, recluta U2 snRNP en el punto de ramificación.

**Proteínas de unión a la secuencia de polipirimidina** – Las proteínas U2 que se unen a la secuencia de polipirimidina reconocen el 3'SS funcional, por medio del emparejamiento de bases con señales de *splicing* específicas en los extremos del intrón (We T & Fu XD., 2015). Entre ellos está U2AF que contiene una región de unión a ARN; consta de 3 motivos de reconocimiento y un dominio rico en Arg/Ser necesario para el *splicing*.

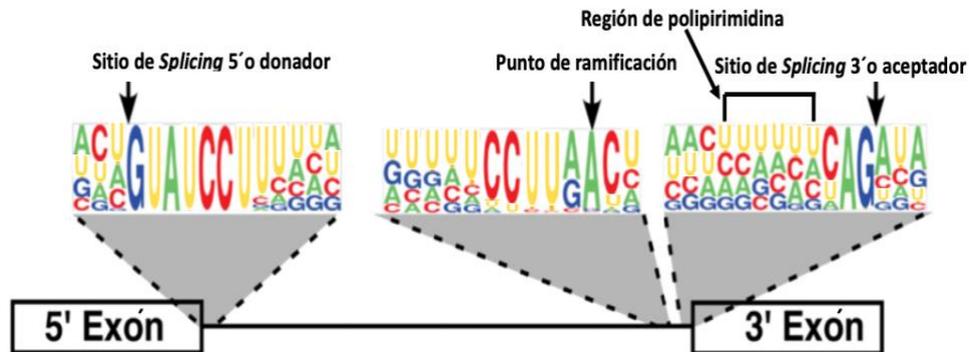
## 2.8.6. Regulación del *splicing*

### 2.8.6.1. Secuencias reguladoras de *splicing*

Los intrones representan más de un 90 % del tamaño del pre-ARNm, por ello es importante que el espliceosoma identifique secuencias específicas en los límites intrón-exón en el ORF para llevar a cabo la escisión del intrón y la unión del exón. Los complejos del espliceosoma son capaces de reconocer un sitio de *splicing* denominado



sitio donante, localizado en 5' (*5' splice site* o *5' SS*), que comienza con el dinucleótido GU y un sitio aceptor 3' (*3' SS*), que termina con el dinucleótido AG en los límites de los intrones, así como el punto de ramificación (*Branch point*, BP), que se localiza a 18-40 nt del sitio 3' aceptor y la región de polipirimidina (PT), situada entre el BP y el sitio aceptor (figura I-2) (Berasain C *et al.*, 2010) (figura 1.6).



**Figura I-6:** Secuencias básicas de *splicing*, del reconocimiento de intrones de tipo U2 por parte del espliceosoma mayor (Adaptación de Padgett RA, 2012).

Las diferencias en el contenido de guanina y citosina entre los exones e intrones facilita el etiquetado de los exones para que sean identificados por el espliceosoma. La decisión sobre qué secuencias se eliminan y cuáles se incluyen en el ARN maduro implica elementos de secuencia a lo largo del pre-ARNm y proteínas que se unen a estas secuencias e interaccionan con el espliceosoma, actuando como reguladoras del proceso de *splicing* (Graveley BR., 2000) (Tacke R & Manley JL., 1999) (Long JC & Caceres JF., 2009) (Chen M & Manley JL., 2009).

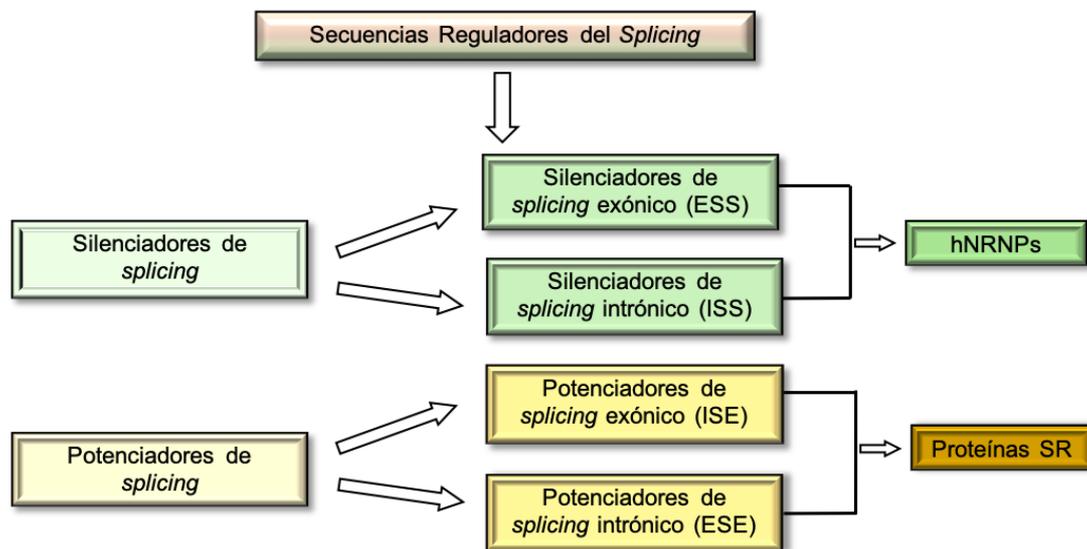
Según la posición y la función de los elementos reguladores en *cis*, estos se dividen en cuatro categorías:

- 1.) Potenciadores de *splicing* exónico (*ESE - exonic splicing enhancer*)
- 2.) Silenciadores de *splicing* exónico (*ESS - exonic splicing silencer*)
- 3.) Potenciadores de *splicing* intrónico (*ISE -intronic splicing enhancer*)
- 4.) Silenciadores de *splicing* intrónico (*ISS -intronic splicing silencer*)

Los silenciadores de *splicing* (*ISS* y *ESS*) suelen estar unidos a ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs) (figura I-7). Estos silenciadores son secuencias que aumentan el *splicing* largo, es decir que los exones estarán incluidos en el ARN maduro. Los *ISS* y *ESS* llevan a cabo su función mediante la interacción con el espliceosoma (Ule J *et al.*, 2006) (Hui J *et al.*, 2005) (Yeo GW *et al.*, 2009) (Mauger DM *et al.*, 2008) (Chen & Manley JL., 2009).



Por otro lado, las secuencias potenciadoras (*ESE* e *ISE*) son reconocidas por las proteínas de la familia SR (Serina-Arginina) a través del RRM, que permite la identificación de secuencias concretas de ARN.



**Figura I-7:** Esquema representativo de las secuencias silenciadoras y potenciadoras reguladoras de *splicing*.

### 2.8.6.2. Proteínas reguladoras del *splicing*

**Proteínas SR** – Son proteínas que favorecen el *splicing* corto, interactuando con potenciadores del *splicing*, ya sean exónicos (*ESE*) o intrónicos (*ISE*) (Blencowe BJ, 2000). Se caracterizan por contener un dominio rico en arginina y dipéptidos de serina. Las proteínas SR están enriquecidas con gránulos de intercromatina (*speckles*) (Spector DL, 1993). Estos gránulos son sitios de unión de factores de *splicing* al pre-ARNm (Shepard PJ & Hertel KJ, 2009). Entre estas proteínas se encuentran:

- SFE2/ASF (*SRSF1*): puede activar o reprimir el *splicing*, dependiendo de su estado de fosforilación.
- SC35 (*SRSF2*): facilita la interacción entre diferentes factores de *splicing* de tipo SR. Además, participa en la exportación del ARNm del núcleo al citoplasma.
- SRp20 (*SRSF3*): induce la inclusión de exones durante el *splicing* alternativo (Xiao W *et al.*, 2016).



-SRp75 (*SRSF4*): es un componente esencial del espliceosoma, que participa tanto en el *splicing* como en la exportación del ARNm.

-SRp55 (*SRSF6*): esta proteína regula la actividad de la proteína SRSF12. Además, juega un papel en el *splicing* constitutivo.

-SRp40 (*SRSF5*), 9G8 (*SRSF7*) y SRp30c (*SRSF9*): presentan funciones semejantes a las de la proteína SC35.

-SRp46 (*SRSF8*): funciona como un factor de *splicing* para el pre-ARNm.

-TRA2- $\beta$  (*SRSF10*): se caracteriza por contener motivos N-terminales RNP1 y RNP2 que son requeridos para unirse al ARN.

-NET2 (*SRSF11*): contiene una región rica en arginina/serina similar a los segmentos encontrados en los factores de *splicing* del pre-ARNm.

-SREK1 (*SRSF12*): parece antagonizar la acción de las proteínas SR en la regulación del *splicing* del pre-ARNm.

-SRm160 (*SRRM1*): promueve la activación del *splicing* constitutivo y es potenciador del *splicing* exónico (ESE).

-RBM5 (*LUCA15*): es un componente del complejo A del espliceosoma que puede modificar la unión de los snRNPs U1 y U2 a los sitios de *splicing* 5' y 3' del intrón.

**Proteínas hnRNP** – Son proteínas que favorecen el *splicing* largo, mediante la inhibición del *splicing* corto a través la interacción con silenciadores tanto exónicos (ESS) como intrónicos (ISS) (Martinez-Contreras R *et al.*, 2007).

-hnRNP A1 (*HNRNPA1*): participa en el transporte del ARNm con el poli(A) desde el núcleo al citoplasma y puede modificar la selección de sitios de *splicing* (Paronetto MP *et al.*, 2007).

-hnRNP B1 (*HNRNPA2B1*): se asocia con los pre-ARNm empaquetándolos en partículas hnRNP, un proceso que depende de la secuencia del ARNm y sirve para estabilizar su transcripción y minimizar su degradación (He Y & Smith R., 2009).



-hnRNP D (*HNRNPD*): se une con alta afinidad a las moléculas de ARNm que contienen elementos ricos en AU (ARE) dentro de la 3'-UTR de muchos protooncogenes y citoquinas.

-hnRNP F (*HNRNPF*): se une a secuencias ricas en G en el pre-ARNm.

-hnRNP H (*HNRNPH1*): media la regulación del *splicing* alternativo del pre-ARNm.

-hnRNP K (*HNRNPK*): se une a secuencias de poly C en los pre-ARN y participa en su metabolismo nuclear.

-hnRNP L (*HNRNPL*): se une a sitios exónicos e intrónicos y actúa como un activador o represor de la inclusión del exón.

-hnRNP E2 (*PCBP2*): junto con PCBP-1 y hnRNPK es una de las proteínas de unión a poli(C).

-PTBP1 (*HNRNPI*): juega un papel en la regulación de eventos de *splicing* alternativos. Se une al tracto de polipirimidina de los intrones.

**Quinasas** - Son proteínas reguladoras de la actividad de las proteínas SR mediante fosforilación. Se distingue entre quinasas *nucleares* y *citoplasmáticas*.

- Quinasas nucleares: Incluyen las “CDC like kinase 1, 2, 3, y 4 (*CLK1*, *CLK2*, *CLK3*, y *CLK4*) y su función es la fosforilación de las proteínas SR implicadas en el procesamiento del pre-ARNm, liberándolas en el nucleoplasma.

- Quinasas citoplasmáticas: Incluyen las proteínas “SRSF protein kinase 1 y 2” (*SRPK1* y *SRPK2*), que fosforilan específicamente sus sustratos en residuos de serina localizados en regiones ricas en dipéptidos de arginina/serina y participan en la fosforilación y actividad de los factores de *splicing* SR.

**Fosfatasas** - Son proteínas reguladoras de las proteínas SR mediante la eliminación de grupos fosfatos. Entre ellas encontramos las PP1A (*PPP1CA*) y PP2A (*PPP2CA*), que son específicas de serina/treonina.



### 2.8.7. *Splicing* alternativo

En humanos, al menos 20000 genes codifican un proteoma altamente diversificado, que abarca de 250000 a 1 millón de proteínas (de Klerk E & 't Hoen PA., 2015). Estos números sugieren que la gran variedad de proteínas observadas en los eucariotas necesita, en gran medida, la regulación de la actividad génica en los niveles transcripcional, postranscripcional y de traducción (Martins RP & Fåhræus R., 2017). Entre los mecanismos responsables de esta complejidad proteica, el *splicing* alternativo juega un papel importante.

Hay cuatro tipos básicos de *splicing* alternativo: (Nilsen TW & Graveley BR., 2010)

- a) Selección alternativa del sitio donador de *splicing* 5'
- b) Selección alternativa del sitio aceptor de *splicing* 3'.
- c) Inclusión u omisión de exones.
- d) Retención de intrones.

También existe en algunos genes la posibilidad de exones mutuamente excluyentes (Kim YJ & Kim HS., 2012) (Mthembu NN., *et al* 2017) y la selección de sitios de poliadenilación alternativos.

### 2.8.8. *Splicing* en la enfermedad

De entre todos los órganos humanos, en el cerebro es donde se ha observado la mayor cantidad de eventos de *splicing* alternativo (Mills JD & Janitz M., 2012). Por esta razón el *splicing* se ha asociado con enfermedades neurodegenerativas, como el Parkinson. Por ejemplo, variantes producidas por *splicing* alternativo en el gen SNCA (alfa-sinucleína) se han asociado con esta enfermedad (La Cognata V *et al.*, 2015). Otra enfermedad neurodegenerativa asociada con *splicing* es la enfermedad de Alzheimer, en la que hay varios genes asociados con la misma que sufren *splicing* alternativo. Entre los genes implicados, se encuentran los que codifican la proteína precursora amiloide (APP), la proteína tau y la apolipoproteína E (APOE) (Love JE *et al.*, 2015). El síndrome de QT-largo (SQTL), una enfermedad que provoca taquicardias, también está asociada con *splicing* alternativo. La mutación implicada en el gen *KCNH2*, en el +6T>C *downstream* del sitio donador del exón 7, evita la unión de la subunidad del espliceosoma snRNP U1, produciéndose entonces la retención del intrón 7 y, por ende, la aparición de una proteína modificada y la enfermedad (Zhang L *et al.*, 2004).



## El *splicing* en cáncer

Estudios genómicos han mostrado eventos alterados de *splicing* alternativo en cáncer y muchos de estos eventos se han asociado con múltiples aspectos de las funciones de las células tumorales, como son el control del ciclo celular, la organización del citoesqueleto, la migración y la adhesión (Sebestyén E *et al.*, 2015) (Danan-Gotthold M *et al.*, 2015) (Luo C *et al.*, 2017). Los mecanismos responsables de alteraciones en el *splicing*, observadas en las células cancerosas, incluyen: i) mutaciones que crean o interrumpen sitios de *splicing*, potenciadores o silenciadores de *splicing* (Srebrow A & Kornbliht AR., 2006) (Berasain C *et al.*, 2010), ii) la expresión anormal de factores de *splicing* (Kim E *et al.*, 2008), y iii) la activación de vías de señalización celular que afectan la actividad de la maquinaria de *splicing* (Srebrow A & Kornbliht AR., 2006) (Blaustein M *et al.*, 2017).

La sobreexpresión de *SRSF1* es un factor clave en el crecimiento tumoral, cuya expresión se duplica en varios tumores (Karni R., 2007). Además, se ha descrito que una sobreexpresión moderada es suficiente para transformar fibroblastos de rata en sarcomas. Recientemente se han identificado, utilizando un enfoque ARN-Seq, más de 300 eventos diferentes de *splicing alternativo* de *SRSF1* en distintos tipos de cáncer (Anczuków O *et al.*, 2015) (Bates DO *et al.*, 2017).

Así mismo, las mutaciones somáticas que afectan la expresión de los componentes del *splicing* tienen un papel importante en la progresión del cáncer. Por ejemplo, el PRPF6, se sobreexpresa en el carcinoma colorrectal, promoviendo la proliferación de células cancerosas. Por otro lado, estudios de secuenciación han descubierto mutaciones somáticas frecuentes en un grupo de componentes asociados al espliceosoma, incluidos SF3B1, U2AF1 y U2AF2, en varios tipos de neoplasias mieloides (Yoshida K & Ogawa S 2014) (Malcovati L *et al.*, 2015). Igualmente, las mutaciones de U2AF1 alteran la hematopoyesis y producen cambios en el reconocimiento del 3'SS, lo que da como resultado un *splicing* incorrecto de cientos de genes (Shirai CL *et al.*, 2015) (Llagan JO *et al.*, 2015). También las mutaciones en SRSF2, pueden ocasionar cambios considerables en los patrones de *splicing* y provocar defectos en la diferenciación de células hematopoyéticas (Zhag J *et al.*, 2015) (Kim E *et al.*, 2015).

Por otra parte, el *splicing* alternativo también juega un papel en el desarrollo del carcinoma hepatocelular, inclusive algunas isoformas asociadas al cáncer ya se han detectado en etapas preneoplásicas, lo que sugiere su posible contribución temprana a la malignidad hepática. Por ejemplo, se ha descrito la sobreexpresión de la variante de



*splicing* de la metiltransferasa 3b3 (DNMT3b3) y de la metiltransferasa 3b4 (DNMT3b4) en tejidos hepáticos con hepatitis y cirrosis crónica, así como en muestras de tejido de HCC. La elevación de DNMT3b4 se ha correlacionado con el grado de hipometilación del ADN en regiones satélite pericentroméricas en condiciones precancerosas y en HCC (Saito Y *et al.*, 2002). También se han observado variantes de *splicing* en la cadherina 17 (CDH17), conocida como la cadherina del hígado e intestino, que se ha visto sobreexpresada en aproximadamente un 90 % de los HCC (Liu Lx *et al.*, 2009). Más tarde, se observó que el 50 % de las muestras de HCC y el 30 % de los tejidos peritumorales también expresaron una variante de *splicing* de CDH17 que carece del exón 7 (Wang XQ *et al.*, 2005).

En cuanto al CCA, se han descrito 623 genes que presentan *splicing* alternativo en muestras neoplásicas en comparación con muestras de tejido sano (Chen Y *et al.*, 2017). Por ejemplo, se ha observado en el caso de la CD44, que es un glicoproteína receptora de membrana que se une a proteínas y otros ligandos para activar la transducción de señales, cumpliendo funciones importantes en la proliferación, migración e invasión tumoral (Yu Q & Stamenkovic I., 2000) (Nam K *et al.*, 2015). El *splicing* alternativo de esta proteína, CD44, puede generar hasta 12 isoformas con diferentes funciones biológicas (Saito S *et al.* 2013) (Wang J *et al.*, 2015). Una de estas isoformas, la CD44v6, es una isoforma específica de CCA que no se detecta en los conductos biliares normales (Yun KJ *et al.*, 2002). Otro ejemplo es la proteína secretada inducible por Wnt 1 (WISP1), también conocida como CNN4, cuyas funciones incluyen la proliferación celular, la diferenciación osteoblástica y la migración. Esta proteína tiene una variante que carece del exón 3 (WISP1v), que promueve la transformación celular y el rápido crecimiento. Se ha demostrado que la isoforma aberrante WISP1v se sobreexpresa en pacientes con CCA (Tanaka S *et al.*, 2003). Un último ejemplo es FOXP3, una proteína que participa en el desarrollo de las células T reguladoras CD25+. Se ha observado, en CCA, que la omisión del exón 3 en FOXP3 conduce a un cambio en el marco de lectura y, por tanto, de aminoácidos (Harada K *et al.*, 2012).



### 3. Material y Métodos

### 3.1. Material Biológico

#### 3.1.1 Muestras humanas

Las muestras de tejido hepático tanto tumoral (T) como tejido adyacente no tumoral (A) de pacientes con HCC y diversas patologías hepáticas se consiguieron a través de los Bancos de tumores del Hospital Universitario de Salamanca y del BCLC (*Barcelona Clinic Liver Cancer*), con el consentimiento escrito de los pacientes, según determina la legislación vigente. También se utilizaron remanentes de biopsias de HCC obtenidas con fines diagnósticos de pacientes con HCC procedentes de centros hospitalarios alemanes en Würzburg, Friburgo y Hannover englobadas dentro del estudio TRANSFER (TRANsporter SoraFENib Response). La información sobre patologías, características tumorales, demográficas y clínicas de estos pacientes se puede encontrar en las tablas MM-1, MM-2 y MM-18.

Los protocolos fueron aprobados por los Comités Éticos de Investigación Clínica del área de Salud de los distintos hospitales de procedencia. Sólo se utilizaron muestras de las que se disponía consentimiento informado firmado por los pacientes para su uso en investigación biomédica. Los datos personales fueron tratados con confidencialidad y seguridad, de acuerdo con la normativa basada en la Ley 15/99 (R.D. 994/99).

**Tabla MM-1.** Muestras utilizadas para detección de *splicing* en el transportador OCT1.

Muestras	Patologías
Control	Hígado sano comercial
Muestra 1	Colelitiasis
Muestra 2	Colecistectomía por colelitiasis
Muestra 3	Leucemia
Muestra 4	Cirrosis
Muestra 5	Hepatosiderosis
Muestra 6	Colangiopatía autoinmune
Muestra 7	Esteatosis
Biopsia 1	Hepatitis crónica alcohólica
Biopsia 2	Hepatitis crónica autoinmune
Biopsia 3	Hemocromatosis



**Tabla MM-2.** Características tumorales de los pacientes cuyas muestras han sido utilizadas en esta tesis doctoral, para medir la expresión de genes de la maquinaria de reconocimiento exónico.

ID del Paciente	Edad	Género	Estado tumoral	Diferenciación	Enfermedad subyacente
BCN-1	67	H	BCLC A	G1	HCV
BCN-2	56	H	BCLC A	G1	HCV
BCN-3	74	H	BCLC A	NA	Alcohol
BCN-4	71	H	BCLC A	G2	HCV/ Alcohol
BCN-5	56	H	BCLC A	G2	Esteatosis/hepática
BCN-6	61	M	BCLC A	G2	HCV
BCN-7	69	H	BCLC 0	G1	Alcohol/ Esteatosis
BCN-8	68	M	BCLC A	G2	Esteatosis hepática
BCN-9	75	H	BCLC A	G1	HCV
BCN-10	78	M	BCLC 0	G1	HCV
BCN-11	54	H	BCLC 0	G3	HCV
BCN-12	63	H	BCLC A	G1	HCV
BCN-13	74	H	BCLC A	G3	Esteatosis hepática
BCN-14	76	H	BCLC A	G2	Alcohol/ Esteatosis
BCN-15	62	H	BCLC A	G2	HCV/Alcohol
BCN-16	64	H	BCLC A	G2	Esteatosis hepática
USAL-1	74	H	BCLC A	G2	Alcohol
USAL-2	19	H	BCLC A	G2	Hepatitis crónica
USAL-3	71	H	BCLC 0	G1	Esteatosis hepática
USAL-4	75	H	BCLC A	NA	HBV/Esteatosis hepática
USAL-5	82	H	BCLC A	G2	Cirrhosis criptogénica
USAL-7	84	H	BCLC A	G2	NA
USAL-8	79	H	BCLC A	NA	Alcohol
USAL-9	68	H	BCLC A	NA	Alcohol
USAL-10	71	M	BCLC A	G2	Esteatosis hepática

BCLC, *Barcelona Clinic Liver Cancer*; M, mujer; H, hombre HBV, hepatitis B; HCV, hepatitis C; ID, identificación; NA, no disponible.

### 3.1.2. Líneas celulares

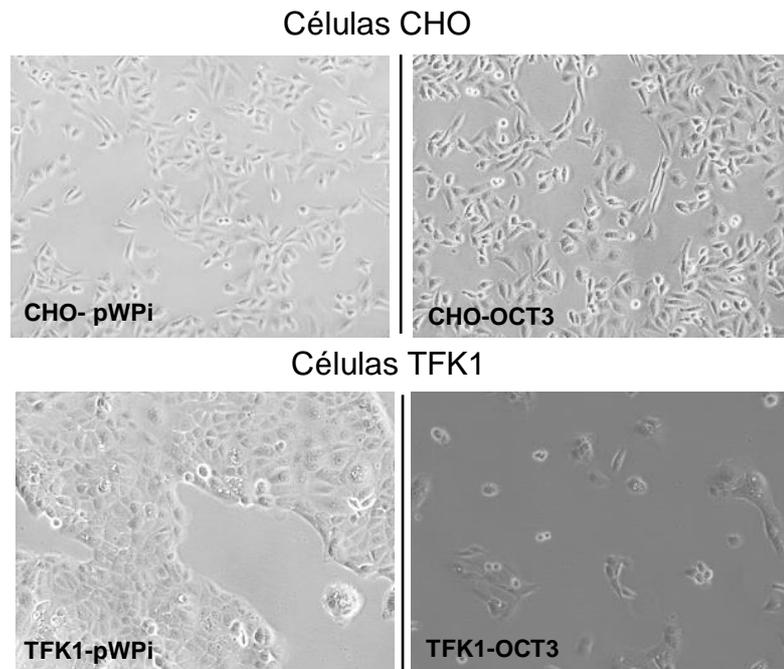
En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares:

Proporcionadas por la *American Type Culture Collection* (ATCC, LGC Standards, Barcelona): células derivadas de HCC humano como las líneas: Alexander o PCL/PRF/5 (CRL 8024) y HepG2 (HB-8065). También se utilizaron células CHO (CCL-61) (figura MM-1), de ovario de hámster chino.



De la casa comercial *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* (DSMZ, Braunschweig, Alemania): células derivadas de CCA humano como las líneas: TFK1 (ACC 344) (figura MM-1) y EGI-1 (ACC 385).

Las células HuH7 de HCC humano fueron cedidas por el Dr. Pedro Majano (Hospital Universitario de la Princesa, Madrid).



**Figura MM-1** Fotos representativas de dos de las líneas celulares utilizadas en esta tesis doctoral, donde se puede apreciar su morfología, tanto en su forma pWPI como las transducidas con el transportador de interés OCT3. Cada una se mantuvo con su medio de cultivos apropiado para su crecimiento.

### 3.2. Productos

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

- Abbot Laboratorios (Madrid): isoflurano (Forane®) y pentobarbital sódico (Nembutal N.R.).
- Abcam: anticuerpo ab2871 (ratón), anticuerpo ab118539 (conejo), anticuerpo ab124826 (conejo).
- Across Organics: gemcitabina, oxaliplatino.
- Air Liquide (Valladolid): carbógeno, CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> líquido.
- AppliChem (Madrid): ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico (HEPES), agar, fenol, galactosa, glicerol 80% estéril, leche descremada liofilizada y triptona.



- BD Biosciences (Madrid): cámaras multipocillo (Lab-tek) y fluido envolvente FACS

Flow para citometría de flujo.

- Biomers.net (Ulm, Alemania): cebadores o *primers* para los ensayos de PCR analítica y cuantitativa.

- Bio-Rad (Madrid): acrilamida, marcadores de pesos moleculares de proteínas, membranas de nitrocelulosa, persulfato de amonio, rojo ponceau, tampón Tris 0,5 M pH 6,8, tampón Tris 1,5 M pH 8,8 y tetrametiletilendiamina (TEMED).

-Biotools B&M Labs, S.A. (Madrid)- ADN Taq polimerasa. - Dako Diagnósticos (Barcelona): medio de montaje para fluorescencia.

- European Pharma: mitoxantrona.

- Enzo: anticuerpo M2III-6 (ratón).

- GE Healthcare (Barcelona): reactivos de detección ECL (*Enhanced Chimio Luminescence*), *kit PlasmidPrep Mini Spin*, *kit illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit* y algunas enzimas de restricción.

- Isogen (De Meern, Holanda): cebadores o *primers* para los ensayos de PCR analítica y cuantitativa.

- LifeSpan BioSciences: anticuerpo LS-C161155 (conejo).

- LíneaLAB (Barcelona): portaobjetos 76x26 mm.

- Merck (Barcelona): acetato sódico anhidro, ácido fórmico, ácido fosfomolibdico,  $\beta$ -mercaptoetanol, cloruro sódico, etanol, formaldehído, glicerol, hidróxido sódico, isopropanol, metanol, reactivo de Folin Ciocalteau y tartrato disódico.

- Pronadisa (Hispalab S.A., Madrid): agarosa de baja electroendósmosis, agarosa de alta resolución MS-8 y agarosa de bajo punto de fusión.

- Roche (Barcelona): ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico (HEPES),

DNAsa I, mitomicina c y algunas enzimas de restricción.

- Sartorius (Goettingen, Alemania): filtros de nitrato de celulosa de 0,2  $\mu$ m de tamaño de poro.



- Santa Cruz Biotechnology: anticuerpo sc-32233(ratón), dasatinib, lenvatinib y tosilato de sorafenib.

- Sigma-Aldrich (Madrid): ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), ácido linoleico, 2-acetamidofluoreno (AAF), actinomicina D, albúmina sérica bovina (fracción V), ampicilina, anastrozol, axitinib, azul de bromofenol, azul de Tripán, bicalutamida, bicarbonato sódico, blemicina, bosutinib, capecitabina, ciclofosfamida, cis-diaminodicloroplatino II (cisplatino), clorhidrato de quinina, cloruro de colina, dacarbazina, D-glucosa, dietilpirocarbonato (DEPC), dihidroetidio(DHE), , dimetilsulfóxido (DMSO), ditiotreitól (DTT), docetaxel, dodecil sulfato sódico (SDS), doxorubicina, epirrubicina, erlotinib, etóposido, 5-fluoruracilo, flutamida, glutamina, hidroxiurea, imatinib, irinotecán, lapatinib, metotrexato, medios RPMI-1640 y *Williams* mezcla de antibióticos y antimicótico (penicilina, estreptomicina y anfotericina B), 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), nicotinamida, nitrato de calcio, Nonidet P40, ornitina, paraformaldehído, piruvato sódico, sulfato de gentamicina, tripsina de páncreas porcino, Tris (trishidroximetil aminometano) base (Trizma) o clorhidrato (Tris HCl), y xilol cianol.

- Sigma-Genosys (Cambridge, Reino Unido) algunos cebadores o *primers* para ensayos de PCR, nilotinib, paclitaxel, pazopanib, pemetrexed, SN-38, sunitinib, tamoxifeno, temozolamida, temsirolimus, tioguanina, topotecán, vinblastina, vincristina.

- Selleckchem: cabazitaxel, cabozantinib, enzalutamida, panobinostat, ponatinib, regorafenib, tivozanib.

- Thermo Fisher Scientific (Madrid): acetato de amonio, aminoácidos no esenciales 100x, anticuerpos secundarios fluorescentes anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo marcados con AlexaFluor® 594 ó AlexaFluor® 488, mezcla de antibióticos penicilina/estreptomicina, 4,6-diamidino-2-fenilindol (Dapi), inhibidor de tripsina de soja, kanamicina, líquido estabilizador *RNAlater*, marcadores de peso molecular de ADN (25, 100 y 500 pb y 1 kb plus), medios de cultivo MEM, Opti-MEM, DMEM F-12 con glutamax, Advanced MEM, medio RPMI 1640 con Glutamax™-I, Accuprime®Pfx ADN polimerasa de alta fidelidad, Platinum® PCR Supermix High Fidelity, proteinasa K, solución de carga para electroforesis, suero bovino fetal (FBS), SYBR Green I (*SYBR Safe*), *SYBR Green I PCR Master Mix*, *Taqman® Universal PCR Master Mix* y las tarjetas microfluídicas o TLDA.



- VWR Internacional (Barcelona): ácido acético glacial, ácido clorhídrico, bromuro de etidio, 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.

### 3.3. Medios instrumentales

- Las pesadas se realizaron en balanzas electrónicas digitales Precisa 125 A y Sartorius BL 150S (Grupo Taper, Madrid).

- 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 Milli-Q integral 3 (Millipore-Merck, Madrid).

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

- Las centrifugaciones se realizaron en centrífugas refrigeradas 5417R y 5810R marca Eppendorf (Hamburgo, Alemania), Beckam Avanti J-20, y L8-M Ultracentrifuge, rotor 70.1 Ti (Beckman). También se utilizaron picofugas Stratagene (VWR International Eurolab, Barcelona).

- 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).
- Para la PCR analítica y para la RT se utilizó un termociclador Eppendorf Mastercycler ep gradient (Thermo Fisher).
- Los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real (tubos de 0,2 ml) se realizaron en un aparato ABI PRISM® 7300 Sequence Detection System de Applied Biosystems.
- Para la visualización de las secuencias y diseño de *primers* se utilizó el programa OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/Oligoanalyzer>) (Integrated DNA Technologies, Coralville, EE.UU.).
- 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 utilizando para ello la misma fuente de alimentación, todo procedente de la casa comercial Bio-Rad.
- Para la visualización de 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 Y 515 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 se realizaron con un homogeneizador Polytron Typ PT 10/35 Kinemática GMBH (Lucerna, Suiza).
- Para la realización de trabajos con 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 de la marca Thermo, 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 (Biotech S.L., Madrid) para el cultivo de las líneas celulares. La esterilización de las soluciones se llevo a cabo con filtros Sterivex de 0,2  $\mu\text{m}$  (Millipore Ibérica). Para contar las células se utilizaron cámaras Thoma.
- Los cortes histológicos se realizaron con un criostato (Leica Microsystems, modelo 1900 UV, Barcelona).
- 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.
- 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 (Madrid).
- 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  $\mu\text{l}$  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 column 30 mm x 2,1 mm, 3,5  $\mu\text{m}$  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 muestras se conservaron en congeladores a -20 °C y -80 °C marca Revco (Pacisa y Thermo Fisher).
- Además se contó con un pequeño equipamiento como agitadores magnéticos Selecta (Duerolab), agitadores Vortex de Ika Works (Wilmington, EE.UU.) y micropipetas Gilson (Prosisa, Salamanca).

### 3.4. Soluciones comunes utilizadas

- Folin-Ciocalteu: folin-ciocalteu comercial al 50% (v/v) en H<sub>2</sub>O destilada.
- Tampón TAE: trizma base 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 1 mM de pH 8,0.



- 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.
- Medio de captación (MC), pH 7,4: NaCl 96 mM, KCl 5,3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,1 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,8 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, D-glucosa 11 mM, y Hepes 50 mM.
- Tampón A: 250 mM Sacarosa, 0,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KNO<sub>3</sub>, 10 mM Hepes- Tris pH 7,4.
- Tampón B: CuSO<sub>4</sub> al 4% (p/v).
- Tampón C: 100 partes del reactivo A + 1 parte del reactivo B.
- Tampón RIPA: 1x PBS, 1% IGEPAL, 0,5% deoxicolato sódico, 0,1% SDS.
- Tampón de migración: 25 mM Trizma base, 0,2 M glicina, y 3,5 mM SDS.
- Tampón de transferencia: 25 mM Trizma base, 0,2 M glicina, 3,5 mM SDS y 20% (v/v) metanol.
- Solución de MTT: 5 mg/ml de MTT en PBS.
- Solución de lisis de células en los ensayos de viabilidad: 10% SDS y 10 mM HCl en H<sub>2</sub>O.
- Polietilenimina (PEI): 1 mg/ml PEI, 25 mM HEPES y 150 mM NaCl; pH 7,5.

### 3.5. Cultivos celulares

Los medios de cultivos utilizados para cada línea celular fueron los siguientes:

- Alexander y HepG2: MEM suplementado con 2,2 g/l de bicarbonato sódico y 110 mg/l de piruvato sódico.
- CHO: DMEM suplementado con prolina 50 µg/ml.
- 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 aminoácidos no esenciales.
- HuH7: DMEM suplementado con 2,2 g/l de bicarbonato sódico, 2,38 g/l de Hepes y 3,5 g/l de D-glucosa.



-TFK1: RPMI 1640 con GlutaMAX TM-I.

A todos los medios se les añadió FBS inactivado al 10% (v/v). La inactivación del suero se realizó a 56°C durante 30 min. También se añadió una mezcla de antibióticos y antimicótico al 1% que contenía: penicilina (20 U/ml), estreptomina (0,02 mg/ml) y anfotericina B (0,05 µg/ml); excepto a las líneas de CCA humanas (TFK1, EGI-1) a las que se le añadía una mezcla de penicilina y estreptomina (sin el antimicótico).

Tanto al recibir las células como al recuperarlas del N<sub>2</sub> líquido en el que se almacenaban, la descongelación de los criotubos se hizo en condiciones de esterilidad en baño a 37°C. Una vez descongeladas, se centrifugaron a 300 x g durante 5 min. El precipitado se resuspendió en el medio de cultivo correspondiente y se incubaron en la estufa a 37°C, en atmosfera del 5% de CO<sub>2</sub> en aire y humedad relativa del 80%.

El crecimiento de las células se produjo tras la adhesión a la superficie de la placa. Al llegar a confluencia el cultivo, se realizaba una tripsinización (0,25% de tripsina y 20 mM de EDTA en PBS) y se recogían sobre medio de cultivo por aspiración, para desprender las células de la placa de cultivo, y por ende, poder realizar los pases, sembrar las placas para los distintos tipos de experimentos o bien congelar alícuotas para su almacenamiento.

### **3.5.1. Cultivo de células para estudios de expresión génica**

Para la determinación de la expresión de diversos genes en las diferentes líneas celulares empleadas durante este trabajo, las células se sembraron en placas de 6 pocillos con un volumen final de 2 ml/pocillo a la densidad celular apropiada dependiendo de cada línea celular. A las 48 h de la siembra, las células se recogían y se procesaban para conseguir ARN total (apartado 3.6.1) o las proteínas totales (apartado 3.9.2.2).

### **3.5.2. Cultivo de células para estudios de funcionalidad de proteínas transportadoras**

Para determinar la funcionalidad del transportador OCT3 mediante citometría de flujo (apartado 3.14.2), las células se sembraron en frascos Roux de 25 cm<sup>2</sup> en un volumen de 7 ml de medio y a una densidad variable en función del tipo celular. Tras 48 h en cultivo se recogían y se procesaban como se explica en el apartado 3.14.



### 3.5.3. Estudios de viabilidad celular

Para evaluar el efecto de agentes citostáticos en las distintas líneas celulares utilizadas, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a la densidad apropiada en función de la línea celular. En el caso de las células CHO se sembraron a una densidad 2.000 células/pocillo. A las 24h se añadían los agentes citostáticos (tabla MM-3), que se incubaban con las células en tiempo variable dependiendo del tipo de experimento, y tras 72 h se realizaba el test de formazán.

#### 3. 5.3.1 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.

Para la determinación de la viabilidad celular, en primer lugar, se añadieron 110  $\mu$ l de 0,5 mg/ml MTT en medio de cultivo en cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Tras 4 h de incubación a 37 °C, se añadió sobre la mezcla anterior 100  $\mu$ l/pocillo de la solución de lisis (10% SDS y 10 mM HCl en agua). Finalmente, tras 16 h de incubación a 37 °C, se determinó la intensidad del color en el sobrenadante por espectrofotometría a una longitud de onda de 595 nm en un lector de ELISA. Como blanco se utilizaron pocillos de la placa en los que no se habían sembrado células, pero sí habían sido incubados con las distintas concentraciones de los compuestos ensayados y posteriormente con medio de cultivo suplementado con MTT y solución de lisis de igual forma que el resto de los pocillos.



**Tabla MM-3** Compuestos TKIS y no TKIS utilizados en el test de formazán y sus respectivas concentraciones.

Compuesto	Concentraciones $\mu\text{M}$	Compuesto	Concentraciones $\mu\text{M}$
TKIs	Rango 0,63 a 40 $\mu\text{M}$	No TKIs	Rango 0,01 a 1000 $\mu\text{M}$
Axatinib		Anastrozol	
Bosutinib		Bucolutamida	
Cabozantinib		Ciclofosfamida	
Cediranib		Citarabina	
Dasatinib		Enzalutamida	
Erlotinib		Flutamida	
Gefitinib		Irinotecán	
Imatinib		Mitomicina c	
Lenvatinib		Mitoxantrona	
Nilotinib		Paclitaxel	
Pazopanib		Panobinostat	
Ponatinib		Tamoxifeno	
Regorafenib		Temozulamida	
Sunitinib			
Sorafenib			
Tivozanib			

### 3.6. Determinación de la expresión génica a nivel de ARNm

#### 3.6.1. Análisis de los niveles de ARNm por RT-qPCR

##### 3.6.1.1. Extracción de ARN total

Para extraer el ARN total, se recogió tejido fresco y se pesó, utilizándose de 30 a 60 mg del tejido. Se prosiguió con la homogenización en buffer de lisis y beta mercaptoetanol, dilución 1:100. El buffer y el tejido se pasaron a los tubos de homogenizado para centrifugarse. A partir de los homogenizados se utilizaron 350  $\mu\text{L}$ , que se emplearon en el kit comercial *illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit* (GE Healthcare).

Para la extracción de ARN total a partir de líneas celulares, primeramente, se tripsinizaron las células y se centrifugaron a 2,000 rpm, 5 minutos. A continuación, se resuspendieron en 2mL de PBS y se centrifugaron nuevamente. Por último, se procesaron en 350  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis con mercaptoetanol (dilución 1:100). Luego se pasó el extracto celular a un eppendorf de 1,5 mL *RNAse free* y se agitó por un minuto y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para emplear luego el kit *illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit* (GE Healthcare). La concentración y la pureza del ARN extraído se comprobó mediante un análisis en el Nanodrop.



### 3.6.1.2. Transcripción reversa (RT)

Para sintetizar el ADNc a utilizar como molde en los experimentos de PCR se realizó una RT con 2 µg de ARN total, utilizando la mezcla de reactivos *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*, (Applied Biosystem). La reacción de RT se llevó a cabo utilizando *random primers* o oligo-dT en las mismas muestras. En algunas ocasiones también se utilizó *SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit* (Invitrogen).

### 3.6.2. Diseño de cebadores o primers

Los cebadores o *primers* específicos para el ADNc de cada una de las proteínas a estudiar fueron diseñados mediante el programa OligoAnalyzer 3.1. Su especificidad fue verificada con el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los *primers* se diseñaron, a caballo entre dos exones codificantes utilizando como secuencia de referencia la secuencia del ARNm publicada en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) específica para cada gen.

En las tablas MM-4, MM-5 y MM-6 se muestran las secuencias de nucleótidos de los *primers* utilizados para la cuantificación relativa de la abundancia del ARNm de los genes estudiados en esta tesis doctoral.

**Tabla MM-4** Secuencias de los *primers forward* y *reverse* utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes de las proteínas OCT1 y OCT3 en muestras humanas.

Proteína	Gen	Primer Forward (5' → 3')	Primer Reverse (5' → 3')	Amplicón (pb)
hOCT1	SLC22A1	TGCAGACAGGTTTGGCCGT	GCCCGAGCCAACAAATTCAT	187
hOCT3	SLC22A3	CATCGTCAGCGAGTTTGACT	GTAAATGACGATCCTGCCAT	139

**Tabla MM-5.** Secuencias de los *primers forward* y *reverse* utilizados para la detección de *splicing* en en gen de la proteína OCT1 en muestras humanas.

Proteína	Gen	Primer Forward (5' → 3')	Primer Reverse (5' → 3')	Amplicón (pb)
hOCT1	SLC22A1	GCCAGGATGGCTGGGTGTAT	CATCGCCGCAAACATCTCTCTCA	1325
hOCT1	SLC22A1	GGAAGCGCACCTTCATCCTGAT	CAGGTGCCCGAGGGTTCT	600



**Tabla MM-6.** Secuencias de los *primers forward* y *reverse* utilizados para cuantificación de genes de proteínas claves de la maquinaria de *splicing*.

Proteína	Gen	Primer Forward (5' → 3')	Tipo	Amplicón (pb)
<i>snRNA U1</i>	<i>RNU1</i>	GCAGGGGAGATACCATGATCACGAA CGAACGCAGTCCCCCACTA	F R	145
<i>U1A snRNP</i>	<i>SNRPA</i>	GGCCAGGCCTTTGTATCTTCA GTCTTGGCATACTGGATACGCATAGGT	F R	110
<i>sm-B and B1</i>	<i>SNRPB</i>	AGTTCAGAAAGATCAAGCCAAAGAAGCTCCA CGAGCAATACCAGTATCTTTGGGAGGA	F R	142
<i>U1C snRNP</i>	<i>SNRPC</i>	CACCCATGACTCTCCATCTGTGAGAA GTTGAAATGCAGCCGTTGTTTTGTCAAT	F R	138
<i>sm-D1</i>	<i>SNRPD1</i>	GCTAGGATGAAGCTCGTGAGATTTTTGATGAA GCTGACATCCACACCTGTGATTGTT	F R	111
<i>sm-E</i>	<i>SNRPE</i>	TGCGGATAGAAAGGCTGTATCATTGGT TCCTTTAGCATGATCCGACCCAGTT	F R	122
<i>Sm-N</i>	<i>SNRPN</i>	GGAACAGCAATCATGACTGTTGGCAA GGTGCCAAATGAAGATTCGGCCAT	F R	102
<i>Sf1</i>	<i>hSF1</i>	GGCAGTGGAAACAGATAAGAAACATCCTGAA CTCTGCCAGGGTCTTAAGATCCTGTT	F R	150
<i>A2af1</i>	<i>U2AF1</i>	CGTCAGTATAGGATGGGAGAAATGCACA CGGGATCGGGATCTTGATCTATGCTT	F R	134
<i>A2af2</i>	<i>U2AF2</i>	CAACTACCTGAACGATGACCAGGTCAA CAATGGCCTGATCCGTGACGTT	F R	152
<i>SC35</i>	<i>SRSF2</i>	CGGAGCCGACGCCCTA TTCGAGCGGCTGTAGCGAGAT	F R	92
<i>SRp20</i>	<i>SRSF3</i>	TCCGAGAGCTAGATGGAAGAACAATATGT AGTGCGCCACGATTTCTACTTCTTT	F R	92
<i>SRp75</i>	<i>SRSF4</i>	GGTTCTGGACGAGTGGATATGGTTA CTGCCTGACGCATATAATCCTTTAGGTCTT	F R	145
<i>SRp40</i>	<i>SRSF5</i>	CTCGAAATGATAGACGAAATGCTCCACCT TTGAGATCCTGCCAGCTGACTCTT	F R	94
<i>SRp55</i>	<i>SRSF6</i>	CTACGGAAGCCGACGTGG ACTTCACCTGCTTGTGCGATAAAATCCT	F R	165
<i>9GB</i>	<i>SRSF7</i>	CCTCCAGGATTTGCTTTGTGGAAAT GGGAGCCACAAATCACCTTTCCAT	F R	91
<i>SRp46</i>	<i>SRSF8</i>	CCTCAAGGTGGACAACCTGACCTA CCACGCGCCGTACTIONT	F R	77
<i>TRA2-β</i>	<i>SRSF10</i>	GAACTACGGCGAGCGGGAAT GCAGGGGTATGCCTTGCAGAT	F R	84
<i>SRm160</i>	<i>SRRM1</i>	CCAGCTGGAAGTGAAGAATCCAGACT AGGGGCCACAGTTCTCCATAA	F R	105
<i>hnRNP A1</i>	<i>HNRNPA1</i>	CCATGACTCCGTGGATAAGATTGT CATTCA AAGTTTCCAGAACCCTTCGACCTCT	F R	141
<i>hnRNP B1</i>	<i>hHNRNPA2B1</i>	ACTTTAGAGGAGATCTGATGGATATGGCA TACAGTGAAGCCCATGGCAAATAGGA	F R	112
<i>HNRNPF</i>	<i>HNRNPF</i>	GCTCGCCTCCGTGGACATTT CTTGGGTGTGGCTTTTTTGTGGCTTA	F R	94
<i>hnRNPK</i>	<i>HNRNPK</i>	CCAATGGTGAATTTGGTAAACGCCCT GCCCCAGCATTCTTGCTCTGAA	F R	124
<i>HNRNPL</i>	<i>HNRNPL</i>	GGGAGAACTACGATGACCCGCA CACCACATAGCTGATGGGTCCAAACT	F R	131
<i>hnRNP E2</i>	<i>PCBP2</i>	GATGCGCGAGGAGAGTGGT CATAGAGCTGCTTATGTCCTCTTCCAGT	F R	148
<i>PTBP1</i>	<i>HNRNPI</i>	GCGGGGATCTGACGAGCTT GAACTTCTTGCTGTCAATTCGGTTTGGCT	F R	103
<i>CLK3</i>	<i>CLK3</i>	GCCTCCTCGAGAAGCCAACA GGTCCCCACAATCTCATATCGCTCT	F R	124
<i>CLK1</i>	<i>CL1</i>	CATCGATCATAAAGCGGGAGGTAGACA TCTGGACACAGCGAAAGTACTGTT	F R	146
<i>CLK2</i>	<i>CLK3</i>	GCCTCCTCGAGAAGCCAACA GGTCCCCACAATCTCATATCGCTCT	F R	124
<i>SRSF1</i>	<i>SRPK1</i>	GCGGAAAGTGCTTGCCT GCCTCGGTGCTGAGTTTCAGATT	F R	91
<i>PPP1A</i>	<i>hPPP1CA</i>	GTTTCTACGATGAGTGCAAGAGACGCTA CCTCCGTGGCAGCAGAAGAT	F R	121
<i>PPP2A</i>	<i>hPPP2CA</i>	GCCTTGGTGGATGGGCAGAT AGCAAGTCACACATTGGACCCCTCA	F R	128
<i>PPP2A</i>	<i>hPPP2CA</i>	GGTGGATGGGCAGATCCTTCTGTCTA GCAAGTCACACATTGGACCCCTCAT	F R	122

Una vez diseñados, los oligonucleótidos fueron suministrados liofilizados por las casas comerciales. Antes de su uso, se reconstituyeron en H<sub>2</sub>O bidestilada y se valoraron por espectrofotometría a 260 nm de longitud de onda.



### 3.6.2.1. PCR cuantitativa (qPCR)

La qPCR es una variante de PCR que permite cuantificar el producto amplificado durante la reacción mediante la detección de fluorescencia generada por un fluorocromo al intercalarse entre las hebras de ADN que se van sintetizando. Se usó el fluorocromo “SYBR”, un componente de la mezcla de reactivos *SYBR® Select Master Mix* (Applied Biosystems) utilizada para este propósito. Las condiciones de temperatura para la RT-qPCR fueron iguales en todos los casos. Las muestras se incubaron primeramente durante 2 min a 50°C, seguidos de 10 min a 95°C y, por último, fueron sometidas a 40 ciclos de 15 s a 95°C y de 1 min a 60°C.

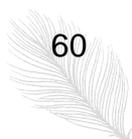
En algunos casos, para comprobar la especificidad de los *primers* utilizados, se añadió un ciclo de disociación consistente en dos ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. La abundancia del ARN problema fue corregida por la del normalizador, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HPRT1) o  $\beta$ -actina (ACTB), determinado paralelamente en cada muestra. Las determinaciones fueron realizadas por duplicado y fueron incluidos blancos de reacción, o sea, tubos en los que había agua ultra pura en vez de ADNc.

### 3.6.2.2. Cuantificación relativa

La cuantificación relativa se basa en el método de comparación de Ct (ciclo umbral). Como elemento normalizador se utiliza un control endógeno 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. Este valor sirve para normalizar la cantidad de ADN añadido a la reacción y corregir así variaciones en la cantidad de ARN de partida en la muestra. Para poder aplicar este método y comparar los resultados, es imprescindible designar una muestra como calibrador, la cual sirve como base para comparar los resultados, es decir, a la que se le otorga el valor 1 de expresión. La cantidad de diana, normalizada frente al control endógeno y relativa al calibrador/muestra control, viene dada por:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Para conseguir este valor es necesario realizar los siguientes cálculos:

- Calcular el Ct promedio de cada muestra para cada una de las dianas y del control endógeno (para cada muestra se realiza una determinación por duplicado).
- Calcular  $\Delta Ct$  como Ct diana - Ct control endógeno.
- Calcular  $\Delta\Delta Ct$  como  $\Delta Ct$  muestra -  $\Delta Ct$  calibrador/muestra control.



### 3.6.3. *Taqman Low Density Arrays (TLDA) o Tarjetas microfluídicas*

Las tarjetas microfluídicas (*TaqMan Low Density Arrays*, TLDA) son placas compuestas con múltiples micropocillos en las que es posible analizar la expresión de entre 12 y 384 genes diferentes (según el formato de TLDA), ya que cada pocillo de la placa contiene liofilizados los dos *primers* y la sonda *Taqman* para el gen de interés. Las TLDA utilizadas en este trabajo fueron del formato de 96 de manera que cada TLDA contenía 8 puertos lo que permitía cargar 8 muestras en las que se analizaban los genes de interés (tabla MM-7) y los genes de los controles endógenos *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 *Taqman Master Mix* y se cargaba la muestra en cada uno de los 8 puertos, después se centrifugaba la placa dos veces a 1.200 rpm durante 2 min, se sellaba y se desencadenaba la reacción de qPCR.

Para analizar los resultados se llevó a cabo una cuantificación relativa como se describe en el apartado (apartado 3.6.2.2.). Para normalizar los valores de Ct de los genes diana se utilizaron los genes *GAPDH* y *ACTB* como controles endógenos (la media de sus valores de  $\Delta Ct$ ). Las muestras utilizadas se describen en la tabla MM-2.



**Tabla MM-7.** Genes incluidos en el diseño de las tarjetas microfluídicas o TLDAs, referencia de secuencias y tamaño de amplicón

<b>Gen</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Amplicón (pb)</b>
<i>SRPK1</i>	Hs00177298_m1	100
<i>SRPK2</i>	Hs00795102_m1	154
<i>CLK1</i>	Hs00269734_m1	78
<i>CLK2</i>	Hs00241874_m1	61
<i>CLK3</i>	Hs00357427_m1	81
<i>CLK4</i>	Hs00252917_m1	74
<i>PPPICA</i>	Hs00267568_m1	71
<i>PPP2CA</i>	Hs00427260_m1	77
<i>SNRPG</i>	Hs01923241_g1	86
<i>SNRPN</i>	Hs00909634_m1	74
<i>GAPDH</i>	Hs99999905_m1	122
<i>SF1</i>	Hs00190309_m1	117
<i>SRSF1</i>	Hs00199471_m1	55
<i>U2AF1L5</i>	Hs01597465_g1	82
<i>U2AF2</i>	Hs00200737_m1	75
<i>SRSF2</i>	Hs00427515_g1	133
<i>SRSF3</i>	Hs00751507_s1	93
<i>SRSF4</i>	Hs00194538_m1	65
<i>SRSF5</i>	Hs00951035_m1	102
<i>SNRNP70</i>	Hs00162035_m1	68
<i>SNRPC</i>	Hs00853882_g1	80
<i>SNRPD1</i>	Hs00705733_s1	99
<i>SNRPF</i>	Hs00853884_g1	90
<i>SFPQ</i>	Hs00915444_m1	66
<i>HNRNPA1</i>	Hs01656228_s1	81
<i>HNRNPA2B1</i>	Hs00242600_m1	78
<i>HNRNPD</i>	Hs01086912_m1	145
<i>HNRNPF</i>	Hs00359014_m1	60
<i>HNRNPH1</i>	Hs01033845_g1	114
<i>HNRNPK</i>	Hs00829140_s1	100
<i>HNRNPL</i>	Hs00704853_s1	144
<i>PCBP2</i>	Hs01590472_mH	68
<i>PTBP1</i>	Hs00259176_m1	101
<i>SRSF6</i>	Hs00607200_g1	59
<i>ACTB</i>	Hs01060665_g1	63
<i>SRSF7</i>	Hs00196708_m1	69
<i>SRSF8</i>	Hs00259455_s1	132
<i>SRSF9</i>	Hs01596548_g1	117
<i>TRA2B</i>	Hs00190210_m1	69
<i>SREK1</i>	Hs00377948_m1	99
<i>SRRM1</i>	Hs01004626_g1	59
<i>RBMY1A1</i>	Hs00359074_m1	84
<i>RBM5</i>	Hs01554570_m1	66
<i>SNRPA</i>	Hs00190231_m1	123
<i>SNRPB</i>	Hs01067442_m1	70
<i>SNRPE</i>	Hs01635040_s1	147
<i>ESRP1</i>	Hs00214472_m1	114
<i>CELF2</i>	Hs00272516_m1	118



### 3.7. Métodos aplicados en los estudios de *splicing*

#### 3.7.1. Ensayo *in silico* para determinar la expresión de los genes del espliceosoma

En esta tesis doctoral se realizó un análisis *in silico* de la expresión de genes del espliceosoma correspondientes al complejo E, complejo B, proteínas SR, hnRNP y quinasas-fosfatasa (tablas MM-8 a MM-13).

El estudio *in silico* realizado se ha llevado a cabo utilizando la información disponible en la base de datos HCCDB: *Integrative Molecular Database of Hepatocellular Carcinoma*. Este recurso pertenece a la Universidad de Tsinghua, el Centro Nacional de Cáncer de Hígado y el Hospital de Cirugía Hepatobiliar del Este de Shanghai y está disponible en el enlace: <http://lifeome.net/database/hccdb/home.html>.

La base de datos global (DB) ha sido desarrollada por (Lian *et al.*, 2018) integrando 15 bases de datos públicas sobre la expresión de genes en HCC, incluidas entre las mismas se encuentran las del *The Cancer Genome Atlas Program* (TCGA) y las del *Genotype-Tissue Expression* (Gtex) que incluyen un total de 3.917 muestras. De las 15 bases de datos, 12 contenían muestras pareadas tumorales y tejido adyacente. La información utilizada para dilucidar la importancia e implicación de los diferentes genes que participan en el proceso de *splicing* se han basado en el análisis del patrón de expresión y en los datos de supervivencia a partir de las curvas de supervivencia asociadas.

Las bases de datos utilizadas fueron *Data base* (DB)1, DB3, DB4, DB6, DB7, DB11, DB12, DB13, DB15, DB16, DB17, DB18. Cada DB contenía información del tejido tumoral y adyacente, número de pacientes y estadística, excepto la base de datos DB3, que tenía información adicional, comprendiendo el tejido de hígado sano (H, n = 6) y cirrótico (C, n = 40). El número de muestras (T/A) por base de datos fue el siguiente: HCCDB1: 100/97; HCCDB3: 268/243; HCCDB4: 240/193; HCCDB6: 225/220; HCCDB7: 80/82; HCCDB11: 88/48; HCCDB12: 81/80; HCCDB13: 228/168; HCCDB15 (TCGA): 351/49; HCCDB16: 60/60; HCCDB17: 115/52; HCCDB18: 212/177. Para detectar posibles diferencias significativas entre el tejido tumoral (HCC) y el no tumoral adyacente se utilizó el test estadístico de t-student seguido de la corrección de Benjamini-Hochberg. Los valores se normalizaron mediante la transformación log<sub>2</sub> (Ferreira JA., 2007).



La correlación entre la expresión de estos genes y la supervivencia de los pacientes de HCC se obtuvo en la mayoría de los casos de tres bases de datos (DB6, DB15, DB18) y se presentó como la probabilidad de supervivencia frente al tiempo de supervivencia en años. Se comparó la probabilidad de supervivencia con respecto a la expresión de cada gen (los tumores se dividieron en tumores que expresan niveles altos o bajos del gen de interés). Para evaluar las diferencias en las tasas de supervivencia se utilizó el análisis estadístico de Kaplan-Meier.

Se empleó la información de los pacientes con HCC disponible en la base de datos del TCGA (<https://tcga-data.nci.nih.gov/>). En esta base de datos aparecen disponibles 427 casos, de los cuales se utilizaron los datos pareados (datos del tejido tumoral (T) y adyacente no tumoral (A) para un total de 50 pacientes. Se seleccionaron genes del complejo E, SR, hnRNP, complejo B y quinasas/fosfatasa (tablas MM-8 a MM-12). Para realizar estos estudios se buscó el número de ensamblaje de cada gen en la base de datos NCBI. Este número se utilizó para buscar la expresión de cada gen en cada tejido pareado encontrado en el TCGA.

La expresión de los genes fue normalizada doblemente utilizando la expresión de GAPDH y de ACTB. Para calcular la significación estadística se llevó a cabo el análisis de la *t* de Student entre los datos pareados T y A.

**Tabla MM-8.** Genes analizados implicados en el complejo E del espliceosoma.

<b>Función</b>	<b>Proteína</b>	<b>Gen</b>
Elementos U1 del complejo E	U1 snRNP 70kDA	<i>SNRP70</i>
	U1A snRNP	<i>SNRPA</i>
	Sm-B/B1	<i>SNRPB</i>
	U1C snRNP	<i>SNRPC</i>
Proteínas Sm del complejo E	sm-D1	<i>SNRPD1</i>
	sm-E	<i>SNRPE</i>
	sm-F	<i>SNRPF</i>
	sm-G	<i>SNRPG</i>
	sm-N	<i>SNRPN</i>
Unión a BPS	Sf1	<i>SF1</i>
Unión a 3´SS	U2af1	<i>U2AF1</i>
Unión a PPT	U2af2	<i>U2AF2</i>

BPS: punto de ramificación; 3´ss: sitio de *splicing*; PPT: tracto de polipirimidina



**Tabla MM-9.** Genes analizados que favorecen el *splicing* corto mediante la interacción con potenciadores de *splicing* exónicos (ESE) e intrónicos (ISE).

<b>Función</b>	<b>Proteína</b>	<b>Gen</b>
<i>Favorecen el splicing corto</i>	SF2/ASF	<i>SRSF1</i>
	SC35	<i>SRSF2</i>
	SRp20	<i>SRSF3</i>
	SRp75	<i>SRSF4</i>
	SRp40	<i>SRSF5</i>
	SRp55	<i>SRSF6</i>
	9GB	<i>SRSF7</i>
	SRp46	<i>SRSF8</i>
	SRp30c	<i>SRSF9</i>
	TRA2- $\beta$	<i>SRSF10</i>
	NET2	<i>SRSF11</i>
	SREK1	<i>SRSF12</i>
	SRm160	<i>SRRM1</i>
LUCA15	<i>RBM5</i>	

**Tabla MM-10.** Genes analizados que favorecen el *splicing* largo, por inhibición del *splicing* corto, mediante la interacción con silenciadores exónicos (ESS) e intrónicos (ISS).

<b>Función</b>	<b>Proteína</b>	<b>Gen</b>
<i>Favorecen el splicing largo</i>	hnRNP A1	<i>HNRNPA1</i>
	hnRNP B1	<i>HNRNPA2B1</i>
	hnRNP D	<i>HNRNPD</i>
	hnRNP F	<i>HNRNPF</i>
	hnRNP H	<i>HNRNPH1</i>
	hnRNP K	<i>HNRNPK</i>
	hnRNP L	<i>HNRNPL</i>
	hnRNP E2	<i>PCBP2</i>
	PTBP1	<i>HNRNPI</i>



**Tabla MM-11.** Genes analizados de proteínas involucradas en la regulación de la actividad de proteínas SR.

<b>Función</b>	<b>Proteína</b>	<b>Gen</b>
Quinasas nucleares	“CDC like kinase 1”	<i>CLK1</i>
	“CDC like kinase 2”	<i>CLK2</i>
	“CDC like kinase 3”	<i>CLK3</i>
	“CDC like kinase 4”	<i>CLK4</i>
Quinasas citoplasmáticas	“SRSF protein kinase 1”	<i>SRPK1</i>
	“SRSF protein kinase 2”	<i>SRPK2</i>
Fosfatasas	PP1A	<i>PPP1CA</i>
	PP2A	<i>PPP2CA</i>

**Tabla MM-12.** Genes analizados implicados en el complejo B del espliceosoma.

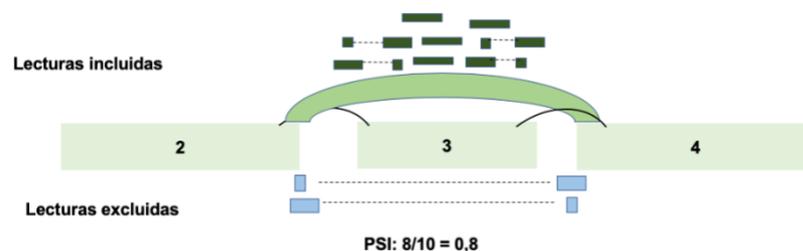
<b>Función</b>	<b>Proteína</b>	<b>Gen</b>
<i>Espliceosoma pre-catalítico</i>	snRNA U4	<i>RNU4-1</i>
	snRNA U5	<i>RNU5-1</i>
	snRNA U6	<i>RNU6-1</i>
	pre-ARNm factor de procesamiento 3	<i>PRPF3</i>
	pre-ARNm factor de procesamiento 4	<i>PRPF4</i>
	pre-ARNm factor de procesamiento 6	<i>PRPF6</i>
	pre-ARNm factor de procesamiento 8	<i>PRPF8</i>
	pre-ARNm factor de procesamiento 31	<i>PRPF31</i>
	Ensamblaje del espliceosoma	“DEAD-box helicase 23”



### 3.7.2. Ensayo *in silico* para la determinación de *splicing* en el pre-ARNm de *SLC22A1*

En este ensayo *in silico* se analizó la abundancia de los eventos de *splicing* sufridos por el pre-ARNm del gen *SLC22A1* y su asociación con cambios en la expresión de las proteínas del espliceosoma. Para llevar a cabo este análisis se utilizó como herramienta computacional SpliceSeq disponible en el Centro de Cáncer MD Anderson de la Universidad de Texas (<http://projects.insilico.us.com/TCGASpliceSeq/>). La herramienta SpliceSeq comienza con un modelo de referencia para cada gen construido a partir de todas las transcripciones de codificación de proteínas del gen (Hubbard T *et al.*, 2002). Las isoformas de transcripción de cada gen se ensamblan en un gráfico de *splicing* unificado de modo que las lecturas de ARNm se alinearán con una única ubicación característica en el gráfico. Las lecturas de las muestras del TCGA se alinean con los gráficos de *splicing* y se generan estadísticas para cada unión de exón y *splicing*. Los totales de lectura se normalizan por la longitud del exón y el número de lecturas alineadas en la muestra (lecturas por 1000 bases de exón por millón de lecturas alineadas) (Ryan M *et al.*, 2015).

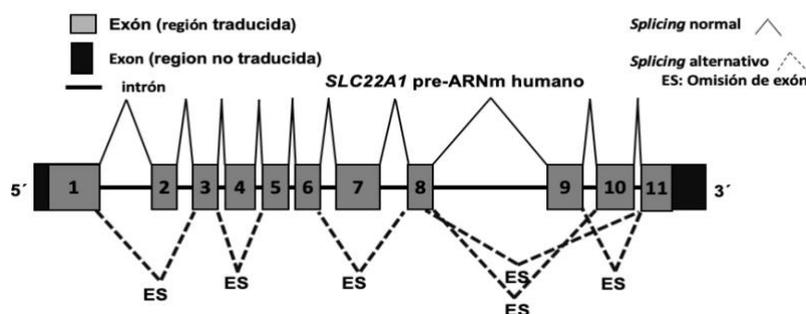
Para cada muestra y para cada posible evento de *splicing* este recurso calcula un porcentaje de la probabilidad de la presencia de los exones implicados en eventos de *splicing* (PSI) en cada gen, que se define como la proporción de recuentos de lecturas normalizadas que indican inclusión de un elemento de transcripción en el total de lecturas normalizadas para ese evento (lecturas de inclusión y exclusión). Por ejemplo, un valor de PSI de 0,25 para un evento de *splicing* debe interpretarse como que este evento ocurre en aproximadamente el 75% de las transcripciones presentes en esa muestra. Se muestra otro ejemplo en la figura MM-2.



**Figura MM-2** Ejemplo donde las 8 lecturas en verde (lecturas del cuerpo del exón 3, lecturas de la unión del exón 2–3 y lecturas de la unión del exón 3–4) que indican que el exón 3 está presente. Las lecturas de la unión en azul 2–4 indican que el exón 3 tuvo un evento de *splicing*. Por lo tanto, el PSI es 8/10 o 0.8 indica que el 80% de las transcripciones en la muestra incluyen el exón 3 (Ryan M *et al.*, 2015)



Los valores mostrados en esta tesis doctoral se han calculado a partir de la PSI de seis eventos de *splicing* (figura MM-3 y tabla-13) que ocurren en la maduración del ARNm de *SLC22A1* que fueron del tipo omisión de un exón (ES).



**Figura MM-3** Posibles eventos de *splicing* en el gen *SLC22A1* cuyos valores están disponibles en la herramienta SpliceSeq. La línea continua se refiere a los eventos de *splicing* de la forma silvestre de *SLC22A1* mientras que la línea discontinua se refiere a los eventos de *splicing* alternativo.

**Tabla MM-13** Tipos de *splicing* incluidos en este trabajo y número de muestras incluidas en cada tipo de *splicing*.

Tipos	<i>Splicing</i>	Número de muestras
ES1	Omisión de exón 2	352
ES2	Omisión de exón 4	359
ES3	Omisión de exón 7	288
ES4	Omisión de exón 9	350
ES5	Omisión de exones 9+10	350
ES6	Omisión de exón 10	310

Se ha definido la frecuencia global de *splicing* alternativo (ASGF) como el porcentaje de moléculas de ARNm que contienen al menos un evento de *splicing*. ASGF se calculó como  $100 * (PSI_1 * \dots * PSI_n)$ , donde  $PSI_x$  fue el PSI para eventos de *splicing* individuales en la muestra (en el caso de *SLC22A1*,  $x = 1 \dots 6$ ). Este cálculo tiene la limitación de suponer que todos los eventos de *splicing* fueron eventos independientes no excluyentes, que en el caso del pre-ARNm de *SLC22A1* no es del todo correcto, porque los saltos del exón 9 o 10 no pueden ocurrir si el exón 9 + 10 ya han saltado juntos.

Las muestras que se cuantificaron fueron un total de 371. Las muestras con eventos de *splicing* que no se pudieron cuantificar (null) se eliminaron del estudio. Por otra parte, también se correlacionó el estadio de cáncer de las muestras con eventos de *splicing*,



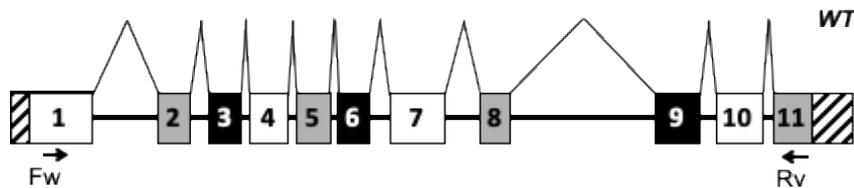
donde para el estadio I, se tenían 167 muestras; para el estadio II, 113, para el estadio III, 86 muestras y para el estadio IV, 5 muestras.

El coeficiente de correlación de Pearson se calculó mediante el análisis de regresión entre el ASGF que afecta al pre-ARNm de *SLC22A1* (SLC22A1-ASGF) y los niveles de expresión (ARNm) de los factores involucrados en el reconocimiento del exón, utilizando el método de mínimos cuadrados.

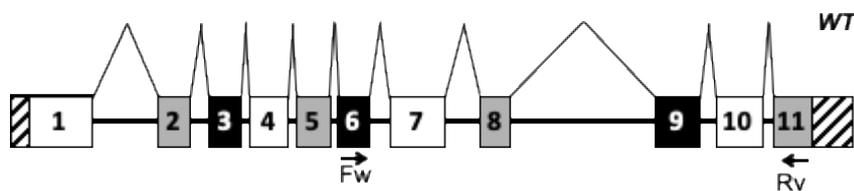
### 3.8. Determinación de splicing en muestras de HCC y en diferentes enfermedades hepáticas

#### 3.8.1. Obtención de ADNc del gen *SLC22A1*

El ARN total extraído de las biopsias de HCC y otras patologías de hígado fue utilizado como molde para la RT (apartado 3.6.1.2), tras la cual se amplificó la ORF o parte del ORF del gen *SLC22A1* por PCR analítica (apartado 3.7.2.2.1.) utilizando los *primers* específicos para OCT1 cuyas secuencias específicas se encuentran en la tabla MM-5. Los sitios de anillamiento de cada *primer* se muestran en las figuras MM-4 y MM-5.



**Figura MM-4.** Pre-ARNm del gen *SLC22A1*. Los intrones se muestran con líneas horizontales. Los sitios de unión de los *primers forward* (Fw) y *reverse* (Rv) utilizados para detectar formas de *splicing* se indican con las flechas correspondientes.



**Figura MM-5.** Pre-ARNm del gen *SLC22A1*. Los intrones se muestran con las líneas horizontales. Los sitios de unión de los *primers forward* (Fw) y *reverse* (Rv) utilizados para detectar formas de *splicing* se indican con las flechas correspondientes.

### 3.8.1.1. Detección de variantes de OCT1 generadas por *splicing* alternativo

### 3.8.1.2. PCR Analítica

La PCR analítica se llevó a cabo con la ADN Taq polimerasa de la casa Biotools B&M Labs, S.A. (Madrid) en presencia de buffer 10x + MgCl<sub>2</sub> y desoxinucleótidos trifosfato 25x a 10mM, disueltos en una solución tampón, más 10 μM de *primers forward* y *reverse* y el ADN molde. Una vez preparada la mezcla de reacción, los tubos se incubaron a 94°C durante 2 min; más 40 ciclos de 94°C 30 s, 60°C 30s y 72°C durante un tiempo variable (1 min por cada kb del amplicón) y un ciclo final de extensión de 10 min a 72°C. En algunos casos se utilizó un gradiente de temperatura de anillamiento de los *primers*.

### 3.8.1.3. Electroforesis en gel de agarosa

Para preparar del gel de agarosa se utilizó la agarosa MS 8 disuelta en TAE 1x al 1 ó 2% (p/v), dependiendo de los tamaños moleculares de las muestras a analizar. Se añadía reactivo *SYBR Safe* hasta conseguir una concentración 1/10.000 (v/v). El gel se colocaba en la cubeta de electroforesis con tampón TAE. Las muestras se mezclaron con un buffer de carga antes de depositarlas en el gel. Como patrón de tamaños moleculares de ADN se empleó el ladder 1 kb Plus. El gel se visualizaba en el equipo de análisis de imagen LAS-4000.

### 3.8.1.4. Visualización de los amplicones de OCT1

Se comprobó la presencia y el tamaño de los amplicones correspondientes a OCT1 mediante geles de agarosa MS 8 al 2%. Se utilizaron 2,5 μl de ADNc de las muestras de biopsias de HCC y de otras patologías hepáticas amplificadas por PCR. Las diferentes bandas se visualizaron en el equipo de análisis de imagen LAS-4000.

## 3.9. Producción de vectores lentivirales

### 3.9.1. Fundamento

Para poder generar lentivirus recombinantes defectivos es necesario remplazar los genes de las proteínas virales por el transgén de interés en el plásmido genómico lentiviral,. En la producción de los virus se debe usar una línea celular (célula empaquetadora) que se transfecta con los dos plásmidos que codifican las proteínas estructurales de los lentivirus y con el plásmido recombinante que contenga el ADN de interés, flanqueado por los LTR (*long terminal repeats*), por la señal de empaquetamiento y por otros elementos necesarios en *cis* como el TSS (sitio de inicio de transcripción) y el tracto polipurínico importante para la síntesis de la segunda



cadena. De esta forma, se generarán partículas retrovirales recombinantes y defectivas, que pueden ser purificadas y concentradas a partir de los sobrenadantes del cultivo celular (Kuroda HR *et al.*, 2009).

### 3.9.2. Producción de las partículas virales

Como células empaquetadoras se utilizaron las células HEK-293T que se sembraron a subconfluencia en placas recubiertas de colágeno de 10 cm de diámetro. Las células fueron transfectadas utilizando polietilenimina (PEI) con 3 tipos de plásmidos:

i) el vector de transferencia pWPi-OCT3 que contenía el gen *reporter* 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 (apartado 3.14) y el transgén de interés separados por un elemento IRES. Para la producción de virus controles se usó el plásmido pWPI vacío, que únicamente codificaba la EGFP

ii) el plásmido psPAX2, que codifica proteínas estructurales del virus

iii) el vector de expresión pMD2.G que codifica para la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular.

Para formar los complejos PEI:ADN se mezclaban 6 µg del plásmido psPAX2, 4,5 µg del plásmido pMD2.G y 6 µg del plásmido de transferencia, disueltos en 1,2 ml de solución salina, con 60 µl de PEI. La mezcla fue incubada durante 20 min a temperatura ambiente y, a continuación, se añadió a la placa de cultivo de células HEK-293T. A las 16 h se quitó el medio de cultivo con los complejos PEI:ADN y se añadió medio fresco.

Se recogieron sobrenadantes de las placas de cultivo a las 40 h, 48 h y 72 h después de la transfección que se pasaron a través de filtros de 0,45 µm de tamaño de poro. Las partículas virales se concentraron por ultracentrifugación a 53.000 x g durante 130 min a 16°C. El precipitado se resuspendió en medio RPMI y se guardó a -80°C hasta su uso.

### 3.9.3. Determinación del título viral

El título viral o concentración de virus fue determinado infectando células HEK-293T con una serie de diluciones de la solución viral y analizado el % de células EGFP positivas, por medio de citometría de flujo, a los 4 días de realizar la transducción,. La concentración de partículas virales se calculó mediante la fórmula:



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

- ED<sub>50</sub>: es el log<sub>10</sub> de la dilución de la suspensión viral que consiguió infectar el 50% de las células.
- TU: Unidades transformantes (partículas virales infectivas).
- Vol: volumen del medio de cultivo (ml).

#### 3.9.4. Determinación de la multiplicidad de infección (MOI)

La MOI es la relación entre el n° de partículas infecciosas de virus y el n° de células diana presentes en un cultivo. Se determinó la MOI óptima para cada línea celular realizando un barrido de títulos MOI (3, 5, 10 y 25) en placas de 12 pocillos, tras sembrar un n° adecuado de células según la línea celular. A las 24 h se transducían con los títulos MOIs 3, 5, 10 y 25 de partículas lentivirales pWPI en presencia de polibreno (8 µg/ml). A los 4 días tras la transducción se determinó el % de células fluorescentes que expresaban la EGFP por citometría de flujo.

#### 3.9.5. Transducción de las células diana

Se sembraron las células en placas de 12 pocillos y se transdujeron a las 24 h con los lentivirus recombinantes según la MOI óptima para cada línea celular con o sin polibreno, según la toxicidad del mismo en la línea celular en estudio. A las 24 h se retiró el medio de cultivo y se añadió medio fresco. Cuatro días después de la transducción se determinó el % de células fluorescentes que expresaban la EGFP por citometría de flujo.

En algunos casos se seleccionaron clones de células que expresaban establemente la proteína de interés por el método de dilución límite, que consiste en sembrar una célula en una placa de 96 pocillos para generar un cultivo monoclonal.

### 3.10. Detección de proteínas por Western blot

#### 3.10.1. Obtención de las muestras

##### 3.10.1.1. Lisado de líneas celulares

Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos o en flasks de 25 cm<sup>2</sup>. Al alcanzar confluencia o semi-confluencia las células se despegaron de la placa mediante

tripsinización con tripsina 1x o 2x, dependiendo de la dificultad de cada línea celular para despegarse. Se lavaron con PBS y se incubaron durante 25 min con tampón RIPA suplementado con 1% (v/v) de un cóctel de inhibidores de proteasas. El lisado se centrifugó durante 20 min a máxima velocidad a 4 °C y las alícuotas de sobrenadante se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

#### **3.10.1.2. Obtención de crudos de membrana**

Las células se cultivaron en placas de 10 cm. Cuando se alcanzó la confluencia del 80%, las células se incubaron en solución Hepes 10 mM y se sometieron a ciclos de congelación y descongelación para posteriormente añadir un volumen igual de tampón A 2X (apartado 3.4).

La suspensión se sometió a una centrifugación de 5 min a 1000 x g para eliminar las células enteras. Los crudos de membrana se obtuvieron ultracentrifugando la muestra a 46700 rpm durante 95 min a 16°C. Tras la centrifugación se recogía el sobrenadante (proteínas del citoplasma y el contenido intracelular) y se resuspendía el precipitado (crudos de membrana) en tampón RIPA (apartdo 3.4) suplementado con inhibidores de proteasas (0,1 ml/ millón de células).

#### **3.10.2. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

##### **3.10.2.1. Preparación de los geles**

La electroforesis vertical fue realizada en geles de poliacrilamida del 7,5 % (p/v), en Tris-HCl empleando el sistema *Mini-Protean II Cell*.

##### **3.10.2.2. Preparación de las muestras**

La concentración de proteínas de las muestras a analizar por Western Blot se determinó por el método de Markwell (Markwell MA *et al.*, 1978). En algunos casos, según la proteína de interés, las muestras se desnaturalizaron durante 5 min a 100°C.

##### **3.10.2.3. Condiciones de la electroforesis y de la transferencia**

##### **3.10.2.4. Soluciones utilizadas**

-Tampón de migración: 25 mM Trizma base, 0,2 M glicina, y 3,5 mM SDS.



-Tampón de transferencia: 25 mM Trizma base, 0,2 M glicina, 3,5 mM SDS y 20% (v/v) metanol.

### Condiciones de la electroforesis y de la transferencia

La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta con tampón de migración a una corriente constante de 15 mA para el gel concentrador y de 30 mA para el gel separador o de resolución.

La transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se hizo, a 4°C y en agitación constante, en una cubeta con tampón de transferencia a una corriente de 250 mA durante 90 min.

#### 3.10.3. Inmunodetección

En este proceso, que se realizó a temperatura ambiente, se sometió la membrana al siguiente procedimiento: bloqueo durante 1 h con leche descremada al 5% o 3% (p/v) en TBS-T (TBS con Tween 20 (0,2%) en agitación. Incubación durante 1 h en agitación a temperatura ambiente o a 4°(durante la noche) con el anticuerpo primario correspondiente. Se utilizaron los anticuerpos primarios que se muestran en la tabla MM-14 diluidos en leche descremada a concentraciones de 1% (p/v) en TBS-T.

**Tabla MM-14.** Anticuerpos primarios, utilizados para la detección de las proteínas transportadoras OCT1, OCT3 y la bomba de sodio y potasio (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa), por medio de Western blot.

Anticuerpos	Referencia comercial	Especie de origen	Dilución	Casa comercial
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	ab 2871	ratón	1:200	Abcam
OCT1	ab118539	conejo	1:1000	Abcam
OCT3	ab124826	conejo	1:1000	Abcam
GAPDH	sc-32233	ratón	1:1000	Santa Cruz Biotechnology

Como anticuerpo secundario se utilizó el adecuado en cada caso marcado con peroxidasa (HRP) a una dilución 1:2000 o 1:3000 en leche descremada al 1% (p/v) en TBS-T. Para la detección se utilizó un método de quimioluminiscencia (ECL) y el equipo de análisis de imagen LAS-4000.



### 3.11. Detección de proteínas por inmunofluorescencia

#### 3.11.1. Preparación de muestras

Para el marcaje por inmunofluorescencia se sembraron las células a la densidad óptima según la línea celular, sobre cubres para inmunofluorescencia, en placas de 24 pocillos (Lab-tek) (500 µl de medio de cultivo/pocillo). Las células se cultivaron hasta que alcanzaron una confluencia entre el 60 y el 80%.

En el caso de tejidos, se utilizaron cortes de 5 µm de espesor realizados en el criostato a una temperatura entre -20 °C y -15 °C. Dichos cortes se coloraron en el portaobjeto, se dejaron secar al aire y se mantuvieron congelados a -80 °C hasta su utilización.

#### 3.11.2. Inmunodetección

Las células se fijaron con metanol frío durante 1 min y tras tres breves lavados con PBS, se llevó a cabo un bloqueo de 30 min con suero bovino fetal al 5% en PBS. Se realizó una incubación con los anticuerpos primarios diluidos en PBS con 1% de suero bovino fetal a temperatura ambiente durante 1 h. Los anticuerpos primarios utilizados en este estudio y las diluciones empleadas se muestran en la tabla MM-15.

**Tabla MM-15** Anticuerpos primarios, utilizados para la detección de las proteínas transportadoras OCT1, OCT3 y de la bomba de sodio y potasio (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa) por inmunofluorescencia. La detección de MRP2 por inmunofluorescencia se realizó para corroborar la localización de OCT3 en la membrana sinusoidal/basolateral de los hepatocitos.

Anticuerpos primarios	Referencia	Especie de origen	Dilución	Casa comercial
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	ab2871	ratón	1:100	Abcam
OCT1	LS-C161155	conejo	1:100	LifeSpan BioSciences
OCT3	ab124826	conejo	1:100	Abcam
MRP2	M2III-6	ratón	1:30	Enzo

A continuación, se realizaron tres lavados de 15 min con PBS y posteriormente una incubación en oscuridad de 1 h con el anticuerpo secundario apropiado: anti-IgG de ratón o conejo conjugado con Alexa Fluor-488<sup>®</sup> o Alexa Fluor-594<sup>®</sup> (dilución 1:1000) y con DAPI para teñir los núcleos (dilución 1:5000). Tras tres lavados de 15 min con PBS, se añadió medio de montaje sobre la laminilla, se colocó el cubreobjetos y se selló con esmalte de uñas para evitar así la entrada de aire y posterior secado celular. La visualización del marcaje se realizó en un microscopio confocal (Leica TCS SP2).



### 3.12. Detección de proteínas por inmunohistoquímica

Se realizaron cortes del tejido en parafina de 5  $\mu\text{m}$  de espesor. En primer lugar, se llevó a cabo la eliminación de la parafina calentando en estufa a 60 °C durante al menos 2 h, seguido de inmersión en xilol y, posteriormente, se rehidrataron las muestras por inmersión en soluciones decrecientes de etanol (100% → 95% → 80% → 70% → 50% → H<sub>2</sub>O). A continuación, se llevó a cabo el desenmascaramiento de antígenos por inmersión en solución del kit moure/rabbit AP/falt red (ABC) detection IHC kit (Abcam), pH 6,0 durante 20 min a 96 °C seguido de cuatro lavados con PBS (pH 6,4) e incubación durante 5 min con solución de bloqueo para reducir el marcaje inespecífico. Seguidamente, se llevó a cabo la incubación durante 30 min con los anticuerpos primarios: OCT1 (policlonal de conejo LS-C161155, producido contra la región C-terminal (residuos 510-539), de la casa comercial LifeSpan BioSciences) y OCT3 (anticuerpo producido en conejo Ab124826 de la casa comercial Abcam) diluidos 1:100, seguido de una incubación de 15 min con el anticuerpo secundario biotinilado, 15 min con estreptavidina-fosfatasa alcalina y 10 min con el substrato-cromógeno *Fast-Red* disuelto en tampón de fosfato de naftol. Tras cada una de las etapas anteriores, las muestras se lavaron en tampón *PBS* cuatro veces. Todos los procedimientos se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Las laminillas se tiñeron con hematoxilina y se montaron con medio de montaje acuoso, se sellaron con esmalte de uñas y las tinciones se visualizaron en un microscopio óptico.

### 3.13. Estudios de citometría de flujo

#### 3.13.1. Fundamento

El uso de fluorocromos en citometría de flujo permite evaluar la funcionalidad de proteínas transportadoras, entre las que se incluyen los distintos miembros de la familia *SLC*. Para evaluar la función del transportador OCT3 se utilizó dihidroetidio como sustrato de este transportador (tabla MM-16) que se acumula en el interior de la célula dependiendo de la actividad de este transportador. Para realizar estos estudios, las células se incubaron en presencia del sustrato y como inhibidor de la actividad de OCT3 se utilizó la quinina (tabla MM-16).

Se midió la inhibición de la captación de dihidroetidio por quinina y por compuestos que podrían ser posibles sustratos del transportador OCT3 (tabla MM-17).



**Tabla MM-16.** Sustrato e inhibidor específicos de transportadores OCT1 y OCT3 utilizados en esta tesis doctoral. La quinina fue utilizada a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  o de 250  $\mu\text{M}$  dependiendo del experimento.

Compuesto	Concentración	Canal de detección ( $\lambda$ )
Dihidroetidio	2 $\mu\text{M}$	FL3 (670 nm <i>log pass</i> )
Quinina	10 $\mu\text{M}$ o 250 $\mu\text{M}$	

**Tabla MM-17.** Compuestos utilizados en los experimentos de inhibición de la captación de dihidroetidio y posibles sustratos del transportador OCT3.

Compuesto	Cáncer	Grupo	Casa comercial
<b>TKIs</b>			
Axitinib	Cáncer renal	Inhibidores de tirosina quinasa	Sigma
Bosutinib	Leucemia mieloide crónica	Inhibidores de tirosina quinasa	Sigma
Cabozantinib	cáncer medular de tiroides, cáncer renal, carcinoma hepatocelular	Inhibidores de tirosina quinasa	Selleckchem
Cediranib	Pulmón, riñón, colorectal	Inhibidores de tirosina quinasa	Selleckchem
Dasatinib	Leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda	Inhibidores de tirosina quinasa	Santa Cruz Biotechnology
Erlotinib	Cáncer de pulmón (NSCLC), cáncer de páncreas	Inhibidores de tirosina quinasa	Sigma
Imatinib	Leucemia mieloide crónica, sarcomas	Inhibidores de tirosina quinasa	Sigma
Lapatinib	Mama,	Inhibidor de tirosina quinasa	Sigma
Lenvatinib	Tiroides, riñón, hígado,	Inhibidores de tirosina quinasa	Santa Cruz Biotechnology
Nilotinib	Leucemia mieloide crónica	Inhibidores de tirosina quinasa	Sigma
Pazopanib	Riñón, sarcomas	Inhibidores de tirosina quinasa	Sigma
Ponatinib	Leucemia mieloide crónica, Leucemia infoblástica aguda, cromosoma Filadelfia positivo	Inhibidores de tirosina quinasa	Selleckchem
Regorafenib	Colorrectal, hígado	Inhibidores de tirosina quinasa	Selleckchem
Sorafenib	Hígado, riñón, tiroide,	Inhibidores de tirosina quinasa	Hospital Universitario USAL
Sunitinib	GIST, riñón, tumores neuroendocrinos pancreáticos	Inhibidores de tirosina quinasa	Sigma
Tivozanib	Riñón	Inhibidores de tirosina quinasa	Selleckchem
<b>No TKIs</b>			
5 Fluorouracilo	Mama, colorrectal, estómago, páncreas, esófago, cabeza y cuello	Análogos de purinas y pirimidinas	Sigma
Actinomicina D	Testículo, placenta, sarcomas, pediátricos (Wilms, hepatoblastoma(HB))	Antibióticos antineoplásicos	Sigma
Anastrozol	Mama	Antihormonas	Sigma (EP)
Bicalutamida	Próstata	Antihormonas	Sigma (EP)
Bleomicina	Cabeza y cuello, cérvix, testículo, ovario, linfomas	Antibióticos antineoplásicos	Sigma (EP)



Cabazitaxel	Próstata	Taxanos	Selleckchem
Capecitabina	Mama, colorrectal, estómago, esófago	Análogos de purinas y pirimidinas	Sigma
Ciclofosfamida	Leucemias, linfomas, mama, ovario, neuroblastoma, sarcomas	Agentes alquilantes	Sigma
Cisplatino	Vejiga, ovario, testículo, cérvix, pulmón, páncreas, estómago, cabeza y cuello, CCA, HB	Derivados platinados	Sigma
Citarabina	Leucemias	Análogos de purinas y pirimidinas	Pfizer
Dacarbazina	Melanoma, linfomas	Agentes alquilantes	Sigma
Docetaxel	Mama, pulmón, próstata, cabeza y cuello, estómago	Taxanos	Sigma
Doxorrubicina	Leucemias, mama, linfomas, pulmón, ovario, sarcomas, tiroides, vejiga, estómago, HB	Antracilinas	Sigma
Enzalutamida	Próstata	Antihormonas	Selleckchem
Epirrubicina	Mama	Antracilinas	Sigma
Etopósido	Pulmón, ovario, testículo, linfomas, neuroblastoma, AML	Podofilotoxinas	Sigma
Flutamida	Próstata	Antihormonas	Sigma
Gemcitabina	Mama, pulmón, ovario, páncreas, mesotelioma, cérvix, vejiga, CCA	Análogos de purinas y pirimidinas	Across Organics
Hidroxiurea	Cabeza y cuello, leucemia CML	Carbamidas	Sigma
Irinotecán	Colorrectal, páncreas, estómago, esófago	Camptotecinas	Sigma
Metotrexato	Mama, leucemia AML, placenta, cabeza y cuello, pulmón, vejiga, linfomas	Antifolatos	Sigma
Mitomicina C	Estómago, páncreas	Agentes alquilantes	Roche Diagnostics
Mitoxantrona	Póstata, leucemia AML	Antracilinas	European Pharma
Oxaliplatino	Colorrectal, páncreas	Derivados platinados	Across Organics
Paclitaxel	Pulmón, ovario, mama	Taxanos	Sigma
Panobinostat	Mieloma multiple	Inhibidores de histonas desacetilasas	Selleckchem
Pemetrexed	Mesotelioma, pulmón	Antifolatos	Sigma
SN-38	Colorrectal, páncreas, estómago, esófago	Camptotecinas	Sigma
Sunitinib	GIST, riñón, tumores neuroendocrinos pancreáticos	Inhibidores de tirosina quinasa	Sigma
Tamoxifeno	Mama	Antihormonas	Sigma
Temozolomida	Gliomas	Agentes alquilantes	Sigma
Temsirolimus	Riñón	Inhibidores de mTOR	Sigma
Tioguanina	Leucemia AML	Análogos de purinas y pirimidinas	Sigma
Topotecán	Cérvix, ovario, pulmón	Camptotecinas	Sigma
Vinblastina	Linfomas, vejiga, mama, placenta, testículo	Alcaloides Antimitóticos	Sigma
Vincristina	Linfomas, leucemia CLL y AML, sarcomas, pediátricos (Wilms)	Alcaloides Antimitóticos	Sigma

Cada compuesto se utilizó a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y fueron disueltos en DMSO, excepto, en solución salina: bleomocina, cisplatino, gemcitabina; en  $\text{H}_2\text{O}$ : cabecitabina, ciclofosfamida, hidroxiurea, oxaliplatino, Pemetrexed, Vinblastina; en  $\text{HCl}$ : dacarbazina; en  $\text{NaOH}$ : Tioguanina.



### 3.13.2. Procedimiento

Para procesar las células para los experimentos de citometría, se tripsinizaron, se lavaron con PBS y se resuspendieron en medio de captación. En tubos de citometría se pipetearon 50  $\mu$ l de las células para posteriormente ir añadiendo los compuestos cada 30 segundos a la concentración de 10  $\mu$ M más/menos quinina. Se incubó la suspensión celular a 37°C en oscuridad durante el tiempo determinado para cada experimento, que fueron 15 minutos.

Finalizado el periodo de incubación con los compuestos se paró la reacción añadiendo medio de captación a 4°C y se midió la fluorescencia intracelular en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) utilizando los filtros de emisión indicados en la tabla MM-18. Se determinó el valor de la fluorescencia media de cada una de las muestras analizadas en el citómetro de flujo.

También se utilizó el citómetro de flujo para cuantificar el porcentaje de células positivas para EGFP tras la transducción con lentivirus. Para ello las células se suspendieron en PBS. La fluorescencia se midió utilizando como fuente emisora de luz el láser de argón de  $\lambda = 488$  nm y el detector de emisión FL1 (533/30 nm).

## 3.14. Medida de sorafenib, regorafenib y cabozantinib por HPLC-MS/MS

### 3.14.1. Captación de sorafenib, regorafenib y cabozantinib en células

Tras la siembra de las células y el crecimiento de las mismas, se añadía medio de cultivos con 5  $\mu$ M de los compuestos con o sin quinina a una concentración de 250  $\mu$ M, y las células se incubaban a 37°C durante 1 h. La captación se paraba con medio base frío y los lavados se repetían 4 veces. Para finalizar el experimento, las células se lisaban a 4°C en H<sub>2</sub>O con prednisolona a 5  $\mu$ M y se determinaba el contenido de sorafenib, regorafenib, cabozantinib y lenvatinib en dichos lisados por HPLC-MS/MS.

### 3.14.2. Preparación de muestras para las medidas de captación por HPLC-MS/MS

Para medir el contenido de los compuestos en las células se diluía cada lisado con metanol (1:4), se centrifugaban a 4°C a 20.000 x g durante 10 min. Luego se recogía 100  $\mu$ l de los sobrenadantes para realizar los análisis en el HPLC-MS/MS.



Una vez preparadas las muestras se siguió una modificación del método descrito por Sparidans (Sparidans RW *et al.*, 2009) para la medida de los compuestos por HPLC-MS/MS.

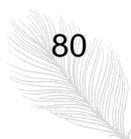
La separación cromatográfica se realizó empleando una columna Zorbax C18 (30 mm x 2,1 mm; 3,5  $\mu$ m) termostaticada a 35°C utilizando como fase móvil una mezcla de metanol:agua (65:35), 5 mM de acetato amónico y 0,1% de ácido fórmico a pH 4,6. El flujo de trabajo fue de 0,3 ml/min y el volumen de inyección fue de 1  $\mu$ l, en todos los casos.

Las condiciones de trabajo para la fuente iónica fueron las siguientes: temperatura del gas ( $N_2$ ) 350°C, flujo del gas 10 litros/minuto, nebulizador 20 psi y capilar 2500 v. La presencia de los compuestos en las muestras fue confirmada usando el modo de trabajo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) siguiendo la transición específica del ion precursor (ion molecular -  $H^+$ ) 465,1 m/z a los iones producto 270 y 252 m/z para el sorafenib, 483 a 287,97 y 269,97 para el regorafenib, 502,3 m/z a 391,1 y 323,1 m/z para el cabozantinib y 427,2 a 369,9 m/z para lenvatinib.

Se construyó una recta patrón mediante inyección de soluciones metanólicas con concentraciones de 0,3 a 40  $\mu$ M de los compuestos. El tiempo de retención para los compuestos fue de 1,15 min.

### **3.15. Estudio clínico retrospectivo para evaluar el papel del OCT3 sobre la respuesta al sorafenib.**

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron remanentes de biopsias de HCC obtenidas con fines diagnósticos de pacientes con HCC en tres centros hospitalarios alemanes; de Würzburg (n=14), de Friburgo (n=20) y de Hannover (n=5), entre los años 2007 y 2015 que formaban parte del estudio TRANSFER (TRANsporter SoraFENib Response). Los datos clínicos y demográficos de los pacientes y las características del tumor se obtuvieron a partir de las historias clínicas (tabla MM-18). Estas biopsias se utilizaron para estudios de caracterización del anticuerpo anti OCT3, medida de expresión del transportador y para estudios de supervivencia.



**Tabla MM-18.** Información demográfica y clínica de los pacientes incluidos en el estudio TRANSFER (el estudio, que se denominó TRANSFER, de las siglas en inglés *TRANsporter SoraFEnib Response*), consistía en el análisis por inmunohistoquímica de OCT3 utilizando anticuerpos específicos en muestras de HCC avanzado y su relación con los datos de respuesta al tratamiento con sorafenib).

<b>Pacientes</b>		
Edad (media $\pm$ EMM)	67,4 $\pm$ 1,6	
Rango de edad	49-87	
Hombres	35	(89,7%)
Mujeres	4	(10,3%)
<b>Pretratamiento con sorafenib</b>		
Ninguno	5	(12,8%)
Resección	7	(18,0%)
TACE	12	(30,8%)
RFA	1	(2,6%)
Resección + TACE	10	(25,6%)
TACE + RFA	2	(5,1%)
Resección + TACE + RFA	2	(5,1%)
<b>Etiología del HCC</b>		
Uso de alcohol	11	(28,2%)
Hepatitis B	4	(10,3%)
Hepatitis C	11	(28,2%)
Hemocromatosis	2	(5,1%)
NAFLD	3	(7,7%)
Desconocido	8	(20,5%)
<b>Clasificación con Child-Pugh</b>		
A	26	(66,6%)
B	7	(18,0%)
Desconocido	6	(15,7%)
<b>BCLC</b>		
A	1	(82,5%)
B	15	(38,5%)
C	16	(41,0%)
Desconocido	7	(18,0%)

BCLC, *Barcelona Clinic Liver Cancer*; NAFLD, esteatosis hepática no alcohólica; RFA, ablación por radiofrecuencia; TACE, quimioembolización por catéter transarterial.



Los criterios de inclusión fueron:

- i) diagnóstico de HCC basado en anatomía patológica o en técnicas de imagen (tomografía computarizada con detectores múltiples y con contraste dinámico o resonancia magnética), según las recomendaciones de la EASL (*European Association for the Study of the Liver*) (EASL-EORTC *clinical practice guidelines*: 2012);
- ii) tratamiento con sorafenib para HCC avanzado con seguimiento de los pacientes (supervivencia y/o respuesta radiológica) durante un tiempo mínimo de 4 semanas;
- iii) intervalo de tiempo entre la adquisición del tejido y el inicio del tratamiento con sorafenib no más de 18 meses;
- iv) función hepática compensada antes del tratamiento (Child-Pugh (CP) Class A o B);
- v) buen estado funcional (PS 0-2); vi) disponibilidad de tejido tumoral parafinado para el análisis histológico.

Los criterios de exclusión fueron:

- i) tumores "mixtos" diagnosticados mediante análisis histológico;
- ii) sin diagnóstico definitivo de HCC;
- iii) quimioterapia sistémica diferente a sorafenib entre la obtención del tejido y el inicio del tratamiento con sorafenib (se permitió la terapia local, como la quimioembolización transarterial);
- iv) descompensación de la función hepática (clase C de CP) antes del inicio del tratamiento con sorafenib; v) estado funcional PS > 2. En los cortes de parafina se analizó la expresión de OCT1 mediante inmunohistoquímica, como se describe en el apartado 3.13.

### 3.16. Tratamiento estadístico

Para la expresión de los resultados se calculó la media y el error estándar de la media (EEM). Para determinar la significancia estadística de las diferencias al comparar dos medias se utilizó el test de la *t* de Student de valores apareados o no apareados, según el caso. Para las comparaciones entre varios grupos se utilizó el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.



## 4. Resultados

#### 4.1. ***Splicing* aberrante del gen *SLC22A1* en enfermedades hepáticas**

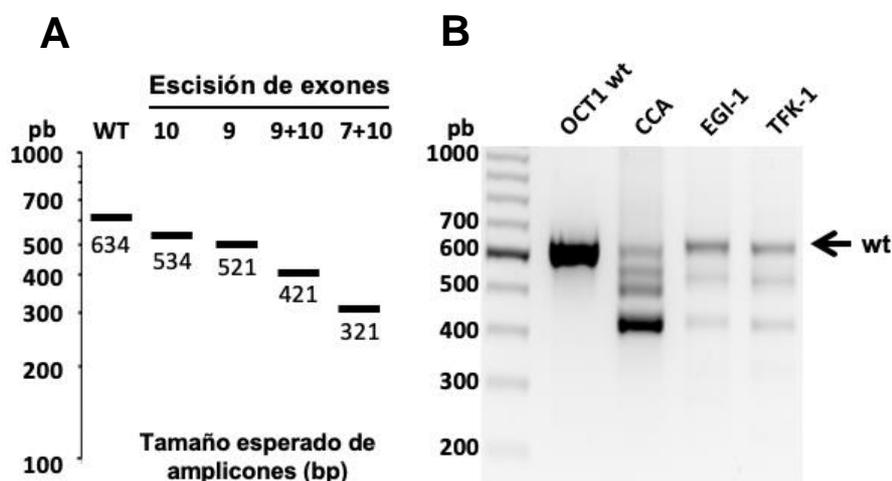
Como se ha comentado en la introducción de esta tesis doctoral la desregulación del *splicing* alternativo subyace en una serie de enfermedades incluido el cáncer. Los datos experimentales respaldan el importante papel de este proceso de regulación epigenética en la hepatocarcinogénesis y en otras hepatopatías. Diversos estudios postulan que el *splicing* alternativo aberrante determina la generación de variantes oncogénicas en cánceres hepáticos, mientras que los supresores tumorales se autoinactivan en dichos procesos tumorales. Por otro lado, las diferentes variantes generadas de un mismo gen pueden mostrar funciones biológicas distintas e incluso antagónicas. En este sentido, el control de la inhibición del *splicing* de variantes oncogénicas y la activación de supresores tumorales pueden ser nuevas estrategias terapéuticas (Liu L *et al.*, 2014).

Entre los genes afectados por la aparición del *splicing* aberrante encontramos el gen *SLC22A1*, que codifica el transportador OCT1, responsable de la captación de una variedad de cationes orgánicos que incluyen algunos fármacos antitumorales utilizados en el tratamiento del HCC. En humanos se han identificado variantes genéticas de OCT1 que afectan a la actividad transportadora. Esto puede ser la causa de las diferencias entre algunos pacientes en la respuesta y sensibilidad a fármacos que son sustratos de este transportador (Jonker JW & Schinkel AH., 2004). Entre los fármacos antitumorales transportados por OCT1 se encuentra el sorafenib (Herraez E *et al.*, 2013), un TKI utilizado en el tratamiento de HCC avanzado. Hay que tener en cuenta que para que el sorafenib ejerza su función antitumoral es imprescindible que entre en las células para alcanzar sus dianas moleculares.

Estudios anteriores realizados en nuestro grupo de investigación ya demostraron que el nivel de expresión de OCT1 es un factor determinante en la captación de sorafenib y en la respuesta antitumoral de pacientes con HCC a este fármaco. Por otro lado, se ha encontrado que la presencia de formas de *splicing* aberrante en HCC puede afectar tanto a la función de OCT1 como a la respuesta al sorafenib (Herraez E *et al.*, 2013) (Al Abdulla R *et al.*, 2019). Los resultados de los estudios en los que se midió el nivel de expresión de OCT1 total y de la forma silvestre en HCC y el tejido adyacente no tumoral, mostraron una disminución en la expresión del OCT1 total en el tejido tumoral comparada con la expresión en el tejido no tumoral. La forma silvestre del transportador presentó una expresión reducida en el tejido adyacente no tumoral comparada con la expresión en el hígado sano (Al Abdulla R *et al.*, 2019).



Cuando se llevó a cabo un estudio para identificar los posibles productos de *splicing* de OCT1 en biopsias de colangiocarcinoma (CCA) y en dos líneas celulares de CCA (EGI-1 y TFK-1) se encontraron resultados muy interesantes. Para ello se realizó una PCR analítica utilizando *primers* que amplificaban desde el exón 6 hasta el exón 11 (tamaño del amplicón 634 pb). El resultado de este estudio se representa en la figura R-1. En la figura R-1A se representa el patrón de escisión de exones de OCT1 esperado. En la figura R-1B se observa la amplificación de un producto de 634 pb en la muestra control, correspondiente a la forma salvaje de OCT1, y la presencia 4 amplicones en la muestra CCA (634, 534, 521 y 421 pb) y 3 amplicones en las de las líneas celulares EGI-1 y TFK-1 (634, 534 y 421 pb).

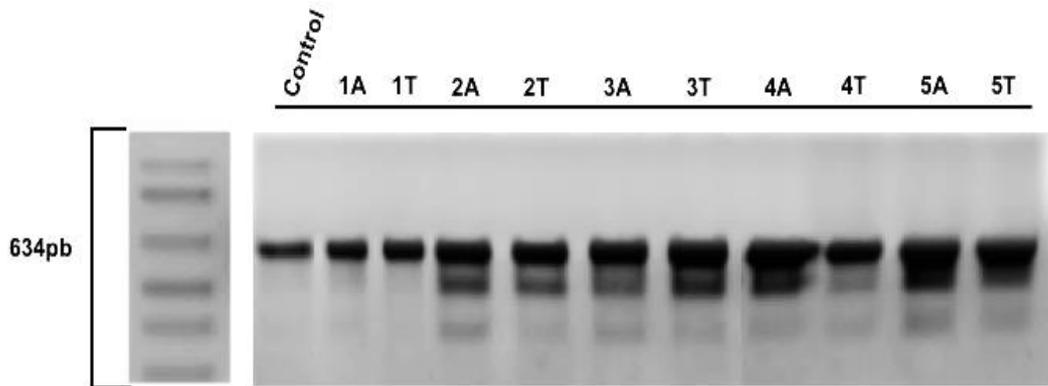


**Figura R-1.** Imagen representativa del tamaño teórico de las bandas correspondientes a la forma silvestre (WT 634 pb) y las correspondientes a las formas de *splicing* esperado (534, 521, 421 y 321 pb) de OCT1 (A). En B se muestra el patrón de bandas obtenidas para OCT1 en una muestra de una biopsia de CCA y en las líneas celulares de CCA (EGI-1 y TFK1). Como control positivo se utilizó un plásmido de OCT1 wt (Tomado de Al Abdulla R *et al.*, 2019).

En esta tesis doctoral nos planteamos el objetivo de seguir la progresión del tejido sano al cirrótico y al tumoral para poder determinar en que etapa aparece el *splicing* aberrante de OCT1, considerando que ocurra antes del desarrollo del HCC.

Comenzamos estudiando el *splicing* de OCT1 en tejido de HCC (T) y en el tejido adyacente no tumoral (A) para lo que se realizó una PCR analítica utilizando los *primers* que amplificaban desde el exón 6 hasta el exón 11 de *SLC22A1* (amplicón de 634 pb). Los fragmentos amplificados en ambos tipos de tejido se visualizaron en un gel de agarosa, como se muestra en la figura R-2. Se puede observar la aparición de amplicones de diferente intensidad localizados por debajo de la banda de 634 pb (WT),

correspondientes a formas de *splicing* probablemente aberrante de OCT1 en HCC y en la mayoría del tejido adyacente no tumoral (521 y 421 pb) (figura R-2).



**Figura R-2.** Gel de agarosa con los productos de PCR analítica del gen *SLC22A1* realizada en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) donde se observa la banda correspondiente de la forma *wild type* (634 pb) y amplicones de menor tamaño (534 y 421 pb) que sugieren eventos de *splicing* aberrante.

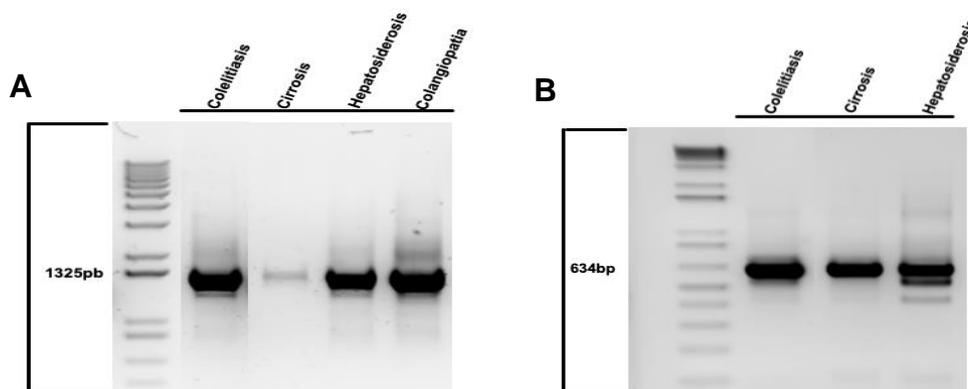
La confirmación de la presencia de eventos de *splicing* aberrante en etapas pretumorales de HCC nos llevó a investigar la presencia de *splicing* alternativo en el gen *SLC22A1* en patologías hepáticas no tumorales.

Las patologías estudiadas en esta tesis doctoral son patologías que favorecen el desarrollo del carcinoma hepatocelular, como son: i) colestiasis (Stinton & Shaffer, 2012); ii) cirrosis (Tsochatzsis *et al.*, 2014); iii) hepatosiderosis (Paisant A *et al.*, 2017) y iv) la colangiopatía autoinmune (Cursio R & Gugenheim J, 2012).

En primer lugar se realizó un ensayo de PCR analítica con el cADN de las diferentes muestras y con *primers* específicos (*primers* 1085) que iban desde el exón 1 hasta el exón 11 (amplicón de 1325 pb) y con los *primers* 634 (del exón 6 hasta el exón 11, amplicón 634 pb) seguido por una electroforesis en gel de agarosa para analizar la presencia de las bandas atribuibles a *splicing* alternativo en el ARNm del transportador OCT1.

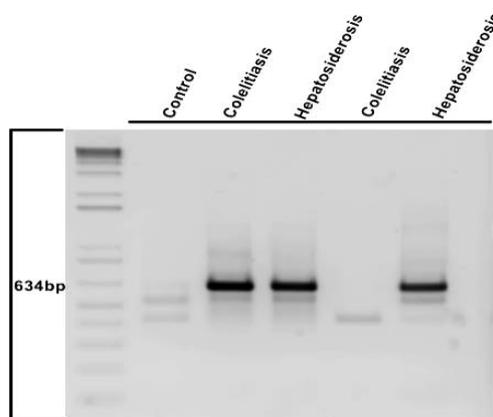
En el gel que se representa en la figura R-3 se puede observar una banda muy marcada y repetitiva (1325 pb [A] y 634 pb [B]) representativa de la forma silvestre. En la figura R-3B se pueden observar, en el carril correspondiente a la muestra de hepatosiderosis, otras dos bandas de menor tamaño que, según estudios anteriores de nuestro grupo, podrían representar la escisión del exón 10 (banda en 534 pb), del exón 9 (banda 521 pb), y la escisión de los exones 9+10 (banda 421 pb) (Herraez E *et al.*, 2013).





**Figura R-3.** Gel de agarosa con los productos de PCR analítica del gen *SLC22A1* realizada en muestras de diversas patologías hepáticas no tumorales. (A) Resultados obtenidos con los *primers* que van desde el exón 1 hasta el exón 11. (B) Resultados obtenidos con los *primers* que van desde el exón 6 hasta el exón 11.

Para confirmar estos hallazgos se realizaron otros ensayos de PCR analítica en muestras de dos patologías hepáticas no tumorales. Se observa que las muestras de hepatosiderosis presentan 3 bandas (de tamaños 634 [wt], 534 o 521 y 421 pb) que sugieren eventos de *splicing* alternativo por escisión de exones 9 o 10 y 9+10 (figura R-4). El mismo patrón de bandas se visualiza en la muestra de hígado de un paciente con colelitiásis. Estos resultados permiten sugerir que en algunas patologías hepáticas no tumorales ocurren eventos de *splicing* alternativo temprano antes del eventual desarrollo de HCC.



**Figura R-4.** Gel de electroforesis con muestras de patologías hepáticas no tumorales (colelitiásis y hepatosiderosis) utilizando los *primers* 634.

#### 4.2. Relación entre los cambios de la maquinaria de reconocer exones y el *splicing* alternativo en HCC

Según lo referido en el apartado de introducción, el *splicing* se lleva a cabo mediante un complejo macromolecular nominado el espliceosoma que cataliza un proceso dinámico de múltiples etapas que incluye alrededor de 300 proteínas con diversas funciones. El

espliceosoma mayor es el complejo responsable del reconocimiento y la eliminación de la mayoría de los intrones en los genes humanos.

Los eventos de *splicing* alternativo ocurren en diferentes tipos de cáncer y en concreto en el HCC pueden ser utilizados como marcadores de diagnóstico o pronóstico (Wu P *et al.*, 2019). Estos eventos de *splicing* alternativo encontrados en HCC pueden afectar a la función de la proteína OCT1 en lo concerniente a la respuesta al sorafenib (Herraez E *et al.*, 2013).

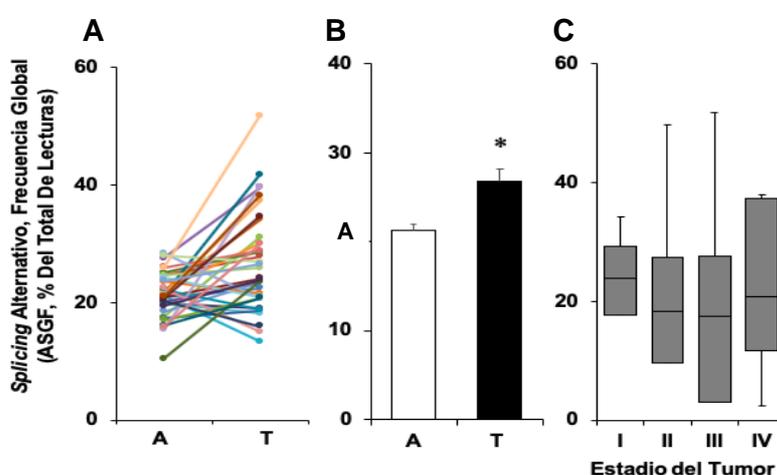
Por ello, se planteó como segundo objetivo de esta tesis doctoral la determinación de la relación entre la expresión de formas de *splicing* alternativo de *SLC22A1* y la expresión de los genes implicados en la maquinaria de reconocimiento exónico.

Para llevar a cabo este objetivo se realizaron estudios *in silico* con los datos disponibles en diferentes bases de datos sobre la expresión de las proteínas implicadas en el *splicing* en HCC, tanto las que componen los complejos del espliceosoma, como las reguladoras del proceso. Se utilizaron datos de muestras pareadas de HCC (tumoral y tejido adyacente no tumoral) disponibles en el TCGA (n=50) y se confirmaron los cambios observados utilizando la información de otras DB, como la HCCDB. Además del estudio sobre las modificaciones en la expresión de las mencionadas proteínas en el HCC, se realizó una evaluación de la correlación entre la expresión de las mismas y el porcentaje de *splicing* alternativo del ARNm de OCT1. La cuantificación del *splicing* se llevó a cabo utilizando los datos disponibles en el recurso on-line SpliceSeq. Por último, se evaluó si la expresión de estas proteínas afectaba la supervivencia de pacientes con HCC utilizando los datos disponibles en HCCDB. Los resultados del estudio *in silico* se confirmaron en una cohorte de muestras pareadas de HCC (n=6) y en tres líneas celulares de HCC (Huh7, HepG2, y Alexander) mediante RT-qPCR y, por último, se validaron en otra cohorte con mayor número de muestras pareadas de HCC y el tejido adyacente no tumoral (n=25) mediante ensayos realizados con TLDAs, como se describe en el apartado 3.6.3 de Material y Métodos.

Como se ha recogido en la introducción, el *splicing* normal del pre-ARNm de *SLC22A1* conduce a la formación de ARNm maduro constituido por 11 exones; sin embargo, se han descrito siete posibles eventos de *splicing* alternativo durante el proceso de maduración de este pre-ARNm. En esta tesis doctoral se han considerado los eventos de *splicing* de *SLCA221* por los valores de PSI, definido como la probabilidad de que



aparezcan eventos de *splicing* y calculada a partir de la probabilidad de que cada uno de los exones estén incluidos en la secuencia final del ARNm maduro, según datos disponibles en la DB SpliceSeq. En primer lugar, se realizó un análisis *in silico* para determinar el porcentaje de *splicing*, representado como la frecuencia global de *splicing* alternativo (ASGF) en las muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) (n=50). Este análisis indicó que el porcentaje de moléculas de ARNm de *SLC22A1* afectadas por *splicing* alternativo fue significativamente más elevado en el tumor (T) que en el tejido adyacente no tumoral (A) (figura R-5A y B). Al analizar el porcentaje de *splicing* alternativo en HCC en el desarrollo tumoral durante los distintos estadios del tumor (estadio I n=167, estadio II n=113, estadio III n=86, y estadio IV n=5) no se encontraron diferencias significativas entre ellos (Figura R-5C).



**Figura R-5.** Análisis *in silico* que representa el porcentaje de moléculas de ARNm de *SLC22A1* afectadas por *splicing* alternativo analizando datos de muestras pareadas de HCC (T) y tejido adyacente no tumoral (A) (n=50), (A y B). Los datos se presentan como frecuencia global de *splicing* alternativo (ASGF) en muestras individuales (A) o como promedio de ASGF (B). Cantidad de *splicing* alternativo en las diferentes etapas del desarrollo tumoral (C) (\*, p<0.05).

A continuación, se realizó otro estudio *in silico*, para calcular el nivel de expresión de las proteínas que juegan un papel importante en el *splicing* alternativo, por estar implicadas en la formación de los complejos E y B del espliceosoma o por ser proteínas reguladoras de la actividad del espliceosoma (proteínas SR, hnRNP, quinasas y fosfatasa).

#### 4.2.1. El complejo E

##### 4.2.1.1. Elementos U1

El complejo E es el primer precursor del espliceosoma, en donde se definen el sitio de *splicing* 5' (5'SS) y el sitio de ramificación (BP). Los sitios se definen por medio de la ribonucleoproteína nuclear pequeña U1 (snRNPU1), que se une al 5'SS, y mediante el reconocimiento del sitio BP por la proteína de unión al punto de ramificación (BBP)

(Larson JD & Hoskins AA., 2017). En la tabla R-1 se recoge un resumen de estas proteínas, los cambios en su expresión génica en HCC, su correlación con el *splicing* del pre-ARNm de OCT1 y su relación con la supervivencia de los pacientes.

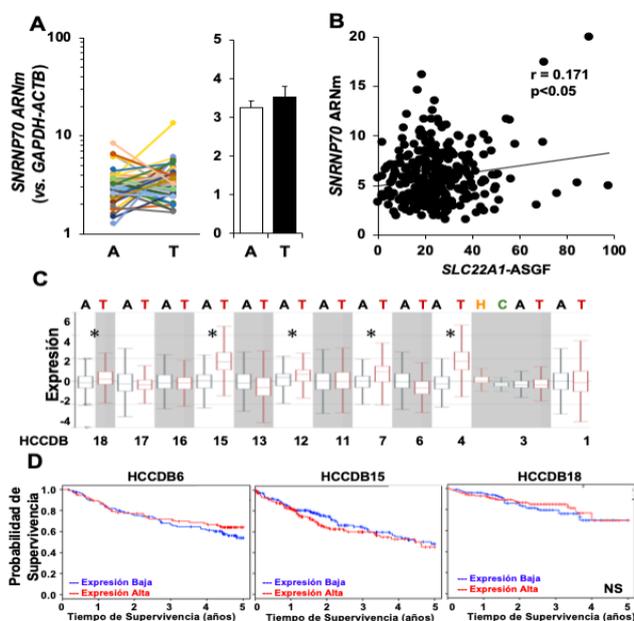
**Tabla R-1.** Análisis *in silico* utilizando datos del TCGA sobre cambios de expresión de genes del complejo E del espliceosoma, así como el valor de prognosis clínica (DB de HCCDB) y correlación con el *splicing* del gen SLC22A1 (SpliceSeq).

Función	Proteína	Gen	Cambios en la expresión	Correlación con SLC22A1-ASGF	Valor pronóstico	Ensamblaje	AN
Elementos U1	U1 snRNP 70kDA	<i>SNRNP70</i>	Ninguno	Si	No	<i>ENSG00000104852</i>	<i>NM_003089.5</i>
	U1A snRNP	<i>SNRPA</i>	Sube	Si	No	<i>ENSG00000077312</i>	<i>NM_004596.4</i>
	U1C snRNP	<i>SNRPC</i>	Sube	No	No	<i>ENSG00000124562</i>	<i>NM_003093.2</i>
Proteínas Sm Unión a BPS	sm-B/B1	<i>SNRPB</i>	Sube	Si	Si	<i>ENSG00000125835</i>	<i>NM_003091.3</i>
	sm-D1	<i>SNRPD1</i>	Sube	No	Si	<i>ENSG00000167088</i>	<i>NM_006938.3</i>
	sm-E	<i>SNRPE</i>	Sube	No	No	<i>ENSG00000182004</i>	<i>NM_003094.3</i>
	sm-F	<i>SNRPF</i>	Ninguno	No	No	<i>ENSG00000139343</i>	<i>NM_003095.2</i>
	sm-G	<i>SNRPG</i>	Ninguno	No	Si	<i>ENSG00000143977</i>	<i>NM_003096.3</i>
	sm-N	<i>SNRPN</i>	Ninguno	Si	No	<i>ENSG00000128739</i>	<i>NM_003097.5</i>
	Sf1	<i>SF1</i>	Baja	Si	No	<i>ENSG00000168066</i>	<i>NM_004630.3</i>
	Unión a 3'SS	U2af1	<i>U2AF1</i>	Baja	Si	No	<i>ENSG00000160201</i>
Unión a PPT	U2af2	<i>U2AF2</i>	Ninguno	si	No	<i>ENSG00000063244</i>	<i>NM_007279.2</i>

El análisis de las muestras pareadas de HCC y el tejido adyacente no tumoral en la base de datos del TCGA (n=50), indicaron cambios significativos en la expresión de algunos de los genes que forman el elemento U1 del espliceosoma. El gen *SNRNP70* que codifica la proteína snRNPU1 es importante para el reconocimiento del 5'SS en el pre-ARNm y para el posterior ensamblaje del espliceosoma (Pomeranz Krummel DA *et al.*, 2009). Analizando los datos pareados del TCGA se observó que no había diferencias significativas en la expresión de este gen en HCC y en el tejido adyacente (figura R-6A). La expresión de *SNRNP70* se correlacionó significativamente con ASGF de *SLC22A1* (figura R-6B). El nivel de expresión de *SNRNP70* en el tejido tumoral se encontró elevada en cinco de las DB incluidas en el HCCDB, no alterada significativamente en otras cinco y con una tendencia a baja expresión en dos de ellas, (DB17 en tejido

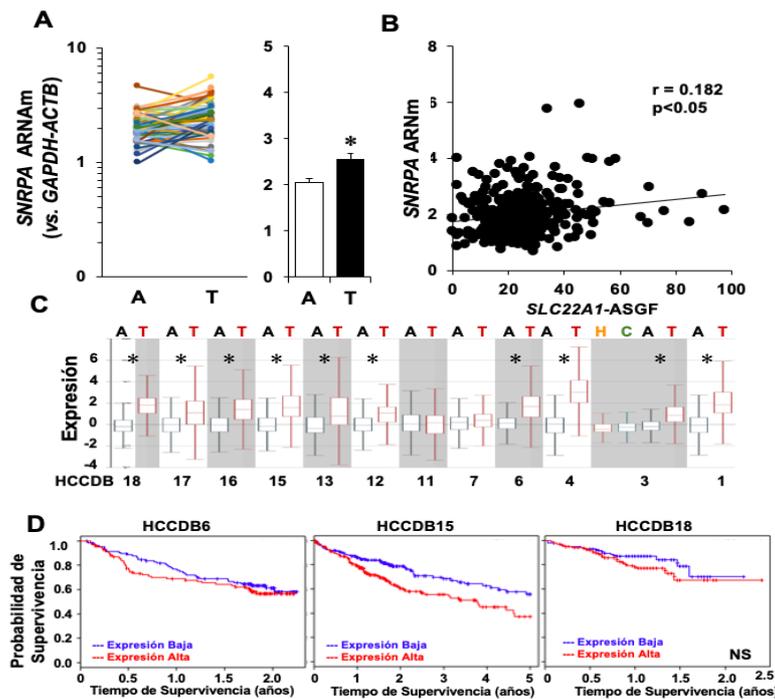


tumoral y DB3 en tejido cirrótico) (figura R-6C). Un dato interesante es que se observa una baja expresión del gen *SNRNP70* en el tejido cirrótico, lo que permite sugerir que la elevación en la expresión no comienza en el tejido cirrótico sino en el tejido tumoral. El análisis de la relación con la supervivencia no mostró diferencias significativas entre los pacientes con tumores con alta y baja expresión de *SNRNP70* (figura R-6D).



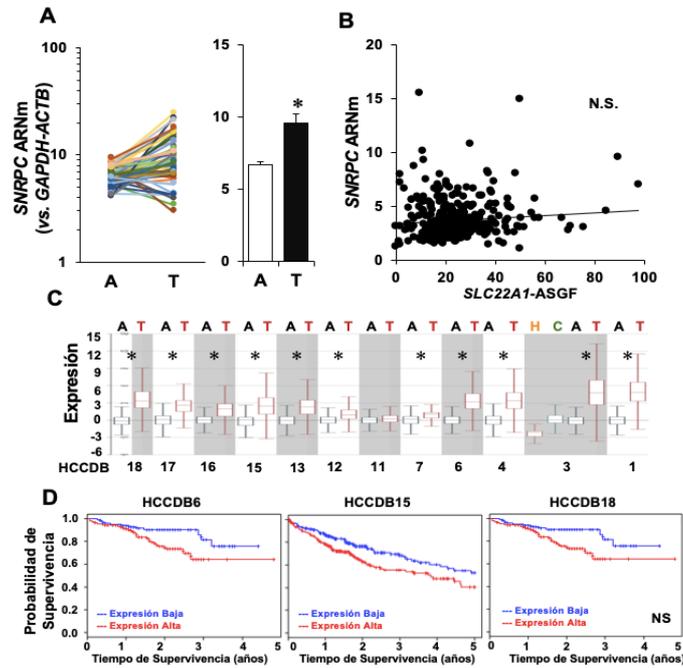
**Figura R-6.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SNRNP70* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) utilizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SNRNP70* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SNRNP70* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

Respecto a la expresión del gen *SNRPA*, que codifica snRNPU1A que se une al 5'SS de pre-ARNm y es requerida para el *splicing*, hubo un consenso casi general entre diferentes DB del HCCDB. En el análisis pareado el gen *SNRPA* estaba sobreexpresado (figura R-7A). También se vio sobreexpresión de este gen en diez DB, mientras que no se describió ningún cambio en dos DB (DB7 y DB11) (figura R-7C). Además, se observó una correlación entre la expresión de este gen y *SLC22A1-ASGF* (figura R-7B), aunque los niveles de expresión de *SNRPA* no tuvieron impacto en la supervivencia de los pacientes con HCC (figura R-7C)



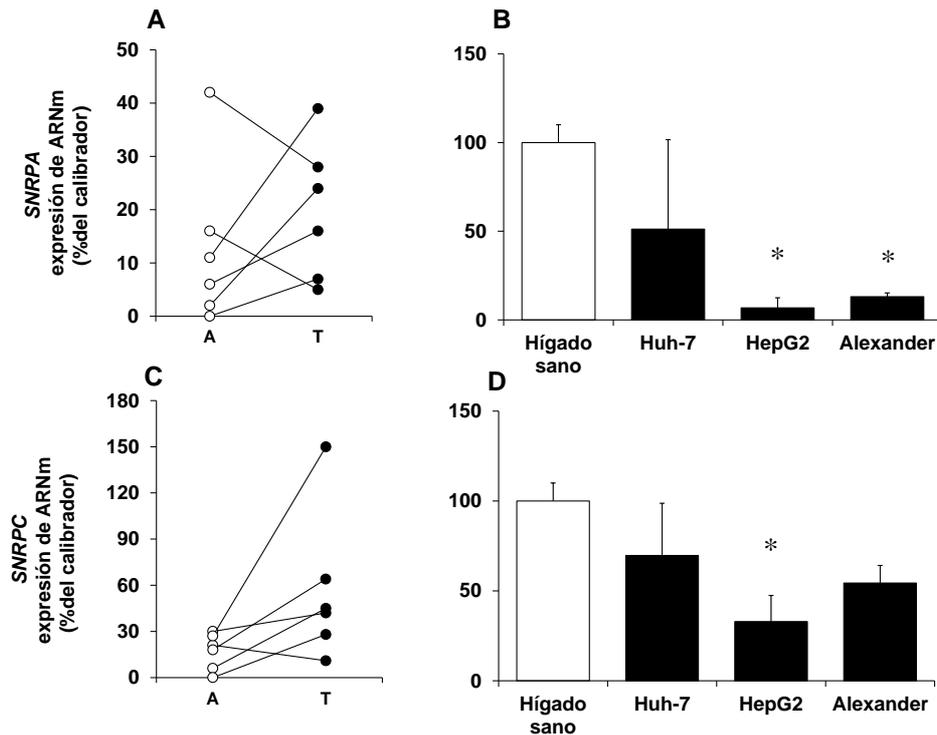
**Figura R-7.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SNRPA* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) utilizando los datos del TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SNRPA* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SNRPA* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

Resultados similares se encontraron para *SNRPC* que estaba sobreexpresado en HCC en todas las DB excepto en una (DB11) (figura R-8C). El análisis de los tejidos pareados T y A del TCGA confirmó la elevada expresión de *SNRPC* en el tejido tumoral frente al tejido adyacente (figura R-8A). No se encontró una correlación entre la expresión de *SNRPC* y *SLC22A1-ASGF* (figura R-8B). Con respecto a su relación con la supervivencia, aunque se observó una tendencia a un tiempo de supervivencia más corto en pacientes con una mayor expresión de *SNRPC* en el tumor; la diferencia no fue estadísticamente significativa (figura R-8D).



**Figura R-8.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SNRPC* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) utilizando los datos del TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SNRPC* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SNRPC* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

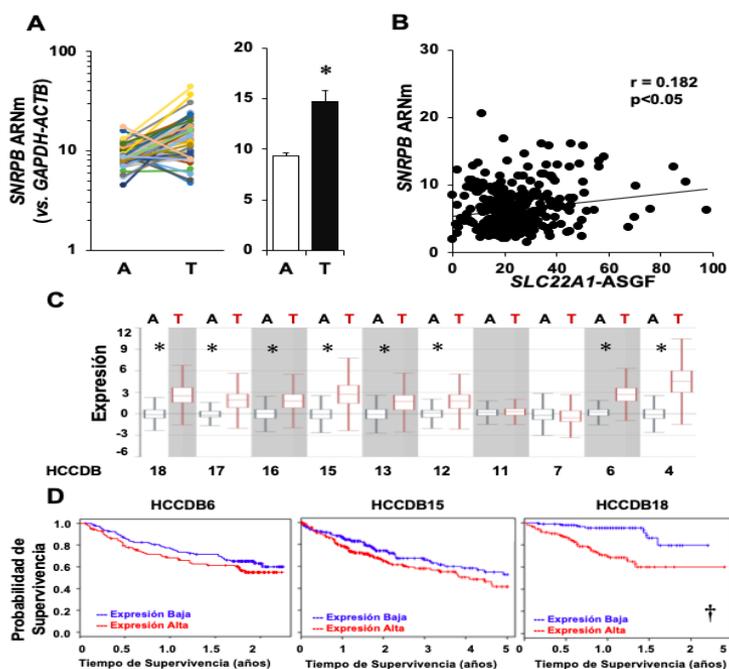
Para confirmar la elevada expresión de *SNRPA* y *SNRPC* observada en los estudios *in silico*, se midió la expresión de estos genes mediante RT-qPCR en muestras pareadas de una cohorte de seis pacientes con HCC y en tres líneas celulares de HCC. Para el gen *SNRPA* se vio un aumento en el nivel de expresión en cuatro muestras pareadas de A y T (figura R-9A). Sin embargo, se observaron cambios en el nivel de expresión en las tres líneas celulares de HCC, que fueron significativos para las HepG2 y Alexander (figura R-9B). El gen *SNRPC* mostró un aumento en su expresión en HCC en comparación con el tejido adyacente no tumoral (figura R-9C), pero se observó una disminución significativa en la expresión de *SNRPC* en las líneas celulares de HCC, que solo fue significativa en el caso de las células HepG2 (figura R-9D).



**Figura R-9.** Expresión de los genes *SNRPA* (A y B) y *SNRPC* (C y D) de la maquinaria de *splicing* medida por RT-qPCR en muestras pareadas (n=6) de HCC y el tejido adyacente no tumoral (A y C) y en tres líneas celulares de HCC (B y D) (\*,  $p < 0.05$ ).

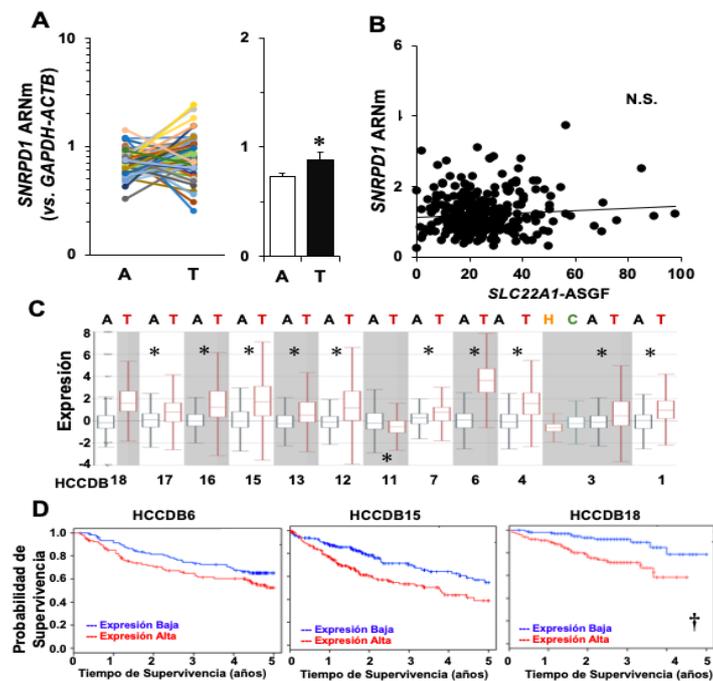
#### 4.2.1.2. Proteínas Sm

El análisis de las seis proteínas Sm implicadas en el complejo E (tabla R-1) reveló que los cambios más significativos se encontraron en la proteína Sm-B/B1 (*SNRPB*), cuya expresión está elevada en HCC en comparación con el tejido adyacente no tumoral, siendo la expresión alta en ambos tejidos (figura R-10A). Además, se encontró una correlación entre la expresión de *SNRPB* y el *splicing* de OCT1 medido por *SLC22A1-ASGF* (figura R-10B). Los datos sobre este gen estaban disponibles en diez DB de HCCDB. Entre ellas, en ocho DB el nivel de ARNm de *SNRPB* fue significativamente mayor en el tumor que en el tejido adyacente y no mostraba cambios en las otras dos DB (DB11 y DB17) (figura R-10C). También se vio una relación significativa entre la alta expresión de *SNRPB* y una menor supervivencia de los pacientes con HCC (figura R-10D).



**Figura R-10.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SNRPB* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) utilizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SNRPB* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SNRPB* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando T con A, †  $P < 0.05$  valor pronóstico de la supervivencia con expresión alta o baja).

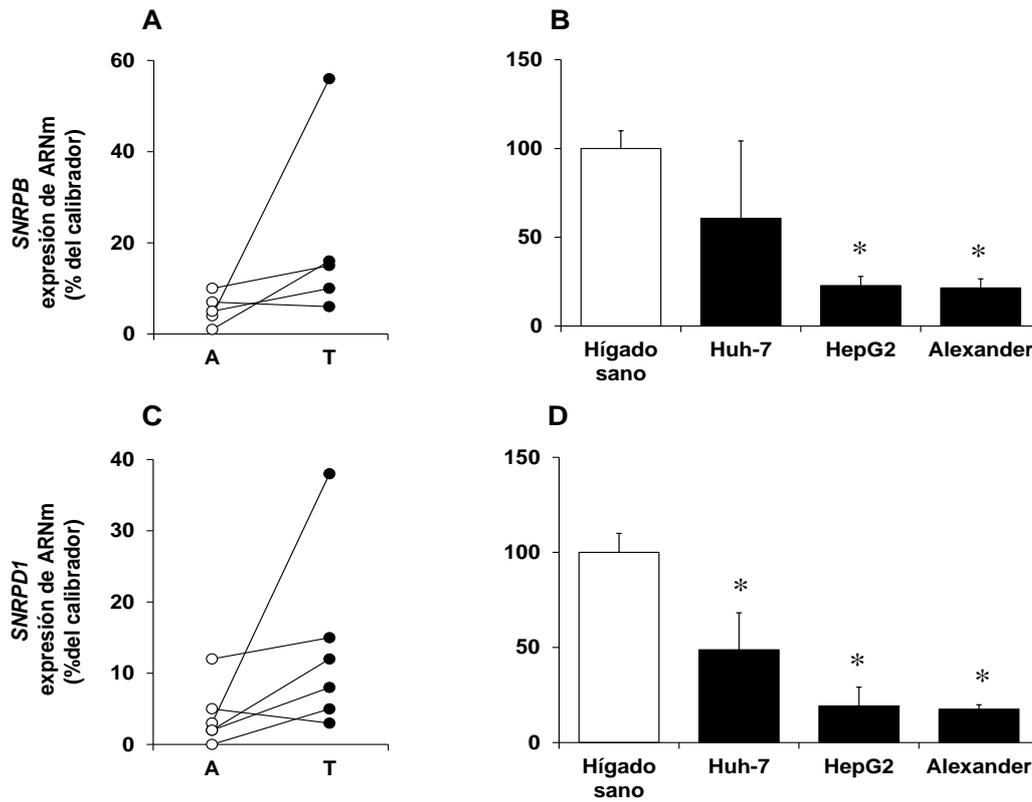
En lo que respecta a los niveles de expresión de *SNRPD1*, estos fueron diez veces más bajos que los de *SNRPB* (figura R-10). Sin embargo, el análisis de los datos de los pareados T y A del TCGA mostró una expresión de *SNRPD1* ligeramente mayor en los tumores que en el tejido adyacente (figura R-11A). No se encontró correlación entre la expresión *SNRPD1* y *SLC22A1-ASGF* (figura R-11B). Por otro lado, en todas las DB del HCCDB incluidas en el presente estudio, excepto una (DB11), se encontró una sobreexpresión de *SNRPD1* (figura R-11C). También se observó una relación significativa entre una mayor expresión de *SNRPD1* y una peor evolución de los pacientes con HCC (figura 11D).



**Figura R-11.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SNRPD1* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) utilizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SNRPD1* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SNRPD1* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando T con A, †  $P < 0.05$  valor pronóstico de la supervivencia con expresión alta o baja).

Debido a que el aumento de expresión de los genes *SNRPB* y *SNRPD1* está asociado con peor supervivencia de los pacientes, se decidió investigar experimentalmente la existencia de estos cambios en la cohorte pareada de seis muestras de HCC y en tres líneas celulares de HCC. En ambos casos se observó un aumento en la expresión de estos genes en las muestras de HCC en comparación con el tejido adyacente no tumoral (figura R-12, A y C). Este cambio no se observó en las líneas celulares de HCC que presentaron expresión disminuida de *SNRPB* en todas las células, siendo significativo el cambio en las células HepG2 y Alexander y en las tres líneas celulares para *SNRPD1* (figura R-12, B y D).

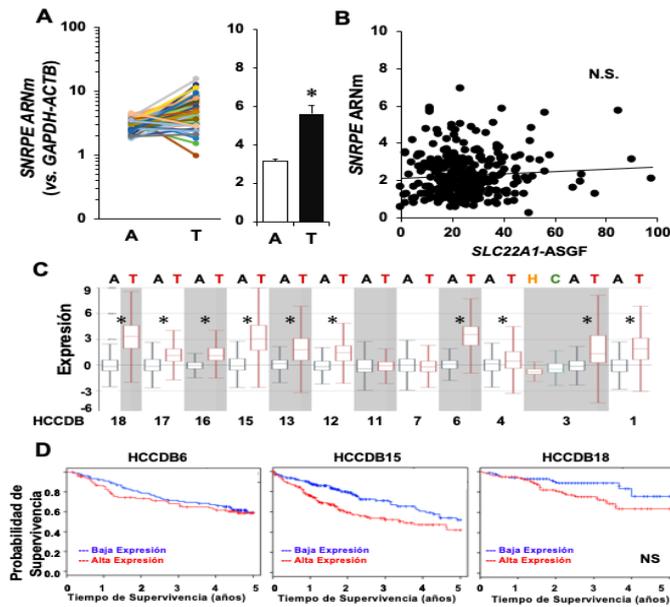
La expresión de *SNRPE* se encontró elevada en el tejido tumoral frente al tejido adyacente no tumoral (figura R-13A). Sin embargo, no hubo relación entre su expresión y el valor de *SLC22A1-ASGF* (figura R-13B). Excepto en dos DB del HCCDB en las que no se observaron cambios (DB7 y DB11), *SNRPE* se encontró aumentado en HCC (figura R-13C). No se encontró un valor pronóstico significativo para este gen (figura R-13D).



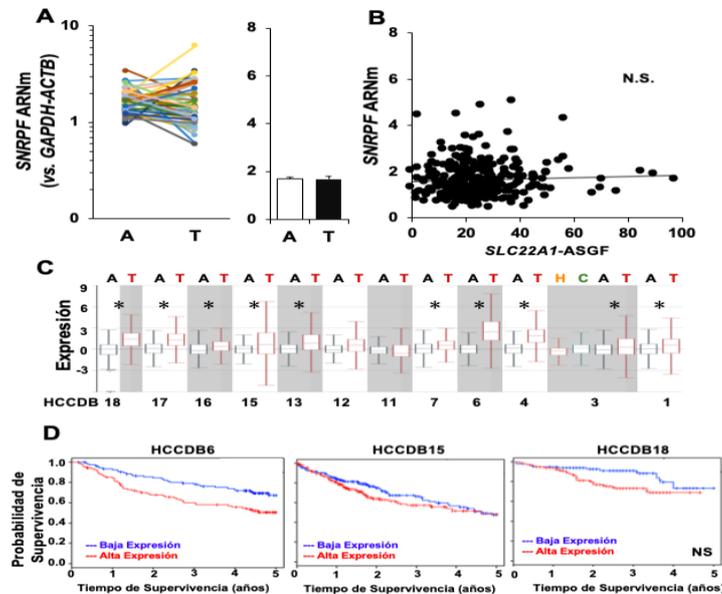
**Figura R-12.** Expresión de los genes *SNRPB* (A y B) y *SNRPD1* (C y D) de la maquinaria de *splicing*, medida por RT-qPCR en muestras pareadas (n=6) de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) (A y C) y en líneas celulares de HCC (B y D) (\*,  $p < 0.05$ ).

La expresión de otros genes que codifican proteínas Sm, como *SNRPF*, *SNRPG* y *SNRPN* en HCC fue baja, pero sin diferencias significativas en el TCGA entre el tejido tumoral y el tejido adyacente no tumoral (figuras R-14A, R-15A y R-16A). Solo la expresión de *SNRPN* mostró correlación con *SLC22A1-ASGF* (figura R-16B). Aunque se encontró que *SNRPF* y *SNRPG* estaban sobreexpresados en la mayoría de las DB del HCCDB (figura R-14C y R-15C), se observaron algunas discrepancias con respecto a la expresión de *SNRPN*, que mostró resultados heterogéneos, ya que en algunas DB se encontró un aumento en la expresión y en otras una disminución (DB1, DB3, DB13 y DB16), no habiendo cambios significativos en otra DB (DB3) (figura R-16C). Ni *SNRPF* (figura R-14D) ni *SNRPN* (figura R-16D) se asociaron con la supervivencia de los pacientes con HCC, mientras que una mayor expresión de *SNRPG* se asoció de manera significativa con una peor evolución (figura R-15D).

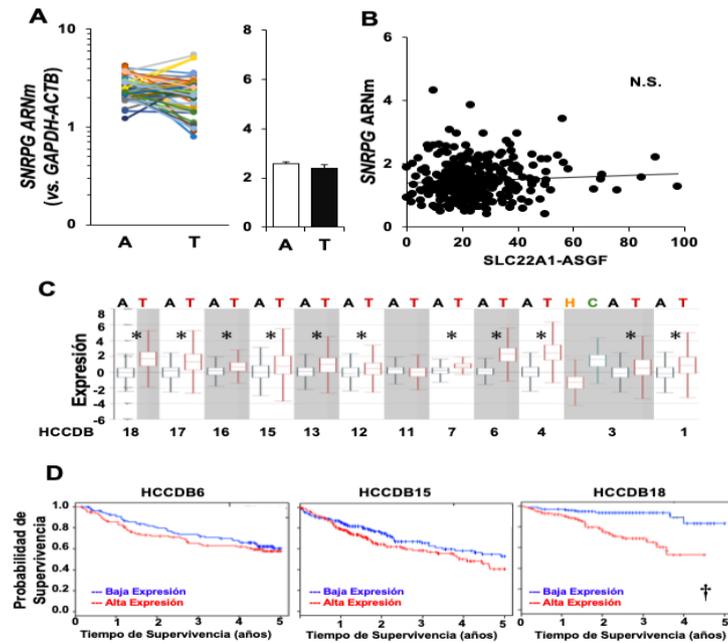




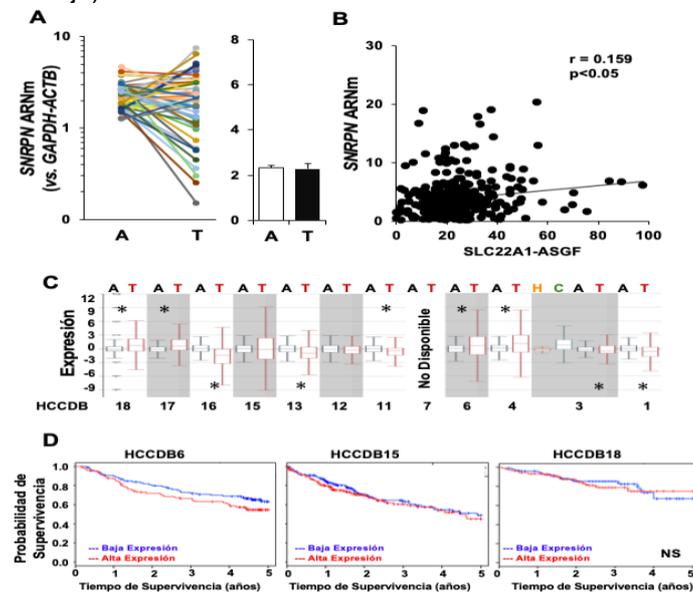
**Figura R-13.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SNRPE* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) utilizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SNRPE* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SNRPE* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).



**Figura R-14.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SNRPF* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) utilizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SNRPF* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SNRPF* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).



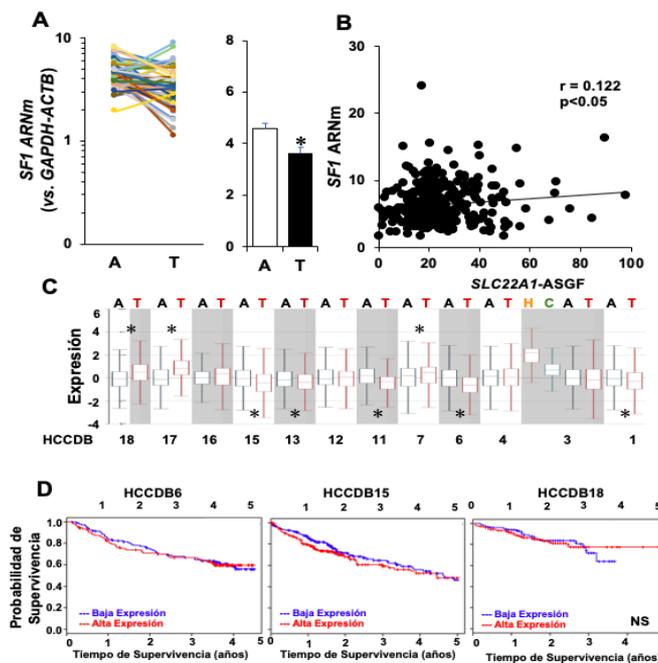
**Figura R-15.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SNRPG* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) utilizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SNRPG* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SNRPG* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando T con A, †  $P < 0.05$  valor pronóstico de la supervivencia con expresión alta o baja).



**Figura R-16.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SNRPN* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SNRPN* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SNRPN* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

#### 4.2.1.3. Factores de reconocimiento de exones del complejo E

El análisis de los datos del TCGA de tres genes involucrados en el reconocimiento de exones durante el *splicing*: *SF1*, *U2AF1* y *U2AF2* reveló que la expresión de *SF1* fue menor en HCC que en el tejido adyacente tumoral (figura R-17A). Los datos de HCCDB fueron heterogéneos, ya que se encontró un aumento moderado en la expresión de *SF1* en tejido tumoral en tres DB (DB7, DB17 y DB18), mientras que hubo una disminución en la expresión del mismo en cinco DB (DB1, DB6, DB11, DB13 y DB15) (figura R-17C). Sin embargo, se encontró correlación entre la expresión del gen *SF1* y *SLC22A1-ASGF* (figura R-17B), pero no entre el nivel de expresión y la supervivencia de los pacientes con HCC (figura R-17D).

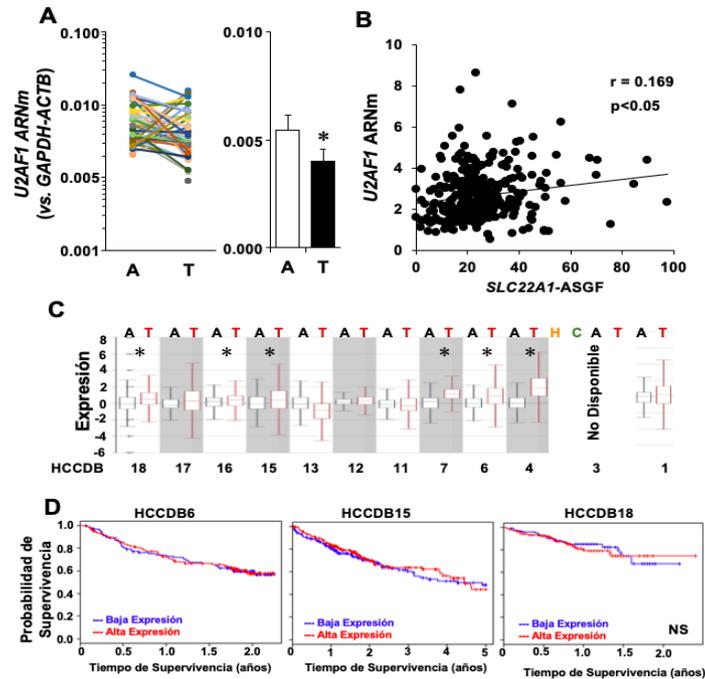


**Figura R-17.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SF1* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SF1* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SF1* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

El análisis de las muestras de HCC pareadas T y A disponibles en el TCGA reveló una expresión reducida de *U2AF1* en HCC (figura R-18A) y correlación de la expresión con *SLC22A1-ASGF* (figura R-18B). Sin embargo, en HCCDB su expresión fue elevada en seis DB, excepto en la DB13, donde se observó una expresión reducida de *U2AF1* en HCC, mientras que las otras tres DB (DB1, DB11, DB12) no mostraron variaciones

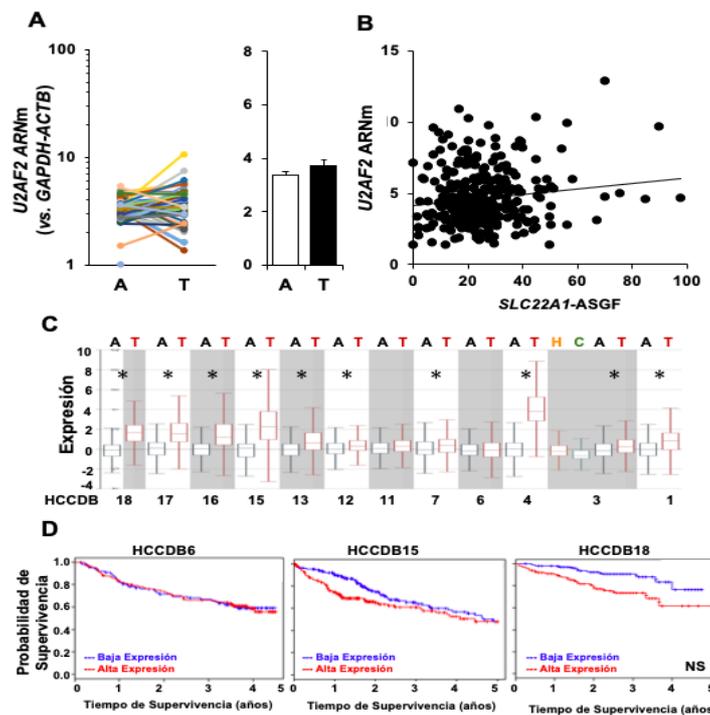


significativas en expresión (figura R-18C). La expresión de *U2AF1* no se asoció con la evolución de los pacientes con HCC (figura R-18D).



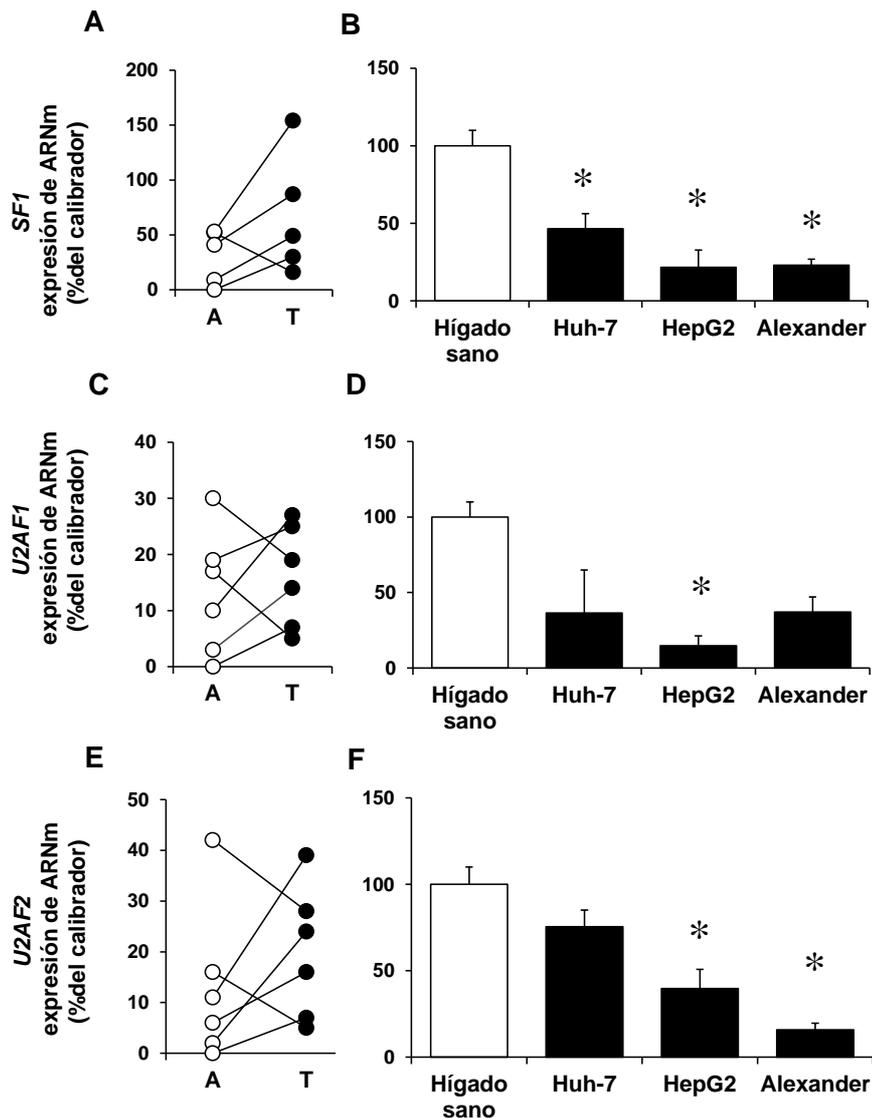
**Figura R-18.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *U2AF1* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *U2AF1* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *U2AF1* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

Al estudiar el factor *U2AF2*, el análisis de datos pareados T y A del TCGA no mostró cambios en su expresión entre HCC y el tejido adyacente no tumoral (figura R-19A), a pesar de que el análisis no pareado indicó que la expresión de *U2AF2* aumentó en diez DB del HCCDB (figura R-19C). Así mismo, la expresión de *U2AF2* se correlacionó con *SLC22A1-ASGF* (figura R-19B), pero no se encontró relevancia pronóstica en los pacientes con HCC (figura R-19D).



**Figura R-19.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *U2AF2* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *U2AF2* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *U2AF2* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

La expresión de los genes *SF1*, *U2AF1*, y *U2AF2*, valorada mediante RT-qPCR en seis muestras pareadas de HCC y en las tres líneas celulares de HCC, reveló diferentes resultados de los obtenidos en el estudio *in silico*. En el caso del gen *SF1* se encontró un leve aumento en el HCC (figura R-20A), mientras que los estudios *in silico* mostraron una disminución de la expresión (figura R-17A); sin embargo, en las tres líneas celulares analizadas se encontró una disminución marcada y significativa en la expresión de este gen (figura R-20B). Por otro lado, la expresión del gen *U2AF1* mostró un nivel elevado en tres muestras tumorales y disminuido en las otras tres (figura R-20C) y en las líneas tumorales la expresión estaba disminuida de manera significativa en las células HepG2 (figura 20D). En cuanto a la expresión de *U2AF2* aumentó en cuatro muestras de HCC y disminuyó en otras dos (figura 20E). En las líneas celulares se observó una disminución marcada y significativa en la expresión de este gen en células HepG2 y aún más en células Alexander (figura R-20F).

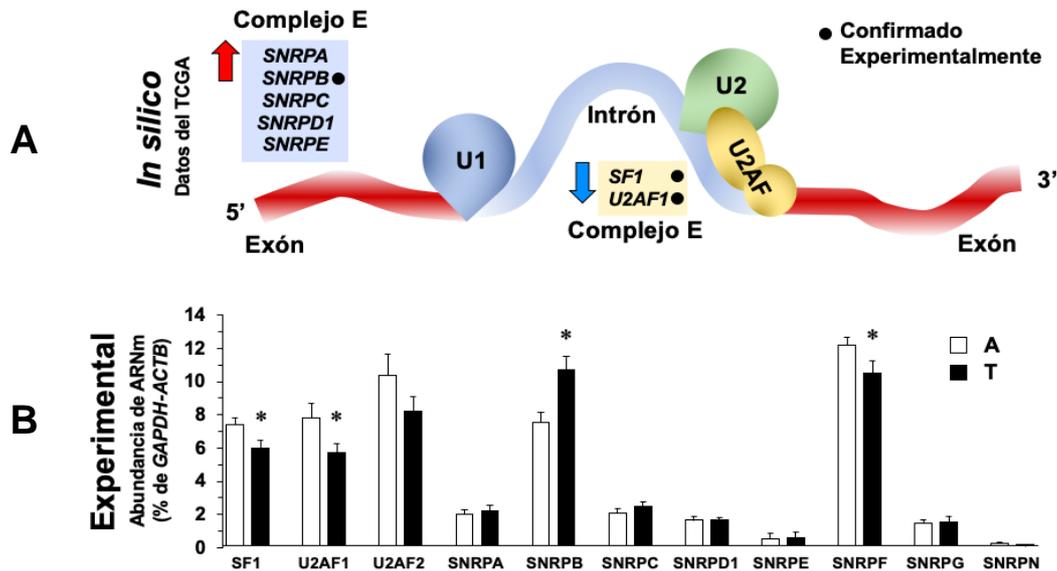


**Figura R-20.** Expresión de los genes *SF1* (A, B) y *U2AF1* (C, D), y *U2AF2* (E, F) de la maquinaria de *splicing*, medida por RT-qPCR en muestras pareadas (n=6) de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) (A, C y E) y en líneas celulares de HCC (B, D, y F) (\*, p<0.05).

Debido a la importancia del complejo E en el *splicing* alternativo, los resultados de la expresión de varios genes de este complejo se determinaron experimentalmente en una cohorte de validación de 25 muestras pareadas de HCC y el tejido adyacente no tumoral (apartado 3.1.1 de Material y Métodos) mediante TLDA (apartado 3.6.3 de Material y Métodos). Posteriormente se aplicó un proceso de *data mining* para resumir los resultados *in silico* anteriormente detallados, con el objetivo de compararlos con los resultados obtenidos experimentalmente.

Utilizando la cohorte de validación experimental se confirmaron los cambios de expresión observados en el estudio *in silico* de los genes *SF1* y *U2AF1* y *SNRPB* (figura

R-21A). Ambos factores de *splicing* *SF1* y *U2AF1* presentaron una expresión reducida en HCC en comparación con el tejido adyacente no tumoral, mientras que para *sm-B* (*SNRPB*) mostró elevada expresión en HCC (figura 21B).

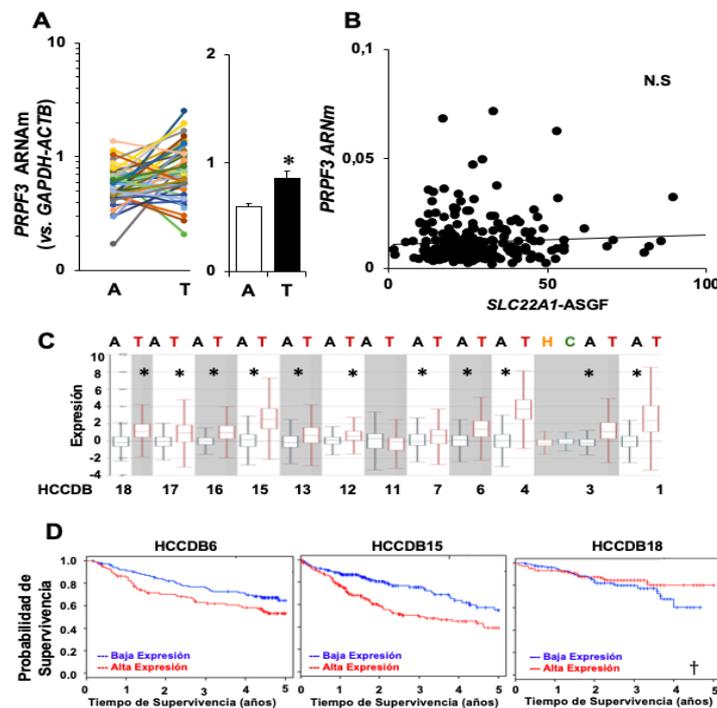


**Figura R-21.** Validación experimental de los cambios de expresión de los genes implicados en el complejo E. Esquema representativo de los genes cuya expresión presenta cambios significativos asociados con HCC, según los datos de ARN-seq disponibles en el TCGA (A). Resultados de validación experimental de expresión génica en una cohorte de 25 muestras pareadas de carcinoma hepatocelular (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) determinados por TLDA (B) (\*,  $p < 0.05$ , comparando A y T).

#### 4.2.2. Complejo B

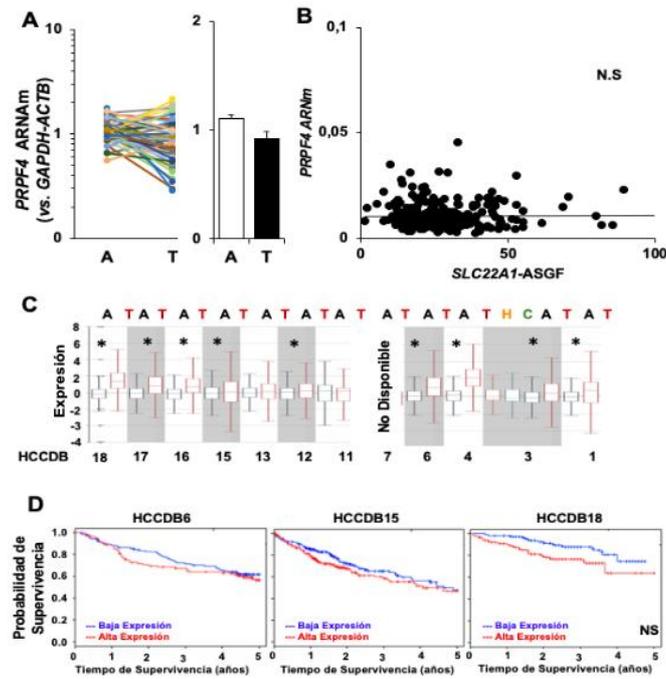
El complejo B activo cataliza la primera reacción de transesterificación del *splicing* que media el corte en el 5'SS y la ligadura del extremo 5' del intrón al sitio de ramificación (BP). Esta reacción genera la liberación del extremo 5' del exón y la formación del *loop* en el extremo 3' del intrón-exon (Agafonov EA *et al.*, 2016).

De los genes implicados en la formación del complejo B, *PRPF3* presenta un nivel de expresión elevado en HCC comparado con el tejido no tumoral en las muestras pareadas del TCGA (figura R-22A). Se observaron resultados similares en todas las DB del HCCDB, excepto en la DB11 (figura R-22C). El análisis de la supervivencia de los pacientes con HCC reveló un valor pronóstico para este gen (figura R-22D), pero no hubo correlación entre su expresión y *SLC22A1-ASGF* (figura R-22B).



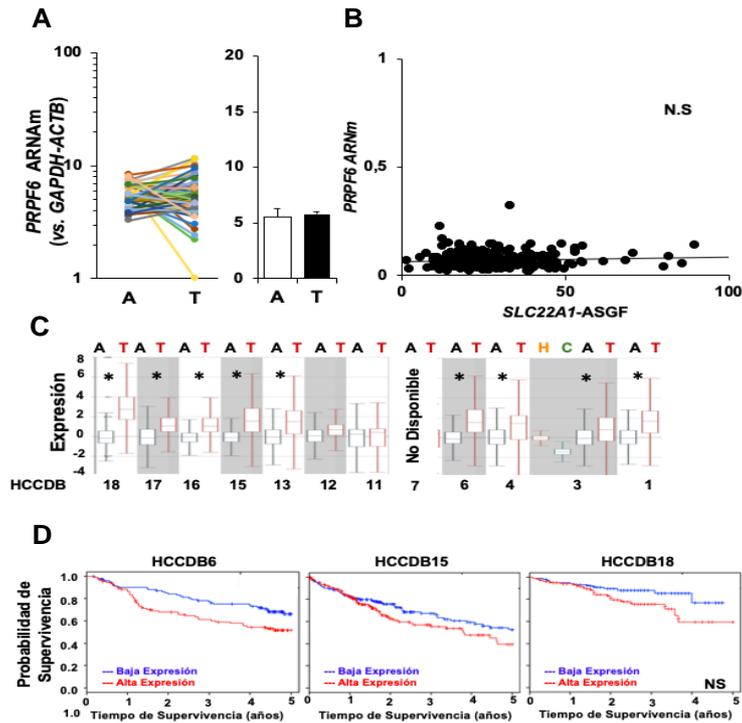
**Figura R-22.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *PRPF3* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) utilizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *PRPF3* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *PRPF3* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando T con A, †,  $p < 0.05$  valor pronóstico de la supervivencia con expresión alta o baja).

Al contrario que *PRPF3*, el gen *PRPF4* mostró una leve caída no significativa en su expresión en el tejido tumoral (figura R-23A). Contrariamente, en HCCDB, la expresión de este gen se encontró elevada en HCC (figura R-23C) excepto en una DB donde se observó una disminución no significativa en su expresión en HCC (DB11). No hubo relación entre la expresión de este gen y la supervivencia de los pacientes con HCC (figura R-23D) ni hubo correlación entre expresión y *splicing* de OCT1 (*SLC22A1-ASGF*) (figura R-23B).



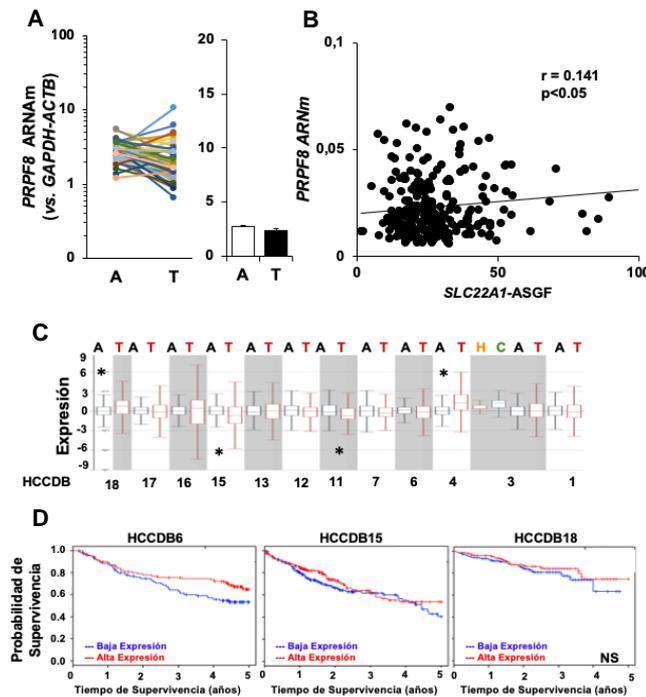
**Figura R-23.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *PRPF4* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) utilizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *PRPF4* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *PRPF4* en las DB HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando T y A).

Utilizando los datos del TCGA, el análisis reveló que el gen *PRPF6* no mostró prácticamente ningún cambio en su expresión en el tejido tumoral de HCC en comparación con el tejido no tumoral (figura R-24A), aunque se observó una expresión elevada en HCC en casi todas las DB de HCCDB (figura R-24C). No hubo relación entre la expresión de este gen y la supervivencia de los pacientes con HCC (figura R-24D) ni tampoco hubo correlación de la expresión con el *splicing* alternativo de OCT1 (*SLC22A1-ASGF*) (figura R-24B).



**Figura R-24.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *PRPF6* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) utilizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *PRPF6* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *PRPF6* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

Respecto al gen *PRPF8*, tampoco se observaron cambios significativos en su expresión en HCC analizando los datos de las muestras pareadas de HCC en el TCGA (figura R-25A). Estos resultados contrastaron con los del HCCDB, cuyo análisis reveló una expresión más alta en una DB (DB4) y más reducida en otras dos (DB11 y DB15) (figura R-25C). La expresión de este gen tampoco se relacionó con la evolución de los pacientes (figura R-25D), pero hubo correlación con el valor de *SLC22A1-ASGF* (figura R-25B).

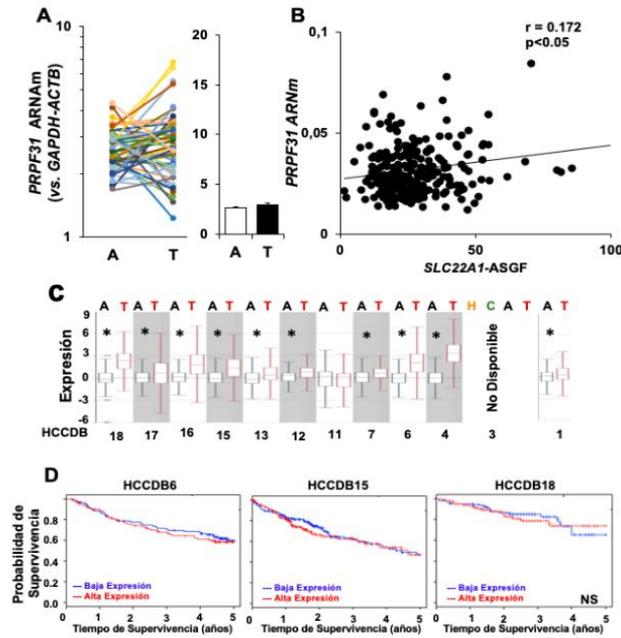


**Figura R-25.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *PRPF8* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) utilizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *PRPF8* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *PRPF8* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

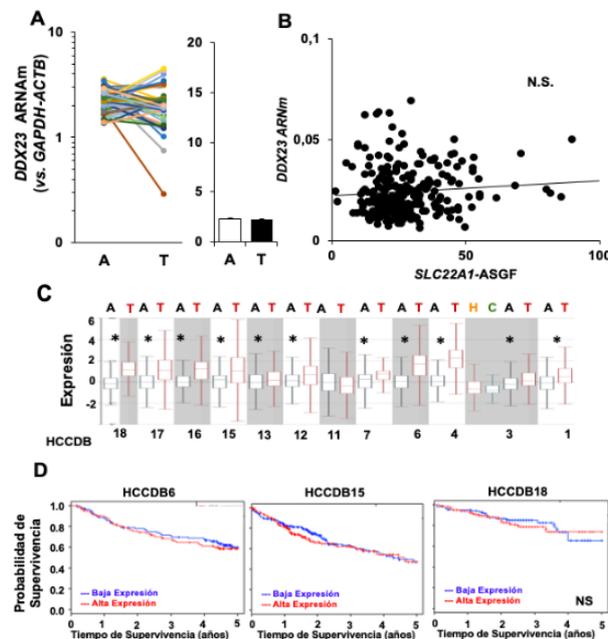
Para el gen *PRPF31* se observaron resultados similares al analizar los datos de muestras pareadas del TCGA, que no mostraron cambios marcados en su expresión (figura R-26A). En casi todas las DB del HCCDB hubo un aumento significativo de la expresión del gen en HCC, excepto en la DB11, donde no hubo diferencias en la expresión entre el tumor y el tejido adyacente (figura R-26C). La expresión de este gen no se relacionó con la supervivencia de pacientes con HCC (figura R-26D), pero sí hubo correlación con el valor de *SLC22A1-ASGF* (figura R-26B).

Así mismo, no se vieron diferencias en la expresión del gen *DDX23* entre los tejidos pareados del TCGA (figura R-27A), mientras que en casi todas las DB de HCCDB se pudo apreciar un aumento significativo de la expresión en el tejido tumoral, excepto en la DB11 (figura R-27C). No se demostró relevancia de la expresión del gen en la supervivencia de los pacientes (figura R-27D) ni hubo correlación con el valor de *SLC22A1-ASGF* (figura R-27B).





**Figura R-26.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *PRPF31* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) utilizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *PRPF31* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *PRPF31* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).



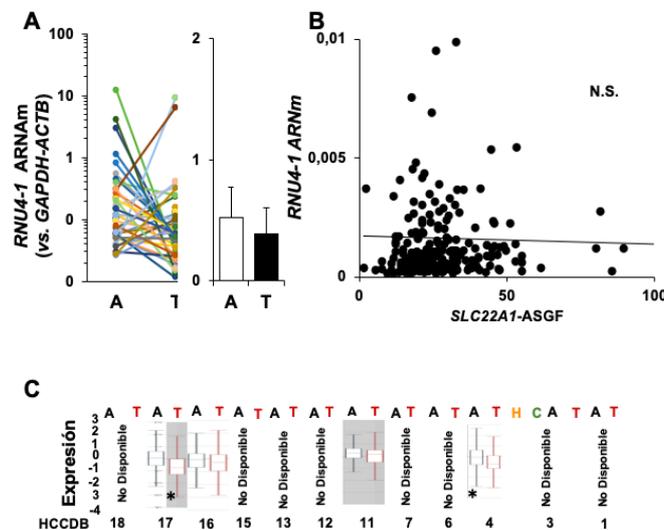
**Figura R-27.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *DDX23* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) utilizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *DDX23* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *DDX23* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).



Para los genes *RNU-5* y *RNU6-1* no se encontró información en las DB disponibles. En el TCGA la expresión de estos genes da valores próximos a cero, en la mayoría de las muestras, lo que sugiere que el método de medida por RNA-Seq no es apropiado para determinar la expresión de secuencias muy cortas, como la de estos RNAs. Tampoco se encontró información sobre el impacto de su expresión en la supervivencia de los pacientes con HCC.

Por otra parte, analizando los datos de muestras pareadas de HCC en TCGA se encontró una leve disminución en la expresión de *RNU4-1*, aunque este cambio no fue significativo (figura R-28A). En dos DB (DB4 y DB17) se encontró disminución en la expresión de este gen en el tejido tumoral (figura R-28C). La expresión de este gen no mostró correlación con *SLC22A1-ASGF* (figura R-28B) y no se dispuso de datos de curvas de supervivencia.

Debido a estas limitaciones, estos genes no fueron incluidos en las etapas posteriores de nuestro estudio.



**Figura R-28.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *RNU4-1* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) utilizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *RNU4-1* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

#### 4.2.3. Genes que favorecen el *splicing* corto: proteínas SR

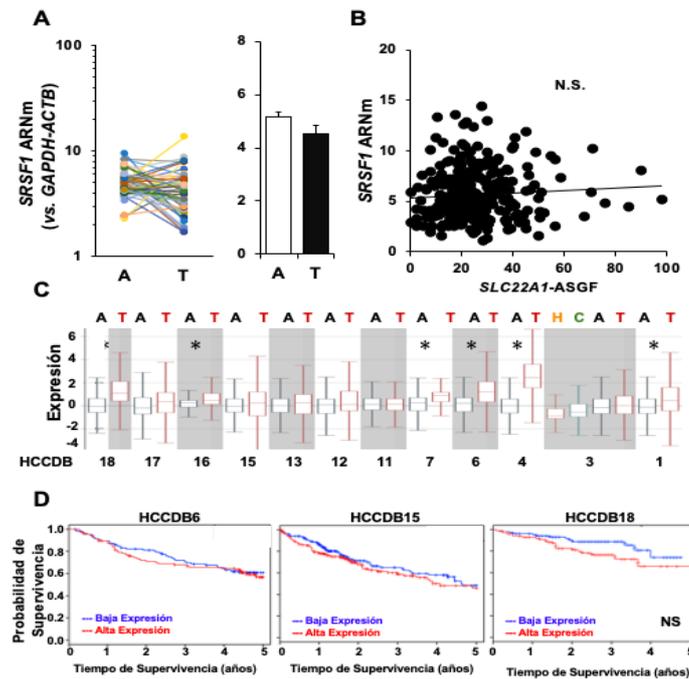
Las proteínas denominadas SR, por poseer abundantes restos de serina y arginina, tienen la capacidad de unirse al pre-ARNm actuando como reguladoras del *splicing* constitutivo y alternativo y poseyendo además la función de favorecer el transporte del ARNm al citoplasma (Jeong S., 2017).

En este estudio, hemos hecho un análisis *in silico* de la expresión de catorce proteínas SR (tabla R-2). En lo que se refiere a *SRSF1*, se observó que en el TCGA no había diferencias significativas entre el HCC y el tejido adyacente (figura R-29A), ni tampoco correlación con los valores de *SLC22A1*-ASGF (figura R-29B). La expresión de *SRSF1* se encontró ligeramente aumentada en seis DB del HCCDB y sin cambios en otras seis DB (figura R-29C), pero no se encontró asociación con la supervivencia de pacientes con HCC (figura R-29D). Al analizar la expresión de *SRSF1* en las seis muestras pareadas de HCC, se vio que la expresión de *SRSF1* estaba elevada en tres muestras y disminuida en otras tres (figura R-30A). En las líneas celulares de HCC no se observó un cambio significativo en su expresión (figura R-30B).

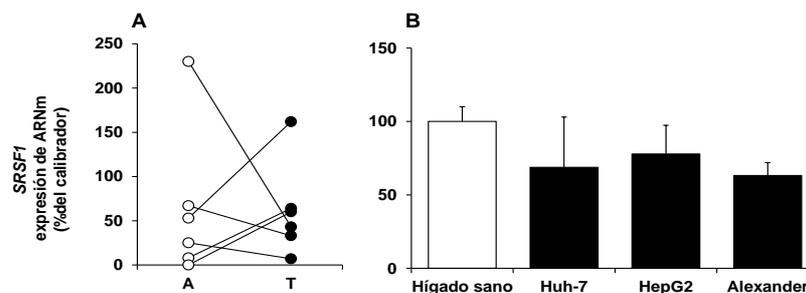
**Tabla R-2.** Proteínas SR que favorecen el *splicing* corto mediante la interacción con potenciadores de *splicing* exónicos (ESE) e intrónicos (ISE). Información del TCGA sobre cambios en la expresión, de HCCDB sobre el valor de prognosis clínica y de SpliceSeq sobre la correlación del *splicing* con la expresión gen *SLC22A1*.

Función	Proteína	Gen	Cambios en la expresión	Correlación con <i>SLC22A1</i> -ASGF	Valor pronóstico	Ensamblaje	AN
Favorecen el <i>splicing</i> corto	SF2/ASF	<i>SRSF1</i>	Ninguno	No	No	ENSG00000136450	NM_006924.4
	SC35	<i>SRSF2</i>	Baja	No	Si	ENSG00000161547	NM_001195427.1
	SRp20	<i>SRSF3</i>	Baja	No	No	ENSG00000112081	NR_036610.1
	SRp75	<i>SRSF4</i>	Baja	Si	No	ENSG00000116350	NM_005626.4
	SRp40	<i>SRSF5</i>	Baja	Si	No	ENSG00000100650	NM_001039465.1
	SRp55	<i>SRSF6</i>	Baja	Si	No	ENSG00000124193	NM_006275.5
	9GB	<i>SRSF7</i>	Baja	Si	No	ENSG00000115875	NM_001031684.2
	SRp46	<i>SRSF8</i>	Baja	Si	No	ENSG00000263465	NM_032102.3
	SRp30c	<i>SRSF9</i>	Ninguno	Si	No	ENSG00000111786	NM_003769.2
	TRA2-β	<i>SRSF10</i>	Baja	No	No	ENSG00000136527	NM_004593.2
	NET2	<i>SRSF11</i>	Ninguna	Si	No	ENSG00000116754	NM_001350605.1
	SREK1	<i>SRSF12</i>	Ninguna	Si	No	ENSG00000153914	NM_001077199.2
	SRm160	<i>SRRM1</i>	Baja	No	No	ENSG00000133226	NM_001303448.1
	LUCA15	<i>RBM5</i>	Ninguna	Si	No	ENSG00000003756	NM_005778.3





**Figura R-29.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SRSF1* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) utilizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SRSF1* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SRSF1* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

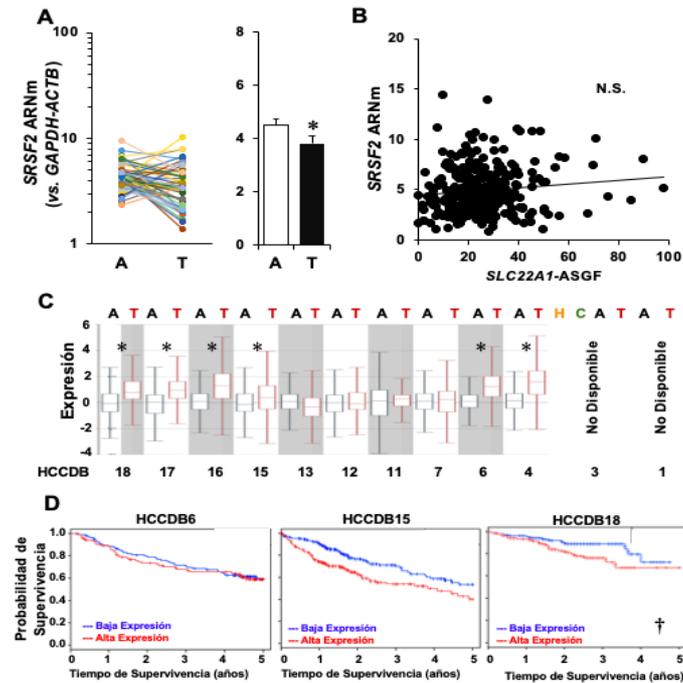


**Figura R-30.** Expresión del gen *SRSF1* medida por RT-qPCR en muestras pareadas ( $n=6$ ) de HCC y el tejido adyacente no tumoral (T, A respectivamente) (A) y en líneas celulares de HCC (B).

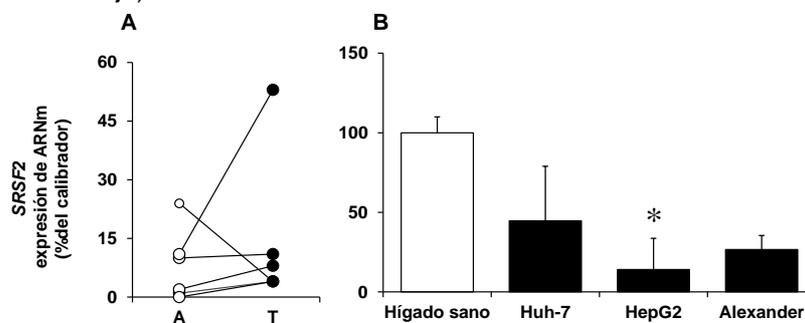
En lo concerniente al gen *SRSF2*, el análisis pareado del T y A en el TCGA mostró una expresión moderadamente baja, pero estadísticamente significativa de *SRSF2* en el tejido tumoral (figura R-31A), con ausencia de relación con *SLC22A1-ASGF* (figura R-31B). La expresión de *SRSF2* se encontró elevada en seis DB del HCCDB, sin cambios en tres DB (DB7, DB11 y DB12) y reducida en una DB (DB13) (figura R-31C). Si se encontró una relación significativa entre una menor expresión de *SRSF2* y una



supervivencia más prolongada de los pacientes con HCC (figura R-31D). Se observaron resultados similares en las líneas celulares de HCC, donde la expresión de *SRSF2* fue baja respecto al hígado sano, de manera significativa en el caso de las células HepG2 (figura R-32B). Sin embargo, de las medidas de expresión realizadas en el grupo de seis muestras pareadas de HCC, se vio una expresión marcadamente elevada en una muestra y disminuida en otra y cambios menores en el resto de las muestras (figura R-32A).

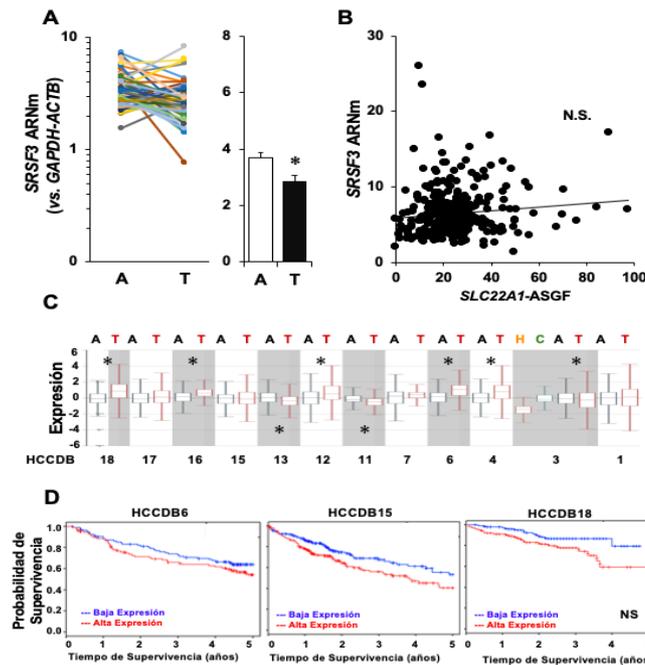


**Figura R-31.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SRSF2* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) utilizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SRSF2* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como A > GF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SRSF2* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando T con A, †  $P < 0.05$  valor pronóstico de la supervivencia con expresión alta o baja).

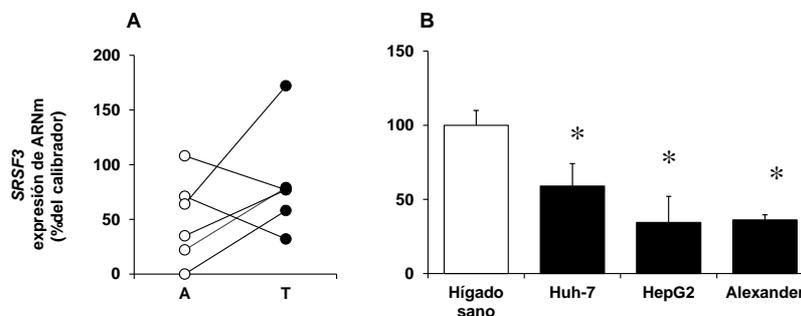


**Figura R-32.** Expresión del gen *SRSF2* medida por RT-qPCR en muestras pareadas ( $n=6$ ) de HCC y el tejido adyacente no tumoral (T, A respectivamente) (A) y en líneas celulares de HCC (B) (\*,  $p < 0.05$ ).

El análisis de la expresión de *SRSF3* en muestras pareadas T y A del TCGA indicó que la expresión disminuía en el tejido de HCC (figura R-33A), al igual que en dos DB del HCCDB (DB11 y DB13), mientras que se encontró una expresión elevada en HCC en otras seis DB del HCCDB (figura R-33C). La baja expresión de *SRSF3* no tuvo correlación ni con supervivencia (figura R-33D) ni con el *splicing* de OCT1 (figura R-33B). Contrariamente los valores obtenidos mediante RT-qPCR en la cohorte de seis muestras pareadas se encontró que la expresión de *SRSF3* aumentaba en cuatro casos y disminuía ligeramente en dos (figura R-34A), mientras que este gen tenía reducidos los niveles de expresión en las tres líneas celulares de HCC estudiadas (figura R-34B).

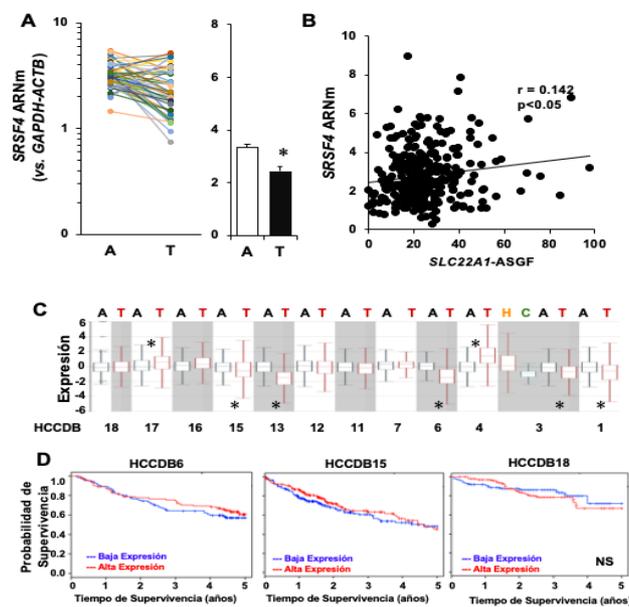


**Figura R-33.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SRSF3* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) utilizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SRSF3* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SRSF3* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

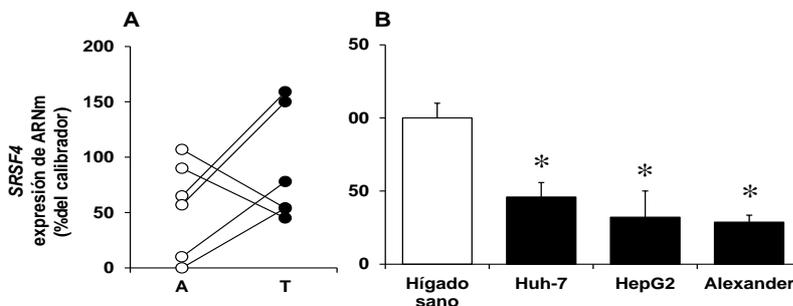


**Figura R-34.** Expresión del gen *SRSF3* medida por RT-qPCR en muestras pareadas ( $n=6$ ) de HCC y el tejido adyacente no tumoral (T, A respectivamente) (A) y en líneas celulares de HCC (B) (\*,  $p < 0.05$ ).

La expresión de *SRSF4* disminuyó en el tejido tumoral (figura R-35A) y se correlacionó con *SLC22A1-ASGF* (figura R-35B). En la DB integrativa HCCDB, se puede apreciar la disminución en la expresión de *SRSF4* en el tejido tumoral en cinco DB (DB1, DB3, DB6, DB13 y DB15) y elevación en otras dos (DB4 y DB17) (figura R-35C). Esta disminución no tuvo importancia pronóstica sobre la supervivencia de los pacientes con HCC (figura R-35D). Se encontraron resultados similares a los de la expresión de *SRSF3* para *SRSF4* en las muestras pareadas y líneas celulares de HCC, es decir, hubo una expresión marcadamente elevada en cuatro de las muestras derivadas de pacientes con HCC y disminuida en dos y una disminución en todas las líneas celulares de HCC estudiadas (figura R-36, A y B).

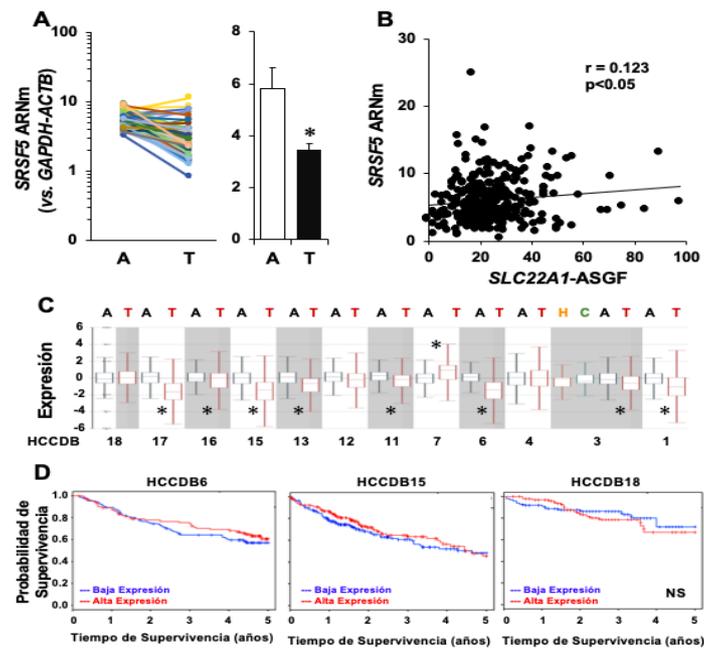


**Figura R-35.** R-Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SRSF4* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SRSF4* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SRSF4* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

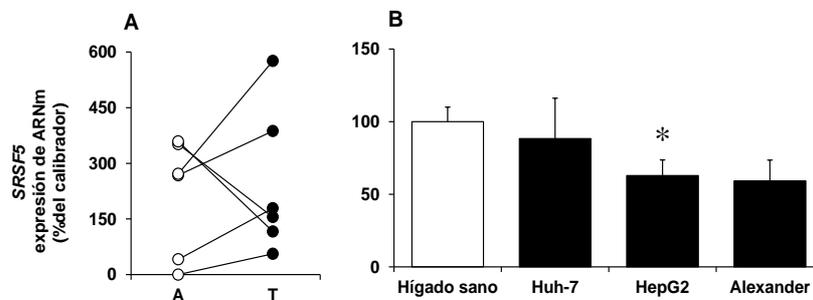


**Figura R-36.** Expresión del gen *SRSF4* medida por RT-qPCR en muestras pareadas ( $n=6$ ) de HCC y el tejido adyacente no tumoral (T, A respectivamente) (A) y en líneas celulares de HCC (B) (\*,  $p < 0.05$ ).

El gen *SRSF5* mostró una disminución en su expresión en tejido tumoral en los datos de TCGA (figura R-37A) y en casi todas las DB del HCCDB, excepto en la DB7 (figura R-37C). La expresión de *SRSF5* mostró correlación con *SLC22A1-ASGF* (figura R-37B), pero no tuvo importancia pronóstica en la supervivencia de los pacientes con HCC (figura R-37D). Esta disminución en la expresión se encontró solo en dos muestras de las seis muestras pareadas de HCC analizadas (figura R-38A) y de manera moderada en las líneas celulares de HCC, que solo fue significativa en el caso de las células HepG2 (figura R-38B).

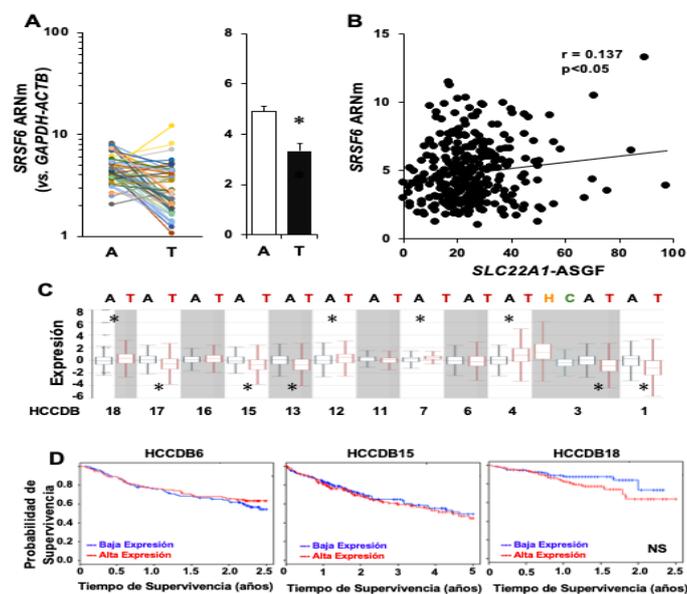


**Figura R-37.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SRSF5* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SRSF5* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SRSF5* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

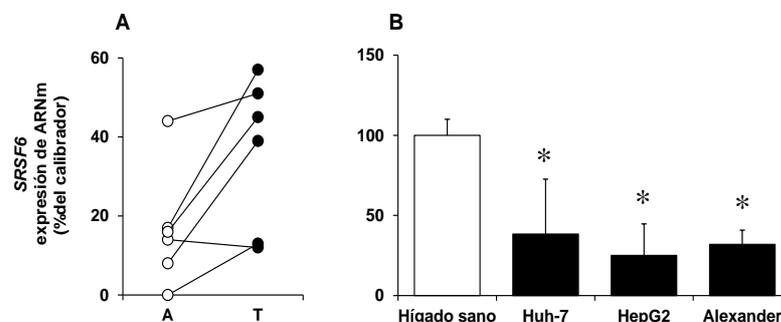


**Figura R-38.** Expresión del gen *SRSF5* medida por RT-qPCR en muestras pareadas (n=6) de HCC y el tejido adyacente no tumoral (T, A respectivamente) (A) y en líneas celulares de HCC (B) (\*,  $p < 0.05$ ).

Analizando los datos de las muestras pareadas de HCC en TCGA, la expresión del gen *SRSF6* se encontró disminuida en tejido tumoral (figura R-39A) al igual que en varias DB del HCCDB (DB1, DB3, DB13, DB15 y DB17) (figura R-39C). La expresión de *SRSF6* mostró una correlación con *SLC22A1*-ASGF (figura R-39B), pero no tuvo relación con la supervivencia de los pacientes con HCC (figura R-39D). Contrariamente a lo encontrado en el análisis *in silico*, la expresión de *SRSF6* medida en las seis muestras pareadas de HCC fue más alta en el tejido tumoral (figura R-40A), mientras que estaba significativamente disminuida en las tres líneas celulares de HCC (figura R-40B).

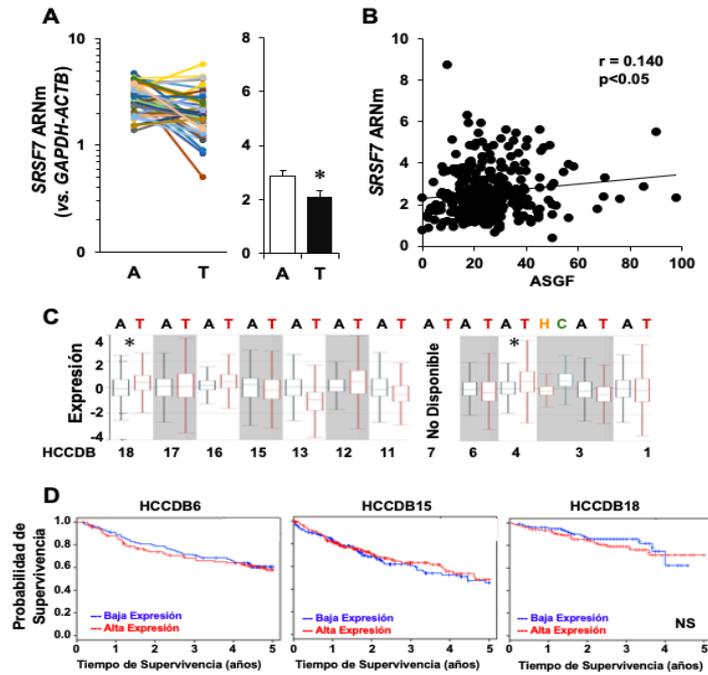


**Figura R-39.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SRSF6* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SRSF6* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SRSF6* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

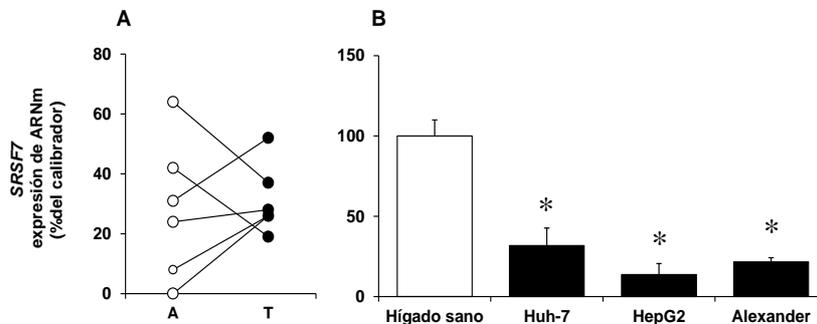


**Figura R-40.** Expresión del gen *SRSF6* medida por RT-qPCR en muestras pareadas ( $n=6$ ) de HCC y el tejido adyacente no tumoral (T, A respectivamente) (A) y en líneas celulares de HCC (B) (\*,  $p < 0.05$ ).

La expresión de *SRSF7* mostró una leve disminución en el tejido tumoral (figura R-41A), pero no mostró grandes cambios, ni en el tejido tumoral ni en el no tumoral, en ninguna de las DB de HCCDB estudiadas (figura R-41C). En las seis muestras pareadas de HCC se vieron aumentos y disminuciones (figura R-42A) y en las tres líneas celulares de HCC se observó una expresión disminuida (figura R-42B). La baja expresión de este gen estaba relacionada con el valor de *SLC22A1-ASGF* (figura R-41B), pero no mostró valor pronóstico en los pacientes con HCC (figura R-41D).

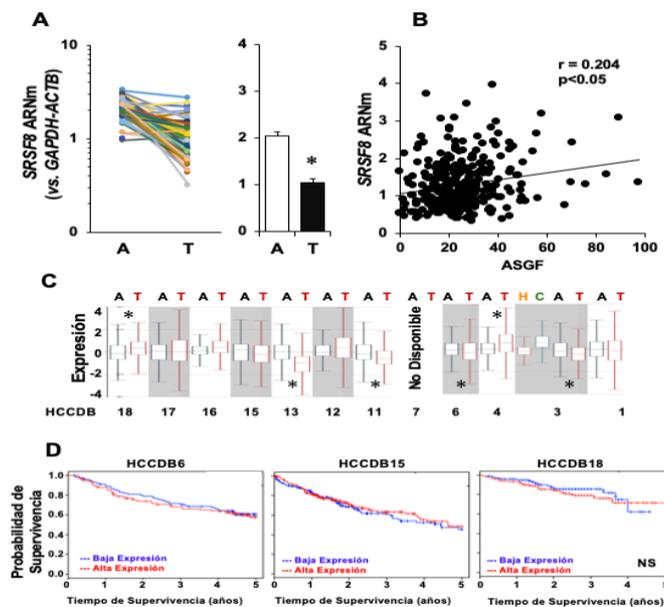


**Figura R-41.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SRSF7* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SRSF7* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SRSF7* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

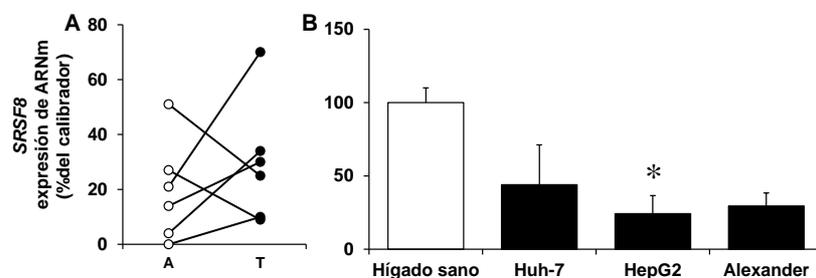


**Figura R-42.** Expresión del gen *SRSF7* medida por RT-qPCR en muestras pareadas (n=6) de HCC y el tejido adyacente no tumoral (T, A respectivamente) (A) y en líneas celulares de HCC (B) (\*,  $p < 0.05$ ).

El gen *SRSF8* mostró una disminución en su expresión en tejido tumoral de HCC según los datos de TCGA (figura R-43A) lo que se observó igualmente en cuatro DB del HCCDB: (DB3, DB6, DB11 y DB13). Sin embargo, en DB4 este gen se encontró sobreexpresado en HCC (figura R-43A). La expresión de *SRSF8* se vio disminuida de manera significativa en las células HepG2 (figura R-44B). Estos resultados no se confirmaron en las seis muestras pareadas de HCC donde el gen estaba disminuido en dos muestras y elevado en cuatro (figura R-44A). Se encontró una relación entre la expresión de *SRSF8* y el valor de *SLC22A1*-ASGF (figura R-43B), pero no una asociación con un mejor pronóstico de los pacientes con HCC (figura R-43D).

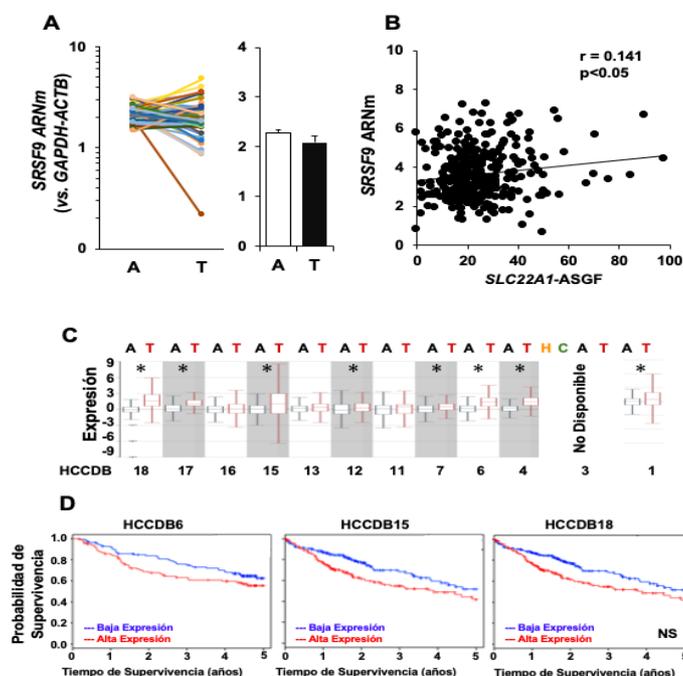


**Figura R-43.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SRSF8* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SRSF8* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SRSF8* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).



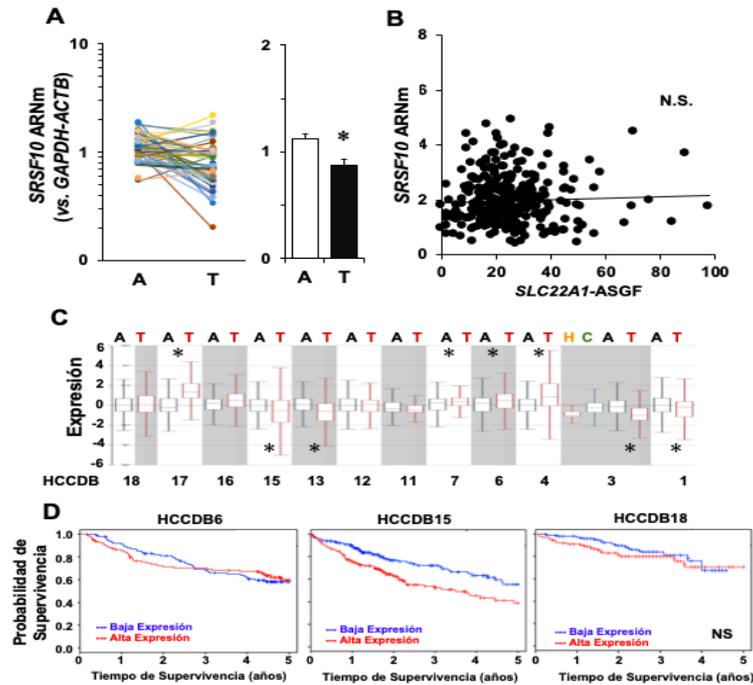
**Figura R-44.** Expresión del gen *SRSF8* medida por RT-qPCR en muestras pareadas ( $n=6$ ) de HCC y el tejido adyacente no tumoral (T, A respectivamente) (A) y en líneas celulares de HCC (B) (\*,  $p < 0.05$ ).

Mientras que *SRSF9* mostró poca variación en su expresión en tejidos pareados T y A del TCGA (figura R-45A), este gen se encontró sobreexpresado en HCC en ocho DB de HCCDB (figura R-45C). Por otro lado, existía correlación entre su expresión y el valor de *SLC22A1-ASGF* (figura R-45B), pero no con la supervivencia de los pacientes de HCC (figura R-45D).

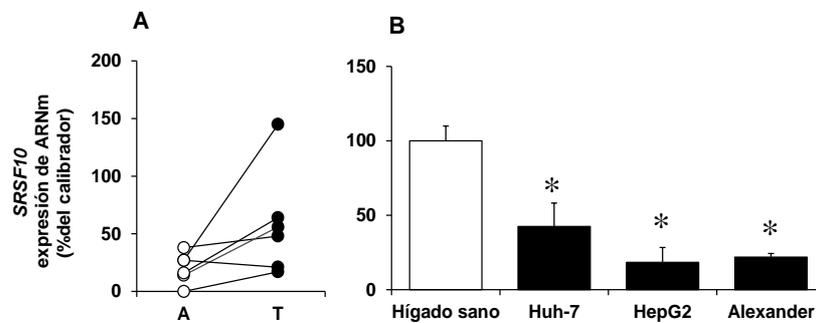


**Figura R-45.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SRSF9* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SRSF9* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenido por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SRSF9* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

*SRSF10* se expresa a niveles bajos en HCC (figura R-46A); de hecho, en cuatro DB de HCCDB se vio disminución en la expresión del gen (DB1, DB3, DB13 y DB15), pero en tres DB (DB4, DB6 y DB7) se pudo apreciar aumento (figura R-46C). La expresión de *SRSF10* no se correlacionó con el nivel de *splicing* de OCT1 (figura R-46B) y tampoco tuvo relación con la supervivencia de los pacientes con HCC (figura 46D). En las tres líneas celulares de HCC estudiadas se encontró baja expresión de *SRSF10* (figura R-47B), pero no en las seis muestras pareadas de HCC, donde *SRSF10* mostró sobreexpresión en HCC en comparación con el tejido adyacente no tumoral (figura R-47A).

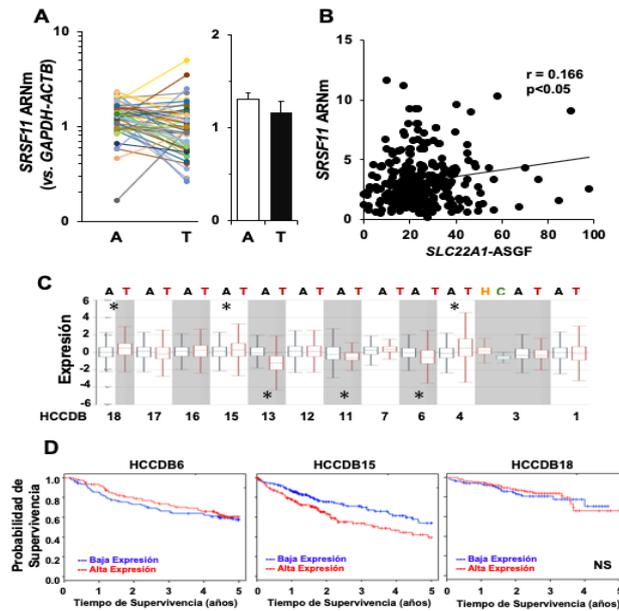


**Figura R-46.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SRSF10* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SRSF10* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SRSF10* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

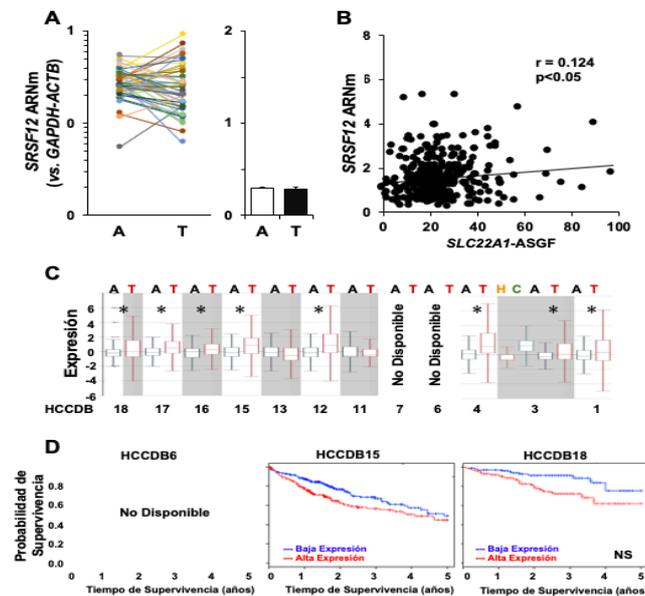


**Figura R-47.** Expresión del gen *SRSF10* medida por RT-qPCR en muestras pareadas ( $n=6$ ) de HCC y el tejido adyacente no tumoral (T, A respectivamente) (A). Y en líneas celulares de HCC (B) (\*,  $p < 0.05$ ).

Al analizar la expresión de los genes *SRSF11* y *SRSF12* en las muestras pareadas de HCC en TCGA, no se observaron cambios significativos (figuras R-48A y R-49A), pese a que la expresión de *SRSF12* estaba elevada en HCC en la mayoría de las DB de HCCDB (figura R-49C) y se encontraron valores variables en la expresión de *SRSF11* en las DB analizadas (figura R-48C). La expresión de ambos genes mostró correlación con el grado de *splicing* de OCT1 (figura R-48B y R-49B), pero no con la supervivencia de los pacientes con HCC (figuras R-48D y R-49D).

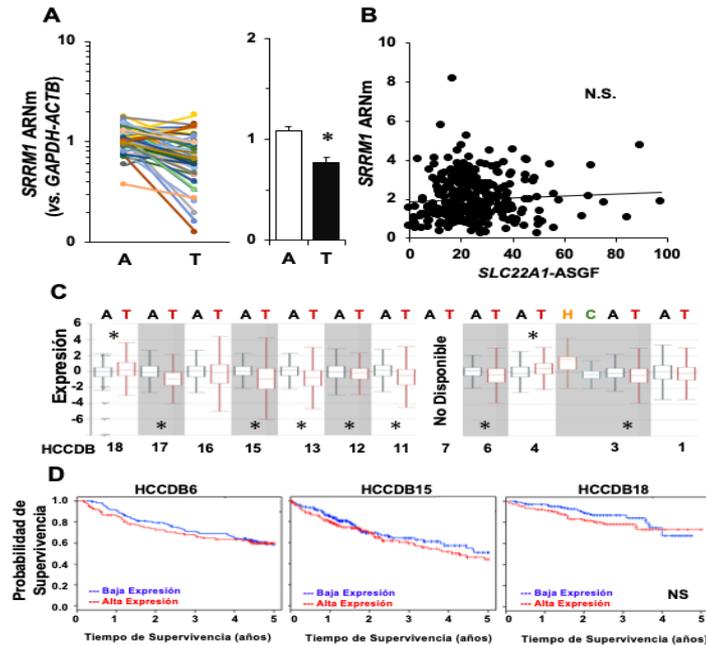


**Figura R-48.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SRSF11* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SRSF11* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SRSF11* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

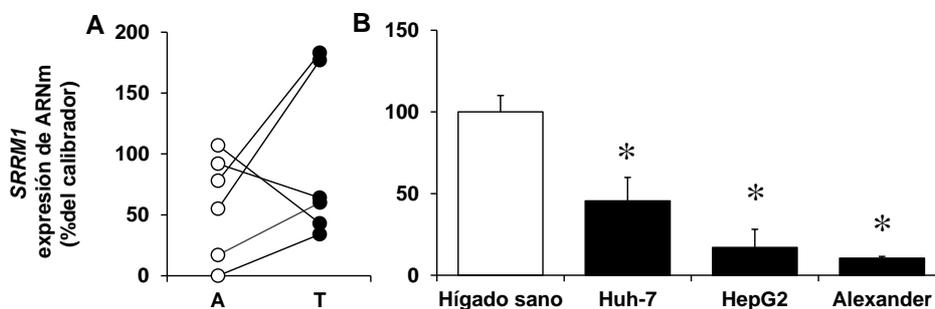


**Figura R-49.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SRSF12* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SRSF12* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SRSF12* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

El gen *SRRM1* mostró expresión disminuida en HCC en los datos de TCGA (figura R-50A) y otras DB de HCCDB (figura R-50C), aunque no mostró correlación con *SLC22A1-ASGF* (figura R-50B) ni valor predictivo de la supervivencia de pacientes con HCC (figura 50D). La medida de la expresión de este gen en las seis muestras pareadas de HCC mostró elevación en la mayoría de las muestras (figura R-51A), pero una expresión disminuida en las tres líneas celulares de HCC (figura R-51B).

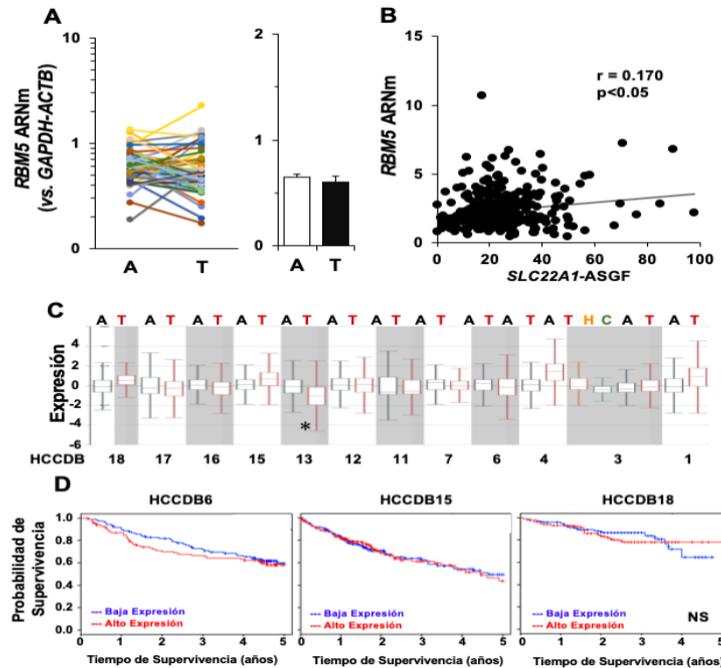


**Figura R-50.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SRRM1* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SRRM1* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SRRM1* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).



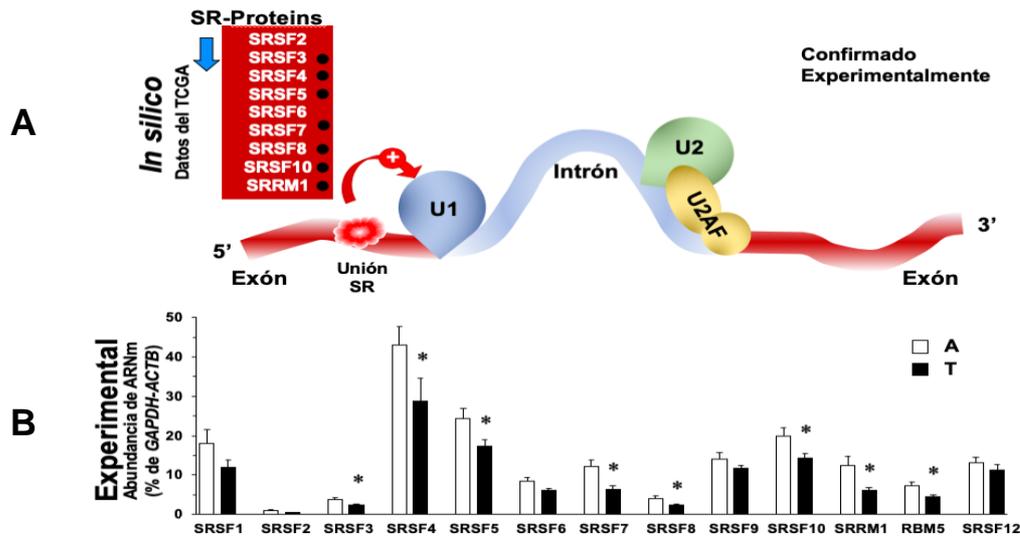
**Figura R-51.** Expresión del gen *SRPM1* medida por RT-qPCR en muestras pareadas ( $n=6$ ) de HCC y el tejido adyacente no tumoral (T, A respectivamente) (A) y en líneas celulares de HCC (B) (\*,  $p < 0.05$ ).

La expresión de *RBM5* en HCC no mostró ningún cambio significativo en las muestras pareadas de TCGA (figura R-52A), ni de HCCDB (figura R-52C) ni tampoco valor pronóstico en los pacientes con HCC (figura 52D). Sin embargo, la expresión de este gen presentó correlación con el valor de *SLC22A1*-ASGF (figura R-52B).



**Figura R-52.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *RBM5* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *RBM5* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *RBM5* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

A pesar de que la expresión de las proteínas SR fue elevada en la mayoría de las muestras de HCC, tanto el procesamiento por *data mining* del estudio *in silico* (figura R-53A) como el estudio experimental de validación por TLDA (figura R-53B), mostraron una disminución marcada en la expresión de la mayoría de las proteínas SR (*SRSF3*, *SRSF4*, *SRSF5*, *SRSF7*, *SRSF8*, *SRSF10*, *SRRM1* y *RBM5*).



**Figura R-53.** Validación experimental de los cambios de expresión de las proteínas SR. Esquema representativo de genes cuya expresión presenta cambios significativos asociados con HCC según los datos de ARN-seq disponibles en el TCGA (A). Resultados de validación de expresión génica en una cohorte de 25 muestras pareadas de carcinoma hepatocelular (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) determinada por TLDA (B). (\* $p < 0.05$ , comparando A y T).

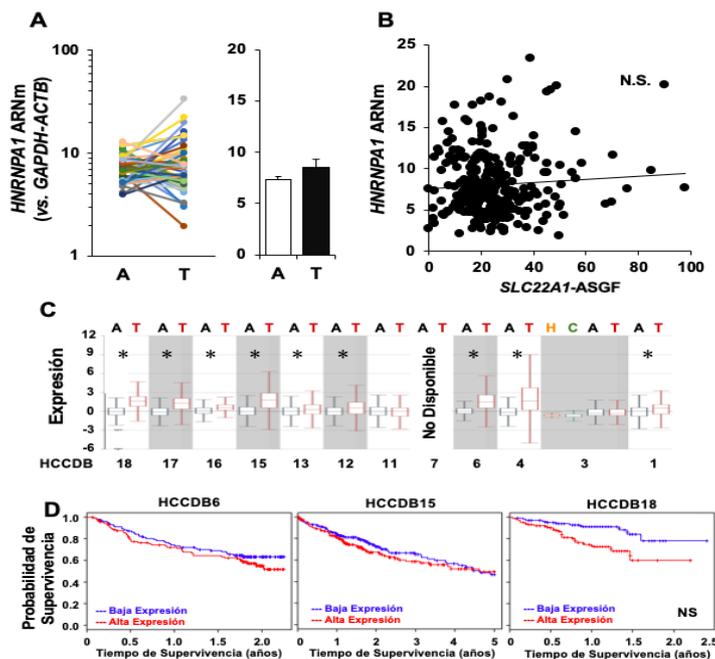
#### 4.2.4. Genes que favorecen el *splicing* largo: proteínas hnRNP

Como se comentó en el apartado de Introducción, las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNP) representan una gran familia de proteínas de unión al pre-ARNm (RBPs) que contribuyen a múltiples aspectos del metabolismo de los ácidos nucleicos, incluido el *splicing* alternativo, la estabilización del ARNm y la regulación de la transcripción y de la traducción (Geuens T *et al.*, 2016). En este trabajo hemos analizado nueve genes que codifican proteínas hnRNP capaces de inhibir el proceso de *splicing* corto (tabla R-3).

**Tabla R-3.** Proteínas hnRNP que favorecen el splicing largo por inhibición del *splicing* corto, mediante la interacción con silenciadores exónicos (ESS) e intrónicos (ISS). Información del TCGA sobre cambios en la expresión, de HCCDB sobre el valor de prognosis clínica y de SpliceSeq sobre la correlación del *splicing* con la expresión gen SLC22A1.

Función	Proteína	Gen	Cambios en la expresión	Correlación con SLC22A1-ASGF	Valor pronóstico	Ensamblaje	AN
Favorecen el <i>splicing</i> largo	hnRNP A1	<i>HNRNPA1</i>	Ninguno	No	No	ENSG00000135486	NM_002136.3
	hnRNP B1	<i>HNRNPA2B1</i>	Ninguno	No	No	ENSG00000122566	NM_002137.3
	hnRNP D	<i>HNRNPD</i>	Ninguno	No	No	ENSG00000138668	NM_001003810.1
	hnRNP F	<i>HNRNPF</i>	Sube	No	No	ENSG00000169813	NM_001098208.1
	hnRNP H	<i>HNRNPH1</i>	Ninguno	Si	Si	ENSG00000169045	NM_001257293.1
	hnRNP K	<i>HNRNPK</i>	Baja	No	Si	ENSG00000165119	NM_002140.4
	hnRNP L	<i>HNRNPL</i>	Baja	Si	Si	ENSG00000104824	NM_001533.2
	hnRNP E2	<i>PCBP2</i>	Baja	No	Si	ENSG00000197111	NM_005016.5
	PTBP1	<i>HNRNPI</i>	Sube	Si	No	ENSG00000011304	NM_002819.4

Primeramente, analizamos el gen *HNRNPA1*, cuya expresión se encontró en aumento en la mayoría de las DB HCCDB (figura R-54C) aunque sin cambios significativos en HCC en las muestras pareadas de TCGA (figura R-54A). Además, no se vio correlación con *SLC22A1-ASGF* (figura R-54B) o con la supervivencia de pacientes con HCC (figura R-54D).

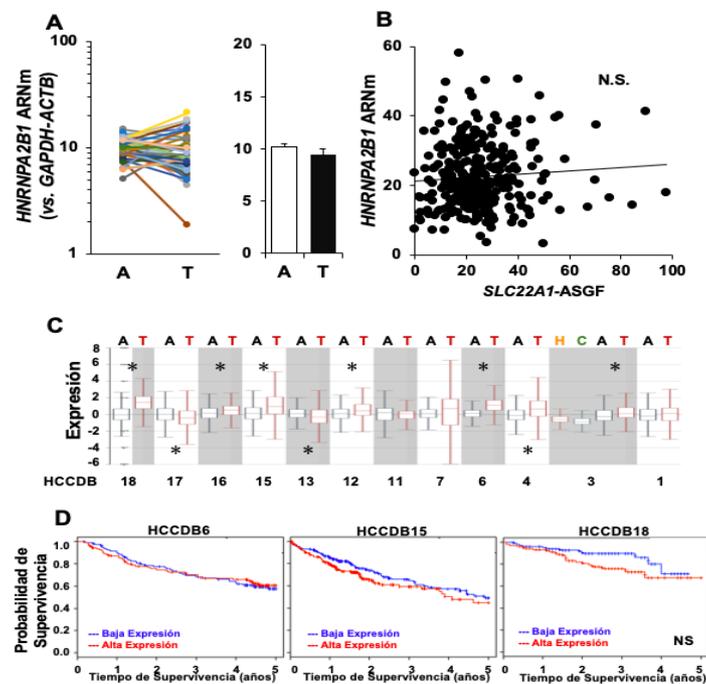


**Figura R-54.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *HNRNPA1* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de

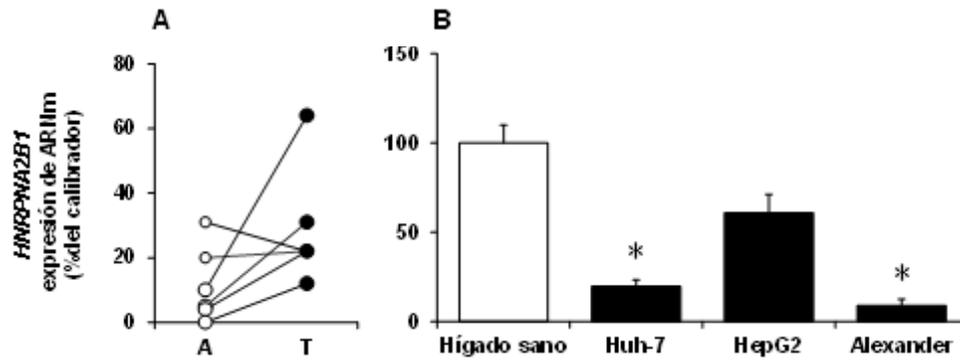
RESULTADOS

TCGA (A). Correlación entre la expresión de *HNRNPA1* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *HNRNPA1* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

No se detectaron cambios significativos en la expresión de *HNRNPA2B1* en los datos del TCGA (figura R-55A) y, sin embargo, se encontró un aumento de la expresión en el tejido tumoral en seis DB del HCCDB (figura R-55C) y también en la cohorte de seis muestras pareadas analizadas para validación por RT-qPCR (figura R-56A). No hubo correlación de la expresión con *SLC22A1*-ASGF (figura R-55B) ni importancia pronóstica significativa para la supervivencia de los pacientes con HCC (figura R-55D). En las tres líneas celulares de HCC se observaron niveles bajos de expresión de este gen, que fueron significativas en células Huh7 y Alexander (figura R-56B).

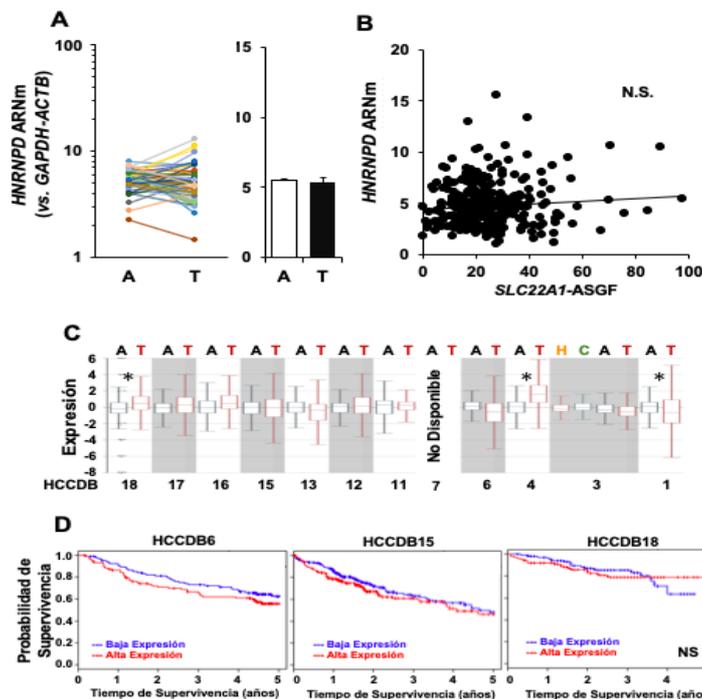


**Figura R-55.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *HNRNPA2B1* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *HNRNPA2B1* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *HNRNPA2B1* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).



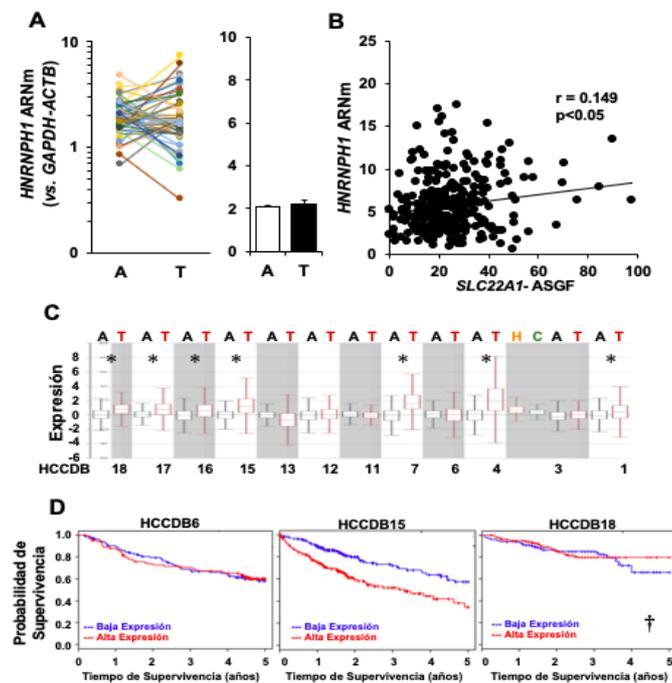
**Figura R-56.** Expresión del gen *HNRNPA2B1* medida por RT-qPCR en muestras pareadas (n=6) de HCC y el tejido adyacente no tumoral (T, A respectivamente) (A) y en líneas celulares de HCC (B) (\*,  $p < 0.05$ ).

Al igual que en el caso del gen anterior no se detectaron cambios significativos en la expresión de *HNRNPD* (figura R-57A). En HCCDB se vio un leve aumento en la expresión en dos DB y una leve disminución en otra (figura R-57C). No hubo relación con *SLC22A1-ASGF* (figura R-57B) ni con la supervivencia de los pacientes con HCC (figura R-57D).



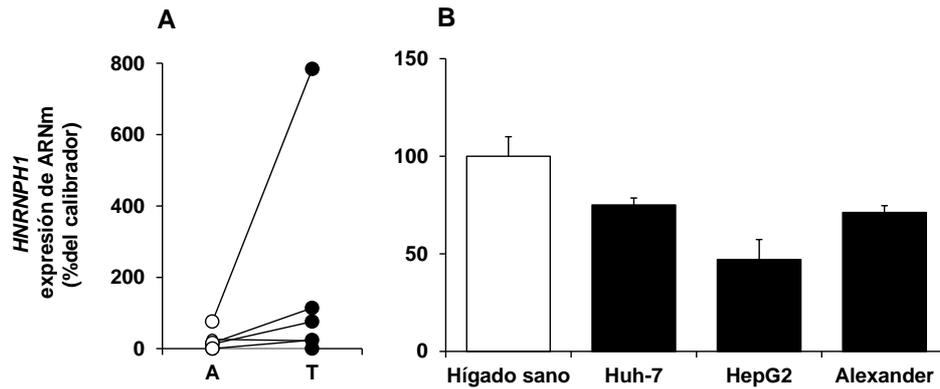
**Figura R-57.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *HNRNPD* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *HNRNPD* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *HNRNPD* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

Para el gen *HNRNPH1* la expresión en HCC en las muestras pareadas de TCGA fue muy variable, sin diferencias significativas entre HCC y el tejido adyacente no tumoral (figura R-58A). Así mismo, se pudo apreciar que en siete DB de HCCDB se encontró un aumento en la expresión del gen en tejidos tumorales, mientras que la diferencia descrita en la DB13 fue una disminución leve y en las otras DB analizadas no hubo cambios (figura R-58C). Para *HNRNPH1* se encontró una correlación con *SLC22A1*-ASGF (figura R-58C) y una asociación entre el nivel de expresión del gen y la supervivencia de los pacientes con HCC (figura R-58D). En las muestras pareadas de HCC se encontró un aumento en la expresión de *HNRNPH1*, mientras que en las tres líneas celulares la expresión estaba disminuida, aunque de manera no significativa (figura R-59, A y B).



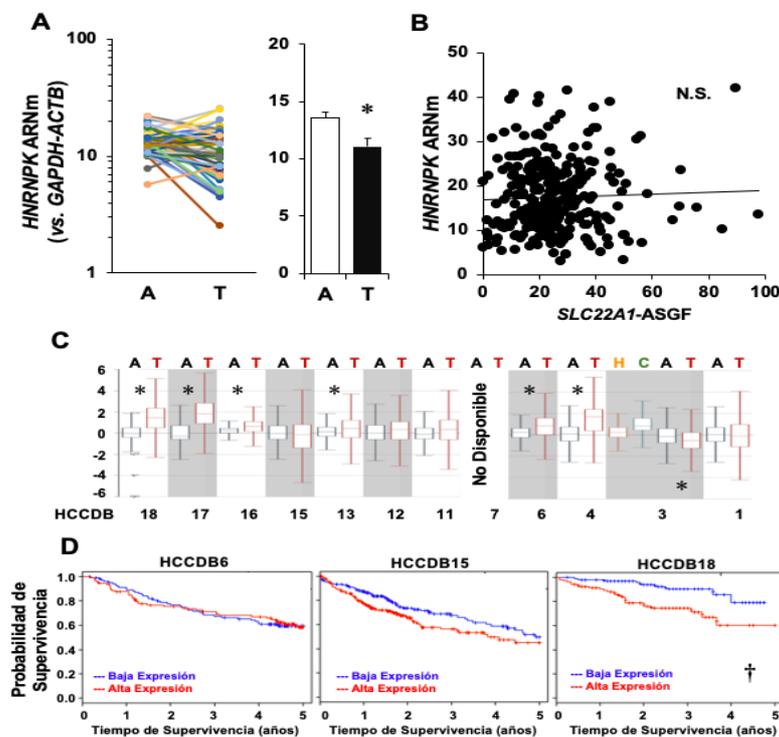
**Figura R-58.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *HNRNPH1* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *HNRNPH1* y el *splicing* alternativo de *OCT1* en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *HNRNPH1* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando T con A, †  $P < 0.05$  valor pronóstico de la supervivencia con expresión alta o baja).





**Figura R-59.** Expresión del gen *HNRNPH1* medida por RT-qPCR en muestras pareadas (n=6) de HCC y el tejido adyacente no tumoral (T, A respectivamente) (A) y en líneas celulares de HCC (B).

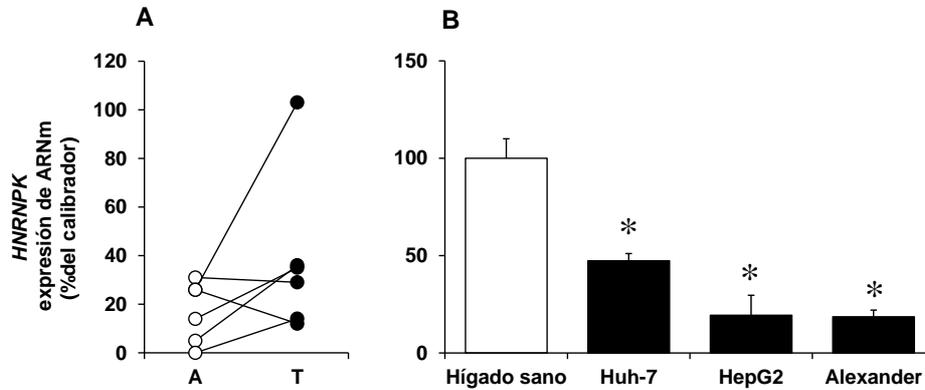
*HNRNPK* presentó una baja expresión en HCC según los datos del TCGA (figura R-60A). Sin embargo, no se observó correlación con *SLC22A1-ASGF* (figura R-60B). Por el contrario, en la mayoría de las DB de HCCDB se observó un aumento en la expresión de *HNRNPK* (figura R-60C). Los niveles altos de expresión se asociaron con una supervivencia significativamente reducida en pacientes con HCC. (figura R-60D). También se observó incremento en la expresión del gen en las seis muestras pareadas de HCC medida por nosotros (figura R-61 A), así como una disminución significativa en las tres líneas celulares de HCC (figura R-61B).



**Figura R-60.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *HNRNPK* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de

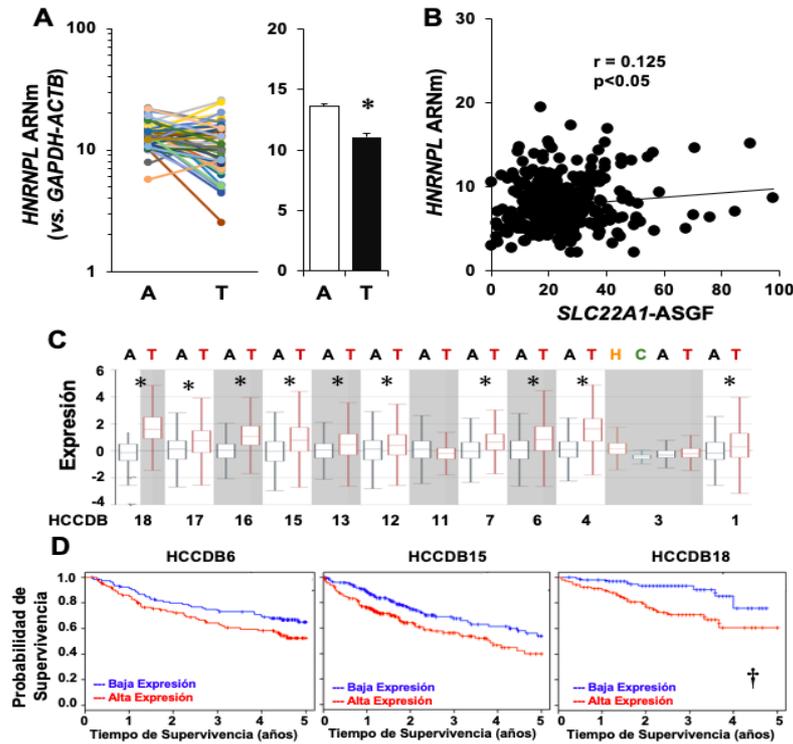


TCGA (A). Correlación entre la expresión de *HNRNPK* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *HNRNPK* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando T con A, †  $P < 0.05$  valor pronóstico de la supervivencia con expresión alta o baja).

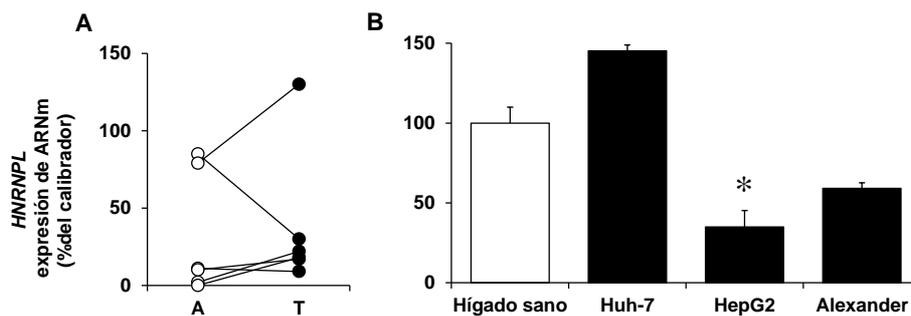


**Figura R-61.** Expresión del gen *HNRNPK* medida por RT-qPCR en muestras pareadas (n=6) de HCC y el tejido adyacente no tumoral (T, A respectivamente) (A) y en líneas celulares de HCC (B) (\*,  $p < 0.05$ ).

Los datos de expresión del gen *HNRNPL* fueron variables, ya que se observaron discrepancias consistentes entre las DB de HCCDB y los datos de los pareados T y A del TCGA. En los datos pareados se pudo ver una disminución significativa de la expresión de *HNRNP* en HCC (figura R-62A), mientras que en la mayoría de las DB de HCCDB la expresión estaba aumentada en HCC (figura R-62C). Se observó que la expresión de *HNRNP* se asociaba a una mayor supervivencia de los pacientes con HCC (figura R-62D) y que había correlación con *SLC22A1-ASGF* (figura R-62B). La discrepancia en los niveles de expresión también se observó en las seis muestras pareadas de la cohorte medida en nuestro laboratorio (figura R-63A) y en las tres líneas celulares, donde se pudo observar un aumento no significativo en la expresión en las células Huh7, y una disminución significativa en las células HepG2 y Alexander (figura R-63B).



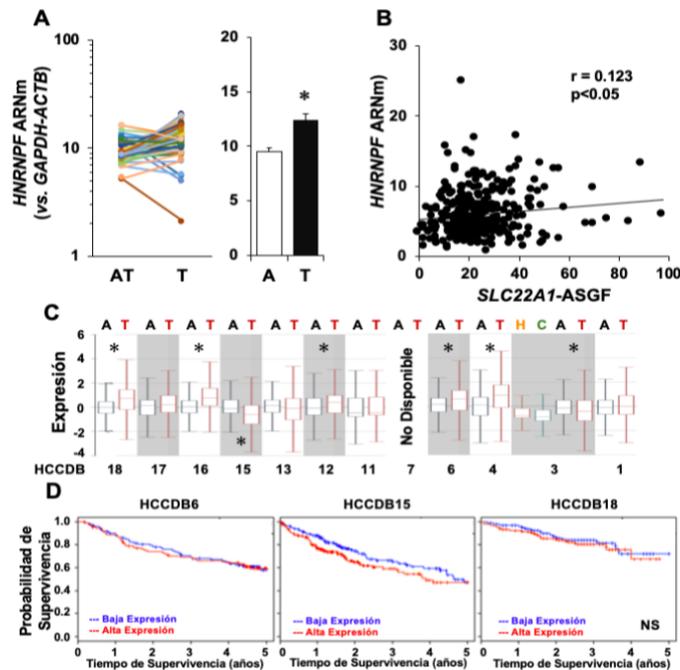
**Figura R-62.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *HNRNPL* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *HNRNPL* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *HNRNPL* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando T con A, †  $P < 0.05$  valor pronóstico de la supervivencia con expresión alta o baja).



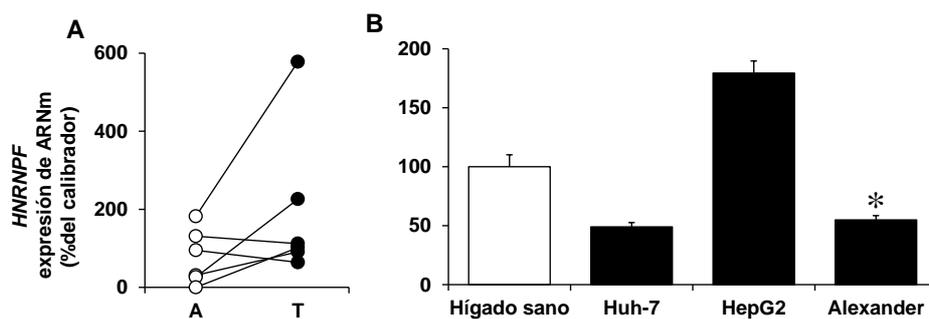
**Figura R-63.** Expresión del gen *HNRNPL* medida por RT-qPCR en muestras pareadas ( $n=6$ ) de HCC y el tejido adyacente no tumoral (T, A respectivamente) (A) y en líneas celulares de HCC (B) (\*,  $p < 0.05$ ).

Según datos del TCGA, la expresión del gen *HNRNPF* estaba elevada en el tejido tumoral (figura R-64A), al igual que encontramos en la mayoría de las DB de HCCDB (figura R-64C), aunque no se relacionó con la supervivencia en las tres DB analizadas (figura R-64D). Adicionalmente, se vio correlación de la expresión de *HNRNPF* con el

valor de *SLC22A1*-ASGF (figura R-64B). La sobreexpresión de este gen se pudo observar también en las muestras pareadas de HCC medidas por nosotros (figura R-65A) y en las células HepG2, pero no en las células Huh7 ni en las Alexander, donde se encontró una disminución (figura R-65B).



**Figura R-64.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *HNRNPF* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *HNRNPF* y el *splicing* alternativo de *OCT1* en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *HNRNPF* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

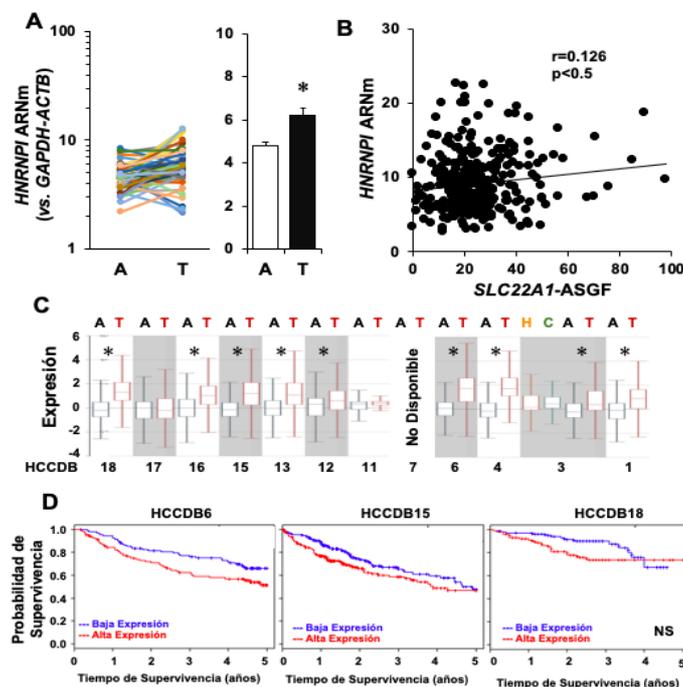


**Figura R-65.** Expresión del gen *HNRNPF* medida por RT-qPCR en muestras pareadas ( $n=6$ ) de HCC y el tejido adyacente no tumoral (T, A respectivamente) (A) y en líneas celulares de HCC (B) (\*,  $p < 0.05$ ).

Los datos del TCGA indicaban que la expresión de *HNRNPI* era significativamente mayor en HCC que en el tejido adyacente no tumoral (figura R-66A), mostrando una correlación con *SLC22A1*-ASGF (figura R-66B). Se observó, igualmente una alta expresión de este gen en casi todas las DB del HCCDB en el tejido tumoral (figura R-

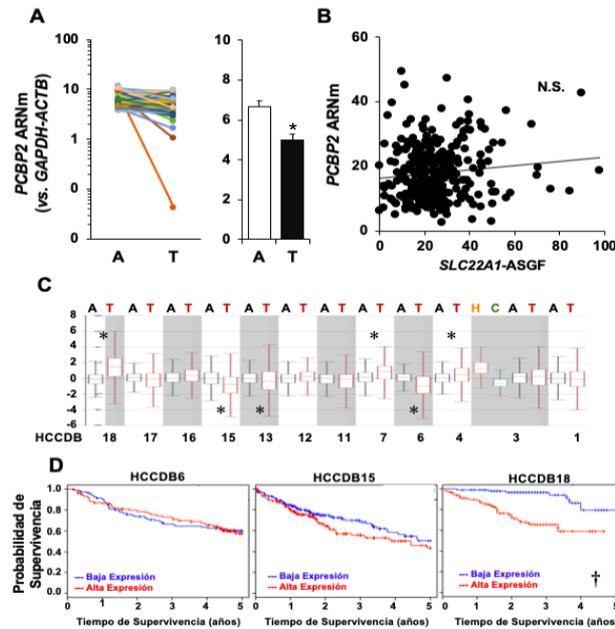


66C), aunque no se encontró relación con la supervivencia de los pacientes con HCC (figura R-66D).

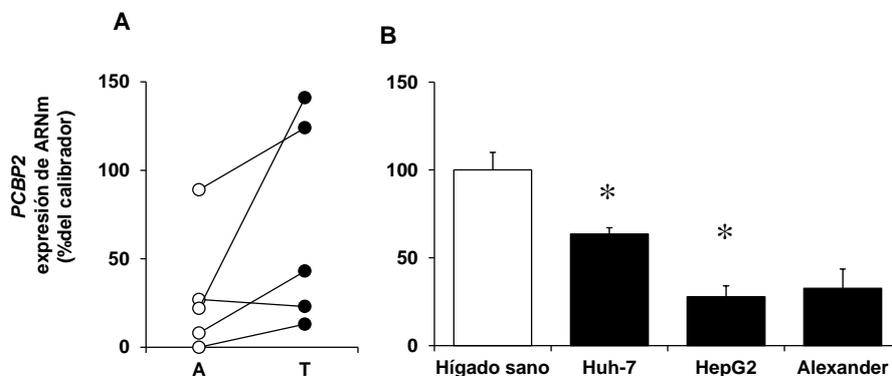


**Figura R-66.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *HNRNPI* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *HNRNPI* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *HNRNPI* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

Como otros genes estudiados en esta tesis doctoral, *PCBP2* mostró resultados contradictorios según las DB de HCCDB analizadas. En la DB del TCGA encontramos una leve disminución en la expresión de este gen en HCC (figura R-67A), mientras que en tres DB de HCCDB (DB4, DB7 y DB18) encontramos un aumento de la expresión y en otras tres (DB6, DB13, DB15) una disminución (figura R-67C). A pesar de estas discrepancias y a que la expresión de este gen no tuvo correlación con el grado de *splicing* de OCT1 (figura R-67B), sí presentó relación significativa con la supervivencia de los pacientes con HCC (figura R-67D). En las muestras pareadas de HCC medidas por nosotros (figura R-68A), se observó un aumento variable en la expresión de *PCBP2*, pero una disminución de la misma en las tres líneas celulares de HCC, aunque esta diferencia solo fue significativa en células Huh7 y HepG2 (figura R-68B).



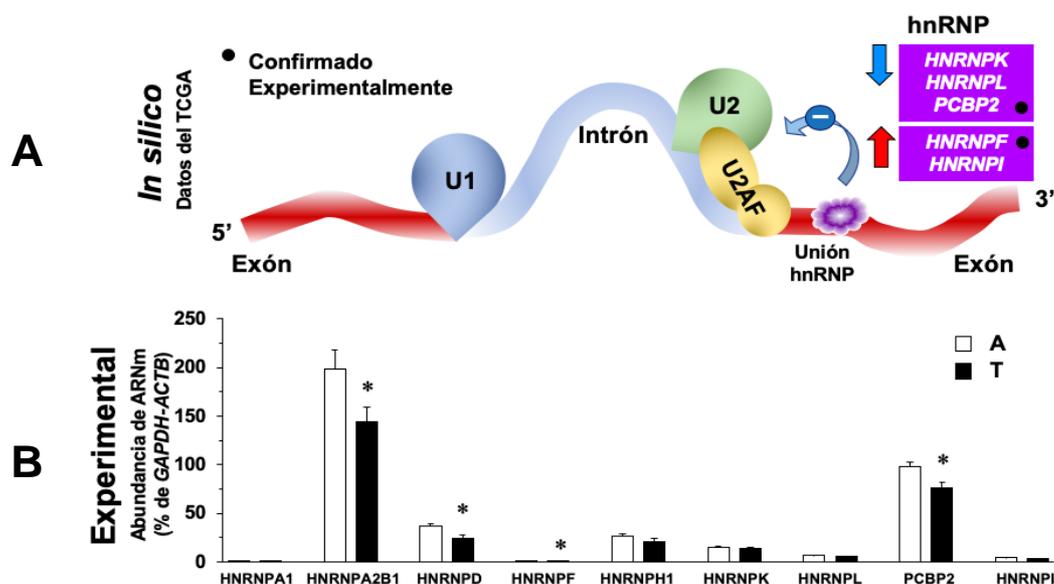
**Figura R-67.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *PCBP2* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *PCBP2* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *PCBP2* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando T con A, †  $P < 0.05$  valor pronóstico de la supervivencia con expresión alta o baja).



**Figura R-68.** Expresión del gen *PCBP2* medida por RT-qPCR en muestras pareadas ( $n=6$ ) de HCC y el tejido adyacente no tumoral (T, A respectivamente) (A) y en líneas celulares de HCC (B) (\*,  $p < 0.05$ ).

Los resultados de la TLDA en la cohorte de validación experimental de 25 muestras pareadas de HCC y el tejido adyacente no tumoral, mostraron que *HNRNPA1*, *HNRNPD*, y *PCBP2* presentaba una baja expresión en HCC, tanto en los estudios realizados *in silico* (figura R-69A) como en el estudio experimental (figura R-69B), mientras que la expresión de *HNRNPF* mostró un aumento significativo en tejido tumoral, tanto en el estudio realizado *in silico* (figura R-69A) como en el experimental (figura R-69B).





**Figura R-69.** Validación experimental de los cambios de expresión de las proteínas hnRNP. Esquema representativo de genes cuya expresión presenta cambios significativos asociados con HCC según los datos de ARN-seq disponibles en el TCGA (A). Resultados de validación de expresión génica en una cohorte de 25 muestras pareadas de carcinoma hepatocelular (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) determinada por TLDA (B). (\* $p < 0.05$ , comparando A y T).

#### 4.2.5. Quinasas / Fosfatasa

Un grupo de quinasas y fosfatasa actúan como enzimas reguladoras de las proteínas SR. El análisis pareado de muestras T y A del TCGA reveló una expresión alterada de las proteínas quinasas y fosfatasa que pueden modificar la actividad de los elementos de la maquinaria de *splicing* (tabla R-4).

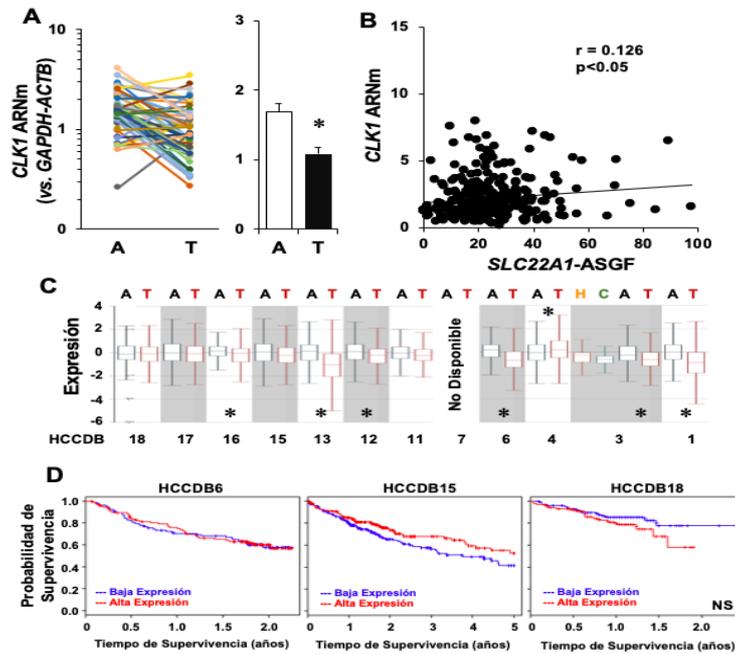
Así, en los datos del TCGA encontramos que la expresión de uno de los genes que codifica las quinasas nucleares, *CLK1*, estaba reducida en HCC (figura R-70A) y en casi todas las DB de HCCDB (figura R-70C). No encontramos relación en la supervivencia de los pacientes con HCC (figura R-70D), pero sí con el valor de *SLC22A1-ASGF* (figura R-70B). En las muestras pareadas de HCC analizadas (figura R-71A), se observó un aumento en la expresión de *CLK1* en cuatro muestras y disminución en dos. En las tres líneas celulares de HCC evaluadas se observó únicamente un aumento significativo en células HepG2 (figura R-71B).

Las otras quinasas nucleares, *CLK2*, *CLK3* y *CLK4*, mostraron en TCGA un aumento en la expresión en el tejido tumoral (figuras R-72, R-73 y R-74A), aunque dicho aumento fue muy leve y no estadísticamente significativo para *CLK4*. *CLK2* fue el único gen que vio aumentada su expresión tanto en los datos del TCGA como en los de HCCDB (figura

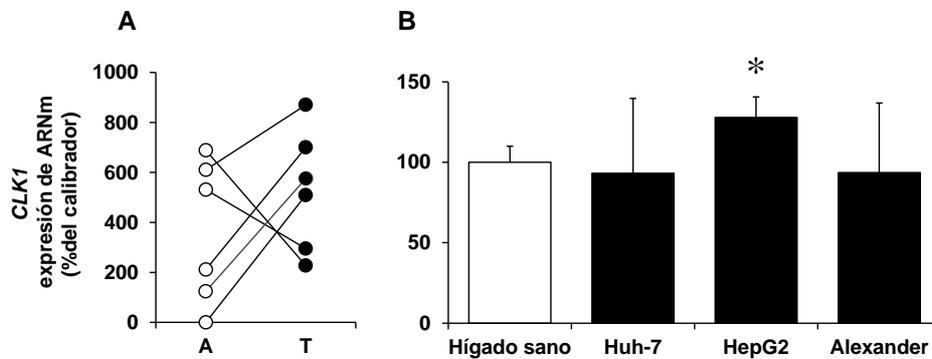
R-72C). Las otras quinasas mostraron resultados dispares (figura R-73C y R-74C), ya que para *CLK3*, en cinco DB del HCCDB se observó un aumento en su expresión (DB3, DB4, DB7, DB15 y DB18) y en cuatro DB una disminución (DB1, DB6, DB12 y DB17) (figura R-73C). La expresión de ninguna de las quinasas estudiadas presentó relación con la supervivencia de los pacientes con HCC (figuras R-72D y R-74D) mientras que todas, excepto *CLK4*, mostraron correlación con *SLC22A1*-ASGF (figuras R-72B, R-73B y R-74B).

**Tabla R-4.** Proteínas quinasas/fosfatasas que participan en el *splicing*. Información del TCGA sobre cambios en la expresión, de HCCDB sobre el valor de prognosis clínica y de SpliceSeq sobre la correlación del *splicing* con la expresión gen *SLC22A1*.

Función	Proteína	Gen	Cambios en la expresión	Correlación con <i>SLC22A1</i> -ASGF	Valor pronóstico	Ensamblaje	AN
Quinasas nucleares	"CDC like kinase 1"	<i>CLK1</i>	Baja	Si	No	ENSG00000013441	NM_004071.3
	"CDC like kinase 2"	<i>CLK2</i>	Sube	Si	No	ENSG00000176444	NM_001294338.1
	"CDC like kinase 3"	<i>CLK3</i>	Sube	Si	No	ENSG00000179335	NM_001130028.1
	"CDC like kinase 4"	<i>CLK4</i>	Ninguno	No	No	ENSG00000113240	NM_020666.2
Quinasas citoplasmáticas	SRSF protein kinase 1	<i>SRPK1</i>	Sube	No	No	ENSG00000096063	NM_003137.4
	SRSF protein kinase 1	<i>SRPK2</i>	Ninguno	No	No	ENSG00000135250	NM_182692.2
Fosfatasas	PP1A	<i>PPP1CA</i>	Sube	Si	No	ENSG00000172531	NM_002708.3
	PP2A	<i>PPP2CA</i>	Sube	Si	No	ENSG00000113575	NM_002715.3

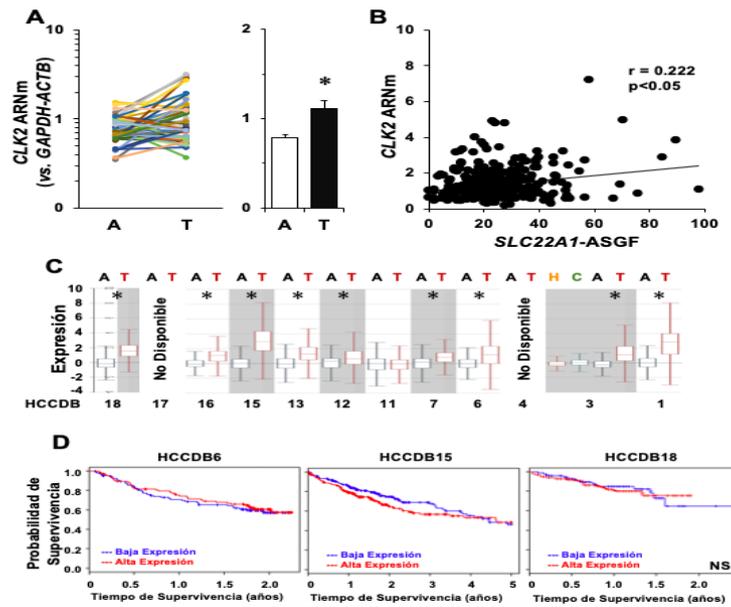


**Figura R-70.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *CLK1* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *CLK1* y el *splicing* alternativo de *OCT1* en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *CLK1* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$ ).

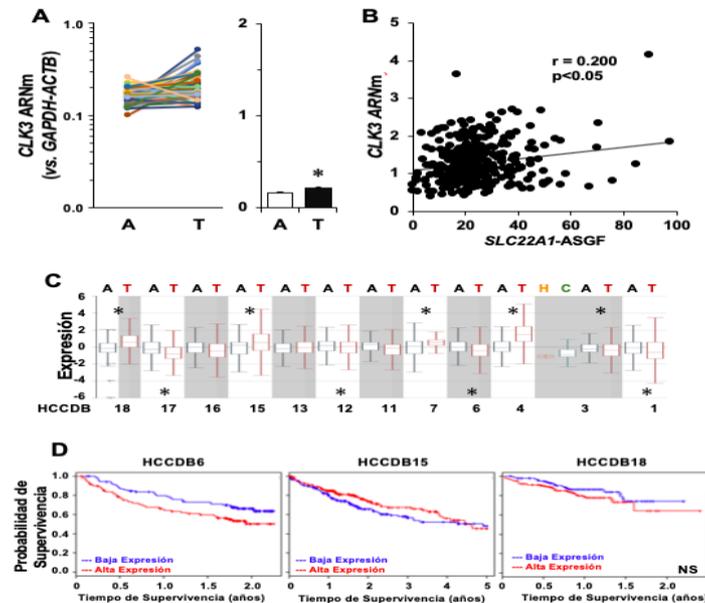


**Figura R-71.** Expresión del gen *CLK1* medida por RT-qPCR en muestras pareadas ( $n=6$ ) de HCC y el tejido adyacente no tumoral (T, A respectivamente) (A) y en líneas celulares de HCC (B) (\*,  $p < 0.05$ ).

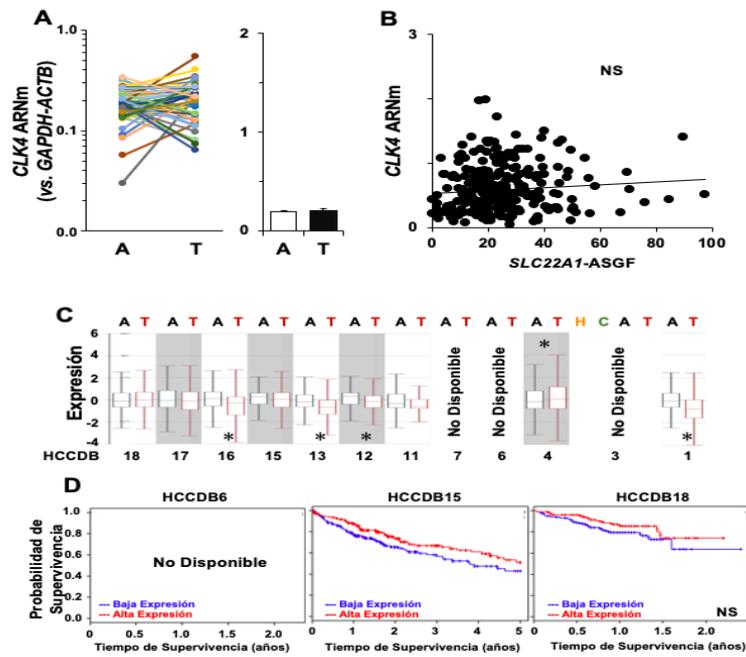
Debido a su nivel bajo de expresión, el gen *CLK4* no se incluyó en el estudio de la expresión génica mediante RT-qPCR en muestras pareadas y líneas celulares de HCC. Para las quinasas *CLK2* y *CLK3* se encontró un aumento en la expresión de ambos genes en cuatro muestras pareadas de HCC y disminución en otras dos (figura R-75, A y C), mientras que en las líneas celulares se observó una disminución en la expresión de los dos genes (figura R-75, B y D).



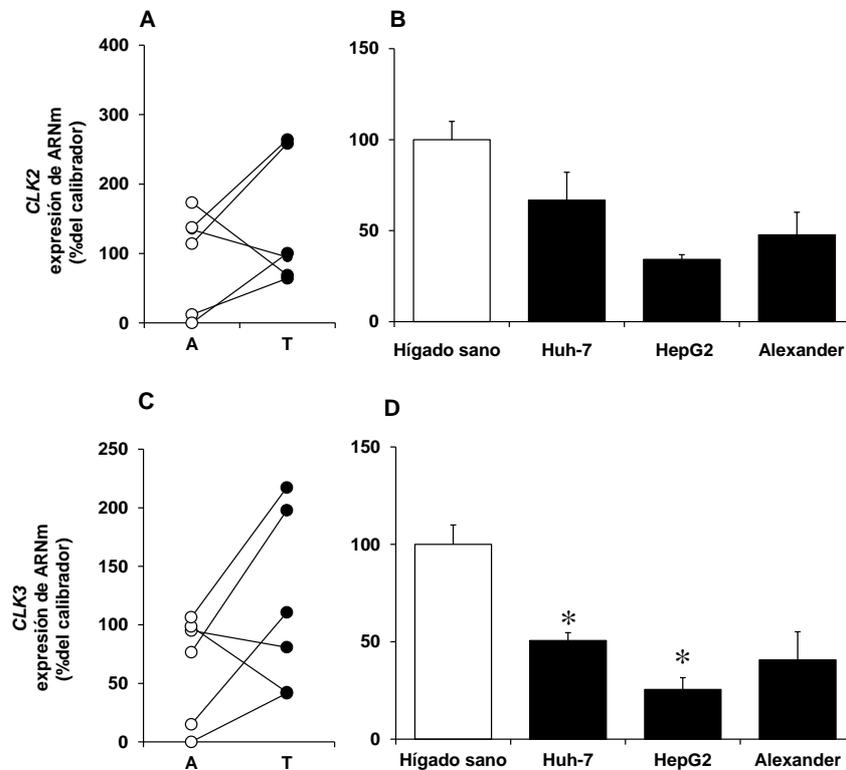
**Figura R-72.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *CLK2* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *CLK2* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *CLK2* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$ ).



**Figura R-73.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *CLK3* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *CLK3* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *CLK3* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$ ).



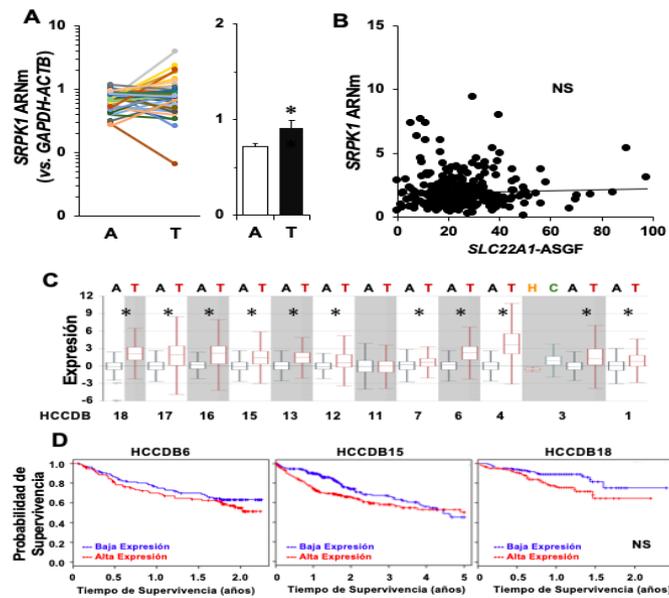
**Figura R-74.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *CLK4* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *CLK4* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *CLK4* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$ ).



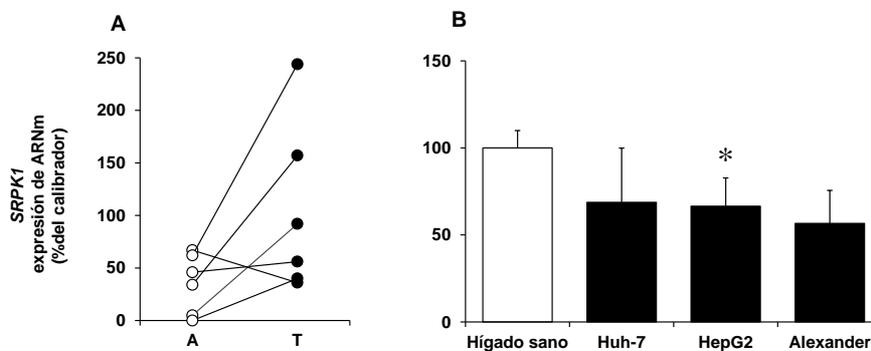
**Figura R-75.** Expresión de los genes *CLK2* (A y B) y *CLK3* (C y D) medida por RT-qPCR en muestras pareadas ( $n=6$ ) de HCC y el tejido adyacente no tumoral (T, A respectivamente) (A y C) y en líneas celulares de HCC (B y D) (\*,  $p < 0.05$ ).



La proteína-quinasa citoplásmica *SRPK1* mostró niveles altos de expresión tanto en el tejido adyacente como en el tumoral en el TCGA. Además, se pudo observar una sobreexpresión moderada pero significativa en HCC (figura R-76A), que se confirmó en casi todas las DB del HCCDB, excepto en la DB11 (figura R-76C) y en cinco de las muestras pareadas de HCC medidas en nuestro laboratorio (figura R-77A). Por otro lado, no se encontró correlación entre la expresión de *SRPK1* y *SLC22A1-ASGF* (figura R-76B) y la supervivencia de pacientes con HCC (figura R-76C). Las tres líneas celulares de HCC estudiadas mostraron niveles de expresión más bajos de los que se observan en el hígado sano y de manera significativa en las HepG2 (figura R-77B).

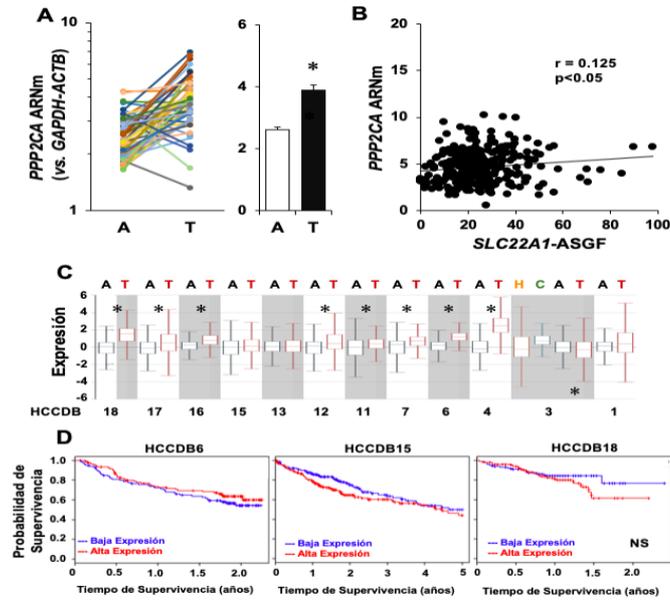


**Figura R-76.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *SRPK1* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) analizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *SRPK1* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *SRPK1* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).

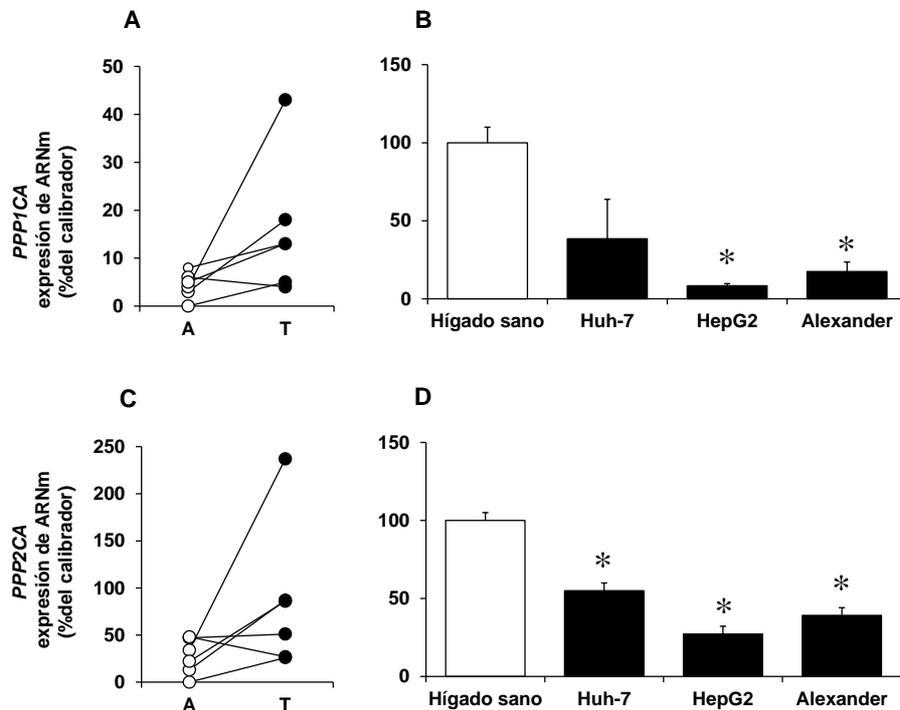


**Figura R-77.** Expresión del gen *SRPK1* medida por RT-qPCR en muestras pareadas (n=6) de HCC y el tejido adyacente no tumoral (T, A respectivamente) (A) y en líneas celulares de HCC (B) (\*,  $p < 0.05$ ).





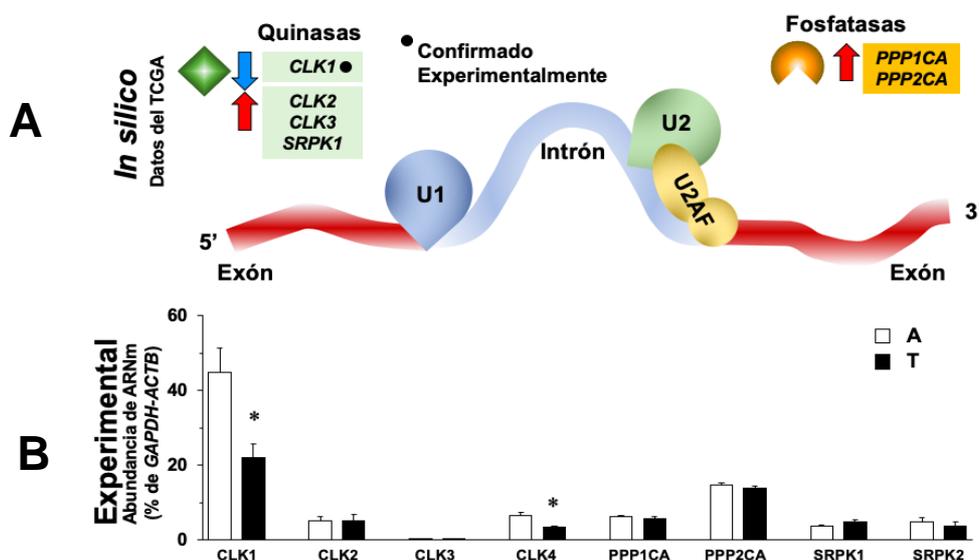
**Figura R-79.** Análisis *in silico* de la expresión de ARNm de *PPP2CA* en muestras pareadas de HCC (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) utilizando los datos de TCGA (A). Correlación entre la expresión de *PPP2CA* y el *splicing* alternativo de OCT1 en HCC. El *splicing* alternativo se presenta como ASGF, la frecuencia global del *splicing* alternativo del gen obtenida por el análisis de los datos disponibles en la DB SpliceSeq (B). Expresión de este gen en T y A utilizando varias DB de HCCDB (C). Curvas de supervivencia en años, según la expresión de *PPP2CA* en las DB de HCCDB (D). (\*,  $p < 0.05$  comparando A y T).



**Figura R-80.** Expresión de los genes *PPP1CA* (A y B) y *PPP2CA* (C y D) medida por RT-qPCR en muestras pareadas ( $n=6$ ) de HCC y el tejido adyacente no tumoral (T, A respectivamente) (A y C) y en líneas celulares de HCC (B y D) (\*,  $p < 0.05$ ).

Por último, quisimos confirmar experimentalmente los cambios en la expresión génica de las quinasas y fosfatasa en muestras pareadas, medidas por TLDA. Los resultados

experimentales confirmaron la baja expresión de *CLK1*. En los estudios *in silico* se observó una expresión significativamente reducida de *CLK4*, que fue confirmada experimentalmente utilizando TLDA en las muestras pareadas de HCC (figura R-81B). La sobre expresión en los genes de *PPP1CA* y *PPP2CA* en HCC observada *in silico* (figura R-81A) no se confirmó experimentalmente en las muestras pareadas de HCC analizadas por nosotros (figura R-81B).



**Figura R-81.** Validación experimental de los cambios de expresión de las quinasas y fosfatasas. Esquema representativo de genes cuya expresión presenta cambios significativos asociados con HCC según los datos de ARN-seq disponibles en el TCGA (A). Resultados de validación de expresión génica en una cohorte de 25 muestras pareadas de carcinoma hepatocelular (T) y el tejido adyacente no tumoral (A) determinada por TLDA (B). (\* $p < 0.05$ , comparando A y T).

En general, podemos decir que los resultados mostrados constatan cambios significativos en muchos de los genes implicados en la maquinaria de *splicing*, genes que codifican tanto proteínas del espliceosoma como proteínas reguladoras del proceso de *splicing*. Cuya implicación en el procesamiento del pre-RNm de *SLC22A1* y sus repercusiones clínicas se comentan en el apartado de discusión de esta tesis doctoral.

## 5. Discusión

Los tumores hepáticos primarios, representados principalmente por HCC y CCA en adultos y hepatoblastoma en niños, constituyen el quinto tipo de cáncer más frecuente a nivel mundial y la tercera causa de muerte por cáncer (Torre LA *et al.*, 2016). Aunque la cirugía es la mejor opción curativa para los pacientes, debido al diagnóstico en un estadio avanzado, la resección quirúrgica frecuentemente no puede realizarse. Por otro lado, la quimioterapia disponible no es suficientemente eficaz, mostrando, en el mejor de los casos, un leve efecto beneficioso sobre la supervivencia de los pacientes (Llovet JM *et al.*, 2008). Esto también ocurre con los fármacos inhibidores de tirosina quinasa como son el sorafenib, el regorafenib, el levantinib y el cabozatinib. Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación demostraron que el transportador OCT1 juega un papel importante en la captación de sorafenib y que la expresión de este transportador en tumores hepáticos está muy disminuida por distintas razones, que incluyen la metilación del promotor, la aparición de mutaciones inactivantes, el aumento de expresión de miRNAs que degradan el ARNm de OCT1 y la existencia de un elevado grado de *splicing* aberrante (Martinez-Becerra P *et al.*, 2012) (Herraez E *et al.*, 2013) (Al Abdulla R *et al.*, 2019) (Lozano E *et al.*, 2019).

Es bien conocido que el *splicing* alternativo permite que un solo gen produzca una variedad de proteínas con distribución, localización, regulación o función alteradas en tejidos. Por otra parte, el *splicing* alternativo aberrante ha sido frecuentemente observado en células neoplásicas, de hecho, se han realizado estudios genómicos que han caracterizado el número de eventos *splicing* alternativo aberrantes en cáncer (David CJ & Manley JL., 2010) (Luo C *et al.*, 2017). Los mecanismos responsables de las alteraciones observadas en las células cancerosas, podrían estar relacionados con distintos factores dentro del proceso del *splicing* como son, la expresión anormal de los factores de *splicing* (Kim E *et al.*, 2008) o la existencia de mutaciones en las secuencias potenciadoras o silenciadoras del *splicing* (Berasain C *et al.*, 2010), entre otras.

Los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio en el marco del proyecto TRANSFER, que se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Andreas Geier de la Universidad de Würzburg en Alemania, demostraron que la presencia del transportador OCT1 en la membrana plasmática de las células del tumor se asociaba con una mayor supervivencia de los pacientes con HCC avanzado tratados con sorafenib. Sin embargo, si el OCT1 presentaba una elevada expresión, pero se localizaba en el citoplasma de las células tumorales, no se observaba diferencia con los pacientes cuyos tumores expresaban bajos niveles de OCT1. Esto es razonable, ya que la proteína localizada en el interior celular no contribuye al transporte de sorafenib. Además, se ha descrito que



alteraciones en la regulación de los patrones de *splicing*, se asocian con muchas enfermedades humanas, entre las que se incluye el cáncer. De hecho, varios estudios han demostrado que el *splicing* aberrante de muchos genes, incluido el *SLC22A1* está aumentado en HCC (Herraez E *et al.*, 2013) (Tremblay MP *et al.*, 2016), lo que sugiere que cambios en el perfil global de *splicing* alternativo juegan un papel, tanto en la carcinogénesis, como en la alta variabilidad de expresión génica interindividual.

Como ya se ha mencionado, en estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, se ha encontrado que además de la reducción en el ARNm de OCT1 en el tejido tumoral (tanto HCC como CCA) en comparación con el tejido no tumoral, la proporción de formas de *splicing* aberrante está marcadamente aumentada en los tumores. Además, sorprendentemente también en el tejido circundante, lo que contribuye de manera notable a una reducción aún mayor en la función del transportador OCT1. Curiosamente, tanto en HCC, como en CCA, la aparición de formas de *splicing* aberrante en algunos estudios no se ha visto estrictamente relacionada con la carcinogénesis, ya que se ha encontrado una proporción similar de *splicing* aberrante en el tejido cirrótico no tumoral, aunque no así en el tejido hepático sano (Al Abdulla R *et al.*, 2019). No obstante, las alteraciones en el proceso de *splicing* son en muchos casos una causa de la aparición de cáncer y quimiorresistencia (Berasain C *et al.*, 2010).

El proceso de *splicing* es llevado a cabo por una estructura macromolecular muy compleja, el espliceosoma, en el que participan directa o indirectamente hasta 300 proteínas. Los resultados de nuestro estudio sobre si la desregulación del *splicing* sugieren que se trata de un evento temprano en las lesiones premalignas, o si el tejido adyacente se ve afectado por cambios en factores que controlan el *splicing* en el tumor, revelaron la presencia de abundante ARNm en formas de *splicing* aberrante en el tejido adyacente, como se ilustra por la presencia de amplicones de 534, 521 y 421 pb, fenómeno semejante a lo ya observado en el tejido tumoral (figura R-2). Este patrón de bandas probablemente se corresponde con la escisión de los exones 9, 10 y 9+10 y podría significar que los eventos de *splicing* alternativo pueden ocurrir antes de la formación de la neoplasia. Asimismo, refuerzan la idea de que la disminución en la expresión de OCT1 en el tejido tumoral y el deterioro de su función puede deberse al *splicing* y escisión de los exones 10 y 9+10 del gen (Al Abdulla R *et al.*, 2019). Por otra parte, debido a que el *splicing* alternativo de OCT1 ocurre en estadios pretumorales, el perfil de *splicing* de este gen podría ser útil para el desarrollo de técnicas diagnósticas en los pacientes con enfermedades hepáticas crónicas con alto riesgo de producir



tumores hepáticos, para lo que se requeriría hacer un estudio completo en series de biopsias hepáticas con diferentes patologías.

Para confirmar la hipótesis que hemos planteado sobre el mecanismo de *splicing*, se analizó por RT-qPCR la presencia de *splicing* aberrante en muestras de varias hepatopatías. Se observó que en hepatosiderosis aparecen 3 bandas de 534, 521 y 421 pb sugerentes de la escisión de los exones 9 o 10 y 9+10 (figura R-3 A,B y figura R-4). En las muestras de colestasis, se observan 2 bandas de 521 y 421 pb que pueden ser el resultado de la escisión de los exones 9 o 10. (figura R-3 A, B y figura R-4). Estos resultados muestran que la escisión de los exones 9 y 10 puede ser un hecho común en tejido hepático enfermo, al igual que en el neoplásico, y son consistentes con la presencia de alteraciones en el *splicing* en varias afecciones hepáticas en ausencia de cáncer (Berasain C *et al.*, 2010) (Webster N., 2017).

Para profundizar en los estudios sobre las causas del *splicing* alternativo aberrante del gen *SLC22A1* en HCC, se han determinado los cambios en la expresión de los principales genes de *splicing* que pueden afectar al proceso de reconocimiento exónico. Una primera parte de nuestra investigación sobre el *splicing* alternativo aberrante de OCT1 se realizó mediante estudios *in silico*, de varias bases de datos (DB) disponibles online, el *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), la base *Integrative Molecular Database of Hepatocellular Carcinoma* (HCCDB) y el recurso SpliceSeq: (*A resource for analysis and visualization of RNA-Seq data on alternative splicing and its functional impacts*). Los resultados obtenidos de estas DB sobre la expresión de genes del espliceosoma se evaluaron experimentalmente por RT-qPCRs o por TLDAs (96 genes) en una cohorte de 25 muestras pareadas de HCC.

Para investigar el papel de los cambios en la expresión de genes del espliceosoma en el *splicing* del gen *SLC22A1*, en el estudio *in silico* realizado en esta tesis doctoral se ha empleado un enfoque basado en eventos; utilizado previamente para detectar eventos individuales relacionados con el desarrollo del cáncer o su pronóstico (Danan-Gotthold M *et al.*, 2015) (Shen S *et al.*, 2016) (Dvinge H & Bradley RK 2015). Por lo tanto, se evaluaron los datos disponibles en la base de datos del TCGA, donde se llevó a cabo un análisis pareado para estudiar la expresión de los genes involucrados en la formación, actividad y regulación del *splicing*. El conjunto de datos se utilizó para correlacionar cambios en la maquinaria de reconocimiento de exones y el *splicing* alternativo en el gen *SLC22A1* en HCC con los datos de SpliceSeq. Asimismo, para



enriquecer el estudio sobre la expresión de genes presentes en la maquinaria del *splicing*, se utilizó la base integrativa de datos HCCDB (muestras no pareadas).

Es importante destacar la discrepancia entre las diferentes cohortes analizadas con respecto a los cambios en la expresión de genes, asociados al HCC, de proteínas involucradas en la maquinaria de maduración de ARNm. En varios casos, diferentes DB muestran cambios, estadísticamente significativos, que van en direcciones opuestas entre sí, algunos de ellos con mayor significación que otros. Esto pone de manifiesto la dificultad de obtener conclusiones en algunos casos debido a la gran variabilidad interindividual en tejidos tumorales y adyacentes. Nuestros resultados sugirieron que analizar todos los datos de la misma cohorte de manera global (no pareados en el caso de HCCDB) puede llevar a conclusiones erróneas. Esto se constató cuando los datos de la misma cohorte (TCGA) se analizaron de manera pareada mediante la comparación de tejido adyacente y tumoral de cada paciente, en los casos en los que fue posible. Al hacerlo de este modo, los resultados fueron más sólidos, menos heterogéneos y más parecidos a los que se obtuvieron de los estudios realizados con muestras de HCC analizadas por nosotros mediante las TLDA.

En lo concerniente a la alta variabilidad interindividual, la misma se ha observado en diferentes estudios, lo que puede deberse tanto a factores genéticos como a factores no genéticos (Nies AT *et al.*, 2009).

En esta tesis doctoral además de investigar los cambios en la expresión génica de las proteínas del espliceosoma, se evaluó la correlación entre la expresión de estos genes con el *splicing* de OCT1 (*SLC22A1-ASGF*) y con la supervivencia de los pacientes. Desde el punto de vista clínico, es relevante mencionar que algunos cambios observados en tres DB de HCCDB (DB6, DB15 y DB18), podrían estar asociados con una supervivencia o más corta o más larga. No obstante, debido a la heterogeneidad de las cohortes y a la falta de información detallada sobre el tratamiento recibido por todos los pacientes, es difícil establecer una relación causa-efecto fiable entre los cambios en la expresión de genes implicados en el espliceosoma y su impacto en la supervivencia del paciente. Sin embargo, algunos cambios en expresión, asociados con *SLC22A1-ASGF*, de genes que codifican proteínas que favorecen o inhiben el *splicing* corto (proteínas SR y hnRNP) respectivamente, podría favorecer la generación de variantes de ARNm aberrantes. Esto conduce a una disminución en el nivel de funcionalidad del transportador OCT1 que se expresa en células cancerosas y, por lo tanto, también en su capacidad para captar y responder al fármaco sorafenib (Soto M *et al.*, 2020).



Para discutir los cambios observados en la expresión génica, seguiremos la secuencia temporal de reconocimiento de exones que ya se siguió en el apartado de resultados: complejo E, complejo B, proteínas SR, proteínas hnRNP, quinasas y fosfatasa.

El proceso de *splicing* comienza con el ensamblaje del llamado complejo pre-esplíceosomal que define el intrón. Esto implica el elemento U1, que se compone de tres proteínas específicas de U1 y siete proteínas Sm, algunas de las cuales, como *SNRPA*, *SNRPB*, *SNRPC*, *SNRPD1* y *SNRPE*, se encuentran sobreexpresadas en HCC. El gen *SNRPB* es el gen con expresión más elevada en HCC, aunque muestra niveles altos en el tejido adyacente no tumoral. La expresión elevada de este gen se confirmó experimentalmente por las TLDA en muestras de HCC. La alta expresión de *SNRPA* y *SNRPB*, se correlacionó con el *splicing* de *SLC22A1* (*SLC22A1-ASGF*); debe destacarse que *SNRPB* y *SNRPD1* están entre los genes cuya sobreexpresión se asocia con una supervivencia más corta del paciente.

Desconocemos si estos cambios en los niveles de expresión dan como resultado un esplíceosoma más activo, así como, qué consecuencias podría tener esta alta actividad esplíceosomal. El *splicing* es un proceso dinámico que necesita de una regulación específica para que la maquinaria pueda funcionar correctamente. Si su actividad se ve comprometida por una actividad acelerada, es probable que las proteínas necesarias para la formación del complejo y posterior funcionalidad no se unan a los sitios correctos o no funcionen de la manera que deberían, pudiendo provocar desregulaciones en el proceso de la maduración del pre-ARNm, dando como resultado proteínas aberrantes y truncadas, funcionalmente inútiles.

La expresión del gen *SNRPB* se correlacionó con el *splicing* de *OCT1* y se asoció con una supervivencia menor en pacientes. La sobreexpresión de *SNRPB* también se ha observado en otros tipos de cáncer. En este sentido, en cáncer de pulmón, la sobreexpresión de *SNRPB* se asoció con una menor probabilidad de supervivencia (Valles I *et al.*, 2012). También se observó que el *knockdown* de *SNRPB* en líneas celulares de cáncer de pulmón inhibía su crecimiento, lo que sugiere que *SNRPB* juega un papel importante en la proliferación de las células tumorales (Valles I *et al.*, 2012). El silenciamiento de este gen inhibió la invasión y migración celular. En estudios realizados a nivel proteico por Western blot se demostró que el *knockdown* de *SNRPB* reducía el nivel de marcadores asociados a la transición epitelio-mesenquimal, como *MMP2* y *MMP9*, lo que indica que *SNRPB* juega un papel favoreciendo la metástasis (Liu N *et al.*, 2019).



En otro estudio realizado en pacientes con HCC, se observó la sobreexpresión de *SNRPB* a nivel de ARNm y de proteína. Esta sobreexpresión se asoció con un mayor grado patológico, invasión celular, aumento en los niveles de AFP, metástasis y en general menor supervivencia (Peng N *et al.*, 2020). Este estudio demostró que la sobreexpresión de *SNRPB* está mediada por *c-Myc*. Los estudios y resultados mencionados sugieren que el gen *SNRPB* podría explorarse como un potencial factor pronóstico en HCC (Peng N *et al.*, 2020).

El siguiente paso en el reconocimiento de exones implica la interacción con las proteínas U2 snRNP, Sf1, U2af1 y U2af2; codificadas por los genes *SF1*, *U2AF1* y *U2AF2*. Tanto *SF1* como *U2AF1* presentaron una disminución en la expresión en HCC, lo que sugiere una menor capacidad para identificar el BPS, lo que puede provocar que no ocurra el primer ataque nucleófilico del sitio 5'SS; y la identificación de la región 3'SS, que puede generar un lugar alternativo 3'SS dando lugar a formas aberrantes de *splicing*.

No se encontraron cambios significativos en lo concerniente al nivel de expresión de los genes del complejo B, con la excepción de *PRPF3*, que mostró un aumento significativo, asociado a una disminución en la supervivencia del paciente. La expresión de este gen podría estar relacionada con la presencia de isoformas de HNF4 $\alpha$  fetales en HCC (Niehof M & Borlak J., 2008); que se ha asociado con una baja expresión del ARNm de OCT1 en hepatocitos humanos (Kamiyama Y *et al.*, 2007) y una baja expresión de OCT1 en la enfermedad hepática colestática (Li J *et al.*, 2019).

Con respecto a la función de las proteínas de reconocimiento de exones, varias proteínas SR (*SRSF2-8,10* y *SRRM1*) involucradas en la potenciación de la identificación de sitios débiles de *splicing*, mediante la unión a las regiones en *cis*, ESE e ISE, sufrieron una disminución en sus niveles de expresión en HCC. Estos resultados fueron confirmados experimentalmente mediante TLDAs, excepto para *SRSF2*, y son consistentes con los de estudios anteriores que indican una disminución en la expresión de *SRSF3* en HCC (Elizalde M *et al.*, 2014). Es importante señalar que la pérdida de *SRSF3* en los hepatocitos favorece la hepatocarcinogenesis en ratones (Sen S *et al.*, 2015).

No obstante, resultados de otro estudio muestran una disminución de la expresión de *SRSF3* en fibroblastos senescentes, provocado por la sobrerregulación de p53 $\beta$ , una isoforma generada por *splicing* alternativo de p53 (Tang Y *et al.*, 2013). Estos resultados sugieren que la disminución en la expresión de *SRSF3*, podría provocar la aparición de

distintas isoformas de otros genes que podrían propiciar la hepatocarcinogenesis. Por último, se ha observado que la disminución en la expresión de *SRSF3* puede favorecer la exclusión de exones (DeLigio JT *et al.*, 2019).

En lo que respecta a la disminución en la expresión de las proteínas SR, esta fue particularmente marcada para *SRSF5* y *SRSF6*, y se relacionaba con el *splicing* de OCT1. Otros genes que también mostraron una disminución en la expresión y se correlacionaron con el *splicing* de OCT1 fueron *SRSF4*, *SRSF5*, *SRSF8*, *SRSF10* y *SRRM1*. Aunque de signo contrario a lo observado por nosotros en los estudios *in silico*, no así en los estudios con las TLDA, son de interés los resultados que indican que la sobreexpresión de *SRSF2* se asocia con hepatocarcinogenesis y con una peor prognosis (Lou C *et al.*, 2017).

Se podría decir que, la consecuencia funcional de la baja expresión de las proteínas SR es una mayor probabilidad de omisión del exón, que podría afectar a la proteína transportadora OCT1, ya sea por tratarse de una proteína más corta que no alcanza la membrana plasmática o por que muestre una función antagónica. Adicionalmente, las proteínas SR, contienen gránulos de intercromatina, que son sitios de unión de otros factores de *splicing*, y una baja expresión de estas proteínas SR dificultaría el ensamblaje del complejo de reconocimiento exónico (Sacco-Bubulya P & Spector DL., 2002).

Las proteínas que favorecen un *splicing* largo, por medio del desplazamiento de las proteínas SR, mostraron resultados más heterogéneos, en cuanto a su nivel de expresión, ya que en algunas disminuía mientras que en otras aumentaba. Los genes *HNRNPF* y *HNRNPI* mostraron un aumento en su expresión, pero solo el aumento de *HNRNPI* se correlacionó con el *splicing* de OCT1. *HNRNPF* también se ha visto sobreexpresado en otros tipos de cáncer, como el de vejiga donde la alta expresión fue necesaria para el crecimiento del tumor y para la inducción de la transición epitelio-mesenquimal y posterior metástasis. Todo ello mediante la unión de hnRNPF al 3' UTR del ARNm de Snail1 que mejora su estabilidad (Li F *et al.*, 2019).

Sin embargo, algunos genes, como *HNRNPK*, *HNRNPL* y *PCBP2*, mostraron una expresión baja, aunque solo la disminución en la expresión de *HNRNPL* mostró correlación con el *splicing* de OCT1. Es importante señalar que *HNRNPK* tenía aumentado su nivel de expresión en casi todas las DB del HCCDB, excepto en la DB3, en que se vio disminución en el tejido neoplásico y aumento en el tejido cirrótico. Los



resultados de otros trabajos han propuesto a *HNRNPK* como un biomarcador, solo o en combinación con AFP, para detección de HCC temprano o para discernir entre etapas tempranas de HCC vs. nódulos benignos, especialmente en pacientes con cirrosis (Guo Y *et al.*, 2012). Este aumento en la expresión de *HNRNPK* está relacionado probablemente con la baja expresión de la claudina-4. En cáncer de hígado, la baja expresión de claudina-4 se asocia con cáncer poco diferenciado, con fenotipos más invasivos en CCA y con hepatocitos dañados (Hammam O *et al.*, 2017). No obstante, en otros estudios se ha observado una disminución de *HNRNPK* en HCC (Shu H *et al.*, 2019).

Por otro lado, la expresión anormal de *HNRNPK* se asocia con la formación, desarrollo y pronóstico del tumor. En este sentido, en algunos tumores, la sobreexpresión de *HNRNPK* está asociada con un pronóstico desfavorable al potenciar un posible efecto oncogénico a través de la regulación de c-Myc, c-Src y eIF4E (Lynch M *et al.*, 2005). Asimismo, *HNRNPK* actúa como un coactivador transcripcional de p53; la disminución en la expresión de *HNRNPK* atenúa la activación de p21 y los niveles de C/EBP activando la señalización de STAT3. Adicionalmente, los ratones haploinsuficientes *Hnrnpk* son propensos al desarrollo de tumores, lo que sugiere que *HNRNPK* desempeña un papel potencial en la supresión tumoral (Moumen A *et al.*, 2005) (Enge M *et al.*, 2009) (Huang H *et al.*, 2017). La disminución en la expresión, en contraste con el aumento, influiría en el equilibrio hacia un *splicing* más corto. Los cambios en el *splicing* del pre-ARNm, podrían conducir a que se transcriban indebidamente fragmentos exónicos y/o intrónicos.

Por último, las proteínas HNRNP tienen una diversidad de roles potenciales en la inhibición de la angiogénesis, apoptosis, la invasión celular y la transición epitelial-mesenquimatosa. Por ello, se sugiere que las proteínas HNRNP podrían ser un objetivo terapéutico novedoso y prometedor y un marcador para la respuesta a tratamientos y para la evaluación del pronóstico (Han N *et al.*, 2013).

Otro hallazgo importante de esta tesis doctoral ha sido el marcado cambio en los niveles de expresión que afecta a las proteínas reguladoras implicadas en la fosforilación, quinasas, y la desfosforilación, fosfatasas, de las proteínas involucradas en la maquinaria de reconocimiento de exones. Las quinasas y fosfatasas son fundamentales para la regulación de la actividad de las proteínas que participan en el *splicing*. De hecho, el grado de fosforilación de las proteínas SR determina la especificidad de unión



a secuencias específicas, ESE y/o ISE, lo que es clave para la interacción con otras proteínas que actúan en *cis* y *trans* en el proceso de *splicing*.

Los resultados de nuestro estudio sobre los niveles de expresión de quinasas y fosfatasas mostraron niveles disminuidos y aumentados de las quinasas, y de manera consistente y más marcada, altos niveles en la expresión de las fosfatasas, ambas correlacionadas con el *splicing* de OCT1.

En general, estos resultados apuntan a un equilibrio a favor de las proteínas desfosforiladas, debido a la disminución de *CLK1*, y al aumento de *PPP1CA* y *PPP2CA*, consistentes con la función alterada de la maquinaria de reconocimiento de exones. La fosforilación inadecuada de algunos genes determina que estos no se unan a las secuencias adecuadas en *cis*, provocando un incorrecto ensamblaje de los complejos.

Las proteínas SR hiperfosforiladas por las quinasas nucleares, que están sobreexpresadas (*CLK2* y *CLK3*), y las hipofosforiladas inhiben el *splicing*, lo que indica que la fosforilación de las proteínas SR debe estar estrechamente regulada en las células (Zhong X *et al.*, 2009). La desregulación de la actividad de estas proteínas puede tener diferentes consecuencias, por ejemplo, el aumento en expresión de *CLK2*, está relacionado con cáncer de mama y su pérdida podría provocar el aumento de genes relacionados con la transición epitelio-mesenquimal (Yoshida T *et al.*, 2015).

Por todo esto, se requiere un análisis cuantitativo y funcional más detallado de las enzimas reguladoras individuales y sus proteínas diana para comprender la situación real de la maduración alterada del pre-ARNm en HCC.

En resumen, los resultados obtenidos en este apartado de esta tesis doctoral respaldan estudios anteriores (Herraez E *et al.*, 2013) (Al Abdulla R *et al.*, 2019) que muestran que en el tejido no tumoral adyacente al HCC, ya existe un grado considerable de *splicing* alternativo de OCT1, que es consistente con la observación frecuente de *splicing* alterado en varias afecciones hepáticas acompañadas de perturbación metabólica, pero en ausencia de cáncer (Berasain C *et al.*, 2010) (Webster NJG., 2017). Un ejemplo es lo que se ha constatado en el hígado de pacientes con obesidad y resistencia a la insulina, en los que se ha observado disminución de la expresión de varios factores de *splicing* codificados por los genes de las proteínas SR y HNRNP (Pihlajamäki J *et al.*, 2011).

Por otra parte, en este estudio se pudo observar que en la DB3, donde se brinda información del tejido cirrótico, se observan cambios en la expresión de los genes implicados en el espliceosoma tal como es el caso de *SNRPG* para el que se puede observar un aumento en la expresión en dicho tejido.

Por último, la frecuencia de eventos de *splicing* en *SLC22A1* aumentó aún más en el tumor, lo que se asocia con cambios más complejos en el perfil de proteínas que determinan el reconocimiento de exones durante la maduración del pre-ARNm. Esto puede desempeñar un papel importante en la expresión general del OCT1 funcional, y probablemente de otras proteínas, que explican los rasgos fenotípicos característicos de HCC, como la menor capacidad de captar y responder al sorafenib (Herraez E *et al.*, 2013).

En un estudio, donde se analizaron los siete eventos de *splicing* en SpliceSeq en HCC, se demostró la eficacia en la predicción de la supervivencia promedio. Un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier demostró que el índice basado en los siete eventos de *splicing* alternativo tenía capacidad para distinguir entre pacientes con resultados favorables frente a desfavorables. En otro análisis de regresión se observó que la expresión de 23 factores de *splicing* se correlacionaba con la supervivencia promedio en la cohorte de HCC. Los datos de este estudio indican que un índice pronóstico basado en los eventos de *splicing* alternativo lo es para la supervivencia promedio en HCC (Chen QF *et al.*, 2019).

En esta tesis doctoral hemos visto que muchos de estos eventos de *splicing* en las propias proteínas que conforman el espliceosoma están relacionados con el *splicing* de OCT1. Estos hechos podrían dar como resultado isoformas disfuncionales de OCT1 que favorecen la quimiorresistencia del HCC al sorafenib.

La importancia del estudio sobre la compleja maquinaria del espliceosoma permite encontrar qué genes son los más importantes y los que puedan servir para el pronóstico de HCC, además de ayudar en la estrategia de búsqueda de nuevos tratamientos (Wu P *et al.*, 218).

En resumen, los resultados de este apartado de la tesis doctoral han abierto el camino para futuros estudios destinados a investigar los cambios asociados a HCC en la expresión génica de proteínas individuales, que interactúan en la maquinaria de reconocimiento de exones, en su repercusión funcional sobre el *splicing* de *SLC22A1*, así como otros genes críticos en la patogénesis de HCC y su tratamiento.



## 6. Conclusiones

### **Conclusión primera**

En los estudios *in silico* realizados para el análisis de los cambios en la expresión genética, es fundamental tener en cuenta si las bases de datos disponibles cuentan con valores de referencia fiables. En este sentido, debido a la alta heterogeneidad que caracteriza la mayoría de los tumores, se obtienen resultados más robustos si se pueden utilizar datos provenientes de muestras pareadas que si la comparación se utilizan datos de la expresión global de los genes de interés en un grupo de pacientes.

### **Conclusión segunda**

Los cambios en la expresión de proteínas implicadas en la maquinaria de *splicing* en HCC, conlleva mayormente la pérdida de exones incluidos en la forma silvestre, lo que da lugar a un aumento de formas aberrantes o con disfunción de las proteínas. Entre los genes que sufren esta alteración postranscripcional en HCC se encuentra el *SLC22A1* que codifica OCT1.

### **Conclusión tercera**

Los cambios en la expresión de proteínas implicadas en la maquinaria de *splicing* en HCC, observados en los análisis *in silico* y en los estudios realizados mediante el uso de TLDAs, se caracterizan por una baja expresión de las proteínas SR y un aumento del gen *SNRPB*, lo que en conjunto sugiere que está favorecido el *splicing* corto.

### **Conclusión cuarta**

Existen cambios significativos en el *splicing* alternativo de OCT1 en enfermedades hepáticas no tumorales, como la colestiasis y la hepatosiderosis. Este hecho sugiere que los fenómenos de *splicing* alternativo de OCT1 y, posiblemente de otros genes, pueden ser eventos pretumorales cuya identificación puede tener interés diagnóstico y pronóstico.

### **Conclusión quinta**

El mantenimiento de la expresión de OCT3 en HCC y la caída de su expresión en CCA es compatible con un papel de este transportador en la respuesta al sorafenib en HCC, pero descarta su papel farmacológico en CCA.



**Conclusión sexta**

La presencia del OCT3 en la membrana plasmática de las células tumorales, pero no los niveles de ARNm del transportador, puede ser un marcador pronóstico de la respuesta del HCC al sorafenib en pacientes cuyos tumores carecen de OCT1.

**Conclusión séptima**

La expresión estable de OCT3 utilizando los vectores lentivirales *in vitro*, permitió obtener modelos celulares para el estudio de la capacidad de este transportador para captar diversos TKIs utilizados en el tratamiento de HCC. Todos los TKIs ensayados, excepto el lapatinib, mostraron un efecto inhibitorio de distinta magnitud sobre la captación de un sustrato típico de OCT3, lo que se interpreta como que dichos fármacos son potenciales sustratos de este transportador. Las pruebas directas de captación de TKIs en los distintos modelos no han dado una respuesta contundente, pero sugieren que OCT3 puede mediar la captación de sorafenib y cabozantinib.

**Conclusión global**

Los cambios en expresión en las proteínas que conforman el espliceosoma, están relacionados con eventos de *splicing* que determinan una caída en la función de OCT1, lo que juega un papel importante en la quimiorresistencia del HCC al sorafenib. Tanto OCT1 como OCT3 deben considerarse como potenciales biomarcadores y dianas terapéuticas para la predicción de la falta de respuesta y el desarrollo de estrategias de sensibilización del HCC a los TKIs.



## 7. Bibliografía

- Abdel-Misih S.R., & Bloomston M. (2010). Liver anatomy. *Surgical Clinics of North America*, 90(4):643-53.
- Abdelaziz, A., & Vaishampayan, U. (2017). Cabozantinib for the treatment of kidney cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 17(7), 577–584.
- Adams, D. H., & Eksteen, B. (2006). Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews. Immunology*, 6(3), 244–251.
- Agafonov, D. E., Van Santen, M., Kastner, B., Dube, P., Will, C. L., Urlaub, H., & Lührmann, R. (2016). ATPγS stalls splicing after B complex formation but prior to spliceosome activation. *RNA (New York, N.Y.)*, 22(9), 1329–1337.
- Ahlin, G., Chen, L., Lazorova, L., Chen, Y., Ianculescu, A. G., Davis, R. L., Giacomini, K. M., & Artursson, P. (2011). Genotype-dependent effects of inhibitors of the organic cation transporter, OCT1: predictions of metformin interactions. *The Pharmacogenomics Journal*, 11(6), 400–411.
- Al-Abdulla, R., Lozano, E., Macias, R. I. R., Monte, M. J., Briz, O., O'Rourke, C. J., Serrano, M. A., Banales, J. M., Avila, M. A., Martinez-Chantar, M. L., Geier, A., Andersen, J. B., & Marin, J. J. G. (2019). Epigenetic events involved in organic cation transporter 1-dependent impaired response of hepatocellular carcinoma to sorafenib. *British Journal of Pharmacology*, 176(6), 787–800.
- Alonso-Peña, M., Sanchez-Martin, A., Sanchon-Sanchez, P., Soto-Muñiz, M., Espinosa-Escudero, R., & Marin, J. J. G. (2019). Pharmacogenetics of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Cancer Drug Resistance*, 2, 680-709.
- Alpini G., Prall R.T., LaRusso, N.F., The pathobiology of biliary epithelia. In: Arias IM, Boyer JL, Chisari FV, Fausto N, Jakoby W, et al., editors. (2001). *The Liver: Biology & Pathobiology*. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 421–435.
- Amphoux, A., Vialou, V., Drescher, E., Brüss, M., Mannoury La Cour, C., Rochat, C., Millan, M. J., Giros, B., Bönisch, H., & Gautron, S. (2006). Differential pharmacological in vitro properties of organic cation transporters and regional distribution in rat brain. *Neuropharmacology*, 50(8), 941–952.
- Anczuków, O., Akerman, M., Cléry, A., Wu, J., Shen, C., Shirole, N. H., Raimer, A., Sun, S., Jensen, M. A., Hua, Y., Allain, F. H.-T., & Krainer, A. R. (2015). SRSF1-Regulated Alternative Splicing in Breast Cancer. *Molecular Cell*, 60(1), 105–117.
- Aoki, K., Takayasu, K., Kawano, T., Muramatsu, Y., Moriyama, N., Wakao, F., Yamamoto, J., Shimada, K., Takayama, T., Kosuge, T., Yamasaki, S., Sakamoto, & M., Hirohashi, S. (1993). Combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma: clinical features and computed tomographic findings. *Hepatology*, 18(5): 1090-1095.
- Argüello, PT., Albis, R., Escovar, J., Muñoz, A., Gaitán, J., Rey, M., Villamizar, J., Oliveiros, R. (2003). Hepatocarcinoma: patología maligna de mal pronóstico. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 18(3), 153-157.

- Arimany-Nardi, C., Koepsell, H., & Pastor-Anglada, M. (2015). Role of SLC22A1 polymorphic variants in drug disposition, therapeutic responses, and drug-drug interactions. *Pharmacogenomics Journal*, 15(6), 473–487.
- Bates, D. O., Morris, J. C., Oltean, S., & Donaldson, L. F. (2017). Pharmacology of Modulators of Alternative Splicing. *Pharmacological Reviews*, 69(1), 63–79.
- Becerra, S., Andrés-León, E., Prieto-Sánchez, S., Hernández-Munain, C., & Suñé, C. (2016). Prp40 and early events in splice site definition. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 7(1), 17–32.
- Belfort, M., & Perlman, P. S. (1995). Mechanisms of intron mobility. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(51), 30237–30240.
- Bengala, C., Bertolini, F., Malavasi, N., Boni, C., Aitini, E., Dealis, C., Zironi, S., Depenni, R., Fontana, A., Del Giovane, C., Luppi, G., & Conte, P. (2010). Sorafenib in patients with advanced biliary tract carcinoma: a phase II trial. *British Journal of Cancer*, 102(1), 68–72.
- Benson, A. B., 3rd (2007). Epidemiology, disease progression, and economic burden of colorectal cancer. *Journal of Managed Care & Speciality Pharmacy*, 13(6 Suppl C): S5-18.
- Berasain, C., Goñi, S., Castillo, J., Latasa, M. U., Prieto, J., & Avila, M. A. (2010). Impairment of pre-mRNA splicing in liver disease: mechanisms and consequences. *World Journal of Gastroenterology*, 16(25), 3091–3102.
- Berget, S. M., Moore, C., & Sharp, P. A. (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(8), 3171–3175.
- Bhide, R. S., Lombardo, L. J., Hunt, J. T., Cai, Z.-W., Barrish, J. C., Galbraith, S., Jeyaseelan, R., Mortillo, S., Wautlet, B. S., Krishnan, B., Kukral, D., Malone, H., Lewin, A. C., Henley, B. J., & Fargnoli, J. (2010). The antiangiogenic activity in xenograft models of brivanib, a dual inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-1 kinases. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(2), 369–378.
- Bielski, L. Y., Orlandi, A. M., & Boquete, H. R. (2016). Inhibidores de tirosina cinasa y disfunción tiroidea. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*, 53(3), 96–105.
- Blachier, M., Leleu, H., Peck-Radosavljevic, M., Valla, D.-C., & Roudot-Thoraval, F. (2013). The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *Journal of Hepatology*, 58(3), 593–608.
- Black, D. L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual Review of Biochemistry*, 72(1), 291–336.
- Blaustein, M., Pelisch, F., & Srebrow, A. (2007). Signals, pathways and splicing regulation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(11), 2031–2048.

- Blechacz, B. (2017). Cholangiocarcinoma: Current Knowledge and New Developments. *Gut and Liver*, 11(1), 13–26.
- Bloom, C. M., Langer, B., & Wilson, S. R. (1999). Role of US in the detection, characterization, and staging of cholangiocarcinoma. *Radiographics: A Review Publication of the Radiological Society of North America, Inc*, 19(5), 1199–1218.
- Bogdanos, D. P., Gao, B., & Gershwin, M. E. (2013). Liver immunology. *Comprehensive Physiology*, 3(2), 567–598.
- Boyer, J. L. (1971). Canalicular bile formation in the isolated perfused rat liver. *The American Journal of Physiology*, 221(4), 1156–1163.
- Boyer, J. L. (2013). Bile formation and secretion. *Comprehensive Physiology*, 3(3), 1035–1078.
- Brito, A. F., Abrantes, A. M., Pinto-Costa, C., Gomes, A. R., Mamede, A. C., Casalta-Lopes, J., Gonçalves, A. C., Sarmiento-Ribeiro, A. B., Tralhão, J. G., & Botelho, M. F. (2012). Hepatocellular carcinoma and chemotherapy: the role of p53. *Chemotherapy*, 58(5), 381–386.
- Briz O., Perez, M.J., & Marin, J.J. (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., Raoul, J. L., Sherman, M., Mazzaferro, V., Bolondi, L., Craxi, A., Galle, P. R., Santoro, A., Beaugrand, M., Sangiovanni, A., Porta, C., Gerken, G., Marrero, J. A., Nadel, A., Shan, M., Moscovici, M., Voliotis, D. & Llovet, J. M. (2012). Efficacy and safety of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: subanalyses of a phase III trial. *Journal of Hepatology*, 57(4): 821- 829.
- Bruix, J., Tak, W.-Y., Gasbarrini, A., Santoro, A., Colombo, M., Lim, H.-Y., Mazzaferro, V., Wiest, R., Reig, M., Wagner, A., & Bolondi, L. (2013). Regorafenib as second-line therapy for intermediate or advanced hepatocellular carcinoma: multicentre, open-label, phase II safety study. *European Journal of Cancer*, 49(16), 3412–3419.
- Bruix, J., Reig, M., & Sherman, M. (2016). Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, 150(4), 835–853.
- Bruix, J., Cheng, A.L., Meinhardt, G., Nakajima, K., De Sanctis Y., & Llovet J. (2017). Prognostic factors and predictors of sorafenib benefit in patients with hepatocellular carcinoma: Analysis of two phase III studies. *Journal of Hepatology*, 67(5): 999-1008.
- Campbell, S. L., Khosravi-Far, R., Rossman, K. L., Clark, G. J., & Der, C. J. (1998). Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*, 17(11), 1395–1413.
- Carriaga, M. T., & Henson, D. E. (1995). Liver, gallbladder, extrahepatic bile ducts, and pancreas. *Cancer*, 75(1 S), 171–190.



Carruthers, J. S., & Steiner, J. W. (1961). Studies on the fine structure of proliferated bile ductules. I. Changes of cytoarchitecture of biliary epithelial cells. *Canadian Medical Association Journal*, *85*, 1223–1236.

Castell, J. V., Jover, R., Martínez-Jiménez, C. P., & Gómez-Lechón, M. J. (2006). Hepatocyte cell lines: their use, scope and limitations in drug metabolism studies. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, *2*(2), 183–212.

Chandra, P., & Brouwer, K.L. (2004). The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts. *Pharmaceutical Research*, *21*(5): 719–735.

Chedid, M. F., Krueh, C. R. P., Pinto, M. A., Grezzana-Filho, T. J. M., Leipnitz, I., Krueh, C. D. P., Scaffaro, L. A., & Chedid, A. D. (2017). Hepatocellular carcinoma: diagnosis and operative management. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva :Brazilian Archives of Digestive Surgery*, *30*(4), 272–278.

Chen, C.-H., Chen, M.-C., Wang, J.-C., Tsai, A.-C., Chen, C.-S., Liou, J.-P., Pan, S.-L., & Teng, C.-M. (2014). Synergistic interaction between the HDAC inhibitor, MPT0E028, and sorafenib in liver cancer cells in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research*, *20*(5), 1274–1287.

Chen, L., Pawlikowski, B., Schlessinger, A., More, S. S., Stryke, D., Johns, S. J., Portman, M. A., Chen, E., Ferrin, T. E., Sali, A., & Giacomini, K. M. (2010). Role of organic cation transporter 3 (*SLC22A3*) and its missense variants in the pharmacologic action of metformin. *Pharmacogenetics and Genomics*, *20*(11), 687–699.

Chen, L., Hong, C., Chen, E. C., Yee, S. W., Xu, L., Almof, E. U., Wen, C., Fujii, K., Johns, S. J., Stryke, D., Ferrin, T. E., Simko, J., Chen, X., Costello, J. F., & Giacomini, K. M. (2013). Genetic and epigenetic regulation of the organic cation transporter 3, *SLC22A3*. *The Pharmacogenomics Journal*, *13*(2), 110–120.

Chen, M., & Manley, J. L. (2009). Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *10*, 741–754. doi:10.1. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *10*(11), 741–754.

Chen, Q.-F., Li, W., Wu, P., Shen, L., & Huang, Z.-L. (2019). Alternative splicing events are prognostic in hepatocellular carcinoma. *Aging*, *11*(13), 4720–4735.

Chen, Y., Liu, D., Liu, P., Chen, Y., Yu, H., & Zhang, Q. (2017). Identification of biomarkers of intrahepatic cholangiocarcinoma via integrated analysis of mRNA and miRNA microarray data. *Molecular Medicine Reports*, *15*(3), 1051–1056.

Cheng, AL., Kang, YK., Chen, Z., Tsao, CJ., Qin, S., Kim, JS., Luo, R., Feng, J., Ye, S., Yang, TS., Xu, J., Sun, Y., Liang, H., Liu, J., Wang, J., Tak, W. Y., Pan, H., Burock, K., Zou, J., ... Guan, Z. (2009). Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Oncology*, *10*(1), 25–34.

Cheng, A. L., Kang, Y. K., Lin, D. Y., Park, J. W., Kudo, M., Qin, S., Chung, H. C., Song, X., Xu, J., Poggi, G., Omata, M., Pitman, S., Lowenthal, L., Lanzalone, S., Yang,



- L., Lechuga, M. J., & Raymond, E. (2013). Sunitinib versus sorafenib in advanced hepatocellular cancer: results of a randomized phase III trial. *Journal of Clinical Oncology*, 31(32): 4067-4075.
- Choi, M.-K., & Song, I.-S. (2012). Genetic variants of organic cation transporter 1 (OCT1) and OCT2 significantly reduce lamivudine uptake. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 33(3), 170–178.
- Chow, L. T., Roberts, J. M., Lewis, J. B., & Broker, T. R. (1977). A map of cytoplasmic RNA transcripts from lytic adenovirus type 2, determined by electron microscopy of RNA:DNA hybrids. *Cell*, 11(4), 819–836.
- Coats, M. T., Bydlinski, N., Maresch, D., Diendorfer, A., Klanert, G., & Borth, N. (2020). mRNA Transfection into CHO-Cells Reveals Production Bottlenecks. *Biotechnology Journal*, 15(2), e1900198.
- Conrad, R., Castelino-Prabhu, S., Cobb, C., & Raza, A. (2013). Cytopathologic diagnosis of liver mass lesions. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 4(1), 53–61.
- Csank, C., Taylor, F. M., & Martindale, D. W. (1990). Nuclear pre-mRNA introns: analysis and comparison of intron sequences from *Tetrahymena thermophila* and other eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 18(17), 5133–5141.
- Cucchetti, A., Vitale, A., Cescon, M., Gambato, M., Maroni, L., Ravaioli, M., Ercolani, G., Burra, P., Cillo, U., & Pinna, A. D. (2014). Can liver transplantation provide the statistical cure? *Liver Transplantation*, 20(2), 210–217.
- Cursio, R., & Gugenheim, J. (2012). Ischemia-Reperfusion Injury and Ischemic-Type Biliary Lesions following Liver Transplantation. *Journal of Transplantation*, 2012, 164329.
- Daher, S., Massarwa, M., Benson, A. A., & Khoury, T. (2018). Current and Future Treatment of Hepatocellular Carcinoma: An Updated Comprehensive Review. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 6(1), 69–78.
- Danan-Gotthold, M., Golan-Gerstl, R., Eisenberg, E., Meir, K., Karni, R., & Levanon, E. Y. (2015). Identification of recurrent regulated alternative splicing events across human solid tumors. *Nucleic Acids Research*, 43(10), 5130–5144.
- Dance, M., Montagner, A., Salles, J. P., Yart, A., & Raynal, P. (2008). The molecular functions of Shp2 in the Ras/Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) pathway. *Cellular Signalling*, 20(3), 453–459.
- Deeks, E. D. (2019). Cabozantinib: A Review in Advanced Hepatocellular Carcinoma. In *Targeted Oncology* 14 (1), 107–113.
- De Lope, C. R., Tremosini, S., Forner, A., Reig, M., & Bruix, J. (2012). Management of HCC. *Journal of Hepatology*, 56(1), S75-87.
- Dimitroulis, D., Damaskos, C., Valsami, S., Davakis, S., Garmpis, N., Spartalis, E., Athanasiou, A., Moris, D., Sakellariou, S., Kykalos, S., Tsouroufflis, G., Garmpi, A., Delladetsima, I., Kontzoglou, K., & Kouraklis, G. (2017). From diagnosis to treatment



of hepatocellular carcinoma: An epidemic problem for both developed and developing world. *World Journal of Gastroenterology*, 23(29): 5282-5294.

Ding, S., Yao, D., Burchell, B., Wolf, C. R., & Friedberg, T. (1997). High levels of recombinant CYP3A4 expression in Chinese hamster ovary cells are modulated by coexpressed human P450 reductase and hemin supplementation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 348(2), 403–410.

Dixon, L. J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M. T., & Nagy, L. E. (2013). Kupffer cells in the liver. *Comprehensive Physiology*, 3(2), 785–797.

Donovan, M. G., Masure, H. R., & Storm, D. R. (1989). Isolation of a protein fraction from *Bordetella pertussis* that facilitates entry of the calmodulin-sensitive adenylate cyclase into animal cells. *Biochemistry*, 28(20), 8124–8129.

Dujon, B. (1989). Group I introns as mobile genetic elements: facts and mechanistic speculations--a review. *Gene*, 82(1), 91–114.

Dvinge, H., & Bradley, R. K. (2015). Widespread intron retention diversifies most cancer transcriptomes. *Genome Medicine*, 7(1), 45.

Eckel, F., & Schmid, R. M. (2007). Chemotherapy in advanced biliary tract carcinoma: a pooled analysis of clinical trials. *British Journal of Cancer*, 96(6), 896–902.

Elizalde, M., Urtasun, R., Azkona, M., Latasa, M. U., Goñi, S., García-Irigoyen, O., Uriarte, I., Segura, V., Collantes, M., Di Scala, M., Lujambio, A., Prieto, J., Ávila, M. A., & Berasain, C. (2014). Splicing regulator SLU7 is essential for maintaining liver homeostasis. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(7), 2909–2920.

El-Khoueiry, A. B., Rankin, C. J., Ben-Josef, E., Lenz, H. J., Gold, P. J., Hamilton, R. D., Govindarajan, R., Eng, C. & Blanke, C. D. (2012). SWOG 0514: a phase II study of sorafenib in patients with unresectable or metastatic gallbladder carcinoma and cholangiocarcinoma. *Investigational New Drugs*, 30(4): 1646-1651.

Enge, M., Bao, W., Hedström, E., Jackson, S. P., Moumen, A., & Selivanova, G. (2009). MDM2-dependent downregulation of p21 and hnRNP K provides a switch between apoptosis and growth arrest induced by pharmacologically activated p53. *Cancer Cell*, 15(3), 171–183.

Engler, J. R., Hughes, T. P., & White, D. L. (2011). OCT-1 as a determinant of response to antileukemic treatment. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 89(4), 608–611.

Facciorusso, A., Di Maso, M. & Muscatiello, N. (2016). Microwave ablation versus radiofrequency ablation for the treatment of hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Hyperthermia*, 32(3): 339-344.

Farley, D. R., Weaver, A. L., & Nagorney, D. M. (1995). "Natural history" of unresected cholangiocarcinoma: patient outcome after noncurative intervention. *Mayo Clinic Proceedings*, 70(5), 425–429.

Ferreira, J. A. (2007). The Benjamini-Hochberg method in the case of discrete test statistics. *International Journal of Biostatistics*, 3(1).



- Fica, S. M., Tuttle, N., Novak, T., Li, N.-S., Lu, J., Koodathingal, P., Dai, Q., Staley, J. P., & Piccirilli, J. A. (2013). RNA catalyses nuclear pre-mRNA splicing. *Nature*, *503*(7475), 229–234.
- Forner, A., Da Fonseca, L. G., Díaz-González, Á., Sanduzzi-Zamparelli, M., Reig, M., & Bruix, J. (2019). Controversies in the management of hepatocellular carcinoma. *JHEP Reports (Online)*, *1*(1), 17–29.
- Forner, A., Vilana, R., Ayuso, C., Bianchi, L., Solé, M., Ayuso, J. R., Boix, L., Sala, M., Varela, M., Llovet, J. M., Brú, C., & Bruix, J. (2008). Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, *47*(1), 97–104.
- França, A. V. C., Junior, J. E., Lima, B. L. G., Martinelli, A. L. C., & Carrilho, F. J. (2004). Diagnosis, staging and treatment of hepatocellular carcinoma. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *37*(11), 1689–1705.
- Fredericks, A. M., Cygan, K. J., Brown, B. A., & Fairbrother, W. G. (2015). RNA-Binding Proteins: Splicing Factors and Disease. *Biomolecules*, *5*(2), 893–909.
- Fu, L., Qin, Y.-R., Ming, X.-Y., Zuo, X.-B., Diao, Y.-W., Zhang, L.-Y., Ai, J., Liu, B.-L., Huang, T.-X., Cao, T.-T., Tan, B.-B., Xiang, D., Zeng, C.-M., Gong, J., Zhang, Q., Dong, S.-S., Chen, J., Liu, H., Wu, J.-L., ... Guan, X.-Y. (2017). RNA editing of SLC22A3 drives early tumor invasion and metastasis in familial esophageal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(23), E4631–E4640.
- Gallardo, M., Lee, H. J., Zhang, X., Bueso-Ramos, C., Paeon, L. R., McArthur, M., Multani, A., Nazha, A., Manshouri, T., Parker-Thornburg, J., Rapado, I., Quintas-Cardama, A., Kornblau, S. M., Martinez-Lopez, J., & Post, S. M. (2015). hnRNP K Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor that Regulates Proliferation and Differentiation Programs in Hematologic Malignancies. *Cancer Cell*, *28*(4), 486–499.
- Geier, A., Macias, R. I. R., Bettinger, D., Weiss, J., Bantel, H., Jahn, D., Al-Abdulla, R., & Marin, J. J. G. (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.
- Geuens, T., Bouhy, D., & Timmerman, V. (2016). The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Human Genetics*, *135*(8), 851–867.
- Ghuri, Y. A., Mian, I. & Rowe, J. H. (2017). Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis, *Journal of Carcinogenesis* *16*, 1.
- Gomes, A. R., Abrantes, A. M., Brito, A. F., Laranjo, M., Casalta-Lopes, J. E., Gonçalves, A. C., Sarmiento-Ribeiro, A. B., Botelho, M. F., & Tralhão, J. G. (2015). Influence of P53 on the radiotherapy response of hepatocellular carcinoma. *Clinical and Molecular Hepatology*, *21*(3), 257–267.
- Gong, L., Giacomini, M. M., Giacomini, C., Maitland, M. L., Altman, R. B., & Klein, T. E. (2017). PharmGKB summary: sorafenib pathways. *Pharmacogenetics and Genomics*, *27*(6), 240–246.

- Graveley, B. R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA*, 6(9), 1197–1211.
- Grisanzio, C., Werner, L., Takeda, D., Awoyemi, B. C., Pomerantz, M. M., Yamada, H., Sooriakumaran, P., Robinson, B. D., Leung, R., Schinzel, A. C., Mills, I., Ross-Adams, H., Neal, D. E., Kido, M., Yamamoto, T., Petrozziello, G., Stack, E. C., Lis, R., Kantoff, P. W., & Freedman, M. L. (2012). Genetic and functional analyses implicate the NUDT11, HNF1B, and SLC22A3 genes in prostate cancer pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109(28), 11252–11257.
- Gründemann, D., Schechinger, B., Rappold, G. A., & Schömig, E. (1998). Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. *Nature Neuroscience*, 1(5), 349–351.
- Gu, J., Wang, L., Li, T., Tang, S., Wang, Y., Zhang, W., & Jiang, X. (2019). Role and mechanism of organic cation transporter 3 in oxaliplatin treatment of colon cancer in vitro and in vivo. *Oncology Reports*, 42(4), 1355–1364.
- Guo, Y., Zhao, J., Bi, J., Wu, Q., Wang, X., & Lai, Q. (2012). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) is a tissue biomarker for detection of early hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Journal of Hematology & Oncology*, 5, 37.
- Guttmann, S., Chandhok, G., Groba, S. R., Niemietz, C., Sauer, V., Gomes, A., Ciarimboli, G., Karst, U., Zibert, A., & Schmidt, H. H. (2018). Organic cation transporter 3 mediates cisplatin and copper cross-resistance in hepatoma cells. *Oncotarget*, 9(1), 743–754.
- Hammam, O., Magdy, M., Anas, A., Rahim, A. A., Heedaya, M., & Helmy, A. (2017). Expression of hnRNPK & Claudin-4 in HCV-Induced Early HCC and Adjacent Liver Tissue. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 5(5), 595–602.
- Han, N., Li, W., & Zhang, M. (2013). The function of the RNA-binding protein hnRNP in cancer metastasis. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 9(3), S129-34.
- Hancock, J. F. (2003). Ras proteins: Different signals from different locations. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(5), 373–384.
- Harada, K., Shimoda, S., Kimura, Y., Sato, Y., Ikeda, H., Igarashi, S., Ren, X.-S., Sato, H., & Nakanuma, Y. (2012). Significance of immunoglobulin G4 (IgG4)-positive cells in extrahepatic cholangiocarcinoma: molecular mechanism of IgG4 reaction in cancer tissue. *Hepatology*, 56(1), 157–164.
- Hayer, M., Bönisch, H., & Brüß, M. (1999). Molecular cloning, functional characterization and genomic organization of four alternatively spliced isoforms of the human organic cation transporter 1 (hOCT1/SLC22A1). *Annals of Human Genetics*, 63(Pt 6), 473–482.
- He, Y., & Smith, R. (2009). Nuclear functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A/B. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(7), 1239–1256.
- Heise, M., Lautem, A., Knapstein, J., Schattenberg, J. M., Hoppe-Lotichius, M., Foltys, D., Weiler, N., Zimmermann, A., Schad, A., Gründemann, D., Otto, G., Galle,



- P. R., Schuchmann, M., & Zimmermann, T. (2012). Downregulation of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) in human hepatocellular carcinoma and their prognostic significance. *BMC Cancer*, *12*, 109.
- Herraez, E., Lozano, E., Macias, R. I. R., Vaquero, J., Bujanda, L., Banales, J. M., Marin, J. J. G., & Briz, O. (2013). Expression of SLC22A1 variants may affect the response of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma to sorafenib. *Hepatology*, *58*(3), 1065–1073.
- Hocine, S., Singer, R. H., & Grünwald, D. (2010). RNA processing and export. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(12), a000752.
- Horgan, A. M., Amir, E., Walter, T., & Knox, J. J. (2012). Adjuvant therapy in the treatment of biliary tract cancer: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Oncology*, *30*(16), 1934–1940.
- Huang, H., Han, Y., Yang, X., Li, M., Zhu, R., Hu, J., Zhang, X., Wei, R., Li, K., & Gao, R. (2017). HNRNPK inhibits gastric cancer cell proliferation through p53/p21/CCND1 pathway. *Oncotarget*, *8*(61), 103364–103374.
- Huang, Y.-T., Yang, H.-I., Liu, J., Lee, M.-H., Freeman, J. R., & Chen, C.-J. (2016). Mediation Analysis of Hepatitis B and C in Relation to Hepatocellular Carcinoma Risk. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, *27*(1), 14–20.
- Hubbard, T. (2002). The Ensembl genome database project. *Nucleic Acids Research*, *30*(1), 38–41.
- Huether, A., Höpfner, M., Baradari, V., Schuppan, D., & Scherübl, H. (2007). Sorafenib alone or as combination therapy for growth control of cholangiocarcinoma. *Biochemical Pharmacology*, *73*(9), 1308–1317.
- Hui, J., Hung, L.-H., Heiner, M., Schreiner, S., Neumüller, N., Reither, G., Haas, S. A., & Bindereif, A. (2005). Intronic CA-repeat and CA-rich elements: a new class of regulators of mammalian alternative splicing. *The EMBO Journal*, *24*(11), 1988–1998.
- Huynh, H., Ngo, V. C., Fargnoli, J., Ayers, M., Soo, K. C., Koong, H. N., Thng, C. H., Ong, H. S., Chung, A., Chow, P., Pollock, P., Byron, S., & Tran, E. (2008). Brivanib alaninate, a dual inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases, induces growth inhibition in mouse models of human hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research*, *14*(19), 6146–6153.
- Ikeda, K., Kudo, M., Kawazoe, S., Osaki, Y., Ikeda, M., Okusaka, T., Tamai, T., Suzuki, T., Hisai, T., Hayato, S., Okita, K., & Kumada, H. (2017). Phase 2 study of lenvatinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology*, *52*(4), 512–519.
- Ilagan, J. O., Ramakrishnan, A., Hayes, B., Murphy, M. E., Zebari, A. S., Bradley, P., & Bradley, R. K. (2015). U2AF1 mutations alter splice site recognition in hematological malignancies. *Genome Research*, *25*(1), 14–26.
- Jacquier, A. (1990). Self-splicing group II and nuclear pre-mRNA introns: how similar are they? *Trends in Biochemical Sciences*, *15*(9), 351–354.

- Jaiswal, M., LaRusso, N. F., Burgart, L. J., & Gores, G. J. (2000). Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Research*, 60(1), 184–190.
- Jeong, S. (2017). SR Proteins: Binders, Regulators, and Connectors of RNA. *Molecules and Cells*, 40(1), 1–9.
- Jiao, Q., Bi, L., Ren, Y., Song, S., Wang, Q., & Wang, Y. shan. (2018). Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Molecular Cancer*, 17(1), 36.
- Jinakote, M., Ontawong, A., Soodvilai, S., Pimta, J., Pasachan, T., Chatsudthipong, V., & Srimaroeng, C. (2019). High affinity of 4-(4-(dimethylamino)styryl)-N-methylpyridinium transport for assessing organic cation drugs in hepatocellular carcinoma cells. *Fundamental & Clinical Pharmacology*.
- Jonker, J. W., & Schinkel, A. H. (2004). Pharmacological and Physiological Functions of the Polyspecific Organic Cation Transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 308(1), 2–9.
- Jung, K.-W., Park, S., Kong, H.-J., Won, Y.-J., Lee, J. Y., Seo, H. G., & Lee, J.-S. (2012). Cancer statistics in Korea: incidence, mortality, survival, and prevalence in 2009. *Cancer Research and Treatment*, 44(1), 11–24.
- Jurica, M. S., Licklider, L. J., Gygi, S. P., Grigorieff, N., & Moore, M. J. (2002). Purification and characterization of native spliceosomes suitable for three-dimensional structural analysis. *RNA*, 8(4), 426–439.
- Kajiwara, M., Terada, T., Asaka, J., Aoki, M., Katsura, T., Ikai, I., & Inui, K. (2008). Regulation of basal core promoter activity of human organic cation transporter 1 (OCT1/SLC22A1). *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295(6), G1211-6.
- Kamath, P. S., Wiesner, R. H., Malinchoc, M., Kremers, W., Therneau, T. M., Kosberg, C. L., D'Amico, G., Dickson, E. R., & Kim, W. R. (2001). A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology*, 33(2), 464–470.
- Kamiyama, Y., Matsubara, T., Yoshinari, K., Nagata, K., Kamimura, H., & Yamazoe, Y. (2007). Role of human hepatocyte nuclear factor 4alpha in the expression of drug-metabolizing enzymes and transporters in human hepatocytes assessed by use of small interfering RNA. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 22(4), 287–298.
- Kanno, N., LeSage, G., Glaser, S., & Alpini, G. (2001). Regulation of cholangiocyte bicarbonate secretion. In *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 281 (3), 44-3.
- Karni R., de Stanchina E., Lowe SW., Sinha R., Mu D., & Krainer AR. (2007). The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(3):185-93.
- Kerb, R., Brinkmann, U., Chatskaia, N., Gorbunov, D., Gorboulev, V., Mornhinweg, E., Keil, A., Eichelbaum, M., & Koepsell, H. (2002). Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences. *Pharmacogenetics*, 12(8), 591–595.



- Khan, S. A., Taylor-Robinson, S. D., Toledano, M. B., Beck, A., Elliott, P., & Thomas, H. C. (2002). Changing international trends in mortality rates for liver, biliary and pancreatic tumours. *Journal of Hepatology*, 37(6), 806–813.
- Kim, D. W., Talati, C., & Kim, R. (2017). Hepatocellular carcinoma (HCC): beyond sorafenib- chemotherapy. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 8(2): 256-265.
- Kim, E., Goren, A., & Ast, G. (2008). Insights into the connection between cancer and alternative splicing. *Trends in Genetics*, 24 (1), 7–10.
- Kim, E., Ilagan, J. O., Liang, Y., Daubner, G. M., Lee, S. C. W., Ramakrishnan, A., Li, Y., Chung, Y. R., Micol, J. B., Murphy, M. E., Cho, H., Kim, M. K., Zebari, A. S., Aumann, S., Park, C. Y., Buonamici, S., Smith, P. G., Deeg, H. J., Lobry, C., & Abdel-Wahab, O. (2015). SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia by Mutant-Specific Effects on Exon Recognition. *Cancer Cell*, 27(5), 617–630.
- Kim, K. W., Kwon, H.-C., Kim, S.-H., Oh, S. Y., Lee, S., Lee, J. H., Roh, M. H., Kim, M. C., Kim, K. H., Kim, Y. H., Roh, Y. H., Jeong, J. S., & Kim, H.-J. (2013). Prognostic significance of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase expression in biliary tract cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Molecular and Clinical Oncology*, 1(6), 987–994.
- Kim, K., Zheng, F., & Zhan, C.-G. (2018). Oligomerization and Catalytic Parameters of Human UDP-Glucuronosyltransferase 1A10: Expression and Characterization of the Recombinant Protein. *Drug Metabolism and Disposition*, 46(10), 1446–1452.
- Kim, M. H., Shin, H. J., Lim, S. J., Park, J. S., Lee, S. S., Song, I. S., & Shin, J. G. (2012). Inter-individual variability in OCT1 expression and its relationship with OCT1 genotype in liver samples from a Korean population. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 27(5), 530–535.
- Kim., S.E., Lee, H.C., Shim, J.H., Park, H.J., Kim, K.M., Kim, P.N., Shin, Y.M., Yu, E.S., Chung, Y.H., & Suh, D.J. (2011). Noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma in hepatic masses larger than 2 cm in a hepatitis B virus-endemic area. *Liver International*, 2011;31:1468–1476.
- Koepsell, H. (2004). Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(7), 375–381.
- Koepsell, H., Lips, K. & Volk, C. (2007). Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharmaceutical Research*, 24(7): 1227- 1251.
- Kudo, M., Finn, R. S., Qin, S., Han, K. H., Ikeda, K., Piscaglia, F., Baron, A., Park, J. W., Han, G., Jassem, J., Blanc, J. F., Vogel, A., Komov, D., Evans, T. R. J., Lopez, C., Dutcus, C., Guo, M., Saito, K., Kraljevic, S., & Cheng, A. L. (2018). Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *The Lancet*, 391(10126), 1163–1173.
- Kurathong, S., Lerdverasirikul, P., Wongpaitoon, V., Pramoolsinsap, C., Kanjanapitak, A., Varavithya, W., Phuapradit, P., Bunyaratvej, S., Upatham, E. S., & Brockelman, W. Y. (1985). Opisthorchis viverrini infection and cholangiocarcinoma. A prospective, case-controlled study. *Gastroenterology*, 89(1), 151–156.



- Kuroda, H., Kutner, R. H., Bazan, N. G. & J. Reiser (2009). Simplified lentivirus vector production in protein-free media using polyethylenimine-mediated transfection. *Journal of Virological Methods*, 157(2): 113-121.
- Kurtz, D. M., & Gambhir, S. S. (2014). Tracking cellular and immune therapies in cancer. *Advances in Cancer Research*, 124, 257–296.
- La Cognata, V., D'Agata, V., Cavalcanti, F., & Cavallaro, S. (2015). Splicing: is there an alternative contribution to Parkinson's disease?. *Neurogenetics*, 16(4), 245–263.
- Lambowitz, A. M., & Belfort, M. (1993). Introns as mobile genetic elements. *Annual Review of Biochemistry*, 62(1), 587–622.
- Lardelli, R. M., Thompson, J. X., Yates, J. R., & Stevens, S. W. (2010). Release of SF3 from the intron branchpoint activates the first step of pre-mRNA splicing. *RNA (New York, N.Y.)*, 16(3), 516–528.
- LaRocca, R. V., Hicks, M. D., Mull, L., & Foreman, B. (2007). Effective palliation of advanced cholangiocarcinoma with sorafenib: a two-patient case report. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 38(2-4): 154-156.
- Larson, J. D., & Hoskins, A. A. (2017). Dynamics and consequences of spliceosome E complex formation. *ELife*, 6.
- Lazaridis, K. N., & Larusso, N. F. (2015). The cholangiopathies. In *Mayo Clinic Proceedings*, 90(6), 791–800.
- Lencioni, R., Llovet, J. M., Han, G., Tak, W. Y., Yang, J., Guglielmi, A., Paik, S. W., Reig, M., Kim, D. Y., Chau, G. Y., Luca, A., Del Arbol, L. R., Leberre, M. A., Niu, W., Nicholson, K., Meinhardt, G., & Bruix, J. (2016). Sorafenib or placebo plus TACE with doxorubicin-eluting beads for intermediate stage HCC: The SPACE trial. *Journal of Hepatology*, 64(5), 1090–1098.
- Leung, T. W., Patt, Y. Z., Lau, W. Y., Ho, S. K., Yu, S. C., Chan, A. T., Mok, T. S., Yeo, W., Liew, C. T., Leung, N. W., Tang, A. M., & Johnson, P. J. (1999). Complete pathological remission is possible with systemic combination chemotherapy for inoperable hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 5(7), 1676–1681.
- Li, F., Zhao, H., Su, M., Xie, W., Fang, Y., Du, Y., Yu, Z., Hou, L., & Tan, W. (2019). HnRNP-F regulates EMT in bladder cancer by mediating the stabilization of Snail1 mRNA by binding to its 3' UTR. *EBioMedicine*, 45, 208–219.
- Li, J., Yang, Z., & Tuo, B. (2019). Role of OCT1 in hepatocellular carcinoma. *OncoTargets and Therapy*, 12, 6013–6022.
- Lian, Q., Wang, S., Zhang, G., Wang, D., Luo, G., Tang, J., Chen, L., & Gu, J. (2018). HCCDB: A Database of Hepatocellular Carcinoma Expression Atlas. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 16(4), 269–275.
- Liu, L., Xie, S., Zhang, C., & Zhu, F. (2014). Aberrant regulation of alternative pre-mRNA splicing in hepatocellular carcinoma. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 24, (2), 133–149. Begell House Inc.

Liu, L. X., Lee, N. P., Chan, V. W., Xue, W., Zender, L., Zhang, C., Mao, M., Dai, H., Wang, X. L., Xu, M. Z., Lee, T. K., Ng, I. O., Chen, Y., Kung, H., Lowe, S. W., Poon, R. T. P., Wang, J. H., & Luk, J. M. (2009). Targeting cadherin-17 inactivates Wnt signaling and inhibits tumor growth in liver carcinoma. *Hepatology*, *50*(5), 1453–1463.

Liu, N., Wu, Z., Chen, A., Wang, Y., Cai, D., Zheng, J., Liu, Y., & Zhang, L. (2019). SNRPB promotes the tumorigenic potential of NSCLC in part by regulating RAB26. *Cell Death and Disease*, *10*(9).

Llovet, J. M., Montal, R., Sia, D., & Finn, R. S. (2018). Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *15*(10), 599–616.

Llovet, J. M., Peña, C. E. A., Lathia, C. D., Shan, M., Meinhardt, G., & Bruix, J. (2012). Plasma biomarkers as predictors of outcome in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research*, *18*(8), 2290–2300.

Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J. F., De Oliveira, A. C., Santoro, A., Raoul, J. L., Forner, A., Schwartz, M., Porta, C., Zeuzem, S., Bolondi, L., Greten, T. F., Galle, P. R., Seitz, J. F., Borbath, I., Häussinger, D., & Bruix, J. (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *New England Journal of Medicine*, *359*(4), 378–390.

Llovet, J. M., Schwartz, M., & Mazzaferro, V. (2005). Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma. In *Seminars in Liver Disease*, *25* (2), 181–200.

Lodish, M. B., & Stratakis, C. A. (2010). Endocrine side effects of broad-acting kinase inhibitors. *Endocrine-Related Cancer*, *17*(3), R233-44.

Long, J. C., & Caceres, J. F. (2009). The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *The Biochemical Journal*, *417*(1), 15–27.

Louisa, M., Suyatna, F., Wanandi, S., Asih, P. S., & Syafruddin, D. (2016). Differential expression of several drug transporter genes in HepG2 and Huh-7 cell lines. *Advanced Biomedical Research*, *5*(1), 104.

Love, JE., Hayden, EJ., & Rohn, TT. (2015). Alternative Splicing in Alzheimer's Disease. *Journal of Parkinsons Disease, Journal of Alzheimers Disease*, *2*(2):6.

Lozano, E., Herraes, E., Briz, O., Robledo, V. S., Hernandez-Iglesias, J., Gonzalez-Hernandez, A., & Marin, J. J. G. (2013). Role of the plasma membrane transporter of organic cations OCT1 and its genetic variants in modern liver pharmacology. *BioMed Research International*, *2013*, 692071.

Lozano, E., Macias, R. I. R., Monte, M. J., Asensio, M., Del Carmen, S., Sanchez-Vicente, L., Alonso-Peña, M., Al-Abdulla, R., Munoz-Garrido, P., Satriano, L., O'Rourke, C. J., Banales, J. M., Avila, M. A., Martinez-Chantar, M. L., Andersen, J. B., Briz, O., & Marin, J. J. G. (2019). Causes of hOCT1-Dependent Cholangiocarcinoma Resistance to Sorafenib and Sensitization by Tumor-Selective Gene Therapy. *Hepatology*, *70*(4), 1246–1261.

Ludwig, J. (1987). New concepts in biliary cirrhosis. *Seminar Liver Disease* *7*(4): 293-301.

Luo, C., Cheng, Y., Liu, Y., Chen, L., Liu, L., Wei, N., Xie, Z., Wu, W., & Feng, Y. (2017). SRSF2 Regulates Alternative Splicing to Drive Hepatocellular Carcinoma Development. *Cancer Research*, 77(5), 1168–1178.

Ma, L., Chua, M.-S., Andrisani, O., & So, S. (2014). Epigenetics in hepatocellular carcinoma: an update and future therapy perspectives. *World Journal of Gastroenterology*, 20(2), 333–345.

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. *Human Pathology*, 26(9): 956-964.

Makarova, O. V., Makarov, E. M., Liu, S., Vornlocher, H.-P., & Lührmann, R. (2002). Protein 61K, encoded by a gene (PRPF31) linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa, is required for U4/U6\*U5 tri-snRNP formation and pre-mRNA splicing. *The EMBO Journal*, 21(5), 1148–1157.

Malcovati, L., Karimi, M., Papaemmanuil, E., Ambaglio, I., Jädersten, M., Jansson, M., Elena, C., Galli, A., Walldin, G., Porta, M. G. Della, Raaschou-Jensen, K., Travaglino, E., Kallenbach, K., Pietra, D., Ljungström, V., Conte, S., Boveri, E., Invernizzi, R., Rosenquist, R., & Lindberg, E. H. (2015). 78-SF3B1 mutation in subset of MDS. *Blood*, 126(2), 233–241.

Maniatis, T. (1991). Mechanisms of alternative pre-mRNA splicing. *Science (New York, N.Y.)*, 251(4989), 33–34.

Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298 (5600), .1912–1934.

Marin, J. J. G., Romero, M. R., & Briz, O. (2010). Molecular bases of liver cancer refractoriness to pharmacological treatment. *Current Medicinal Chemistry*, 17(8), 709–740.

Marin, J. J. G., Romero, M. R., Martinez-Becerra, P., Herraes, E., & Briz, O. (2009). Overview of the molecular bases of resistance to chemotherapy in liver and gastrointestinal tumours. *Current Molecular Medicine*, 9(9), 1108–1129.

Markwell, MA HS., Bieber, LL., Tolbert, NE. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*., 87: 206- 210.

Martinez-Contreras, R., Cloutier, P., Shkreta, L., Fiset, J. F., Revil, T., & Chabot, B. (2007). hnRNP proteins and splicing control. *Advances in experimental medicine and biology*, 623, 123–147.

Martins, R. P., & Fåhræus, R. (2017). A matter of maturity: The impact of pre-mRNA processing in gene expression and antigen presentation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 91(Pt B), 203–211.

Masyuk, T. V., Ritman, E. L., & LaRusso, N. F. (2001). Quantitative assessment of the rat intrahepatic biliary system by three-dimensional reconstruction. *The American Journal of Pathology*, 158(6): 2079- 2088.



- Matsumoto, K., Nagahara, T., Okano, J. & Murawaki, Y. (2008). The growth inhibition of hepatocellular and cholangiocellular carcinoma cells by gemcitabine and the roles of extracellular signal-regulated and checkpoint kinases. *Oncology Reports*, 20(4): 863-872.
- Mauger, D. M., Lin, C., & Garcia-Blanco, M. A. (2008). hnRNP H and hnRNP F Complex with Fox2 To Silence Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Exon IIIc. *Molecular and Cellular Biology*, 28(17), 5403–5419.
- Mazzaferro, V., Regalia, E., Doci, R., Andreola, S., Pulvirenti, A., Bozzetti, F., Montalto, F., Ammatuna, M., Morabito, A., & Gennari, L. (1996). Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *New England Journal of Medicine*, 334(11), 693–699.
- McLean, L., & Patel, T. (2006). Racial and ethnic variations in the epidemiology of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Liver International*, 26(9), 1047–1053.
- Meier, P. J. (1988). Transport polarity of hepatocytes. *Seminars in Liver Disease*, 8(4), 293–307.
- Mekuria, A.N., & Abdi, A.D. (2017). Potential Molecular Targets and Drugs for Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 9(12), 736-745.
- Menche N. (2012). *Biologie Anatomie Physiologie*. Munich: Urban & Fischer/ Elsevier.
- Mendel, D. B., Douglas Laird, A., Xin, X., Louie, S. G., Christensen, J. G., Li, G., Schreck, R. E., Abrams, T. J., Ngai, T. J., Lee, L. B., Murray, L. J., Carver, J., Chan, E., Moss, K. G., Haznedar, J. Ö., Sukbuntherng, J., Blake, R. A., Sun, L., Tang, C., & Cherrington, J. M. (2003). In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: Determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clinical Cancer Research*, 9(11), 327–337.
- Milano, A., Nasti, G., Iaffaioli, R. V., & Caponigro, F. (2007). First line targeted therapies in breast cancer: focus on bevacizumab. *Biologics: Targets & Therapy*, 1(1), 3–10.
- Mills, J. D., & Janitz, M. (2012). Alternative splicing of mRNA in the molecular pathology of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Aging*, 33 (5), 1012.e11-1012.e24.
- Minematsu, T. & Giacomini KM. (2011). Interactions of Tyrosine Kinase Inhibitors with Organic Cation Transporters, OCTs, and Multidrug and Toxic Compound Extrusion Proteins. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(3), 531–539.
- Miyakawa, S., Ishihara, S., Horiguchi, A., Takada, T., Miyazaki, M., & Nagakawa, T. (2009). Biliary tract cancer treatment: 5,584 results from the Biliary Tract Cancer Statistics Registry from 1998 to 2004 in Japan. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 16(1), 1–7.



Moore MJ., Query CC., & Sharp PA. (1993). Splicing of precursors to mRNA by the spliceosome. In RNA World (ed. Gesteland RF, Atkins JF), pp. 303–357. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Moumen, A., Masterson, P., O'Connor, M. J., & Jackson, S. P. (2005). hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage. *Cell*, 123(6), 1065–1078.

Mthembu, N. N., Mbita, Z., Hull, R., & Dlamini, Z. (2017). Abnormalities in alternative splicing of angiogenesis-related genes and their role in HIV-related cancers. *HIV/AIDS*, 9, 77–93.

Muskal, S. M., & Kim, S. H. (1992). Predicting protein secondary structure content. A tandem neural network approach. *Journal of Molecular Biology*, 225(3), 713–727.

Nakatani, K., Kaneda, K., Seki, S., & Nakajima, Y. (2004). Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function. *Medical Electron Microscopy*, 37(1), 29–36.

Nam, K., Oh, S., Lee, K., Yoo, S., & Shin, I. (2015). CD44 regulates cell proliferation, migration, and invasion via modulation of c-Src transcription in human breast cancer cells. *Cellular Signalling*, 27(9), 1882–1894.

Niehof, M., & Borlak, J. (2008). EPS15R, TASP1, and PRPF3 Are Novel Disease Candidate Genes Targeted by HNF4 $\alpha$  Splice Variants in Hepatocellular Carcinomas. *Gastroenterology*, 134(4), 1191–1202.

Nies, A. T., Koepsell, H., Winter, S., Burk, O., Klein, K., Kerb, R., Zanger, U. M., Keppler, D., Schwab, M., & Schaeffeler, E. (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.

Nilsen, T. W., & Graveley, B. R. (2010). Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*, 463 (7280), 457–463.

Nishida, N., Kitano, M., Sakurai, T., & Kudo, M. (2015). Molecular Mechanism and Prediction of Sorafenib Chemoresistance in Human Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis*, 33(6): 771-779.

Ohlsson, C., Mohan, S., Sjögren, K., Tivesten, A., Isgaard, J., Isaksson, O., Jansson, J.-O., & Svensson, J. (2009). The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocrine Reviews*, 30(5), 494–535.

Okabe, M., Szakacs, G., Reimers, M. A., Suzuki, T., Hall, M. D., Abe, T., Weinstein, J. N., & Gottesman, M. M. (2008). Profiling SLCO and SLC22 genes in the NCI-60 cancer cell lines to identify drug uptake transporters. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(9): 3081-3091

Ong, C. K., Subimerb, C., Pairojkul, C., Wongkham, S., Cutcutache, I., Yu, W., McPherson, J. R., Allen, G. E., Ng, C. C. Y., Wong, B. H., Myint, S. S., Rajasegaran, V., Heng, H. L., Gan, A., Zang, Z. J., Wu, Y., Wu, J., Lee, M. H., Huang, D., & Teh, B. T. (2012). Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Nature Genetics*, 44(6), 690–693.



- Ozougwu, Jervas. (2017). Physiology of the liver. 4, 13 - 24.
- Padgett, R. A. (2012). New connections between splicing and human disease. *Trends in Genetics : TIG*, 28(4), 147–154.
- Paisant, A., d'Assignies, G., Bannier, E., Bardou-Jacquet, E., & Gandon, Y. (2017). MRI for the measurement of liver iron content, and for the diagnosis and follow-up of iron overload disorders. *Presse Medicale (Paris, France : 1983)*, 46(12 Pt 2), e279–e287.
- Paronetto, M. P., Achsel, T., Massiello, A., Chalfant, C. E., & Sette, C. (2007). The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x. *Journal of Cell Biology*, 176(7), 929–939.
- Patel, A. A., & Steitz, J. A. (2003). Splicing double: Insights from the second spliceosome. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, (12), 960–970.
- Peck-Radosavljevic, M. (2014). Drug therapy for advanced-stage liver cancer. *Liver Cancer*, 3 (2), 125–131.
- Peng, N., Li, J., He, J., Shi, X., Huang, H., Mo, Y., Ye, H., Wu, G., Wu, F., Xiang, B., Zhong, J., Li, L., & Zhu, S. (2020). c-Myc-mediated SNRNP upregulation functions as an oncogene in hepatocellular carcinoma. *Cell Biology International*.
- Pérez-Navarro, JV., Tello-Barbara, IM., Anaya-Prado, R., Castelltort-Cervantes, LF., Schadeegg-Peña, D., Cantón-Díaz, A., & Ochoa-Herrera, R. 2014. Colangiocarcinoma, una revisión de retos en diagnóstico y manejo. *Cirujano General*, 36(1):48-57.
- Pérez-Valle, J., & Vilardell, J. (2012). Intronic features that determine the selection of the 3' splice site. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(5), 707–717.
- Pievsky, D., & Pylsopoulos, N. (2016). Profile of tivantinib and its potential in the treatment of hepatocellular carcinoma: the evidence to date. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, 3: 69-76.
- Pihlajamäki, J., Lerin, C., Itkonen, P., Boes, T., Floss, T., Schroeder, J., Dearie, F., Crunkhorn, S., Burak, F., Jimenez-Chillaron, JC., Kuulasmaa, T., Miettinen, P., Park, P. J., Nasser, I., Zhao, Z., Zhang, Z., Xu, Y., Wurst, W., Ren, H., & Patti, M. E. (2011). Expression of the splicing factor gene SFRS10 is reduced in human obesity and contributes to enhanced lipogenesis. *Cell Metabolism*, 14(2), 208–218.
- Pinter, M., Sieghart, W., Reisegger, M., Wrba, F. & Peck-Radosavljevic, M. (2011). Sorafenib in unresectable intrahepatic cholangiocellular carcinoma: a case report. *Wien Klin Wochenschr*, 123(1-2): 61-64.
- Plessel, G., Fischer, U., & Lührmann, R. (1994). m3G cap hypermethylation of U1 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) in vitro: evidence that the U1 small nuclear RNA-(guanosine-N2)-methyltransferase is a non-snRNP cytoplasmic protein that requires a binding site on the Sm core domain. *Molecular and Cellular Biology*, 14(6), 4160–4172.



- Pomeranz Krummel, D. A., Oubridge, C., Leung, A. K. W., Li, J., & Nagai, K. (2009). Crystal structure of human spliceosomal U1 snRNP at 5.5 Å resolution. *Nature*, *458*(7237), 475–480.
- Proudfoot, N. (2004). New perspectives on connecting messenger RNA 3' end formation to transcription. *Current Opinion in Cell Biology*, *16*(3), 272–278.
- Query, C. C., Bentley, R. C., & Keene, J. D. (1989). A common RNA recognition motif identified within a defined U1 RNA binding domain of the 70K U1 snRNP protein. *Cell*, *57*(1), 89–101.
- Ramanathan, A., Robb, GB., & Chan, SH. (2016). mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res*, *44*(16):7511-26.
- Raoul, J.-L., Frenel, J.-S., Raimbourg, J., & Gilibert, M. (2019). Current options and future possibilities for the systemic treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatic Oncology*, *6*(1), HEP11.
- Reig M., & Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 2018;31:1301–1314.
- Rizvi, S., & Gores, G. J. (2013). Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. *Gastroenterology*, *145* (6); 1215–1229. W.B. Saunders.
- Rizvi S, Mertens JC, Bronk SF, Hirsova, P., Dai, H., Roberts, L.R., Kaufmann, S.H., & Gores, G. J. (2014) . Platelet-derived growth factor primes cancer-associated fibroblasts for apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(33): 22835-49.
- Roberts, P. J., & Der, C. J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, *26*(22), 3291–3310.
- Romagnuolo, J., Bardou, M., Rahme, E., Joseph, L., Reinhold, C., & Barkun, A. N. (2003). Magnetic Resonance Cholangiopancreatography: A Meta-Analysis of Test Performance in Suspected Biliary Disease. *Annals of Internal Medicine*, *139* (7), 336–343.
- Roskams, T., & Kojiro, M. (2010). Pathology of early hepatocellular carcinoma: conventional and molecular diagnosis. *Seminars in Liver Disease*, *30*(1), 17–25.
- Roth, M., Obaidat, A., & Hagenbuch, B. (2012). OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *British Journal of Pharmacology*, *165*(5), 1260–1287.
- Rübsamen, H., Hess, G. P., Eldefrawi, A. T., & Eldefrawi, M. E. (1976). Interaction between calcium and ligand-binding sites of the purified acetylcholine receptor studied by use of a fluorescent lanthanide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *68*(1), 56–63.
- Rulcova, A., Krausova, L., Smutny, T., Vrzal, R., Dvorak, Z., Jover, R., & Pavek, P. (2013). Glucocorticoid receptor regulates organic cation transporter 1 (OCT1, SLC22A1) expression via HNF4a upregulation in primary human hepatocytes. *Pharmacological Reports*, *65*(5), 1322–1335.



- Ryan, M., Wong, W. C., Brown, R., Akbani, R., Su, X., Broom, B., Melott, J., & Weinstein, J. (2016). TCGASpliceSeq a compendium of alternative mRNA splicing in cancer. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1018-22.
- Saborowski, M., Kullak-Ublick, G. A., & Eloranta, J. J. (2006). The human organic cation transporter-1 gene is transactivated by hepatocyte nuclear factor-4alpha. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(2), 778–785.
- Sacco-Bubulya, P., & Spector, D. L. (2002). Disassembly of interchromatin granule clusters alters the coordination of transcription and pre-mRNA splicing. *The Journal of Cell Biology*, 156(3), 425–436.
- Saito, S., Okabe, H., Watanabe, M., Ishimoto, T., Iwatsuki, M., Baba, Y., Tanaka, Y., Kurashige, J., Miyamoto, Y., & Baba, H. (2013). CD44v6 expression is related to mesenchymal phenotype and poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Oncology Reports*, 29(4), 1570–1578.
- Saito, Y., Kanai, Y., Sakamoto, M., Saito, H., Ishii, H., & Hirohashi, S. (2002). Overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4, associated with DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 99(15), 10060–10065.
- Sakata, T., Anzai, N., Kimura, T., Miura, D., Fukutomi, T., Takeda, M., Sakurai, H., & Endou, H. (2010). Functional analysis of human organic cation transporter OCT3 (SLC22A3) polymorphisms. *Journal of Pharmacological Sciences*, 113(3), 263–266.
- Sampat, K. R., & O'Neil, B. (2013). Antiangiogenic Therapies for Advanced Hepatocellular Carcinoma. *The Oncologist*, 18(4), 430–438.
- Sarveazad, A., Agah, S., Babahajian, A., Amini, N., & Bahardoust, M. (2019). Predictors of 5 year survival rate in hepatocellular carcinoma patients. *Journal of Research in Medical Sciences*, 24(1), 86.
- Sata, R., Ohtani, H., Tsujimoto, M., Murakami, H., Koyabu, N., Nakamura, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., Nagata, H., Tsukimori, K., Nakano, H., & Sawada, Y. (2005). Functional analysis of organic cation transporter 3 expressed in human placenta. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315(2), 888–895.
- Sayyed, K., Camillerapp, C., Le Vée, M., Bruyère, A., Nies, A. T., Abdel-Razzak, Z., & Fardel, O. (2019). Inhibition of organic cation transporter (OCT) activities by carcinogenic heterocyclic aromatic amines. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 54, 10–22.
- Schaffner, F., & Popper, H. (1961). Electron microscopic studies of normal and proliferated bile ductules. *The American Journal of Pathology*, 38, 393–410.
- Schlessinger, J. (2004). Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science*, 306(5701), 1506–1507.
- Schulze, E. (1990). The virological supervision of drinking water quality--a review. *Zentralblatt Fur Mikrobiologie*, 145(2), 135–143.



Schümperli, D., & Pillai, R. S. (2004). The special Sm core structure of the U7 snRNP: far-reaching significance of a small nuclear ribonucleoprotein. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(19–20), 2560–2570.

Sen, S., Jumaa, H., & Webster, N. J. G. (2013). Splicing factor SRSF3 is crucial for hepatocyte differentiation and metabolic function. *Nature Communications*, 4(1), 1–12.

Senoo, H., Yoshikawa, K., Morii, M., Miura, M., Imai, K., & Mezaki, Y. (2010). Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative – past, present and future. *Cell Biology International*, 34(12), 1247–1272.

Shaib, Y., & El-Serag, H. B. (2004). The epidemiology of cholangiocarcinoma. *In Seminars in Liver Disease*, 24(2), 115–125.

Shaib, Y. H., El-Serag, H. B., Davila, J. A., Morgan, R., & McGlynn, K. A. (2005). Risk factors of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a case-control study. *Gastroenterology*, 128(3), 620–626.

Shearn, C. T., & Petersen, D. R. (2015). Understanding the tumor suppressor PTEN in chronic alcoholism and hepatocellular carcinoma. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 815, 173–184.

Shen, S., Wang, Y., Wang, C., Wu, Y. N., & Xing, Y. (2016). SURVIV for survival analysis of mRNA isoform variation. *Nature Communications*, 7, 11548.

Shepard, P. J., & Hertel, K. J. (2009). The SR protein family. *In Genome biology*, 10(10), 242.

Shirai, C. L., Ley, J. N., White, B. S., Kim, S., Tibbitts, J., Shao, J., Ndonwi, M., Wadugu, B., Duncavage, E. J., Okeyo-Owuor, T., Liu, T., Griffith, M., McGrath, S., Magrini, V., Fulton, R. S., Fronick, C., O’Laughlin, M., Graubert, T. A., & Walter, M. J. (2015). Mutant U2AF1 Expression Alters Hematopoiesis and Pre-mRNA Splicing In Vivo. *Cancer Cell*, 27(5), 631–643.

Shu, H., Hu, J., & Deng, H. (2019). miR-1249-3p accelerates the malignancy phenotype of hepatocellular carcinoma by directly targeting HNRNPK. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 7(10), e00867.

Shu, Y., Leabman, M. K., Feng, B., Mangravite, L. M., Huang, C. C., Stryke, D., Kawamoto, M., Johns, S. J., DeYoung, J., Carlson, E., Ferrin, T. E., Herskowitz I., & Giacomini K. M. (2003). Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter, OCT1. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 100(10): 5902-5907.

Shu, Y., Sheardown, S.A., Brown, C., Owen, R. P., Zhang, S., Castro, R. A., Ianculescu, A. G., Yue, L., Lo, J.C., Burchard, E.G., Brett, C.M., & Giacomini K. M. (2007). Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *Journal of Clinical Investigation*, 117(5): 1422-1431.

Slattery, J. M., & Sahani, D. V. (2006). What is the current state-of-the-art imaging for detection and staging of cholangiocarcinoma? *The Oncologist*, 11(8), 913–922.



- Song, E., Kim, M., Kim, E. Y., Kim, B. H., Shin, D. Y., Kang, H.-C., Ahn, B.-C., Kim, W. B., Shong, Y. K., Jeon, M. J., & Lim, D. J. (2020). Lenvatinib for Radioactive Iodine-Refractory Differentiated Thyroid Carcinoma and Candidate Biomarkers Associated with Survival: A Multicenter Study in Korea. *Thyroid*.
- Soto, M., Reviejo, M., Al-Abdulla, R., Romero, M. R., Macias, R. I. R., Boix, L., Bruix, J., Serrano, M. A., & Marin, J. J. G. (2020). Relationship between changes in the exon-recognition machinery and SLC22A1 alternative splicing in hepatocellular carcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1866(5), 165687.
- Sparidans, R. W., Vlaming, M. L., Lagas, J. S., Schinkel, A. H., Schellens J. H., & Beijnen J. H. (2009). Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for sorafenib and sorafenib-glucuronide in mouse plasma and liver homogenate and identification of the glucuronide metabolite. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical Life Sciences* 877, (3): 269-276.
- Spector, D. L. (1993). Macromolecular domains within the cell nucleus. In *Annual Review of Cell Biology*, 9, 265–315.
- Srebrow, A., & Kornblihtt, A. R. (2006). The connection between splicing and cancer. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 13), 2635–2641.
- Staud, F., Cerveny, L., & Ceckova, M. (2012). Pharmacotherapy in pregnancy; effect of ABC and SLC transporters on drug transport across the placenta and fetal drug exposure. *Journal of Drug Targeting*, 20(9), 736–763.
- Stinton, L. M., & Shaffer, E. A. (2012). Epidemiology of gallbladder disease: Cholelithiasis and cancer. *Gut and Liver*, 6(2), 172–187.
- Strumberg, D., Clark, J. W., Awada, A., Moore, M. J., Richly, H., Hendlisch, A., Hirte, H. W., Eder, J. P., Lenz, H.-J., & Schwartz, B. (2007). Safety, pharmacokinetics, and preliminary antitumor activity of sorafenib: a review of four phase I trials in patients with advanced refractory solid tumors. *The Oncologist*, 12(4), 426–437.
- Subramaniam, S., Kelley R.K., & Venook A.P. (2013). A review of hepatocellular carcinoma (HCC) staging systems. *Chinese Clinical Oncology*, 2(4): 33.
- Suzuki, H. & Sugiyama Y. (2002). Single nucleotide polymorphisms in multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2): its impact on drug disposition. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(10): 1311-1331.
- Tacke, R., & Manley, J. L. (1999). Determinants of SR protein specificity. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(3), 358–362.
- Tanaka, S., Sugimachi, K., Kameyama, T., Maehara, S. ichiro, Shirabe, K., Shimada, M., Wands, J. R., & Maehara, Y. (2003). Human WISP1v, a member of the CCN family, is associated with invasive cholangiocarcinoma. *Hepatology*, 37(5), 1122–1129.
- Tang, Y., Horikawa, I., Ajiro, M., Robles, A. I., Fujita, K., Mondal, A. M., Stauffer, J. K., Zheng, Z.-M., & Harris, C. C. (2013). Downregulation of splicing factor SRSF3 induces p53 $\beta$ , an alternatively spliced isoform of p53 that promotes cellular senescence. *Oncogene*, 32(22), 2792–2798.



- Tarn, W. Y., & Steitz, J. A. (1997). Pre-mRNA splicing: The discovery of a new spliceosome doubles the challenge. In *Trends in Biochemical Sciences*, 22(4), 132–137.
- Thongprasert, S. (2005). The role of chemotherapy in cholangiocarcinoma. *Annals of Oncology*, 16(2), ii93-6.
- Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward E. M., & Jemal A. (2016). Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 25(1): 16-27.
- Tovar V, Cornella H, Villanueva A et al. FGF signaling dysregulation in HCC and role in the development of acquired resistance to anti-angiogenic therapies. Paper presented at: 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases; November 4–8, 2011; San Francisco, CA.
- Tremblay, M. P., Armero, V. E., Allaire, A., Boudreault, S., Martenon-Brodeur, C., Durand, M., Lapointe, E., Thibault, P., Tremblay-Letourneau, M., Perreault, J. P., Scott, M. S., & Bisailon, M. (2016). Global profiling of alternative RNA splicing events provides insights into molecular differences between various types of hepatocellular carcinoma. *BMC Genomics*, 17: 683.
- Tremosini, S., Forner, A., Boix, L., Vilana, R., Bianchi, L., Reig, M., Rimola, J., Rodríguez-Lope, C., Ayuso, C., Solé, M., & Bruix, J. (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.
- Trojan, J., & Waidmann, O. (2016). Role of regorafenib as second-line therapy and landscape of investigational treatment options in advanced hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, 3: 31-36.
- Tsai, J.-J., Pan, P.-J., & Hsu, F.-T. (2017). Regorafenib induces extrinsic and intrinsic apoptosis through inhibition of ERK/NF- $\kappa$ B activation in hepatocellular carcinoma cells. *Oncology Reports*, 37(2), 1036–1044.
- Tsochatzis, E. A., Bosch, J., & Burroughs, A. K. (2014). Liver cirrhosis. *The Lancet*, 383(9930), 1749–1761.
- Tyson, G. L., & El-Serag, H. B. (2011). Risk factors for cholangiocarcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 54(1), 173–184.
- Ule, J., Stefani, G., Mele, A., Ruggiu, M., Wang, X., Taneri, B., Gaasterland, T., Blencowe, B. J., Darnell, R. B., & I-e, E. Y. (2006). An RNA map predicting Nova-dependent splicing regulation. *Nature*, 444(7119), 580–586.
- Urlaub, H., Raker, VA., Kostka, S., & Lührmann, R. (2001). Sm protein-Sm site RNA interactions within the inner ring of the spliceosomal snRNP core structure. *EMBO J*, 20(1-2), 187-96.
- Valle, J., Wasan, H., Palmer, D. H., Cunningham, D., Anthoney, A., Maraveyas, A., Madhusudan, S., Iveson, T., Hughes, S., Pereira, S. P., Roughton, M., & Bridgewater, J. (2010). Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *New England Journal of Medicine*, 362(14), 1273–1281.



- Valles, I., Pajares, M. J., Segura, V., Guruceaga, E., Gomez-Roman, J., Blanco, D., Tamura, A., Montuenga, L. M., & Pio, R. (2012). Identification of novel deregulated RNA metabolism-related genes in non-small cell lung cancer. *PLoS One*, *7*(8), e42086.
- Valls, C., Gumà, A., Puig, I., Sanchez, A., Andía, E., Serrano, T., & Figueras, J. (2000). Intrahepatic peripheral cholangiocarcinoma: CT evaluation. *Abdominal Imaging*, *25*(5), 490–496.
- van den Hoogenhof, M. M. G., Pinto, Y. M., & Creemers, E. E. (2016). RNA Splicing: Regulation and Dysregulation in the Heart. *Circulation Research*, *118*(3), 454–468.
- Villanueva, A., & Llovet, J. M. (2011). Targeted therapies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, *140*(5), 1410–1426.
- Vogel, A., Cervantes, A., Chau, I., Daniele, B., Llovet, J., Meyer, T., Nault, J. C., Neumann, U., Ricke, J., Sangro, B., Schirmacher, P., Verslype, C., Zech, C. J., Arnold, D., & Martinelli, E. (2018). Hepatocellular carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, *29*, iv238–iv255.
- Vogel, A., Wege, H., Caca, K., Nashan, B., & Neumann, U. (2014). Diagnostik und Therapie von Cholangiokarzinomen. *Deutsches Ärzteblatt*, *111*(44), 748–754.
- Vollmar, J., Kim, Y. O., Marquardt, J. U., Becker, D., Galle, P. R., Schuppan, D., & Zimmermann, T. (2019). Deletion of organic cation transporter Oct3 promotes hepatic fibrosis via upregulation of TGF $\beta$ . *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *317*(2), G195–G202.
- Vollmar, J., Lautem, A., Closs, E., Schuppan, D., Kim, Y. O., Grimm, D., Marquardt, J. U., Fuchs, P., Straub, B. K., Schad, A., Gründemann, D., Schattenberg, J. M., Gehrke, N., Wörns, M. A., Baumgart, J., Galle, P. R., & Zimmermann, T. (2017). Loss of organic cation transporter 3 (Oct3) leads to enhanced proliferation and hepatocarcinogenesis. *Oncotarget*, *8*(70), 115667–115680.
- Wahl, M. C., Will, C. L., & Lührmann, R. (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*, *136*(4), 701–718.
- Wan, P. T. C., Garnett, M. J., Roe, S. M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V. M., Project, C. G., Jones, C. M., Marshall, C. J., Springer, C. J., Barford, D., & Marais, R. (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, *116*(6), 855–867.
- Wang, J., Xiao, L., Luo, C.-H., Zhou, H., Zeng, L., Zhong, J., Tang, Y., Zhao, X.-H., Zhao, M., & Zhang, Y. (2015). CD44v6 promotes  $\beta$ -catenin and TGF- $\beta$  expression, inducing aggression in ovarian cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, *11*(5), 3505–3510.
- Wang, X. Q., Luk, J. M., Leung, P. P., Wong, B. W., Stanbridge, E. J., & Fan, S. T. (2005). Alternative mRNA splicing of liver intestine-cadherin in hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research*, *11*(21), 483–489.
- Webster, N. J. G. (2017). Alternative RNA Splicing in the Pathogenesis of Liver Disease. *Frontiers in Endocrinology*, *8*, 133.



- Weiss L., & Greep RO. 1982. Histología. 4ª edición. Editorial el Ateneo. Barcelona
- Wessler, I., Roth, E., Deutsch, C., Brockerhoff, P., Bittinger, F., Kirkpatrick, C. J., & Kilbinger, H. (2001). Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. *British Journal of Pharmacology*, 134(5), 951–956.
- Wilhelm, S., & Chien, D.-S. (2002). BAY 43-9006: preclinical data. *Current Pharmaceutical Design*, 8(25), 2255–2257.
- Will, C. L., & Lührmann, R. (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(7), 1–2.
- Wlodaver, A. M., & Staley, J. P. (2014). The DExD/H-box ATPase Prp2p destabilizes and proofreads the catalytic RNA core of the spliceosome. *RNA (New York, N.Y.)*, 20(3), 282–294.
- Wörns, M. A., & Galle, P. R. (2010). Future perspectives in hepatocellular carcinoma. *Digestive and Liver Disease*, 42(3), S302-9.
- Wu, P., Zhou, D., Wang, Y., Lin, W., Sun, A., Wei, H., Fang, Y., Cong, X., & Jiang, Y. (2019). Identification and validation of alternative splicing isoforms as novel biomarker candidates in hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*, 41(3), 1929–1937.
- Wu, T., & Fu, X.-D. (2015). Genomic functions of U2AF in constitutive and regulated splicing. *RNA Biology*, 12(5), 479–485.
- Wu, X., Kekuda, R., Huang, W., Fei, Y. J., Leibach, F. H., Chen, J., Conway, S. J., & Ganapathy, V. (1998). Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake2) and evidence for the expression of the transporter in the brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32776–32786.
- Xiang, Q., Chen, W., Ren, M., Wang, J., Zhang, H., Deng, D. Y. B., Zhang, L., Shang, C., & Chen, Y. (2014). Cabozantinib suppresses tumor growth and metastasis in hepatocellular carcinoma by a dual blockade of VEGFR2 and MET. *Clinical Cancer Research*, 20(11), 2959–2970.
- Xiang, Q., Zhang, D., Wang, J., Zhang, H., Zheng, Z., Yu, D., Li, Y., Xu, J., Chen, Y., & Shang, C. (2015). Cabozantinib reverses multidrug resistance of human hepatoma HepG2/adr cells by modulating the function of P-glycoprotein. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 35(3), 1010–1023.
- Xiao, W., Adhikari, S., Dahal, U., Chen, Y. S., Hao, Y. J., Sun, B. F., Sun, H. Y., Li, A., Ping, X. L., Lai, W. Y., Wang, X., Ma, H. L., Huang, C. M., Yang, Y., Huang, N., Jiang, G. Bin, Wang, H. L., Zhou, Q., Wang, X. J., & Yang, Y. G. (2016). Nuclear m6A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Molecular Cell*, 61(4), 507–519.
- Xu, Y. Z., Newnham, C. M., Kameoka, S., Huang, T., Konarska, M. M., & Query, C. C. (2004). Prp5 bridges U1 and U2 snRNPs and enables stable U2 snRNP association with intron RNA. *EMBO Journal*, 23(2), 376–385.



- Yabuuchi, H., Tamai, I., Nezu, J., Sakamoto, K., Oku, A., Shimane, M., Sai Y., & Tsuji, A. (1999). Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289(2): 768-773.
- Yeo, G. W., Coufal, N. G., Liang, T. Y., Peng, G. E., Fu, X. D., & Gage, F. H. (2009). An RNA code for the FOX2 splicing regulator revealed by mapping RNA-protein interactions in stem cells. *Nature Structural and Molecular Biology*, 16(2), 130–137.
- Yonezawa, A., Masuda, S., Yokoo, S., Katsura, T., & Inui, K.-I. (2006). Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319(2), 879–886.
- Yoon, J. H., Higuchi, H., Werneburg, N. W., Kaufmann, S. H., & Gores, G. J. (2002). Bile acids induce cyclooxygenase-2 expression via the epidermal growth factor receptor in a human cholangiocarcinoma cell line. *Gastroenterology*, 122(4), 985–993.
- Yoon, J.-H., Canbay, A. E., Werneburg, N. W., Lee, S. P., & Gores, G. J. (2004). Oxysterols induce cyclooxygenase-2 expression in cholangiocytes: implications for biliary tract carcinogenesis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 39(3), 732–738.
- Yoshida, K., & Ogawa, S. (2014). Splicing factor mutations and cancer. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 5(4), 445–459.
- Yoshida, T., Kim, J. H., Carver, K., Su, Y., Weremowicz, S., Mulvey, L., Yamamoto, S., Brennan, C., Mei, S., Long, H., Yao, J., & Polyak, K. (2015). CLK2 Is an Oncogenic Kinase and Splicing Regulator in Breast Cancer. *Cancer Research*, 75(7), 1516–1526.
- You G., & Morris ME. 2014. Drug Transporters: Molecular Characterization and Role in Drug Disposition. 2da edición. Wiley.
- Yu, Q., & Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- $\beta$  and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes and Development*, 14(2), 163–176.
- Yun, K. J., Yoon, K. H., & Han, W. C. (2002). Immunohistochemical Study for CD44v6 in Hepatocellular Carcinoma and Cholangiocarcinoma. *Cancer Research and Treatment : Official Journal of Korean Cancer Association*, 34(3), 170–174.
- Zhang, B., Zhang, X., Zhou, T., & Liu, J. (2015). Clinical observation of liver cancer patients treated with axitinib and cabozantinib after failed sorafenib treatment: a case report and literature review. *Cancer Biology & Therapy*, 16(2), 215–218.
- Zhang, J., Lieu, Y. K., Ali, A. M., Penson, A., Reggio, K. S., Rabadan, R., Raza, A., Mukherjee, S., & Manley, J. L. (2015). Disease-associated mutation in SRSF2 misregulates splicing by altering RNA-binding affinities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 112(34), E4726-34.
- Zhang, L., Dresser, M.J., Gray, A.T., Yost, S.C., Terashita, S., & Giacomini K. M. (1997). Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter. *Molecular Pharmacology*, 51(6): 913-921



Zhang, L., Vincent, G. M., Baralle, M., Baralle, F. E., Anson, B. D., Benson, D. W., Whiting, B., Timothy, K. W., Carlquist, J., January, C. T., Keating, M. T., & Splawski, I. (2004). An intronic mutation causes long QT syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*, *44*(6), 1283–1291.

Zhang, S., Lovejoy, K. S., Shima, J. E., Lagpacan, L. L., Shu, Y., Lapuk, A., Chen, Y., Komori, T., Gray, J. W., Chen, X., Lippard, S. J., & Giacomini, K. M. (2006). Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity. *Cancer Research*, *66*(17), 8847–8857.

Zhang, Y. (2015). Detection of Epigenetic Aberrations in the Development of Hepatocellular Carcinoma. (2015). Detection of Epigenetic Aberrations in the Development of Hepatocellular Carcinoma. In *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) (Vol. 1238, pp. 709–731. In *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) (Vol. 1238, pp. 709–731). Humana Press Inc.

Zhang, Y., Madl, T., Bagdiul, I., Kern, T., Kang, H.-S., Zou, P., Mäusbacher, N., Sieber, S. A., Krämer, A., & Sattler, M. (2013). Structure, phosphorylation and U2AF65 binding of the N-terminal domain of splicing factor 1 during 3'-splice site recognition. *Nucleic Acids Research*, *41*(2), 1343–1354.

Zhong, X.-Y., Ding, J.-H., Adams, J. A., Ghosh, G., & Fu, X.-D. (2009). Regulation of SR protein phosphorylation and alternative splicing by modulating kinetic interactions of SRPK1 with molecular chaperones. *Genes & Development*, *23*(4), 482–495.

Zhu, H.-J., Appel, D. I., Gründemann, D., & Markowitz, J. S. (2010). Interaction of organic cation transporter 3 (SLC22A3) amphetamine. *Journal of Neurochemistry*, *114*(1), 142–149.

