

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE

**DESARROLLO DE NUEVAS MOLÉCULAS VECTORIZADAS CON
ÁCIDOS BILIARES MEDIANTE CICLOADICIÓN 1,3-DIPOLAR PARA
LA EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN HEPATOBILIAR Y EL
TRATAMIENTO DE CÁNCER HEPÁTICO**

TESIS DOCTORAL

ÁLVARO GACHO TEMPRANO

2021

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE

**DESARROLLO DE NUEVAS MOLÉCULAS VECTORIZADAS CON
ÁCIDOS BILIARES MEDIANTE CICLOADICIÓN 1,3-DIPOLAR PARA
LA EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN HEPATOBILIAR Y EL
TRATAMIENTO DE CÁNCER HEPÁTICO**

Memoria que presenta **D. Álvaro Gacho Temprano** para optar al Título de Doctor por la
Universidad de Salamanca

Salamanca, 17 de septiembre de 2021

Dña. ANA PURIFICACIÓN VELASCO CRIADO, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "Desarrollo de nuevas moléculas vectorizadas con ácidos biliares mediante cicloadición 1,3-dipolar para la evaluación de la función hepatobiliar y el tratamiento de cáncer hepático" presentada por D. Álvaro Gacho Temprano 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 Dr. Dña. Marta Rodríguez Romero, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, y la Dra. Dña. María Concepción Pérez Melero, Profesora Titular del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día diez de septiembre de dos mil veintiuno.

Fdo. Ana Purificación Velasco Criado

Dña. MARÍA JESÚS MONTE RÍO COMO COORDINADORA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOPATOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada "Desarrollo de nuevas moléculas vectorizadas con ácidos biliares mediante cicloadición 1,3-dipolar para la evaluación de la función hepatobiliar y el tratamiento de cáncer hepático" presentada por D. Álvaro Gacho Temprano 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 Dr. Dña. Marta Rodríguez Romero, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, y la Dra. Dña. María Concepción Pérez Melero, Profesora Titular del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día diez de septiembre de dos mil veintiuno.

Fdo. María Jesús Monte Río

D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA, Dña. MARTA RODRÍGUEZ ROMERO, PROFESORA CONTRATADA DOCTORA DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, Y Dña. MARÍA CONCEPCIÓN PÉREZ MELERO, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada " Desarrollo de nuevas moléculas vectorizadas con ácidos biliares mediante cicloadición 1,3-dipolar para la evaluación de la función hepatobiliar y el tratamiento de cáncer hepático " presentada por D. Álvaro Gacho Temprano para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección conjunta en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca a diez de septiembre de dos mil veintiuno.

Fdo. José Juan García Marín

Fdo. Marta Rodríguez Romero

Fdo. María Concepción Pérez Melero

El doctorando ha disfrutado durante la realización de esta Tesis Doctoral de un Contrato de Investigación para la formación de personal universitario (FPU), de la Universidad de Salamanca, cofinanciada por el Banco Santander (Programa III)

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

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.

Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional. Proyecto PI19/00819. “Interés pronóstico y terapéutico de las proteínas SLC y ABC en adenocarcinomas hepáticos y gastrointestinales”. Investigador Principal: José Juan García Marín. Periodo: 2020-2022.

Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional. Proyecto PI20/00189. “Identificación de biomarcadores diagnóstico y pronóstico en pacientes con cáncer biliar”. Investigador Principal: Rocío I. Rodríguez Macías. Periodo: 2021-2023.

Asociación Española Contra el Cáncer. Proyectos cáncer infantil y cáncer poco frecuentes. “Estudio multidisciplinar del colangiocarcinoma: diagnóstico, patogenia y nuevas terapias”. Coordinador: Jesús María Bañales Asurmendi. Investigador Principal (USAL): José Juan García Marín. Periodo: 2018-2021.

Fundación La Marató de TV3. Ref. 201916-31. “Contribution of mitochondrial oxysterol and bile acid metabolism to liver carcinogenesis”. Coordinador: José Carlos Fernández Checa. Investigador Principal (USAL): José Juan García Marín. Periodo: 2020-2023.

Consejería de Educación, Junta de Castilla y León. Proyecto SA074P20. “Reajustes personalizados en el tratamiento farmacológico del carcinoma hepatocelular basados en la heterogeneidad tumoral y la aparición de sensibilización colateral”. Investigador Principal: José Juan García Marín. Periodo: 2021-2023.

Fundación La Marató de TV3. Ref. 201916-31. “Contribution of mitochondrial oxysterol and bile acid metabolism to liver carcinogenesis”. Coordinador: José Carlos Fernández Checa. Investigador Principal (USAL): José Juan García Marín. Periodo: 2020-2023.

Fundación General de la Universidad de Salamanca. Plan TCUE. Ref: Plan de Transferencia de Conocimiento Universidad-Empresa 2015-2017. “Desarrollo de sondas con fluorescencia infrarroja para la determinación no invasiva de la funcionalidad hepática a tiempo real”. Investigador Principal (USAL): Marta Rodríguez Romero. Periodo: 2017-2018.

Universidad de Salamanca. Programa de Financiación de grupos de investigación. Modalidad C2. 2019-2020”. “Utilización de la química *Click* en el desarrollo de nuevos agentes citostáticos vectorizados para el tratamiento del cáncer hepático y digestivo”. Investigador Principal (USAL): Marta Rodríguez Romero. Periodo 2019-2021.

Fundación General de la Universidad de Salamanca. Plan TCUE. CONVOCATORIA ITINERARIO PARA LA TRANSFERENCIA DE RESULTADOS (ITR) de la Universidad de Salamanca – Edición 2021. Plan de Transferencia de Conocimiento Universidad-Empresa 2018-2020. “Desarrollo de nuevas estrategias vectorizadas basadas en la Química *Click* para el diagnóstico de hepatopatías y tratamiento de cáncer enterohepático mediante la unión de derivados de ácidos biliares a moléculas con actividad farmacológica”. Investigador Principal (USAL): Marta Rodríguez Romero. Periodo 2021.

Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral han sido registrados como Patentes en la Oficina Española de Patentes y Marcas:

Patente registrada a fecha de 17/12/2020 ante la Oficina de Patentes y Marcas con número de registro **202031262** referente a: "SONDAS PARA LA EVALUACIÓN NO INVASIVA DE LA FUNCIONALIDAD HEPÁTICA A TIEMPO REAL", a nombre de UNIVERSIDAD DE SALAMANCA. Inventores/autores/obtenedores: **Álvaro Gacho Temprano**; Beatriz Sánchez de Blas; Francisco Bermejo González; María Concepción Pérez Melero; Marta Rodríguez Romero; José Juan García Marín

Patente registrada a fecha de 08/06/2021 ante la Oficina de Patentes y Marcas con número de registro **202130526** referente a: "AGENTES CITOSTÁTICOS VECTORIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER HEPÁTICO Y DIGESTIVO", a nombre de UNIVERSIDAD DE

SALAMANCA. Inventores/autores/obtenedores: **Álvaro Gacho Temprano**; Beatriz Sánchez de Blas; Francisco Bermejo González; María Concepción Pérez Melero; Marta Rodríguez Romero; José Juan García Marín

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

Marin, J., Macias, R., Monte, M. J., Herraiez, E., Peleteiro-Vigil, A., Blas, B. S., Sanchon-Sanchez, P., **Temprano, A. G.**, Espinosa-Escudero, R. A., Lozano, E., Briz, O., & Romero, M. R. (2020). Cellular Mechanisms Accounting for the Refractoriness of Colorectal Carcinoma to Pharmacological Treatment. *Cancers*, 12(9), 2605. <https://doi.org/10.3390/cancers12092605>.

Marin, J., Macias, R., Monte, M. J., Romero, M. R., Asensio, M., Sanchez-Martin, A., Cives-Losada, C., **Temprano, A. G.**, Espinosa-Escudero, R., Reviejo, M., Bohorquez, L. H., & Briz, O. (2020). Molecular Bases of Drug Resistance in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*, 12(6), 1663. <https://doi.org/10.3390/cancers12061663>

Marin, J., Serrano, M. A., Monte, M. J., Sanchez-Martin, A., **Temprano, A. G.**, Briz, O., & Romero, M. R. (2020). Role of Genetic Variations in the Hepatic Handling of Drugs. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2884. <https://doi.org/10.3390/ijms21082884>

Parte de los conocimientos obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos:

XXVI EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC-ISMC 2021). Online, 29 de Agosto al 2 de Septiembre 2021. **Álvaro Gacho Temprano**; Beatriz Sánchez De Blas; Mattia Mori; Francisco Bermejo González; Marta Rodríguez Romero; José Juan García Marín; María Concepción Pérez Melero. "Synthesis and biological evaluation of conjugate drugs bearing bile acid carriers to target liver tumours". TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. ÁMBITO: Internacional.

The International Liver Congress 2021. Online, 23-26 de Junio 2021. **Álvaro Gacho Temprano**; Beatriz Sánchez De Blas; Ricardo Espinosa Escudero; Candela Cives Losada; Elisa Lozano; Oscar Briz; María Concepción Pérez Melero; Francisco Bermejo González; Marta Rodríguez Romero; José Juan García Marín. "Extracorporeal non-invasive assessment of the hepatobiliary function using novel bile acid derivatives with near-infrared fluorescence". TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. ÁMBITO: Internacional.

XXXVII Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química. San Sebastián, 26 al 29 de Mayo 2019. Marta Rodríguez Romero; Concepción Pérez Melero; Mónica Del Dujo Gutiérrez; Aurora Monje Liras; José Juan García Marín; Francisco Bermejo González; **Álvaro Gacho Temprano**. "1,3-Dipolar cycloadditions for the development of novel cytostatic drugs targeted toward liver cancer". TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. ÁMBITO: Nacional.

Reza como si todo dependiera de Dios.

Trabaja como si todo dependiera de ti.

San Agustín

AGRADECIMIENTOS:

Este maravilloso viaje comenzó un lejano 18 de agosto del año 2015, día en el que yo me encontraba de campamento en las tierras leonesas ubicadas en el sur de la cordillera cantábrica. Eran las tres de la mañana y decidí revisar la bandeja de entrada del email para encontrarme con la sorpresa de un correo de quién sería uno de mis futuros directores de Tesis. A partir de entonces dio paso este, aunque a veces difícil, increíble viaje el cuál, sin las personas que cito a continuación, no podría haber completado. Me dijeron que para alcanzar el éxito debía de rodearme de mejores personas que yo, por ello, con estas líneas quiero expresar mi agradecimiento hacia aquellas personas que han aportado su granito de arena, tanto fuera como dentro del laboratorio y que me han ayudado a crecer tanto en lo académico y en lo personal.

A mis directores de Tesis:

Al Dr. José Juan García Marín, por ofrecerme esta gran oportunidad de entrar a formar parte de este maravilloso proyecto. Por todas las horas de dedicación, formación y enseñanza y, por supuesto, por todos los consejos tanto dentro como fuera del laboratorio que me han permitido culminar con esta Tesis.

A la Dra. Marta Rodríguez, por todas las horas de su tiempo que ha dedicado para que el trabajo fuera de calidad. Gracias por sacar tiempo de donde no lo había para atender mis dudas o revisar mi trabajo, en especial al comienzo de mi Tesis. Después de tanto esfuerzo, por fin podemos decir: *“Lo hemos logrado”*.

A la Dra. María Concepción Pérez, por todas las horas que nos hemos pasado viendo espectros, repasando señales e integrales. De ti he aprendido a ser crítico con el trabajo y a ser taimado a la hora de tomar decisiones. Gracias por tu paciencia para resolver mis dudas a pesar de que nunca llevaba las integrales de los espectros hechas.

Al resto del grupo HEVEPHARM:

Aunque al principio yo era “el químico” que pasaba como un fantasma muy de vez en cuando por el 118, con el tiempo mi presencia fue aumentando y me ganasteis el corazón uno a uno, aquí van los agradecimientos del “químico en cultivos”.

A la Dra. M^a Ángeles Serrano, por su gran corazón y amabilidad, por su ayuda, en especial en el ámbito administrativo. Pocas personas tienen un corazón que deja una impronta huella desde el principio.

A la Dra. M^a Jesús Monte te convertiste, como no puede ser de otra manera, en ejemplo de equilibrio entre profesionalidad y buen sentido del humor. También, por enseñarme a trabajar con animales, jamás pensé ver como se hacía una reanimación a una rata. También quiero agradecerte la ayuda en toda la gestión en la recta final con el depósito de la Tesis. Gracias por darme calma y tranquilidad en la tempestad.

Quizás una de las personas que más sabe del grupo, por ello se ha ganado el sobrenombre de “Oscarpedia”. Su curiosidad y, sobre todo, sus grandes dones hacen que el Dr. Óscar Briz Sánchez haya hecho mella en mí. Gracias por demostrarnos cada día que nunca dejamos de aprender y por sorprenderme con tu gran talento.

A la Dra. Elisa Herráez, gran investigadora que me enseñó a dar mis primeros pasos con el Masas. Por tu buen humor, tu talento y tu mente crítica, que no pasan desapercibidas. Gracias por acompañarme en esta etapa y siempre estar dispuesta a echar una mano.

A la Dra. Rocío Rodríguez, por tu amabilidad y buena templanza. Fue contigo con la que tuve uno de los primeros contactos con el grupo, en la asignatura del Máster, en el ya lejano 2015. Desde el primer momento me transmitiste el buen espíritu que comparte este grupo, de profesionalidad y humanidad a partes iguales.

A mi N compi, compañera de residuos, tutora legal en cultivos y heredera de mis proyectos. Gracias por enseñarme todo sobre Cultivos Celulares y Biología Molecular y por acompañarme en los experimentos *in vivo*. Poco a poco te fuiste convirtiendo en mi amiga y compañera de viaje. Gracias por estar siempre con una sonrisa y enseñarme con toda tu santa paciencia.

Poco a poco fuimos forjando una amistad que espero que siga más allá de esta etapa: gracias a Anabel, Paula, Elisa y Meraris, por todos esos momentos siendo los “juernes” o la “patrulla” sin vuestro buen humor y sin vuestra amistad, este camino hubiera sido más oscuro. Paula, por llegar cada mañana con una sonrisa y estar tan reluciente. Hemos pasado muchos baches en el camino, pero estoy seguro de que, con tu optimismo e inteligencia, sabrás superarlos uno a uno. A Anabel, por aguantarme muchos días en el gimnasio y ser tan pesado con que tienes que volver, algún día lo conseguiré y, por supuesto, por las charlas en el café, cuando te preguntaba “¿Y qué tal?” Sabiendo que una pregunta, nunca era una pregunta. A Elisa, la “zamorana” cuyo espíritu y ejemplo de esfuerzo son la viva imagen de nuestra pequeña ciudad. Y a Meraris, compañera breve de nitrógeno, cuyas frases épicas nos alegraban el día cuando más lo necesitábamos.

Gracias a esa persona inquieta, nerviosa y andariega, que le conocí con una bandana en la cabeza y que me enseñó a tranquilizarme cuando las cosas no salen como uno quiere. A Ricardo, por ser siempre sincero y decir la verdad, aunque a veces duela, pero que siempre te libera. Gracias por apoyarme y por todas las largas horas, aunque muchas a través de una pantalla, en las que podíamos hablar de mil y un temas.

A María, la última incorporación a nuestro grupo. Sé que a veces el camino es difícil, pero si crees que merece la pena, ve a por ello. Gracias por todos los momentos compartidos tanto dentro como fuera del laboratorio y por todos los proyectos que hemos comenzado.

A Candela, quizás una de las personas que siempre está para echarte una mano. Gracias por ofrecerte siempre a ayudar o por tener tiempo para explicarte cualquier procedimiento, aunque discutamos de vez en cuando por echar tantas horas en el laboratorio.

A mi compañera de escritorio Laura, que, aunque me enfade a veces por invadirme mi sitio, las duras mañanas, cargadas de su sarcasmo y su buen humor, habrían sido mucho más duras. Siempre recordaré tu frase *“Álvaro, no puedo ayudarte a hacer algunas cosas con compuestos químicos, ahora somos uno más”*

A Ana Peleteiro, nuestra asesora en cuanto a leyes y normativas. Quizás habría que poner tu foto al lado de la expresión “debemos relativizar”. Gracias por todos tus consejos en todos los temas legales y por tu buen humor.

A Sara, nuestra incorporación más reciente. Aunque nos conozcamos desde hace unos escasos meses, tus consejos ya han hecho mella en mí. Estoy seguro de que te esperan grandes éxitos en nuestro grupo.

A Marta Alonso, aunque ya no estes por nuestros laboratorios, tu espíritu sigue presente, con tu optimismo y tus memes que perdurarán por muchos años. Gracias por acompañarme.

A Emilia Flores, por tener siempre una sonrisa y alegrarnos el corazón cada mañana. Gracias por todo tu trabajo, sin tí, este grupo estaría cojo.

Y nada de este trabajo hubiera sido lo que es sin mis compañeros de Químicas, donde aprendí todo lo que sé sobre síntesis orgánica, ayudándome y apoyándome cuando lo necesitaba. A Quino, por seguir enseñándome día tras día, pocas personas se ofrecen a ayudar de forma tan desinteresada como tú. A Ángel, por ser mi modelo a seguir, el primer día que entré en un laboratorio de química orgánica me acogiste como tu pupilo y a día de hoy me sigues ayudando y enseñando. A José, amigo y compañero, que nos apoyamos día a día ya sea en el laboratorio, en las tediosas horas en la E.O.I. e incluso en el gimnasio, Gracias por compartir tu amistad conmigo y sobre todo por esas escapadas para poner reacciones clandestinas en vacaciones y fines de semana. También a Sara, pues has sido también apoyo en duros

momentos. No puedo olvidarme de Laura, que siempre tiene su puerta del despacho abierta para escucharme y hacerme ver que los días no son tan grises. A Simón, por enseñarme todo lo que sé sobre modelizaciones y acompañarme en todo el proceso de la estancia.

Al Dr Paco Bermejo, sin tu guía, ayuda, enseñanza y acogida, no habría podido lograr todos los objetivos. Siempre has estado presente en mi carrera investigadora, desde aquellas lejanas prácticas en tercero de carrera, cuando nos enseñaste que la química no se aprende en un libro, si no en el laboratorio. Siempre estás dispuesto a ayudarme, tanto en lo profesional como en lo personal.

Gracias Anna, por todas las horas que me he pasado en RMN contigo hablando de espectros, la estancia o planes de futuro. Siempre estás dispuesta a escuchar y a dedicar el tiempo que haga falta a explicar las señales de un espectro. Gracias a ti aprendí la frase "*Gracias a Dios, la resonancia existe*".

A César, por su gran ayuda y paciencia para analizar las muestras que le envió. Por todas las horas y ensayos que hemos hecho hasta poder ver las tan buscadas señales de mis compuestos.

Al Dr. Mattia Mori e Francesca Picarazzi dell'Università di Siena, con i quali ho avuto la meravigliosa esperienza di lavorare durante il mio soggiorno. Ho solo parole di gratitudine per voi. Parte di questa tesi non sarebbe stata possibile senza il vostro aiuto. Grazie per avermi ospitato, insegnato e per le fantastiche passeggiate in Siena, gli altri posti della Toscana e Roma.

No puedo por menos citar a todo el grupo de los Madrugadores: Eva, Simón, Juan, Ángel, Patricia, Diego, José, Chema y María. Gracias porque sin vuestro optimismo y buen humor, acudir por las mañanas a las 8 día tras días, no hubiera sido igual. Por supuesto a Vicente y a Sonia, que muchas veces me daban de comer y me levantaban el ánimo a golpe de chistes y buen café.

También quiero dedicar unas palabras a quién fue compañero de trabajo en el Servicio de Rayos X, y que aún me ha seguido animando y ayudando durante estos años. A José, sin tu ayuda, guía y buen humor, no hubiera podido seguir adelante en muchas ocasiones.

A Miriam, que, aunque no has estado desde el principio de esta aventura, sí que me has acompañado durante gran parte de ella y hasta el final. Gracias por aguantarme y permitirme soñar día tras día. Y gracias por agarrarme la mano, darme fuerza y permitirme volar.

A mi equipo, a Ángel, Ana, Henar, Ana, Elena y Noemí. Desde hace muchos años formáis parte de mi familia y sin vuestra compañía, nada de esto hubiera sido posible. Sois la roca que me sostiene, mi espíritu y mi alegría. Gracias por ser el equipo de “Los Bloques Mandan” Finalmente, a mis padres y hermana, que siempre me han apoyado en todas mis decisiones. Me enseñaron a luchar por mis sueños y gracias a su apoyo, uno de ellos se está cumpliendo en este manuscrito. Y como no, ahora a Liam, que me alegra el día cuando viene a mi habitación y me dices “*tío Álvaro, deja de trabajar y ven a jugar ya*”. Nunca pierdas la sonrisa.

Dedicada a:

Mis padres, Teresa y José y a mi hermana Teresa que me enseñaron a no rendirme ante las dificultades y a perseguir mis sueños.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Å:	Ångström
AB:	Ácido biliar
ABC:	<i>ATP Binding Cassette</i>
AcOEt:	Acetato de etilo
AcOH:	Ácido acético
ACOX:	Acil-CoA oxidasa
AKR:	<i>Aldo-Keto Reductase</i>
Ala:	Alanina
AMACR:	α -Metilacil-CoA racemasa
Arg:	Arginina
ASBT:	<i>Apical Sodium-Bile Acid Transporter</i>
Asn:	Asparagina
Asp:	Ácido aspártico
AST:	Aspartato-aminotransferasa
BAAT:	Ácido biliar-CoA: aminoácido N-aciltransferasa
BATKI	<i>Bile Acid-Tyrosine Kinase Inhibitor</i>
BCRP:	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
Boc:	<i>tert-butyloxycarbonyl (terc-butoxicarbonil)</i>
BSA:	Albúmina sérica bovina
BSEP:	<i>Bile Salt Export Pump</i>
C24:	Esteroides de 24 átomos de carbono
C27:	Esteroides de 27 átomos de carbono
CA:	Ácido cólico
CDCA:	Ácido quenodesoxicólico
CoA:	Coenzima A
COSY:	<i>Correlation spectroscopy</i> (espectroscopia de correlación)
Ct:	Ciclo umbral.
CYP:	Citocromo P45
CYP7A1:	Colesterol 7 α -hidroxilasa
d:	Doblete
DCA:	Ácido desoxicólico
DCC:	Diciclohexilcarbodiimida
dd:	Doble doblete
DHCA:	Ácido 3 α , 7 α -dihidroxicolestanoico.
DMAP:	Dimetilaminopiridina

DMEM:	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF:	Dimetilformamida
DMSO:	Dimetil sulfóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
dNTP:	Desoxinucleótido trifosfato
dt:	Doble triplete
EGFP:	Proteína verde fluorescente mejorada
EEM:	Error estándar de la media
EI:	Ionización por impacto electrónico
eq/equiv:	Equivalente
ER:	<i>Everted Repeat</i>
ERK:	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinases</i>
ESI:	Ionización por electrospray.
FAD:	Flavín adenín dinucleótido
FBS:	Suero bovino fetal
FXR:	<i>Farnesoid X Receptor</i>
GAPDH:	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GCA:	Ácido glicocólico
GCDCA:	Ácido glicoquenodesoxicólico
GDCA:	Ácido glicodesoxicólico.
Glu:	Ácido glutámico
Gly:	Glicina
h:	horas
His:	Histidina
HMBC:	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i> (experimentos de correlación heteronuclear hidrógeno-carbono a dos o tres enlaces)
HMQC:	<i>Heteronuclear multiple quantum correlation</i> (experimentos de correlación heteronuclear hidrógeno-carbono a un enlace)
HOMO:	<i>Highest occupied molecular orbital</i> (orbital molecular ocupado más alto en energía)
HPLC:	<i>High performance liquid chromatography</i> (cromatografía líquida de alta resolución)
HRMS:	Espectrometría de masas de alta resolución
HPLC-MS/MS:	Cromatografía líquida de alta presión acoplado a espectrometría de masas en tándem

Hz:	Hercio
IR:	<i>Infrared radiation</i>
J:	Constante de acoplamiento
kcal:	Kilocalorías.
LCA:	Ácido litocólico
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad
Leu:	Leucina
LUMO:	Lowest unoccupied molecular orbital (orbital molecular vacío de menor energía)
Lys:	Lisina
m:	Multiplete
MAPK:	<i>Mitogen-activated Protein Kinases</i>
MDR:	<i>Multidrug-Resistance Protein</i>
MEM:	<i>Minimum Essential Medium</i>
min:	Minutos
Mock:	Control transducido con vectores vacíos
MPR:	<i>Mechanism of pharmacoresistance</i>
MTT:	Metil tetrazolio
NIRBAD	<i>Near Infrared Radiation Bile Acid Derivative</i>
NTCP:	<i>Na⁺-Taurocholate Cotransporting Polypeptide</i>
o:	Orto
OATP:	<i>Organic Anion-Transporting Polypeptide</i>
ORF:	<i>Open reading frame</i>
OST:	<i>Organic Solute Transporters</i>
p:	Para
PBS:	Tampón fosfato salino
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
P. f.:	Punto de fusión
Phe:	Fenilalanina
pKa:	Logaritmo con signo negativo de la constante de disociación ácida
ppm:	Partes por millón
Pro:	Prolina
PXR:	<i>Pregnane X Receptor</i>
q:	Cuartete
qPCR:	PCR cuantitativa

RMN ¹³ C:	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹ H:	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RNA:	Ácido ribonucleico
mRNA:	Ácido ribonucleico mensajero
ROESY:	<i>Rotating frame Overhauser effect spectroscopy</i> (determinación de proximidad espacial entre hidrógenos por efecto Overhauser)
RT:	Transcripción reversa
RT-qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
s:	Singlete
SCP2:	Gen codificante de la proteína transportadora de esteroides X (SCPx)
SD:	Desviación estándar
SDS:	Dodecilsulfato sódico
Ser:	Serina
SHP:	<i>Small heterodimer partner</i>
SN2:	Sustitución nucleofílica bimolecular
SNP:	Polimorfismo de nucleótido único
t:	<i>terc</i>
t:	Triplete
TCA:	Ácido taurocólico
TCDCA:	Ácido tauroquenosodesoxicólico
TDCA:	Ácido desoxicólico
TKI	<i>Tyrosine Kinase Inhibitor</i> (Inhibidor de tirosina quinasa)
TKR	<i>Tyrosine Kinase receptor</i> (Receptor de tirosina quinasa)
TLCA:	Ácido taurolitocólico
t.a.:	Temperatura ambiente
t-Bu:	<i>terc</i> -butilo
THF:	Tetrahidrofurano
TUDCA:	Ácido tauroursodesoxicólico
TGR5:	<i>G-protein-Coupled Bile Acid Receptor</i>
THCA:	Ácido 3 α , 7 α , 12 α -trihidroxicolestanoico
TLC:	<i>Thin layer chromatography</i> (cromatografía en capa fina)
TOF:	<i>Time-of-flight</i> (cuadrupolo-tiempo de vuelo)
Tyr:	Tirosina
UAF:	Unidades arbitrarias de fluorescencia

UDCA:	Ácido ursodesoxicólico
UV:	Ultravioleta
VDR:	<i>Vitamin D Receptor</i>
WT:	<i>Wild type</i>
δ :	Desplazamiento químico
λ :	Longitud de onda

ÍNDICE

1.OBJETIVOS GENERALES.....	1
2.INTRODUCCIÓN.....	5
2.1. CIRCUITO ENTEROHEPÁTICO.....	7
2.1.1. Hígado.....	7
2.1.2. Función del sistema enterohepático.....	10
2.1.3. Bilis.....	12
2.2. ÁCIDOS BILIARES.....	13
2.2.1. Estructura y propiedades.....	13
2.2.2. Biosíntesis.....	16
2.2.3. Circulación enterohepática de los ácidos biliares.....	24
2.2.4. Transportoma de los ácidos biliares.....	27
2.2.4.1. Transportadores de ácidos biliares dependientes de sodio.....	28
2.2.4.2 Transportadores de ácidos biliares independientes de sodio.....	29
2.2.4.3 Proteínas ABC o “ATP-Binding Casette”.....	30
2.2.4.4. Otros transportadores importantes.....	31
2.2.5. Funciones de los ácidos biliares.....	32
2.3. CÁNCER HEPÁTICO.....	34
2.3.1 Carcinoma hepatocelular.....	34
Epidemiología.....	34
Diagnóstico.....	34
Tratamiento.....	35
2.3.2. Colangiocarcinoma.....	36
Epidemiología.....	36
Diagnóstico.....	37
Tratamiento.....	37
2.4. FÁRMACOS ANTITUMORALES INHIBIDORES DE RECEPTORES CON ACTIVIDAD TIROSINA QUINASA.....	38
2.5. MECANISMOS DE FÁRMACORRESISTENCIA QUE AFECTAN AL TRANSPORTOMA DE FÁRMACOS.....	41
2.5.1. Transportadores involucrados en la captación de fármacos (MPR-1a).....	42
2.5.2. Transportadores involucrados en el eflujo de fármacos (MPR-1b).....	44
2.6. VECTORIZACIÓN DE FÁRMACOS EMPLEANDO ABs COMO LANZADERAS MOLECULARES.....	46
2.6.1. Moléculas conjugadas con ácidos biliares.....	46
2.7. REACCIONES DE CICLOADICIÓN 1,3-DIPOLAR.....	50
2.7.1. Cicloadición de Huisgen.....	52

2.7.2. Reacciones <i>click</i> en la preparación de derivados de ácidos biliares	57
3. MATERIALES Y MÉTODOS	65
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	67
3.1.1. Líneas celulares.....	67
3.1.2. Modelos animales	68
3.2. PRODUCTOS QUÍMICOS.....	68
3.3. MEDIOS INSTRUMENTALES	69
3.4. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA.....	73
3.4.1. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	73
3.4.2. Espectroscopía de Infrarrojo	73
3.5. CULTIVOS CELULARES.....	74
3.5.1. Estudios de viabilidad celular	74
3.5.2. Determinación de la viabilidad celular	75
3.5.3. Cultivo celular para estudiar la expresión génica y la funcionalidad de proteínas transportadoras.....	75
3.6. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE mRNA POR RT-PCR CUANTITATIVA	76
3.6.1. Extracción del RNA total	76
3.6.2. Transcripción inversa (RT)	76
3.6.3. Diseño de <i>primers</i> para RT-PCR cuantitativa.....	76
3.6.4. RT-PCR cuantitativa	77
3.6.5. Cuantificación relativa	78
3.7. ESTUDIOS DE TRANSPORTE <i>IN VITRO</i>	78
3.7.1. Soluciones empleadas	78
3.7.2. Captación de compuestos fluorescentes para evaluar la actividad de los transportadores para derivados de ABs.....	78
3.8. MODELOS <i>IN VIVO</i>	79
3.8.1. Determinación de la fluorescencia de la bilis de las muestras obtenidas.....	79
3.8.2. Determinación de marcadores bioquímicos de daño hepático y renal	80
3.9. ESTUDIOS DE MECÁNICA MOLECULAR.....	80
3.9.1. Construcción de proteínas por homología estructural	80
3.9.2. Simulaciones de dinámica molecular (MD)	81
3.9.3. Docking molecular	81
3.10. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	82
3.11. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	83
4. CAPITULO 1: SINTESIS DE AGENTES CITOSTÁTICOS VECTORIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER HEPÁTICO.....	85

4.1. INTRODUCCIÓN	87
4.1.1. Erlotinib	87
4.1.2. Sorafenib	89
4.2. OBJETIVOS	92
4.4. CONCLUSIONES.....	93
5.CAPITULO 2: SINTESIS DE SONDAS PARA LA EVALUACIÓN NO INVASIVA DE LA FUNCIONALIDAD HEPÁTICA A TIEMPO REAL	95
5.1. INTRODUCCIÓN	97
5.2. OBJETIVOS	100
5.4. CONCLUSIONES.....	101
6.BIBLIOGRAFÍA	103
7.ENGLISH SUMMARY	121

Una de las estrategias utilizadas en el diseño de fármacos consiste en vectorizar un compuesto de conocida actividad farmacológica o de diagnóstico mediante conjugación con otra molécula que le facilite su acceso de la forma más selectiva posible al tejido-diana. De esta manera, en el caso de la terapia antitumoral se pretende aumentar la llegada del fármaco al interior de las células cancerosas, limitando al máximo su acumulación en tejidos sanos y con ello reduciendo sus efectos secundarios. En este sentido, distintos transportadores de membrana implicados en la captación de ácidos biliares (ABs), como son el NTCP (*Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide*), y varios miembros de la familia de OATP (*Organic Anion Transporting Polypeptides*) presentes en las células enterohepáticas constituyen excelentes dianas para el desarrollo de nuevos compuestos con carácter organotrópico hacia el hígado y el intestino. Por otra parte, los inhibidores de receptores con actividad tirosina quinasa (TKI, del inglés *Tyrosine Kinase Inhibitor*) representan una de las más innovadoras clases de agentes antitumorales para el tratamiento de distintos tipos de cáncer, incluidos los hepáticos y gastrointestinales, ya que actúan inhibiendo tanto la proliferación de las células tumorales como los procesos angiogénicos del tejido hospedador. Entre las ventajas que presentan los TKIs cabe destacar que gran parte de ellos son activos por vía oral y presentan un perfil de seguridad que los hace buenos candidatos para ser combinados con otras formas de quimioterapia o radioterapia. Algunos de ellos han sido aprobados o están en fase clínica de ensayo para el tratamiento del hepatocarcinoma (HCC) y del colangiocarcinoma (CCA), como son el erlotinib y el sorafenib. El erlotinib presenta un buen perfil de tolerabilidad, pero su actividad clínica es limitada para este tipo de pacientes, mientras que el sorafenib, empleado como tratamiento de primera línea de HCC, es el más efectivo y con un buen margen de tolerabilidad.

Sin embargo, a pesar de los avances en la obtención de nuevos fármacos, la supervivencia en algunos pacientes es escasa debido al desarrollo de mecanismos de farmacorresistencia (MPRs) en las células tumorales. De entre los 7 grupos de MPRs que se han descrito, los MPR-1a y MPR-1b que incluyen una reducción en la captación del fármaco por las células tumorales y una potenciación de los procesos de expulsión del agente citostático respectivamente, consiguen reducir la concentración de fármaco en el interior celular, por lo que los agentes citostáticos ven reducida su eficacia.

Por otro lado, en la práctica clínica actual, para el diagnóstico de enfermedades hepatobiliares en el paciente se utiliza la resonancia magnética con gadoxetato y colescintigrafía con derivados del ácido iminodiacético que, además de poseer la característica de una marcada vectorialidad específica hacia los hepatocitos, colangiocitos e ileocitos, puedan ser utilizadas como marcadores para el estudio de la funcionalidad hepática.

Debido a la estructura que poseen los ABs, se pueden considerar como moléculas ideales para la síntesis de una gran cantidad de sustancias farmacológicas que podrían unirse a diferentes posiciones del esqueleto esteroideo o de la cadena lateral. En este aspecto, podemos encontrar en bibliografía una gran cantidad de derivados de ABs unidos a aminoácidos, péptidos, heparina, insulina, fármacos antivirales y antitumorales, para el tratamiento de diversas patologías hepáticas. Empleando estas técnicas de vectorización de fármacos, que utiliza a los ABs como “caballos de Troya” se planteó la posibilidad de vectorizar TKIs, o un agente que pudiera ser empleado para el radiodiagnóstico.

El trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral tiene como **objetivo global** desarrollar nuevas estrategias vectorizadas para el tratamiento y la detección de tumores hepáticos, haciendo uso de las reacciones de cicloadición 1,3-dipolar, para obtener derivados de ABs que posean características hepatotrópicas, además de propiedades citostáticas o fluorescentes.

Para lograr el **objetivo global** se plantearon los siguientes objetivos parciales que se encuentran desarrollados en los capítulos 1 y 2.

Objetivo 1: Obtención y evaluación *in vitro* de una familia de compuestos denominados **BATKIs** (*Bile Acid-Tyrosine Kinase Inhibitor*) con propiedades organotrópicas y antitumorales.

Objetivo 2: Obtención y evaluación *in vitro* e *in vivo* de moléculas con vectorización hepatobiliar mediante ABs y portadores de un grupo con característica de fluorescencia en el infrarrojo cercano que denominaremos **NIRBAD** (*Near Infrared Radiation Bile Acid Derivative*)

2.INTRODUCCIÓN

2.1. CIRCUITO ENTEROHEPÁTICO

2.1.1. Hígado

El hígado es uno de los órganos de mayor tamaño del organismo, constituyendo aproximadamente el 2,5% del peso corporal en adultos sanos y un 5% en el recién nacido. Es uno de los órganos que posee una mayor actividad metabólica; para ello, recibe sangre oxigenada a través de la arteria hepática, mientras que a través de la vena porta, recibe nutrientes y metabolitos procedentes del tracto gastrointestinal y del bazo (Abdel-Misih and Bloomston, 2010). La sangre, una vez filtrada, abandona el hígado a través de la vena hepática, volviendo a la circulación sistémica. Tiene múltiples funciones biológicas, habiéndose identificado más de 1.500 funciones vitales. Algunas de ellas son:

- ❖ **Metabolismo de lípidos:** A nivel hepático se sintetizan multitud de moléculas lipídicas como son el colesterol, triglicéridos y ácidos grasos. También se lleva a cabo la síntesis y metabolismo de lipoproteínas plasmáticas, β -oxidación de ácidos grasos y producción de cuerpos cetónicos durante el ayuno.
- ❖ **Metabolismo de proteínas:** Se lleva a cabo la biosíntesis de algunas proteínas como son la albúmina o proteínas de unión a hormonas.
- ❖ **El hígado posee la capacidad de regular la biodisponibilidad de aminoácidos en la circulación general.** Asimismo, se encarga de la síntesis de varias proteínas, entre ellas la albúmina, proteínas de unión a hormonas y lleva a cabo reacciones de transformación del amonio en urea, catabolismo de bases púricas y pirimidínicas e interconversión de aminoácidos no esenciales.
- ❖ **Metabolismo de hidratos de carbono:** El tejido hepático está implicado en la homeostasis de la glucosa, ya que el hígado es el encargado de suministrar glucosa al organismo. La glucosa se sintetiza en los hepatocitos a partir de glicerol, aminoácidos y lactato, llevándose a cabo la ruta de gluconeogénesis. El hígado es también el encargado de realizar la síntesis, almacenamiento y degradación de glucógeno a través de procesos de glucogenólisis y glucogénesis.
- ❖ **Producción de bilis:** El hígado secreta la bilis al duodeno, donde desempeña un papel fundamental en la digestión y absorción de grasas y vitaminas liposolubles.
- ❖ **Síntesis de diferentes factores:** Entre los que destacan los factores de coagulación como el fibrinógeno, factores III, V, VII, IX y XI. Además, tiene lugar en el hígado la síntesis del grupo hemo y del factor de crecimiento IGF-1.

- ❖ Almacén de múltiples sustancias: En el hígado se almacenan biomoléculas como glucosa en forma de glucógeno, vitamina B12, hierro y cobre.
- ❖ Destoxificación: El hígado es un órgano que lleva a cabo la eliminación de numerosos compuesto endógenos y exógenos por medio de una serie de reacciones químicas como oxidación, reducción, glucoronidación, entre otras, que transforman algunos compuestos tóxicos, fármacos, hormonas y esteroides en productos de fácil eliminación gracias a su aumento de hidrosolubilidad.
- ❖ Función inmunitaria: El hígado es el órgano donde se ubican las células de Kupffer. Dichas células son macrófagos que se localizan en las paredes de los sinusoides, formando parte del sistema reticuloendotelial.

La unidad estructural y funcional del parénquima hepático es el acino hepático, formado por la porción de tejido asociada a las ramas terminales de la vena porta y la arteria hepática y a un conducto biliar, siendo así el espacio porta el organizador central del funcionamiento de este órgano. En el acino, tanto el aporte sanguíneo que procede de la arteria hepática como de la vena porta se mezcla en la zona de los sinusoides hepáticos, definidos como los espacios vasculares entre las láminas de los hepatocitos, posteriormente, este aporte sanguíneo, es drenado por las venas centrolobulillares, que a su vez convergen formando la vena suprahepática. Los hepatocitos, que son las células más abundantes en el hígado, se disponen formando cordones o vías que conducen desde la entrada sanguínea portal hasta la salida venosa, repitiéndose por todo el parénquima. Por lo que respecta a la vena porta, está formada por la unión de las venas esplénica y mesentérica superior, ya que la vena mesentérica inferior drena en la vena esplénica que también recibe sangre de la vena gástrica y la vena pancreática (Sibulesky, 2013). Por otro lado, en cuanto a la arteria hepática común es una rama del tronco celíaco, junto con las arterias esplénica y gástrica izquierda (Figura 2.1).

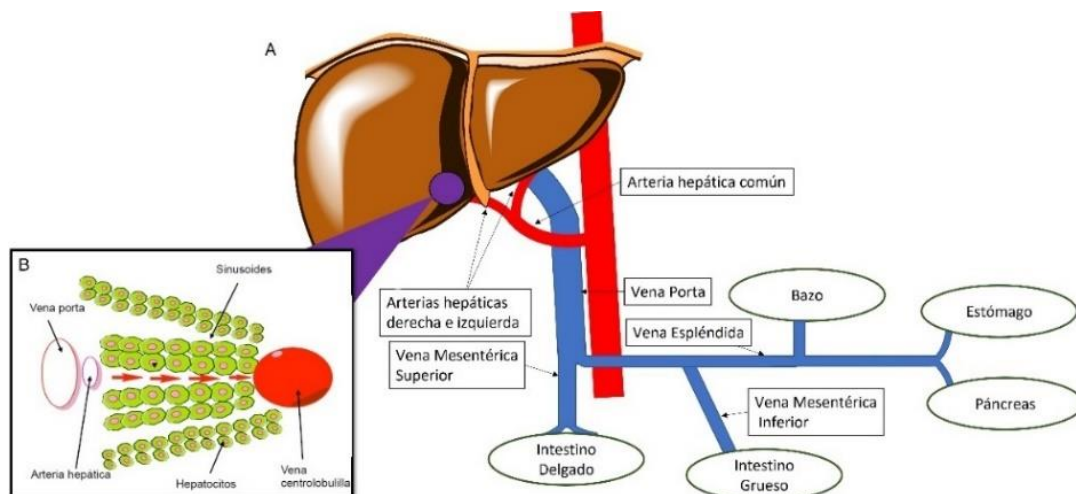


Figura 2.1: (A): Esquema del flujo sanguíneo a nivel hepático; (B): Esquema de un acino hepático en el que se indica con flechas el sentido de la circulación de la sangre partiendo de las ramas de la vena porta y arteria hepática hacia la vena centrolobulillar.

A nivel externo, el hígado está dividido por el ligamento falciforme, que forma un lóbulo derecho mayor y un lóbulo izquierdo más pequeño. El ligamento falciforme une el hígado con la pared abdominal anterior. En su base se encuentra el ligamento redondo, que es un remanente de la vena umbilical vestigial. En el hígado, a nivel sublobulillar, podemos encontrar diferentes tipos celulares, cuyas funciones varían de un tipo a otro, tal como se resume a continuación:

- ❖ **Hepatocitos:** Son las células más abundantes, agrupándose en hileras de una o dos células de espesor. Los hepatocitos representan alrededor del 80% de las células del hígado formando su parénquima. Llevan a cabo la mayoría de las funciones hepáticas. Tienen una estructura más o menos regular, conformando un poliedro de ocho o más caras y con un diámetro de entre 13 y 30 μm , siendo la media de 25 μm . Los hepatocitos son células que presentan una polaridad muy marcada, determinando su orientación con respecto al sinusoides. Su membrana celular posee tres regiones de distinta especificidad morfológica y funcional (Evans, 1980). La membrana sinusoidal se encuentra orientada hacia el flujo sanguíneo (espacio de Disse). Dicha membrana, posee microvellosidades que aumentan la superficie de intercambio y su característica principal es que la actividad Na^+/K^+ -ATPasa se localiza fundamentalmente en esta región de la membrana plasmática de los hepatocitos (Sellinger *et al.*, 1990). La membrana lateral es la membrana situada entre hepatocitos adyacentes y presenta un número menor de microvellosidades. Entre sus funciones, destacan las de mantener la adhesión mecánica y la conexión funcional entre los hepatocitos adyacentes. Por último, la membrana canalicular se caracteriza por ser una invaginación de la superficie de la membrana celular del

hepatocito, formando el canalículo biliar al unirse a la membrana del hepatocito contiguo. Esta membrana también presenta numerosas microvellosidades hacia la luz canalicular (Meier, 1988), (Watanabe *et al.*, 1991).

- ❖ **Colangiocitos:** Son células epiteliales del conducto biliar que recubren la red tridimensional de conductos biliares conocida como árbol biliar (Gaudio *et al.*, 2009). Constituyen en torno al 5% de la población total de células hepáticas, cuya principal función consiste en modificar los componentes y la concentración de la bilis canalicular hepática a medida que ésta se transporta a lo largo del árbol biliar. Para ello, llevan a cabo procesos complejos de ósmosis dependientes de la secreción y/o absorción de electrolitos y solutos orgánicos (Irwin M. Arias, 2009). Además, si se produce un daño hepático, los colangiocitos son capaces de actuar como células hepáticas progenitoras, participando en la regeneración del hígado (Sell, 2001).
- ❖ **Células endoteliales fenestradas:** Células que se encuentran ubicadas en los sinusoides a ambos lados de las hileras que forman los hepatocitos. Permiten un intercambio directo de partículas de tamaño medio, como lipoproteínas, entre la sangre y los hepatocitos.
- ❖ **Células de Kupffer:** Son macrófagos residentes del hígado o histiocitos hepáticos. Son células que se encargan de la fagocitosis de bacterias y sustancias extrañas, así como de la producción de citoquinas y de participar en la respuesta inflamatoria (Hall, 2016).
- ❖ **Células estrelladas:** También denominadas como células de Ito, se encuentran en el espacio perisinusoidal de Disse. Entre sus funciones se encuentran la de almacenar vitamina A, sintetizar diferentes proteínas de la matriz extracelular y colágeno de tipo III, además de segregar factores de crecimiento, por lo que juegan un papel fundamental en los procesos de regeneración y fibrogenesis.

2.1.2. Función del sistema enterohepático

La circulación enterohepática consiste en un proceso de secreción y recaptación de compuestos por un conjunto de conductos intra y extrahepáticos por los cuales circula la bilis que se produce en el hígado hasta desembocar en el duodeno. El sistema biliar (Figura 2.2) consta del parénquima hepático y el árbol biliar, formado a su vez por los ductos biliares o canales de Hering, los ductos biliares intrahepáticos y extrahepáticos, el conducto hepático común, el conducto cístico y el conducto biliar común. También forma parte del sistema biliar la vesícula biliar, que sirve de lugar de almacenamiento de la bilis.

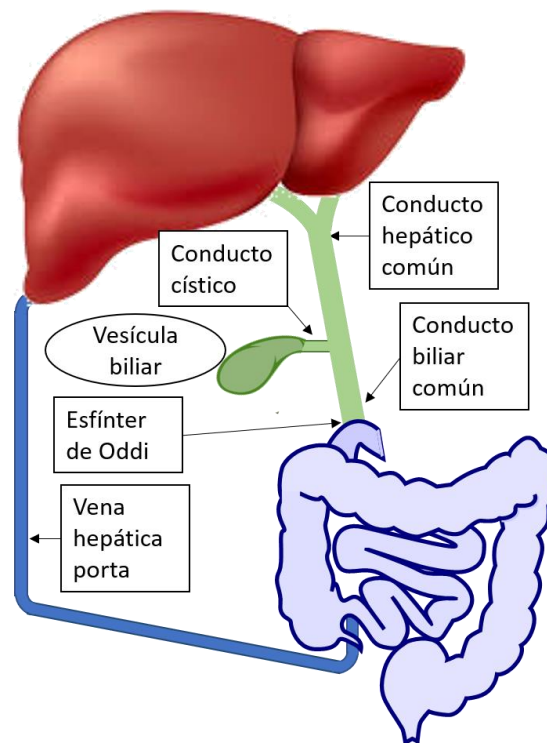


Figura 2.2: Esquema de la circulación enterohepática en la que participan componentes de la bilis.

La formación de la bilis comienza en los hepatocitos, secretando los componentes biliares a los canalículos hepáticos a través de un complejo sistema de transporte activo y pasivo que permite variar las concentraciones de los componentes que forman la bilis, de los cuales se hablará más adelante. Este proceso tiene lugar en el canalículo biliar, en el cual se vierte la bilis primaria o canalicular. Posteriormente, la bilis pasa a los conductos biliares, lugar donde los colangiocitos alcalinizan (Kanno *et al.*, 2001) y diluyen la bilis (Lazaridis and LaRusso, 2015). Este proceso está facilitado por hormonas como la secretina, somatostatina, gastrina, insulina y acetilcolina; y es debido a transportadores que se encuentran en los colangiocitos y que se expresan en la membrana apical o en la basolateral de los mismos, modificando así el volumen y las concentraciones finales de la bilis. El hígado se divide en una porción hepática derecha e izquierda, que poseen sus propios conductos biliares que confluyen en un conducto hepático común, el cual se une al conducto cístico, conducto procedente de la vesícula biliar. Finalmente, la bilis ya formada, se secreta al duodeno durante el proceso de digestión. En los periodos en los que la bilis no es necesaria, como son los periodos entre ingesta de alimentos, se almacena en la vesícula biliar, desde la que, tras un estímulo externo por contracción de la vesícula y relajación del esfínter de Oddi, se expulsa hacia el duodeno (Ludwig, 1987), (Hundt *et al.*, 2020), (Espinosa, 2006).

Este complejo sistema biliar funciona gracias a la estructura que posee, que bien se puede asemejar a la forma de un árbol, donde los conductos común y extrahepático corresponderían al tronco, en donde convergen los conductos biliares intrahepáticos que corresponderían a las ramas más grandes (Masyuk *et al.*, 2001).

Por último, la bilis llega al conducto colédoco, encargado de llevar la bilis hasta la porción descendente del duodeno.

En cuanto a la vesícula biliar, no todos los vertebrados la poseen. En el caso de los seres humanos, está alojada en la fosa de la vesícula biliar, en la cara visceral del hígado. Consta de fondo, cuerpo, infundíbulo y cuello que se continúa con el conducto cístico. La función de la vesícula biliar en la circulación enterohepática de la bilis es doble, pues interviene tanto almacenando la bilis hasta que un estímulo externo provoca su liberación hacia el duodeno como concentrando y modificando su composición (Housset *et al.*, 2016).

2.1.3. Bilis

Una de las funciones del hígado es la producción de bilis, proceso estimulado por señales nerviosas y hormonas. La bilis es una solución compleja que está constituida en torno a un 97 % de agua, además de sales biliares, fosfolípidos, principalmente fosfatidilcolina y lecitina, colesterol, conjugados de bilirrubina y biliverdina que son los responsables del color amarillo-verdoso y electrolitos (sodio, potasio, calcio y cloruro). La bilis posee varias funciones, debido a la gran cantidad de componentes que la forman, destacando la capacidad surfactante que ayuda a emulsionar los lípidos. Esta capacidad surfactante se debe en parte a los ácidos biliares (ABs) ya que, gracias a su estructura anfótera, tienden a agregarse alrededor de gotas de lípidos, como son los triglicéridos y fosfolípidos. Los ABs se colocan de manera que su parte aniónica quede hacia el exterior de la micela (Figura 2.3), confiriendo una carga electrostática que evita que las micelas mixtas se puedan agregar entre sí nuevamente, otorgándoles un diámetro máximo de 50 μm en humanos (Macierzanka *et al.*, 2019).

La formación de micelas mixtas mediante la emulsión producida por la bilis proporciona un aumento considerable de área de superficie para la acción de la enzima lipasa pancreática, cuya función es la hidrólisis de los triglicéridos, dando como productos dos ácidos grasos y un monoglicérido, que son fácilmente absorbidos por las vellosidades del epitelio intestinal. Sin la acción emulsionante de los ABs, la mayoría de los lípidos en los alimentos se perderían en las heces. Por otro lado, al facilitar la absorción de los ácidos grasos, también facilita la absorción de las sustancias liposolubles, como las vitaminas A,

D, E y K. Entre otras funciones, cabe destacar la capacidad que tiene de actuar como vehículo de eliminación de sustancias que de otra manera no se podrían eliminar del organismo, como la bilirrubina, un subproducto del catabolismo del grupo hemo. También destaca la capacidad neutralizadora que posee la bilis, ya que su pH es alcalino, lo que es crucial, ya que, al interactuar con los jugos provenientes del estómago, es capaz de neutralizar el ácido clorhídrico estomacal al llegar al duodeno. Por otro lado, la bilis posee función bactericida gracias a la presencia de los ABs, que también actúan destruyendo muchos de los microbios que pueden estar presentes en los alimentos (Iacob *et al.*, 2018).

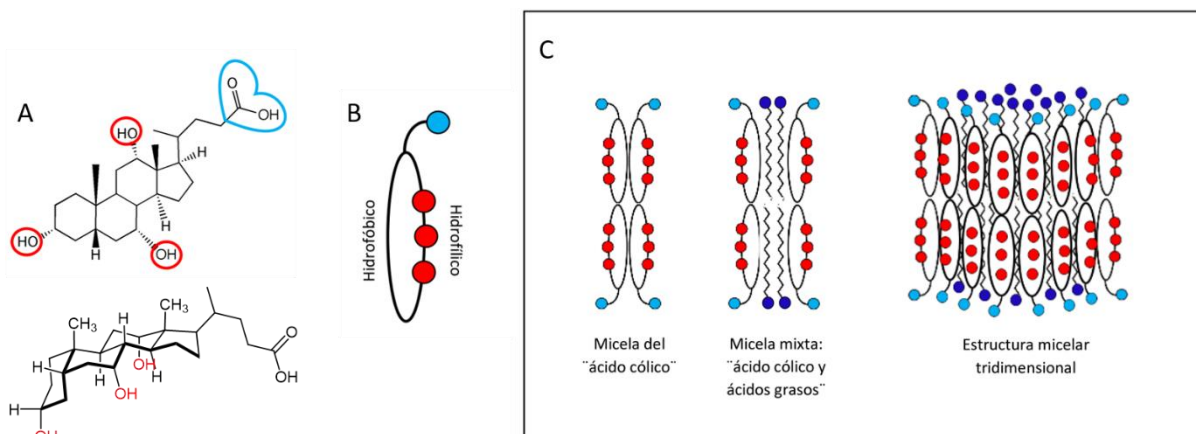


Figura 2.3: Ejemplo de la formación de micelas en presencia de ácidos biliares (ABs). (A): Estructura del ácido cólico (CA), uno de los ABs más abundante; (B): Representación gráfica de las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas del CA; en rojo los grupos hidroxilos, en azul el ácido carboxílico que a pH fisiológico estará en forma de carboxilato; (C): Esquema de la formación de micelas del CA junto con ácidos grasos, extrapolable a otros ABs.

2.2. ÁCIDOS BILIARES

2.2.1. Estructura y propiedades

Los ABs son esteroides que poseen una función ácido carboxílico y que se biosintetizan en el hígado mediante rutas metabólicas que emplean el colesterol como material de partida, llevándose a cabo reacciones de reducción e hidroxilación del núcleo esteroideo y ruptura oxidativa de su cadena lateral. Como resultado de esta biosíntesis, se obtienen moléculas con características hidrosolubles, fácilmente excretables y con utilidad, ente otros, en los procesos digestivos. La estructura de los ABs es propia de una molécula anfipática, poseyendo una parte hidrofóbica, propia del esqueleto esteroideo y una región hidrófila, gracias a la presencia de grupos hidroxilo, confiriéndoles propiedades detergentes (Monte *et al.*, 2009). Además, en la estructura de cualquier AB se distinguen dos partes, por un lado, el núcleo esteroideo y por otro la cadena lateral.

El núcleo esteroide de los ABs parte de un núcleo denominado esterano o gonano, que está formado por un fenantreno totalmente hidrogenado, dando lugar a tres ciclohexanos fusionados (A, B y C), y un ciclopentano (D) (Figura 2.4). Dicho núcleo, posee distintas funciones y sustituyentes, dando lugar a una gran variedad de estructuras químicas. Una característica que cabe destacar es la estructural común a todos los ABs y que conservan de su precursor, el colesterol, y es la presencia de dos grupos metilos, situados en los carbonos C10 (unión de los anillos A-B) y C13 (unión de los anillos C-D) que se conservan de las unidades de isopreno durante la biosíntesis del colesterol (Cerqueira *et al.*, 2016).

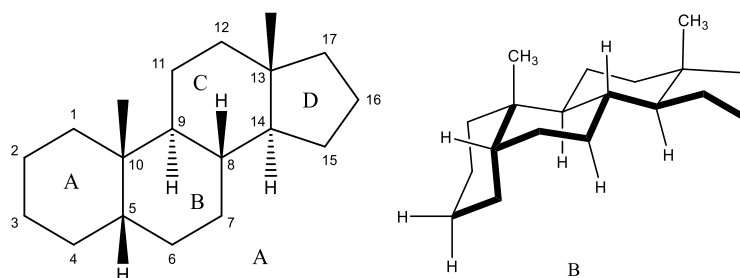


Figura 2.4: Núcleo esteroide funcionalizado con los metilos en C10 y C13. (A): Estructura plana con la estereoquímica; (B): Conformación espacial del esqueleto esteroideo.

Los grupos funcionales más comunes de los ABs son hidroxilaciones que varían en el número y posición a lo largo del núcleo esteroideo (Hofmann and Hagey, 2008) y en algunos casos, también por la presencia de dobles enlaces. En la mayoría de los mamíferos las hidroxilaciones más frecuentes suelen tener lugar en los carbonos C3, C6, C7 o C12, siendo en lo que se denomina disposición α , aunque también se pueden producir dichas hidroxilaciones en la disposición β , considerándose α la parte inferior del plano que forma el esqueleto esteroideo y β la superior (Monte *et al.*, 2009). En la mayoría de los vertebrados, incluido el ser humano, la configuración correspondiente al carbono 5 hace que el hidrógeno se sitúe en disposición β . Esta configuración se denomina “AB-5 β ”, pero no es la única, puesto que en algunos vertebrados los anillos A y B se encuentran unidos con configuración *trans* (Figura 2.5B), dando lugar a los denominados “AB-5 α o allo-AB” en los que el átomo de hidrógeno del C5 se encuentra en posición α . Un ejemplo de este tipo de ácidos es el ácido allo-cólico (Elliott, 1971). Otra variación que pueden presentar algunos ABs es la presencia de insaturaciones a lo largo del núcleo esteroideo. La más característica, es la presencia de insaturaciones entre los carbonos C4 y C5 o entre los C5 y C6, dando lugar a rigidez en los anillos, debido a la tensión generada por el doble enlace por el solapamiento de los orbitales π . Debido a esta tensión, adquieren una cierta planaridad, siendo su disposición espacial similar a la de los allo-AB. Estos ABs son frecuentes en fetos humanos sanos, aunque también pueden encontrarse en humanos

adultos que presenten algún tipo de mutación genética cuya consecuencia sea errores en el metabolismo de los ABs o asociados a ciertas patologías hepáticas. Un ejemplo es la presencia sérica de ABs con insaturaciones entre C4 y C5 en pacientes con un cuadro clínico de hepatocarcinoma. También se ha descrito la aparición de los allo-AB durante la hepatocarcinogénesis experimental, llegando a tener altas concentraciones durante la formación de adenomas y carcinomas (Carnicero, 1988).

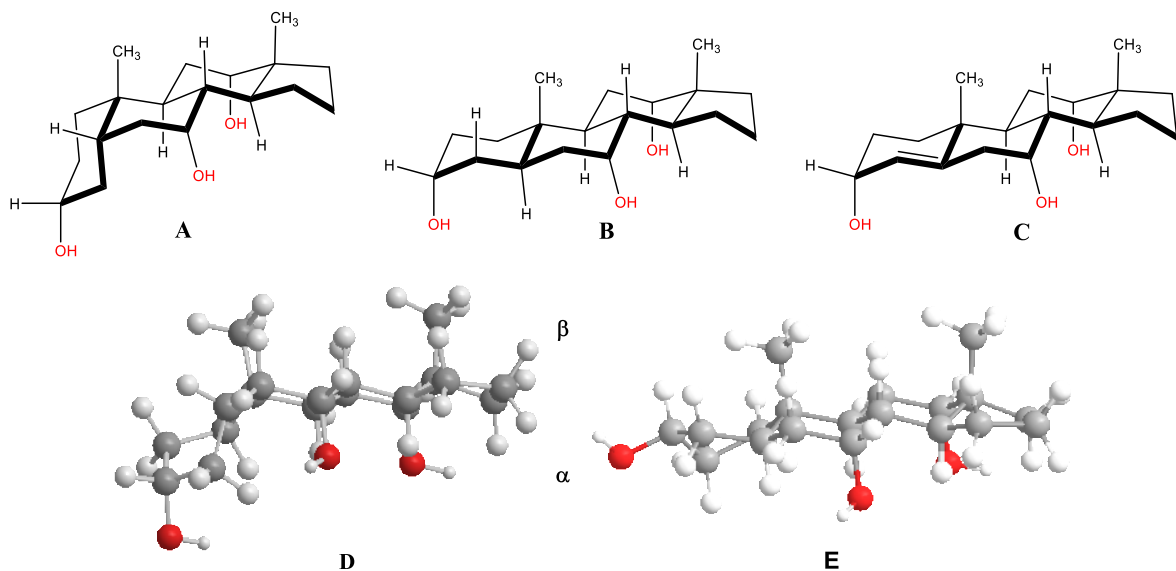
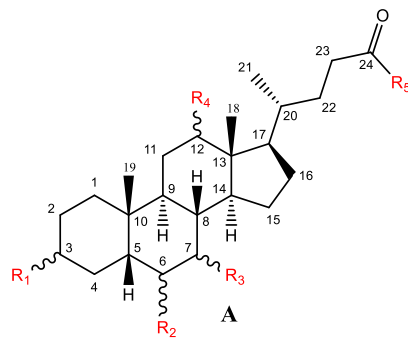


Figura 2.5: (A): Ácido biliar (AB) hidroxilado en posiciones alfa en los carbonos 3, 7 y 12; los anillos A y B tienen unión cis; (B): Estructura de un allo-ácido biliar, en el que la fusión entre los anillos A y B están con conformación trans debido a la estereoquímica del carbono 5; (C): Estructura de un AB con doble enlace entre C4 y C5; (D): Estructura modelizada de A en el que los hidroxilos quedan en el plano α , inferior al plano del esqueleto. E: Estructura modelizada de B.

En cuanto a la cadena lateral, por lo general presenta 5 átomos de carbono unidos al anillo D por el carbono C17. La conformación que adopta respecto al núcleo esteroideo es β , presentando un metilo en la posición 20, que al igual que el resto de metilos, se conserva de los bloques de isopreno que conforman el colesterol y es característico de todos los ABs (Figura 2.6). Junto con la cadena lateral, el número total de carbonos en los ABs suele ser 24 (Hofmann *et al.*, 2010), aunque también son frecuentes las modificaciones mediante la funcionalización del ácido carboxílico, gracias a la conjugación con glicina o con taurina, alargando la cadena lateral, como son el ácido glicocólico (GCA) o el taurocólico (TCA), respectivamente. En algunas ocasiones, y debido a patologías, se han descrito la presencia de ABs con un número diferente de carbonos, como es el caso del síndrome de Zellweger, en el que la cadena lateral presenta hasta 8 átomos de carbono en total, o en algunas situaciones que cursan con colestasis, donde se han detectado ABs con C23, denominándose estos últimos como “nor-ABs”, y a los que presentan C25 se les denomina “homo-ABs”.



Nombre de ácido biliar	Sustituyente y estereoquímica				
	3 (R1)	6 (R2)	7 (R3)	12 (R4)	24 (R5)
Colanoico	H	H	H	H	OH
Cólico (CA)	OH (α)	H	OH (α)	OH (α)	OH
Quenodesoxicólico (CDCA)	OH (α)	H	OH (α)	H	OH
Ursodesoxicólico (UDCA)	OH (α)	H	OH (β)	H	OH
Litocólico (LCA)	OH (α)	H	H	H	OH
Hiocólico	OH (α)	OH (α)	OH (α)	H	OH
Desoxicólico (DCA)	OH (α)	H	H	OH (α)	OH
Glicocólico (GCA)	OH (α)	H	H	OH (α)	NHCH ₂ COOH
Taurocólico (TCA)	OH (α)	H	OH (α)	OH (α)	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ H

Figura 2.6: Principales ácidos biliares (ABs) con hidroxilos en distintas posiciones y con diferente configuración. (A): Estructura general de los principales ABs. Imagen adaptada de (Monte et al., 2009).

2.2.2. Biosíntesis

La mayoría de los ABs presentes en el organismo provienen de la circulación enterohepática, ya que la gran selectividad de los transportadores específicos de los ABs hace que se recirculen hasta el 95%, perdiéndose solo un 5% al día en heces. Esto determina que el tiempo de vida media de un AB en el organismo sea, por término medio, de 2 a 3 días, pudiendo realizar entre 10 a 20 veces el circuito enterohepático (Hofmann, 1994). Su biosíntesis se lleva a cabo únicamente en los hepatocitos. De esta manera, el colesterol se transforma en otro tipo de compuestos que poseen mayor polaridad y, por ende, una mayor hidrosolubilidad, facilitando su eliminación ya que se pueden excretar fácilmente a través de la bilis.

Como se ha mencionado en el apartado anterior, en el ser humano, los ABs biosintetizados poseen, por lo general, un total de 24 átomos de carbono (C24). Partiendo del colesterol, siendo una molécula de 27 carbonos, para la síntesis de los ABs de 24 carbonos se requiere de varias etapas como son la hidroxilación, la oxidación del doble enlace entre los carbonos de las posiciones 5 y 6, la epimerización del hidroxilo de la posición 3 y la ruptura de la cadena lateral del colesterol mediante oxidación (Chiang, 2013). Para ello, se requiere por lo menos, la intervención de 17 enzimas que se distribuyen en los distintos compartimientos celulares, como son citosol, retículo endoplásmico, mitocondria y peroxisoma. La modificación de las posiciones de los grupos hidroxilos, la estereoquímica, o la posibilidad de funcionalizar el ácido carboxílico, hace posible que se puedan sintetizar una gran variedad de ABs. Se denominan ABs primarios a aquellos que son sintetizados en los hepatocitos, como son el ácido cólico (ácido 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colanoico, CA) y el ácido quenodesoxicólico (ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colanoico, CDCA) (Hofmann *et al.*, 2010), (Hofmann, 1977); además, también se biosintetizan conjugados con taurina y glicina, como se ha indicado anteriormente, dando lugar a los ABs GCA y TCA, mediante la formación de una amida por reacción del ácido carboxílico presente en la cadena lateral (Figura 2.7) (Di Ciaula *et al.*, 2017).

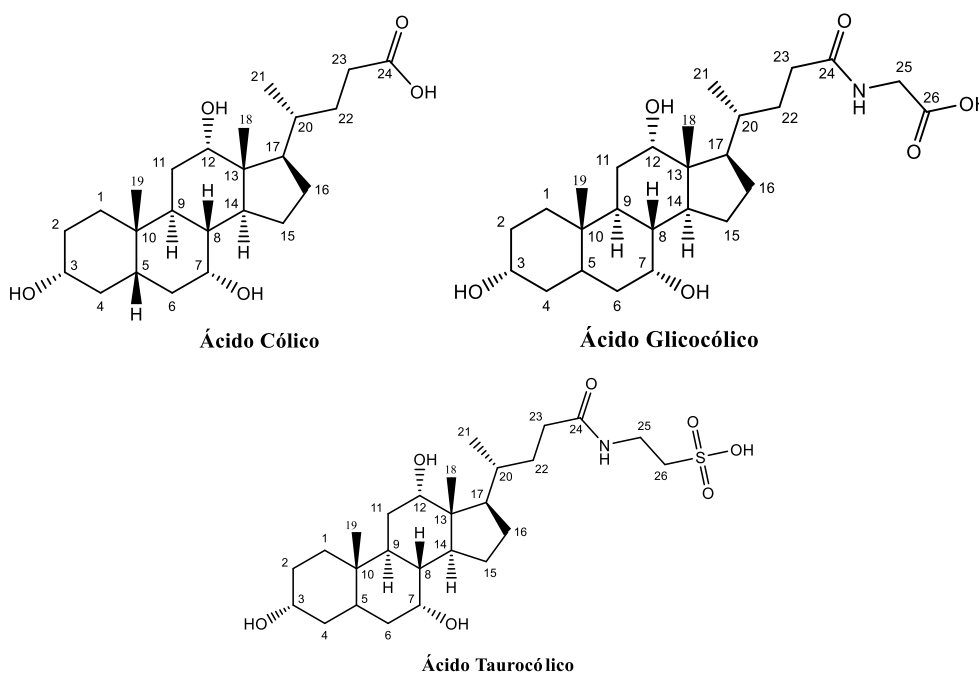


Figura 2.7: Ejemplos de estructuras de varios ABs en los que se puede ver la enumeración de los carbonos. En los ácidos glicocólico y taurocólico se puede observar la funcionalización en la cadena lateral formando una amida a partir del ácido carboxílico con la glicina o la taurina, respectivamente.

Aún no se conocen con exactitud todas las rutas metabólicas implicadas en la síntesis de ABs, ni el orden exacto de las reacciones, ya que varios intermediarios de la ruta pueden ser sustratos de más de una enzima, además de que no se conocen con detalle los mecanismos de transporte involucrados entre los intermediarios de la ruta de síntesis y los distintos compartimentos celulares. Sin embargo, se ha conseguido realizar una clasificación y una descripción de un total de cuatro rutas implicadas en la síntesis de ABs primarios como son el CA y CDCA. Estas rutas se denominan ruta clásica o neutra, ruta alternativa o ácida, ruta de Yamasaki y ruta de 25-hidroxiación (Figura 2.8) (Russell, 2003).

En cuanto a la vía clásica o vía neutra, se denomina así debido a que los compuestos intermediarios son esteroides neutros. Sus productos principales son el CA y el CDCA, siendo el paso limitante la hidroxilación en el C7 del núcleo esteroideo, llevada a cabo por la enzima microsomal colesterol 7 α -hidroxilasa (gen *CYP7A1*). La ruta de biosíntesis comienza en el retículo endoplásmico, llevándose a cabo, primeramente, modificaciones en el núcleo esteroideo y posteriormente el acortamiento de la cadena lateral, pasando de C27 a C24. El primer paso de la vía neutra consiste en la intervención de la enzima *CYP7A1*, que cataliza la reacción de hidroxilación del colesterol en el carbono C7 de su núcleo esteroide para formar 7 α -hidroxicolesterol mediante oxígeno molecular y NADPH+H⁺. Posteriormente, el grupo hidroxilo en la posición 3 debe ser epimerizado ya que se encuentra en orientación β y debe poseer disposición α . Esta epimerización se inicia mediante la conversión del 3 β -hidroxilo en un carbonilo, generando la cetona correspondiente, catalizado por la 3 β -hidroxi- Δ^5 -C₂₇-esteroide oxidoreductasa (*HSD3B7*), generando el 3-oxo- Δ^4 . Esta reacción está favorecida entálpicamente mediante la isomerización alílica al pasar el doble enlace de la posición 5,6 a la posición 4,5 ganando así energía de conjugación entre el carbonilo y el doble enlace. Esta reacción es crítica para la síntesis y función de los ABs, ya que se ha demostrado que en niños que albergan mutaciones en el gen *HSD3B7* desarrollan una enfermedad hepática progresiva que se caracteriza por ictericia colestática.

El siguiente paso es la posible hidroxilación del carbono C12 por la enzima esteroide 12-hidroxilasa (*CYP8B1*). Si se realiza la hidroxilación, se generará CA, mientras que, si no interviene esta enzima, se quedará como CDCA. La generación de estos dos ABs está determinada por la actividad del gen *CYP8B1*, que será el responsable de la proporción de CA a CDCA (Chiang, 2013).

Tanto si ha intervenido la *CYP8B1* como si no, los intermedios de la biosíntesis pasan al citosol, lugar donde se continúa la ruta de síntesis. Se produce en este punto la reducción del doble enlace, gracias a la Δ^4 -3-oxoesteroide-5 β -reductasa (*AKR1D1*) para generar un

enlace sencillo, debido a que la reducción transcurre mediante la adición de un protón en posición β en el carbono C5 y un hidruro en el carbono C4. Como resultado se obtiene un esqueleto esteroideo en el que la unión entre los anillos A y B es *cis*, formando los “5 β -ABs”. La ausencia o la presencia de mutaciones en *AKR1D1* podrían dar lugar a los “5 α -ABs o alo-ABs” en los que el átomo de hidrógeno del C5 se encuentra en posición α . También se ha encontrado que en hepatocarcinoma existen ABs que presentan insaturaciones entre los carbonos C4 y C5, lo que podría indicar una inactividad por parte de *AKR1D1*, generando esqueletos rígidos similares a los “5 α -ABs”. El paso siguiente corresponde con la reducción del carbonilo en posición 3, generando un hidroxilo en posición α , catalizada por la enzima 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (*AKR1C4*) con lo que se completaría el proceso de epimerización en C3.

Una vez realizadas las modificaciones en el esqueleto esteroideo y obteniendo las configuraciones adecuadas de los carbonos unidos a los hidroxilos, los intermedios pasan a la mitocondria, donde la enzima esteroide 27-hidroxiesteroide oxidasa (*CYP27A1*) produce una oxidación en C27, generando un grupo carboxilato y formando exclusivamente el estereoisómero 25*R* de los intermediarios ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colestanoico (DHCA) y ácido 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colestanoico (THCA) (Figura 2.9).

El carboxilato, mediante la intervención y activación por parte de la AB-CoA ligasa (BACS), que se encuentra en el retículo endoplásmico, o por la acil-CoA de cadena muy larga sintetasa (VLCS), que se localiza tanto en el retículo endoplásmico como en el peroxisoma, darán como resultado un enlace tioéster uniendo los intermediarios a la coenzima A (CoA). Una vez unidos a CoA, los ABs C27 son transportados al peroxisoma mediante el transportador ABCD3 (también denominado PMP70). En el peroxisoma van a sufrir una serie de reacciones basadas en β -oxidación, generando finalmente los ABs C24 (Figura 2.9). En primer lugar, la enzima α -metilacil-CoA racemasa (AMACR) produce la tautomerización ceto-enólica del carbonilo del tioéster, lo que favorece la epimerización de C25, desplazando el equilibrio hacia el producto con configuración *S*. Una vez generado el intermedio (25*S*)-THC-CoA o (25*S*)-DHCA-CoA se produce la β -oxidación, mediante la acil-CoA oxidasa 2 o acil-CoA de cadena ramificada oxidasa (ACOX2) generando 24-enoil-CoA del THCA y de DHCA con el doble enlace *trans* en el carbono C24. Dicha enzima solo reconoce sustratos con el centro quiral en configuración *S*, es por ello por lo que es necesario la intervención de la AMACR anterior, para generar el isómero *S*. El siguiente paso es la hidratación mediante una adición electrofílica de agua, llevada a cabo por la enzima D-bifuncional (DBP). Al igual que la ACOX2; esta enzima también es estereoespecífica y forma sólo los isómeros 24*R*. La enzima DBP vuelve a oxidar el grupo

hidroxilo mediante una deshidrogenación, generando la correspondiente cetona, formando 24-cetoésteres de CoA y generando NADH+H⁺. Finalmente, la proteína transportadora de esteroides X (SCPx) cataliza la tiolisis, liberando propionil-CoA y CA-CoA o CDCA-CoA. Dichos ABs pueden liberarse directamente o pueden conjugarse con taurina o glicina, mediante la aminoácido *N*-aciltransferasa (BAAT) formando el TCA o GCA, generándose en total los cuatro ABs primarios (Figura 2.9).

La ruta alternativa o vía ácida (Figura 2.8) consiste en realizar primero la funcionalización de la cadena lateral y posteriormente las modificaciones en el esqueleto esteroideo. Se denomina vía ácida debido a que los compuestos intermediarios que se obtienen aquí son esteroides ácidos, generando finalmente el CDCA. El primer paso de la biosíntesis por esta ruta está mediado por la anteriormente mencionada, *CYP27A1*, produciendo una oxidación del carbono C27 pasando a ser un ácido carboxílico, el ácido 3 β -hidroxi-5-colestenoico. Posteriormente, en el retículo endoplásmico, se produce la hidroxilación del carbono C7 catalizada por la enzima oxisterol-7 α -hidroxilasa (*CYP7B1*). Una vez generado el ácido 3 β ,7 α -dihidroxi-5-colestenoico se producen el resto de las modificaciones, interviniendo las mismas enzimas que en la ruta clásica.

En la ruta de Yamasaki (Figura 2.8), al igual que en la ruta alternativa, el principal ABs obtenido es el CDCA. Los primeros pasos de la biosíntesis mediante esta ruta son similares a la ruta alternativa. Primeramente, se obtiene, a partir del colesterol, el ácido 3 β -hidroxi-5-colestenoico mediante la *CYP27A1*. Sin embargo, se produce el acortamiento de la cadena lateral, obteniendo un C24 previamente a las modificaciones del esqueleto esteroideo. No se conoce con exactitud si se produce la hidroxilación del carbono C7 previamente a la β -oxidación o posteriormente. Lo que sí se conoce es que se forma un ácido colenoico con un hidroxilo en la posición 3 β . Una vez formado el ácido 3 β ,7 α -dihidroxi-5-colenoico se realizan las modificaciones estructurales en el esqueleto esteroideo siguiendo la ruta clásica, hasta obtener el CDCA que, mediante BAAT, puede pasar a ser ácido tauro/glicoquenodesoxicólico (TCDCA/GCDCA).

La ruta de 25-hidroxilación (Figura 2.8) no se ha caracterizado por completo, pero se encuentra descrita como otra vía de síntesis de ABs C24, que se inicia una vez se han realizado las modificaciones del núcleo esteroideo y previo a la β -oxidación. Una vez formado el 3 α ,7 α ,12 α -colestano-5 β -triol, la enzima citosólica 25-hidroxilasa (CH25H), adiciona un hidroxilo en la posición 25, generando el 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colestano-25-tetraol. Posteriormente, se vuelve a producir una hidroxilación en el carbono C24, formando el isómero S, que en el siguiente paso de síntesis se oxida generando un carbonilo en la posición 24, compuesto denominado 24-oxo-tetraol (Shefer *et al.*, 1976). Por último, se

produce la ruptura entre los carbonos C24 y C25, generando CA y acetona. En este último paso se desconoce con exactitud qué enzima lo lleva a cabo, pero se sugiere que puede ser la *CYP27A1*, ya que se produce una ruptura y una oxidación, por lo que estaría justificada la intervención de una CYP (Salen *et al.*, 1979).

Se desconoce la contribución y la importancia de cada ruta a la biosíntesis total de los ABs. Parece ser que la vía clásica es la más importante y que desempeña un papel principal en humanos. A esta vía le sigue la vía alternativa, que puede adquirir un papel fundamental en pacientes con enfermedades hepáticas y durante la vida fetal, ya que se ha determinado la presencia de ácido 3 β -hidroxi-5-colenoico, un intermedio de esta ruta, en el líquido amniótico de humanos, lo que sugiere que en el feto maduran antes las enzimas implicadas en la oxidación de la cadena lateral que las que actúan sobre el núcleo (Deleze *et al.*, 1978). También la vía alternativa es importante en niños (Setchell *et al.*, 1988), ya que contribuye con mayor peso a la síntesis de CDCA. Por último, en las rutas de Yamasaki y 25-hidroxilación, se desconoce cuál es su importancia en el aporte total de ABs, pero parece que la ruta de Yamasaki tiene una gran importancia durante la etapa fetal y neonatal (Setchell *et al.*, 1988), (Nakagawa and Setchell, 1990).

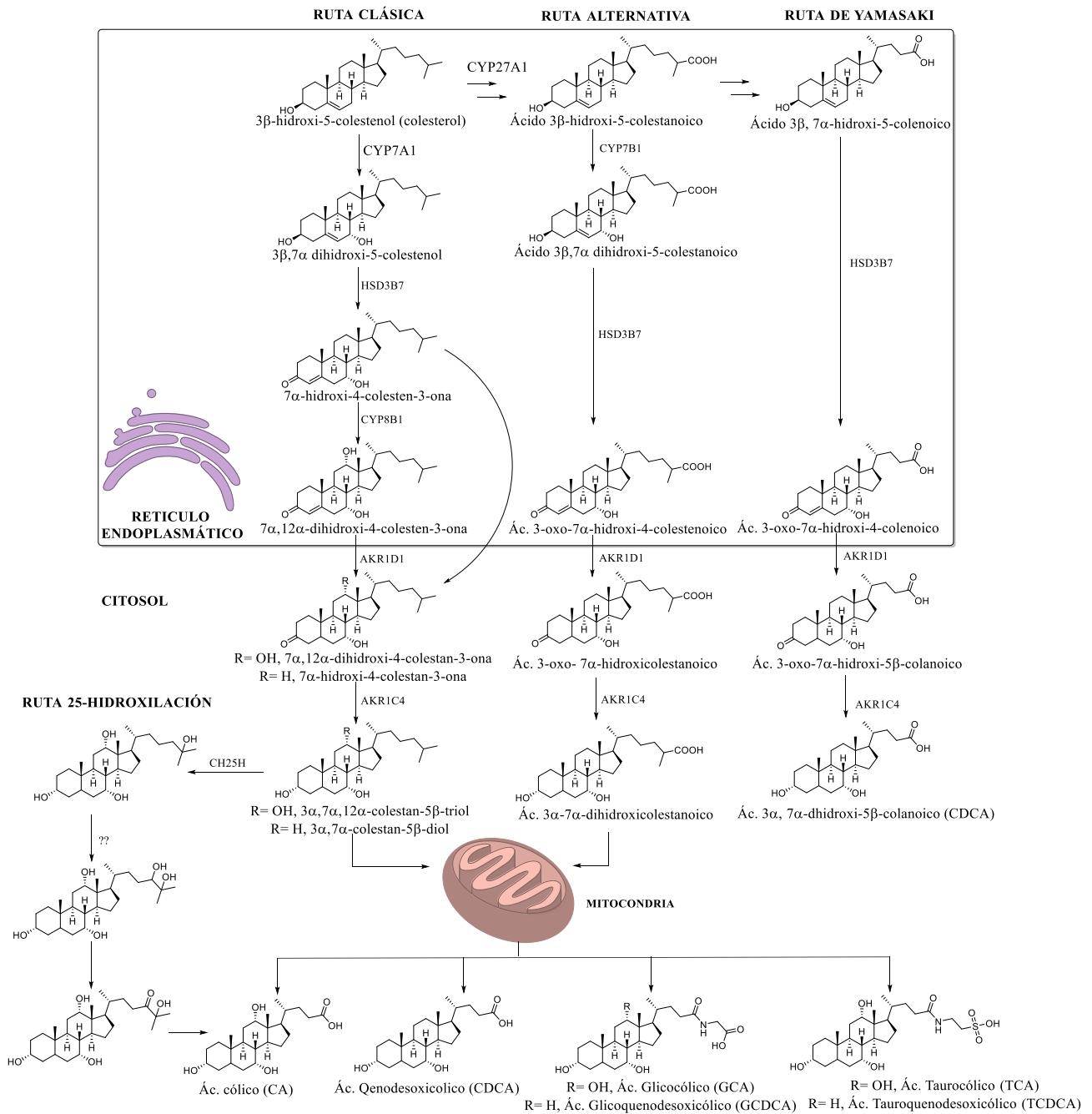


Figura 2.8: Esquema de las cuatro principales rutas de síntesis de los ácidos biliares primarios descritas en el ser humano: ruta de 25-hidroxilación, ruta clásica o neutra, ruta alternativa o ácida y ruta de Yamasaki. Se representan las principales enzimas implicadas y las fórmulas estructurales de los intermediarios con su nombre químico (IUPAC). CYP7A1: Colesterol 7α-hidroxilasa. CYP27A1: Esterol 27-hidroxilasa. CYP7B1: 25-hidroxicolesterol 7α-hidroxilasa. HSD3B7: 3β-hidroxi-Δ⁵-C₂₇-esteroide oxidoreductasa. CYP8B1: Esterol 12α-hidroxilasa. AKR1D1: Δ⁴-3-oxoesteroide-5β-reductasa. AKR1C4: 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa. CH25H: Colesterol 25-hidroxilasa. 24H: esteroide 24-hidroxilasa desconocida. BAAT: ácido biliar-CoA: aminoácido N-aciltransferasa (Vaz and Ferdinandusse, 2017).

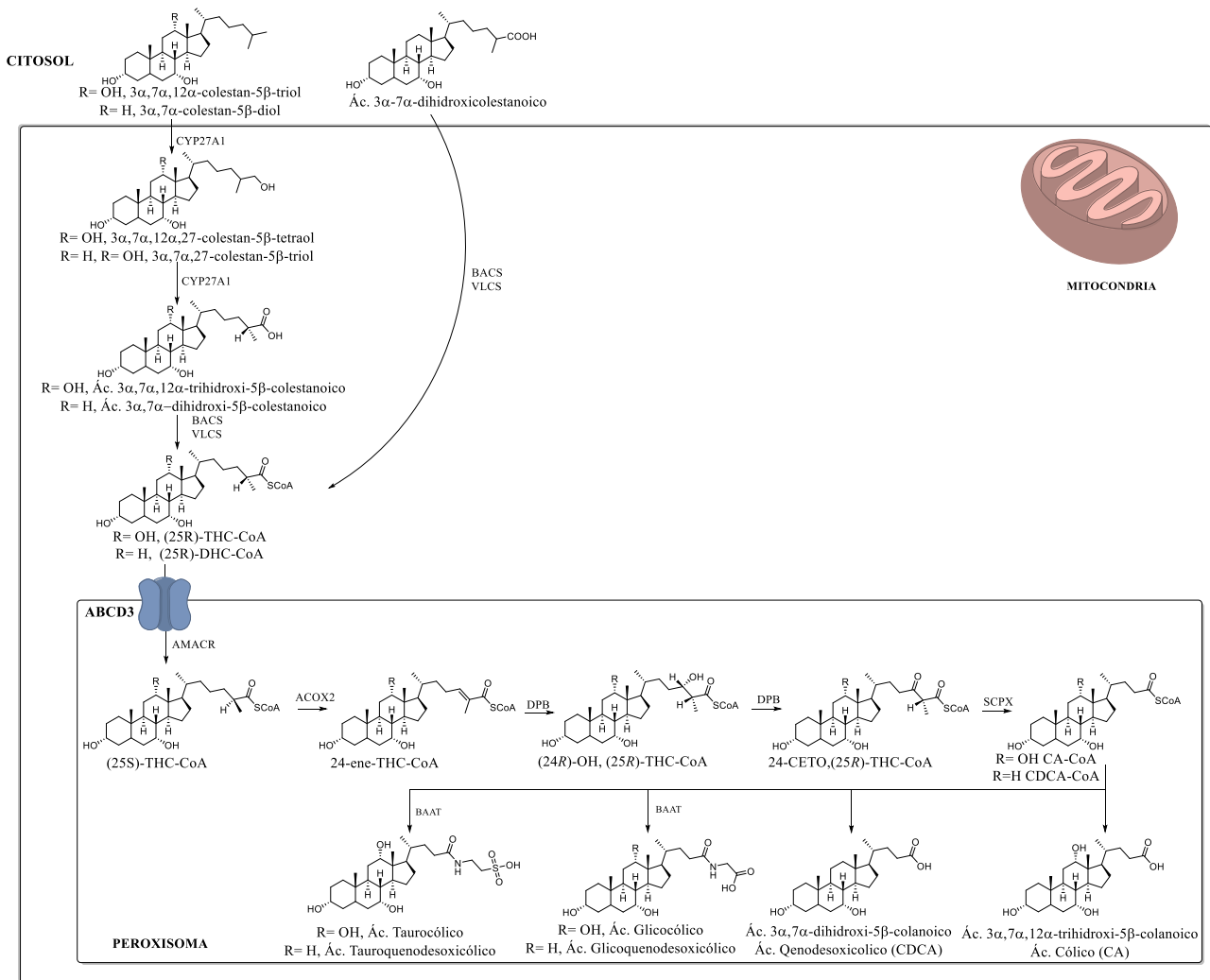


Figura 2.9: Reacciones de acortamiento del ácido $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -trihidroxi-5 β -colestanoico (THCA) por β -oxidación durante la síntesis del ácido cólico (CA) en el peroxisoma. Se representan las principales enzimas implicadas y las fórmulas estructurales de los intermediarios. THC: trihidroxicolestanoico. VLCS: acil-CoA de cadena muy larga sintetasa. BACS: ácido biliar-CoA ligasa. ABCD3: proteína ABC, subfamilia D, miembro 3. AMACR: α -metilacil-CoA racemasa. ACOX2: acil-coA oxidasa 2. DPB: proteína D-bifuncional. SCPX: proteína transportadora de esteroides X. BAAT: ácido biliar-CoA: aminoácido N-aciltransferasa (Vaz and Ferdinandusse, 2017).

2.2.3. Circulación enterohepática de los ácidos biliares

Una vez realizada la biosíntesis de ABs en los hepatocitos, éstos, junto con los que retornan desde el intestino, son secretados a los canalículos biliares. La excreción activa de los ABs forma parte de la generación de la bilis en el organismo, que proporciona un mecanismo natural para la eliminación de compuestos potencialmente tóxicos, tanto de naturaleza endógena como xenobiótica, a través de la vía hepatobiliar. Esta excreción se produce gracias a la acción de bombas específicas pertenecientes a la superfamilia de proteínas ABC, principalmente a la bomba exportadora de ABs (BSEP, *Bile Salt Export Pump*) (Trauner and Boyer, 2003). Por otro lado, también participan en la excreción biliar la proteína de resistencia a múltiples fármacos 3 (ABCB4, *Multidrug-Resistance Protein 3*) en el caso de los fosfolípidos, y el heterodímero ABCG5/ABCG8, para el transporte de colesterol (Elferink and Groen, 2002), que son claves para la protección del sistema biliar frente a las funciones detergentes de las altas concentraciones de los ABs (Smit *et al.*, 1993). Asimismo, participan en la secreción de ABs MRP2 (*ABCC2*) y ABCG2, también denominada BCRP; ambas bombas se expresan en la membrana canalicular (apical) de los hepatocitos y son capaces de transportar ABs, entre otros compuestos.

La bilis se almacena en la vesícula biliar, concentrándose mediante un sistema de intercambio de agua llegando a estar hasta mil veces más concentrada. Durante la ingesta de alimentos, en especial si éstos son ricos en grasa, la vesícula biliar expulsa la bilis debido a la acción de la hormona intestinal colecistoquinina, liberándola en el lumen intestinal. Una vez en el duodeno los ABs van a desempeñar sus funciones de emulsión, facilitando la absorción de grasas y vitaminas liposolubles de la dieta (Hofmann and Hagey, 2008). En el íleon terminal, la mayoría de los ABs son reabsorbidos por acción de sistemas transportadores específicos, como el cotransportador activo apical de ABs dependiente de sodio (ASBT, *Apical Sodium-Bile Acid Transporter*) y el transportador pasivo de solutos orgánicos heterodimérico OST α /OST β (*Organic Solute Transporters α/β*), localizado en la membrana basolateral en contacto con la sangre (Dawson and Karpen, 2015). En el ileocito, gracias a la proteína citosólica intestinal de unión a ABs (IBABP, *Ileal Bile Acid-Binding Protein*) se produce el transporte transcelular entre las dos membranas de los ileocitos (Gong *et al.*, 1994).

Hay una pequeña fracción, alrededor del 15% de los ABs, que escapan a la absorción en el íleon terminal y continúan el recorrido intestinal hasta llegar al colon. La microbiota intestinal anaerobia metaboliza los ABs primarios (CA, CDCA, TCA, GCA, TCDCA, GCDCA), generando los ABs secundarios (Agostino Di Ciaula, 2017). Los ABs secundarios formados son el ácido desoxicólico (DCA), y el ácido litocólico (LCA) que carecen de

hidroxilo en la posición 7 y provienen del CA y CDCA respectivamente. Los ABs tales como el TCA o el GCA, pueden sufrir una hidrólisis del enlace amida, por parte de algunas bacterias, dando como resultado el CA de origen y liberando taurina y glicina. El CA producto de dicha hidrólisis puede sufrir nuevamente la acción bacteriana para formar LCA. También se forma el UDCA, que posee el hidroxilo de C7 en la posición en β y que posteriormente puede sufrir una epimerización para formar el CDCA (Figura 2.10). Gracias a estas transformaciones, tanto los ABs secundarios como los productos de la hidrólisis del enlace amida aumentan su hidrofobicidad, permitiendo su reabsorción pasiva (Mekhjian *et al.*, 1979), siendo aproximadamente el 50% de DCA y una pequeña cantidad de LCA y UDCA reabsorbidos. La mayoría de LCA se excreta en las heces, y una pequeña cantidad de LCA que recircula al hígado se conjuga rápidamente por sulfatación y se excreta en la bilis. Aquellos ABs que no han sido reabsorbidos son eliminados del organismo en las heces.

Los ABs, una vez en la circulación sanguínea, se transportan unidos a albúmina y lipoproteínas pasando a las ramas de la vena porta (Kramer, 1995). Los ABs son reabsorbidos con gran eficacia por la membrana sinusoidal de los hepatocitos de la circulación portal, gracias a dos sistemas de transporte: el polipéptido cotransportador del TCA y Na^+ (*SLC10A1/NTCP*, *Na⁺-Taurocholate Cotransporting Polypeptide*) que tiene una especificidad de sustrato limitada a los ABs conjugados, y por sistemas independientes de sodio, representados por miembros de la familia de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (*SLC/OATP*, *Organic Anion-Transporting Polypeptide*) (Hagenbuch and Dawson, 2004), (Slijepcevic and van de Graaf, 2017).

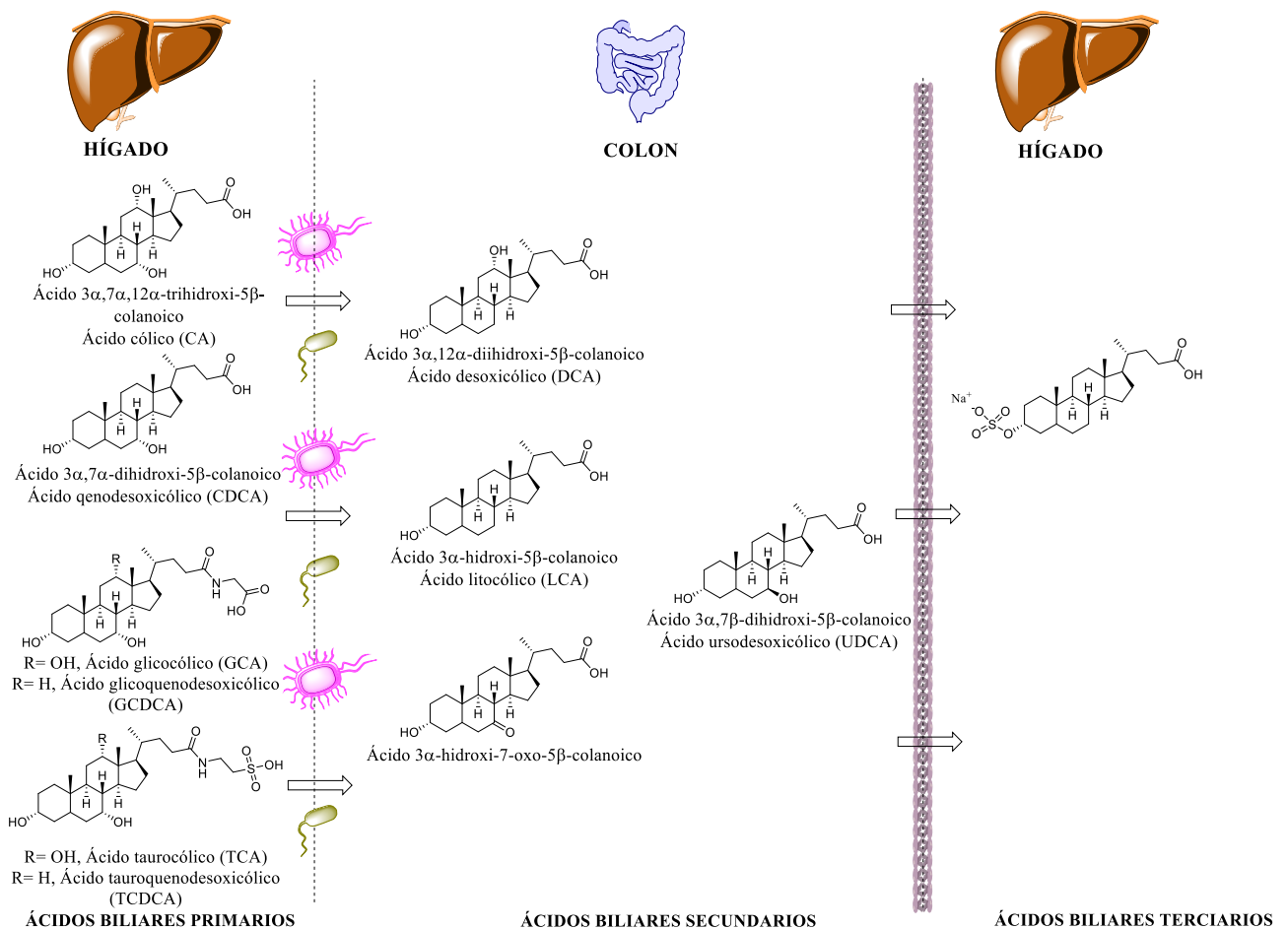


Figura 2.10: Los ácidos biliares (ABs) primarios pasan al intestino delgado y grueso, y, mediante intervención bacteriana, se forman los ABs secundarios. Entre las conversiones más importantes, destacan la hidrólisis de las funciones en la cadena lateral, la deshidrogenación y/o deshidroxilación de C7 y la epimerización de los ABs. El ácido cólico (CA) se convierte en el ácido desoxicólico (DCA). El ácido quenodesoxicólico (CDCA) pasa a formar el ácido litocólico (LCA). La deshidrogenación de C7 de CDCA forma el ácido 3 α -hidroxi-7-oxo-5 β -colanoico que vuelve a ser metabolizado mediante reducción hepática o bacteriana a CDCA, formando principalmente el 7 α , pero también se puede formar el 7 β , denominado ácido ursodesoxicólico (UDCA), que en el hígado es transformado en su epímero 7 α . El LCA es tóxico para el organismo, por lo que en el hígado es rápidamente sulfoconjugado para aumentar su solubilidad y eliminarlo. Imagen adaptada de (Agostino Di Ciaula, 2017).

Gracias a este sistema de transportadores, las concentraciones de ABs en sangre periférica son inferiores a 5 μ M (el rango de normalidad se fija en 10 μ M), pudiendo considerarse a los hepatocitos como factorías productoras de ABs y a los transportadores específicos hepáticos e intestinales los encargados de mantener un nivel adecuado de ABs en la circulación enterohepática. En términos cuantitativos, la reabsorción de ABs en el íleon tiene como resultado una acumulación de ABs en el organismo de entre 3 a 5 gramos, denominándola como pool de ABs (Hofmann, 1977). Que ese pool de ABs se mantenga entre un intervalo en el total de la circulación enterohepática requiere la acción conjunta y coordinada de varias proteínas transportadoras, que se expresan tanto en las membranas

canalicular y basolateral de los hepatocitos como en las membranas apical y basal de los ileocitos. Como resultado, a diario solamente perdemos de 50 a 500 mg de ABs, siendo menos de un 5% del *pool* total, a pesar de que el ciclo se lleva a cabo unas 6-10 veces al día (3-4 veces por comida).

2.2.4. Transportoma de los ácidos biliares

Se conoce como transportoma al conjunto de proteínas transportadoras cuya función es llevar a cabo el tráfico de moléculas a través de la membrana plasmática de las células, alterando la concentración intracelular de multitud de moléculas, entre las que destacamos en este apartado a los ABs. El transportoma involucrado en el transporte de ABs es esencial para las funciones de los hepatocitos y para llevar a cabo la circulación enterohepática. Se desarrolló el concepto de captación de ABs mediada por transportador en los hepatocitos cuando se demostró que la absorción de ABs a través de su membrana basolateral no era solamente por difusión pasiva, sino que era un proceso dependiente de sodio mediado por transportadores que sigue una cinética de Michaelis-Menten (Reichen and Paumgartner, 1976). En este proceso de transporte, juega un papel clave la proteína NTCP que, no solo transporta ABs a través de la membrana basolateral de los hepatocitos, sino también estatinas, e incluso está implicada en el conocimiento de los hepatocitos por los virus de hepatitis B y D (Jetter and Kullak-Ublick, 2020). Posteriormente se identificaron transportadores que actuaban de forma independiente de sodio (OATP), y las proteínas de la superfamilia ABC o "ATP Binding Cassette" que intervienen en la secreción canalicular de ABs hacia la bilis que representa el paso limitante en el conjunto de procesos de transporte de los ABs. A pesar de la existencia de otros sistemas de transporte, tanto NTCP como las diferentes isoformas de OATP son los responsables de la captación de ABs, que, al existir altos niveles ABs conjugados intestinales, promueven la señalización de diferentes vías para la regulación de síntesis de ABs, modulando la expresión de dichos transportadores (Slijepcevic *et al.*, 2017) (Figura 2.11). La homeostasis de ABs es necesaria debido a que elevadas concentraciones de ABs en sangre, bilis, intestino o en los hepatocitos pueden ser tóxicas induciendo apoptosis, interfiriendo en procesos biológicos como es la regeneración hepática, la homeostasis de la glucosa o dando lugar a procesos de carcinogénesis (Kubitz *et al.*, 2014).

2.2.4.1. Transportadores de ácidos biliares dependientes de sodio

El transportador responsable de la captación sodio-dependiente de ABs hacia el interior de los hepatocitos es NTCP. NTCP es un miembro de la familia de transportadores de solutos SLC10, presente en la membrana basolateral de los hepatocitos que, empleando el gradiente de sodio generado por $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, transporta ABs mediante el cotransporte de dos iones sodio por cada molécula de AB. En el hígado, NTCP se distribuye por igual a lo largo de todos los lóbulos hepáticos, pero se produce la absorción de ABs conjugados predominantemente en células periportales, ya que éstas son expuestas a concentraciones más elevadas de ABs por su proximidad a la vena porta. En concreto, NTCP es un transportador que es capaz de interactuar con múltiples sustratos, como esteroides sulfatados, como el 3-sulfato de estrona (Visser *et al.*, 2010), (Bijsmans *et al.*, 2012). Entre sus múltiples sustratos destacan ABs conjugados como el TCA (80%). No obstante, también es capaz de captar ABs no conjugados como el CA (50%) (Boyer *et al.*, 1994), el sulfato de deshidroepiandrosterona y el anión orgánico bromosulfoftaleína (BSP) (Hagenbuch and Meier, 1996). En una determinación de la cantidad de captación mediada por NTCP, se demostró que la captación de taurocolato adquiriría valores que varían de 5 a 84 μM para NTCP humano y en el intervalo 8–61 μM para roedores (Stieger, 2011).

En cuanto a su estructura, NTCP es una glicoproteína de 349 aminoácidos con un peso molecular de alrededor de 56 kDa, que adopta una estructura cuaternaria dimérica. Posee de 7 a 9 dominios transmembrana con conformación de hélices α , ubicándose el extremo C-terminal en el citosol del hepatocito mientras que el extremo N-terminal es extracelular, conteniendo dos glicosilaciones ligadas a N. El extremo C-terminal es esencial para dirigir a NTCP en la membrana plasmática basolateral de los hepatocitos, como se puso de manifiesto en experimentos en rata en los cuales NTCP, carente de extremo C-terminal, se acumula en el retículo endoplasmático (Bijsmans *et al.*, 2012).

Para el transporte de ABs, NTCP cuenta con residuos de cisteína que son capaces de actuar como sitios de unión, particularmente los residuos 96, 98 y 250, y también posee bucles extracelulares o *loops*, de los cuales un tercio de ellos están cargados negativamente por la presencia de aminoácidos como ácido aspártico y ácido glutámico, que son cruciales para controlar el transporte de sodio, que depende exclusivamente del potencial (Stieger, 2011).

Se han realizado numerosos estudios para determinar la importancia de NTCP en el transporte de ABs, en concreto en ratones en los que existía una inactivación de *Slc10a1/ntcp* generando ratones K.O.; se encontraron elevados niveles de ABs conjugados en plasma, confirmando un papel primario para NTCP en su aclaramiento hepático. Sin embargo, varios de los ratones adultos mostraron niveles de ABs fisiológicos en bilis, lo que indica que debía de existir una absorción independiente de NTCP de ABs conjugados (Slijepcevic *et al.*, 2015), a través de transportadores de ABs independientes de sodio.

A diferencia de lo que ocurren en los hepatocitos, en el intestino los ABs se absorben en los enterocitos mediante el transportador apical de ABs dependiente de sodio (ASBT; *SLC10A2*) (Dawson and Karpen, 2015), por lo que ASBT es el homólogo intestinal de NTCP y es uno de los transportadores más importantes, ya que permite la absorción de los ABs del intestino. Esta proteína está formada por 348 aminoácidos, teniendo un peso molecular de 39 kDa (Hu *et al.*, 2011) y, al igual que NTCP, posee una región N-terminal extracelular y otra C-terminal orientada al citosol, y 7-9 hélices α transmembrana. El transporte de ABs mediado por sodio se efectúa en una proporción de 2:1 Na^+ /ABs. Asociado a ASBT se encuentra la proteína ileal de unión a lípidos o ILBP (*Ileal Lipid-Binding Protein*), también denominadas IBAP (*Ileal Bile Acid Protein*), que es la principal proteína de unión a ABs en los enterocitos del íleon (Geyer *et al.*, 2006).

2.2.4.2 Transportadores de ácidos biliares independientes de sodio

Como se ha comentado en el apartado anterior, existe una absorción hepática de ABs mediada por miembros de la familia de OATP que se caracterizan, a diferencia de NTCP, por ser capaces de llevar cabo la captación de ABs de forma independiente de sodio. Estos transportadores se encuentran en la membrana basolateral del hepatocito, y al igual que NTCP, poseen una gran cantidad de sustratos, como son ABs no conjugados (CA y el CDCA), bilirrubina, aniones orgánicos, BSP, agentes de contraste, esteroides conjugados, diferentes cationes y numerosos fármacos (Kullak-Ublick *et al.*, 2000).

Se han descrito 6 miembros de esta familia de transportadores en humanos (OATP A-F), siendo las subfamilias de OATP hepáticas más abundantes que se expresan en altos niveles en hepatocitos humanos OATP1B1 (*SLCO1B1*), OATP1B3 (*SLCO1B3*) y OATP2B1 (*SLCO2B1*) (Zair *et al.*, 2008). Estos transportadores actúan bidireccionalmente y pueden mediar la absorción de sustancias anfipáticas y aniónicas a cambio de iones glutatión reducido (GSH) o bicarbonato (Kullak-Ublick *et al.*, 2001). Tienen especificidades de sustrato superpuestas, que son causadas por el alto grado de homología de aminoácidos entre ellos. Son capaces de transportar bidireccionalmente aniones orgánicos

colefílicos monovalentes, como los ABs no conjugados y conjugados, al igual que aniones orgánicos divalentes como la BSP, la bilirrubina, y el verde de indocianina (Kullak-Ublick *et al.*, 1994), además de una amplia variedad de sustratos como esteroides conjugados como el 3-sulfato de estrona, péptidos cíclicos, hormonas tiroideas, sulfato de deshidroepiandrosterona y una gran cantidad de fármacos (Jetter and Kullak-Ublick, 2020).

Es difícil estimar el papel de cada isoforma OATP *in vivo*, ya que existe una gran superposición de sustrato y los OATPs de roedores no tienen un ortólogo humano directo. En humanos, la deficiencia de los genes que codifican para OATP1B1 y OATP1B3 provoca el trastorno congénito denominado síndrome del Rotor, caracterizado por altos niveles de bilirrubina plasmática conjugada. La evidencia de polimorfismos de OATP en humanos que afectan a la absorción endógena de ABs es escasa. Curiosamente, ratones que carecen de todos los miembros de la familia *Oatp1a/1b* (ratones *Knock-out Slco1a/1b*) muestran niveles elevados de AB no conjugados de hasta 13 veces superiores en sangre, mientras que los niveles en bilis de ABs conjugados se mantuvieron, en su mayoría, sin cambios, y se encontraron resultados similares en ratones *Knock-out* que solo carecían de *Slco1b2* (Slijepcevic and van de Graaf, 2017). Sin embargo, Zhang Y. *et al.* (Zhang *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2013) en estudios realizados en ratones, sugiere que *Oatp1a1* y *Oatp1a4* preferiblemente transporta ABs secundarios no conjugados.

2.2.4.3 Proteínas ABC o “ATP-Binding Cassette”

La expulsión de ABs hacia el exterior del hepatocito al canalículo biliar es llevada a cabo por transportadores que pertenecen a una superfamilia de proteínas con dominios de unión al ATP denominadas proteínas ABC o “ATP-Binding Cassette” (Muller and Jansen, 1997). En nuestra especie, existen 48 genes ABC, clasificados en 7 familias que van de la ABCA a la ABCG acorde con la homología de sus secuencias y la organización estructural de los dominios intracelulares que interactúan con el ATP o los dominios de unión a nucleótidos (Locher, 2016). Las distintas bombas ABC descritas a nivel hepático son:

- ❖ **BSEP (*Bile Salt Export Pump, ABCB11*):** Es una bomba exportadora de ABs y es la principal proteína que lleva a cabo la secreción de ABs monovalentes, ubicada en la membrana canalicular de los hepatocitos (Kubitz *et al.*, 2012). Es capaz de transportar ABs no conjugados y una gran variedad de ABs conjugados, teniendo una afinidad en el orden: TCDCA, TCA, ácido taurodesoxicólico, ácido tauroursodesoxicólico y GCA (Lam *et al.*, 2010). Está formado por 1321 aminoácidos, con un peso aproximado de 160 kDa, presentado 1 dominio orientado al citosol y 6

dominios en su parte extracelular. Cuenta, además, con una región enlazadora de aproximadamente 75 aminoácidos que interactúa con diferentes proteínas para llevar a cabo la acción secretora (Stieger and Beuers, 2011).

- ❖ **MRPs (*Multidrug Resistance-Associated Proteins*):** MRP es una familia de proteínas que pertenece a la familia de proteínas de resistencia a fármacos, por su capacidad de transportar una gran diversidad de compuestos entre los que se encuentran los ABs, siendo las más destacadas a nivel hepático las de tipo 1, 2, 3 y 4. MRP2 (*ABCC2*) se expresa en la membrana canalicular (apical) de los hepatocitos y es capaz de transportar ABs, conjugados de AB sulfatados o glucoronados, glutatión, leucotrienos y bilirrubina, entre otros (Jemnitz *et al.*, 2010). MRP3 (*ABCC3*) y MRP4 (*ABCC4*) se expresan en la membrana basolateral y también son capaces de transportar ABs (Dawson *et al.*, 2009). Se ha visto que, en situaciones de colestasis, se sobreexpresan MRP1, 3, y 4 en la membrana basolateral del hepatocito, pudiendo mediar en la expulsión de ABs al igual que otros aniones orgánicos hacia la sangre, evitando así la acumulación intracelular en la situación patológica.
- ❖ **BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein, ABCG2*):** Es una proteína que se expresa en la membrana apical del hepatocito. Está compuesta por 655 aminoácidos con un peso molecular en torno a 72 kDa. Es capaz de realizar el transporte de una gran variedad de compuestos esteroideos sulfatados y xenobióticos, además de ser capaz de transportar ABs (Blazquez *et al.*, 2012).

2.2.4.4. Otros transportadores importantes

Además de los transportadores anteriores, existen una gran variedad de proteínas que son capaces de realizar un transporte de ABs y también se expresan en las células de los tejidos que conforman el sistema enterohepático:

- ❖ **OST α (*SLC51A*) y OST β (*SLC51B*):** Estas proteínas heteroméricas de aproximadamente 352 aminoácidos son capaces de realizar el transporte de ABs de forma pasiva desde las células intestinales (enterocitos, ileocitos y colonocitos) a la sangre (Dawson *et al.*, 2009). Son capaces de exportar ABs conjugados con glicina y no conjugados, además de prostaglandinas, y sulfatos esteroideos. Un estudio realizado en células transfectadas y en ovocitos de *Xenopus*, indica que OST α -OST β muestra un transporte bidireccional, por lo que puede mediar en la absorción o eflujo de ABs dependiendo del gradiente electroquímico (Ballatori *et al.*, 2005).

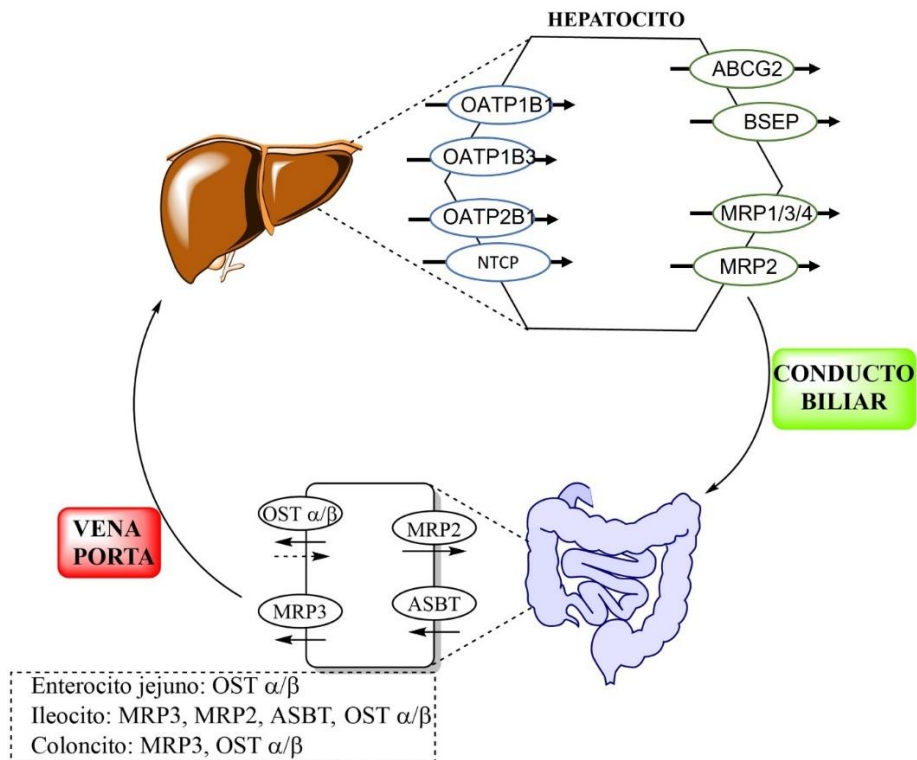


Figura 2.11: Esquema del transporte de ácidos biliares (ABs) a lo largo del intestino y del hígado. En el íleon, se realiza una captación de ABs conjugados mediada por ASBT. Los ABs son exportados a través de la membrana basolateral por OST α/β . Los ABs no conjugados que se absorben pasivamente en el íleon distal y el colon pueden glucuronidarse y sulfatarse y ser expulsados a través de la membrana apical por MRP2 o ABCG2 o a través de la membrana basolateral por MRP3. Los ABs absorbidos en el intestino, tanto los primarios como los secundarios, se transportan de vuelta en la circulación portal de vuelta al hígado, donde son captados por diferentes transportadores. En la membrana basolateral se encuentra el cotransportador de ABs acoplado al transporte de sodio (NTCP) y los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos OATP1B1, OATP1B3 y OATP2B1. La membrana apical presenta un transportador de sales biliares dependiente de ATP (BSEP), el transportador de aniones orgánicos MRP2 y ABCG2 que participan en el transporte activo de AB a la bilis para reiniciar la circulación enterohepática.

2.2.5. Funciones de los ácidos biliares

Los ABs desempeñan una gran cantidad de funciones fisiológicas (Marin *et al.*, 2015). Así, sus funciones en el hígado son:

- ❖ Generan un flujo biliar dependiente de los ABs: Debido a la secreción de los ABs a la luz canalicular, se genera un proceso de filtración osmótico que promueve la formación de bilis.
- ❖ Estimulan la contracción canalicular: La cual colabora en el bombeo de la bilis hacia los conductos colectores del sistema biliar.
- ❖ Inducen la secreción de lípidos biliares: Principalmente fosfolípidos y colesterol.

- ❖ Modulan la biosíntesis de colesterol: La síntesis de ABs se produce a partir del colesterol como molécula precursora.
- ❖ Determinan la cantidad de receptores de colesterol en el hepatocito: El flujo de ABs a través del hepatocito también genera un aumento de expresión de receptores de membrana para las lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Las funciones que poseen los ABs en la bilis:

- ❖ Forman micelas mixtas: Que son capaces de transportar sustancias hidrofóbicas, como el colesterol, la bilirrubina y las protoporfirinas.
- ❖ Actúan como moléculas captadoras de Ca^{2+} .

A lo largo de su paso por el intestino:

- ❖ Emulsionantes: Gracias a la capacidad para formar micelas mixtas, permiten emulsionar las grasas y las vitaminas liposolubles (A, D, E y K) de la dieta para favorecer su absorción.
- ❖ Activan lipasas intestinales, modulan la actividad de proteasas, la motilidad intestinal, la colonización bacteriana, la secreción de hormonas gastrointestinales como la colecistoquinina e inducen la secreción de agua y electrolitos (Izokura *et al.*, 1991).

Por otro lado, los ABs tienen un papel importante en la regulación de la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en su síntesis, metabolismo y transporte. Así, actúan como moléculas de señalización celular, como ligandos del receptor de AB acoplado a proteína G (TGR5, G-protein-Coupled Bile Acid Receptor) (Kawamata *et al.*, 2003), de los receptores nucleares FXR (Farnesoid X Receptor) (Makishima *et al.*, 1999), (Parks *et al.*, 1999), PXR (Pregnane X Receptor) (Xie *et al.*, 2001) y el receptor de vitamina D (VDR, Vitamin D Receptor) (Makishima *et al.*, 2002). Además, los ABs actúan como factores que participan en el control de las funciones y del metabolismo de las grasas y azúcares y, por lo tanto, en el metabolismo energético (Lefebvre *et al.*, 2009). También son capaces de activar la proliferación de las células estelares hepáticas (Sommerfeld *et al.*, 2009) y la respuesta inflamatoria mediada por la actuación de las células de Kupffer (Miyake *et al.*, 2000).

2.3. CÁNCER HEPÁTICO

El cáncer hepático es uno de los cánceres más frecuentes, colocándose en la quinta posición en frecuencia y la tercera posición en las causas de mortandad de la población (Torre *et al.*, 2016). Los tumores hepáticos son más frecuentes en los hombres que en las mujeres, pudiéndose dividir en tumores primarios, originados por las propias células hepáticas, o secundarios, que derivan de metástasis de tumores en otros órganos. Entre los tumores primarios, el más común es el carcinoma hepatocelular (HCC), constituyendo un 85-90 % del total de todos los cánceres primarios del hígado. A éste le sigue el colangiocarcinoma (CCA) (Chedid *et al.*, 2017). Además, aunque su frecuencia es baja, entre el 1 al 4%, se pueden desarrollar tumores mixtos de HCC-CCA, denominados hepatocolangiocarcinomas, que combinan características de ambos tipos de tumor (Gentile *et al.*, 2020). También existen, asimismo, otras formas raras como el hepatoblastoma, que afecta a niños, el hemangioma, el adenoma colangiocelular, el cistadenoma biliar, el adenoma hepatocelular o el hemangioendotelioma infantil.

2.3.1 Carcinoma hepatocelular

Epidemiología

El HCC se desarrolla con mayor frecuencia entre las edades de 50 a 60 años, siendo más común en hombres que en mujeres, con un factor de 2,4 en los hombres respecto a las mujeres a nivel mundial. En las últimas décadas se ha observado un aumento en los países desarrollados, incrementándose hasta cuatro veces el número de diagnósticos de HCC en EE.UU. desde 1980 (Ghouri *et al.*, 2017). Este incremento fue especialmente importante entre los años 2000 a 2016, en los que se observó un aumento del 43%, que en términos numéricos se cuantifica en un total de 10,3 muertes por cada 100.000 habitantes (Xu, 2018), observándose un desarrollo de HCC a edades más tempranas (Dimitroulis *et al.*, 2017). Sin embargo, la prevalencia del HCC sigue siendo mayor en los países de Asia y África, destacando un aumento considerable en países como Japón, Italia y Francia.

Diagnóstico

El diagnóstico de HCC suele producirse en estadios avanzados, debido a que tiene una evolución asintomática en la mayoría de los casos y solo se detecta cuando se encuentra en un estadio avanzado y el paciente comienza a mostrar síntomas (Llovet *et al.*, 2008a). Destacan, entre sus síntomas clínicos, malestar general, dolor abdominal, hepatomegalia, ictericia, pérdida de peso y fiebre.

Para su diagnóstico se suelen emplear técnicas de imagen como son ecografía, tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM). Además de emplear técnicas de imagen, también se pueden realizar pruebas basadas en la detección de marcadores tumorales como es la alfa-fetoproteína 1 (AFP-1), de lectina AFP (AFP-L3) y la des-γ-carboxiprotrombina (DCP). Sin embargo, la técnica más eficaz para el diagnóstico de HCC es una biopsia para realizar un análisis de anatomía patológica y determinar la presencia o sobreexpresión por inmunohistoquímica de HepPar-1, glicican-3, heat shock protein 70 (HSP70) y glutamina sintasa. Aunque en muchas ocasiones, las biopsias no son posibles por el delicado estado del paciente (Gomaa *et al.*, 2009).

Tratamiento

La elección de tratamiento en pacientes de HCC suele estar determinada en función del estadio del cáncer. Para su elección, se suelen emplear el sistema de estadificación BCLC, “Barcelona Clinic Liver Cancer”, propuesto por el Hospital Clínico de Barcelona (Bruix *et al.*, 2011). Si el cáncer se diagnostica en una etapa temprana, se suele recurrir a técnicas quirúrgicas de resección tumoral e incluso, trasplante de hígado, aunque también se puede recurrir a la ablación terminal para eliminar los tumores, si estos tienen un tamaño pequeño. Sin embargo, cuando el HCC se encuentra en un estado avanzado, o hay presencia de tumores multifocales, estos tratamientos no son efectivos. Para estas situaciones, se suele recurrir a tratamiento alternativos como la quimioembolización transarterial (TACE), la radioembolización o quimioterapia (Grandhi *et al.*, 2016). Sin embargo, lo normal es tener en cuenta la evolución del paciente, por lo que lo habitual es recurrir a varias de estas técnicas a pesar de que en HCC avanzado la supervivencia es muy escasa, ya que los pacientes en estados muy avanzados no sobreviven a las cirugías y la efectividad de los tratamientos mediante quimioterapia es muy escasa debida al desarrollo de fármacorresistencia (Marin *et al.*, 2020b).

En los últimos veinte años se han realizado avances en el campo del tratamiento farmacológico del HCC, adaptando nuevas estrategias e identificando nuevas dianas terapéuticas. Uno de los fármacos que se emplean en primera línea de tratamiento es el sorafenib, un inhibidor multiquinasa de administración oral (Llovet *et al.*, 2018). Desde la aparición del sorafenib, se han desarrollado nuevos fármacos con actividad multiquinasa, como es el regorafenib, un compuesto que es estructuralmente muy similar al sorafenib, con la adición de un sustituyente flúor en la posición 4 del fenoxifenilo (Bruix *et al.*, 2013) (Figura 2.12). También, aunque no poseen actividad multiquinasa, se están desarrollando terapias basadas en inhibidores del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) como erlotinib y lapatinib. Además de estos fármacos, se han implementado

estudios para aplicar fármacos cuya diana farmacológica son los factores que están implicados en la angiogénesis; ejemplos de estos fármacos son el sunitinib, brivanib, linifanib, vatalanib, TSU-68, cediranib, bevacizumab o ramucirumab. Se encuentran en estudios preclínicos el selumetinib, un inhibidor competitivo de MEK1/2, el everolimus, un antagonista de mTOR, y nintedanib, un inhibidor multiquinasa (Daher *et al.*, 2018).

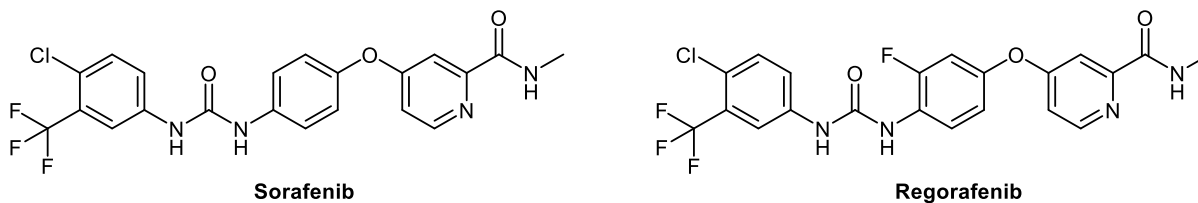


Figura 2.12: Estructuras del Sorafenib y Regorafenib. Ambas estructuras son muy similares, a excepción de la presencia de un átomo de flúor en el anillo central.

2.3.2. Colangiocarcinoma

Epidemiología

El CCA, después del HCC, es el segundo tipo de cáncer hepático primario más frecuente, entre los que se incluye un grupo heterogéneo de tumores derivados de células de las vías biliares (Banales *et al.*, 2016). Entre las afecciones, supone en torno a un 3% de las neoplasias gastrointestinales y entre un 10 a un 25% de las neoplasias hepatobiliares primarias, siendo más frecuente en mayores de 65 años (Macias, 2014); (Banales *et al.*, 2016), situándolo como la neoplasia biliar maligna más frecuente. El CCA posee una elevada mortalidad, presentando una esperanza de vida menor a 24 meses tras su diagnóstico.

El CCA es una enfermedad con una baja incidencia, menos de tres casos por cada 100.000 habitantes, pero que ha experimentado un aumento en el número de casos en los últimos años, en especial en algunas regiones de América del Sur (Chile) y Asia (Corea del Sur y Tailandia) (Global Burden of Disease Cancer *et al.*, 2018). En países como EE. UU., su incidencia es menor, en torno a 1 caso por 100.000 habitantes, mientras que en Japón esta incidencia aumenta hasta 7,3 casos por 10.000. Las diferencias en la prevalencia se deben a causas basadas en los grupos raciales y étnicos, ya que en EE.UU. los hispanos y japoneses poseen prevalencias más elevadas (2,8 - 3,3/100 000) (Pérez Navarro *et al.*, 2014). Los CCA se pueden clasificar en función de la localización anatómica en:

- ❖ CCA intrahepático (iCCA): Producido a partir de pequeños conductos biliares en el hígado.

- ❖ CCA extrahepático (eCCA), que a su vez se divide en dos tipos, ambos producidos en el epitelio del árbol biliar extrahepático: CCA perihiliar (pCCA), desarrollado en el tramo de conductos a la salida del hígado; y CCA distal (dCCA), desarrollado en zonas del conducto biliar más alejadas del hígado.

En el tracto biliar se pueden desarrollar otros dos tipos de cáncer: el cáncer de vesícula y los tumores malignos de la ampolla de Vater.

Diagnóstico

La inespecificidad de los síntomas del CCA, unido a que se manifiestan en etapas avanzadas del desarrollo tumoral, hace que actualmente el diagnóstico temprano del CCA siga siendo un reto. La sintomatología depende de la ubicación del tumor, incluyendo dolor abdominal, pérdida de peso y debilidad, ictericia, orina hiperpigmentada (coluria) relacionada con la obstrucción biliar, prurito y heces de coloración arcilla (hipocólicas) (Farhat *et al.*, 2008). Además, dependiendo de la localización exacta del tumor, el paciente, puede presentar un cuadro clínico diferente. Por ejemplo, si es dCCA, localizándose el tumor en el conducto biliar común o conducto hepático, en los estadios iniciales se producirá una ictericia, pero si el paciente desarrolla iCCA o pCCA, lo más habitual es desarrollar la ictericia en estadios más tardíos. Para el diagnóstico de CCA se suele recurrir a técnicas de imagen, combinadas con datos bioquímicos e histológicos. Una vez diagnosticado, se suelen emplear las técnicas de imagen, como la colangiografía para el seguimiento de respuesta al tratamiento del CCA (Forner *et al.*, 2019). En cuanto a los biomarcadores, la bioquímica muestra niveles elevados de CA 19-9, además de AFP negativo y la tinción con mucicarmina es positiva. También es habitual recurrir a RM y la colangiopancreatografía por resonancia magnética (Romagnuolo *et al.*, 2003).

Tratamiento

El tratamiento con mayor probabilidad de éxito para el CCA es la resección quirúrgica, cuando es posible su realización. Desgraciadamente, el pronóstico tardío hace que los pacientes, por lo general, no sean candidatos para realizar una cirugía en el momento de su diagnóstico (Konstadoulakis *et al.*, 2008).

Sin embargo, a pesar de la resección quirúrgica, la tasa de supervivencia de los pacientes es del 33,1 % para dCCA y del 41,6 % para el cáncer de la vesícula biliar (Miyakawa S *et al.*, 2009), por lo que el pronóstico es desfavorable, incluso a pesar de realizar trasplantes, debido a la alta recurrencia de este tipo de cánceres. Además de la resección quirúrgica, se recurre a tratamientos como la quimiorradiación neoadyuvante, que, junto a un trasplante hepático, logra alcanzar tasas de supervivencia sin recurrencia

de hasta 5 años en un 68% de los casos para el pCCA (Darwish Murad *et al.*, 2012). También se ha recurrido a otras terapias, por ejemplo, ablación por radiofrecuencia, radioterapia, TACE, o radioterapia intraarterial selectiva. Sin embargo, ninguna de las anteriores terapias ha demostrado un beneficio claro en la supervivencia de estos pacientes (Boehm *et al.*, 2015).

Dado que no existe un tratamiento eficaz para el CCA, se recurre a la quimioterapia como recurso paliativo, a pesar de que su eficacia es baja por la alta refractariedad (Marin *et al.*, 2018b). Como terapia adyuvante se recurre a 5-fluorouracilo (5-FU) y la gemcitabina como los fármacos de uso más común (Kim *et al.*, 2013). En especial, la administración de gemcitabina combinada con cisplatino es el tratamiento más habitual (Vogel *et al.*, 2014), variando el compuesto organometálico a oxaliplatino (GEMOX: gemcitabina-oxaliplatino) cuando el paciente presenta insuficiencia renal (Andre *et al.*, 2008). Como segunda opción, en los casos en los que el paciente no responde de forma adecuada a la gemcitabina, se recurre a fluoropiridinas, del tipo 5-FU (Lamarca *et al.*, 2014) junto con ácido folínico y oxaliplatino (mFOLFOX). Este segundo tratamiento ha mostrado resultados positivos aumentando a 24% en la tasa de supervivencia. La combinación triple de cisplatino, epirubicina y 5-FU produce una tasa de respuesta del 40 % con un tiempo medio de supervivencia de 11 meses (Thongprasert, 2005).

Se han realizado ensayos clínicos en fase II empleando inhibidores de tirosina quinasas (TKIs), como el sorafenib, pero los ensayos clínicos han puesto de manifiesto un efecto beneficioso limitado (Luo *et al.*, 2017), no mostrando grandes ventajas respecto a los tratamientos habituales.

2.4. FÁRMACOS ANTITUMORALES INHIBIDORES DE RECEPTORES CON ACTIVIDAD TIROSINA QUINASA

Los receptores de tirosina quinasas (TKRs) son un conjunto de proteínas cuya función es catalizar la transferencia de un grupo fosfato desde una molécula de ATP a un residuo de tirosina de una proteína. Esta reacción, denominada fosforilación, es una función esencial en la transducción de señales para la comunicación intracelular. Su actividad en las diferentes proteínas desencadena una cascada de señalización que regula múltiples funciones celulares como son el crecimiento celular, diferenciación, muerte y diferentes procesos bioquímicos (Wang and Cole, 2014). Una activación anómala de dichos receptores conduce a trastornos en el ciclo celular, causando tumorigénesis (Drake *et al.*, 2014) y se asocia con procesos de metástasis, neovascularización tumoral y

procesos de fármacorresistencia (Knosel *et al.*, 2014). Por lo tanto, los TKRs han sido objetivo de estudio para el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales.

En las últimas décadas se ha desarrollado la terapia dirigida al cáncer, cuyo objetivo es disminuir los efectos secundarios de la quimioterapia gracias al desarrollo de fármacos cuya diana son los TKRs, denominados TKI que afectan a las vías moleculares específicas que sufren un aumento de expresión y actividad en ciertos tipos de cáncer (Winkler *et al.*, 2014). Así, en 2001, el primer medicamento TKI fue el imatinib, aprobado por la FDA, que inició una nueva línea de fármacos antineoplásicos. Desde ese año, se han aprobado y lanzado al mercado más de 20 TKI (Jiao *et al.*, 2018) (Tabla 2.1). Todos estos fármacos poseen una elevada selectividad, alta eficacia y bajos efectos secundarios para cánceres del tipo leucemia mieloide crónica (CML), cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) o carcinoma renal (CCR), comparado con los agentes antineoplásicos citotóxicos tradicionales (Haznedaroglu, 2014), convirtiéndose en los fármacos elegidos como primera línea para tratamientos quimioterapéuticos en estos tumores.

Una vez suministrados, los fármacos con actividad TKI actúan inhibiendo los diversos receptores con actividad tirosina quinasa. Su mecanismo de acción se basa en unirse selectivamente en el TKR al dominio catalítico, compitiendo con el ATP gracias a semejanzas estructurales (Arora and Scholar, 2005). Muchos de los TKI poseen actividad multiquinasa, debido a que los TKRs poseen una marcada conservación evolutiva del dominio catalítico, por lo que varios TKIs pueden desarrollar un efecto inhibitor sobre una gran cantidad de TKR, afectando de este modo múltiples vías de señalización. De acuerdo con las principales dianas de los TKI, se puede realizar una clasificación en inhibidores de EGFR, VEGFR, PDGFR, inhibidores de linfoma quinasa anaplásica (ALK) e inhibidores de Bcr-Abl. Mediante el bloqueo de varias rutas en las que interviene un TKR, se logra la inhibición de mecanismos como la reparación del DNA de las células tumorales, bloqueo del ciclo celular en fase G1, inducir la apoptosis y bloquear la angiogénesis (Jiao *et al.*, 2018).

El uso de los TKIs ha sido extendido para el tratamiento de numerosos cánceres, incluidos los hepáticos, ya que actúan sobre el ciclo celular inhibiendo tanto la proliferación del tumor como los procesos angiogénicos del tejido hospedador (Marin *et al.*, 2010). Entre las ventajas que presentan los TKIs cabe destacar que gran parte de ellos son activos por vía oral y presentan un perfil de seguridad que los hace buenos candidatos para ser combinados con otras formas de quimioterapia o radioterapia. Algunos de ellos han sido aprobados o están en fase clínica de ensayo para el tratamiento de HCC y de CCA, como son el erlotinib y el gefitinib, que han sido ensayados en pacientes con HCC avanzado. De

entre todos los TKI, el sorafenib parece ser el más efectivo y con un buen margen de tolerabilidad (Di Costanzo *et al.*, 2012), aumentando la supervivencia de los pacientes (Llovet, 2007), lo que en la actualidad lo ha convertido en el tratamiento de elección de terapia de primera línea en el hepatocarcinoma y a su derivado el regorafenib de segunda línea (Bruix *et al.*, 2017).

Tabla 2.1: Inhibidores de receptores con actividad tirosina quinasa (TKI) comercializados indicando año de comercialización, empresa, diana molecular y cáncer en el que se usa como tratamiento.

TKI	Año de lanzamiento	Compañía	Diana molecular	Cáncer
Imatinib	2001	Novartis	Abl, PDGFR, SCFR	CML, GIST
Gefitinib	2003	AstraZeneca	EGFR	NSCLC
Nilotinib	2004	Novartis	Bcr-Abl, PDGFR	CML
Sorafenib	2005	Bayer	Raf, VEGFR, PDGER	RCC, HCC
Sunitinib	2006	Pfizer	PDGFR, VEGFR,	GIST, RCC
Dasatinib	2006	Bristol-Myers Squibb	Bcr-Abl, SRC, PDGFR	CML
Lapatinib	2007	GlaxoSmithKline	EGFR	Cáncer de mama
Pazopanib	2009	GlaxoSmithKline	VEGFR, PDGFR, FGFR	RCC, STS, NSCLC
Crizotinib	2011	Pfizer	ALK	NSCLC
Ruxolitinib	2011	Novartis	JAK1, JAK2	Mielofibrosis
Vandetanib	2011	AstraZeneca	VEGFR, EGFR	DTC
Axitinib	2012	Pfizer	VEGFR	RCC
Bosutinib	2012	Wyeth	Abl, SRC	CML
Afatinib	2013	Boehringer Ingelheim	EGFR	NSCLC
Erlotinib	2013	Roche	EGFR	NSCLC
Ceritinib	2014	Novartis	ALK	NSCLC
Osimertinib	2015	AstraZeneca	EGFR	NSCLC
Lenvatinib	2015	Eisai	VEGFR	HCC, RCC, DTC
Alectinib	2015	Roche	ALK	NSCLC
Regorafenib	2017	Bayer	VEGFR, EGFR	HCC, CRC, GIST
Neratinib	2017	Puma	HER2	Cáncer de mama
Brigatinib	2017	Ariad	ALK	NSCLC

CML: Leucemia mieloide crónica; GIST Tumores del estroma gastrointestinal; NSCLC: carcinoma pulmonar no microcítico; RCC: carcinoma de células renales; HCC: Carcinoma hepatocelular; STS Sarcoma de tejido blando; DTC: Cáncer de tiroides

2.5. MECANISMOS DE FÁRMACORRESISTENCIA QUE AFECTAN AL TRANSPORTOMA DE FÁRMACOS

A pesar de los avances en el desarrollo de nuevos fármacos, la supervivencia en cáncer hepático es escasa, debido al desarrollo de mecanismos de farmacorresistencia (MPRs) (Marin and Macias, 2021), por parte de las células tumorales. La presencia de MPRs antes de la administración al paciente de agentes quimioterápicos (resistencia primaria) y/o su desarrollo y/o potenciación durante el tratamiento (resistencia adquirida) constituyen uno de los principales problemas clínicos en el tratamiento del cáncer (Marin *et al.*, 2018a), (Marin *et al.*, 2020b), (Marin *et al.*, 2020a). Por otro lado, pueden desarrollarse MPRs durante los tratamientos con determinados fármacos induciendo resistencia frente a otros fármacos, denominándose este proceso como fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (MDR).

Los MPRs se han clasificado en 7 grupos (Figura 2.13), que incluyen una reducción en la captación del fármaco por las células tumorales (MPR-1a), una potenciación de los procesos de expulsión del agente citostático (MPR-1b), una menor proporción de moléculas de fármaco activo en las células tumorales debido a una reducción en la activación de profármacos o un aumento de la inactivación de formas activas (MPR-2), cambios en la expresión y/o función de las dianas moleculares de los citostáticos (MPR-3), una mayor capacidad de las células del tumor para reparar el daño causado por fármacos que interfieren con su DNA (MPR-4), una disminución en la expresión y/o función de factores proapoptóticos o el aumento de los genes antiapoptóticos (MPR-5). A estos MPRs hay que añadir los cambios en el microambiente tumoral, que pueden proteger al tumor de la quimioterapia (MPR-6) y el escape del efecto antitumoral por transición fenotípica en el conjunto de células de la población tumoral (MPR-7). El cáncer hepático, en especial, es uno de los cánceres que presenta una menor sensibilización frente a la quimioterapia debido al desarrollo de varios mecanismos que contribuyen a la farmacorresistencia (Marin *et al.*, 2018a), (Marin *et al.*, 2019), (Marin *et al.*, 2020b).

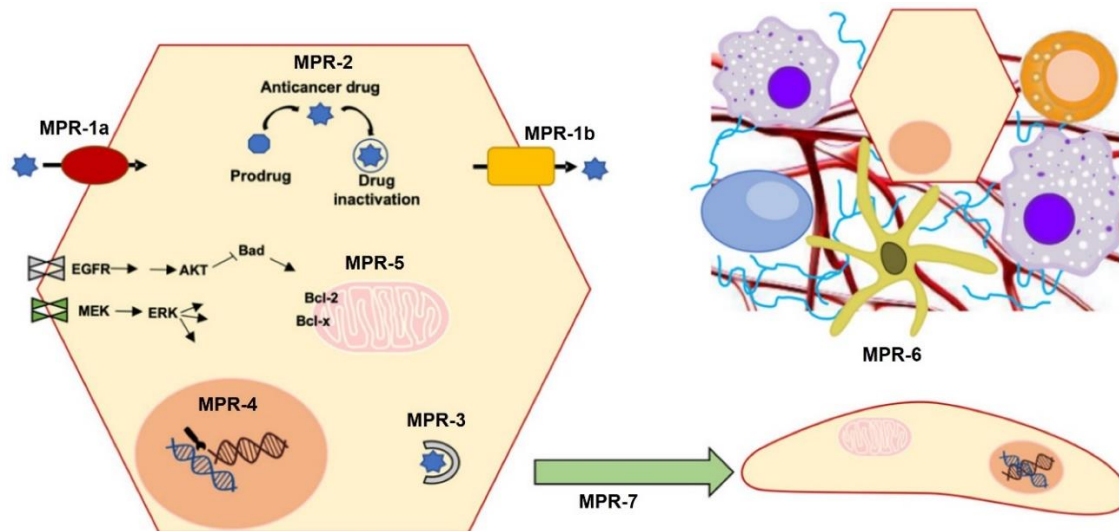


Figura 2.13: Representación esquemática de los mecanismos de farmacorresistencia (MPRs) también conocidos como mecanismos de quimiorresistencia (MOCs) presentes en una célula tumoral: reducción de la concentración intracelular del agente antitumoral, por una disminución de la captación (MPR-1a) o un aumento de su expulsión (MPR-1b); alteraciones en el metabolismo de los fármacos, por menor activación del profármaco o mayor metabolismo del agente citotóxico (MPR-2); alteraciones en las dianas moleculares (MPR-3); cambios en el sistema de reparación del DNA (MPR-4); desregulación de las rutas que desencadenan la apoptosis o implicadas en la supervivencia celular (MPR-5); cambios en el microambiente tumoral (MPR-6) y transición epitelio-mesenquimal (EMT) (MPR-7). SLC, "solute carrier protein"; ABC, "ATP-binding cassette". Imagen adaptada de (Alonso-Peña et al., 2019).

2.5.1. Transportadores involucrados en la captación de fármacos (MPR-1a)

Como se ha comentado, el MPR-1a afecta a los genes que codifican a los transportadores que intervienen en la captación de agentes antitumorales (Huang *et al.*, 2004). Por lo general, los agentes antineoplásicos, y en especial los TKI, ejercen su acción farmacológica en el interior de la célula, por lo que su captación es fundamental para que lleven a cabo su función. Por esa razón, el MPR-1a, que afecta a los cambios de expresión del transportoma, hace que la célula tumoral se insensibilice a los tratamientos.

Los TKIs son fármacos con elevado peso molecular, además de poseer en su estructura numerosos heteroátomos, destacando oxígenos y nitrógenos, que son capaces de formar enlaces de hidrógeno, confiriéndoles una baja lipofilia y requiriendo por ello la participación de transportadores específicos para efectuar su entrada al interior celular (Chandra and Brouwer, 2004).

Uno de los transportadores que juega un papel esencial en MPR-1a son las proteínas SLC. Dichos transportadores se expresan en multitud de tipos celulares, destacando que las células hepáticas expresan varias proteínas de esta familia, lo que supone un factor crucial en la captación de fármacos y, por consiguiente, la actividad antitumoral que ejercerán (Okabe *et al.*, 2008). Por desgracia, el desarrollo de MPR-1a por parte de las células tumorales supone una gran diferencia en la expresión y/o función de dichos transportadores, por lo que las concentraciones de fármaco en el interior celular se verán afectadas (Kerb *et al.*, 2002). Un ejemplo es el caso del transportador de cationes orgánicos-1 (OCT1, *SLC22A1*) (Tabla 2.2), habiéndose demostrado en ovocitos de *Xenopus laevis* y células de mamíferos con expresión estable de OCT1 que este transportador está implicado en la captación de sorafenib (Herraez *et al.*, 2013), pero no regorafenib (Al-Abdulla *et al.*, 2019). Además, la pérdida de expresión de OCT1 en la membrana plasmática de las células tumorales se ha correlacionado con una reducción de la supervivencia global en pacientes de HCC tratados con sorafenib (Geier *et al.*, 2017) y al restaurar la expresión de OCT1 se observa una mayor sensibilidad de las células de HCC al sorafenib (Al-Abdulla *et al.*, 2019).

Los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP) (genes *SLCO*) pueden estar involucrados en el transporte de TKI empleados en HCC. En particular, OATP1B1 y OATP1B3 pueden mediar en la captación de cabozantinib, mientras que OATP1B1 también puede transportar regorafenib y, probablemente, lenvatinib (Marin *et al.*, 2020b). Sin embargo, existen estudios que muestran una controversia con respecto al transporte de sorafenib mediado por OATP. Por un lado, hay estudios en células transfectadas de forma estable que sugieren que sorafenib es un sustrato para OATP1B1/1B3 (Zimmerman *et al.*, 2013) pero, por otro lado, también hay experimentos con modelos de ratones transgénicos que expresan OATP1B1/1B3 humanos que mostraron que estos transportadores sólo tienen un papel en la depuración de los metabolitos glucuronidados de sorafenib (Durmus *et al.*, 2016).

2.5.2. Transportadores involucrados en el eflujo de fármacos (MPR-1b)

Las proteínas transportadoras que mayormente están involucradas en este MPR son las pertenecientes a la superfamilia de proteínas ABC. Las bombas ABC actúan como transportadores activos primarios, empleando como fuerza impulsora la hidrólisis de ATP, lo que dificultan el éxito de los regímenes farmacológicos, impidiendo que se alcancen concentraciones terapéuticas en el interior de la célula tumoral.

Las proteínas ABC son las principales proteínas involucradas en MDR, ya que pueden transportar una amplia variedad de fármacos contra el cáncer, en especial TKIs (Tabla 2.2).

MDR1 (*ABCB1*), también conocida como glicoproteína P, se ha asociado con una supervivencia media reducida en HCC (Gao *et al.*, 2015). Es una de las bombas ABCs más estudiadas en el MPR-1b debido a que puede transportar una gran variedad de fármacos antitumorales (Marin *et al.*, 2009). Entre los sustratos de MDR1 se encuentran sorafenib (Hu *et al.*, 2009) y regorafenib. Además, la inhibición farmacológica de MDR1 aumenta moderadamente la concentración plasmática de lenvatinib, sugiriendo un posible papel en el transporte de este fármaco (Shumaker *et al.*, 2014).

Las proteínas MRP se encuentran entre los transportadores más importantes en la refractariedad de los tumores humanos, como son MRP1 (*ABCC1*), MRP2 (*ABCC2*), MRP3 (*ABCC3*) y MRP4 (*ABCC4*), que contribuyen al fenotipo MDR en HCC (Nies *et al.*, 2001). Se ha establecido una clara relación entre MRP1 y la resistencia a muchos agentes antineoplásicos, como la doxorubicina y la vincristina, según estudios *in vitro* realizados en cultivos celulares (Grant *et al.*, 1994). MRP2 tiene una elevada expresión en la membrana canalicular de los hepatocitos y juega un papel importante en la resistencia a derivados de platino, ya que puede reducir las concentraciones intracelulares del cisplatino (Cui *et al.*, 1999). Esta proteína se encuentra en niveles elevados en HCC, donde su expresión presenta una relación inversa con el éxito del tratamiento con cisplatino (Korita *et al.*, 2010). MRP2 participa también en el transporte de TKIs como son el sorafenib, regorafenib, cabozantinib, y probablemente lenvatinib (Marin *et al.*, 2020b). En CCA, se ha demostrado que una elevada expresión de MRP3, empleando estudios en cultivos celulares, se relaciona con resistencia a etopósido, doxorubicina y pararubicina (Marin *et al.*, 2018b), y MRP3 se ha asociado con una disminución de sensibilidad de las células del HCC al sorafenib (Tomonari *et al.*, 2016). Por último, se ha demostrado que MRP4 está involucrado en el transporte de diferentes fármacos antitumorales como las antraciclinas, análogos de purina, metotrexato o camptotecinas (Marin *et al.*, 2009).

Curiosamente, varios TKI pueden inhibir la actividad y expresión de bombas ABC, lo que conduce a un aumento en la sensibilidad, por lo que este hecho abre una nueva opción terapéutica para los TKIs como quimiosensibilizadores en HCC (Beretta *et al.*, 2017). Este hecho afecta por ejemplo al sorafenib, que disminuye la expresión de ABCB1 y ABCC2 en el HCC, probablemente a través de la inhibición de las vías de supervivencia. Además, la expresión reducida de BCRP por el tratamiento de células de HCC con TKI, como gefitinib, aumenta su sensibilidad al sorafenib.

Por otro lado, la presencia de variantes genéticas de estas proteínas afecta notablemente la respuesta farmacológica del HCC. Por lo tanto, los pacientes con HCC que son heterocigotos para las variantes rs1045642 en ABCB1, y rs2231137 y rs2231142 en ABCG2, tienen menor concentración plasmática de sorafenib y presentan una mejor evolución clínica (Marin *et al.*, 2020b).

Tabla 2.1: Mecanismo de fármacorresistencia para el MPR-1a y MPR-1b en el sorafenib, fármaco empleado clínicamente para el tratamiento de HCC. Tabla adaptada de (Marin *et al.*, 2020b).

	proteína	Cambio	Consecuencia
MPR-1a	OCT	Disminución de expresión	Reducción de la supervivencia
	OCT	Mutación	Disminución de la actividad en estudios <i>in vitro</i>
	SLC46A3	Disminución de expresión	Reducción de la supervivencia
MPR-1b	BCRP	Aumento de expresión	Reducción de la supervivencia
	MDR1	Aumento de expresión	Reducción de la supervivencia
	MDR1	rs1045642	Mejor pronóstico
	MRP3	Aumento de expresión	Disminución de la sensibilidad al fármaco en estudios celulares

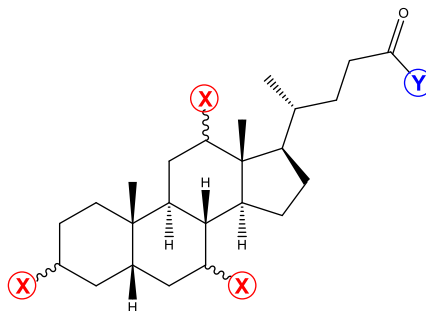
2.6. VECTORIZACIÓN DE FÁRMACOS EMPLEANDO ABs COMO LANZADERAS MOLECULARES

Los ABs son moléculas que poseen un carácter hepatotrópico, gracias a los transportadores específicos presentes en el circuito enterohepático, por lo que su transporte involucra casi exclusivamente al hígado y al intestino. Este hepatotropismo los convierte en excelentes moléculas para ser empleadas como lanzaderas de fármacos dirigidos a tejidos diana, mejorando su biodisponibilidad y su estabilidad metabólica (Kramer and Wess, 1996). Por otro lado, también se facilita la eliminación biliar de dichos fármacos, evitando que se produzca una acumulación a largo plazo que pueda producir efectos secundarios en células sanas. El diseño de nuevas moléculas, enfocadas en el acoplamiento de una molécula con actividad biológica demostrada a un sustrato natural, es lo que se denomina "Mimetismo de sustrato" (Zhang *et al.*, 2002). Ha sido utilizado en aplicaciones farmacológicas usando ABs como agentes vectorizantes.

2.6.1. Moléculas conjugadas con ácidos biliares

Debido a la estructura que poseen los ABs, se pueden considerar como bloques muy versátiles para la síntesis de una gran cantidad de compuestos. En la naturaleza encontramos numerosos ABs con diferentes funciones químicas, por lo que se pueden unir sustancias farmacológicas en diferentes posiciones del esqueleto esteroideo o de la cadena lateral, definiendo una gran cantidad de derivados farmacológicos. Por otro lado, también se pueden emplear diferentes tipos de enlaces químicos, longitud de espaciadores, estereoquímica y/o polaridad para realizar el acoplamiento de los fármacos, por lo que aumenta aún más la cantidad de posibilidades (Figura 2.14).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, para la síntesis de derivados de ABs generalmente se emplean dos estrategias diferentes: por un lado, se unen las moléculas de interés biológico directamente al esqueleto esteroideo mediante los grupos hidroxilos, que se encuentran en las posiciones 3, 7 o 12, y, por otro lado, existe la posibilidad de unir la molécula activa a la cadena lateral, empleando el ácido carboxílico como grupo reactivo, pudiendo realizar en todos los grupos funcionales reacciones del tipo esterificación, amidación, reducción, formación de anhídridos y, formación de aminas (Sievanen, 2007) (Figura 2.14).



X= OH en α , β , esterificación, reducción, amidación, espaciador, fármaco

Y= OH, esterificación, amidación, reducción, espaciador, fármaco

Figura 2.14: Estructuras de derivados de ABs y las posibles modificaciones que se pueden realizar mediante unión directa del fármaco o mediante modificación química, incluyendo la adición de un espaciador en las posiciones C3, C7, C12 o C24.

En este sentido, se han sintetizado una gran cantidad de compuestos derivados de ABs unidos a aminoácidos, péptidos, heparina, insulina, fármacos antivirales y antitumorales (Figura 2.15), para el tratamiento de diversas patologías del circuito enterohepático y/o para aumentar su absorción transepitelial en estos tejidos. Kramer y Wess son algunos de los primeros autores que han sintetizado compuestos vectorizados de este tipo, como por ejemplo un derivado con capacidad alquilante como es el clorambucilo, así como inhibidores de la biosíntesis de colesterol, HR780 y lovastatina, empleando el ω -aminoalcoxi como espaciador en la posición C₃- β . También se han obtenido derivados de oxaprolilpéptidos empleando, una esterificación con el ácido 3 β -(5-aminopentoxi)-7 α , 12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (Sievanen, 2007). Asimismo, se han sintetizado derivados de ABs con péptidos, lo que aumenta la biodisponibilidad oral, y la permeabilidad a la membrana celular (Kramer and Wess, 1996). Otro ejemplo de derivados de ABs con actividad farmacológica lo encontramos en la formación de un análogo de CA con cosalano, fármaco empleado para el tratamiento contra el VIH. En este caso, se recurre a la funcionalización en la cadena lateral y posterior formación de un derivado de alqueno. En este caso, se comprobó que el compuesto poseía una absorción mayor por vía oral que el agente farmacológico de partida, aunque perdió efectividad antiviral (Arunachalam Kannan, 2001). Baht *et al.* realizó un estudio para evaluar cómo afectaría al transporte de moléculas vectorizadas mediante la modificación del esqueleto esteroideo añadiendo anillos de pirazol en las posiciones C2-C3 (Bhat *et al.*, 2005). Los pirazol-derivados de ABs, junto con un fármaco, como el naproxeno, mostraron mejor afinidad con NTCP respecto a ASBT, concluyendo que los derivados con un heterociclo en las posiciones C2-C3 pueden actuar como sustratos para los sistemas de transporte de Bas sodio-dependientes, pudiendo ser utilizados como vehículos para vectorizar fármacos.

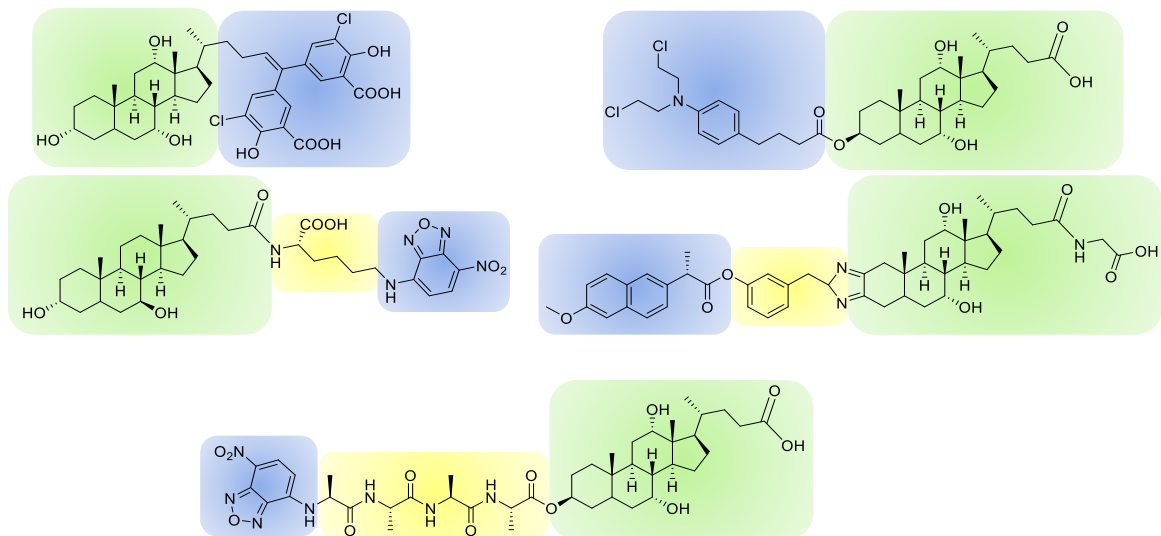


Figura 2.15: Moléculas con actividad farmacológica unidas a derivados de ABs en diferentes posiciones y empleando en algunas ocasiones un elemento que sirve de espaciador. En verde se remarca el AB, en amarillo los diferentes grupos espaciadores y en azul la molécula con características farmacológicas.

Siguiendo esta línea de derivados de AB, encontramos los BAMET, compuestos formados por la unión de un AB a derivados del cisplatino (Criado *et al.*, 1997b). Los BAMET son considerados compuestos del campo de la bioinorgánica, ya que están formados por la unión de un AB, que le confiere propiedades organotrópicas, y un metal de transición, que le confiere capacidad citostática (Marin *et al.*, 1998), haciendo que puedan interactuar con el DNA, formando aductos que bloquean la proliferación de células tumorales. También son capaces de interactuar con el DNA del virus de la hepatitis B, inhibiendo su ciclo vital y reduciendo por tanto la carga viral en las células hepáticas (Romero *et al.*, 2002).

Dentro de toda esta familia de compuestos, destaca el cabeza de serie BAMET-R2, producto entre la reacción de GCA con cisplatino mediante unión por enlaces de coordinación del ácido carboxílico al platino (Criado *et al.*, 1997a). A partir de este compuesto cabeza de serie, se desarrollaron el BAMET-D3, constituido por una poliamiamida al GCA y el BAMET-UD2, formado por la unión de dos moléculas de UDCA al cisplatino mediante enlaces de coordinación a través de los electrones no compartidos de los oxígenos y los d vacíos orbitales del metal.

Tanto el BAMET-R2 como el BAMET-UD2 han demostrado, *in vitro* e *in vivo*, que poseen propiedades antitumorales y antivirales. El Pt (II) mantiene su actividad citotóxica, (Marin *et al.*, 1998) interactuando con el DNA, y el AB conserva las propiedades organotrópicas (Larena *et al.*, 2001). Otra propiedad que conservan los ABs en estos derivados es la de formación de liposomas, debido a sus propiedades anfipáticas, lo que

ha permitido la inclusión de los BAMET en estas estructuras, mejorando su efectividad en células tumorales resistentes (Briz *et al.*, 2000) (Figura 2.16). Los BAMET han supuesto un punto de partida en el diseño de nuevos fármacos acoplados a AB, en los que en un principio se introducía un enlace éster entre el esteroide y el fármaco de platino, que garantiza la liberación del agente citostático similar al cisplatino. Sin embargo, actualmente se siguen investigando las diferentes propiedades de derivados de ABs unidos a cis-platino por diferentes funciones y/o espaciadores, variando estos entre éster o amidas para estudiar sus diferentes características (Seroka *et al.*, 2020).

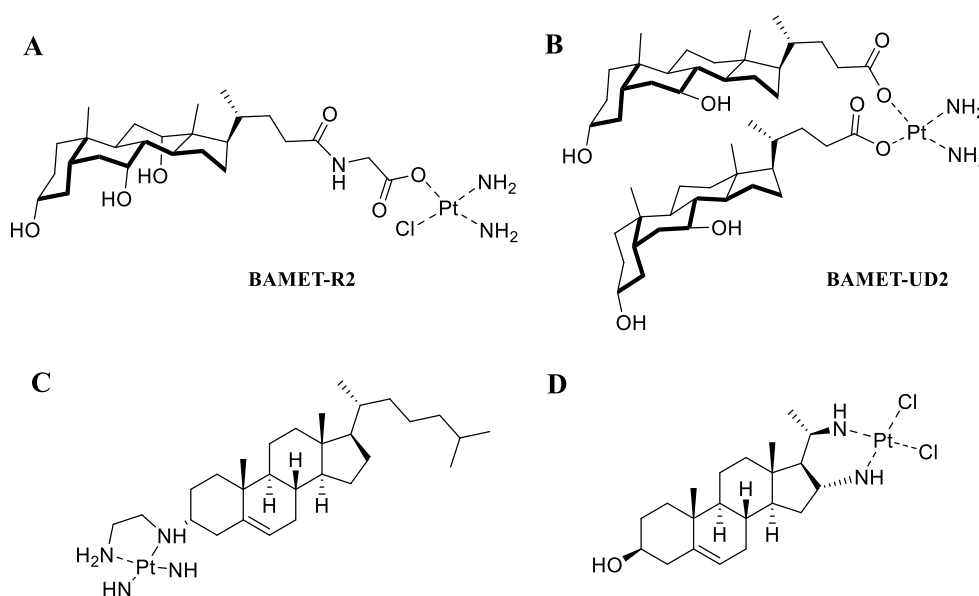


Figura 2.16: Compuestos derivados de estructuras esteroideas junto con cis-platino. (A): Derivado del GCA; (B): Derivado con dos moléculas de UDCA. (C) y (D): Derivados del colesterol.

La conjugación de ABs con metales de transición ha sido desarrollada con éxito para utilizarlos como agentes de contraste en RM, empleando gadolinio (III). Estos derivados de ABs de segunda generación constan de la conjugación del CA a través del grupo OH en 3 α con el gadolinio (III), mostrando un transporte a través de NTCP, lo que podría permitir el diagnóstico directo de enfermedades hepáticas, como el HCC (Anelli *et al.*, 2004).

También se han sintetizados derivados de ABs con el propósito de ser utilizados como marcadores para el estudio de sus cinéticas de transporte *in vivo* y de sublocalización celular. Encontramos derivados de ABs unidos a isótopos radiactivos y a moléculas fluorescentes como son el ácido [^{14}C]-taurosulfolitocólico, el ácido [^8F]-fluorocólico, la colilglicilamidofluoresceína, el colato de nitrobenzoxadiazolil-lisina o el colato de dansilo (Holzinger *et al.*, 1997) (Figura 2.17). Sin embargo, debido a las limitaciones en la detección, su utilidad está muy restringida a investigaciones *in vitro* e *in vivo* en laboratorio. En la práctica clínica actual, para el diagnóstico de enfermedades hepatobiliares en el paciente se utiliza la RM con gadoxetato y colescintigrafía con derivados del ácido

diiminodiacético (Van Beers *et al.*, 2015). A pesar de los avances en el desarrollo de sondas esteroideas u otros agentes de contraste, es necesario ampliar el banco de moléculas marcadoras con el objetivo de poder dar versatilidad a herramientas en estudios multiparamétricos como colocalización subcelular en microscopía de fluorescencia y confocal, citometría de flujo, ensayos de inmunofluorescencia *in vivo* y diagnóstico de alta resolución.

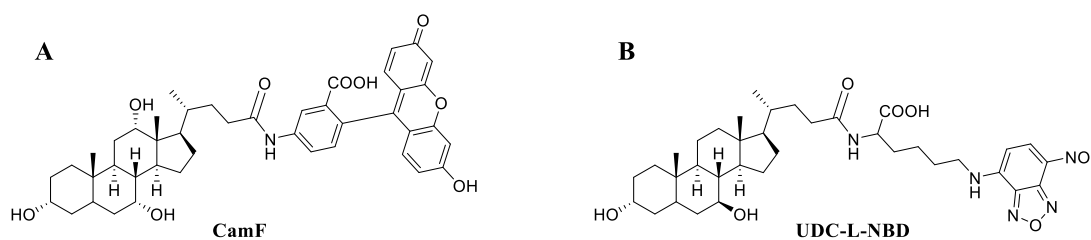


Figura 2.17: Estructuras de ácidos biliares unidos a moléculas fluorescentes. (A): Ácido cólico unido a la fluoresceína mediante un enlace amida. (B): Ácido ursodesoxicólico unido a una molécula de nitrobenzoxadiazolil mediante un enlace amida.

2.7. REACCIONES DE CICLOADICIÓN 1,3-DIPOLAR

Las reacciones de cicloadición 1,3-dipolar constituyen un recurso sintético para la formación de heterociclos de cinco miembros. Se basan en la reacción entre un dipolarófilo y un 1,3-dipolo, obteniendo como resultado una gran variedad de moléculas en las que puede variar la regio y estereoselectividad, así como la posibilidad de realizar diferentes transformaciones de los cicloaductos. Estas reacciones se engloban dentro del grupo de las denominadas reacciones *click*, cuyo concepto, *Click Chemistry*, fue introducido por el químico K. Barry Sharpless en el año 2001. Las características de las reacciones *click* incluyen una elevada selectividad, simplicidad, rapidez, fácil purificación de los productos, versatilidad, regioselectividad, también son reacciones muy robustas que suelen ser insensibles al oxígeno y permiten el uso de disolventes como el agua (Kolb *et al.*, 2001). El desarrollo de las reacciones *click* fue resultado de la observación directa de los procesos bioquímicos de formación de una amplísima cantidad de biomoléculas a partir de unos escasos monómeros como, por ejemplo, la formación de proteínas a partir de unos pocos aminoácidos o el DNA a partir de los ácidos desoxirribonucleicos. Sharpless propuso el desarrollo de nuevas técnicas para la síntesis de nuevos fármacos, para crear grandes bibliotecas al combinar fácilmente los bloques de construcción disponibles a través de reacciones *click* (Hein *et al.*, 2008).

El concepto de reacción *click* se puede considerar, no tanto como una disciplina científica, sino más bien como una filosofía aplicada a la síntesis orgánica que usa como modelo la química combinatoria que lleva a cabo la naturaleza. Dicha química, permite la creación de compuestos mediante la formación de enlaces C-C o C-heteroátomo siendo estas reacciones muy tolerantes a la variación de las características físico-químicas de los reactivos. La gran variedad de reacciones que pueden encuadrarse como reacciones *click* se pueden clasificar en cuatro grandes bloques (Hein *et al.*, 2008):

- ❖ Reacciones de cicloadición 1,3-dipolares [3+2], cicloadiciones [4+2] como las hetero Diels-Alder.
- ❖ Reacciones de sustitución nucleofílica o de apertura de anillo, en las que intervienen electrófilos heterocíclicos como pueden ser epóxidos, aziridinas, iones aziridinio e iones episulfonio.
- ❖ Reacciones en las que están involucrados grupos carbonilos no catalogadas como aldólicas, como son la formación de oximas, heterociclos aromáticos o hidrazonas.
- ❖ Reacciones de adición a dobles o triples enlaces C-C, como son adiciones de haluros, nitrosilo y sulfonilo, epoxidaciones, dihidroxilación, aziridinación y algunos tipos de reacción de Michael.

En el caso de las reacciones de cicloadición 1,3-dipolar en las que estén involucrados un alquino terminal y una azida, es posible tener control sobre la regioselectividad mediante el uso de catalizadores de cobre o rutenio. Dicho hallazgo supuso una revolución por su aplicabilidad en ciencias biomédicas, incluso en la ciencia de los materiales (Kolb and Sharpless, 2003) (Meldal *et al.*, 2010). A continuación, se han recogido las aplicaciones de catalizadores de cobre (I) para la obtención específica de un regioisómero en la obtención de derivados de ABs con moléculas farmacológicamente activas.

2.7.1. Cicloadición de Huisgen

Entre las reacciones de cicloadición [3+2] de compuestos 1,3-dipolares destacan aquellas en las que están involucrados sustratos alquino y azida, dando como resultado heterociclos aromáticos de 5 miembros, en concreto 1,2,3-triazoles. El proceso de cicloadición está termodinámicamente favorecido hacia la formación del heterociclo y se nombra como reacción de Huisgen, en honor a que fue quién las impulsó en 1960. El proceso de formación del producto heterocíclico requiere una elevada temperatura, debido a la elevada energía de activación, junto con tiempos prolongados de hasta 60 horas. Además, en las condiciones térmicas de reacción no se lograba obtener una regioselectividad adecuada, por lo que se formaban los regioisómeros 1,4 y 1,5-disustituídos; consiguiendo escasos avances en regioisomería mediante el uso de acetilenos o azidas deficientes en electrones, favoreciendo el isómero 1,4 o el 1,5 respectivamente, o mediante la inclusión de macrociclos como resorcinarenos o cucurbiturilos.

El valor práctico de estas reacciones radicaba en la relativa facilidad de funcionalización de diferentes compuestos para la incorporación de alquinos y azidas para su posterior cicloadición, junto con la estabilidad de dichas funcionalidades, pudiendo coexistir con una elevada variedad de grupos funcionales dentro de la misma molécula y siendo inertes en presencia de oxígeno o agua. Sin embargo, entre los inconvenientes de estas reacciones, destacaban la cinética lenta de reacción, que era la responsable de las elevadas temperaturas necesarias para que la reacción tuviera lugar. Otra desventaja podría ser, la descomposición espontánea de las azidas, que está termodinámicamente favorecida, aunque posee una cinética lenta, por lo que las azidas tienen un tiempo de vida prolongado, y, en especial las alifáticas. La revolución en la reacción de Huisgen llegó con el descubrimiento, descrito por Meldal (Tornøe *et al.*, 2002), y por Sharpless (Rostovtsev *et al.*, 2002) de modo independiente, del proceso catalizado por cobre (I), entrando a formar parte de las reacciones *click*, (Figura 2.18), el cual da lugar a una absoluta regioselectividad hacia el isómero 1,4-disustituído; además de aumentar la velocidad de la reacción en un factor de hasta 10^7 , permitiendo que se lleve a cabo a temperatura ambiente.

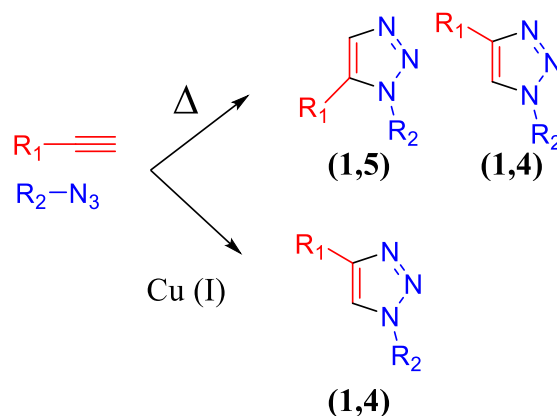


Figura 2.18: Cicloadición de Huisgen entre una azida y un derivado acetilénico con y sin catalizador de Cu (I).

Sharpless describió el uso de sulfato de cobre (II) pentahidratado como especie generadora del catalizador, empleando ascorbato de sodio como reductor del cobre (II) a cobre (I), obteniendo así la especie catalítica y llevando a cabo las reacciones en disolventes acuosos. Este nuevo avance proporciona una mejora ya que, al ser una reacción exotérmica, el agua, debido a su alto calor específico, sirve como refrigerante. La obtención de 1,2,3-triazoles en este tipo de reacciones catalizadas por cobre posee una serie de ventajas que las convierte en reacciones idóneas para la síntesis de nuevas moléculas con actividad biológica. El anillo de 1,2,3-triazol es un heterociclo aromático que es inerte frente a agentes oxidantes o reductores; a esta característica, hay que sumarle la alta especificidad de la reacción junto con la biocompatibilidad de los reactivos y la relativa sencillez de purificación entre los reactivos y el producto de la reacción mediante técnicas de precipitación y lavado. Quizás, el inconveniente de estas reacciones catalizadas por cobre es que se reduce el número de reactivos candidatos a la cicloadición, puesto que la regioselectividad se obtiene entre alquinos terminales y alquil o aril azidas, no observándose regioselectividad con alquinos no terminales (Rostovtsev *et al.*, 2002).

El mecanismo de la cicloadición de Huisgen catalizada por cobre (I) transcurre a través de un ciclo catalítico (Figura 2.19) que consta de las siguientes etapas (Liyuan Liang, 2011):

- ❖ Formación de un acetiluro de cobre: La formación de esta especie es debido al establecimiento de un enlace de coordinación entre los electrones π del alquino y el átomo de cobre (I). Existen variantes en las condiciones de la reacción en las que una base sustrae el protón terminal del acetileno, favoreciendo la coordinación entre los electrones no enlazantes del carbono terminal y el cobre.

- ❖ Coordinación de la azida: La azida se comporta como un ligando débil σ -donador, uniéndose al átomo de cobre.
- ❖ Adición nucleófila: Del átomo de carbono no terminal del acetileno al nitrógeno terminal de la azida, formando un metalaciclo.
- ❖ Proceso de contracción del anillo: Este proceso espontáneo da lugar a un 3-triazol complejo de cobre. Este intermedio ha podido ser estudiado gracias a su aislamiento con el uso de ligandos auxiliares voluminosos que permiten su estabilización por efectos estéricos.
- ❖ Por último, se produce una protonación liberando el triazol y regenerándose el catalizador.

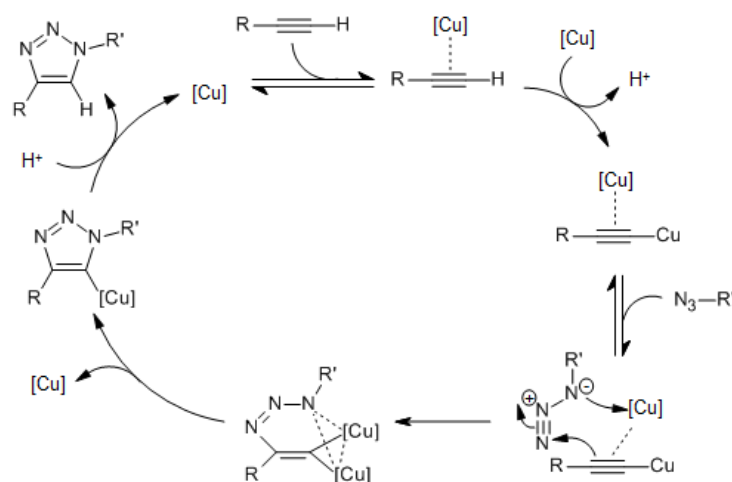


Figura 2.19: Mecanismo de la reacción click catalizada por cobre (I).

Mediante el estudio de este mecanismo de reacción se comprende que la regioselectividad se encuentra limitada a alquinos terminales, mediante la formación del acetiluro de cobre en el primer paso del mecanismo. Por otro lado, la reacción transcurre debido a la interacción entre el orbital LUMO del dipolo y el HOMO del dipolarófilo, por lo que se encuadra en una cicloadición con demanda electrónica inversa.

El ion cobre (I) que actúa como catalizador en la reacción de Huisgen es el ion menos estable entre los tres estados de valencia que puede tener el cobre (0, +1 y +2), pudiéndose oxidar espontáneamente con el oxígeno a Cu^{2+} o dismutar a Cu^0 y Cu^{2+} . Debido a la poca estabilidad del ion que cataliza la cicloadición, se han diseñado diferentes métodos para obtener el ion necesario. El método estándar es el empleo de una sal de cobre(II) como el CuSO_4 o $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, obteniendo la especie reducida gracias al uso de un agente reductor como es el ascorbato de sodio.

Otro método habitual es la oxidación de cobre metálico, añadido en virutas, con un oxidante suave o comproporciónación del sistema $\text{Cu}^0/\text{Cu}^{2+}$. Por último, actualmente se han diseñado sales de cobre(I) como son CuI , CuOTf , $[\text{Cu}(\text{NCMe})_4]^+$ que se añaden directamente al medio de reacción.

Sin embargo, la oxidación del Cu^{1+} a Cu^{2+} es espontánea en presencia de oxígeno y este último es inactivo en la cicloadición, mediando en reacciones competitivas de tipo Glaser-Hay o de Eglinton, con la formación de diinos. Por lo tanto, el empleo de reductores como el ascorbato de sodio es esencial para que la presencia de cobre (I) sea continua en el medio de reacción.

Respecto a la adición de ligandos para el cobre, aunque no es imprescindible su presencia para que se lleve a cabo la reacción, sí que se ha observado un aumento en la velocidad de la reacción, favoreciendo la solubilidad y la cinética y disminuyendo los tiempos significativamente. Este fenómeno es debido a que los ligandos favorecen la estabilización del estado de oxidación del cobre (I), inhibiendo posibles acoplamientos de alquinos terminales del tipo Ullman o Cadiot-Chodkiewicz en los que interviene el cobre (II) (Chan *et al.*, 2004). También se ha estudiado que la formación de complejos de cobre reduce la formación de agregados polinucleares de los diferentes reactivos, que son los responsables de inhibir la catálisis por impedimento estérico de unión entre la azida y el cobre. La síntesis de nuevos agentes que actúen como ligando ha supuesto un avance en este campo de investigación en los últimos años, siendo los ligandos N-donadores los que ofrecen una mayor eficacia en los sistemas catalíticos, en especial los ligandos polidentados con la presencia de distintos heterociclos nitrogenados, aminas terciarias y distintos derivados de bipyridina y/o fenantrolinas (Presolski *et al.*, 2010) (Figura 2.20). Por otro lado, también se han descrito ligandos fosforados (Campbell-Verduyn *et al.*, 2009) y carbenos N-heterocíclicos (Nakamura *et al.*, 2011).

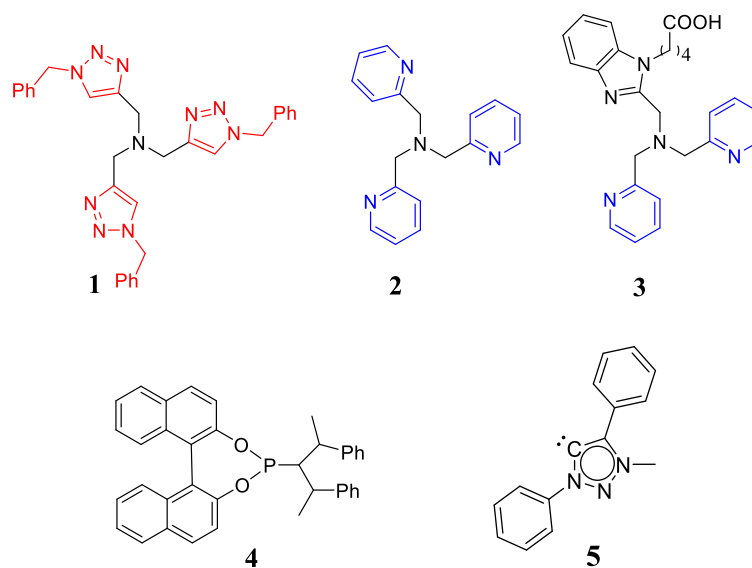


Figura 2.20: Estructuras de ligandos para reacciones de cicloadición entre azidas y alquinos catalizadas por Cu (I). **1-3:** Ligandos basados en los grupos triazol 1,4-disustituido (rojo), bencimidazol (negro) y piridina (azul) (Presolski et al., 2010). **4:** Ligando fosforado (Campbell-Verduyn et al., 2009). **5:** Ligando carbeno N-heterocíclico (Nakamura et al., 2011).

Debido a la gran versatilidad de las reacciones *click*, también se han desarrollado ligandos con centros quirales que son capaces de añadir cierto grado de enantioselectividad a la reacción. En este aspecto, se ha descrito la acción de diferentes ligandos quirales, obteniendo resultados moderados de enantioselectividad en la resolución racémica de ciertas reacciones al emplear ligandos Pybox, que son capaces de resolver cinéticamente azidas quirales (Jun Cai Meng, 2005). Gracias al desarrollo de nuevos ligandos quirales, se ha conseguido la síntesis enantioselectiva de numerosos compuestos triazólicos, denominados triazoles α -N-quirales (Alexander et al., 2019) (Figura 2.21) constituyendo moléculas estimulantes del sistema inmune, antiagregantes e inhibidores de captasina S.

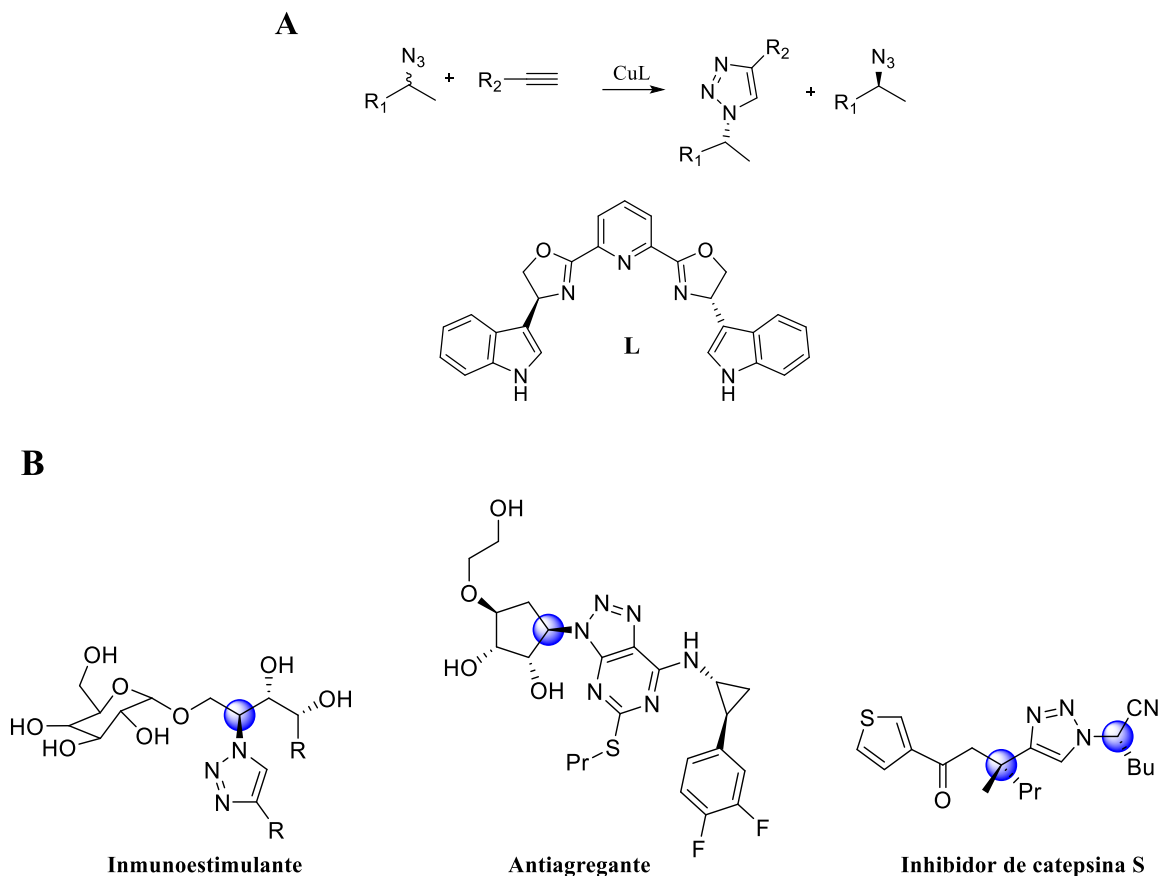


Figura 2.21: (A): Resolución cinética de azidas quirales desarrollada mediante ligandos quirales para el cobre (I); (B): Compuestos bioactivos con triazoles α -N-quirales. Figura adaptada de (Alexander et al., 2019).

2.7.2. Reacciones *click* en la preparación de derivados de ácidos biliares

Los ABs son moléculas muy atractivas para la síntesis de nuevos fármacos, debido a sus propiedades químicas como son el esqueleto esteroideo rígido y curvo y por la presencia de diferentes grupos hidroxilo que, junto con el esqueleto carbonado y el grupo carboxilato, les confiere propiedades anfipáticas que los convierten en tensioactivos biológicos con múltiples funciones fisiológicas. Por todas estas características químicas, los ABs juegan un papel importante en la química supramolecular y farmacología, empleándose como bloques de construcción para el diseño y síntesis de nuevas moléculas con actividad farmacológica.

Debido a la gran versatilidad de la química *click*, las reacciones de cicloadición 1,3 dipolares entre azidas y acetilenos han sido un gran recurso para el diseño de nuevos derivados de ABs. Las reacciones *click* se pueden llevar a cabo en varios disolventes, incluyendo agua, son métodos eficientes y selectivos para la síntesis de triazoles en presencia de otros grupos funcionales; además, los triazoles son heterociclos muy estables y resistentes a la hidrólisis en el medio biológico, en presencia de reductores y condiciones oxidantes. Otra de las características de los triazoles es su capacidad para actuar como aceptores de enlaces de hidrógeno e interacciones dipolo, además de imitar topológicamente las características electrónicas del enlace amida, por lo que han sido empleados para el diseño de peptidomiméticos. Debido a todas estas propiedades, en los últimos años ha habido un auge en la síntesis de derivados de ABs empleando la química *click* como recurso. Además, se pueden encontrar muchas aplicaciones en química que incluyen, por ejemplo, descubrimiento de fármacos o ciencia de los materiales, entre otras.

En bibliografía encontramos varios ejemplos de estos sistemas *click* AB-molécula, empleando diferentes recursos sintéticos, por lo que, en función de las diferentes propiedades y criterios de síntesis, se puede funcionalizar el AB tanto con una azida como con un acetileno, aprovechando los diferentes grupos funcionales que ofrece la molécula. Sokolova *et al.* diseñaron y sintetizaron derivados de ABs mediante esterificación en los carbonos C3, C7, C12 y en la cadena lateral mediante diferentes derivados alquino (Figura 2.22) (Sokolova *et al.*, 2011). Posteriormente llevaron a cabo la reacción *click* con azidopéptidos, creando una gran batería de triazoles con ABs que pueden jugar un papel importante tanto en bioquímica y química medicinal, como en química de coordinación y química supramolecular. Esta aplicabilidad es debida a la gran cantidad de dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno, que pueden actuar como estructuras tipo "pinza", así como a la gran cantidad de heteroátomos con pares de electrones libres que pueden enfocarse a la preparación de sistemas de ligando adecuados para la complejación de metales. Además, puede ser útil en el diseño de nuevos receptores para el reconocimiento selectivo de aniones.

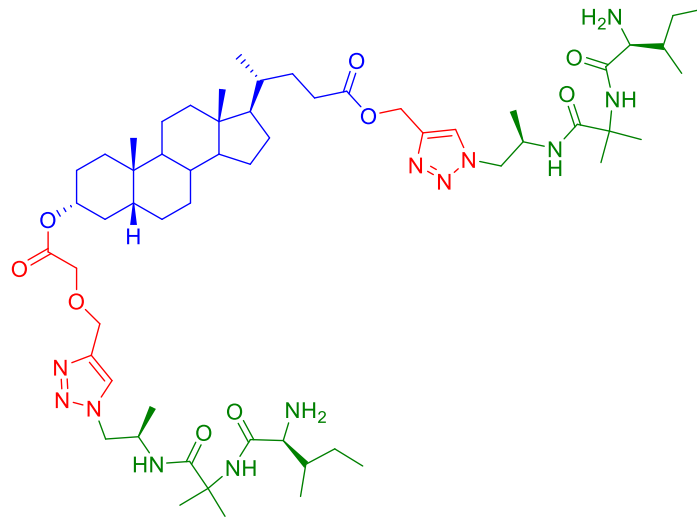


Figura 2.22: Compuestos preparados por Sokolova et al. (Sokolova et al., 2011). En azul se muestra el esqueleto esteroideo, en rojo los triazoles unidos a través de enlaces éster, cuya función es servir de espaciador y, por último, los péptidos unidos al triazol en verde.

Otro ejemplo se encuentra en la síntesis de nuevos antimicrobianos, como en la síntesis de derivados de β -lactamas. (Vatmurge *et al.*, 2008) sintetizaron un grupo de nuevos agentes β -lactámicos unidos a ABs, obteniendo una mejora en la actividad antimicrobiana (Figura 2.23). La conjugación con un AB, como es el CA, proporcionaba características anfipáticas que mejoraban la permeabilidad del fármaco a través de las membranas biológicas, incluidas las bacterianas. Para su síntesis, obtenían el alquino derivado mediante una esterificación o amidación con el alcohol propargílico o amina correspondiente, dando lugar tanto un éster como una amida derivada a partir del ácido carboxílico respectivamente. Una vez obtenido el etinil derivado, llevaron a cabo la reacción *click* con diferentes β -lactamas, teniendo como resultado conjugados de ácido β -lactámico-cólico/desoxicólico a través de triazol y estudiaron sus propiedades antibacterianas y antifúngicas, logrando resultados muy prometedores, en especial con los derivados ácido β -lactámico-desoxicólico en cultivos con *C. albicans*, *B. poitrasii* e *Y. lipolytica*.

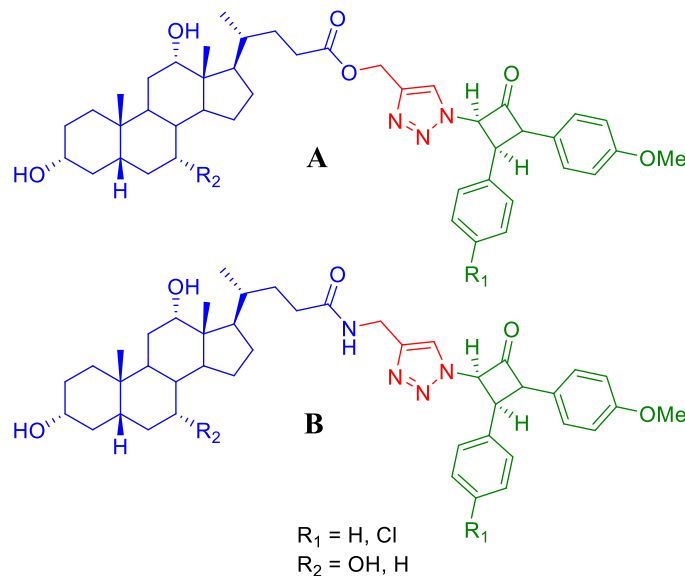


Figura 2.23: Conjugados de ácido β -lactámico-cólico y desoxicólico a través de un triazol con capacidad antibacteriana y antifúngica. La unión se realiza mediante enlaces éster (A) o mediante enlace amida (B). Figura adaptada de (Vatmurge et al., 2008).

Por otra parte, en los últimos años, se han desarrollado dímeros y macrociclos formados por esqueletos esteroideos de ABs, con el objetivo de encontrar nuevas aplicaciones farmacológicas, e incluso el diseño de nuevos polímeros. Los diseños de dímeros o polímeros se basan en el enfoque de unión mediante los hidroxilos, habitualmente el de la posición C3, aunque también los hay en el resto de las posiciones con hidroxilos o en la cadena lateral. El fragmento enlazante es un anillo de triazol, a través de la modificación química del esqueleto mediante reacción de grupos azida y acetileno apropiados presentes en los sustratos esteroideos. Un ejemplo es el acoplamiento del derivado 11-azido-12-oxo de metil-3,7-diacetoxi-5 β -colan-24-ato con 5 β -colato de propargilo que resultó en la formación de un dímero que tiene el conector triazol entre C24 y C11 de los residuos 5 β -colano, compuesto con aplicaciones en el reconocimiento molecular (Aher, 2005). También se han sintetizado dímeros unidos a través de la cadena lateral, mediante la reducción del ácido carboxílico al alcohol primario y posterior desplazamiento con azida sódica para formar la azida derivada. Por otro lado, se han obtenido diferentes derivados de alquinos mediante la formación de un éster con alcohol propargílico al reaccionar directamente con el ácido carboxílico o con ácido propiónico, reduciendo previamente el ácido al alcohol correspondiente (Mađrzak-Litwa et al., 2015).

Asimismo, también se han diseñado y sintetizado dímeros de ABs con la inclusión de espaciadores que les proporcionen una mayor cantidad de grados de libertad, de manera que puede formar una mayor cantidad de enlaces de hidrógeno. Es el caso de Pospieszny *et al.* (Pospieszny *et al.*, 2017), que sintetizaron tres nuevos dímeros de ABs mediante un anillo de triazol o empleando como sustrato dos dímeros de bromoacetil derivados de ABs, sintetizados a partir de los propargil éster de ABs, empleando en este caso el 1,3-di(azidometilo) benceno como espaciador entre los ABs. Los resultados de los ensayos mostraron que los hidroxilos de los ABs son capaces de participar en la formación de enlaces de hidrógeno con ácido ftálico, ácido tereftálico y PABA, formando aductos (Figura 2.24).

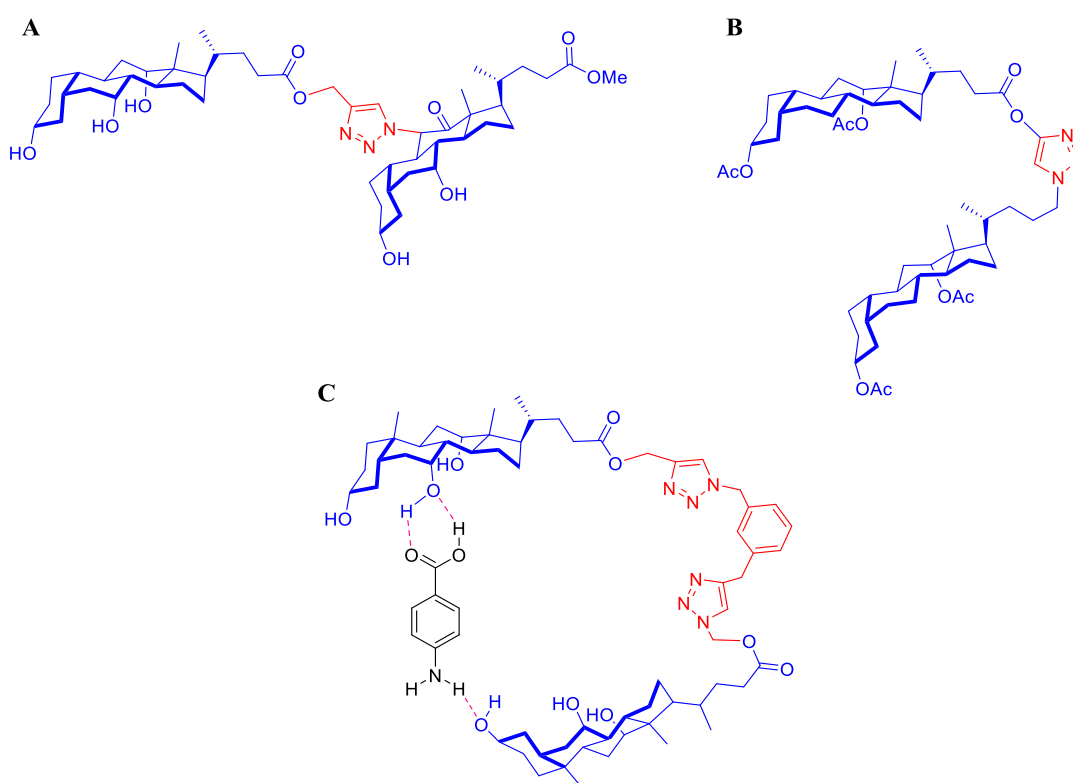


Figura 2.24: Dímeros sintetizados a partir de ácidos biliares mediante química click. (A): Dímero unido mediante la cadena lateral y el C11 (Aher, 2005); (B): Dímero unido mediante las dos cadenas laterales (Mańdrzak-Litwa *et al.*, 2015); (C): Dímero unido mediante las dos cadenas laterales y añadiendo un espaciador que permite un mayor número de grados de libertad, por lo que es capaz de actuar como receptor (Pospieszny *et al.*, 2017).

Otra de las aplicaciones de la química *click* en los ABs es la formación de derivados de estrella para la formación de bolsas moleculares con el objetivo de actuar como vehículos de fármacos, quimiosensores para iones metálicos y contenedores moleculares. Basándose en este diseño, (Anandkumar and Rajakumar, 2017) han aplicado las reacciones *click* para el diseño de dendrímeros, que son macromoléculas hiperramificadas con estructuras definidas con precisión y múltiples funciones. Los dendrímeros ofrecen una gran cantidad de aplicaciones en campos como ciencia de los materiales y ciencias biológicas, tales como sistemas de administración de fármacos, sensores y encapsulación molecular entre otras. Con unas aplicaciones tan extensas, se han diseñado dendrímeros empleando ABs como base y benceno como unidad central empleando la química *click*. Los dendrímeros mostraron citotoxicidad en líneas celulares de glioma *in vitro* (Figura 2.25).

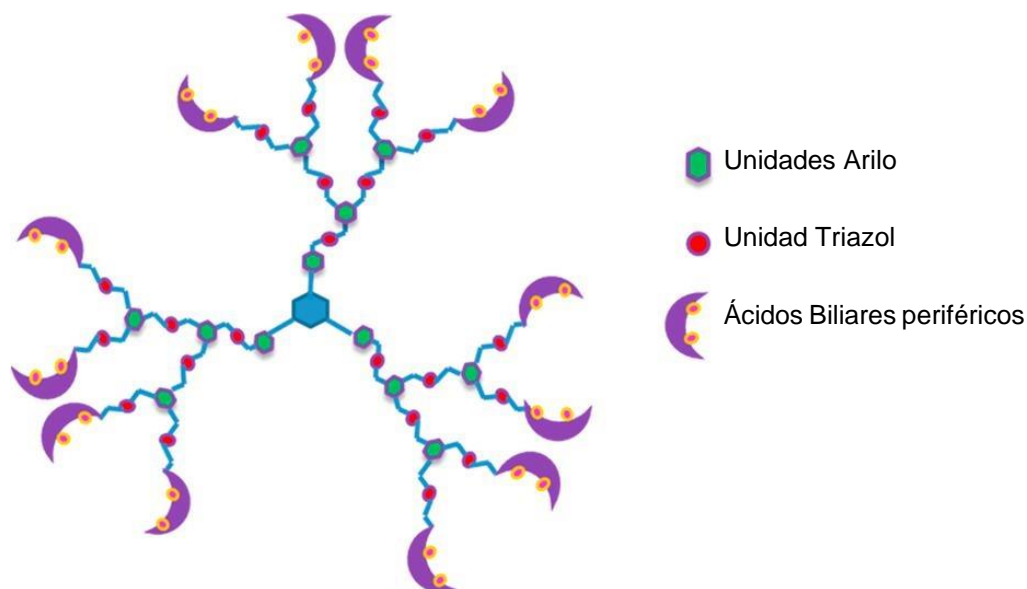


Figura 2.25: Dendrímero sintetizado a partir de derivados de ABs empleando un benceno como núcleo central. Figura adaptada de (Anandkumar and Rajakumar, 2017).

(Agarwal *et al.*, 2018) aplicó la metodología de reacciones *click* para la síntesis de una batería de compuestos conjugados con ABs. Los compuestos sintetizados fueron evaluados por su citotoxicidad *in vitro* en tres líneas de cáncer de próstata humano (PC-3), adenocarcinoma de mama (MCF-7) y de neuroblastoma humano (IMR-32), además se evaluó su actividad antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (cepa ATCC 27294). Entre todos los conjugados sintetizados, se encontró que algunos de ellos (Figura 2.26) mostraban una elevada citotoxicidad en adenocarcinoma y neuroblastoma humano. Otro de los compuestos mostró una elevada actividad antimicrobiana, demostrando que los conjugados de AB-nucleósido podrían ser potenciales moléculas vectorizas citotóxicas.

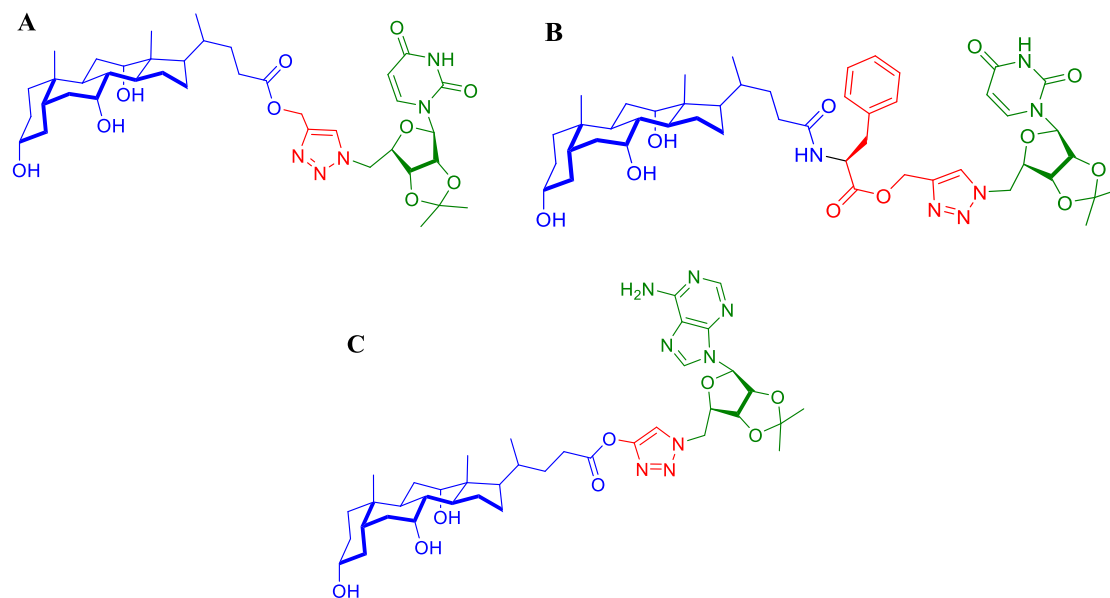


Figura 2.26: Compuestos vectorizados con actividad biológica. (A): En adenocarcinoma; (B): En neuroblastoma y (C): Antimicrobiana. Imagen adaptada de (Agarwal et al., 2018).

3.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Líneas celulares

En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- ❖ Alexander o PCL/PRF/5 (CRL 8024) derivadas de HCC humano: Proporcionadas por la American Type Culture Collection (ATCC, LGC Standards, Barcelona), transducidas con vehículos virales vacíos (denominada como Alexander Mock), o conteniendo el ORF de SLC10A2 (Alexander-ASBT). Estas líneas derivadas de la WT proceden del Biobanco del grupo de investigación HEVEPHARM, las cuales fueron obtenidas en trabajos previos mediante transducción con lentivirus y selección clonal para la sobreexpresión del transportador (Lozano *et al.*, 2015).
- ❖ CHO: La línea celular silvestre CHO-WT, de ovario de hámster chino, y la sublínea establemente transfectada con OATP1B1 (CHO-OATP1B1) fueron generosamente cedidas por el Dr. Bruno Stieger, del Hospital Universitario de Zurich (Suiza). Las líneas celulares CHO-OATP1B3 y CHO-NTCP se obtuvieron de nuevo del Biobanco del grupo de investigación HEVEPHARM y derivan de la línea celular CHO-WT, la cual fue modificada en trabajos previos mediante transducción con lentivirus y selección clonal para la sobreexpresión del transportador. Como control de estas dos líneas se utilizó la línea CHO Mock, también obtenida por transducción con vehículos virales vacíos.
- ❖ TFK (ACC 344 o denominada también como TFK Mock): células derivadas de CCA humano. Proporcionadas por la casa comercial German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Alemania), transducidas con vehículos virales vacíos (denominada como TFK Mock), o conteniendo el ORF de SLC10A2 (TFK-ASBT). Estas líneas derivadas de la WT proceden del Biobanco del grupo de investigación HEVEPHARM, las cuales fueron obtenidas en trabajos previos mediante transducción con lentivirus y selección clonal para la sobreexpresión del transportador (Lozano *et al.*, 2015).

3.1.2. Modelos animales

Para los estudios en modelos animales se utilizaron ratas macho de la raza Wistar, entre 200 y 300 g de peso corporal, procedentes del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca.

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

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

3.2. PRODUCTOS QUÍMICOS

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

- ❖ Abbot Laboratorios (Madrid): Pentobarbital sódico (Nembutal N.R.).
- ❖ Air Liquide (Valladolid): Argón, dióxido de carbono y nitrógeno líquido.
- ❖ AppliChem (Madrid): Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico (HEPES) y glicina.
- ❖ Biomers.net (Ulm, Alemania): *Primers* empleador para las RT-PCR.
- ❖ B. Braun (Melsungen, Alemania): Sutura de seda.
- ❖ Cymit química (Pamplona): Ácido cólico, ácido glicocólico, erlotinib, 4-cloro picolinato de metilo y propargilamina.
- ❖ Leo Laboratorios S.A. (Madrid): Heparina.
- ❖ Merck (Barcelona): Acetato de cobre (II), ácido fosfomolibdico, ascorbato de sodio, hidróxido de sodio, isopropanol, β -mercaptoetanol y sulfato de cobre (II) pentahidratado.
- ❖ Millipore (Waters Corporation, Madrid): Filtros “Steritop™” para la esterilización de medios de cultivo.

- ❖ Sigma-Aldrich (Madrid): Ácido 4-cloro picolinico, albúmina sérica bovina (fracción V), alquinocianina 718, *p*-aminofenol, *p*-Boc-aminofenol, ampicilina, azida de sodio, azul de Triptán, bicarbonato de sodio, *tert*-butanol, *tert*-butóxido de sodio, 2-cloroetanol, dimetilsulfóxido (DMSO), cloruro de tionilo, dodecil sulfato de sodio (SDS), fenol, isocianato de 4-cloro-3-(trifluorometil)fenilo, medio de cultivo “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM)-high glucose”, *p*-nitrofenol, paladio sobre carbón 5% y sulfato de sodio.
- ❖ Qiagen (Izasa, Barcelona): IllustraRNAspin Mini RNA Isolation Kit.
- ❖ Thermo Fisher Scientific (Madrid): Acetato de etilo, ácido nítrico, aminoácidos no esenciales 100x, cloroformo, diclorometano, dicitclohexilcarbodiimida (DCC), dimetilformamida (DMF), éter, hidrógeno carbonato de sodio, mezcla de antibióticos (penicilina/estreptomicina) y antimicótico (anfotericina B), kanamicina, kits comerciales para la transcripción reversa (RT) SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit y High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, kit de RNA ribosómico 18S “TaqMan™ Ribosomal RNA Control Reagents”, suplemento de glutamina GlutaMAX, suero bovino fetal (FBS), “SYBR Green I PCR Master Mix”, metanol, suplemento de glutamina GlutaMAX y tetrahidrofurano (THF).
- ❖ VWR Internacional (Barcelona): Ácido clorhídrico, carbonato de sodio, carbonato de potasio, cloroformo deuterado, cloruro de potasio, DMSO deuterado, indicador universal de pH y metanol deuterado.

Todos los demás reactivos utilizados fueron del nivel de calidad requerido para cada caso.

3.3. MEDIOS INSTRUMENTALES

Para la realización de las pesadas se han empleado balanzas electrónicas digitales Precisa 600 A y Sartorius BL 150S (Grupo Taper, Madrid). Para realizar las pesadas de los animales se empleó una balanza electrónica digital Precisa, modelo 600 C (Grupo Taper).

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se registraron en un espectrómetro Bruker WP-200-SY (200 MHz para ^1H y 50 MHz para ^{13}C), Varian 200 Mercury VS 2000 (200 MHz para ^1H y 50 MHz para ^{13}C) y Bruker Advance DRX (400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C ; Servicio de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad de Salamanca). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm)

usando como estándar interno la señal del disolvente. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hercios (Hz), con las siguientes abreviaturas para explicar las multiplicidades: s, singlete; d, doblete; t, triplete; m, multiplete; q, cuartete; quin, quintuplete; h, hexaplete; dd, doblete de dobletes; dt, doblete de tripletes; sa, singlete ancho.

Los espectros de infrarrojo (IR) se registraron en un espectrofotómetro Nicolet IR100 (Thermo Fisher), realizándolos en forma de película en nujol o en CH_2Cl_2 , con una ventana de NaCl, expresando las bandas obtenidas en cm^{-1} .

Para la determinación de los puntos de fusión (P.f.) se empleó un aparato capilar Stuart Scientific SM3P y con un microscopio Leica Galen III (Thermo Fisher).

Los espectros de masas se realizaron en el Servicio de Espectrometría de Masas de la Universidad de Salamanca. Los espectros fueron registrados con un espectrómetro cuadrupolo-tiempo de vuelo (TOF) Applied Biosystems QSTAR XLo Waters ZQ 4000 usando ionización por impacto electrónico (EI) o electrospray (ESI). La detección se realizó en el ultravioleta (UV) y se llevó a cabo en el Servicio de Espectrometría de Masas de la Universidad de Salamanca.

La cromatografía de capa fina se realizó sobre placas de 0,2 mm de gel de sílice 60 F254 soportada en aluminio (Merck) y se visualizaron con una lámpara ultravioleta de $\lambda = 254$ nm. Para la cromatografía de columna se empleó gel de sílice Chromagel 60 A. C. C. de 70-200 μm , en proporción 30 gramos de sílice por gramo de muestra.

Para la determinación del pH se empleó un electrodo Crison PH BASIC 20 (Crison Instruments, Barcelona).

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

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

La determinación espectrofotométrica de la concentración de RNA se llevó a cabo con un NanoDrop 1000 (Thermo Fisher).

Para llevar a cabo las centrifugaciones se emplearon centrífugas refrigeradas 5417R y 5810R marca Eppendorf (Hamburgo, Alemania). También se emplearon picofugas Stratagene (VWR International Eurolab).

Para realizar la esterilización de materiales sólidos y líquidos, y material de cultivos celulares se empleó un autoclave, modelo Tuttnaver 2340 M (Duerolab, Salamanca).

Para llevar a cabo la RT se utilizó un termociclador Eppendorf Mastercycle egradient (Thermo Fisher). Los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real en tubos de 0,2 ml se realizaron en un equipo ABI PRISM® 7300 Sequence Detection System, de Applied Biosystems.

Para la visualización de la fluorescencia en ratas se empleó un equipo de análisis de imagen Fujifilm LAS-4000 (TDI, Madrid) que posee una CCD de alta sensibilidad (3,2 MP). Las imágenes se analizaron con el programa informático MultiGauge v3.0 (Fujifilm).

Los estudios de fluorescencia se llevaron a cabo con un espectrofotómetro de fluorescencia marca HITACHI F-4500 (Triadscientific) empleando cubetas de silicio con un 1 cm de paso óptico y un detector R3788 Photomultiplier tube con un rango de medida comprendido entre 200 a 730 nm.

Para llevar a cabo las evaporaciones de disolventes orgánicos y acuosos se emplearon rotavapores Büchi 121 (Flawil, Suiza) y para la evaporación de disolventes en las técnicas de biología molecular se utilizó un “speed-vacuum” marca Savant modelo SPD121P, acoplado a una bomba de vacío modelo UVS400A (Hucoa-Erlöss, Madrid).

Para favorecer la disolución de determinados compuestos se empleó un sonicador tipo baño Ultrasonic Cleaner 400 W, 30 kHz (Fungilab S.A., Barcelona).

Para realizar los estudios de cultivos celulares se empleó una campana de flujo laminar modelo AV-30/70 (Telstar, Barcelona). Las células se mantuvieron a 37°C en un incubador termostatzado con atmósfera de CO₂ humidificada modelo Hepa Class 100 (Thermo Fisher), y se estudió su morfología y crecimiento mediante un microscopio Leitz Fluovert FS (Leitz). Para almacenar las distintas líneas celulares se conservaron en un contenedor de N₂ líquido (Thermo Fisher). Se utilizaron placas de cultivo y frascos Roux de cuello inclinado de la marca TPP (Biotech S.L., Madrid) para el cultivo de las líneas celulares. La esterilización de las disoluciones se hizo mediante filtro Sterivex de 0,2 µm (Millipore Ibérica). Para llevar a cabo el recuento de las células se utilizaron cámaras Thoma.

Para la realización de reacciones con irradiación por microondas se recurrió a un reactor de microondas Anton Paar Monowave 300.

Para estudiar el avance de algunas reacciones se empleó un cromatógrafo de gases Agilent 7820A GC System con columna Agilent 5MS de 30 m de longitud y 0,25 mm de diámetro; relleno de (5% fenil) metilsilicona. El cromatógrafo se encuentra acoplado a un espectrómetro de masas Agilent Technologies 5977B. La ionización de las muestras se realizó por impacto electrónico (70eV).

En algunos estudios, se recurrió a 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 que está formado por una bomba cuaternaria con desgasificador de vacío (modelo G12354A), un inyector de 20 µl de capacidad (modelo G1328B) así como de un detector ultravioleta/visible (modelo G1314B) de longitud de onda variable y programable y una columna de fase reversa Zorbax C18 de 30 mm x 2,1 mm, 3,5 µm de tamaño de poro termostalizada a 35°C (Agilent Technologies). Para la detección se empleó un Detector de Masas Triple Cuadrupolo (modelo G6410A) que está acoplado a una fuente de ionización a presión atmosférica (API) serie 6000 (modelo G1948B).

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

Para la realización de los análisis por citometría de flujo de la captación o eflujo de compuestos fluorescentes se empleó un citómetro FACScalibur, de la casa BD Biosciences. El programa informático empleado para la adquisición y tratamiento de los datos fue el CellQuestPro, perteneciente a la misma casa comercial.

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

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

3.4. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

3.4.1. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

Para el estudio de resonancia magnética nuclear, tanto de protón como de carbono, es necesaria la preparación previa de las muestras. Tanto para los intermedios de la síntesis, como para los compuestos finales y el transcurso de las reacciones, es necesario evaporar todo solvente, tanto orgánico como acuoso, por destilación a presión reducida. Posteriormente se preparó una disolución de 0,5 mg en 0,5 ml de disolvente deuterado adecuado para realizar RMN ^1H o 30 mg para realizar RMN ^{13}C . Una vez preparada la disolución, esta fue filtrada para asegurarse que no hubiera ningún precipitado y trasvasada a un tubo de RMN. El volumen mínimo de la disolución no debía ser inferior a 0,5 ml, ya que, de lo contrario, el campo magnético no sería homogéneo en toda la muestra y daría como resultado un espectro con demasiado ruido.

Una vez preparada la muestra, se realizó el análisis deseado en el espectrómetro Bruker WP-200-SY (200 MHz para ^1H y 50 MHz para ^{13}C), Varian 200 Mercury VS 2000 (200 MHz para ^1H y 50 MHz para ^{13}C) y/o Bruker Advance DRX (400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C). Los tiempos de medición de cada muestra dependían de varios factores como son el tiempo de relajación, que es intrínseco de cada molécula y el experimento, ya que difiere en tiempos entre análisis de protón y carbono debido a la diferencia entre la abundancia isotópica del $^1\text{H}/^2\text{H}$ y $^{13}\text{C}/^{14}\text{C}$.

Una vez obtenidos los espectros, se procedió a la asignación de cada una de las señales correspondiente a cada protón y/o carbono, de manera que quedaran totalmente identificados los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento. Para el caso de los compuestos cuya velocidad de relajación era muy elevada y también debido a las interacciones intermoleculares, las señales tendían a volverse muy anchas, por lo que se asignaron regiones que suelen abarcar varios protones.

3.4.2. Espectroscopía de Infrarrojo

Para realizar los espectros de infrarrojo (IR) se prepararon las muestras disolviendo una pequeña cantidad en CH_2Cl_2 o en nujol, si no era soluble en el primero. Primeramente, se realizó una primera medida del blanco en el espectrofotómetro marca Nicolet IR100, recogiendo un espectro del aire atmosférico para eliminar la banda producida por el CO_2 y el agua de la atmósfera. Posteriormente, se depositó una fina capa del compuesto sobre los cristales pulidos de NaCl y se dejaron secar. Por último, se registró el espectro de IR de la muestra, restándole el blanco y expresando las bandas obtenidas en cm^{-1} .

3.5. CULTIVOS CELULARES

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

- ❖ Alexander: 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.
- ❖ TFK-1: RPMI-1640 con 1% GlutaMAX™.

Todos los medios empleados, se suplementaron con un 10% de FBS inactivado (56°C durante 30 min) y 1% de una mezcla de antibióticos que contenían penicilina (20 U/ml) y estreptomicina (0,02 mg/ml). En el caso del medio de las Alexander, se suplementaron con la misma mezcla de antibióticos añadiendo un antimicótico (anfotericina B 0,05 µg/ml).

Los cultivos celulares se mantuvieron en incubadores a 37°C, en atmósfera del 5% de CO₂ en aire y humedad relativa del 80%.

Las líneas celulares se conservaban en tanques con N₂ líquido, hasta que eran requeridas para llevar a cabo los experimentos. La descongelación de los criotubos que contienen las células se llevó a cabo en condiciones de esterilidad en baño a 37 °C. Una vez que las células eran descongeladas, se resuspendían en su correspondiente medio de cultivo.

En la realización de los pases de cultivo o siembra de células para los experimentos, se realizaba una tripsinización (0,25% de tripsina y 20 mM de EDTA en PBS) de las células y se recogían en medio de cultivo.

3.5.1. Estudios de viabilidad celular

Para realizar el estudio mediante un análisis del efecto de fármacos antitumorales y las moléculas sintetizadas en las distintas líneas celulares empleadas en esta Tesis Doctoral, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a la densidad adecuada en función de la línea celular: CHO 50.000 cel/ml; Alexander 50.000 cel/ml; TFK 75.000 cel/ml; añadiendo 100 µl a cada pocillo. Tras 24 h, se procedió a la adición de los compuestos, a los que se exponían las células un tiempo variable dependiendo del tipo de experimento, y a las 72 h desde el inicio de la adición de los compuestos se llevó a cabo el test de formazán (apartado 3.5.2.).

3.5.2. 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 celular. Su fundamento se basa en la transformación por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), reduciéndolo a un compuesto denominado formazán. El MTT es una sal de tetrazolio de coloración amarilla, en cambio, el formazán es un compuesto insoluble de color violeta. La cantidad de formazán producido se puede cuantificar espectrofotométricamente y es directamente proporcional al número de células vivas, ya que se relaciona directamente con la funcionalidad mitocondrial de estas células. 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 emplearon pocillos de la placa en los que no se sembraron células, pero a los que se añadieron las distintas concentraciones de los compuestos ensayados (Tabla 3.1) y posteriormente con medio de cultivo suplementado con MTT y solución de lisis de igual forma que el resto de los pocillos.

Tabla 3.1: *Compuestos empleados en el test de formazán con su rango de concentraciones*

Compuesto	Rango de Concentraciones para estudio de viabilidad a 72 horas	Concentraciones para estudio de viabilidad a 2, 4 y 6 horas
BATKI-1C	0-100 μ M	100 μ M
BATKI-1G	0-100 μ M	100 μ M
Erlotinib	0-100 μ M	100 μ M
BATKI-2C	0-100 μ M	50 μ M
BATKI-2G	0-100 μ M	50 μ M
Sorafenib	0-100 μ M	50 μ M

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

Para llevar a cabo el estudio de la expresión génica, las células se sembraron en placas de 6 pocillos en un volumen final de 3 ml/pocillo a una densidad celular adecuada en función de la línea celular. Las células se dejaron el tiempo adecuado en función del experimento, se recogieron y se procesaron para la obtención de RNA total (apartado 3.6.1).

3.6. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE mRNA POR RT-PCR CUANTITATIVA

3.6.1. Extracción del RNA total

Para la extracción de RNA total de los homogenados a partir de líneas celulares, las células se tripsinizaron para ser centrifugadas a 2000 rpm, durante 5 minutos. Posteriormente, se resuspendieron en 2 ml de PBS y se centrifugaron nuevamente, para ser procesadas en 350 µl de buffer de lisis con mercaptoetanol (dilución 1:100). Por último, el extracto celular fue almacenado en un eppendorf de 1,5 ml RNAsa-free a -80 °C.

Una vez realizada la lisis celular, se empleó el kit comercial illustraRNAspin Mini RNA Isolation Kit..

3.6.2. Transcripción inversa (RT)

Para llevar a cabo la síntesis de cDNA empleado como molde en la PCR, se realizó mediante una RT de 2 µg de RNA total, empleando la mezcla de reactivos SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. La reacción se llevó a cabo en un termociclador, empleando *random primers* con la transcriptasa inversa de un virus de la leucemia murina de Moloney recombinante (rMoMuLV) optimizada.

3.6.3. Diseño de *primers* para RT-PCR cuantitativa

Para diseñar los *primers* específicos de cada uno de los genes estudiados en esta Tesis Doctoral, cuyas secuencias se muestran en la Tabla 3.2, se empleó un programa online para el análisis de oligonucleótidos ([http:// eu.idtdna.com/analyzer/Applications/Oligoanalyzer](http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/Oligoanalyzer)) (Integrated DNA Technologies, Coralville, EE.UU.). Su especificidad se comprobó con el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los *primers* se diseñaron, siempre que fue posible, a caballo entre dos exones codificantes utilizando como molde la secuencia del mRNA publicada en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) específica para cada gen.

Tabla 3.2: Primers forward (F) y reverse (R) utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes humanos por RT-PCR cuantitativa.

PROTEÍNA	GEN	PRIMERS	TIPO	AMPLICÓN (pb)	NÚMERO DE ACCESO
ASBT	SLC10A2	GGAATCATGCCCTCACAGGATTCAT	F	656	NM_000452
		GCTGACGCTCAGGTCCATGT	R		
C-Kit	CD117	CGTCCAGACAGGCTCTTCTCAA	F	136	NM_001093772
		GACAAAGCCCGGATCAGTGCATAA	R		
EGFR	EGFR	AGGAGAACTGCCAGAACTGACCA	F	151	NM_005228
		AATTTGCGGCAGACCAGGCA	R		
HPRT1	HPRT1	ATGGACAGGACTGAACGTCTTGCT	F	79	NM_000194
		TGAGCACACAGAGGGCTACAATGT	R		
OATP1B1	SLCO1B1	TGCAATGGATTGAAGATGTTCTTGCA	F	166	NM_006446
		GCAAATTTCCAATTTCAAAGCTTCCGTCA	R		
OATP1B3	SLCO1B3	AGATTGTGTAAAGGAATCTGGGTCACA	F	198	NM_019844
		AGTGCAAAGCCAATGACTGGAC	R		
PDGFRA	CD140A	GCTGTCTTCTCACAGGGCTGA	F	300	NM_006206
		GCTCATTCTTCTGTCTGAGTGTGG	R		
VEGFR2	VEGFR	GCCTCTGTGGTTTGCCTAGT	F	116	NM_002253.2
		TCCCTCTGTCCCCTGCAAGTAAT	R		

3.6.4. RT-PCR cuantitativa

Para llevar a cabo la PCR cuantitativa a tiempo real se empleó el fluorocromo SYBR Green I, un componente de la mezcla de reactivos Power SYBR Green PCR Master Mix o Select SYBR Green PCR Master Mix o la mezcla de reacción Taqman™ Universal PCR Master Mix. Las condiciones establecidas de tiempo y temperatura para la PCR fueron las siguientes: una primera incubación de las muestras durante 2 min a 50°C, seguida de 10 min a 95°C y, por último, 40 ciclos de 15 sg a 95°C y de 1 min a 60°C. La cantidad del RNA problema se corrigió con la del normalizador GAPDH para las líneas celulares Alexander y TFK; mientras que para las células CHO se empleó como normalizador el 18S.

3.6.5. Cuantificación relativa

Para llevar a cabo la cuantificación relativa, se utilizó el método de comparación del ciclo umbral o Ct. Para ello, se calculó $\Delta\Delta Ct$ como ΔCt muestra - ΔCt calibrador/muestra control. La cantidad de gen diana que había en la muestra, normalizada frente al control endógeno y relativa al calibrador/muestra control, viene dada por la expresión: $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.7. ESTUDIOS DE TRANSPORTE *IN VITRO*

3.7.1. Soluciones empleadas

Para realizar estos estudios de captación, se emplearon un medio de captación a pH 7,4: NaCl 96 mM, KCl 5,3 mM, KH_2PO_4 1 mM, $MgSO_4$ 0,8 mM, $CaCl_2$ 1,8 mM, D-glucosa 11 mM, y Hepes 50 mM.

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

3.7.2. Captación de compuestos fluorescentes para evaluar la actividad de los transportadores para derivados de ABs

Para estos experimentos se utilizaron las líneas celulares que expresaban los transportadores de interés, con respecto a las células Mock: CHO Mock, OATP1B3 y NTCP; CHO WT y OATP1B3; Alexander Mock y ASBT. Las diferentes líneas celulares se sembraron en un flask t25 con una densidad variable, en función de la línea celular. Tras 72 horas, las células se encontraban en confluencia, por lo que se procedió a su tripsinación para su resuspensión en medio de captación. Posteriormente se incubaron con las respectivas concentraciones para el estudio de captación: CGamF y **NIRBAD**, durante 15 min a 37°C en presencia o ausencia de inhibidores como el TCA, CA, GCA o **BATKIs**; en una relación de concentraciones 10 veces superiores del inhibidor.

3.8. MODELOS *IN VIVO*

Para el estudio del efecto del tratamiento con **NIRBAD** y la alquinocianina 718 de partida para la síntesis del **NIRBAD**, se llevó a cabo estudios *in vitro* utilizando como modelo ratas que se anestesiaban con pentobarbital sódico, mediante inyección intravenosa, con una dosis de 50 mg/kg.

El compuesto **NIRBAD** y alquinocianina 718 fueron inyectados por vía intravenosa en una dosis de 1000 nmoles en disolución salina, utilizando DMSO como cosolvente (12,5%). Una vez inyectado el **NIRBAD**, se pudo seguir su avance por el organismo mediante el equipo de imagen Fujifilm LAS-4000 (TDI, Madrid) midiendo la radiación IR emitida, y realizando capturas de IR en diferentes tiempos, en función del estudio. Una vez finalizado el estudio, las ratas eran reanimadas y tras 24 horas, se repitió el experimento para estudiar si se encontraban trazas de fluorescencia de los compuestos, y también, para establecer si los animales se encontraban en estado de bienestar, sin parámetros físicos ni de conducta asociados al dolor.

En otro estudio, las ratas anestesiadas, fueron sometidas a una laparotomía ventral media y se procedió a la recogida de bilis, sangre e hígado. Las muestras de bilis se obtuvieron mediante canulación del conducto biliar. Se recogió bilis durante 30 min en viales previamente tarados y el volumen se calculó al considerar la densidad relativa de la bilis aproximadamente igual a 1 g/ml (Klaassen, 1974). Una vez recogida la bilis, se analizó según el procedimiento descrito en el apartado 3.8.1 manteniendo las muestras en total oscuridad para evitar la degradación de los compuestos inyectados. La sangre se recogió por venopunción de la vena de la cola, empleándose para estudiar los parámetros bioquímicos de daño hepático y renal, descritos en el apartado 3.8.2.

3.8.1. Determinación de la fluorescencia de la bilis de las muestras obtenidas

La determinación se llevó a cabo empleando el equipo HITACHI F-4500 Fluorescence Spectrophotometer. Previamente, se realizó una recta patrón del compuesto **NIRBAD** de concentraciones 5; 10; 25; 50; 100; 250 μM empleando como solvente una mezcla de PBS/metanol 85:15. La medida de la fluorescencia se realizó empleando una longitud de onda de excitación de 675 nm y registrando la emisión del **NIRBAD** a 709 nm. Una vez registradas las fluorescencias de las disoluciones patrón, expresadas en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF), se procedió a la medida de la fluorescencia de las muestras de bilis y sangre recogidas a diferentes tiempos.

3.8.2. Determinación de marcadores bioquímicos de daño hepático y renal

La determinación de los marcadores bioquímicos se llevó a cabo empleando el equipo Spotchem EZ, que precisa de una calibración propia utilizando la correspondiente tarjeta de la tira reactiva que se quiere determinar, siendo diferente para el estudio de los marcadores bioquímicos hepáticos y renales. Se realizó la determinación cuantitativa de los marcadores lactato deshidrogenasa (LDH), Transaminasa Glutámico Oxalacético (AST) y pirúvica (ALT), albúmina (Alb), proteína total (T-Pro), bilirrubina total (T-Bil), creatinina, nitrógeno ureico en sangre (BUN) y ácido úrico en muestras de suero o plasma.

3.9. ESTUDIOS DE MECÁNICA MOLECULAR

3.9.1. Construcción de proteínas por homología estructural

Las estructuras 3D de OATP y su dominio extracelular se generaron mediante modelado de homología utilizando el software Prime, versión 2.1 (Schrodinger) (Bell *et al.*). Para ello, se obtuvieron las secuencias de las proteínas OATP1B1 y OATP1B3 de humanos de la base de datos Uniprot (Consortium, 2019), (Bairoch *et al.*, 2005) bajo los códigos de acceso Q9Y6L6 y Q9NPD5, respectivamente.

Las plantillas empleadas para la construcción de la proteína se obtuvieron gracias a la búsqueda en la base de datos de SWISS-MODEL Workspace / GMQE (Waterhouse *et al.*, 2018). Para la realización del BLAST, se empleó como entrada en búsqueda, las secuencias individuales completas de OATP1B1 y OATP1B3, así como la secuencia de la región extracelular entre H9 y H10 (residuos 426–537). De entre todos los posibles resultados, se seleccionaron la estructura cristalográfica del transportador de múltiples fármacos MdfA codificado por PDB-ID: 6euq a una resolución de 2,20 Å (Zomot *et al.*, 2018) y la estructura cristalográfica de la gran región extracelular de los inhibidores de serina proteasa de tipo Kazal codificados por PDB-ID: 2erw (Campos *et al.*, 2012), empleándose como plantillas estructurales en la construcción del modelo por homología estructura. Las secuencias de las plantillas y las proteínas OATP se alinearon usando el programa ClustalX versión 2.1 (Larkin *et al.*, 2007). Los modelos de homología estructural de OATP generados y la minimización de energía como se describe a continuación, se llevaron a cabo como receptores rígidos en simulaciones de *docking* molecular.

Posteriormente, se llevó a cabo el modelado de las estructuras de OATP1B1 y OATP1B3 utilizando el programa Prime (Jacobson *et al.*, 2004) incluido en MAESTRO (Schrödinger Release 2021-2: Maestro, Schrödinger, LLC, Nueva York, NY, 2021) (Sastray *et al.*, 2013).

Obtenidos los modelos, se llevó a cabo una minimización de energía utilizando AMBER 18 (Salomon-Ferrer *et al.*, 2013) en una caja de moléculas de agua tipo TIP3P y contra-iones que amortiguan un tamaño de 8 Å de la proteína.

Para la visualización de los modelos tridimensionales se empleó el programa PyMOL (<http://www.pymol.org>). El potencial de superficie electrostática de los modelos se calculó con APBS versión 27 (Baker *et al.*, 2001) con la configuración de parámetros predeterminada.

3.9.2. Simulaciones de dinámica molecular (MD)

Para el estudio de las interacciones entre el modelo construido por homología estructural de la región extracelular comprendida entre H9 y H10 con AB se investigó mediante simulaciones de MD (Roe and Cheatham, 2013). Las simulaciones de MD se realizaron con Amber18 (Salomon-Ferrer *et al.*, 2013). El campo de fuerza ff14SB41 (Maier *et al.*, 2015) se empleó para parametrizar la proteína, mientras que el Campo de Fuerza General Amber (GAFF) (Wang *et al.*, 2004) se empleó para el AB. Se minimizó la energía del solvente durante 500 procesos empleando SD y 2500 procesos adicionales empleando CG mientras se mantuvo la proteína fija. A continuación, se llevó a cabo un proceso para equilibrar la densidad a presión constante (NPT) durante 1 ns, antes de ejecutar un equilibrio preliminar de 50 ns, seguido de la producción de trayectorias MD independientes durante 500 ns (el intervalo de tiempo fue de 2 fs). Las trayectorias MD fueron procesadas por el software cpptraj (Roe and Cheatham, 2013) y analizadas en términos de la desviación cuadrática media (RMSD) y el análisis de cluster. El reconocimiento intermolecular entre el AB y el dominio extracelular se simuló por MD en un total de seis réplicas, comenzando desde la ubicación inicial ligeramente diferente del fragmento en el solvente que rodea la proteína.

3.9.3. Docking molecular

La solidez de los modelos de homología OATP1B1 y OATP1B3 se probó volviendo a acoplar el ligando cristalográfico de la plantilla estructural, así como acoplado un conjunto de ligandos conocidos para los cuales se conocen sus K_M experimentales, estando disponibles en la literatura. Para llevar a cabo este estudio, se empleó el programa de acoplamiento GOLD (Verdonk *et al.*, 2003). Una vez obtenidas las posiciones acopladas, estas se vuelven a puntuar utilizando diferentes funciones como GoldScore, PLP, ASP, ScorePose y XScore (Jones *et al.*, 1997), (Zhong *et al.*, 2010), (Wang *et al.*,

2003). Las moléculas empleadas en los estudios de *docking* se dibujaron en 2D con picto y posteriormente se convirtieron en formato SMILES obteniendo coordenadas 3D con OMEGA (Openeye) versión 3.1.0.3 (Hawkins *et al.*, 2010). Su estado de protonación se corrigió con QUACKPAC (Openeye) versión 2.0.0.3, (Hawkins *et al.*, 2010) y luego, se minimizó la energía de los compuestos con Szybki (OpenEye) versión 1.10.0.3, (Hawkins *et al.*, 2010) utilizando el campo de fuerza MMFF94S. Las simulaciones de *docking* molecular se llevaron a cabo con GOLD versión 5.6.3 utilizando la función de puntuación ChemScore (Jones *et al.*, 1997) con la máxima precisión en el acoplamiento y manteniendo los mejores resultados para cada compuesto en base al *score* o a la dG.

3.10. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para la expresión de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, se ha calculado la media y la desviación estándar (SD) o el error estándar de la media (EEM).

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

El tratamiento de datos y estudio estadístico se realizó con los programas Excel y GraphPad Prism™.

3.11. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Método general (A) para la obtención de cloroetilderivados a partir de ABs:

A una mezcla del AB (50 mmol), DCC (50 mmol) y DMAP (50 mmol) disueltos en CHCl_3 (3 ml), se añade 2-cloroetanol (1500 mmol). La mezcla se deja reaccionar a temperatura ambiente y con agitación durante 48 horas siguiendo su avance por TLC. Una vez la reacción ha terminado, se extrae con CHCl_3 (x3), lavando la reunión de las fases orgánicas con HCl 1M (x3), y seguidamente, con una disolución acuosa saturada de NaCl (x3). La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 anhidro y se elimina el disolvente por destilación a presión reducida. El bruto de la reacción se somete a cromatografía de columna sobre gel de sílice con una mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ como eluyente, aislándose el compuesto deseado.

Método general (B) para la obtención de azidas a partir de cloroetilderivados de ABs:

A una mezcla del cloroderivado del AB (10 mmol), junto con azida sódica (12 mmol) se disuelven en DMF (3ml). La mezcla se deja reaccionar a 100°C y con agitación durante 48 horas bajo atmósfera de argón, siguiendo su avance por RMN ^1H . Una vez la reacción ha terminado, se evapora el disolvente a presión reducida eliminando toda la DMF posible, y a continuación, se añade acetato de etilo. Seguidamente se lava en primer lugar con una disolución acuosa saturada de NaCl (x3). Después se lava con una disolución acuosa de NaHCO_3 (x3), se seca sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtra y posteriormente se elimina el disolvente a presión reducida. El bruto de reacción se somete a cromatografía de columna sobre gel de sílice con una mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ como eluyente, aislándose el compuesto deseado.

Método general (C) para la obtención de triazoles a partir de azidas derivadas de ABs:

A una mezcla de azida derivada de AB (12 mmol), ascorbato de sodio (10 mmol), sulfato de cobre pentahidratado (1 mmol) y alquino (10 mmol) se disuelve en 5 ml de una mezcla de agua destilada y *tert*-butanol en proporción 1:1. La mezcla se deja reaccionar a temperatura ambiente, con agitación, bajo atmósfera de argón. Al cabo de 48 horas, se adiciona hielo a la mezcla de reacción, se agita unos minutos y a continuación se extrae con AcOEt (x3). La reunión de las fases orgánicas se lava sucesivamente con una disolución acuosa de HCl 1 M (x3) y una disolución acuosa saturada de NaCl (x3). La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtra y el disolvente se elimina por destilación a presión reducida. El bruto de reacción se somete a cromatografía de columna sobre gel de sílice con una mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ como eluyente, aislándose el compuesto triazólico deseado.

**4.CAPITULO 1: SINTESIS DE AGENTES
CITOSTÁTICOS VECTORIZADOS
PARA EL TRATAMIENTO
DEL CÁNCER HEPÁTICO**

4.1. INTRODUCCIÓN

Como ya se mencionó en el capítulo de la Introducción General, existe una gran variedad de compuestos derivados de ABs con marcado tropismo hacia los tejidos del circuito enterohepático. Esta propiedad se debe a la presencia de transportadores específicos localizados en la membrana plasmática de las células epiteliales presentes en estos órganos, como son las proteínas implicadas en la captación de aniones (NTCP, ASBT y OATPs) y cationes (OCTs) orgánicos y los sistemas de exportación pasiva (OST α/β) o activa (BSEP, MRP2, MRP3 y MRP4) de estos compuestos (Jetter and Kullak-Ublick, 2020).

Los ABs modificados, además, tienen importancia farmacéutica para el diseño de nuevos fármacos, con potencial utilidad para regular los niveles del colesterol plasmático, para la disolución de cálculos biliares y en el tratamiento del cáncer (Sarenac and Mikov, 2019).

La química *click*, gracias a la gran versatilidad entre azidas y acetilenos terminales, ha sido un recurso muy útil para el diseño de nuevas moléculas con potencial actividad farmacológica. Sin embargo, hasta la fecha no se ha utilizado esta estrategia para la síntesis de derivados de ABs unidos a TKIs con el objetivo de generar nuevas moléculas con mejores propiedades frente al cáncer hepático.

4.1.1. Erlotinib

El erlotinib, comercializado como Tarceva®, es un fármaco empleado para el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y el cáncer de páncreas, que en la actualidad está siendo investigado para el tratamiento del HCC (Zhang *et al.*, 2016), (Tella *et al.*, 2021). Su diana es el EGFR o HER, un TKR expresado de forma ubicua en el organismo, cuyos niveles de expresión están elevados en las células cancerosas y que ha sido reconocido como un mediador clave de la tumorigénesis de muchos cánceres epiteliales humanos (Abdelgalil *et al.*, 2020), (Landi and Cappuzzo, 2015).

Una vez que su ligando se une al EGFR, éste dimeriza formando un homodímero al que, posteriormente, se une una molécula de ATP produciéndose la fosforilación de dos residuos de tirosina. Este proceso desencadena una cascada de señales intracelulares que activan diferentes procesos como la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular (Hidalgo and Bloedow, 2003). Cuando el erlotinib se une al EGFR, lo hace en el bolsillo de

unión e hidrólisis del ATP, por lo que impide dicho proceso, inhibiendo las cascadas de señalización, desencadenando un proceso de muerte celular por apoptosis.

Sin embargo, a pesar de los buenos resultados obtenidos con el uso del erlotinib en determinados tipos de tumores, en el caso del HCC hay que tener en cuenta que, por una parte, su utilización para el tratamiento de dicha patología no ha demostrado aún que pueda proporcionar mejores resultados a los obtenidos con las terapias de primera línea y por otra parte, la administración de este TKI también genera una serie de efectos secundarios, entre los cuales destacan: erupción cutánea, dolor articular, dolor muscular, diarrea y tos. (Roe *et al.*, 2006) (de Noronha e Menezes *et al.*, 2009). Además, también se han registrado efectos secundarios graves como son la aparición de problemas pulmonares, insuficiencia renal o hepática, accidente cerebrovascular y ulceración corneal (Methvin and Gausas, 2007). Todos estos efectos secundarios son debidos a la acción del erlotinib en la inhibición de EGFR en todo el organismo debido a su diseminación por del torrente sanguíneo. Por esta razón, si se logra una vectorización del compuesto, dirigiéndolo a la zona tumoral, como es el hígado en el caso del HCC, se podrían resolver en parte estos efectos adversos, mejorando el nivel de vida del paciente durante el tratamiento.

En cuanto a la estructura química del erlotinib, es una quinazolinamina cuyo nombre químico es *N*-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi) quinazolin-4-amina. En su estructura se encuentran 7 aceptores y un dador de enlaces de hidrógeno (Figura 4.1), que como se comentará posteriormente son claves en la interacción del fármaco con el sitio de unión del ATP en el EGFR.

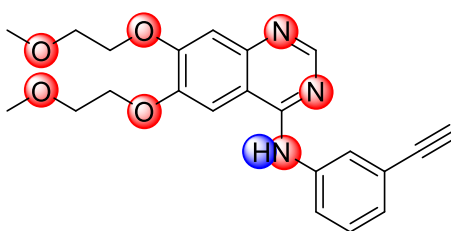


Figura 4.1: Estructura del erlotinib destacando en rojo los aceptores de enlaces de hidrógeno y en azul el dador de enlaces de hidrógeno.

Además, su pK_a se sitúa en torno a 5,42 por lo que a pH fisiológico se encuentra en su forma no protonada. Se suele administrar en forma de sal, concretamente como clorhidrato, ya que de esta manera se facilita su solubilidad y ello mejora a su vez su absorción.

4.1.2. Sorafenib

El sorafenib, también conocido como BAY43-9006 y comercializado como Nexavar®, es un fármaco antineoplásico aprobado por la FDA (Estados Unidos) y la EMA (Unión Europea) para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer como el HCC (tratamiento de primera línea) (Llovet *et al.*, 2008b) (Llovet *et al.*, 2018) carcinoma renal avanzado y el tratamiento del carcinoma de tiroides avanzado refractario al tratamiento con yodo radioactivo. Este compuesto también se administra en forma de sal, como tosilato en este caso, generando una carga positiva en el anillo de piridina (Figura 4.2) (Sampat and O'Neil, 2013).

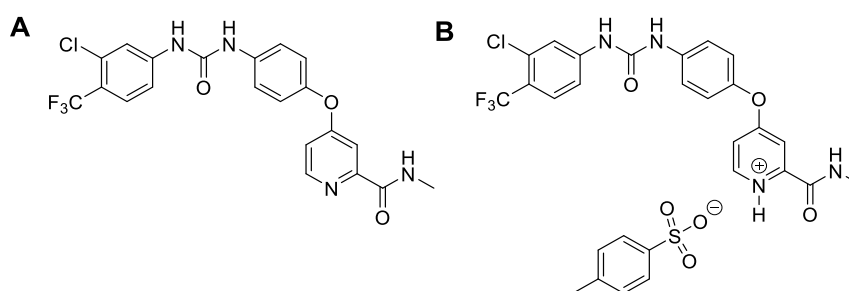


Figura 4.2: Estructura del sorafenib (A) y de tosilato de sorafenib (B) con la piridina protonada.

El sorafenib, administrado por vía oral, es un inhibidor de varios TKR, considerándose como un fármaco con alta eficacia antineoplásica debido precisamente a esa actividad inhibidora multiquinasas y es, como ya se ha comentado con anterioridad, actualmente el fármaco de elección para el tratamiento farmacológico del HCC avanzado (Llovet *et al.*, 2008b). Sus dianas moleculares son proteínas de la ruta RAS/RAF/MEK/ERK como C-RAF, la forma silvestre de B-RAF y la B-RAF mutada V600E, MEK y ERK (Peck-Radosavljevic, 2014), (Zhang *et al.*, 2015). Por otro lado, es capaz de desencadenar mecanismos apoptóticos debido al bloqueo de la proteína Mcl-1 (Liu *et al.*, 2006). También es capaz de interactuar con VEGFR, PDGFR, c-KIT, FLT-3 y el receptor RET, provocando una inhibición de la angiogénesis (Wilhelm *et al.*, 2004), (Llovet *et al.*, 2008b). Pese a que el sorafenib ha demostrado su capacidad para prolongar la supervivencia de los pacientes, y que algunos casos clínicos han mostrado una remisión completa de la enfermedad a largo plazo (Park *et al.*, 2017), los resultados son en general, discretos siendo la media de supervivencia de 2-3 meses más de vida en comparación con los pacientes sin tratamiento (Llovet *et al.*, 2008b).

A pesar de los beneficios terapéuticos que se obtienen en el tratamiento de HCC con el sorafenib, los datos disponibles respecto a la utilidad de este TKI en otro tipo de cáncer hepático como el CCA, son controvertidos. El sorafenib inhibe la ruta de las MAPK en líneas celulares de CCA humano, lo cual induce la parada del ciclo celular y su acción antitumoral (Huether *et al.*, 2007). Aunque el sorafenib es, generalmente, bien tolerado por los pacientes con CCA (Pan *et al.*, 2017), el efecto sobre su supervivencia está aún por definir de forma concluyente. Por tanto, en general, el tratamiento con sorafenib en pacientes con tumores hepáticos tiene efectos beneficiosos moderados y transitorios. Sin embargo, su eficacia frecuentemente se reduce debido a diferentes MPRs, así como por presentar algunos efectos tóxicos, como son afecciones dérmicas causantes del “síndrome mano-pie”, hipertensión, fatiga, proteinuria o diarrea y, más raramente, efectos cardiovasculares adversos muy graves (Li *et al.*, 2015).

El sorafenib, cuyo nombre químico es 4-[4-({[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]carbamoil}amino)fenoxi]-*N*-metilpiridin-2-carboxamida, posee un conjunto de grupos funcionales que le confieren la posibilidad de formar enlaces de hidrógeno y acomodarse así al bolsillo hidrofóbico de los TKR que inhibe (Wan *et al.*, 2004). El cálculo de los diferentes valores de pK_a de los grupos funcionales presentes en la molécula revela que la especie más abundante a pH fisiológico es la forma no ionizada, por lo que el conjunto de dadores de enlaces de hidrógeno se establece en tres y el número de aceptores de enlaces de hidrógeno en cuatro (Figura 4.3).

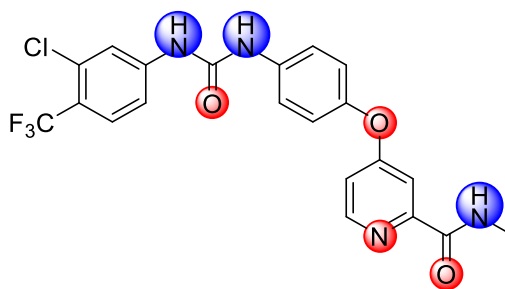


Figura 4.3: Estructura del sorafenib en la que se señalan los dadores enlaces de hidrógeno (azul) y los aceptores de enlaces de hidrógeno (rojo).

Los TKIs como el erlotinib y el sorafenib previenen la fosforilación de diversos TKRs compitiendo con el ATP por la unión al dominio catalítico de los mismos. Dado que el dominio catalítico de estos receptores se encuentra altamente conservado, varios TKIs pueden desarrollar su efecto inhibitorio sobre un gran espectro de quinasas afectando de este modo múltiples vías de señalización (Arora and Scholar, 2005). En la Figura 4.4 se pueden observar las diferentes interacciones del sorafenib en una proteína BRAF. El TKI se une en el sitio de unión del ATP de forma competitiva, inhibiendo con ello la fosforilación y la actividad de la enzima (Foster *et al.*, 2016).

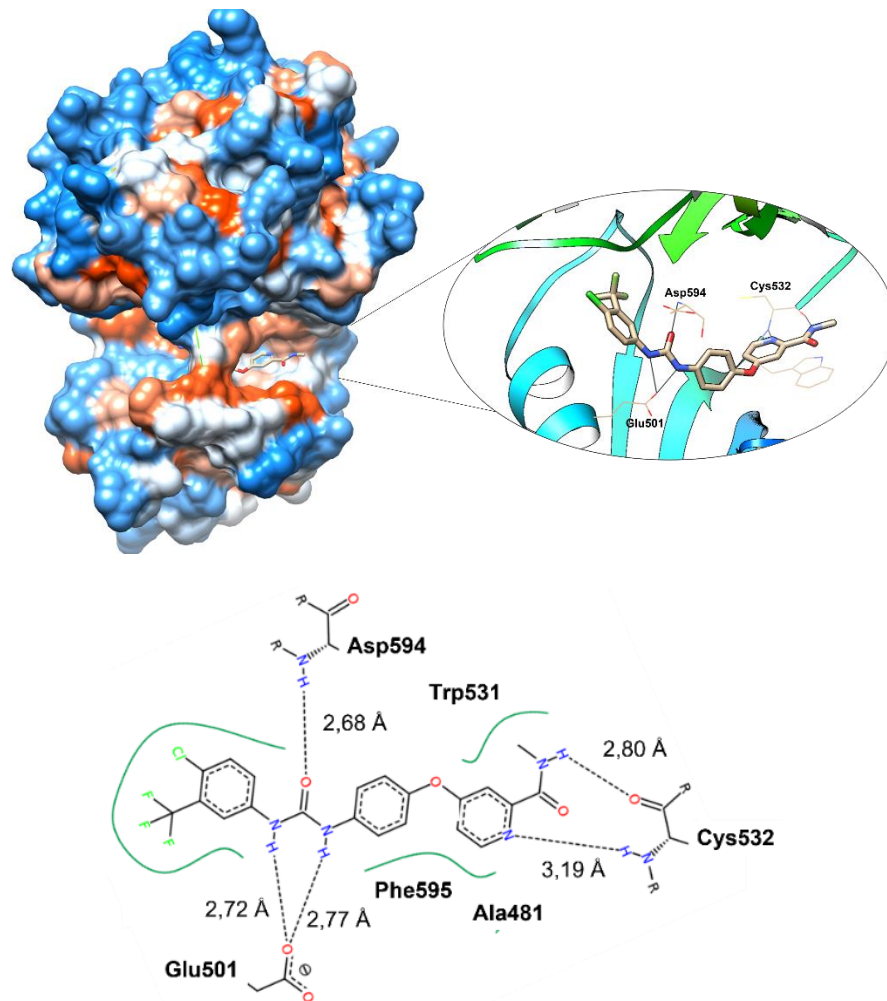


Figura 4.4: Conjunto de interacciones entre el sorafenib y el sitio de unión en BRAF. El sorafenib establece enlaces de hidrógeno con los residuos Asp⁵⁹⁴, Glu⁵⁰¹ y Cys⁵³², además de interacciones de tipo hidrofóbico con los residuos Trp⁵³¹, Ala⁴⁸¹, Leu⁵¹⁴, Phe⁵⁹⁵ y Asp⁵⁹⁴. Imagen generada con el programa Chimera, analizando los archivos obtenidos de la base de datos Protein Data Bank (PDB: 5hi2).

4.2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta estos antecedentes nos planteamos como **objetivo** de este capítulo investigar la vectorización de fármacos con actividad inhibitora de TKRs su unión a ABs, a través de la cadena lateral de éstos, dejando intacto el esqueleto esteroideo (Figura 4.5). Estos nuevos compuestos denominados **BATKI** (de *bile acid* and *tyrosine kinase inhibitor*) podrían ser reconocidos por transportadores de membrana específicos de las células hepáticas, constituyendo así una posible estrategia de superación de la quimiorresistencia en el cáncer de hígado. Todos los compuestos sintetizados mediante esta estrategia han sido evaluados en esta Tesis en ensayos de fase preclínica *in vitro*.

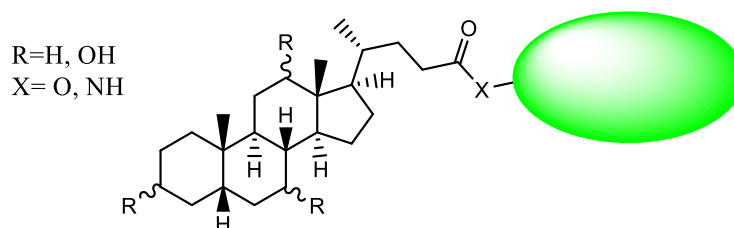


Figura 4.5: Esqueleto de ácido biliar funcionalizado en la cadena lateral mediante un compuesto farmacológicamente activo (óvalo verde) denominado de manera general **BATKI** de (*Bile acid* y *tyrosine kinase inhibitor*).

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

Objetivo 1: Desarrollo de estrategias químicas para la conjugación de AB con TKIs por combinación de un TKI con un análogo de AB empleando un espaciador adecuado. Para ello se hará uso de las reacciones de cicloadición 1,3-dipolares, empleando Cu (I) como catalizador, con la intención de obtener el regioisómero 1,4-disustituido. La obtención de este regioisómero tiene como objetivo el no presentar impedimentos estéreos a la hora de interaccionar el esqueleto de los ABs con sus transportadores específicos en la membrana de los hepatocitos.

Objetivo 2: Obtención mediante síntesis química de una nueva batería de compuestos denominados **BATKIs**, mediante la conjugación de CA o GCA con los TKIs erlotinib y sorafenib. Los compuestos serán caracterizados por técnicas espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de 1H y ^{13}C , técnicas de infrarrojo (IR) y HRMS, con el objetivo de establecer sus estructuras.

Objetivo 3: Evaluación *in vitro* de las características de vectorialidad y del efecto antiproliferativo y tóxico que presentan los compuestos de la familia **BATKI** sobre diferentes líneas celulares procedentes de tumores hepáticos. Se determinará la captación y la capacidad citostática de dichos compuestos vectorizados respecto los TKIs de origen.

4.4. CONCLUSIONES

Conclusión primera:

Se ha sintetizado, purificado y caracterizado químicamente una nueva familia de derivados de ácidos biliares (AB) unidos a moléculas farmacológicamente activas que se utilizan actualmente en el tratamiento del cáncer de hígado (sorafenib y erlotinib) debido a que su actividad como inhibidores de receptores con actividad tirosina quinasa (TKI). Esta nueva familia denominada BATKI se ha diseñado a partir de una estrategia de conjugación entre las moléculas de interés que conlleva la formación de triazoles como fragmento de conexión entre ellas, gracias a cicloadiciones 1,3-dipolares de Huisgen conocidas también como química *click*. Se han obtenido los compuestos **BATKI-1**, derivados del erlotinib unido al ácido cólico (CA), **BATKI-1C**, o al glicocólico (GCA), **BATKI-1G**; y los **BATKI-2**, derivados del sorafenib unido al CA, **BATKI-2C**, o al GCA, **BATKI-2G**, con buenos rendimientos, grado de pureza y caracterización por las técnicas espectroscópicas habituales.

Conclusión segunda:

Los **BATKIs** han demostrado actividad antiproliferativa de forma dosis-dependiente en modelos vectorizados con transportadores enterohepáticos y de hepatocarcinoma (HCC) y colangiocarcinoma humano (CCA), reduciendo la viabilidad celular con una potencia similar al fármaco del que derivan. En experimentos de 72 horas, su posible capacidad de vectorización se vio enmascarada por otros procesos de captación inespecífica. Sin embargo, en ensayos de citotoxicidad en periodos de exposición de 6 horas los **BATKIs** mostraron una actividad antitumoral superior en las líneas de HCC que sobreexpresaban transportadores de ABs, lo que revela su capacidad de vectorización.

Conclusión tercera:

Los estudios de captación realizados utilizando la citometría de flujo para identificar los posibles transportadores de ABs que podrían ser la vía de entrada de los compuestos sintetizados, mostraron que moléculas derivadas de ABs funcionalizadas con un fluoróforo en la cadena lateral y, por tanto, con una estructura similar a los **BATKIs** como es la colilglicilamidofluoresceína (CgamF), pueden ser sustratos de OATP1B3. Esta captación es inhibida por sustratos naturales de este polipéptido, como es el ácido taurocólico y con mayor eficacia por los **BATKIs**, lo que sugiere que las nuevas moléculas sintetizadas podrían ser sustrato de este transportador.

Conclusión cuarta:

Los resultados obtenidos en estudios de *docking* fueron concordantes con los obtenidos en ensayos biológicos, ya que las energías de unión en el complejo enzima-sustrato entre diferentes TKRs y los compuestos **BATKI** o su subproducto de hidrólisis son muy similares a las encontradas por cristalografía de RX del TKI del que derivan. Estas observaciones justificarían que los **BATKIs** mantengan su actividad citostática y que ésta no se hubiese visto alterada al realizar las modificaciones químicas necesarias para su vectorización.

**5.CAPITULO 2: SINTESIS DE SONDAS
PARA LA EVALUACIÓN NO
INVASIVA DE LA
FUNCIONALIDAD HEPÁTICA
A TIEMPO REAL**

5.1. INTRODUCCIÓN

Existe un número limitado de moléculas que puedan ser utilizadas como marcadores para el estudio de la funcionalidad hepática. Entre ellas se encuentran algunos derivados de ácidos biliares marcados radiactivamente con [^{14}C] y [^3H] y el ácido [^8F]-fluorocólico, o con fluorocromos como el FICT, el CGamF (utilizado como herramienta en los experimentos del bloque anterior) y sus derivados, el colato de nitrobenzoxadiazolilisina y sus derivados, y colato de dansilo y sus derivados, entre otros (Holzinger *et al.*, 1997), (Blazquez *et al.*, 2012) ; (De Lombaerde *et al.*, 2017).

Sin embargo, su utilidad se encuentra limitada a modelos *in vivo* en laboratorio. Además, en el caso de los marcadores fluorescentes, la franja del espectro en el que se encuentra su longitud de onda de emisión los hace incompatibles para su uso simultáneo en ensayos multiparamétricos, por su solapamiento con los espectros de emisión de otros trazadores de uso común en inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Este hecho dificulta su utilidad en estudios de colocalización con otros marcadores empleados habitualmente en investigación básica y preclínica.

Por otro lado, para el diagnóstico de enfermedades hepatobiliares (lesiones focalizadas, tumoraciones, colestasis, etc...) se utiliza la resonancia magnética con gadoxetato y colescintigrafía con derivados del ácido iminodiacético y tecnecio, son radiofármacos que carecen de una estructura que les confiera vectorización enterohepática y, por tanto, especificidad de tejido (Van Beers *et al.*, 2015).

Pese a la existencia de sondas que mantienen la estructura esteroidea y de otros agentes de contraste que carecen de ella, el avance en los sistemas de captación de imagen en experimentación en biomedicina, así como el desarrollo de nuevas técnicas inocuas/no-invasivas de diagnóstico por imagen en el paciente como las basadas en la fluorescencia en el IR cercano (NIR), hacen necesario ampliar el panel de moléculas marcadoras para dar versatilidad a estas herramientas en estudios multiparamétricos como la colocalización subcelular en microscopía de fluorescencia y confocal, la citometría de flujo, los ensayos de inmunofluorescencia *in vivo* y el diagnóstico de alta resolución.

Por otra parte, las imágenes de fluorescencia del NIR ofrecen interesantes posibilidades para el registro en tiempo real de procesos biológicos y para la visualización de regiones de tejido específicas dentro de organismos completos. Desde que en la década de los 70 se comenzara a emplear el verde de indocianina para la realización de angiografías, se ha avanzado considerablemente en la técnica de imagen con NIR para su uso en pruebas de mapeo e integridad de los vasos sanguíneos o la identificación

intraoperativa de nódulos malignos en cirugías oncológicas, entre otras. El interés que despierta la fluorescencia del NIR (700-900 nm) es debido, además de a lo inocuo de la misma, a la permeabilidad de los tejidos a esta radiación, ya que puede detectarse desde el exterior corporal, sin realizar ninguna intervención quirúrgica, con mínimas molestias y riesgo para el individuo y con muy escaso ruido de fondo, ya que reduce la emisión de cromóforos endógenos que pueden ser considerados competidores y que podrían reducir su detección.

Todas estas aplicaciones, son debidas a que la luz IR es capaz de penetrar en los tejidos debido a que la dispersión en el tejido vivo es mucho mayor que la absorción (Mondal *et al.*, 2014), (MANIEWSKI R. , 2004). Ello otorga a los estudios basados en espectroscopía del NIR una capacidad diagnóstica al proporcionar información en tiempo real sobre los diversos procesos fisiológicos y patológicos que ocurren en tejidos y órganos.

El espectro NIR es el resultado de sobretonos y bandas generadas por los diferentes grupos funcionales como son C-H, N-H y O-H, pudiéndose aplicar la tecnología de estudios de NIR a un amplio abanico en diversos campos como una importante herramienta analítica para distintos productos de las industrias de alimentos, Química, Bioquímica, Ambiental, Farmacéutica y Médica (Roggo *et al.*, 2007)

Técnicamente hablando, la espectroscopía del NIR involucra un haz de luz que, al interactuar con un material biológico, hace que las uniones específicas entre los átomos vibran a cierta frecuencia, absorbiendo NIR de una longitud de onda específica en función de los grupos funcionales, mientras todas las demás longitudes son reflejadas. Posteriormente, se miden las diferentes longitudes de onda emitidas para analizar los datos obtenidos por un microprocesador. La profundidad de penetración del haz dentro de la muestra no está determinada por la posición del detector sino más bien por la potencia de la fuente de luz, razón por la cual la espectroscopía del NIR es una tecnología ideal para análisis rápidos y precisos. Debido a que la radiación NIR emitida depende de los diferentes grupos químicos funcionales presentes en la muestra, esta técnica proporciona un amplio espectro de información sobre la composición química de la muestra que se analiza.

Por otro lado, la tecnología de NIR se basa en la absorción de cromóforos específicos a través de longitudes de onda. De esta forma, un haz de luz determinado generado con una intensidad constante puede seleccionar longitudes de onda que pasan a través del tejido y que a su vez son detectados para poder detectar un cromóforo determinado.

Por ello, resultaría ventajoso para la práctica clínica la disponibilidad de un agente de contraste en esta franja de radiación para su uso combinado con otras técnicas de imagen utilizadas en la actualidad en el diagnóstico de patologías del circuito enterohepático.

5.2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo anterior, nos planteamos como **objetivo global** de este capítulo la síntesis de un compuesto vectorizado mediante un AB, que sea capaz de emitir fluorescencia en el rango de NIR. El nuevo compuesto denominado **NIRBAD** (Near InfraRed Bile Acid Derivative) será evaluado en ensayos preclínicos *in vitro* e *in vivo* para determinar sus propiedades de sonda vectorizada permeable a los tejidos. Para llevar a cabo este objetivo global se plantean los siguientes objetivos parciales:

Objetivo 1: Aplicar las estrategias desarrolladas en el capítulo 1 para la conjugación de esteroides con una molécula fluorescente de emisión en el espectro NIR, por combinación de la azida derivada del CA mediante el uso de la química *click*. El compuesto **NIRBAD** será caracterizado por técnicas espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C y HRMS, con el objetivo de establecer la estructura del compuesto.

Objetivo 2: Estudiar *in vitro* e *in vivo* las características de vectorialidad del compuesto **NIRBAD** mediante ensayos utilizando técnicas de citometría de flujo en diferentes líneas celulares de origen enterohepático que sobreexpresan los transportadores específicos de ABs y en el modelo de rata Wistar tras la administración intravenosa del compuesto y su posterior visualización en un equipo de captura de imagen de alta resolución a longitudes de onda de emisión del NIR.

Objetivo 3: Analizar las interacciones entre el compuesto **NIRBAD** y los principales transportadores implicados en su captación mediante estudios de dinámica molecular en las proteínas transportadoras de las cuales sea sustrato el **NIRBAD**.

5.4. CONCLUSIONES

Conclusión primera:

Se ha obtenido un compuesto derivado de CA conjugado con una molécula que posee un cromóforo en su estructura, otorgándole propiedades de emisión de fluorescencia en la región del IR.

Para ello se ha adaptado la estrategia establecida en el capítulo anterior para obtener un nuevo triazol derivado de un AB con un rendimiento aceptable, gracias a cicloadiciones 1,3-dipolares de Huisgen. Aplicando esta estrategia, se ha logrado obtener un compuesto denominado **NIRBAD**.

Conclusión segunda

Se ha puesto de manifiesto que el **NIRBAD** posee un marcado tropismo hacia el sistema enterohepático, demostrando que se puede utilizar para estudiar la funcionalidad hepática de animales de laboratorio sin necesidad de realizar intervenciones invasivas. Además, el **NIRBAD** ha demostrado no ser tóxico, ya que no se reduce el flujo biliar ni induce cambios significativos en los biomarcadores de nefrotoxicidad ni hepatotoxicidad.

Conclusión tercera

Los estudios de captación realizados utilizando citometría de flujo para identificar los posibles transportadores de ABs que podrían ser la vía de entrada hacia el interior celular del **NIRBAD**, mostraron, que es sustrato del transportador OATP1B3 y que la captación de **NIRBAD** a través de OATP1B3 es inhibida por los sustratos naturales de esta proteína.

Conclusión cuarta

Los resultados obtenidos mediante la reconstrucción de los transportadores OATP1B1 y OATP1B3 por homología estructural, y, realizando estudios de *docking* con el **NIRBAD** han mostrado un posible mecanismo de interacción entre el compuesto y la proteína. El análisis mediante dinámica molecular de la parte extracelular comprendida entre las regiones H9 y H10 del transportador OATP1B1 han permitido proponer que la primera interacción entre un AB natural y dicha proteína se realiza mediante el esqueleto esteroideo, no interfiriendo en dicho proceso la cadena lateral, por lo que los derivados de ABs obtenidos mediante modificación en la cadena lateral, podrán seguir siendo sustratos de los transportadores de la familia de OATP1, como hemos demostrado para los compuestos **BATKIs** y **NIRBAD**.

6.BIBLIOGRAFÍA

- ABDEL-MISIH, S. R. & BLOOMSTON, M. 2010. Liver anatomy. *Surg Clin North Am*, 90, 643-53.
- ABDELGALIL, A. A., AL-KAHTANI, H. M. & AL-JENOABI, F. I. 2020. Erlotinib. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*, 45, 93-117.
- AGARWAL, D. S., SIVA KRISHNA, V., SRIRAM, D., YOGEE SWARI, P. & SAKHUJA, R. 2018. Clickable conjugates of bile acids and nucleosides: Synthesis, characterization, in vitro anticancer and antituberculosis studies. *Steroids*, 139, 35-44.
- AGOSTINO DI CIAULA, G. G., RAQUEL LUNARDI BACCETTO, EMILIO MOLINA-MOLINA, LEONILDE BONFRATE, DAVID Q.-H.WANG, PIERO PORTINCASA 2017. Bile Acid Physiology. *Annals of Hepatology*, 16, S14-S14.
- AHER, N. P., VANDANA. 2005. Synthesis of Bile Acid Dimers Linked with 1,2,3-Triazole Ring at C-3, C-11, and C-24 Positions. *Synlett*, 14, 2155-2158.
- 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. *Br J Pharmacol*, 176, 787-800.
- ALAM, K., CROWE, A., WANG, X., ZHANG, P., DING, K., LI, L. & YUE, W. 2018. Regulation of Organic Anion Transporting Polypeptides (OATP) 1B1- and OATP1B3-Mediated Transport: An Updated Review in the Context of OATP-Mediated Drug-Drug Interactions. *Int J Mol Sci*, 19.
- ALEXANDER, J. R., OTT, A. A., LIU, E. C. & TOPCZEWSKI, J. J. 2019. Kinetic Resolution of Cyclic Secondary Azides, Using an Enantioselective Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Org Lett*, 21, 4355-4358.
- ALONSO-PEÑA, M., SANCHEZ-MARTIN, A., SANCHON-SANCHEZ, P., SOTO-MUÑIZ, M., ESPINOSA-ESCUADERO, R. & MARIN, J. J. G. 2019. Pharmacogenetics of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Cancer Drug Resistance*, 2, 680-709.
- ANANDKUMAR, D. & RAJAKUMAR, P. 2017. Synthesis and anticancer activity of bile acid dendrimers with triazole as bridging unit through click chemistry. *Steroids*, 125, 37-46.
- ANDRE, T., REYES-VIDAL, J. M., FARTOUX, L., ROSS, P., LESLIE, M., ROSMORDUC, O., CLEMENS, M. R., LOUVET, C., PEREZ, N., MEHMUD, F. & SCHEITHAUER, W. 2008. Gemcitabine and oxaliplatin in advanced biliary tract carcinoma: a phase II study. *Br J Cancer*, 99, 862-7.
- ANELLI, P. L., LATTUADA, L., LORUSSO, V., LUX, G., MORISETTI, A., MOROSINI, P., SERLETI, M. & UGGERI, F. 2004. Conjugates of gadolinium complexes to bile acids as hepatocyte-directed contrast agents for magnetic resonance imaging. *J Med Chem*, 47, 3629-41.
- ARORA, A. & SCHOLAR, E. M. 2005. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther*, 315, 971-9.
- ARUNACHALAM KANNAN, E. D. C., CHRISTOPHE PANNECOUQUE, MYRIAM WITVROUW, TRACY L HARTMAN, JIM A TURPIN, ROBERT W BUCKHEIT, MARK CUSHMAN 2001. Synthesis and anti-HIV activity of a bile acid analog of cosalane. *Tetrahedron*, 57, 9385-9391.
- BAIROCH, A., APWEILER, R., WU, C. H., BARKER, W. C., BOECKMANN, B., FERRO, S., GASTEIGER, E., HUANG, H., LOPEZ, R., MAGRANE, M., MARTIN, M. J., NATALE, D. A., O'DONOVAN, C., REDASCHI, N. & YE H, L. S. 2005. The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res*, 33, D154-9.
- BAKER, N. A., SEPT, D., JOSEPH, S., HOLST, M. J. & MCCAMMON, J. A. 2001. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 10037-41.

- BALLATORI, N., CHRISTIAN, W. V., LEE, J. Y., DAWSON, P. A., SOROKA, C. J., BOYER, J. L., MADEJCZYK, M. S. & LI, N. 2005. OSTalpha-OSTbeta: a major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia. *Hepatology*, 42, 1270-9.
- BANALES, J. M., CARDINALE, V., CARPINO, G., MARZIONI, M., ANDERSEN, J. B., INVERNIZZI, P., LIND, G. E., FOLSERAAS, T., FORBES, S. J., FOUASSIER, L., GEIER, A., CALVISI, D. F., MERTENS, J. C., TRAUNER, M., BENEDETTI, A., MARONI, L., VAQUERO, J., MACIAS, R. I., RAGGI, C., PERUGORRIA, M. J., GAUDIO, E., BOBERG, K. M., MARIN, J. J. & ALVARO, D. 2016. Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 13, 261-80.
- BELL, J. A., CAO, Y., GUNN, J. R., DAY, T., GALLICCHIO, E., ZHOU, Z., LEVY, R. & FARID, R. PrimeX and the Schrödinger computational chemistry suite of programs. *International Tables for Crystallography*.
- BEN EL AYOUCHE, H., BAHSIS, L., ANANE, H., DOMINGO, L. R. & STIRIBA, S.-E. 2018. Understanding the mechanism and regioselectivity of the copper(i) catalyzed [3 + 2] cycloaddition reaction between azide and alkyne: a systematic DFT study. *RSC Advances*, 8, 7670-7678.
- BERETTA, G. L., CASSINELLI, G., PENNATI, M., ZUCO, V. & GATTI, L. 2017. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: The dual role of tyrosine kinase inhibitors as multitargeting agents. *Eur J Med Chem*, 142, 271-289.
- BHAT, L., JANDELEIT, B., DIAS, T. M., MOORS, T. L. & GALLOP, M. A. 2005. Synthesis and biological evaluation of novel steroidal pyrazoles as substrates for bile acid transporters. *Bioorg Med Chem Lett*, 15, 85-7.
- BIJSMANS, I. T., BOUWMEESTER, R. A., GEYER, J., FABER, K. N. & VAN DE GRAAF, S. F. 2012. Homo- and hetero-dimeric architecture of the human liver Na(+)-dependent taurocholate co-transporting protein. *Biochem J*, 441, 1007-15.
- BLAZQUEZ, A. G., BRIZ, O., ROMERO, M. R., ROSALES, R., MONTE, M. J., VAQUERO, J., MACIAS, R. I., CASSIO, D. & MARIN, J. J. 2012. Characterization of the role of ABCG2 as a bile acid transporter in liver and placenta. *Mol Pharmacol*, 81, 273-83.
- BOEHM, L. M., JAYAKRISHNAN, T. T., MIURA, J. T., ZACHARIAS, A. J., JOHNSTON, F. M., TURAGA, K. K. & GAMBLIN, T. C. 2015. Comparative effectiveness of hepatic artery based therapies for unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Surg Oncol*, 111, 213-20.
- BOYER, J. L., NG, O. C., ANANTHANARAYANAN, M., HOFMANN, A. F., SCHTEINGART, C. D., HAGENBUCH, B., STIEGER, B. & MEIER, P. J. 1994. Expression and characterization of a functional rat liver Na⁺ bile acid cotransport system in COS-7 cells. *Am J Physiol*, 266, G382-7.
- BRIZ, O., SERRANO, M. A., MACIAS, R. I. & MARIN, J. J. 2000. Overcoming cisplatin resistance in vitro by a free and liposome-encapsulated bile acid derivative: BAMET-R2. *Int J Cancer*, 88, 287-92.
- BRIZ, O., SERRANO, M. A., REBOLLO, N., HAGENBUCH, B., MEIER, P. J., KOEPESELL, H. & MARIN, J. J. 2002. Carriers involved in targeting the cytostatic bile acid-cisplatin derivatives cis-diammine-chloro-cholylglycinate-platinum(II) and cis-diammine-bisursodeoxycholate-platinum(II) toward liver cells. *Mol Pharmacol*, 61, 853-60.
- BRUIX, J., QIN, S., MERLE, P., GRANITO, A., HUANG, Y. H., BODOKY, G., PRACHT, M., YOKOSUKA, O., ROSMORDUC, O., BREDER, V., GEROLAMI, R., MASI, G., ROSS, P. J., SONG, T., BRONOWICKI, J. P., OLLIVIER-HOURMAND, I., KUDO, M., CHENG, A. L., LLOVET, J. M., FINN, R. S., LEBERRE, M. A., BAUMHAUER, A., MEINHARDT, G., HAN, G. & INVESTIGATORS, R. 2017. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment

- (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, 389, 56-66.
- BRUIX, J., SHERMAN, M. & AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER, D. 2011. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*, 53, 1020-2.
- 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. *Eur J Cancer*, 49, 3412-9.
- CAMPBELL-VERDUYN, L. S., MIRFEIZI, L., DIERCKX, R. A., ELSINGA, P. H. & FERINGA, B. L. 2009. Phosphoramidite accelerated copper(i)-catalyzed [3 + 2] cycloadditions of azides and alkynes. *Chem Commun (Camb)*, 2139-41.
- CAMPOS, I. T., SOUZA, T. A., TORQUATO, R. J., DE MARCO, R., TANAKA-AZEVEDO, A. M., TANAKA, A. S. & BARBOSA, J. A. 2012. The Kazal-type inhibitors infestins 1 and 4 differ in specificity but are similar in three-dimensional structure. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 68, 695-702.
- CARNICERO, M. D. B. 1988. *Relacion entre la proliferacion hepatocelular y la aparicion de acidos biliares planos*. Universidad de Salamanca.
- CERQUEIRA, N. M., OLIVEIRA, E. F., GESTO, D. S., SANTOS-MARTINS, D., MOREIRA, C., MOORTHY, H. N., RAMOS, M. J. & FERNANDES, P. A. 2016. Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. *Biochemistry*, 55, 5483-5506.
- CONSORTIUM, U. 2019. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res*, 47, D506-D515.
- CRIADO, J. J., HERRERA, M. C., PALOMERO, M. F., MEDARDE, M., RODRIGUEZ, E. & MARIN, J. J. 1997a. Synthesis and characterization of a new bile acid and platinum(II) complex with cytostatic activity. *J Lipid Res*, 38, 1022-32.
- CRIADO, J. J., MACIAS, R. I., MEDARDE, M., MONTE, M. J., SERRANO, M. A. & MARIN, J. J. 1997b. Synthesis and characterization of the new cytostatic complex cis-diammineplatinum(II)-chlorocholylylglycinate. *Bioconjug Chem*, 8, 453-8.
- CUI, Y., KONIG, J., BUCHHOLZ, J. K., SPRING, H., LEIER, I. & KEPPLER, D. 1999. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol*, 55, 929-37.
- CHAN, T. R., HILGRAF, R., SHARPLESS, K. B. & FOKIN, V. V. 2004. Polytriazoles as copper(I)-stabilizing ligands in catalysis. *Org Lett*, 6, 2853-5.
- CHANDRA, P. & BROUWER, K. L. 2004. The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts. *Pharm Res*, 21, 719-35.
- CHEDID, M. F., KRUEL, C. R. P., PINTO, M. A., GREZZANA-FILHO, T. J. M., LEIPNITZ, I., KRUEL, C. D. P., SCAFFARO, L. A. & CHEDID, A. D. 2017. Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis and Operative Management. *Arq Bras Cir Dig*, 30, 272-278.
- CHIANG, J. Y. 2013. Bile acid metabolism and signaling. *Compr Physiol*, 3, 1191-212.
- CHICU, A. B., R.; GLATT, H. H. 1983. Synthesis and characterization of N1,N2-disubstituted ureas and chloroformamidines. *Buletinul Stiintific si Tehnic al Institutului Politehnic Traian Vuia Timisoara, Seria Chimie*, 28, 103-6.
- CHOUDHURI, S. & KLAASSEN, C. D. 2020. Elucidation of OATP1B1 and 1B3 transporter function using transgenic rodent models and commonly known single nucleotide polymorphisms. *Toxicol Appl Pharmacol*, 399, 115039.
- DAHER, S., MASSARWA, M., BENSON, A. A. & KHOURY, T. 2018. Current and Future Treatment of Hepatocellular Carcinoma: An Updated Comprehensive Review. *J Clin Transl Hepatol*, 6, 69-78.
- DARWISH MURAD, S., KIM, W. R., THERNEAU, T., GORES, G. J., ROSEN, C. B., MARTENSON, J. A., ALBERTS, S. R. & HEIMBACH, J. K. 2012. Predictors of

- pretransplant dropout and posttransplant recurrence in patients with perihilar cholangiocarcinoma. *Hepatology*, 56, 972-81.
- DAWSON, P. A. & KARPEN, S. J. 2015. Intestinal transport and metabolism of bile acids. *J Lipid Res*, 56, 1085-99.
- DAWSON, P. A., LAN, T. & RAO, A. 2009. Bile acid transporters. *J Lipid Res*, 50, 2340-57.
- DE LOMBAERDE, S., NEYT, S., KERSEMANS, K., VERHOEVEN, J., DEVISSCHER, L., VAN VLIERBERGHE, H., VANHOVE, C. & DE VOS, F. 2017. Synthesis, in vitro and in vivo evaluation of 3beta-[18F]fluorocholeic acid for the detection of drug-induced cholestasis in mice. *PLoS One*, 12, e0173529.
- DE NORONHA E MENEZES, N. M., LIMA, R., MOREIRA, A., VARELA, P., BARROSO, A., BAPTISTA, A. & PARENTE, B. 2009. Description and management of cutaneous side effects during erlotinib and cetuximab treatment in lung and colorectal cancer patients: a prospective and descriptive study of 19 patients. *Eur J Dermatol*, 19, 248-51.
- DELEZE, G., PAUMGARTNER, G., KARLAGANIS, G., GIGER, W., REINHARD, M. & SIDIROPOULOS, D. 1978. Bile acid pattern in human amniotic fluid. *Eur J Clin Invest*, 8, 41-5.
- DI CIAULA, A., GARRUTI, G., LUNARDI BACCETTO, R., MOLINA-MOLINA, E., BONFRATE, L., WANG, D. Q. & PORTINCASA, P. 2017. Bile Acid Physiology. *Ann Hepatol*, 16, s4-s14.
- DI COSTANZO, G. G., TORTORA, R., IODICE, L., LANZA, A. G., LAMPASI, F., TARTAGLIONE, M. T., PICCIOTTO, F. P., MATTERA, S. & DE LUCA, M. 2012. Safety and effectiveness of sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma in clinical practice. *Dig Liver Dis*, 44, 788-92.
- DIMITROULIS, D., DAMASKOS, C., VALSAMI, S., DAVAKIS, S., GARMPI, N., SPARTALIS, E., ATHANASIOU, A., MORIS, D., SAKELLARIOU, S., KYKALOS, S., TSOUROUFLIS, G., GARMPI, A., DELLADETSIMA, I., KONTZOGLU, K. & KOURAKLIS, G. 2017. From diagnosis to treatment of hepatocellular carcinoma: An epidemic problem for both developed and developing world. *World J Gastroenterol*, 23, 5282-5294.
- DRAKE, J. M., LEE, J. K. & WITTE, O. N. 2014. Clinical targeting of mutated and wild-type protein tyrosine kinases in cancer. *Mol Cell Biol*, 34, 1722-32.
- DUJO, M. D. 2019. *Cycloaddition reactions in bile acid derivatives*. Grado en Química, Salamanca.
- DURMUS, S., VAN HOPPE, S. & SCHINKEL, A. H. 2016. The impact of Organic Anion-Transporting Polypeptides (OATPs) on disposition and toxicity of antitumor drugs: Insights from knockout and humanized mice. *Drug Resist Updat*, 27, 72-88.
- ELFERINK, R. O. & GROEN, A. K. 2002. Genetic defects in hepatobiliary transport. *Biochim Biophys Acta*, 1586, 129-45.
- ELLIOTT, W. H. 1971. *The Bile Acids Chemistry, Physiology, and Metabolism*. Springer, Boston, MA.
- ESPINOSA, E. S. 2006. Fisiología de los aparatos y sistemas
- EVANS, W. H. 1980. A biochemical dissection of the functional polarity of the plasma membrane of the hepatocyte. *Biochim Biophys Acta*, 604, 27-64.
- FARHAT, M. H., SHAMSEDDINE, A. I., TAWIL, A. N., BERJAWI, G., SIDANI, C., SHAMSEDEEN, W. & BARADA, K. A. 2008. Prognostic factors in patients with advanced cholangiocarcinoma: role of surgery, chemotherapy and body mass index. *World J Gastroenterol*, 14, 3224-30.
- FLECKNELL, P. A. 1979. Clinical, Biochemical and Haematological Reference Values in Normal Experimental Animals. *Journal of Clinical Pathology*, 32, 96-96.
- FORNER, A., VIDILI, G., RENGO, M., BUJANDA, L., PONZ-SARVISE, M. & LAMARCA, A. 2019. Clinical presentation, diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Liver Int*, 39 Suppl 1, 98-107.

- FOSTER, S. A., WHALEN, D. M., ÖZEN, A., WONGCHENKO, M. J., YIN, J., YEN, I., SCHAEFER, G., MAYFIELD, J. D., CHMIELECKI, J., STEPHENS, P. J., ALBACKER, L. A., YAN, Y., SONG, K., HATZIVASSILIOU, G., EIGENBROT, C., YU, C., SHAW, A. S., MANNING, G., SKELTON, N. J., HYMOWITZ, S. G. & MALEK, S. 2016. Activation Mechanism of Oncogenic Deletion Mutations in BRAF, EGFR, and HER2. *Cancer Cell*, 29, 477-493.
- GAO, B., YANG, F. M., YU, Z. T., LI, R., XIE, F., CHEN, J., LUO, H. J. & ZHANG, J. C. 2015. Relationship between the expression of MDR1 in hepatocellular cancer and its biological behaviors. *Int J Clin Exp Pathol*, 8, 6995-7001.
- GAUDIO, E., CARPINO, G., CARDINALE, V., FRANCHITTO, A., ONORI, P. & ALVARO, D. 2009. New insights into liver stem cells. *Dig Liver Dis*, 41, 455-62.
- GEIER, A., MACIAS, R. I., BETTINGER, D., WEISS, J., BANTEL, H., JAHN, D., AL-ABDULLA, R. & MARIN, J. J. 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, 15846-15857.
- GENTILE, D., DONADON, M., LLEO, A., AGHEMO, A., RONCALLI, M., DI TOMMASO, L. & TORZILLI, G. 2020. Surgical Treatment of Hepatocholangiocarcinoma: A Systematic Review. *Liver Cancer*, 9, 15-27.
- GEYER, J., WILKE, T. & PETZINGER, E. 2006. The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 372, 413-31.
- GHOURI, Y. A., MIAN, I. & ROWE, J. H. 2017. Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. *J Carcinog*, 16, 1.
- GLAESER, H., MANDERY, K., STICHT, H., FROMM, M. F. & KONIG, J. 2010. Relevance of conserved lysine and arginine residues in transmembrane helices for the transport activity of organic anion transporting polypeptide 1B3. *Br J Pharmacol*, 159, 698-708.
- GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER, C., FITZMAURICE, C., AKINYEMIJU, T. F., AL LAMI, F. H., ALAM, T., ALIZADEH-NAVAEI, R., ALLEN, C., ALSHARIF, U., ALVIS-GUZMAN, N., AMINI, E., ANDERSON, B. O., AREMU, O., ARTAMAN, A., ASGEDOM, S. W., ASSADI, R., ATEY, T. M., AVILA-BURGOS, L., AWASTHI, A., BA SALEEM, H. O., BARAC, A., BENNETT, J. R., BENSENOR, I. M., BHAKTA, N., BRENNER, H., CAHUANA-HURTADO, L., CASTANEDA-ORJUELA, C. A., CATALA-LOPEZ, F., CHOI, J. J., CHRISTOPHER, D. J., CHUNG, S. C., CURADO, M. P., DANDONA, L., DANDONA, R., DAS NEVES, J., DEY, S., DHARMARATNE, S. D., DOKU, D. T., DRISCOLL, T. R., DUBEY, M., EBRAHIMI, H., EDESSA, D., EL-KHATIB, Z., ENDRIES, A. Y., FISCHER, F., FORCE, L. M., FOREMAN, K. J., GEBREHIWOT, S. W., GOPALANI, S. V., GROSSO, G., GUPTA, R., GYAWALI, B., HAMADEH, R. R., HAMIDI, S., HARVEY, J., HASSEN, H. Y., HAY, R. J., HAY, S. I., HEIBATI, B., HILUF, M. K., HORITA, N., HOSGOOD, H. D., ILESANMI, O. S., INNOS, K., ISLAMI, F., JAKOVLJEVIC, M. B., JOHNSON, S. C., JONAS, J. B., KASAEIAN, A., KASSA, T. D., KHADER, Y. S., KHAN, E. A., KHAN, G., KHANG, Y. H., KHOSRAVI, M. H., KHUBCHANDANI, J., KOPEC, J. A., KUMAR, G. A., KUTZ, M., LAD, D. P., LAFRANCONI, A., LAN, Q., LEGESSE, Y., LEIGH, J., LINN, S., LUNEVICIUS, R., MAJEED, A., MALEKZADEH, R., MALTA, D. C., MANTOVANI, L. G., MCMAHON, B. J., MEIER, T., MELAKU, Y. A., MELKU, M., MEMIAH, P., MENDOZA, W., MERETOJA, T. J., MEZGEBE, H. B., MILLER, T. R., MOHAMMED, S., MOKDAD, A. H., et al. 2018. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol*, 4, 1553-1568.
- GOMAA, A. I., KHAN, S. A., LEEN, E. L., WAKED, I. & TAYLOR-ROBINSON, S. D. 2009. Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 15, 1301-14.

- GONG, Y. Z., EVERETT, E. T., SCHWARTZ, D. A., NORRIS, J. S. & WILSON, F. A. 1994. Molecular cloning, tissue distribution, and expression of a 14-kDa bile acid-binding protein from rat ileal cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 4741-5.
- GRANDHI, M. S., KIM, A. K., RONNEKLEIV-KELLY, S. M., KAMEL, I. R., GHASEBEH, M. A. & PAWLIK, T. M. 2016. Hepatocellular carcinoma: From diagnosis to treatment. *Surg Oncol*, 25, 74-85.
- GRANT, C. E., VALDIMARSSON, G., HIPFNER, D. R., ALMQUIST, K. C., COLE, S. P. & DEELEY, R. G. 1994. Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res*, 54, 357-61.
- HAGENBUCH, B. & DAWSON, P. 2004. The sodium bile salt cotransport family SLC10. *Pflugers Arch*, 447, 566-70.
- HAGENBUCH, B. & MEIER, P. J. 1996. Sinusoidal (basolateral) bile salt uptake systems of hepatocytes. *Semin Liver Dis*, 16, 129-36.
- HALL, G. Y. 2016. Tratado de fisiología médica. 13 ed.
- HAWKINS, P. C. D., SKILLMAN, A. G., WARREN, G. L., ELLINGSON, B. A. & STAHL, M. T. 2010. Conformer Generation with OMEGA: Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 50, 572-584.
- HAZNEDAROGLU, I. C. 2014. Monitoring the Response to Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI) Treatment in Chronic Myeloid Leukemia (CML). *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 6, e2014009.
- HEIN, C. D., LIU, X. M. & WANG, D. 2008. Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. *Pharm Res*, 25, 2216-30.
- HERRAEZ, E., LOZANO, E., MACIAS, R. I., VAQUERO, J., BUJANDA, L., BANALES, J. M., MARIN, J. J. & BRIZ, O. 2013. Expression of SLC22A1 variants may affect the response of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma to sorafenib. *Hepatology*, 58, 1065-73.
- HIDALGO, M. & BLOEDOW, D. 2003. Pharmacokinetics and pharmacodynamics: maximizing the clinical potential of Erlotinib (Tarceva). *Semin Oncol*, 30, 25-33.
- HIRTH, B. H., QIAO, S., CUFF, L. M., COCHRAN, B. M., PREGEL, M. J., GREGORY, J. S., SNEDDON, S. F. & KANE, J. L., JR. 2005. Discovery of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid diamides that increase CFTR mediated chloride transport. *Bioorg Med Chem Lett*, 15, 2087-91.
- HOFMANN, A. F. 1977. The enterohepatic circulation of bile acids in man. *Clin Gastroenterol*, 6, 3-24.
- HOFMANN, A. F. 1994. Microtubule-dependent transport of bile salts through hepatocytes: cholic vs. taurocholic acid. *Hepatology*, 20, 1375-8.
- HOFMANN, A. F. & HAGEY, L. R. 2008. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci*, 65, 2461-83.
- HOFMANN, A. F., HAGEY, L. R. & KRASOWSKI, M. D. 2010. Bile salts of vertebrates: structural variation and possible evolutionary significance. *J Lipid Res*, 51, 226-46.
- HOLZINGER, F., SCHTEINGART, C. D., TON-NU, H. T., EMING, S. A., MONTE, M. J., HAGEY, L. R. & HOFMANN, A. F. 1997. Fluorescent bile acid derivatives: relationship between chemical structure and hepatic and intestinal transport in the rat. *Hepatology*, 26, 1263-71.
- HOUSSET, C., CHRETIEN, Y., DEBRAY, D. & CHIGNARD, N. 2016. Functions of the Gallbladder. *Compr Physiol*, 6, 1549-77.
- [HTTP://WWW.PYMOL.ORG](http://www.pymol.org). <http://www.pymol.org> [Online].
- HU, N. J., IWATA, S., CAMERON, A. D. & DREW, D. 2011. Crystal structure of a bacterial homologue of the bile acid sodium symporter ASBT. *Nature*, 478, 408-11.
- HU, S., CHEN, Z., FRANKE, R., ORWICK, S., ZHAO, M., RUDEK, M. A., SPARREBOOM, A. & BAKER, S. D. 2009. Interaction of the multikinase inhibitors sorafenib and sunitinib with solute carriers and ATP-binding cassette transporters. *Clin Cancer Res*, 15, 6062-9.

- HUANG, Y., ANDERLE, P., BUSSEY, K. J., BARBACIORU, C., SHANKAVARAM, U., DAI, Z., REINHOLD, W. C., PAPP, A., WEINSTEIN, J. N. & SADEE, W. 2004. Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res*, 64, 4294-301.
- HUETHER, A., HOPFNER, M., BARADARI, V., SCHUPPAN, D. & SCHERUBL, H. 2007. Sorafenib alone or as combination therapy for growth control of cholangiocarcinoma. *Biochem Pharmacol*, 73, 1308-17.
- HUNDT, M., BASIT, H. & JOHN, S. 2020. Physiology, Bile Secretion. *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- IACOB, S., IACOB, D. G. & LUMINOS, L. M. 2018. Intestinal Microbiota as a Host Defense Mechanism to Infectious Threats. *Front Microbiol*, 9, 3328.
- IRWIN M. ARIAS, H. J. A., JAMES L. BOYER, DAVID E. COHEN, NELSON FAUSTO, DAVID A. SHAFRITZ, ALLAN W. WOLKOFF 2009. The Liver: Biology and Pathobiology: Fifth Edition. John Wiley and Sons.
- IZUKURA, M., HASHIMOTO, T., GOMEZ, G., UCHIDA, T., GREELEY, G. H., JR. & THOMPSON, J. C. 1991. Intracolonic infusion of bile salt stimulates release of peptide YY and inhibits cholecystokinin-stimulated pancreatic exocrine secretion in conscious dogs. *Pancreas*, 6, 427-32.
- JACOBSON, M. P., PINCUS, D. L., RAPP, C. S., DAY, T. J., HONIG, B., SHAW, D. E. & FRIESNER, R. A. 2004. A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. *Proteins*, 55, 351-67.
- JEMNITZ, K., HEREDI-SZABO, K., JANOSSY, J., IOJA, E., VERECZKEY, L. & KRAJCSI, P. 2010. ABCC2/Abcc2: a multispecific transporter with dominant excretory functions. *Drug Metab Rev*, 42, 402-36.
- JETTER, A. & KULLAK-UBLICK, G. A. 2020. Drugs and hepatic transporters: A review. *Pharmacol Res*, 154, 104234.
- JIAO, Q., BI, L., REN, Y., SONG, S., WANG, Q. & WANG, Y. S. 2018. Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Mol Cancer*, 17, 36.
- JONES, G., WILLETT, P., GLEN, R. C., LEACH, A. R. & TAYLOR, R. 1997. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol*, 267, 727-48.
- JUN CAI MENG, V. V. F., M. G. FINN 2005. Kinetic resolution by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Tetrahedron Letters*, 46, 4543-4546.
- KANNO, N., LESAGE, G., GLASER, S. & ALPINI, G. 2001. Regulation of cholangiocyte bicarbonate secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281, G612-25.
- KAUFMAN, D. L. F. A. P. D. 2008. *Kinase inhibitors useful for the treatment of myeloproliferic diseases and other proliferative diseases*. USA patent application 12/105,376.
- KAWAMATA, Y., FUJII, R., HOSOYA, M., HARADA, M., YOSHIDA, H., MIWA, M., FUKUSUMI, S., HABATA, Y., ITOH, T., SHINTANI, Y., HINUMA, S., FUJISAWA, Y. & FUJINO, M. 2003. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem*, 278, 9435-40.
- KERB, R., BRINKMANN, U., CHATSKAIA, N., GORBUNOV, D., GORBOULEV, V., MORNHINWEG, E., KEIL, A., EICHELBAUM, M. & KOEPEL, H. 2002. Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences. *Pharmacogenetics*, 12, 591-5.
- 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. *Mol Clin Oncol*, 1, 987-994.
- KLAASSEN, C. D. 1974. Bile flow and composition during bile acid depletion and administration. *Can J Physiol Pharmacol*, 52, 334-48.
- KNOSEL, T., KAMPMANN, E., KIRCHNER, T. & ALTENDORF-HOFMANN, A. 2014. [Tyrosine kinases in soft tissue tumors]. *Pathologe*, 35 Suppl 2, 198-201.

- KOLB, H. C., FINN, M. G. & SHARPLESS, K. B. 2001. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed Engl*, 40, 2004-2021.
- KOLB, H. C. & SHARPLESS, K. B. 2003. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov Today*, 8, 1128-37.
- KONSTADOULAKIS, M. M., ROAYAIE, S., GOMATOS, I. P., LABOW, D., FIEL, M. I., MILLER, C. M. & SCHWARTZ, M. E. 2008. Fifteen-year, single-center experience with the surgical management of intrahepatic cholangiocarcinoma: operative results and long-term outcome. *Surgery*, 143, 366-74.
- KORITA, P. V., WAKAI, T., SHIRAI, Y., MATSUDA, Y., SAKATA, J., TAKAMURA, M., YANO, M., SANPEI, A., AOYAGI, Y., HATAKEYAMA, K. & AJIOKA, Y. 2010. Multidrug resistance-associated protein 2 determines the efficacy of cisplatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*, 23, 965-72.
- KRAMER, W. 1995. Identification of the bile acid binding proteins in human serum by photoaffinity labeling. *Biochim Biophys Acta*, 1257, 230-8.
- KRAMER, W. & WESS, G. 1996. Bile acid transport systems as pharmaceutical targets. *Eur J Clin Invest*, 26, 715-32.
- KUBITZ, R., DROGE, C., KLUGE, S., STINDT, J. & HAUSSINGER, D. 2014. Genetic variations of bile salt transporters. *Drug Discov Today Technol*, 12, e55-67.
- KUBITZ, R., DROGE, C., STINDT, J., WEISSENBERGER, K. & HAUSSINGER, D. 2012. The bile salt export pump (BSEP) in health and disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 36, 536-53.
- KULLAK-UBLICK, G. A., HAGENBUCH, B., STIEGER, B., WOLKOFF, A. W. & MEIER, P. J. 1994. Functional characterization of the basolateral rat liver organic anion transporting polypeptide. *Hepatology*, 20, 411-6.
- KULLAK-UBLICK, G. A., ISMAIR, M. G., STIEGER, B., LANDMANN, L., HUBER, R., PIZZAGALLI, F., FATTINGER, K., MEIER, P. J. & HAGENBUCH, B. 2001. Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology*, 120, 525-33.
- KULLAK-UBLICK, G. A., STIEGER, B., HAGENBUCH, B. & MEIER, P. J. 2000. Hepatic transport of bile salts. *Semin Liver Dis*, 20, 273-92.
- LAM, P., SOROKA, C. J. & BOYER, J. L. 2010. The bile salt export pump: clinical and experimental aspects of genetic and acquired cholestatic liver disease. *Semin Liver Dis*, 30, 125-33.
- LAMARCA, A., HUBNER, R. A., DAVID RYDER, W. & VALLE, J. W. 2014. Second-line chemotherapy in advanced biliary cancer: a systematic review. *Ann Oncol*, 25, 2328-38.
- LANDI, L. & CAPPUZZO, F. 2015. Experience with erlotinib in the treatment of non-small cell lung cancer. *Ther Adv Respir Dis*, 9, 146-63.
- LARENA, M. G., MARTINEZ-DIEZ, M. C., MONTE, M. J., DOMINGUEZ, M. F., PASCUAL, M. J. & MARIN, J. J. 2001. Liver organotropism and biotransformation of a novel platinum-ursodeoxycholate derivative, Bamet-UD2, with enhanced antitumour activity. *J Drug Target*, 9, 185-200.
- LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P. A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I. M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J. & HIGGINS, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-8.
- LAZARIDIS, K. N. & LARUSSO, N. F. 2015. The Cholangiopathies. *Mayo Clin Proc*, 90, 791-800.
- LE, P., KUNOLD, E., MACSICS, R., ROX, K., JENNINGS, M. C., UGUR, I., REINECKE, M., CHAVES-MORENO, D., HACKL, M. W., FETZER, C., MANDL, F. A. M., LEHMANN, J., KOROTKOV, V. S., HACKER, S. M., KUSTER, B., ANTES, I., PIEPER, D. H., ROHDE, M., WUEST, W. M., MEDINA, E. & SIEBER, S. A. 2020. Repurposing human kinase inhibitors to create an antibiotic active against drug-resistant *Staphylococcus aureus*, persists and biofilms. *Nat Chem*, 12, 145-158.

- LEFEBVRE, P., CARIOU, B., LIEN, F., KUIPERS, F. & STAELS, B. 2009. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev*, 89, 147-91.
- LI, Y., GAO, Z. H. & QU, X. J. 2015. The adverse effects of sorafenib in patients with advanced cancers. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 116, 216-21.
- LIRAS, A. M. 2020. *SYNTHESIS OF TRIAZOLIC ESTERS DERIVED FROM CHOLIC ACID*. Grado en Química, Salamanca.
- LIU, L., CAO, Y., CHEN, C., ZHANG, X., MCNABOLA, A., WILKIE, D., WILHELM, S., LYNCH, M. & CARTER, C. 2006. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res*, 66, 11851-8.
- LIYUAN LIANG, D. A. 2011. The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) "click" reaction and its applications. An overview. *Coordination Chemistry Reviews*, 255, 2933-2945.
- LOCHER, K. P. 2016. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat Struct Mol Biol*, 23, 487-93.
- LOZANO, E., MONTE, M. J., BRIZ, O., HERNANDEZ-HERNANDEZ, A., BANALES, J. M., MARIN, J. J. & MACIAS, R. I. 2015. Enhanced antitumour drug delivery to cholangiocarcinoma through the apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT). *J Control Release*, 216, 93-102.
- LUDWIG, J. 1987. New concepts in biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis*, 7, 293-301.
- LUO, X., JIA, W., HUANG, Z., LI, X., XING, B., JIANG, X., LI, J., SI, A., YANG, T., GAO, C., LAU, W. Y. & SHEN, F. 2017. Effectiveness and safety of sorafenib in the treatment of unresectable and advanced intrahepatic cholangiocarcinoma: a pilot study. *Oncotarget*, 8, 17246-17257.
- LLOVET, J. M. 2007. Clinical and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl*, 13, S13-6.
- LLOVET, J. M., DI BISCEGLIE, A. M., BRUIX, J., KRAMER, B. S., LENCIONI, R., ZHU, A. X., SHERMAN, M., SCHWARTZ, M., LOTZE, M., TALWALKAR, J., GORES, G. J. & PANEL OF EXPERTS IN, H. C. C. D. C. T. 2008a. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 100, 698-711.
- LLOVET, J. M., MONTAL, R., SIA, D. & FINN, R. S. 2018. Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol*, 15, 599-616.
- 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., HAUSSINGER, D., GIANNARIS, T., SHAN, M., MOSCOVICI, M., VOLIOTIS, D. & BRUIX, J. 2008b. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 359, 378-90.
- MACIAS, R. I. 2014. Cholangiocarcinoma: Biology, Clinical Management, and Pharmacological Perspectives. *ISRN Hepatol*, 2014, 828074.
- MACIERZANKA, A., TORCELLO-GOMEZ, A., JUNGNIKEL, C. & MALDONADO-VALDERRAMA, J. 2019. Bile salts in digestion and transport of lipids. *Adv Colloid Interface Sci*, 274, 102045.
- MAĐRZAK-LITWA, I., WOJCIECHOWSKA, A. & PARYZEK, Z. 2015. Synthesis of Isomeric Dimers of Deoxycholic Acid Derivatives Linked by 1,2,3-Triazole. *Synthetic Communications*, 45, 1222-1230.
- MAIER, J. A., MARTINEZ, C., KASAVAJHALA, K., WICKSTROM, L., HAUSER, K. E. & SIMMERLING, C. 2015. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J Chem Theory Comput*, 11, 3696-713.
- MAKISHIMA, M., LU, T. T., XIE, W., WHITFIELD, G. K., DOMOTO, H., EVANS, R. M., HAUSSLER, M. R. & MANGELSDORF, D. J. 2002. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science*, 296, 1313-6.

- MAKISHIMA, M., OKAMOTO, A. Y., REPA, J. J., TU, H., LEARNED, R. M., LUK, A., HULL, M. V., LUSTIG, K. D., MANGELSDORF, D. J. & SHAN, B. 1999. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*, 284, 1362-5.
- MANDERY, K., STICHT, H., BUJOK, K., SCHMIDT, I., FAHRMAYR, C., BALK, B., FROMM, M. F. & GLAESER, H. 2011. Functional and structural relevance of conserved positively charged lysine residues in organic anion transporting polypeptide 1B3. *Mol Pharmacol*, 80, 400-6.
- MANIEWSKI R. , L. A., KACPRZAK M., AND ZBIEÆ A. 2004. Selected applications of near infrared optical methods in medical diagnosis. *Institute of Biocybernetics and Biomedical Engineering, Polish Academy of Sciences Opto-Electron*, 12.
- MARIN, J. J., BRIZ, O., PEREZ, M. J., ROMERO, M. R. & MONTE, M. J. 2009. Hepatobiliary transporters in the pharmacology and toxicology of anticancer drugs. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14, 4257-80.
- MARIN, J. J. & MACIAS, R. I. 2021. Understanding drug resistance mechanisms in cholangiocarcinoma: assisting the clinical development of investigational drugs. *Expert Opin Investig Drugs*, 30, 675-679.
- MARIN, J. J., MACIAS, R. I., BRIZ, O., BANALES, J. M. & MONTE, M. J. 2015. Bile Acids in Physiology, Pathology and Pharmacology. *Curr Drug Metab*, 17, 4-29.
- MARIN, J. J., MACIAS, R. I., CRIADO, J. J., BUENO, A., MONTE, M. J. & SERRANO, M. A. 1998. DNA interaction and cytostatic activity of the new liver organotropic complex of cisplatin with glycocholic acid: Bamet-R2. *Int J Cancer*, 78, 346-52.
- MARIN, J. J., ROMERO, M. R. & BRIZ, O. 2010. Molecular bases of liver cancer refractoriness to pharmacological treatment. *Curr Med Chem*, 17, 709-40.
- MARIN, J. J. G., BRIZ, O., HERRAEZ, E., LOZANO, E., ASENSIO, M., DI GIACOMO, S., ROMERO, M. R., OSORIO-PADILLA, L. M., SANTOS-LLAMAS, A. I., SERRANO, M. A., ARMENGOL, C., EFFERTH, T. & MACIAS, R. I. R. 2018a. Molecular bases of the poor response of liver cancer to chemotherapy. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 42, 182-192.
- MARIN, J. J. G., CIVES-LOSADA, C., ASENSIO, M., LOZANO, E., BRIZ, O. & MACIAS, R. I. R. 2019. Mechanisms of Anticancer Drug Resistance in Hepatoblastoma. *Cancers (Basel)*, 11.
- MARIN, J. J. G., LOZANO, E., HERRAEZ, E., ASENSIO, M., DI GIACOMO, S., ROMERO, M. R., BRIZ, O., SERRANO, M. A., EFFERTH, T. & MACIAS, R. I. R. 2018b. Chemoresistance and chemosensitization in cholangiocarcinoma. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1864, 1444-1453.
- MARIN, J. J. G., MACIAS, R. I. R., MONTE, M. J., HERRAEZ, E., PELETEIRO-VIGIL, A., BLAS, B. S., SANCHON-SANCHEZ, P., TEMPRANO, A. G., ESPINOSA-ESCUADERO, R. A., LOZANO, E., BRIZ, O. & ROMERO, M. R. 2020a. Cellular Mechanisms Accounting for the Refractoriness of Colorectal Carcinoma to Pharmacological Treatment. *Cancers (Basel)*, 12.
- MARIN, J. J. G., MACIAS, R. I. R., MONTE, M. J., ROMERO, M. R., ASENSIO, M., SANCHEZ-MARTIN, A., CIVES-LOSADA, C., TEMPRANO, A. G., ESPINOSA-ESCUADERO, R., REVIEJO, M., BOHORQUEZ, L. H. & BRIZ, O. 2020b. Molecular Bases of Drug Resistance in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)*, 12.
- MARTÍN, M. A. 2019. *UTILIDAD DEL TRANSPORTOMA EN LA BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES DE QUIMIORRESISTENCIA Y EN EL DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE SENSIBILIZACIÓN A LA QUIMIOTERAPIA EN EL CÁNCER HEPÁTICO*. SALAMANCA.
- MASYUK, T. V., RITMAN, E. L. & LARUSSO, N. F. 2001. Quantitative assessment of the rat intrahepatic biliary system by three-dimensional reconstruction. *Am J Pathol*, 158, 2079-88.
- MEIER-ABT, F., MOKRAB, Y. & MIZUGUCHI, K. 2005. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLCO superfamily: identification of new members in

- nonmammalian species, comparative modeling and a potential transport mode. *J Membr Biol*, 208, 213-27.
- MEIER, P. J. 1988. Transport polarity of hepatocytes. *Semin Liver Dis*, 8, 293-307.
- MEKHJIAN, H. S., PHILLIPS, S. F. & HOFMANN, A. F. 1979. Colonic absorption of unconjugated bile acids: perfusion studies in man. *Dig Dis Sci*, 24, 545-50.
- MELDAL, M., TORNOE, C. W., NIELSEN, T. E., DINESS, F., LE QUEMENT, S. T., CHRISTENSEN, C. A., JENSEN, J. F., WORM-LEONHARD, K., GROTH, T., BOUAKAZ, L., WU, B., HAGEL, G. & KEINICKE, L. 2010. Ralph F. Hirschmann award address 2009: Merger of organic chemistry with peptide diversity. *Biopolymers*, 94, 161-82.
- METHVIN, A. B. & GAUSAS, R. E. 2007. Newly recognized ocular side effects of erlotinib. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg*, 23, 63-5.
- MIYAKE, J. H., WANG, S. L. & DAVIS, R. A. 2000. Bile acid induction of cytokine expression by macrophages correlates with repression of hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase. *J Biol Chem*, 275, 21805-8.
- MONDAL, S. B., GAO, S., ZHU, N., LIANG, R., GRUEV, V. & ACHILEFU, S. 2014. Real-time fluorescence image-guided oncologic surgery. *Adv Cancer Res*, 124, 171-211.
- MONTE, M. J., MARIN, J. J., ANTELO, A. & VAZQUEZ-TATO, J. 2009. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol*, 15, 804-16.
- MULLER, M. & JANSEN, P. L. 1997. Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am J Physiol*, 272, G1285-303.
- NAKAGAWA, M. & SETCHELL, K. D. 1990. Bile acid metabolism in early life: studies of amniotic fluid. *J Lipid Res*, 31, 1089-98.
- NAKAMURA, T., TERASHIMA, T., OGATA, K. & FUKUZAWA, S. 2011. Copper(I) 1,2,3-triazol-5-ylidene complexes as efficient catalysts for click reactions of azides with alkynes. *Org Lett*, 13, 620-3.
- NIES, A. T., KONIG, J., PFANNSCHMIDT, M., KLAR, E., HOFMANN, W. J. & KEPPLER, D. 2001. Expression of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 94, 492-9.
- 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. *Mol Cancer Ther*, 7, 3081-91.
- ONASANYA, G., OKE, F., SANNI, T. AND MUHAMMAD, A. 2015. Parameters Influencing Haematological, Serum and Bio-Chemical References in Livestock Animals under Different Management Systems. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 5, 181-189.
- PAN, T. T., WANG, W., JIA, W. D. & XU, G. L. 2017. A single-center experience of sorafenib monotherapy in patients with advanced intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncol Lett*, 13, 2957-2964.
- PARK, J. G., TAK, W. Y., PARK, S. Y., KWEON, Y. O., JANG, S. Y., LEE, S. H., LEE, Y. R., JANG, S. K., HUR, K. & LEE, H. J. 2017. Long-term follow-up of complete remission of advanced hepatocellular carcinoma following sorafenib therapy: A case report. *Oncol Lett*, 14, 4853-4856.
- PARKS, D. J., BLANCHARD, S. G., BLEDSOE, R. K., CHANDRA, G., CONSLER, T. G., KLIEWER, S. A., STIMMEL, J. B., WILLSON, T. M., ZAVACKI, A. M., MOORE, D. D. & LEHMANN, J. M. 1999. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science*, 284, 1365-8.
- PECK-RADOSAVLJEVIC, M. 2014. Drug therapy for advanced-stage liver cancer. *Liver Cancer*, 3, 125-31.
- PÉREZ, M., SÁNCHEZ, M., GARCÍA, M., PATIÑO C, L. P., BLUSTEIN, G. & PALERMO, J. A. 2019. Antifouling activity of peracetylated cholic acid, a natural bile acid derivative. *Steroids*, 149, 108414.
- PÉREZ NAVARRO, J. V., TELLO BARBA, I. M., ANAYA-PRADO, R., CASTELLTORT CERVANTES, L. F., SCHADEGG PEÑA, D., CANTON DIAZ, A. & OCHOA

- HERRERA, R. 2014. Colangiocarcinoma, una revisión de retos en diagnóstico y manejo. *Cirujano general*, 36, 48-57.
- POSPIESZNY, T., PAKIET, M., KOWALCZYK, I. & BRYCKI, B. 2017. Design, synthesis and application of new bile acid ligands with 1,2,3-triazole ring. *Supramolecular Chemistry*, 29, 81-93.
- PRESOLSKI, S. I., HONG, V., CHO, S. H. & FINN, M. G. 2010. Tailored ligand acceleration of the Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction: practical and mechanistic implications. *J Am Chem Soc*, 132, 14570-6.
- REICHEN, J. & PAUMGARTNER, G. 1976. Uptake of bile acids by perfused rat liver. *Am J Physiol*, 231, 734-42.
- ROE, D. R. & CHEATHAM, T. E., 3RD 2013. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J Chem Theory Comput*, 9, 3084-95.
- ROE, E., GARCIA MURET, M. P., MARCUELLO, E., CAPDEVILA, J., PALLARES, C. & ALOMAR, A. 2006. Description and management of cutaneous side effects during cetuximab or erlotinib treatments: a prospective study of 30 patients. *J Am Acad Dermatol*, 55, 429-37.
- ROGGO, Y., CHALUS, P., MAURER, L., LEMA-MARTINEZ, C., EDMOND, A. & JENT, N. 2007. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *J Pharm Biomed Anal*, 44, 683-700.
- 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. *Ann Intern Med*, 139, 547-57.
- ROMERO, M. R., MARTINEZ-DIEZ, M. C., LARENA, M. G., MACIAS, R. I., DOMINGUEZ, M., GARCIA-MONZON, C., SERRANO, M. A. & MARIN, J. J. 2002. Evidence for dual effects of DNA-reactive bile acid derivatives (Bamets) on hepatitis B virus life cycle in an in vitro replicative system. *Antivir Chem Chemother*, 13, 371-80.
- ROSTOVTSEV, V. V., GREEN, L. G., FOKIN, V. V. & SHARPLESS, K. B. 2002. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed Engl*, 41, 2596-9.
- ROTH, M., OBADAT, A. & HAGENBUCH, B. 2012. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol*, 165, 1260-87.
- RUSSELL, D. W. 2003. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem*, 72, 137-74.
- SALEN, G., SHEFER, S., CHENG, F. W., DAYAL, B., BATTI, A. K. & TINT, G. S. 1979. Cholic acid biosynthesis: the enzymatic defect in cerebrotendinous xanthomatosis. *J Clin Invest*, 63, 38-44.
- SALOMON-FERRER, R., CASE, D. A. & WALKER, R. C. 2013. An overview of the Amber biomolecular simulation package. *WIREs Computational Molecular Science*, 3, 198-210.
- SAMPAT, K. R. & O'NEIL, B. 2013. Antiangiogenic therapies for advanced hepatocellular carcinoma. *Oncologist*, 18, 430-8.
- SARENAC, T. & MIKOV, M. 2019. Cervical Cancer, Different Treatments and Importance of Bile Acids as Therapeutic Agents in This Disease. *Front Pharmacol*, 10, 484.
- SASTRY, G. M., ADZHIGIREY, M., DAY, T., ANNABHIMOJU, R. & SHERMAN, W. 2013. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J Comput Aided Mol Des*, 27, 221-34.
- SELL, S. 2001. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology*, 33, 738-50.
- SELLINGER, M., BARRETT, C., MALLE, P., GORDON, E. R. & BOYER, J. L. 1990. Cryptic Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity in rat liver canalicular plasma membranes: evidence for its basolateral origin. *Hepatology*, 11, 223-9.

- SEROKA, B., LOTOWSKI, Z., HRYNIEWICKA, A., RAROVA, L., R, R. S., A, M. T. & J, W. M. 2020. Synthesis of New Cisplatin Derivatives from Bile Acids. *Molecules*, 25.
- SETCHELL, K. D., DUMASWALA, R., COLOMBO, C. & RONCHI, M. 1988. Hepatic bile acid metabolism during early development revealed from the analysis of human fetal gallbladder bile. *J Biol Chem*, 263, 16637-44.
- SHEFER, S., CHENG, F. W., DAYAL, B., HAUSER, S., TINT, G. S., SALEN, G. & MOSBACH, E. H. 1976. A 25-hydroxylation pathway of cholic acid biosynthesis in man and rat. *J Clin Invest*, 57, 897-903.
- SHUMAKER, R. C., ALURI, J., FAN, J., MARTINEZ, G., THOMPSON, G. A. & REN, M. 2014. Effect of rifampicin on the pharmacokinetics of lenvatinib in healthy adults. *Clin Drug Investig*, 34, 651-9.
- SIBULESKY, L. 2013. Anatomía normal del hígado. *Clinical Liver Disease*, 2, S61Š-S63Š.
- SIEVANEN, E. 2007. Exploitation of bile acid transport systems in prodrug design. *Molecules*, 12, 1859-89.
- SLIJEPCEVIC, D., KAUFMAN, C., WICHERS, C. G., GILGLIONI, E. H., LEMPP, F. A., DUIJST, S., DE WAART, D. R., ELFERINK, R. P., MIER, W., STIEGER, B., BEUERS, U., URBAN, S. & VAN DE GRAAF, S. F. 2015. Impaired uptake of conjugated bile acids and hepatitis b virus pres1-binding in na(+) -taurocholate cotransporting polypeptide knockout mice. *Hepatology*, 62, 207-19.
- SLIJEPCEVIC, D., ROSCAM ABBING, R. L. P., KATAFUCHI, T., BLANK, A., DONKERS, J. M., VAN HOPPE, S., DE WAART, D. R., TOLENAARS, D., VAN DER MEER, J. H. M., WILDENBERG, M., BEUERS, U., OUDE ELFERINK, R. P. J., SCHINKEL, A. H. & VAN DE GRAAF, S. F. J. 2017. Hepatic uptake of conjugated bile acids is mediated by both sodium taurocholate cotransporting polypeptide and organic anion transporting polypeptides and modulated by intestinal sensing of plasma bile acid levels in mice. *Hepatology*, 66, 1631-1643.
- SLIJEPCEVIC, D. & VAN DE GRAAF, S. F. 2017. Bile Acid Uptake Transporters as Targets for Therapy. *Dig Dis*, 35, 251-258.
- SMIT, M. J., KUIPERS, F., VONK, R. J., TEMMERMAN, A. M., JACKLE, S. & WINDLER, E. E. 1993. Effects of dietary cholesterol on bile formation and hepatic processing of chylomicron remnant cholesterol in the rat. *Hepatology*, 17, 445-54.
- SOKOLOVA, N. V., LATYSHEV, G. V., LUKASHEV, N. V. & NENAJDENKO, V. G. 2011. Design and synthesis of bile acid-peptide conjugates linked via triazole moiety. *Org Biomol Chem*, 9, 4921-6.
- SOMMERFELD, A., REINEHR, R. & HAUSSINGER, D. 2009. Bile acid-induced epidermal growth factor receptor activation in quiescent rat hepatic stellate cells can trigger both proliferation and apoptosis. *J Biol Chem*, 284, 22173-83.
- STIEGER, B. 2011. The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation. *Handb Exp Pharmacol*, 205-59.
- STIEGER, B. & BEUERS, U. 2011. The canalicular bile salt export pump BSEP (ABCB11) as a potential therapeutic target. *Curr Drug Targets*, 12, 661-70.
- SUGA, T., YAMAGUCHI, H., SATO, T., MAEKAWA, M., GOTO, J. & MANO, N. 2017. Preference of Conjugated Bile Acids over Unconjugated Bile Acids as Substrates for OATP1B1 and OATP1B3. *PLoS One*, 12, e0169719.
- TELLA, S. H., KOMMALAPATI, A. & MAHIPAL, A. 2021. Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: targeted therapies. *Chin Clin Oncol*, 10, 10.
- THONGPRASERT, S. 2005. The role of chemotherapy in cholangiocarcinoma. *Ann Oncol*, 16 Suppl 2, ii93-6.
- TOMONARI, T., TAKEISHI, S., TANIGUCHI, T., TANAKA, T., TANAKA, H., FUJIMOTO, S., KIMURA, T., OKAMOTO, K., MIYAMOTO, H., MUGURUMA, N. & TAKAYAMA, T. 2016. MRP3 as a novel resistance factor for sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 7, 7207-15.

- TORNOE, C. W., CHRISTENSEN, C. & MELDAL, M. 2002. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J Org Chem*, 67, 3057-64.
- TORRE, L. A., SIEGEL, R. L., WARD, E. M. & JEMAL, A. 2016. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 25, 16-27.
- TRAUNER, M. & BOYER, J. L. 2003. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev*, 83, 633-71.
- ULRICH, H., TILLEY, J. N. & SAYIGH, A. A. R. 1964. Syntheses and Some Reactions of Allophanoyl Chlorides 1a. *J Org Chem*, 29, 2401-2404.
- VAN BEERS, B. E., DAIRE, J. L. & GARTEISER, P. 2015. New imaging techniques for liver diseases. *J Hepatol*, 62, 690-700.
- VATMURGE, N. S., HAZRA, B. G., PORE, V. S., SHIRAZI, F., CHAVAN, P. S. & DESHPANDE, M. V. 2008. Synthesis and antimicrobial activity of beta-lactam-bile acid conjugates linked via triazole. *Bioorg Med Chem Lett*, 18, 2043-7.
- VAZ, F. M. & FERDINANDUSSE, S. 2017. Bile acid analysis in human disorders of bile acid biosynthesis. *Mol Aspects Med*, 56, 10-24.
- VERDONK, M. L., COLE, J. C., HARTSHORN, M. J., MURRAY, C. W. & TAYLOR, R. D. 2003. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins*, 52, 609-23.
- VISSER, W. E., WONG, W. S., VAN MULLEM, A. A., FRIESEMA, E. C., GEYER, J. & VISSER, T. J. 2010. Study of the transport of thyroid hormone by transporters of the SLC10 family. *Mol Cell Endocrinol*, 315, 138-45.
- VOGEL, A., WEGE, H., CACA, K., NASHAN, B. & NEUMANN, U. 2014. The diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma. *Dtsch Arztebl Int*, 111, 748-54.
- WAN, P. T., GARNETT, M. J., ROE, S. M., LEE, S., NICULESCU-DUVAZ, D., GOOD, V. M., 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, 855-67.
- WANG, J., WOLF, R. M., CALDWELL, J. W., KOLLMAN, P. A. & CASE, D. A. 2004. Development and testing of a general amber force field. *J Comput Chem*, 25, 1157-74.
- WANG, K., LI, Y., ZHANG, L.-J., CHEN, X.-G. & FENG, Z.-Q. 2014. Synthesis and in vitro cytotoxic activities of sorafenib derivatives. *Chinese Chemical Letters*, 25, 702-704.
- WANG, R., LU, Y. & WANG, S. 2003. Comparative evaluation of 11 scoring functions for molecular docking. *J Med Chem*, 46, 2287-303.
- WANG, Z. & COLE, P. A. 2014. Catalytic mechanisms and regulation of protein kinases. *Methods Enzymol*, 548, 1-21.
- WATANABE, N., TSUKADA, N., SMITH, C. R. & PHILLIPS, M. J. 1991. Motility of bile canaliculi in the living animal: implications for bile flow. *J Cell Biol*, 113, 1069-80.
- WATERHOUSE, A., BERTONI, M., BIENERT, S., STUDER, G., TAURIELLO, G., GUMIENNY, R., HEER, F. T., DE BEER, T. A. P., REMPFER, C., BORDOLI, L., LEPORE, R. & SCHWEDE, T. 2018. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*, 46, W296-W303.
- WEAVER, Y. M. & HAGENBUCH, B. 2010. Several conserved positively charged amino acids in OATP1B1 are involved in binding or translocation of different substrates. *J Membr Biol*, 236, 279-90.
- WILHELM, S., CARTER, C., LYNCH, M., LOWINGER, T., DUMAS, J., SMITH, R. A., SCHWARTZ, B., SIMANTOV, R. & KELLEY, S. 2006. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 5, 835-44.
- WILHELM, S. M., CARTER, C., TANG, L., WILKIE, D., MCNABOLA, A., RONG, H., CHEN, C., ZHANG, X., VINCENT, P., MCHUGH, M., CAO, Y., SHUJATH, J., GAWLAK, S., EVELEIGH, D., ROWLEY, B., LIU, L., ADNANE, L., LYNCH, M., AUCLAIR, D., TAYLOR, I., GEDRICH, R., VOZNESENSKY, A., RIEDL, B., POST, L. E., BOLLAG,

- G. & TRAIL, P. A. 2004. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res*, 64, 7099-109.
- WINKLER, G. C., BARLE, E. L., GALATI, G. & KLUWE, W. M. 2014. Functional differentiation of cytotoxic cancer drugs and targeted cancer therapeutics. *Regul Toxicol Pharmacol*, 70, 46-53.
- XIE, W., RADOMINSKA-PANDYA, A., SHI, Y., SIMON, C. M., NELSON, M. C., ONG, E. S., WAXMAN, D. J. & EVANS, R. M. 2001. An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 3375-80.
- XU, J. 2018. Trends in Liver Cancer Mortality Among Adults Aged 25 and Over in the United States, 2000-2016. *NCHS Data Brief*, 1-8.
- YAO, J., HONG, W., HUANG, J., ZHAN, K., HUANG, H. & HONG, M. 2012. N-Glycosylation dictates proper processing of organic anion transporting polypeptide 1B1. *PLoS One*, 7, e52563.
- ZAIR, Z. M., ELORANTA, J. J., STIEGER, B. & KULLAK-UBLICK, G. A. 2008. Pharmacogenetics of OATP (SLC21/SLCO), OAT and OCT (SLC22) and PEPT (SLC15) transporters in the intestine, liver and kidney. *Pharmacogenomics*, 9, 597-624.
- 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 Biol Ther*, 16, 215-8.
- ZHANG, E. Y., KNIPP, G. T., EKINS, S. & SWAAN, P. W. 2002. Structural biology and function of solute transporters: implications for identifying and designing substrates. *Drug Metab Rev*, 34, 709-50.
- ZHANG, J., ZONG, Y., XU, G. Z. & XING, K. 2016. Erlotinib for advanced hepatocellular carcinoma. A systematic review of phase II/III clinical trials. *Saudi Med J*, 37, 1184-1190.
- ZHANG, Y., CSANAKY, I. L., LEHMAN-MCKEEMAN, L. D. & KLAASSEN, C. D. 2011. Loss of organic anion transporting polypeptide 1a1 increases deoxycholic acid absorption in mice by increasing intestinal permeability. *Toxicol Sci*, 124, 251-60.
- ZHANG, Y., CSANAKY, I. L., SELWYN, F. P., LEHMAN-MCKEEMAN, L. D. & KLAASSEN, C. D. 2013. Organic anion-transporting polypeptide 1a4 (Oatp1a4) is important for secondary bile acid metabolism. *Biochem Pharmacol*, 86, 437-45.
- ZHONG, S., ZHANG, Y. & XIU, Z. 2010. Rescoring ligand docking poses. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 13, 326-34.
- ZIMMERMAN, E. I., HU, S., ROBERTS, J. L., GIBSON, A. A., ORWICK, S. J., LI, L., SPARREBOOM, A. & BAKER, S. D. 2013. Contribution of OATP1B1 and OATP1B3 to the disposition of sorafenib and sorafenib-glucuronide. *Clin Cancer Res*, 19, 1458-66.
- ZOMOT, E., YARDENI, E. H., VARGIU, A. V., TAM, H. K., MALLOCI, G., RAMASWAMY, V. K., PERACH, M., RUGGERONE, P., POS, K. M. & BIBI, E. 2018. A New Critical Conformational Determinant of Multidrug Efflux by an MFS Transporter. *J Mol Biol*, 430, 1368-1385.

7.ENGLISH SUMMARY

UNIVERSITY OF SALAMANCA

FACULTY OF PHARMACY

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE

**DEVELOPMENT OF NOVEL COMPOUNDS FOR HEPATOBILIARY
FUNCTION EVALUATION AND LIVER CANCER TREATMENT
TARGETED WITH BILE ACIDS BY 1,3-DIPOLAR CYCLOADDITION**

Presented by **Álvaro Gacho Temprano** to obtain the PhD in the University of Salamanca

2021

BACKGROUND

One of the strategies used in drug design consists of vectorizing a compound with known pharmacological or diagnostic activity by conjugation with another molecule that facilitates its access to the target tissue in the most selective possible way. In this sense, in the case of anti-tumour therapy, the aim is to increase the uptake of the drug by cancer cells, limiting its accumulation in healthy tissues and thereby reducing its side effects. In this sense, different membrane transporters involved in the uptake of bile acids (BAs), such as NTCP (Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide), and several members of the OATP (Organic Anion Transporting Polypeptide) family expressed in enterohepatic cells are excellent targets for the development of new compounds with organotropic properties towards the liver and intestine. Furthermore, tyrosine kinase inhibitors (TKIs) represent one of the most innovative classes of anti-tumour agents for the treatment of different types of cancer, including liver and gastrointestinal ones, since they act by inhibiting both tumour cell proliferation and angiogenic processes. Besides, many TKIs are orally active and have a safety profile that makes them good candidates for combination with other forms of chemotherapy or radiotherapy. Some of them have been approved or are in clinical trials for the treatment of hepatocarcinoma (HCC) and cholangiocarcinoma (CCA), such as erlotinib and sorafenib. Erlotinib has a good tolerability profile but limited clinical activity in these patients, while sorafenib, used as first-line treatment for HCC, is the most effective and has a good tolerability margin.

However, despite advances in the development of new drugs, survival in some patients is poor due to the development of pharmacoresistance mechanisms (MPRs) in tumour cells. Among the 7 groups of MPRs that have been described, MPR-1a and MPR-1b, which include a reduction in the uptake of the drug by tumour cells and an increase in the cytostatic agent efflux, respectively, manage to reduce the concentration of drug inside the cell, decreasing anti-tumour efficacy.

On the other hand, in current clinical practice, magnetic resonance with gadoxetate and cholescintigraphy with iminodiacetic acid derivatives are used to diagnose hepatobiliary diseases in patients, however there are a very limited number of molecules with a marked vectoriality towards hepatocytes, cholangiocytes, and ileocytes that can also be used as markers for the study of liver function.

Due to BAs structure, they can be considered as ideal molecules for the binding of a large number of pharmacological substances that could be conjugated attached to different positions of the steroid skeleton or side chain. In this regard, in the literature there are a large number of BAs derivatives linked to amino acids, peptides, heparin, insulin, antiviral and anti-tumour drugs, for the treatment of various liver pathologies. Therefore we explored the use BAs as "Trojan horses" for vectorizing TKIs, or an agent that could be used for radiodiagnosis.

AIMS

The overall objective of the work presented in this Doctoral Thesis is to develop new vectorized strategies for the treatment of liver tumours, making use of 1,3-dipolar cycloaddition reactions, to obtain BA derivatives that possess hepatotropic characteristics, as well as cytostatic or Near Infrared Fluorescence (NIR) properties.

To achieve the global objective, the following partial objectives were proposed and are developed in chapters 1 and 2.

Chapter 1: Synthesis and *in vitro* evaluation of a family of compounds called BATKIs (Bile Acid-Tyrosine Kinase Inhibitor) with organotropic and antitumour properties.

Objective 1: Development of chemical strategies for the conjugation of BA to TKIs employing a BA analogue with a suitable spacer. For this purpose, we will use 1,3-dipolar cycloaddition reactions, using Cu(I) as a catalyst, to obtain the 1,4-disubstituted regioisomer. The aim of obtaining this regioisomer is to avoid steric hindrance when the BAs skeleton interacts with its specific transporters in the hepatocyte membrane.

Objective 2: To synthesize a new battery of compounds called BATKIs, through the conjugation of Cholic Acid (CA) or Glycocholic Acid (GCA) with the TKIs erlotinib and sorafenib. The compounds will be characterized by ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopic techniques, infrared (IR), and HRMS techniques, to establish their structures.

Objective 3: *In vitro* evaluation of the hepatotropism and the antiproliferative and toxic effect of compounds of the BATKI family on different cell lines from liver tumours which overexpressing BA transporters. The uptake and cytostatic capacity of these vectorized compounds will be determined comparing with the TKIs of origin.

Chapter 2: Synthesis and *in vitro/in vivo* evaluation of a molecule with fluorescence in the NIR with hepatotropism using BA as shuttles of the fluorophore, named NIRBAD (Near Infrared Radiation Bile Acid Derivative).

To achieve this overall objective, the following sub-objectives are proposed:

Objective 1: To apply the strategies developed in Chapter 1 for the conjugation of steroids to a fluorescent molecule emitting in the NIR spectrum by the combination of CA-derived azide using click chemistry. The NIRBAD compound will be characterized by ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopic techniques and HRMS, to establish the structure of the compound.

Objective 2: To study NIRBAD1 vectoriality towards enterohepatic circuit *in vitro* and *in vivo* by flow cytometry techniques in different cell lines overexpressing specific BA transporters and by real time visualization in high-resolution image equipment at NIR emission wavelength and *in vivo* model in rats.

Objective 3: To analyze the interactions between the compound NIRBAD and the main carriers involved in its uptake using molecular dynamics studies on the transporter proteins for which NIRBAD is a substrate.

MATERIAL AND METHODS

In vitro assays

To determine cytostatic activity CHO, Alexander and TFK cells were plated onto 96-well plates. After 24 h, the cells were treated with different concentrations of the BTKIs, sorafenib and erlotinib compounds to be tested. Cell viability was determined 72 h after incubation of cells to the compounds by the formazan test by using thiazolyl blue tetrazolium bromide (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) as a reagent. The captation of BTKIs, sorafenib, erlotinib and NIRBAD compounds was evaluated using fluorescence probes in combination with flow cytometry in CHO cell line.

In vivo assays

NIRBAD and alkyno cyanine 718 administration (1000 nmol) (i.v.) to anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/Kg) control rats (males, 200-250 g) was injected. Determination of hepatic fluorescence due to NIRBAD and the alkyno cyanine 718 was carried out with a high-sensitive (3.2 MP) CCD camera (Luminescent Image Analyzer LAS-4000 imaging system. Fujifilm Life Science).

NIR fluorescence dynamics detected by NIRBAD and the alkyno cyanine 718 was studied in the liver directly by laparotomy or trans-abdominally in the intact animal. Blood and bile secretion studies were carried out in the same experiment following a protocol described (Monte et al., 1997). Serum markers of hepatic and renal toxicity were measured. Bile samples were collected throughout the experiment. Bile flow was determined gravimetrically.

Homology modelling

The 3D structures of OATPs and their extracellular domain were generated by homology modelling using the Prime software, version 2.1 (Schrodinger) (Bell et al.). The sequence of human OATP1B1 gene and OATP1B3 gene were retrieved from the Uniprot database (Bairoch et al., 2005), (Consortium, 2019) under the accession codes Q9Y6L6 and Q9NPD5, respectively.

Structural templates homologues of OATP proteins were searched by the SWISS-MODEL Workspace/ GMQE (Waterhouse et al., 2018). The crystallographic structure of the multidrug transporter MdfA coded by PDB-ID: 6euq at 2.20 Å resolution (Zomot et al., 2018) and the crystallographic structure for the large extracellular region of the Kazal-type serine protease inhibitors coded by PDB-ID: 2erw (Campos et al., 2012) were used as structural templates in homology modeling.

The sequences of the templates and the proteins OATPs were aligned using the ClustalX version 2.1 program (Larkin et al., 2007). The OATPs homology models generated and energy minimized as described above were used as rigid receptors in molecular docking simulations.

Once the decision was made to use both structures as templates for the comparative modelling of OATP, the structures of OATP1B1 and OATP1B3 were modelled using the Prime program included in the MAESTRO suite (Sastry et al., 2013). The resulting models were energy minimized using AMBER 18 (Salomon-Ferrer et al., 2013) in a rectangular box of TIP3P type water molecules and counter-ions buffering 8 Å from the protein.

The PyMOL software (<http://www.pymol.org>) was used to visualize the three-dimensional models. The electrostatic surface potential of the models was calculated by APBS version 27 (Baker et al., 2001) with the default parameter settings.

Molecular dynamics (MD) simulations

The interaction between the homology model of the extracellular region comprised between H9 and H10 with BA was investigated by MD simulations. MD simulations were carried out by Amber18. The ff14SB41 force field (Maier et al., 2015) was used to parametrize the protein, while the General Amber Force Field (GAFF) (Wang et al., 2014) was used for BA. In order to keep the systems electrically neutral, the total charge was neutralized by the addition of Na⁺ counterions. MD trajectories were processed by the cpptraj software (Roe and Cheatham, 2013) and analyzed in terms of root-mean-square deviation (RMSD) and cluster analysis. Intermolecular recognition between BA and the extracellular domain was simulated by MD in three replicas, starting from slightly different initial locations of the fragment in the solvent surrounding the protein.

Molecular docking

Docked poses were re-scored using different scoring functions (GoldScore, PLP, ScorePose and XScore) (Jones et al., 1997) (Zhong et al., 2010) (Wang et al., 2003).

The molecules were drawn in 2D with picto in SMILES format and were converted in 3D coordinates with OMEGA (Openeye) version 3.1.0.3 (Hawkins et al., 2010). Their protonation state was assigned by QUACKPAC (Openeye) version 2.0.0.3 (Hawkins et al., 2010) and then, compounds were energy minimized by Szybki (OpenEye) version 1.10.0.3, (Hawkins et al., 2010) using the MMFF94S force field. Molecular docking simulations were carried out with GOLD version 5.6.3 using the ChemScore scoring function (Jones et al., 1997) with the maximum docking accuracy and keeping the best pose for each compound.

General experimental procedures

Solvents were purified by standard procedures and distilled before use. Reagents and starting materials obtained from commercial suppliers were used without further purification. IR spectra were recorded as a neat film or in Nujol and frequencies are given in cm^{-1} . Melting points are given in $^{\circ}\text{C}$. NMR spectra were recorded on 200 MHz and 400 MHz spectrometers. ^1H NMR chemical shifts are reported in ppm with tetramethylsilane (TMS) as the internal standard. Data for ^1H NMR are reported as follows: chemical shift (in ppm), number of hydrogen atoms, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, m = multiplet, s = broad singlet), coupling constant (Hz). Splitting patterns that could not be clearly distinguished are denoted as multiplets (m). Data for ^{13}C NMR are reported in ppm and hydrogen multiplicity is included. High-resolution mass spectral analyses (HRMS) were performed using ESI ionization and a quadrupole TOF mass analyzer. Flash chromatography was performed on 70–200 mesh silica gel.

Synthesis

General method for obtaining triazoles from BA-derived azides:

To a mixture of BA-derived azide (12 mmol), sodium ascorbate (10 mmol), copper sulphate pentahydrate (1 mmol) and alkyne (10 mmol) is added a mixture of distilled water and *tert*-butanol. The mixture is left to react at room temperature under stirring in an argon atmosphere. After 48 hours, ice is added to the reaction mixture, stirred for a few minutes and then extracted with AcOEt (x3). The organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography over SiO_2 using a mixture of $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ as the eluent to isolate the azide compound.

CHAPTER 1: SYNTHESIS OF VECTORIZED CYTOSTATIC AGENTS FOR THE TREATMENT OF LIVER AND DIGESTIVE CANCER

Introduction

There is a wide variety of compounds derived from BAs with a marked tropism towards the tissues of the enterohepatic circuit. This property is due to the presence of specific transporters located in the plasma membrane of the cells conforming in these organs, such as proteins involved in the uptake of organic anions (NTCP, ASBT and OATPs) and cations (OCTs) and the passive (OST α/β) or active (BSEP, MRP2, MRP3 and MRP4) export systems of these compounds (Jetter and Kullak-Ublick, 2020).

Modified BAs have pharmaceutical importance for the design of new drugs, with potential utility in regulating plasma cholesterol levels, dissolving gallstones and treating cancer (Sarenac and Mikov, 2019).

Click chemistry, thanks to the great versatility between azides and terminal acetylenes, has been a very useful resource for the design of new molecules with potential pharmacological activity, however, to date this strategy has not been used for the synthesis of BAs derivatives linked to TKIs with the aim of generating new molecules with improved properties against liver cancer.

TKIs such as erlotinib and sorafenib used in clinical trials oral in the treatment of HCC prevent phosphorylation of various TKRs by competing with ATP binding to their catalytic domain. Since the catalytic domain of these receptors is highly conserved, several TKIs can develop their inhibitory effect on a broad spectrum of kinases, thereby affecting multiple signalling pathways (Arora and Scholar, 2005).

Erlotinib, sold under the brand name Tarceva®, is a drug used for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) and pancreatic cancer, which is currently being investigated for the treatment of HCC (Zhang et al., 2016), (Tella et al., 2021). Its target is EGFR or HER, a TKR ubiquitously expressed in the body, whose expression levels are elevated in cancer cells, and which has been recognised as a key mediator of tumourigenesis in many human epithelial cancers (Abdelgalil et al., 2020), (Landi and Cappuzzo, 2015).

Once its ligand binds to EGFR, it dimerizes to form a homodimer to which an ATP molecule subsequently binds, resulting in the phosphorylation of two tyrosine residues. This

process trigger a cascade of intracellular signals that activate different processes such as cell proliferation, differentiation and survival (Hidalgo and Bloedow, 2003). When erlotinib binds to the EGFR, it does so in the ATP binding and hydrolysis pocket, thus preventing this process, inhibiting the signalling cascades, setting off a process of cell death by apoptosis.

However, despite the good results obtained with the use of erlotinib in certain types of tumours, on the one hand, its use in HCC has not yet been shown to be superior to first-line therapies and, on the other hand, the administration of this TKI also generates a series of side effects, among which the following stand out: skin rash, joint pain, muscle pain, and cough (Roe et al., 2006), (de Noronha e Menezes et al., 2009). In addition, serious side effects such as lung problems, kidney or liver failure, stroke and corneal ulceration have also been reported (Methvin and Gausas, 2007). All of these side effects are due to the action of erlotinib in inhibiting EGFR throughout the body due to its dissemination through the bloodstream. For this reason, if a vectorization of the compound is achieved, directing it to the tumour site, such as the liver in the case of HCC, these adverse effects could be partially resolved, improving the patient's standard of living during treatment.

Sorafenib, sold under the brand name Nexavar®, is an antineoplastic drug approved by the FDA (United States) and EMA (European Union) for the treatment of different types of cancer such as HCC (first-line treatment) (Llovet et al., 2008), (Llovet et al., 2018) advanced renal carcinoma and the treatment of advanced thyroid carcinoma refractory to radioactive iodine treatment.

Sorafenib, is an inhibitor of several tyrosine kinase receptors (TKRs) and is considered a drug with high antineoplastic efficacy due precisely to this multikinase inhibitory activity and is, as previously mentioned, currently the drug of choice for the pharmacological treatment of advanced HCC (Llovet et al., 2008). Its molecular targets are proteins of the RAS/RAF/MEK/ERK pathway such as C-RAF, the wild-type form of B-RAF and its mutant variant V600E mutant B-RAF, MEK and ERK (Peck-Radosavljevic, 2014), (Zhang et al., 2015). On the other hand, it is able to set off apoptotic mechanisms by blocking the Mcl-1 protein (Liu et al., 2006). It is also able to interact with VEGFR, PDGFR, c-KIT, FLT-3 and the RET receptor, leading to inhibition of angiogenesis (Wilhelm et al., 2004). Although sorafenib has demonstrated its ability to prolong patient survival, and some clinical cases have shown long-term complete disease remission (Park et al., 2017), the results are generally modest, with median survival being 2-3 months longer compared to untreated patients (Llovet et al., 2008).

Despite the therapeutic benefits obtained in the treatment of HCC with sorafenib, the available data regarding the usefulness of this TKI in another type of liver cancer, CCA, are controversial. Sorafenib inhibits the MAPK pathway in human HCC cell lines, inducing cell cycle arrest (Huether et al., 2007). Although sorafenib is generally well tolerated by CCA patients (Pan et al., 2017), the effect on their survival remains to be elucidated. Therefore, in general, sorafenib treatment in patients with liver tumours has moderate and transient beneficial effects, however, its efficacy is often reduced due to different MPRs, as well as some toxic effects, such as dermal conditions causing "hand-foot syndrome", hypertension, fatigue, proteinuria and, more rarely, very serious adverse cardiovascular effects (Li et al., 2015).

Conclusions:

Conclusion one: A new family of bile acid (BA) derivatives linked to pharmacologically active molecules currently used in the treatment of liver cancer (sorafenib and erlotinib) that are receptor tyrosine kinase inhibitors (TKIs), has been synthesised, purified and chemically characterized. This new family called BATKI has been designed based on a conjugation strategy between the molecules of interest that involves the formation of triazoles as a connecting fragment between them, thanks to 1,3-dipolar Huisgen cycloadditions also known as click chemistry. The compounds BATKI-1, erlotinib derivatives linked to cholic acid (CA), BATKI-1C, or to glycocholic acid (GCA), BATKI-1G; and BATKI-2, sorafenib derivatives linked to CA, BATKI-2C, or to GCA, BATKI-2G, have been obtained with good yields, degree of purity and characterisation by the usual spectroscopic techniques.

Conclusion two: BATKIs have demonstrated antiproliferative activity in a dose-dependent manner in *in vivo* vectorized models of enterohepatic and human hepatocarcinoma (HCC) and cholangiocarcinoma (HCC), reducing cell viability with similar potency to the drug from which they are derived. In cytotoxicity assays in short exposure periods (from 2-6 h) BATKIs showed superior anti-tumour activity in HCC lines overexpressing BAs transporters, revealing their targeting capacity.

Conclusion three: Uptake studies performed using flow cytometry to identify potential BAs transporters that could be the entry pathway for the synthesized compounds showed that BAs-derived molecules functionalized with a fluorophore in the side chain and thus with a similar structure to BATKIs such as cholyglycylamidofluorescein (CgamF), can be substrates of OATP1B3. This uptake is inhibited by natural substrates of this polypeptide,

such as taurocholic acid, and more effectively by BATKIs, suggesting that the new molecules synthesized could be substrates of this transporter.

Conclusion four: The results obtained in docking studies were concordant with those obtained in biological assays, as the enzyme-substrate binding energies between different tyrosine kinase receptors (TKRs) and the BATKI compounds and their hydrolysis by-product are very similar to those found by XR crystallography of the TKI from which they are derived. These observations would justify that the BATKIs maintain their cytostatic activity and that this has not been altered by the chemical modifications necessary for their vectorization.

CHAPTER 2: SYNTHESIS OF PROBES FOR THE NON-INVASIVE ASSESSMENT OF LIVER FUNCTIONALITY IN REAL TIME

Introduction

There are a limited number of molecules that can be used as markers for the study of liver function. These include some BAs derivatives radioactively labelled with [^{14}C] and [^3H] and [^8F]-fluorocholeic acid, or with fluorochromes such as IGBT, CGamF (used as a tool in the experiments in the previous chapter) and its derivatives, nitrobenzoxadiazolisine cholate and its derivatives, and dansyl cholate and its derivatives, among others (Holzinger et al., 1997), (Blazquez et al., 2012); (De Lombaerde et al., 2017).

However, their usefulness is limited to *in vivo* laboratory models. Moreover, in the case of fluorescent markers, the range of the spectrum in which their emission wavelength is located makes them incompatible for simultaneous use in multiparametric assays, due to their overlap with the emission spectra of other tracers commonly used in immunohistochemistry and immunofluorescence. This fact hinders its usefulness in colocalization studies with other markers commonly used in basic and preclinical research.

On the other hand, for the diagnosis of hepatobiliary diseases (focal lesions, tumours, cholestasis, etc.), magnetic resonance with gadoxetate and cholescintigraphy with iminodiacetic acid and technetium derivatives are used, radiopharmaceuticals that lack a structure that confers them enterohepatic vectorisation and therefore tissue specificity (Van Beers et al., 2015).

Despite the existence of probes that maintain the steroid structure and other contrast agents that lack it, advances in imaging systems in biomedical experimentation, as well as the development of new innocuous/non-invasive techniques for patient imaging such as those based on near-IR fluorescence (NIR), make it necessary to expand the panel of marker molecules to give versatility to these tools for multi-parametric studies such as subcellular colocalization in fluorescence and confocal microscopy, flow cytometry, *in vivo* immunofluorescence assays and high-resolution diagnostics.

Moreover, NIR fluorescence imaging offers exciting possibilities for real-time recording of biological processes and visualisation of specific tissue regions within whole organisms. Since indocyanine green was first used for angiography in the 1970s, considerable progress has been made in NIR imaging for use in blood vessel mapping and integrity testing, intraoperative identification of malignant nodules in oncological surgeries and others. The interest in NIR fluorescence (700-900 nm) is due not only to its innocuousness, but also to the permeability of tissues to this radiation, as it can be detected from outside the body, without any surgical intervention, with minimal discomfort and risk to the individual and with very little background noise, as it reduces the emission of endogenous chromophores that may be considered competitors and that could reduce its detection.

All these applications are due to the fact that IR light is able to penetrate tissues as scattering in living tissue is much higher than absorption (Mondal et al., 2014), (MANIEWSKI R. , 2004) giving studies based on NIR spectroscopy a diagnostic capability by providing real-time information on the various physiological and pathological processes occurring in tissues and organs.

The NIR spectrum is the result of overtones and bands generated by the different functional groups such as C-H, N-H and O-H and the technology of NIR studies can be applied to a wide range of fields as an important analytical tool for different products in the food, chemical, biochemical, environmental, pharmaceutical and medical industries (Roggo et al., 2007).

Technically speaking, NIR involves a beam of light that, when interacting with a biological material, specific bonds between atoms vibrate at a certain frequency, absorbing NIR of a specific wavelength depending on the functional groups, while all other wavelengths are reflected. Subsequently, the different wavelengths emitted are measured to analyse the data obtained by a microprocessor. The penetration depth of the beam into the sample is not determined by the position of the detector but rather by the power of the light source, which is why NIR is an ideal technology for fast and accurate analysis. Because

the emitted NIR depends on the different chemical functional groups, it provides a broad spectrum of information on the chemical composition related to the composition of the sample being analysed.

On the other hand, NIR technology is based on the absorption of specific chromophores across wavelengths. In this way, a given beam of light generated at a constant intensity can select wavelengths that pass through the tissue and are in turn detected in order to identify a given chromophore.

The availability of a contrast agent in this radiation band for use in combination with other imaging techniques currently used in the diagnosis of pathologies of the enterohepatic circuit would therefore be advantageous for clinical practice.

Conclusions

Conclusion one: A CA-derived compound conjugated to a molecule possessing a chromophore in its structure has been obtained, giving it fluorescence emission properties in the NIR region.

By applying 1,3-dipolar Huisgen cycloaddition strategy, a compound called NIRBAD has been obtained, binding a CA derivative with alkynocyanine 718.

Conclusion two: It has been shown that NIRBAD has a marked tropism towards the enterohepatic system, demonstrating that it can be used to study liver function in laboratory animals without the need for invasive interventions. Furthermore, NIRBAD has been shown to be non-hepatotoxic, as it does not reduce bile flow or induce significant changes in biomarkers of nephrotoxicity or hepatotoxicity.

Conclusion three: Studies performed using flow cytometry to identify potential BA transporters that could take up NIRBAD into the cell showed that it is a substrate of the OATP1B3 transporter in a TCA-inhibitable way.

Conclusion four: The results obtained by reconstructing the OATP1B1 and OATP1B3 transporters by structural homology and by performing docking studies with NIRBAD have shown a possible mechanism of interaction between the compound and the protein. Molecular dynamics analysis of the extracellular part between the H9 and H10 regions of the OATP1B1 transporter has allowed us to propose that the first interaction between a natural BA and this protein takes place via the steroid skeleton, with the side chain not interfering in this process, so that BA derivatives obtained by modification of the side chain can continue to be substrates of the OATP family of transporters, as we have shown for the BATKIs and NIRBAD compounds.

Bibliography

- ABDELGALIL, A. A., AL-KAHTANI, H. M. & AL-JENOABI, F. I. 2020. Erlotinib. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*, 45, 93-117.
- ARORA, A. & SCHOLAR, E. M. 2005. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther*, 315, 971-9.
- BAIROCH, A., APWEILER, R., WU, C. H., BARKER, W. C., BOECKMANN, B., FERRO, S., GASTEIGER, E., HUANG, H., LOPEZ, R., MAGRANE, M., MARTIN, M. J., NATALE, D. A., O'DONOVAN, C., REDASCHI, N. & YEH, L. S. 2005. The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res*, 33, D154-9.
- BAKER, N. A., SEPT, D., JOSEPH, S., HOLST, M. J. & MCCAMMON, J. A. 2001. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 10037-41.
- BELL, J. A., CAO, Y., GUNN, J. R., DAY, T., GALLICCHIO, E., ZHOU, Z., LEVY, R. & FARID, R. PrimeX and the Schrödinger computational chemistry suite of programs. *International Tables for Crystallography*.
- BLAZQUEZ, A. G., BRIZ, O., ROMERO, M. R., ROSALES, R., MONTE, M. J., VAQUERO, J., MACIAS, R. I., CASSIO, D. & MARIN, J. J. 2012. Characterization of the role of ABCG2 as a bile acid transporter in liver and placenta. *Mol Pharmacol*, 81, 273-83.
- CAMPOS, I. T., SOUZA, T. A., TORQUATO, R. J., DE MARCO, R., TANAKA-AZEVEDO, A. M., TANAKA, A. S. & BARBOSA, J. A. 2012. The Kazal-type inhibitors infestins 1 and 4 differ in specificity but are similar in three-dimensional structure. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 68, 695-702.
- CONSORTIUM, U. 2019. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res*, 47, D506-D515.
- CHOUDHURI, S. & KLAASSEN, C. D. 2020. Elucidation of OATP1B1 and 1B3 transporter function using transgenic rodent models and commonly known single nucleotide polymorphisms. *Toxicol Appl Pharmacol*, 399, 115039.
- DE LOMBAERDE, S., NEYT, S., KERSEMANS, K., VERHOEVEN, J., DEVISSCHER, L., VAN VLIERBERGHE, H., VANHOVE, C. & DE VOS, F. 2017. Synthesis, in vitro and in vivo evaluation of 3beta-[18F]fluorocholeic acid for the detection of drug-induced cholestasis in mice. *PLoS One*, 12, e0173529.
- DE NORONHA E MENEZES, N. M., LIMA, R., MOREIRA, A., VARELA, P., BARROSO, A., BAPTISTA, A. & PARENTE, B. 2009. Description and management of cutaneous side effects during erlotinib

- and cetuximab treatment in lung and colorectal cancer patients: a prospective and descriptive study of 19 patients. *Eur J Dermatol*, 19, 248-51.
- GLAESER, H., MANDERY, K., STICHT, H., FROMM, M. F. & KONIG, J. 2010. Relevance of conserved lysine and arginine residues in transmembrane helices for the transport activity of organic anion transporting polypeptide 1B3. *Br J Pharmacol*, 159, 698-708.
- HAWKINS, P. C. D., SKILLMAN, A. G., WARREN, G. L., ELLINGSON, B. A. & STAHL, M. T. 2010. Conformer Generation with OMEGA: Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 50, 572-584.
- HIDALGO, M. & BLOEDOW, D. 2003. Pharmacokinetics and pharmacodynamics: maximizing the clinical potential of Erlotinib (Tarceva). *Semin Oncol*, 30, 25-33.
- HOLZINGER, F., SCHEINGART, C. D., TON-NU, H. T., EMING, S. A., MONTE, M. J., HAGEY, L. R. & HOFMANN, A. F. 1997. Fluorescent bile acid derivatives: relationship between chemical structure and hepatic and intestinal transport in the rat. *Hepatology*, 26, 1263-71.
- [HTTP://WWW.PYMOL.ORG](http://WWW.PYMOL.ORG). <http://www.pymol.org> [Online].
- HUETHER, A., HOPFNER, M., BARADARI, V., SCHUPPAN, D. & SCHERUBL, H. 2007. Sorafenib alone or as combination therapy for growth control of cholangiocarcinoma. *Biochem Pharmacol*, 73, 1308-17.
- JETTER, A. & KULLAK-UBLICK, G. A. 2020. Drugs and hepatic transporters: A review. *Pharmacol Res*, 154, 104234.
- JONES, G., WILLETT, P., GLEN, R. C., LEACH, A. R. & TAYLOR, R. 1997. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol*, 267, 727-48.
- LANDI, L. & CAPPUZZO, F. 2015. Experience with erlotinib in the treatment of non-small cell lung cancer. *Ther Adv Respir Dis*, 9, 146-63.
- LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P. A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I. M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J. & HIGGINS, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-8.
- LI, Y., GAO, Z. H. & QU, X. J. 2015. The adverse effects of sorafenib in patients with advanced cancers. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 116, 216-21.
- LIU, L., CAO, Y., CHEN, C., ZHANG, X., MCNABOLA, A., WILKIE, D., WILHELM, S., LYNCH, M. & CARTER, C. 2006. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res*, 66, 11851-8.
- LLOVET, J. M., MONTAL, R., SIA, D. & FINN, R. S. 2018. Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol*, 15, 599-616.
- 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., HAUSSINGER, D., GIANNARIS, T., SHAN, M., MOSCOVICI, M., VOLIOTIS, D. & BRUIX, J. 2008. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 359, 378-90.
- MAIER, J. A., MARTINEZ, C., KASAVAJHALA, K., WICKSTROM, L., HAUSER, K. E. & SIMMERLING, C. 2015. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J Chem Theory Comput*, 11, 3696-713.
- MANDERY, K., STICHT, H., BUJOK, K., SCHMIDT, I., FAHRMAYR, C., BALK, B., FROMM, M. F. & GLAESER, H. 2011. Functional and structural relevance of conserved positively charged lysine residues in organic anion transporting polypeptide 1B3. *Mol Pharmacol*, 80, 400-6.
- MANIEWSKI R. , L. A., KACPRZAK M., AND ZBIEÆ A. 2004. Selected applications of near infrared optical methods in medical diagnosis. *Institute of Biocybernetics and Biomedical Engineering, Polish Academy of Sciences Opto-Electron*, 12.

- MEIER-ABT, F., MOKRAB, Y. & MIZUGUCHI, K. 2005. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLCO superfamily: identification of new members in nonmammalian species, comparative modeling and a potential transport mode. *J Membr Biol*, 208, 213-27.
- METHVIN, A. B. & GAUSAS, R. E. 2007. Newly recognized ocular side effects of erlotinib. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg*, 23, 63-5.
- MONDAL, S. B., GAO, S., ZHU, N., LIANG, R., GRUEV, V. & ACHILEFU, S. 2014. Real-time fluorescence image-guided oncologic surgery. *Adv Cancer Res*, 124, 171-211.
- MONTE, M. J., EL-MIR, M. Y., SAINZ, G. R., BRAVO, P. & MARIN, J. J. 1997. Bile acid secretion during synchronized rat liver regeneration. *Biochim Biophys Acta*, 1362, 56-66.
- PAN, T. T., WANG, W., JIA, W. D. & XU, G. L. 2017. A single-center experience of sorafenib monotherapy in patients with advanced intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncol Lett*, 13, 2957-2964.
- PARK, J. G., TAK, W. Y., PARK, S. Y., KWEON, Y. O., JANG, S. Y., LEE, S. H., LEE, Y. R., JANG, S. K., HUR, K. & LEE, H. J. 2017. Long-term follow-up of complete remission of advanced hepatocellular carcinoma following sorafenib therapy: A case report. *Oncol Lett*, 14, 4853-4856.
- PECK-RADOSAVLJEVIC, M. 2014. Drug therapy for advanced-stage liver cancer. *Liver Cancer*, 3, 125-31.
- ROE, D. R. & CHEATHAM, T. E., 3RD 2013. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J Chem Theory Comput*, 9, 3084-95.
- ROE, E., GARCIA MURET, M. P., MARCUELLO, E., CAPDEVILA, J., PALLARES, C. & ALOMAR, A. 2006. Description and management of cutaneous side effects during cetuximab or erlotinib treatments: a prospective study of 30 patients. *J Am Acad Dermatol*, 55, 429-37.
- ROGGO, Y., CHALUS, P., MAURER, L., LEMA-MARTINEZ, C., EDMOND, A. & JENT, N. 2007. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *J Pharm Biomed Anal*, 44, 683-700.
- ROTH, M., OBAIDAT, A. & HAGENBUCH, B. 2012. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol*, 165, 1260-87.
- SALOMON-FERRER, R., CASE, D. A. & WALKER, R. C. 2013. An overview of the Amber biomolecular simulation package. *WIREs Computational Molecular Science*, 3, 198-210.
- SARENAC, T. & MIKOV, M. 2019. Cervical Cancer, Different Treatments and Importance of Bile Acids as Therapeutic Agents in This Disease. *Front Pharmacol*, 10, 484.
- SASTRY, G. M., ADZHIGIREY, M., DAY, T., ANNABHIMOJU, R. & SHERMAN, W. 2013. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J Comput Aided Mol Des*, 27, 221-34.
- TELLA, S. H., KOMMALAPATI, A. & MAHIPAL, A. 2021. Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: targeted therapies. *Chin Clin Oncol*, 10, 10.
- VAN BEERS, B. E., DAIRE, J. L. & GARTEISER, P. 2015. New imaging techniques for liver diseases. *J Hepatol*, 62, 690-700.
- WANG, K., LI, Y., ZHANG, L.-J., CHEN, X.-G. & FENG, Z.-Q. 2014. Synthesis and in vitro cytotoxic activities of sorafenib derivatives. *Chinese Chemical Letters*, 25, 702-704.
- WANG, R., LU, Y. & WANG, S. 2003. Comparative evaluation of 11 scoring functions for molecular docking. *J Med Chem*, 46, 2287-303.
- WATERHOUSE, A., BERTONI, M., BIENERT, S., STUDER, G., TAURIELLO, G., GUMIENNY, R., HEER, F. T., DE BEER, T. A. P., REMPFER, C., BORDOLI, L., LEPORE, R. & SCHWEDE, T. 2018. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*, 46, W296-W303.
- WEAVER, Y. M. & HAGENBUCH, B. 2010. Several conserved positively charged amino acids in OATP1B1 are involved in binding or translocation of different substrates. *J Membr Biol*, 236, 279-90.

- WILHELM, S., CARTER, C., LYNCH, M., LOWINGER, T., DUMAS, J., SMITH, R. A., SCHWARTZ, B., SIMANTOV, R. & KELLEY, S. 2006. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 5, 835-44.
- WILHELM, S. M., CARTER, C., TANG, L., WILKIE, D., MCNABOLA, A., RONG, H., CHEN, C., ZHANG, X., VINCENT, P., MCHUGH, M., CAO, Y., SHUJATH, J., GAWLAK, S., EVELEIGH, D., ROWLEY, B., LIU, L., ADNANE, L., LYNCH, M., AUCLAIR, D., TAYLOR, I., GEDRICH, R., VOZNESENSKY, A., RIEDL, B., POST, L. E., BOLLAG, G. & TRAIL, P. A. 2004. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res*, 64, 7099-109.
- 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 Biol Ther*, 16, 215-8.
- ZHANG, J., ZONG, Y., XU, G. Z. & XING, K. 2016. Erlotinib for advanced hepatocellular carcinoma. A systematic review of phase II/III clinical trials. *Saudi Med J*, 37, 1184-1190.
- ZHONG, S., ZHANG, Y. & XIU, Z. 2010. Rescoring ligand docking poses. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 13, 326-34.
- ZOMOT, E., YARDENI, E. H., VARGIU, A. V., TAM, H. K., MALLOCI, G., RAMASWAMY, V. K., PERACH, M., RUGGERONE, P., POS, K. M. & BIBI, E. 2018. A New Critical Conformational Determinant of Multidrug Efflux by an MFS Transporter. *J Mol Biol*, 430, 1368-1385.