

# VNiVERSiDAD D SALAMANCA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**EFFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE GENES  
SUPRESORES TUMORALES EN LA HETEROGENEIDAD  
DE LA QUIMIORRESISTENCIA DEL CARCINOMA  
HEPATOCELULAR. IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS  
DIANAS FARMACOLÓGICAS**

TESIS DOCTORAL

Anabel Sánchez Martín

2023



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de bioquímica y biología molecular



EFFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE GENES SUPRESORES  
TUMORALES EN LA HETEROGENEIDAD DE LA  
QUIMIORRESISTENCIA DEL CARCINOMA  
HEPATOCALULAR. IDENTIFICACIÓN DE NUEVA  
DIANAS FARMACOLÓGICAS

Memoria presentada por **Dña. Anabel Sánchez Martín** para optar  
al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca

Salamanca, 20 de diciembre de 2022



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

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "Efecto del silenciamiento de genes supresores tumorales en la heterogeneidad de la quimiorresistencia del carcinoma hepatocelular. Identificación de nuevas dianas terapéuticas" presentada por Dña. Anabel Sánchez Martín para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección conjunta del Dr. D. José Juan García Marín, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología, la Dra. Dña. Marta Rodríguez Romero, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, y el Dr. D. Óscar Briz Sánchez, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a 20 de diciembre de dos mil veintidós.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Ana Purificación Velasco Criado', enclosed within a blue oval scribble.

Fdo. Ana Purificación Velasco Criado



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

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "Efecto del silenciamiento de genes supresores tumorales en la heterogeneidad de la quimiorresistencia del carcinoma hepatocelular. Identificación de nuevas dianas terapéuticas" presentada por Dña. Anabel Sánchez Martín para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección conjunta del Dr. D. José Juan García Marín, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología, la Dra. Dña. Marta Rodríguez Romero, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, y el Dr. D. Óscar Briz Sánchez, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a 20 de diciembre de dos mil veintidós.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'M. Jesús Monte Río', written in a cursive style.

Fdo. M<sup>a</sup> Jesús Monte Río



D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA, Dña. MARTA RODRÍGUEZ ROMERO, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, Y D. ÓSCAR BRIZ SÁNCHEZ, PROFESOR CONTRATADO DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada "Efecto del silenciamiento de genes supresores tumorales en la heterogeneidad de la quimiorresistencia del carcinoma hepatocelular. Identificación de nuevas dianas terapéuticas" presentada por Dña. Anabel Sánchez Martín 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, expide y firma la presente certificación en Salamanca a 20 de diciembre de dos mil veintidós.



Fdo. José Juan García Marín



Fdo. Marta Rodríguez Romero



Fdo. Óscar Briz Sánchez



## FINANCIACIÓN

La doctoranda ha disfrutado durante la realización de esta Tesis Doctoral de un Contrato de Investigación para la formación de personal universitario (FPU), del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (BOE-B-2017-72875), y una ayuda complementaria de movilidad para estancias breves destinada a beneficiarios FPU (BOE-B-2020-18050) durante 3 meses en el Institute of Pathology de la Universidad de Regensburg (Alemania).

El desarrollo del trabajo experimental incluido en esta Memoria ha sido en parte financiado 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. Proyectos de investigación en salud (AES 2016). Modalidad proyectos en salud cofinanciados con Fondos FEDER. Proyecto PI16/00598. “Quimiorresistencia del adenocarcinoma gástrico: Caracterización de su huella genética y superación mediante edición genómica programada basada en CRISPR/Cas9”. Investigador Principal: José Juan García Marín. Periodo: 2017-2019.

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

Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III. Proyectos de Investigación en Salud (AES 2019). Proyecto PI19/00819. “Interés pronóstico y terapéutico de las proteínas SLC y ABC en adenocarcinomas hepáticos y gastrointestinales” Investigador principal: José Juan García Marín; Óscar Briz Sánchez (coIP). Periodo: 2020-2022.

Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III. Proyectos de Investigación en Salud (AES 2020). Modalidad proyectos en salud cofinanciados con Fondos FEDER. Proyecto PI20/00189 “Identificación de biomarcadores diagnóstico y pronóstico en pacientes con cáncer biliar”. Investigador Principal: Rocío I Rodríguez Macías. Periodo: 2021-2023.

Consejería de Educación, Junta de Castilla y León. Programa de apoyo a proyectos de investigación 2020. 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.

Asociación Española para el Estudio del Hígado. Beca Juan Córdoba 2021. “Role of microRNAs in the etiopathogenesis and chemoresistance of cholangiocarcinoma”. Investigador principal: Marta Rodríguez Romero.

## PUBLICACIONES

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

Alonso-Peña M, **Sanchez-Martin A**, Sanchon-Sanchez P, Soto-Muñiz M, Espinosa-Escudero RA, Marin JJM. Pharmacogenetics of hepatocelular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Cancer drug resistance*.2019; 2(3): 680–709.

Alonso-Peña M., Espinosa-Escudero RA, Soto-Muñiz M, Sanchon-Sanchez P, **Sanchez-Martin A**, Marin, JJM. Role of transportome in the pharmacogenomics of hepatocellular carcinoma and hepatobiliary cancer. *Pharmacogenomics*. 2019; 20(13): 957–970.

Marin JJG, Serrano MA, Monte MJ, **Sanchez-Martin A**, Temprano AG, Briz O, Romero MR. Role of Genetic Variations in the Hepatic Handling of Drugs. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21(8) 2884.

Marin JJG, Macias RIR, Monte MJ, Romero MR, Asensio M, **Sanchez-Martin A**, Cives-Losada C, Temprano AG, Espinosa-Escudero R, Reviejo M, Bohorquez LH, Briz O. Molecular Bases of Drug Resistance in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*. 2020; 12(6):1663.

Marin JJG, Perez-Silva L, Macias RIR, Asensio M, Peleteiro-Vigil A, **Sanchez-Martin A**, Cives-Losada C, Sanchon-Sanchez P, Sanchez De Blas B, Herraiez E, Briz O, Lozano E. Molecular Bases of Mechanisms Accounting for Drug Resistance in Gastric Adenocarcinoma. *Cancers*. 2020; 12(8): 2116.

Marin JJG, Romero MR, Herraiez E, Asensio M., Ortiz-Rivero S, **Sanchez-Martin A**, Fabris L, Briz O. Mechanisms of Pharmaco-resistance in Hepatocellular Carcinoma: New Drugs but Old Problems. *Seminars in liver disease*. 2022; 42(1): 87–103.

Espinosa-Escudero R, Herraiez E, **Sanchez-Martin A**, Sanchon-Sanchez P, Marin JJG, Monte MJ. Cholestasis Associated to Inborn Errors in Bile Acid Synthesis. *Exploration of Digestive Diseases*. 2022; 1:137-53.

Parte de los resultados obtenidos en esta Tesis doctoral han sido presentados en el siguiente congreso:

**Sanchez-Martín A**, Briz O, Asensio M, Romero MR, Gonzalez-Santiago JM, Serrano MA, Marin JJM. Impact of inactivating tumor suppressor genes on the multidrug resistance (MDR) phenotype of hepatocellular carcinoma cells. 4th Meeting of Translational Hepatology – Liver Cancer. Santiago de Compostela, 2022. Asociación Española para el Estudio del Hígado. Tipo de participación: póster.

Además, durante el periodo de desarrollo de esta Tesis Doctoral, la doctoranda ha colaborado en varios proyectos de investigación que han dado lugar a las siguientes contribuciones científicas:

### **Publicaciones**

Macias RIR, Muñoz-Bellvís L, **Sánchez-Martín A**, Arretxe E, Martínez-Arranz I, Lapitz A, Gutiérrez ML, La Casta A, Alonso C, González LM, Avila MA, Martinez-Chantar ML, Castro RE, Bujanda L, Banales JM, Marin JJG. A Novel Serum Metabolomic Profile for the Differential Diagnosis of Distal Cholangiocarcinoma and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers*; 2020; 12(6): 1433.

### **Comunicaciones a Congresos**

**Sánchez-Martín A**, Abete L, Di Giacomo S, Monte MJ, Lozano E, Marín JJG, Briz O. Sensibilización del cáncer hepático a la quimioterapia mediante la inhibición de bombas ABC con sesquiterpenos. 1ª Reunión de Hepatología Traslacional: Status Quo y nuevos horizontes en el estudio del hígado. San Sebastián, 2019. Asociación Española para el Estudio del Hígado. Tipo de participación: póster.

Macias RIR, Muñoz-Bellvís L, **Sánchez-Martín A**, Arretxe E, Martínez-Arranz I, Lapitz A, Gutiérrez ML, La Casta A, Alonso C, González LM, Avila MA, Martinez-Chantar ML, Castro RE, Bujanda L, Banales JM, Marin JJG. Identification of serum metabolic biomarkers for the differential diagnosis of distal cholangiocarcinoma and pancreas ductal adenocarcinoma. The 2020 Annual Conference Cholangiocarcinoma Foundation. Online. Tipo de participación: póster.

Macias RIR, **Sánchez-Martín A**, Arretxe E, Martínez-Arranz I, Lapitz A, Gutiérrez ML, La Casta A, Muñoz-Bellvís L, Alonso C, González LM, Avila MA, Martínez-Chantar ML, Castro RE, Bujanda L, Banales JM, Marin JJG. Usefulness of serum metabolic profiles for the differential diagnosis of distal cholangiocarcinoma and pancreatic ductal adenocarcinoma. International Liver Cancer Association Annual 2020 Virtual Conference. Tipo de participación: póster.

Macias RIR, Muñoz-Bellvís L, **Sánchez-Martín A**, Arretxe E, Martínez-Arranz I, Lapitz A, Gutiérrez ML, La Casta A, Alonso C, González LM, Avila MA, Martínez-Chantar ML, Castro RE, Bujanda L, Banales JM, Marin JJG. Identification of serum metabolic biomarkers for the differential diagnosis of distal cholangiocarcinoma and pancreas ductal adenocarcinoma. XIV Jornadas CIBER Enfermedades Hepáticas y Digestivas. Online, 2020. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas. Tipo de participación: póster.

Cives-Losada C, Asensio M, Lozano E, Peleteiro-Vigil A, **Sanchez-Martin A**, Carrillo J, Briz O, Cairo S, Poetz O, Hammer HS, Armengol C, Bruix J, Marin JJG, Macias RIR. Role of ABC drug efflux pumps in the resistance of hepatoblastoma to conventional chemotherapy. Liver Cancer Summit 2022. Online. European Association for the Study of the Liver. Tipo de participación: póster.

## AGRADECIMIENTOS

No quisiera finalizar mi Tesis Doctoral sin expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que, de una manera u otra, han contribuido a la realización de este trabajo y han hecho que el camino sea un poquito más fácil.

### **A mis directores de Tesis:**

Al Dr. José Juan García Marín, por permitirme formar parte de este maravilloso equipo. Por la confianza que depositaste en mí desde el principio, por valorarme y creer en mí, a veces incluso más que yo misma. Gracias por las horas de formación y dedicación, por tomarte con buen humor mis momentos de testarudez y, por supuesto, por tu gran preocupación tanto en lo profesional como en lo personal.

Al Dr. Óscar Briz, no sé si podré encontrar las palabras adecuadas para agradecerte todo lo que me has ayudado. Sin duda has sido el pilar fundamental de este trabajo. Gracias por transmitirme tu sabiduría y tu inquietud por la ciencia, por tener siempre la respuesta a todas mis dudas y por haberme guiado durante estos años. Pero, sobre todo, gracias por tus buenas palabras y tu templanza, por tu infinita paciencia conmigo y por mostrarme siempre el lado positivo de las cosas.

A la Dra. Marta Rodríguez Romero, por estar siempre dispuesta a ayudarme en todo lo que necesitara aun cuando no tenías tiempo, y hacerlo con tanta amabilidad. Gracias por tus ánimos en los momentos difíciles, por tu alegría y buen humor.

### **Al resto del HEVEPHARM y colaboradores:**

A la Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Serrano, por ser una gran profesional y tener un corazón tan grande a la vez. Por tu generosidad, tu valentía y tu actitud positiva ante las adversidades de la vida. Un ejemplo a seguir.

A la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Monte, por ser un ejemplo del trabajo bien hecho y por conseguir que el laboratorio siguiera en orden aun cuando éramos multitud. Porque el Hevepharm no sería lo mismo sin tu capacidad organizativa.

A la Dra. Rocío I. R. Macías, por abrirme las puertas del grupo e iniciarme en el mundo de la investigación. Por el tiempo que me has dedicado, siempre con una sonrisa y esa

gran dulzura que te caracteriza. Por mostrarme la parte más clínica de la investigación y transmitirme esos conocimientos que han enriquecido mi formación.

A la Dra. Elisa Herráez, por ser voz de experiencia en mis inicios. Por tu cercanía y tus sabios consejos cuando los polluelos estábamos empezando a andar.

A la Dra. Elisa Lozano, porque si hubiera más personas como tú, el mundo iría mucho mejor. Un ejemplo de esfuerzo y humildad. Gracias por tu amabilidad y tu ayuda, y por no dejar que ningún obstáculo te frene, ni siquiera un enorme ratón.

A la Dra. Sara Ortiz, la incorporación más reciente del grupo. En poco tiempo has conseguido hacerte un hueco muy grande. Gracias por tus grandes ideas y por los consejos que me has dado en los momentos más oportunos.

A la Dra. Maitane Asensio, por esa capacidad que tienes para relativizar los problemas y hacer que todo parezca más fácil. Gracias por transmitir siempre tu energía positiva, sin olvidar tu gran ayuda como Lab Manager.

A la Dra. Marta Alonso, la norteña más sureña, un torbellino que revoluciona el laboratorio y lo inunda con su alegría. Por los ratitos compartidos en las comidas y por ser un ejemplo de que hay que apostar por lo que uno quiere.

A la Dra. Meraris Soto, por los buenos momentos que trajiste al laboratorio y tus frases dramáticas que tanto nos hicieron reír. Por enseñarme un poquito de tu cultura y mostrarme cómo es una piña colada de verdad.

Al Dr. Álvaro Gacho, por ser una de las personas más generosas que he conocido. Por haberme ido ganando poco a poco y haberte convertido en un gran amigo. Por los ratos compartidos dentro y fuera del laboratorio y por tus “qué tal” tan poco inocentes que acababan en charlas confidenciales.

A la Dra. Ana Peleteiro, por todo lo que has aportado, no solo a mí, sino a todo el grupo. Gracias por estar al pie del cañón luchando por nuestros derechos y mantenernos al día de todas las novedades burocráticas. Por ser tan auténtica y valiosa en lo profesional y en lo personal.

A la Dra. Laura P. Silva, por tu sinceridad y tus buenos consejos, por mostrarme que a las cosas no hay que darles más importancia de la que merecen. Por ser un ejemplo de fortaleza y demostrar que ser madre e investigadora sí es posible.

Al Dr. Ricardo A. Espinosa, porque nuestra amistad comenzó con el Heartbreaking, y desde entonces ha ido creciendo día a día con cariño y muchos “*petitsuisse*s”. Gracias por hacer que las tardes en cultivos fueran mucho más agradables, pero sobre todo por estar ahí para escucharme y comprenderme, y por hacer que la recta final fuera más fácil.

A Paula, por haber compartido esta etapa juntas. Han sido más de cuatro años intensos en los que hemos pasado buenos y no tan buenos momentos, entre risas y baches, pero siempre nos quedarán los conciertos compartidos, nuestras tardes en el Haddock o las noches de Imprenta.

A Candela, por ser la pieza fundamental de este equipo. Por ofrecerme tu ayuda en innumerables ocasiones y por ser esa gran persona altruista que siempre suma en la vida de los demás. Por tu simpatía y por alegrarte siempre de corazón. Gracias, de verdad.

A Bea, mi compañera de música, pádel y gran amiga. Gracias por entenderme cuando pensaba que nadie podía hacerlo. Por llenar mi sitio de post-its y alegrar mis ratitos de ordenador. Por nuestros cafés y buenas conversaciones. Porque a tu lado es imposible no sonreír.

A María, la más joven del grupo, pero a la vez la más sabia. Por tu filosofía de vida y tu manera de ver las cosas. Por tu buen humor y tu capacidad para hacer que los jueves sean un poco más viernes.

A Emilia, por transformar el laboratorio en un lugar mejor. Gracias por contagiarnos tu alegría por las mañanas, por tu sentido del humor y por hacernos el trabajo un poco más fácil.

Al personal del Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca y a nuestras conserjes, por su gran labor.

A las personas del Departamento de Bioquímica y Biología molecular con las que he tenido la suerte de impartir docencia práctica, por considerarme una más en vuestro equipo.

Al Dr. Diego F. Calvisi, y al resto del equipo del Instituto de Patología de la Universidad de Regensburg, a la Dra. Sara Steinmann, Ingrid, Francesco y Manfred, que me acogisteis con tanto cariño durante la estancia. Gracias por vuestra amabilidad y vuestra ayuda. Parte de esta tesis es gracias a vosotros. También a todas las personas que conocí allí y me acompañaron durante esa bonita experiencia.

### **A mis amigos:**

A las de siempre, a Aida e Isa, por ser mi segunda familia. Porque, aunque nuestros caminos sigan su curso, estáis ahí incondicionalmente en todas las etapas de mi vida. Por apoyarme y no fallarme, gracias. Al resto de Huevonas, Silvia, Vero, Jenny y Conchi, porque lo que unió el Uribarri es difícil de romper, porque estar con vosotras es estar en casa.

A los Biotecs, por los buenos momentos que me llevo de mis inicios en la ciencia. En especial a Rebeca, por tu leal amistad durante todos estos años. Por nuestras profundas charlas siempre tan reconfortantes. Gracias por mantener la conexión Valladolid-Salamanca, que tan imprescindible es.

A todas las personas que Granada puso en mi camino. En especial a Ana, que desde que nos conocimos siempre ha estado ahí. Gracias por ser mi confidente y por nuestros audios de diez minutos que valen oro. A Isa, el rayo de luz que hizo de Granada un sitio aún más soleado. Por los momentos compartidos y tu risa contagiosa. Al resto de Genyos que marcaron un punto de inflexión en mi vida. A Iris y Joan, que me transmitisteis vuestra enorme vocación por la ciencia, y a Diego, Gon, Raquel, Fede y demás. Por hacer que disfrutara tanto de mi etapa pre-predocctoral.

A Alex, por estar aquí aun estando en Madrid. Por tu apoyo incondicional durante este año y por ser mi vía de escape. Gracias por mostrarme el mundo de otra manera y enseñarme que las águilas, cuando hay tormenta, vuelan por encima de ella.

### **A mi familia:**

A mis padres, por todo vuestro amor, comprensión y cariño. Gracias por todos los valores que me habéis inculcado y que me han convertido en quien soy. Por apoyarme incondicionalmente en todas las decisiones que he tomado, por estar a mi lado y creer en mí. A mi hermana, mi referente, porque como buena hermana pequeña seguí tus pasos, y gracias a ellos estoy hoy aquí. Por ser esa persona esencial en mi vida que me ha abierto los ojos en los momentos en los que más lo necesitaba. Los tres sois lo más importante que tengo, mi refugio. Gracias.



*A mis padres y a mi hermana,  
por apoyarme siempre.*



**Cada error en cada intersección,  
no es un paso atrás, es un paso más.**

*Vetusta Morla*



## ABREVIATURAS

<b>5-FU:</b>	5-fluorouracilo
<b>7-AAD:</b>	7-aminoaceticina D
<b>ABC:</b>	<i>ATP-binding cassette</i>
<b>AFP:</b>	$\alpha$ -Fetoproteína
<b>AFP-L3:</b>	$\alpha$ -Fetoproteína unida a lectina
<b>ALDH1A1:</b>	Enzima aldehído deshidrogenasa 1A1
<b>ANOVA:</b>	Análisis de varianza
<b>ATP:</b>	Adenosín trifosfato
<b>BCLC:</b>	<i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i>
<b>BCRP:</b>	<i>Breast cancer resistance protein</i>
<b>BSA:</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CAF:</b>	Cancer-associated fibroblast
<b>Cas9:</b>	<i>CRISPR-associated protein 9</i>
<b>CCA:</b>	Colangiocarcinoma
<b>cDNA:</b>	DNA complementario
<b>cfDNA:</b>	<i>Cell-free DNA</i>
<b>CFSE:</b>	Éster de succinimidil-carboxifluoresceína
<b>CI:</b>	Intervalo de confianza
<b>CRISPR:</b>	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
<b>CSC:</b>	<i>Cancer stem cell</i>
<b>Ct:</b>	Ciclo umbral
<b>CTCs:</b>	Células tumorales circulantes
<b>CYP:</b>	Citocromo P450
<b>dATP:</b>	Desoxiadenosina trifosfato
<b>DMEM:</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO:</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA:</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP:</b>	Desoxinucleósido trifosfato

<b>DPC:</b>	Des- $\gamma$ -carboxiprotrombina
<b>DSB:</b>	Corte de doble cadena
<b>DYPD:</b>	Dihidropirimidina deshidrogenasa
<b>ECL:</b>	<i>Enhanced chemiluminiscence</i>
<b>ECOG:</b>	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
<b>ECOG-PS:</b>	<i>Eastern Cooperative Oncology Group-Performance Status</i>
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EEM:</b>	Error estándar de la media
<b>eIF:</b>	Factor de iniciación de la traducción eucariótico
<b>EMA:</b>	Agencia Europa del Medicamento
<b>EMT:</b>	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
<b>ESMO:</b>	Sociedad Europea de Oncología Médica
<b>FACS:</b>	Clasificación de células activada por fluorescencia
<b>FBS:</b>	Suero bovino fetal
<b>FDA:</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FGFR:</b>	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos
<b>FLC:</b>	Carcinoma fibrolamelar
<b>FOLFOX:</b>	Ácido folínico, 5-fluorouracilo y oxaliplatino
<b>FPKM:</b>	<i>Fragments per kilobase of transcript per million mapped reads</i>
<b>FPKM-UQ:</b>	<i>Fragments per kilobase of transcript per million mapped reads upper quartile</i>
<b>Fw:</b>	<i>Forward primer</i>
<b>GDC:</b>	<i>Genomic Data Commons</i>
<b>gDNA:</b>	DNA genómico
<b>GDSC:</b>	<i>Genomics of Drug Sensitivity in Cancer</i>
<b>GLO:</b>	Control de carga del gel
<b>GSTP1:</b>	glutación-S-transferasa pi
<b>GTO:</b>	Proteína total del gel
<b>HCA:</b>	Adenoma hepatocelular

<b>HCC:</b>	Carcinoma hepatocelular
<b>HIF:</b>	Factor inducido por hipoxia
<b>HR:</b>	<i>Hazard ratio</i>
<b>HSC:</b>	Hepatic stellate cell
<b>IAP:</b>	Inhibidor de la apoptosis
<b>IC<sub>50</sub>:</b>	Concentración inhibitoria 50
<b>ICI:</b>	<i>Immune checkpoint inhibitor</i>
<b>IM:</b>	Metástasis intrahepática
<b>Indel:</b>	Inserción o deleción
<b>IP:</b>	Yoduro de propidio
<b>IPTG:</b>	Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>IQR:</b>	Rango intercuartílico
<b>KO:</b>	<i>Knock-out</i>
<b>KRT19:</b>	Queratina 19
<b>LB:</b>	Medio Luria-Bertani
<b>LCSC:</b>	<i>Liver cancer stem cell</i>
<b>LOH:</b>	Pérdida de heterocigosidad
<b>MDR:</b>	<i>Multidrug resistance</i>
<b>MEM:</b>	<i>Minimum Essential Medium</i>
<b>MMR:</b>	<i>Mismatch repair</i>
<b>MO:</b>	Origen multicéntrico
<b>MOC:</b>	<i>Mechanisms of chemoresistance</i>
<b>mRNA:</b>	RNA mensajero
<b>MRP:</b>	Proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos
<b>NAFLD:</b>	Enfermedad de hígado graso no alcohólico
<b>NASH:</b>	Esteatohepatitis no alcohólica
<b>NEHJ:</b>	Unión de extremos no homólogos
<b>NER:</b>	Reparación por escisión de nucleótidos
<b>NSG:</b>	Next generation DNA sequencing

<b>OATP:</b>	<i>Organic anion transporting polypeptides</i>
<b>ORF:</b>	Open reading frame
<b>PAM:</b>	Motivo adyacente al protoespaciador
<b>Pb:</b>	Pares de bases de nucleótidos
<b>PBS:</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDGFR:</b>	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PD-L1:</b>	Ligando de muerte celular programada 1
<b>PEI:</b>	Polietilenimina
<b>PIAF:</b>	Cisplatino, doxorubicina, 5-fluorouracilo e interferón $\alpha$
<b>qPCR:</b>	PCR cuantitativa
<b>RECIST:</b>	<i>Response Evaluation Criteria In Solid Tumors</i>
<b>RNA:</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNA-seq:</b>	<i>RNA sequencing</i>
<b>RQ:</b>	<i>Relative quantification</i>
<b>RSTK:</b>	<i>Receptor serine/threonine kinase</i>
<b>RT:</b>	Transcripción reversa
<b>Rv:</b>	<i>Reverse primer</i>
<b>SD:</b>	Desviación estándar
<b>SDS:</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SG:</b>	Supervivencia global
<b>SGC:</b>	<i>Single guide cassette</i>
<b>SLC:</b>	<i>Solute carrier protein</i>
<b>SOC:</b>	Medio súper óptimo con represor de catabolitos
<b>SPL:</b>	Smart Protein Layer
<b>SRB:</b>	Sulforodamina B
<b>TACE:</b>	Quimioembolización transarterial
<b>TAM:</b>	Macrófago asociado a tumores
<b>TAN:</b>	Neutrófilo asociado a tumores

<b>TBS:</b>	Tampón tris salino
<b>TCA:</b>	Ácido tricloroacético
<b>TCGA:</b>	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
<b>TCGA-LIHC:</b>	<i>The Cancer Genome Atlas Liver Hepatocellular Carcinoma</i>
<b>TF:</b>	Transcription Factor
<b>TGF-β:</b>	Factor de crecimiento transformante β
<b>TKI:</b>	<i>Tyrosine kinase inhibitors</i>
<b>TLDA:</b>	<i>Taqman low-density array</i>
<b>TOP2A:</b>	Topoisomerasa IIα
<b>UAF:</b>	Unidades arbitrarias de fluorescencia
<b>UGT1A9:</b>	UDP-glucuronil-transferasa 1A9
<b>VEGFA:</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular A
<b>VEGFR:</b>	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
<b>VHB:</b>	Virus de la hepatitis B
<b>VHC:</b>	Virus de la hepatitis C
<b>WT:</b>	<i>Wild-type</i>
<b>ZIP:</b>	<i>Zero interaction potency</i>
<b>λ:</b>	Longitud de onda



# ÍNDICE

<b>1. OBJETIVOS</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>2.1. EL CÁNCER HEPÁTICO</b>	<b>7</b>
2.1.1. Carcinoma hepatocelular	7
A. Epidemiología	8
B. Factores de riesgo	8
C. Patogenia	9
D. Vigilancia y diagnóstico del HCC	11
E. Estadíaaje y tratamiento	12
<b>2.2. MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA A LOS TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS DEL HCC</b>	<b>18</b>
2.2.1. Cambios en el transportoma (MOC-1)	19
2.2.2. Cambios en el metabolismo de fármacos antitumorales (MOC-2)	22
2.2.3. Cambios en las dianas moleculares (MOC-3)	23
2.2.4. Cambios en los mecanismos de reparación del DNA (MOC-4)	24
2.2.5. Cambios en el balance apoptosis/supervivencia (MOC-5)	25
2.2.6. Cambios en el microambiente tumoral (MOC-6)	29
2.2.7. Transición fenotípica (MOC-7)	31
<b>2.3. HETEROGENEIDAD EN EL HCC</b>	<b>33</b>
2.3.1. Tipos de heterogeneidad	33
2.3.2. Enfoques para estudiar la heterogeneidad tumoral	42
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>45</b>
<b>3.1. MATERIAL BIOLÓGICO</b>	<b>47</b>
3.1.1. Muestras humanas	47
3.1.2. Líneas celulares	48
3.1.3. Bacterias	49
<b>3.2. PRODUCTOS</b>	<b>49</b>

<b>3.3. MEDIOS INSTRUMENTALES</b>	<b>52</b>
<b>3.4. TÉCNICAS DE EDICIÓN GENÓMICA: CRISPR-CAS9</b>	<b>55</b>
3.4.1. Clonación del fragmento <i>sgc</i> en el vector pGEM-T	56
3.4.2. Diseño de las guías crRNA	57
3.4.3. Clonación de la secuencia codificante del crRNA en el vector pGEM- <i>sgcX</i>	58
3.4.4. Ensayo de detección de escisiones en el genoma o test de la endonucleasa T7	59
<b>3.5. CULTIVOS CELULARES</b>	<b>61</b>
3.5.1. Medios y procedimientos de cultivo	61
3.5.2. Cultivo de células para estudios de expresión génica	62
3.5.3. Obtención de modelos celulares <i>knockout</i> mediante CRISPR-	63
3.5.4. Estudios de viabilidad celular	65
3.5.5. Estudios de sinergia	65
3.5.6. Estudios de migración celular	65
3.5.7. Ensayo clonogénico o de formación de colonias	66
3.5.8. Ensayo de ciclo celular	67
3.5.9. Evaluación de la apoptosis	67
3.5.10. Estudio de la proliferación celular por citometría de flujo	68
<b>3.6. CULTIVO DE BACTERIAS</b>	<b>69</b>
3.6.1. Transformación bacteriana por choque térmico	69
3.6.2. Selección de colonias bacterianas y crecimiento en medio líquido	70
3.6.3. Purificación del DNA plasmídico de cultivos bacterianos	70
<b>3.7. MÉTODOS COMUNES DE BIOLOGÍA MOLECULAR</b>	<b>71</b>
3.7.1. PCR analítica de alta fidelidad	71
3.7.2. Electroforesis en geles de agarosa no desnaturalizante	71
3.7.3. Purificación del DNA contenido en geles de agarosa y de reacciones enzimáticas	72
3.7.4. Digestión con enzimas de restricción	72
<b>3.8. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE mRNA POR RT-QPCR</b>	<b>73</b>
3.8.1. Extracción de RNA total	73
3.8.2. Transcripción reversa (RT)	73

3.8.3. Diseño de <i>primers</i>	73
3.8.4. PCR cuantitativa (qPCR)	75
3.8.5. Tarjetas microfluídicas	76
<b>3.9. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT</b>	<b>77</b>
3.9.1. Soluciones empleadas	77
3.9.2. Obtención de homogeneizados de cultivos celulares	77
3.9.3. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida	78
3.9.4. Transferencia y tinción de la membrana con rojo Ponceau	79
3.9.5. Inmunodetección	79
3.9.6. Revelado	80
3.9.7. Cuantificación de la proteína de interés	81
<b>3.10. DETERMINACIONES ANALÍTICAS</b>	<b>81</b>
3.10.1. Cuantificación de ácidos nucleicos	81
3.10.2. Cuantificación de proteínas totales	81
3.10.3. Determinación de la viabilidad celular por el test de formazán	82
3.10.4. Determinación de la viabilidad celular por el test de sulforodamina B	82
<b>3.11. ESTUDIO <i>IN SILICO</i> DE LA HETEROGENEIDAD DEL HCC EN QUIMIORRESISTENCIA</b>	<b>83</b>
3.11.1. Diseño del estudio y recopilación de datos	83
3.11.2. Análisis de datos	84
<b>3.12. ESTUDIO <i>IN SILICO</i> PARA LA CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS</b>	<b>85</b>
<b>3.13. ANÁLISIS Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO</b>	<b>85</b>
<b><u>4. CAPÍTULO I: HETEROGENEIDAD EN EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE GENES DE QUIMIORRESISTENCIA EN EL HCC</u></b>	<b>87</b>
<b><u>5. CAPÍTULO II: PAPEL DE LOS SUPRESORES TUMORALES EN LA QUIMIORRESISTENCIA DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR</u></b>	<b>88</b>
<b><u>6. CAPÍTULO III: EIF4A COMO DIANA TERAPÉUTICA EN EL CARCINOMA HEPATOCELULAR</u></b>	<b>89</b>
<b>6.1. RESULTADOS</b>	<b>91</b>

**7. CONCLUSIONES** **95**

**8. BIBLIOGRAFÍA** **99**

**9. ENGLISH SUMMARY** **117**





# 1. OBJETIVOS



El cáncer de hígado es una de las neoplasias malignas más frecuentes y representa la tercera causa de muerte por cáncer a nivel mundial. El carcinoma hepatocelular (HCC) constituye el tipo más común de cáncer primario de hígado en adultos, con más del 90% de los casos, y suele desarrollarse en pacientes con una enfermedad hepática subyacente como la cirrosis o la inflamación crónica del hígado.

Los tratamientos potencialmente curativos para el HCC, como son la resección quirúrgica, el trasplante de hígado y la ablación local por radiofrecuencia, solo se consideran para la fase inicial de la enfermedad. No obstante, este tipo de tumor suele diagnosticarse en fases más avanzadas, en las que los pacientes no pueden beneficiarse de ninguna de estas estrategias curativas, siendo el tratamiento farmacológico sistémico su única opción terapéutica. El HCC se caracteriza por una elevada refractariedad a los fármacos antineoplásicos. A pesar de los importantes avances en el abordaje terapéutico del HCC avanzado en los últimos años con la aprobación de diferentes inhibidores de tirosina quinasa (TKIs) y tratamientos basados en inmunoterapia, los beneficios de estas terapias son modestos y aún existe un porcentaje considerable de pacientes que no responde a estos tratamientos.

La escasa respuesta a los agentes antineoplásicos utilizados frente a este tumor se debe al marcado fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (MDR, del inglés *multidrug resistance*), que resulta de la interacción de diversos y complejos mecanismos de quimiorresistencia (MOCs, del inglés *mechanisms of chemoresistance*) presentes en las células tumorales o bien desarrollados bajo presión farmacológica. Otro de los factores que limita el éxito de la terapia antitumoral en pacientes con HCC es la enorme heterogeneidad molecular característica de este tumor, no solo entre los tumores de distintos pacientes sino también dentro de un mismo nódulo tumoral.

Existen numerosas alteraciones moleculares implicadas en el proceso de hepatocarcinogénesis y en la progresión tumoral, como la inactivación de genes supresores tumorales (TSGs). No obstante, aún no se ha dilucidado la repercusión de muchos de estos cambios en la respuesta a la terapia farmacológica que se utiliza frente al HCC. Por tanto, resulta fundamental profundizar en el estudio de la heterogeneidad tumoral y de los MOCs con el fin de desarrollar estrategias terapéuticas más eficaces y que se adecúen a las características moleculares de cada tumor. Así mismo, es necesaria la identificación de nuevas dianas terapéuticas para ampliar el arsenal terapéutico con el que enfrentarse a este tumor. En este sentido, el grupo del Dr. Diego Calvisi de la

## OBJETIVOS

Universidad de Regensburg (Alemania), donde realicé una estancia predoctoral corta, investiga la inhibición selectiva de la maquinaria de traducción como un nuevo enfoque prometedor para el tratamiento del cáncer, que podría ser de gran interés para el HCC.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos planteamos como **objetivo global** de esta tesis doctoral profundizar en el estudio de la heterogeneidad del HCC en la huella genética de quimiorresistencia, investigar el efecto del silenciamiento de distintos TSGs relevantes en el HCC en la falta de respuesta a los tratamientos actuales y evaluar nuevas estrategias farmacológicas basadas en la inhibición selectiva de la iniciación de la traducción.

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

**Objetivo 1:** Llevar a cabo un análisis retrospectivo de caracterización de la heterogeneidad en la huella genética de quimiorresistencia en pacientes con HCC, como base para realizar estudios posteriores que permitan desarrollar herramientas para predecir la falta de respuesta a la quimioterapia en los pacientes con este tipo de tumor.

**Objetivo 2:** Desarrollar modelos celulares con silenciamiento total de diferentes TSGs relevantes en el HCC mediante la tecnología de edición genética programada CRISPR/Cas9.

**Objetivo 3:** Estudiar *in vitro* la repercusión de la pérdida de función de los TSGs en la sensibilidad de líneas celulares de HCC a los fármacos antitumorales y en su fenotipo de malignidad.

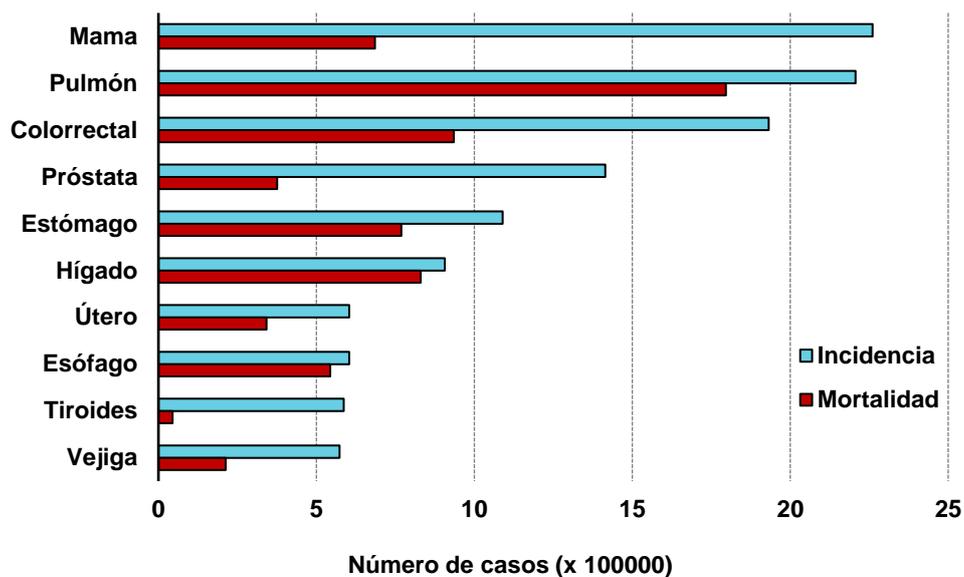
**Objetivo 4:** Evaluar *in vitro* el potencial terapéutico de una nueva estrategia farmacológica basada en la inhibición del factor de iniciación de la traducción eIF4A en el tratamiento del HCC.

## 2. INTRODUCCIÓN



## 2.1. EL CÁNCER HEPÁTICO

El cáncer de hígado es el sexto tipo de cáncer más frecuente, con una incidencia de 905.000 casos nuevos en el mundo en 2020, y constituye la tercera causa de muerte por cáncer (Figura I-1) (1). Según su origen, los tumores hepáticos pueden clasificarse en: i) primarios, derivados de células hepáticas, y ii) secundarios, debido a metástasis de tumores originados en otros tejidos, principalmente colorrectales (2). Entre los tumores primarios se encuentran el carcinoma hepatocelular o hepatocarcinoma (HCC), que es el más frecuente (75-85% de los casos) y se origina en los hepatocitos, el colangiocarcinoma (CCA), derivado de colangiocitos (10-15%), y el hepatocolangiocarcinoma mixto (HCC-CCA), que combina características de ambos tipos, aunque solo representa entre el 1 y el 4% de todos los tumores hepáticos primarios (3). Además, existen otros tumores hepáticos primarios menos frecuentes, como el hepatoblastoma, que procede de hepatoblastos y se desarrolla en niños, el HCC fibrolamelar o el angiosarcoma hepático.



**Figura I-1.** Incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más frecuentes en 2020 a nivel mundial incluyendo ambos sexos y todas las edades según el *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN).

### 2.1.1. Carcinoma hepatocelular

El HCC es el cáncer de hígado primario más común en adultos (1), por lo que constituye un grave problema mundial de salud pública. Generalmente, este tipo de tumor se desarrolla en pacientes con una enfermedad hepática subyacente. Su pronóstico es malo, con una supervivencia estimada a los 5 años del 18%, ya que en la mayoría de los

casos se diagnostica en una fase avanzada de la enfermedad, cuando las opciones terapéuticas curativas son muy escasas (4).

### **A. Epidemiología**

La incidencia y la mortalidad del HCC varían según la región geográfica y el nivel socioeconómico. Aproximadamente el 85% de los casos de HCC se diagnostican en países de pocos recursos, especialmente en Asia oriental y en África subsahariana (1), aunque su incidencia ha aumentado en Europa y América del Norte durante las últimas décadas (5). La edad media de los pacientes en el momento del diagnóstico también varía entre las diferentes regiones. En Europa, América del Norte y Japón, es superior a 60 años, mientras que en algunas partes de Asia y en la mayoría de los países africanos la media de edad de los pacientes es menor (6,7). Así mismo, el HCC es más frecuente en hombres que en mujeres, con una proporción estimada de 2-4:1 a nivel mundial (8).

### **B. Factores de riesgo**

La mayoría de los casos de HCC se desarrollan en el contexto de una enfermedad hepática crónica. Entre los principales factores de riesgo se encuentran las infecciones por los virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC), el consumo excesivo de alcohol, la exposición a aflatoxina B1, el consumo de tabaco y la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), asociada al síndrome metabólico.

El HCC asociado a la infección por VHB es más frecuente en África y en el este asiático, mientras que la infección por VHC es la causa principal en los países occidentales y Japón (5). No obstante, como consecuencia de la vacunación efectiva frente al VHB y el tratamiento del VHC con agentes antivirales de acción directa, la incidencia de HCC relacionada con estos factores está disminuyendo (9). El VHB, además de provocar hepatitis crónica, tiene un efecto oncogénico directo por su capacidad para integrarse en el genoma e inducir mutagénesis insercional (10). De hecho, el HCC asociado a este factor puede aparecer en ausencia de cirrosis, aunque en la mayoría de los casos los pacientes sí presentan esta enfermedad hepática (11). A diferencia del VHB, el VHC es un virus de RNA que no se integra en el genoma del hospedador, por lo que el riesgo de HCC se limita a aquellos casos en los que previamente se desarrolla cirrosis o fibrosis hepática avanzada.

Por otra parte, la exposición a aflatoxina B1 en la dieta es un cofactor importante para el desarrollo del HCC en algunas partes de África y Asia. Varios estudios han demostrado que la ingesta de alimentos contaminados con esta micotoxina aumenta el riesgo de HCC en pacientes infectados por VHB al inducir frecuentemente mutaciones en el codón 249 del supresor tumoral *TP53* (12).

La cirrosis asociada al consumo excesivo de alcohol es otra de las causas más frecuentes de HCC en los países occidentales, junto a la infección por VHC (6). También se ha observado un aumento de la incidencia del HCC en pacientes con NAFLD en los países desarrollados (13). Esta afección varía desde la esteatosis simple a la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), una forma más grave que puede progresar a fibrosis hepática y cirrosis y, en última instancia, al HCC (14). No obstante, el HCC asociado a NAFLD también puede desarrollarse en ausencia de cirrosis (15). Aunque en menor medida, algunas enfermedades metabólicas hereditarias como la hemocromatosis, la deficiencia de  $\alpha$ 1-antitripsina, tirosinemia, porfiria cutánea tarda y enfermedad de Wilson pueden aumentar la susceptibilidad a los factores que favorecen el desarrollo del HCC (16–20).

### C. Patogenia

El HCC puede originarse a partir de la transformación maligna de varios tipos celulares del parénquima hepático, incluidos los hepatocitos maduros y las células progenitoras hepáticas. El desarrollo de este tumor es un proceso complejo que ocurre generalmente en el contexto de una enfermedad hepática crónica y está relacionado con la diversidad de etiologías de la afección hepática subyacente (21,22). La continua inflamación, lesión, reparación y regeneración aberrante de hepatocitos favorece la aparición de una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas que dan lugar a la formación de nódulos displásicos de bajo grado. Estos pueden progresar a nódulos displásicos de alto grado y, posteriormente, convertirse en HCC mediante alteraciones moleculares adicionales que confieren a las células displásicas ventajas proliferativas, invasivas y de supervivencia (23).

Un proceso implicado en el inicio y la progresión del HCC es el incremento de la expresión de la telomerasa transcriptasa inversa debido principalmente a mutaciones o inserciones de secuencias virales en el promotor del gen *TERT*. Es la alteración más frecuente en el HCC, observándose en el ~70% de los casos, y puede detectarse en los

nódulos displásicos premalignos, por lo que se asocia con las primeras etapas de la carcinogénesis (24). También se han identificado alteraciones que afectan a genes implicados en el ciclo celular, como mutaciones en *TP53*, que aparecen en el ~30% de los casos de HCC, en el gen *RBI* (3-8%) o la inactivación del gen *CDKN2A* por hipermetilación del promotor o delección homocigota (25), (26). Así mismo, se han descrito mutaciones en genes que regulan la remodelación de la cromatina como *ARID1A* y *ARID2* (4-17% y 3-18% de los HCCs, respectivamente) y en reguladores epigenéticos de la familia de metilación de histonas KMT2 (2-4%) (21), (27). Por otra parte, en este tipo de tumor suelen aparecer activadas de manera aberrante algunas rutas de señalización debido a alteraciones en algunos de sus componentes. Entre ellas, cabe destacar la vía de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, la cual se encuentra activada en el 30-50% de los casos de HCC debido a mutaciones activantes en el gen *CTNNB1* (que codifica  $\beta$ -catenina) o mutaciones inactivantes en algunos inhibidores de la vía, como *AXIN1*, *APC* y *ZNRF3* (21,27). Todas estas mutaciones previenen la degradación de  $\beta$ -catenina y conducen a la activación constitutiva de la ruta, promoviendo la desdiferenciación, proliferación y motilidad celular (28). También se encuentran activadas de manera constitutiva las vías oncogénicas Ras/Raf/MEK/ERK (por mutaciones inactivantes en *RPS6KA3*) y PI3K/AKT/mTOR (por mutaciones activantes en *PIK3CA* o inactivantes en *PTEN*, *TSC1* o *TSC2*), y rutas de estrés oxidativo (por mutaciones activantes en *NFE2L2* o inactivantes en *KEAP1*). Además, son frecuentes las amplificaciones cromosómicas que dan lugar a la sobreexpresión de genes como *CCND1*, *FGF19*, *VEGFA*, *MYC* y *MET*, que activan algunas de las vías oncogénicas mencionadas (21,27).

En cada nódulo de HCC se acumulan una media de 40 alteraciones somáticas, por lo que cada tumor es el resultado de una combinación única de alteraciones genéticas junto con modificaciones epigenéticas. Esto pone de manifiesto la complejidad de la hepatocarcinogénesis y la alta diversidad del HCC (29).

Además de las alteraciones genéticas y epigenéticas, el microambiente tumoral también desempeña un papel fundamental en la patogénesis del HCC, ya que participa tanto en las etapas iniciales de transformación maligna como en los procesos de invasión y metástasis. Entre los diferentes componentes del microambiente tumoral implicados en el desarrollo de este tumor se encuentran las células hepáticas estrelladas (HSCs, del inglés *hepatic stellate cells*), células endoteliales, fibroblastos asociados al cáncer (CAF, del inglés *cancer-associated fibroblasts*), macrófagos asociados al tumor y otras células

del sistema inmunitario que producen varios factores y citoquinas (30). Por ejemplo, las HSCs promueven la angiogénesis del HCC a través de la secreción de angiopoyetina-1 (31) y IL-8 (32). Los CAFs también pueden contribuir a la progresión del tumor mediante la producción de factores de crecimiento (EGF, HGF y TGF- $\beta$ ), citoquinas (IL-6) y metaloproteinasas (MMP3 y MMP9) (33). En general, numerosos estudios han demostrado que las citoquinas y factores de crecimiento secretadas por los componentes del microambiente tumoral activan las vías de señalización inflamatoria NF- $\kappa\beta$  y JAK-STAT, que promueven el desarrollo del HCC (34). Así, se ha descrito que STAT3 se encuentra activado de manera constitutiva en un ~60% de los casos de HCC (35).

#### **D. Vigilancia y diagnóstico del HCC**

En general el HCC es asintomático en los estadios iniciales, ya que las manifestaciones clínicas (malestar general, dolor abdominal, hepatomegalia, ictericia, fiebre y pérdida de peso) suelen aparecer en etapas avanzadas de la enfermedad (36).

Los programas de vigilancia de HCC se basan en la realización de pruebas de cribado que tienen como objetivo detectar tumores en etapas tempranas para poder proporcionar tratamientos curativos y mejorar la supervivencia. Estos programas están indicados para pacientes de alto riesgo, incluyendo aquellos con cirrosis y subgrupos de pacientes con infección crónica por VHB, y se recomienda el seguimiento de estos pacientes cada seis meses (37). La ecografía abdominal es la técnica de elección utilizada en estos programas para la detección precoz del HCC. Se trata de una técnica no invasiva con una sensibilidad del 60 al 80% y una especificidad mayor del 90% (38) y puede complementarse con la medida de marcadores tumorales en suero, como la  $\alpha$ -fetoproteína (AFP), aunque esta última prueba de manera aislada no está recomendada para el cribado por su baja sensibilidad y especificidad. Otros marcadores tumorales propuestos como la des- $\gamma$ -carboxiprotrombina (DCP) y la fracción de AFP que se une a lectina (AFP-L3), presentan los mismos inconvenientes que la AFP (37).

Los pacientes que presentan resultados anormales en las pruebas de cribado requieren una evaluación diagnóstica definitiva. La mayoría de las lesiones de <1 cm de diámetro no son malignas o son muy difíciles de diagnosticar. Por tanto, en estos pacientes se debe repetir la ecografía cada 3-4 meses. Para las lesiones de  $\geq 1$  cm de diámetro, se utilizan técnicas de imagen mejorada con contraste como la tomografía computarizada o la resonancia magnética multifásicas. Estas técnicas permiten detectar

el patrón vascular característico del HCC basado en la hipervascularización arterial y la disminución de radicales portales en comparación con el parénquima hepático adyacente (37).

En los casos en los que no se observa el patrón vascular típico por las técnicas de imagen, o bien en pacientes no cirróticos, se necesita una biopsia para confirmar el diagnóstico. Para ello, se realizan análisis inmunohistoquímicos basados en la combinación de varios marcadores como glipican-3, glutamina sintetasa y HSP70 (39).

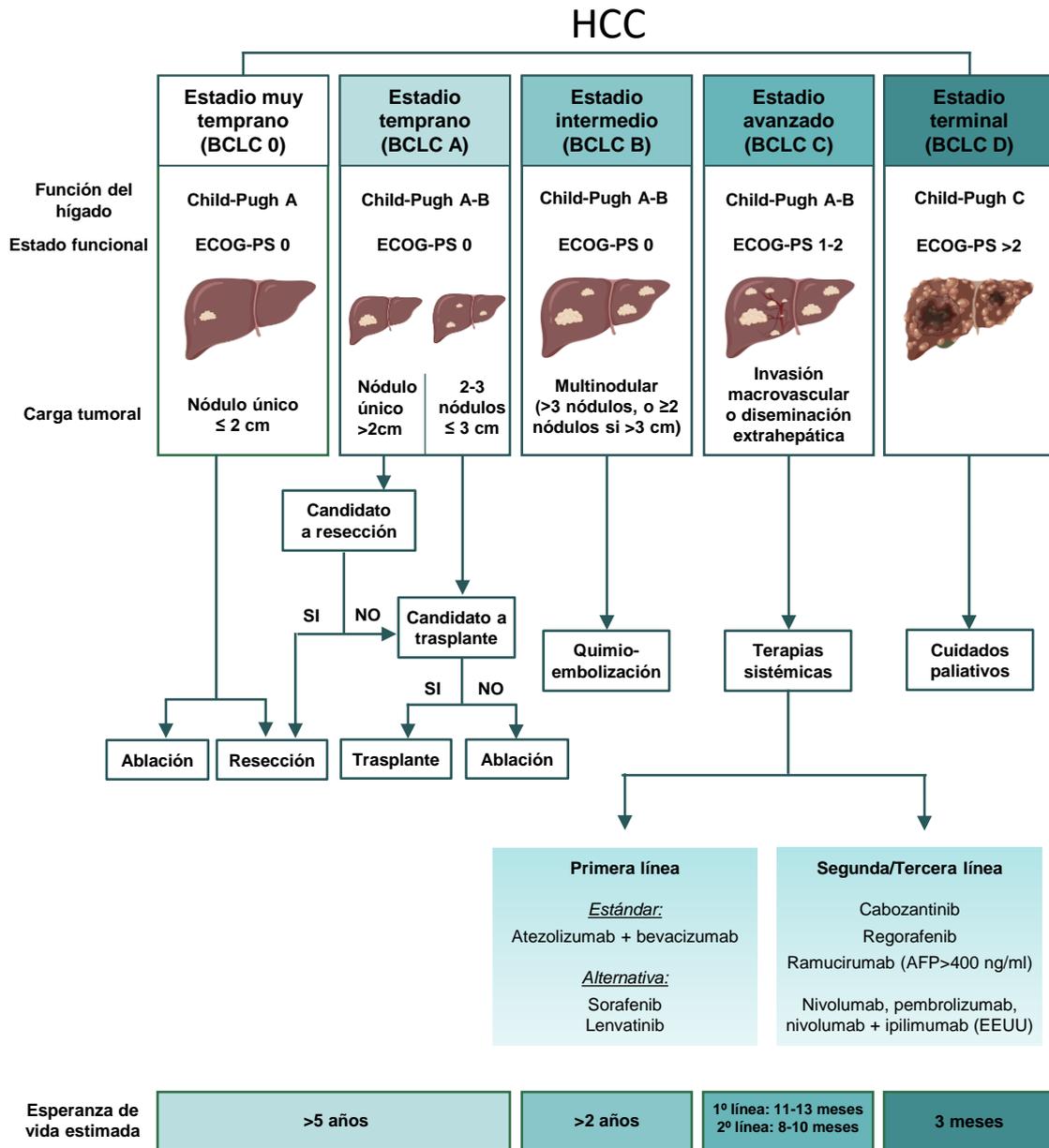
### **E. Estadiaje y tratamiento**

Como ya se ha mencionado, el HCC aparece asociado en la mayoría de los casos a una enfermedad hepática, por lo que para seleccionar el tratamiento adecuado no solo se debe considerar el estadio del tumor sino también el grado de disfunción hepática. En la actualidad, la estrategia más utilizada para la clasificación y elección del tratamiento en pacientes con HCC es el sistema *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC) (40). Este sistema clasifica a los pacientes en cinco estadios con diferente pronóstico y opciones terapéuticas dependiendo de la carga tumoral (número de lesiones, diámetro máximo del tumor y presencia de invasión vascular o metástasis), el grado de disfunción hepática (según la puntuación Child-Pugh) y los síntomas relacionados con el cáncer, evaluados según la escala del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG). En la Figura I-2 se resumen los diferentes estadios del HCC y los tratamientos recomendados para cada uno de ellos.

#### **▪ Tratamiento en etapas iniciales del HCC**

Los pacientes en fases iniciales de la enfermedad (BCLC 0 o A) pueden beneficiarse de terapias potencialmente curativas como la resección quirúrgica, el trasplante hepático y ablación local. La resección quirúrgica es el tratamiento de elección para aquellos casos que presentan un solo tumor, buena función hepática (Child-Pugh A) con niveles séricos normales de bilirrubina y sin hipertensión portal. Aunque la resección quirúrgica se asocia con una supervivencia superior al 60% a los 5 años, la tasa de recurrencia tras este tiempo es del 70% (41). El trasplante hepático es la mejor opción terapéutica para aquellos pacientes que no son candidatos para la resección quirúrgica y presenta la ventaja de curar no solo el HCC, sino la cirrosis subyacente. Además, se asocia con una tasa de recurrencia menor que las otras estrategias curativas (42). La ablación

local por radiofrecuencia es la opción recomendada en pacientes con HCC en estadios iniciales que no son candidatos para cirugía.



**Figura I-2.** Estrategia clínica para el tratamiento del carcinoma hepatocelular (HCC) basada en la clasificación *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC). ECOG-PS, del inglés *Eastern Cooperative Oncology Group-Performance Status*. AFP,  $\alpha$ -fetoproteína.

▪ **Tratamiento en etapas intermedias del HCC**

La quimioembolización transarterial (TACE) constituye la primera línea de tratamiento para aquellos casos de HCC en estadio intermedio que no presentan invasión vascular ni diseminación hepática (BCLC-B). Consiste en la administración intraarterial de un agente quimioterapéutico citotóxico, generalmente emulsionado con el agente oleoso lipiodol, seguido de la embolización de los vasos sanguíneos que alimentan el

tumor, consiguiendo así un efecto citotóxico e isquémico simultáneo. Los agentes citotóxicos más utilizados en esta estrategia terapéutica son cisplatino, 5-fluorouracilo (5-FU), doxorrubicina o epirrubicina, bien como agentes únicos o combinados (43). La TACE también puede utilizarse para pacientes en estadio temprano que no pueden beneficiarse de los tratamientos indicados en el apartado anterior (44) y como terapia neoadyuvante antes del trasplante hepático (45).

### ▪ **Tratamiento en etapas avanzadas del HCC**

El tratamiento sistémico es la única opción terapéutica para los pacientes con HCC avanzado (BCLC C), es decir, pacientes con función hepática preservada, pero que presentan un HCC con invasión vascular y/o diseminación extrahepática y con afectación leve del estado general (ECOG 1-2), así como los pacientes que progresan tras la terapia locorregional.

Los agentes quimioterápicos convencionales bien administrados solos o en combinación, como en el caso de los regímenes PIAF, que incluye cisplatino, doxorrubicina, 5-FU e interferón  $\alpha$ , y FOLFOX, compuesto de ácido folínico, 5-FU y oxaliplatino, no han mostrado una mejora de la supervivencia en los pacientes con HCC avanzado (46,47). Debido al escaso beneficio y a su alta toxicidad, estos tratamientos no se utilizan para estos pacientes y su uso se limita exclusivamente a la terapia locorregional.

La terapia dirigida basada en el uso de inhibidores de tirosina quinasa (TKIs, por sus siglas en inglés *tyrosine kinase inhibitors*) y, más recientemente, la inmunoterapia, son las únicas estrategias terapéuticas beneficiosas para estos pacientes, aunque solo han demostrado aumentar la supervivencia en ~6-12 meses.

### Tratamientos de primera línea

El sorafenib fue el primer fármaco de terapia dirigida aprobado por la FDA (del inglés, *Food and Drug Administration*) en 2007 para el tratamiento del HCC avanzado, y actualmente sigue siendo una de las terapias sistémicas de primera línea. Se trata de un inhibidor multiquinasa administrado por vía oral que actúa inhibiendo la progresión tumoral y la angiogénesis a través de la interacción con varios receptores con actividad de tirosina quinasa, principalmente los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFRs) y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas  $\beta$

(PDGFR- $\beta$ ), además de FLT3, RET, KIT y la familia de quinasas Raf. La aprobación del sorafenib se basó en los resultados obtenidos en los ensayos clínicos en fase III SHARP y Asia-Pacífico, los cuales mostraron mejoras significativas en términos de supervivencia general en pacientes con HCC avanzado y función hepática preservada tratados sorafenib en comparación con el grupo placebo (10,7 vs. 7,9 meses y 6,5 vs. 4,2 meses para los ensayos SHARP y Asia-Pacífico, respectivamente) (48,49).

A pesar de sus modestos beneficios, el sorafenib ha sido el único tratamiento disponible para el HCC avanzado durante una década. Durante ese tiempo se realizaron numerosos ensayos clínicos para evaluar agentes dirigidos como posibles tratamientos de primera línea que pudieran mejorar el pronóstico de los pacientes, incluyendo sunitinib (50), brivanib (51), linifanib (52) o dovitinib (53); sin embargo, ninguno de ellos demostró mejores resultados que el sorafenib en términos de supervivencia general. Las combinaciones del sorafenib con otros fármacos como el erlotinib (inhibidor de la vía EGFR) (54) o el everolimus (inhibidor de mTOR) (55) tampoco aportan mayor beneficio que el sorafenib como agente único.

El lenvatinib es otro TKI con actividad frente a VEGFR1-3, los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos 1-4 (FGFR1-4), PDGFR- $\alpha$ , RET y KIT. En 2018 fue aprobado por la FDA como tratamiento de primera línea para el HCC avanzado tras los resultados positivos del ensayo clínico en fase III REFLECT, donde se comparó la eficacia del lenvatinib con la del sorafenib (56). En este estudio, el lenvatinib demostró una mejora significativa frente al sorafenib tanto en la supervivencia libre de progresión (7,4 vs 3,7 meses) como en el tiempo hasta la progresión (8,9 frente a 3,7 meses), y demostró ser similar al sorafenib en cuanto a la supervivencia general (13,6 vs 12,3 meses) y tolerabilidad.

El desarrollo de la inmunoterapia ha supuesto un gran avance en el tratamiento de muchos tumores, incluido el HCC avanzado. Actualmente, uno de los tratamientos disponibles más prometedores para este tumor es la combinación de atezolizumab y bevacizumab, que ha sido aprobada como nueva terapia de primera línea tras los resultados positivos del ensayo clínico en fase III IMbrave150 (57). Atezolizumab pertenece al grupo de los denominados inhibidores de puntos de control inmunitario (ICI, del inglés *immune checkpoint inhibitors*). Es un anticuerpo monoclonal que bloquea el ligando de muerte celular programada 1 (PD-L1), una proteína extracelular presente en las células tumorales que permite evadir la respuesta inmune antitumoral. Por otra parte,

el bevacizumab es un inhibidor de la angiogénesis que actúa uniéndose al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA). En el ensayo clínico IMbrave150, la combinación de estos dos fármacos demostró una mejora significativa en comparación con el sorafenib tanto en la supervivencia general a los 12 meses (67,2% vs 54,6%) como en la supervivencia libre de progresión (6,8 vs 4,3 meses).

La guía de práctica clínica de la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) recomienda la combinación de atezolizumab y bevacizumab como tratamiento estándar de primera línea, dejando al sorafenib y lenvatinib como terapias alternativas de primera línea en aquellos casos en los que la combinación está contraindicada por las características del paciente o del propio tumor (58).

### Tratamientos de segunda línea

En los últimos años se han aprobado varias terapias dirigidas como tratamiento de segunda línea del HCC avanzado para aquellos pacientes intolerantes o que progresan con el tratamiento de primera línea. El regorafenib es un inhibidor multiquinasa con un espectro de dianas moleculares similar al del sorafenib. Fue el primer inhibidor aprobado como tratamiento de segunda línea en 2017 al demostrar una mejora en la supervivencia de pacientes que habían progresado con el sorafenib en comparación con el grupo placebo (10,6 vs. 7,8 meses en el ensayo clínico en fase III RESORCE) (59,60). El cabozantinib es otro TKI de segunda línea con actividad frente a varias dianas, incluyendo VEGFR2, MET y RET, aprobado en 2019 tras los resultados del ensayo en fase III CELESTIAL (61). Al igual que el regorafenib, este inhibidor también demostró una mejora de la supervivencia global (10,2 vs 8,0 meses) y progresión libre de enfermedad (5,2 vs 1,9 meses) en comparación con el grupo placebo.

El ramucirumab es un anticuerpo monoclonal humano frente al dominio extracelular de VEGFR2 utilizado como tratamiento de segunda línea para pacientes con HCC avanzado que han progresado o son intolerantes al sorafenib y con altos niveles séricos de AFP ( $\geq 400$  ng/mL), siendo la única terapia cuya selección se realiza en función de un biomarcador (62,63).

Recientemente la FDA ha otorgado una aprobación acelerada a algunos ICIs como terapia de segunda línea para pacientes refractarios al sorafenib tras los resultados de varios ensayos clínicos de fase I/II. Entre estos se incluyen el nivolumab (64) y pembrolizumab (65). En ambos casos, se trata de anticuerpos monoclonales frente a la



### 2.2. MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA A LOS TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS DEL HCC

Muchos pacientes no responden a la terapia sistémica que se utiliza actualmente frente al HCC o bien sufren una recaída durante los primeros meses de tratamiento. La resistencia a la terapia farmacológica puede existir antes de la exposición a los agentes antitumorales (resistencia primaria o intrínseca) o bien desarrollarse o potenciarse durante el tratamiento (resistencia adquirida) (69). Además, es frecuente que estos tumores presenten un fenotipo MDR.

Aunque la causa de la alta refractariedad del HCC no ha sido completamente dilucidada, muchos estudios se han centrado en identificar los posibles mecanismos de resistencia a los tratamientos actuales. Hasta ahora, se han descrito numerosos genes y RNAs no codificantes implicados en MOCs, los cuales se han clasificado en 7 grupos principales (69,70) (Figura I-4) que se definen a continuación:

- **MOC-1:** incluye los mecanismos que reducen los niveles intracelulares de los fármacos por cambios en el transportoma, ya sea i) mediante una disminución de la entrada del fármaco en la célula (MOC-1a) o ii) mediante una acentuada capacidad de la célula para expulsar los agentes farmacológicos (MOC-1b).
- **MOC-2:** engloba los mecanismos que producen una alteración del metabolismo del fármaco, disminuyendo la concentración de la forma activa en el interior celular.
- **MOC-3:** se refiere a los cambios de expresión o función de las dianas moleculares de los agentes farmacológicos.
- **MOC-4:** incluye los mecanismos que aumentan la capacidad de la célula tumoral para reparar los daños en el DNA que inducen algunos fármacos antitumorales.
- **MOC-5:** engloba los procesos que desregulan el balance apoptosis/supervivencia favoreciendo el crecimiento de las células tumorales, bien por la inactivación de la apoptosis (MOC-5a) o por la activación de vías de supervivencia (MOC-5b).
- **MOC-6:** hace referencia a aquellos procesos que producen cambios en el microambiente tumoral como hipoxia, acidificación del medio extracelular, aumento de señales inflamatorias o de especies reactivas de oxígeno, que pueden reducir la efectividad de los agentes farmacológicos.

- **MOC-7:** comprende aquellos mecanismos que favorecen la aparición de un fenotipo de células madre o la transición epitelio-mesénquima (EMT, del inglés *epithelial-mesenchymal transition*), esto es, el proceso por el cual las células tumorales pierden la polaridad típica de las células epiteliales y adquieren un fenotipo de células mesenquimales, lo que favorece su capacidad de migración, metástasis y quimiorresistencia.

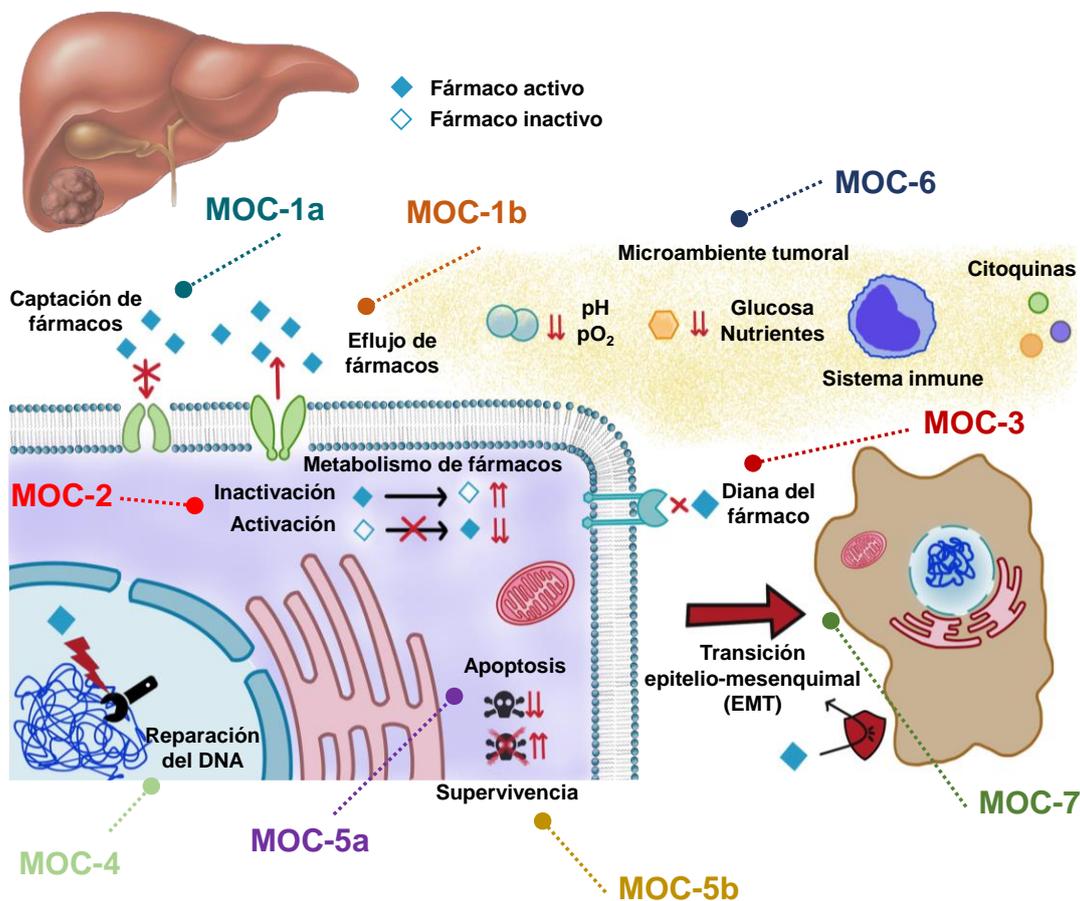


Figura I-4. Mecanismos de quimiorresistencia (MOCs) en cáncer hepático. Modificada de (70).

### 2.2.1. Cambios en el transportoma (MOC-1)

Los agentes antitumorales y, en concreto, los TKIs, llevan a cabo su acción farmacológica en el interior celular, por lo que sus niveles intracelulares son determinantes en la eficacia del tratamiento. Aquellos mecanismos que disminuyan la concentración intracelular del fármaco pueden reducir la respuesta del paciente a la terapia antitumoral. El concepto de “transportoma” hace referencia al conjunto de proteínas transportadoras expresadas en las células y que determinan la concentración intracelular de sus sustratos, incluyendo los fármacos antitumorales (71). Se han descrito numerosos transportadores de entrada y expulsión de fármacos cuyos cambios de

expresión y/o función pueden estar implicados en la falta respuesta de los tumores a la terapia farmacológica.

### **A. MOC-1a. Cambios en los transportadores de captación de fármacos**

La mayoría de los fármacos antineoplásicos son poco lipofílicos y poseen elevado peso molecular, por lo que tienen poca capacidad para difundir a través de la membrana plasmática y requieren de transportadores específicos de membrana para entrar en la célula. Estos transportadores pertenecen a la superfamilia SLC (del inglés, *solute carriers*), que incluye más de 400 proteínas transportadoras organizadas en 66 familias hasta el momento, expresadas en diferentes tejidos del organismo (72).

La baja expresión de los transportadores de entrada o bien la presencia de variantes genéticas que reducen la función o expresión de las proteínas que codifican reduce la entrada del fármaco antineoplásico a la célula, limitando la respuesta a la terapia antitumoral (MOC-1a) (73,74). Además, cabe mencionar que la expresión de estos transportadores puede cambiar durante el desarrollo del tumor y particularmente durante el tratamiento farmacológico.

Se han descrito varios transportadores de entrada que podrían tener un papel relevante en la eficacia de los TKIs utilizados en el tratamiento del HCC. Así, se ha demostrado que el transportador de cationes orgánicos OCT1 (gen *SLC22A1*) está implicado en el transporte del sorafenib (75,76), aunque no del regorafenib (76), por lo que se ha propuesto al OCT1 como posible marcador pronóstico para determinar la respuesta al sorafenib en pacientes con HCC. Por un lado, se ha descrito una bajada de expresión de este transportador en HCC respecto al tejido adyacente no tumoral, así como la presencia de mutaciones y variantes de *splicing* aberrantes que alteran su función en los tumores de algunos pacientes (75,76). Además, en un estudio retrospectivo con pacientes de HCC tratados con sorafenib, se relacionó la pérdida de expresión de OCT1 en la membrana plasmática de las células tumorales con una menor supervivencia global (77). La familia de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATPs, del inglés *organic anion transporting polypeptides*) también podría estar implicada en el transporte de otros TKIs. Se ha descrito que los transportadores OATP1B1 y OATP1B3 pueden mediar la captación de cabozantinib (78), y OATP1B1 también puede transportar regorafenib (79). Los niveles de expresión de estos transportadores son menores en el

tejido tumoral de HCC en comparación con el tejido sano (80), lo que sugiere que esos cambios podrían contribuir a la quimiorresistencia del HCC a estos agentes.

El transportador CTR1 (gen *SLC31A1*) está implicado en la captación del cisplatino (81), fármaco que se utiliza comúnmente en la TACE, lo que sugiere un papel de su expresión en la respuesta a este tipo de terapia.

### **B. MOC-1b. Cambios en los transportadores de expulsión de fármacos**

La mayoría de estos transportadores pertenecen a la superfamilia de proteínas ABC (del inglés, *ATP-binding cassette*). Son transportadores que utilizan la energía producida por la hidrólisis de ATP para expulsar una gran variedad de agentes antineoplásicos de la célula tumoral, de manera que se reduce la concentración intracelular necesaria para que dichos fármacos lleven a cabo su acción terapéutica. Su sobreexpresión constituye uno de los principales problemas de resistencia en el tratamiento del cáncer. Además, en el HCC la expresión de las proteínas ABC se ha relacionado con la activación de vías de supervivencia (MOC-5b) (82) o la adquisición de un fenotipo de células madre tumorales o CSC (del inglés *cancer stem cell*) (MOC-7) (83).

En humanos, se han identificado 48 genes ABC clasificados en 7 familias diferentes (ABCA a ABCG) en función de la homología de secuencia aminoacídica y la organización estructural de sus dominios de unión al nucleótido (84).

La proteína MDR1 (gen *ABCB1*), también conocida como glicoproteína P, pertenece a la familia ABCB. Esta bomba es capaz de transportar algunos de los TKIs empleados en el tratamiento del HCC, como el regorafenib (85) y probablemente el sorafenib (86,87). Entre los agentes quimioterapéuticos convencionales utilizados en la terapia TACE, la doxorubicina también se expulsa por MDR1. Estudios *in vitro* realizados con líneas celulares de HCC han demostrado una clara relación entre la expresión de esta bomba y la resistencia a la doxorubicina (88).

Algunos de los miembros de la familia ABCC, constituida por las proteínas asociadas a resistencia a múltiples fármacos (MRPs), contribuyen al fenotipo MDR en el HCC. MRP2 está implicada en el transporte de sorafenib (89), regorafenib (79), cabozantinib (78), y probablemente lenvatinib (90), por lo que su expresión podría tener una repercusión en la respuesta a estos TKIs. Además, la expresión de MRP3 se ha

asociado a una falta de sensibilidad al sorafenib en estudios *in vitro* (91), lo cual pone de manifiesto su posible papel en el transporte de este fármaco. Las MRPs también participan en el transporte de los fármacos utilizados en la terapia TACE. Por ejemplo, MRP2 transporta cisplatino y se ha demostrado que desempeña un papel importante en la resistencia de los pacientes con HCC a este fármaco (92).

La proteína de resistencia del cáncer de mama (BCRP del inglés *breast cancer resistance protein*, gen *ABCG2*) se encuentra normalmente sobreexpresada en el HCC respecto al tejido adyacente no tumoral (93). En el contexto de quimiorresistencia, BCRP desempeña un papel importante en el eflujo del sorafenib (94) y estudios *in vitro* con líneas celulares de HCC han demostrado que la inhibición de BCRP quimiosensibiliza a este TKI (95).

También se ha demostrado que los TKIs son capaces de inhibir la expresión y actividad de las bombas ABC, por lo que podrían inducir sensibilidad colateral a otros fármacos (96). Este fenómeno abre una nueva opción terapéutica para los TKIs como agentes quimiosensibilizantes en el HCC.

### **2.2.2. Cambios en el metabolismo de fármacos antitumorales (MOC-2)**

Las células tumorales pueden reducir la concentración intracelular de fármaco activo mediante un aumento de la expresión y/o actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo del fármaco para producir metabolitos inactivos. Este proceso de detoxificación se lleva a cabo por reacciones de oxidorreducción mediante enzimas de fase I, como la familia de citocromos P450 (CYPs), y/o por conjugación con moléculas endógenas de la célula, como ácido glucurónico, glutatión o sulfato, mediante enzimas de fase II. En algunos casos, los fármacos son administrados como profármacos y requieren una activación metabólica en el interior de la célula tumoral. La disminución de la expresión y/o actividad de las enzimas implicadas en este proceso también se engloba dentro del grupo MOC-2. Los cambios en todas estas enzimas pueden repercutir, no solo en la eficacia del tratamiento, sino también en la aparición de efectos adversos debido al estrecho margen terapéutico característico de los agentes antitumorales.

El sorafenib es metabolizado principalmente mediante un proceso de oxidación mediado por la enzima CYP3A4, así como de glucuronidación llevado a cabo por la enzima UDP-glucuronil-transferasa 1A9 (UGT1A9). Mediante estudios con microsomas hepáticos obtenidos de pacientes con HCC se ha demostrado que el metabolismo del

sorafenib está alterado en estos pacientes debido a una menor expresión de las enzimas CYP3A4 y UGT1A9 en el tejido tumoral (97). Aunque no se ha establecido una clara relación entre el metabolismo del sorafenib y la respuesta a este, se ha asociado la presencia de polimorfismos en *UGT1A9* con una mayor toxicidad en pacientes tratados con este fármaco (98).

El aumento de expresión de la enzima glutatión-S-transferasa pi (GSTP1), implicada en la inactivación de derivados de platino o de doxorubicina por la conjugación con glutatión (99,100), o la sobreexpresión de la enzima dihidropirimidina deshidrogenasa (DPYD), que participa en el metabolismo del 5-FU, también contribuyen a la quimiorresistencia. De hecho, los niveles de DPYD se han correlacionado negativamente con la respuesta de los pacientes con HCC tratados con 5-FU en terapia locorregional (101).

### 2.2.3. Cambios en las dianas moleculares (MOC-3)

La resistencia a las terapias dirigidas del HCC puede producirse por la reactivación de la vía de señalización inhibida por el fármaco debida a cambios de expresión o actividad de las propias proteínas diana o bien a alteraciones aguas arriba o abajo de la vía. Se ha establecido una relación entre altos niveles de VEGFR-2 y de la proteína ERK fosforilada o pERK y una peor respuesta al sorafenib en términos de supervivencia global y libre de progresión en pacientes de HCC tratados con este fármaco (102). También se han identificado polimorfismos en genes de la vía angiogénica que participan en la quimiorresistencia del sorafenib. Por ejemplo, la variante c.1416A>T (p.Gln472His, rs1870377) en *KDR*, que codifica para el receptor VEGFR-2, disminuye la capacidad de esta proteína para unir el ligando VEGF y se ha relacionado con una peor respuesta del HCC al sorafenib (103).

El cabozantinib es el único TKI de los que se utilizan en el tratamiento del HCC que inhibe MET. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que altos niveles de la proteína fosforilada (p-MET) así como la amplificación de *MET* están asociados a una mayor sensibilidad al cabozantinib (104,105), mientras que la sobreexpresión de p-MET se relaciona con una peor respuesta de los pacientes con HCC tratados con sorafenib (105). Esto sugiere que la activación de MET podría ser un biomarcador para identificar a aquellos pacientes que puedan beneficiarse de la terapia con cabozantinib.

La resistencia a los fármacos utilizados en la terapia locorregional también puede deberse a cambios en sus dianas moleculares. La topoisomerasa II $\alpha$  (gen *TOP2A*) constituye la diana de las antraciclinas, como la doxorubicina. En HCC se ha correlacionado la alta expresión de *TOP2A* con la resistencia a este fármaco (106). Otro ejemplo es el 5-FU, que actúa como inhibidor de la timidilato sintasa (gen *TYMS*), una enzima clave en la síntesis de DNA cuyos niveles de expresión se asocian a la resistencia a este fármaco (107).

#### **2.2.4. Cambios en los mecanismos de reparación del DNA (MOC-4)**

Los mecanismos que aumentan la capacidad de reparación del DNA de la célula tumoral tienen especial relevancia en aquellas estrategias terapéuticas en las que se utilizan fármacos antitumorales que inducen daño en el DNA. Este es el caso de los agentes antineoplásicos utilizados en terapia locorregional para el tratamiento del HCC en estadio intermedio, como el cisplatino, que induce una alteración directa en el DNA, o el 5-FU, de acción indirecta. Se han identificado diferentes procesos de reparación que pueden estar implicados en la resistencia a este tipo de fármacos.

La reparación por escisión de nucleótidos (NER) es uno de los principales mecanismos que participan en la reparación de aductos del DNA, como aquellos que se forman por agentes alquilantes (por ejemplo, cisplatino). La sobreexpresión de algunas de las proteínas de este sistema puede aumentar de manera considerable la capacidad de la célula tumoral para reparar el daño inducido por estos agentes. De hecho, el aumento de expresión de ERCC1 se ha asociado con la resistencia del HCC al cisplatino (108).

Otro de los mecanismos más importantes es la unión de extremos no homólogos (NEHJ), que participa en la reparación de roturas de doble cadena en el DNA producidas por diversos agentes exógenos como los derivados de platino. Varios estudios han demostrado que algunas proteínas implicadas en esta vía de reparación, como XRCC4 y XLF, se sobreexpresan tras el tratamiento con derivados de platino y se ha relacionado con la respuesta a esta terapia (109,110).

### 2.2.5. Cambios en el balance apoptosis/supervivencia (MOC-5)

La mayoría de los regímenes farmacológicos utilizados en la terapia frente al HCC actúan induciendo apoptosis en las células tumorales. Por lo tanto, las posibles alteraciones en los mecanismos que activan la apoptosis contribuyen no solo a la carcinogénesis y progresión del tumor sino también a un aumento de la resistencia a los agentes antitumorales. La evasión de la apoptosis puede deberse a la pérdida de función de mediadores proapoptóticos (MOC-5a) o a la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas y la activación aberrante de vías de supervivencia (MOC-5b).

#### A. Factores proapoptóticos (MOC-5a)

Uno de los factores proapoptóticos más relevantes en el HCC es la proteína supresora de tumores p53. Esta proteína responde a señales de estrés mediante la regulación transcripcional de genes implicados en la parada del ciclo celular, reparación del DNA, apoptosis y senescencia. La función de p53 aparece alterada con frecuencia en el HCC debido a la presencia tanto de mutaciones inactivantes como de ganancia de función que afectan principalmente al dominio de unión al DNA de la proteína. Las mutaciones en p53 se han relacionado con una mayor agresividad del tumor y tasa de recurrencia (111), lo que sugiere un papel fundamental en quimiorresistencia. De hecho, en un estudio *in vitro* se ha demostrado que la variante p.Arg248Gln de p53 induce resistencia a doxorubicina (112). También se ha descrito que el sorafenib es capaz de inducir apoptosis mediante una vía dependiente de p53 (113), lo cual pone de manifiesto el posible papel de esta proteína en la resistencia al TKI.

La vía intrínseca de apoptosis, también denominada vía mitocondrial, está regulada por proteínas proapoptóticas, como Bax, Bak y proteínas con dominio BH3 (por ejemplo, PUMA y BIM). Generalmente, esta vía es activada por diversos fármacos antitumorales, incluyendo cisplatino (114), sorafenib (115), regorafenib (116) y cabozantinib (117). Sin embargo, se ha descrito que la alteración de algunos de sus miembros puede conferir quimiorresistencia en cáncer (118). Por ejemplo, ensayos *in vitro* realizados con líneas celulares de HCC han demostrado que la disminución de la expresión del factor proapoptótico PUMA inhibe la apoptosis inducida por el sorafenib (115).

**B. Factores antiapoptóticos y activación de vías de supervivencia (MOC-5b)**

Otro de los mecanismos de evasión de la apoptosis que se asocia con el desarrollo de quimiorresistencia es la sobreexpresión de factores antiapoptóticos de la familia Bcl2 de la vía mitocondrial, como Bcl2, Bcl-xL y Mcl1. El factor Bcl-xL (isoforma larga codificada por el gen *BCL2L1*) está sobreexpresado en el HCC (119) y se relaciona con la progresión tumoral y resistencia a varios agentes terapéuticos (120,121). Los cambios en los niveles expresión de estos factores antiapoptóticos tras la exposición al sorafenib y regorafenib han llevado a evaluar *in vitro* nuevas estrategias terapéuticas que combinan los TKIs con inhibidores específicos de estas proteínas denominados miméticos de BH3 (120,122).

Dentro del grupo MOC-5b también se encuentran los inhibidores de la apoptosis (IAPs), que actúan inhibiendo las caspasas efectoras de la apoptosis 3 y 7. La alteración de algunos de sus miembros es característica de muchos tumores, incluido el HCC (123). Este es el caso de la survivina (gen *BIRC5*), que está sobreexpresada en este tumor y se correlaciona con peor pronóstico (124).

Por otra parte, la activación constitutiva de las vías de supervivencia independiente de ligando induce la proliferación y evasión de la apoptosis de las células tumorales, por lo que juega un papel esencial en la falta de respuesta a los agentes farmacológicos. A continuación, se describen las vías principales con mayor relevancia en el HCC (Figura I-5):

- **Ruta Wnt/ $\beta$ -catenina.** Esta vía aparece activada con frecuencia de forma aberrante en el HCC. Esto puede deberse a mutaciones en el gen *CTNNB1*, que impiden la degradación de la proteína codificante  $\beta$ -catenina; en los genes *AXIN1* y *AXIN2*, componentes del complejo de degradación de  $\beta$ -catenina; o bien por señales del microambiente tumoral, como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que promueven la pérdida de E-cadherina, que normalmente mantiene unida  $\beta$ -catenina a la membrana plasmática. En todos los casos, la proteína se acumula en el citoplasma y en el núcleo y permite la transcripción oncogénica.  $\beta$ -catenina activa la transcripción de genes que aumentan la resistencia a la apoptosis mediada por el sorafenib, como *MYC* (125), *JNK* (126), *BCL2* y *MCL1* (120). La activación de esta vía también promueve el escape inmunitario y la resistencia a la inmunoterapia (127).

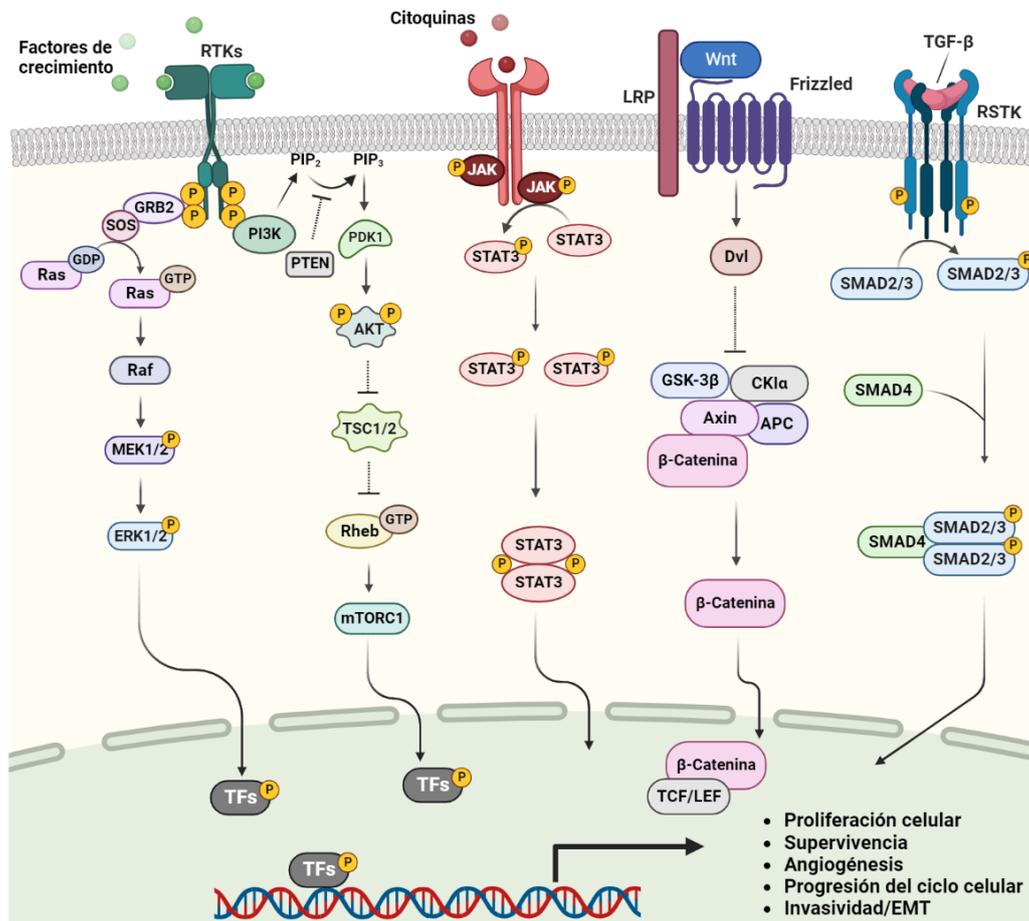
- **Ruta PI3K/AKT/mTOR.** Se encuentra sobreactivada en el HCC, observándose un aumento de la fosforilación de AKT, mTOR y RPS6 en aproximadamente el 50% de los casos, y se ha asociado con la progresión del tumor y peor pronóstico de estos pacientes (128). Se han propuesto algunos mecanismos que podrían explicar la activación de la vía en HCC, como la sobreexpresión de los receptores aguas arriba IGFR y EGFR (129,130), la pérdida de expresión de PTEN, un regulador negativo de esta ruta de señalización (131), o mutaciones somáticas en *PIK3CA* (132). Ensayos *in vitro* han demostrado que la activación de la ruta media la resistencia adquirida al sorafenib mediante la sobreexpresión de genes implicados en la EMT, como el factor de transcripción Snail (133,134). Debido a la importancia de la vía PI3K/AKT/mTOR en el desarrollo de resistencia a los TKIs, se han propuesto nuevas estrategias terapéuticas que combinan el sorafenib con inhibidores de la vía para mejorar la eficacia del tratamiento en el HCC (135).
- **Ruta JAK/STAT.** La activación aberrante de esta vía aparece con frecuencia en el HCC (35) y juega un papel importante en la proliferación y supervivencia celular mediante la expresión de genes antiapoptóticos (*BCL2*, *BCL2L1*, *BIRC5* y *MCL1*) y de progresión del ciclo celular (*CCND1*); promueve la angiogénesis mediante la regulación de factores proangiogénicos (VEGF, HIF-1); y contribuye a la invasividad, así como al mantenimiento de células madre tumorales mediante la regulación de la expresión de marcadores típicos de estas células denominados marcadores de *stemness*, como son CD133 y NANOG. También participa en la regulación de la respuesta inflamatoria y tiene un papel inmunosupresor (136). Algunos de los factores responsables de la activación de esta ruta son un aumento de la señalización inflamatoria y la estimulación de factores de crecimiento (34), así como la presencia de mutaciones de ganancia de función en el gen *JAK1* (137). En cuanto a su papel en la quimiorresistencia, se ha observado un aumento de la actividad de STAT3 en células de HCC resistentes al sorafenib (138).
- **Ruta Hippo.** El principal efector de esta vía es YAP, que muestra una sobreexpresión aberrante y localización nuclear en el 50% de los HCCs (139). La activación de esta vía confiere resistencia al sorafenib mediante la sobreexpresión de sus genes diana, como la proteína antiapoptótica survivina (140). También se ha demostrado la implicación de esta vía en la respuesta a fármacos antitumorales

convencionales como cisplatino o doxorubicina mediante ensayos *in vitro* con células de HCC (141,142).

- **Ruta MAPK/ERK.** La activación incontrolada de esta vía promueve la supervivencia celular inhibiendo la activación o expresión de los factores proapoptóticos de la familia Bcl-2 (por ejemplo, BAX y BIM) y aumentando la expresión de factores antiapoptóticos, como BCL-2, BCL-XL y MCL-1, y también induce la sobreexpresión de factores relacionados con la EMT, invasividad y angiogénesis (143). A diferencia de otros tumores, la frecuencia de mutaciones en los elementos de esta vía en el HCC es baja; sin embargo, aparece activada en más del 50% de los HCCs (144). Esto puede explicarse por la sobreexpresión de algunos de sus componentes como RAF, MEK y ERK (145), la alteración de factores de crecimiento y sus receptores situados aguas arriba de la vía (146), o bien por la disminución de la expresión de algunos inhibidores (147). En varios estudios retrospectivos con pacientes de HCC tratados previamente con sorafenib se ha asociado la forma activa de ERK (pERK) con una menor supervivencia (102,148).
- **Otras rutas.** Las vías de señalización de Notch y Hedgedog desempeñan un papel fundamental en la autorrenovación de las células madre y determinación del destino celular. Se ha demostrado que estas vías también participan en la respuesta farmacológica del tumor. En ensayos *in vitro* realizados con líneas celulares de HCC se observó que la inhibición de Notch3 sensibiliza a las células a doxorubicina (149) y sorafenib (150). Así mismo, en un estudio con organoides derivados de pacientes de HCC enriquecidos en células CD44<sup>+</sup> que mostraban una sobreactivación de la vía Hedgedog, el efecto del sorafenib se potenció cuando se incubaban con inhibidores de la vía (151).

Dada la importancia de las distintas vías de señalización en la progresión del HCC y en la resistencia a los fármacos antitumorales, muchos estudios se han centrado en evaluar nuevas estrategias terapéuticas basadas en la combinación de diferentes inhibidores de las vías mencionadas anteriormente con los TKIs, principalmente con el sorafenib, ya que es el inhibidor que más se ha utilizado en clínica hasta ahora y cuyos mecanismos de resistencia son los más estudiados.

Algunos ejemplos son las combinaciones del sorafenib con el erlotinib (inhibidor de EGFR) (54), refametinib (inhibidor de MEK) (152), rapamicina o everolimus (inhibidores de mTOR) (55,153) y LY3039478 (inhibidor de Notch), entre otros. Algunas de estas combinaciones ya se han evaluado en ensayos clínicos, aunque ninguna de ellas ha mostrado mayor efectividad que la terapia única con sorafenib.



**Figura I-5.** Representación esquemática de las principales vías de señalización implicadas en la quimiorresistencia del HCC. RTKs, receptores tyrosine kinases, RSTK, receptor serine/threonine kinase; TFs, transcription factors. EMT, epithelial-mesenchymal transition.

### 2.2.6. Cambios en el microambiente tumoral (MOC-6)

Existen diversos componentes y procesos del microambiente tumoral que influyen en la progresión del tumor y en la resistencia al tratamiento.

En primer lugar, a pesar de que el HCC está muy vascularizado, su rápida tasa de crecimiento lo convierte en uno de los tumores con un microambiente más hipóxico. Este fenómeno se ha asociado con un peor pronóstico debido a un aumento de la actividad de los factores inducidos por hipoxia (HIFs), los cuales regulan una gran variedad de genes

implicados en proliferación, metabolismo de la glucosa, angiogénesis, invasividad y metástasis (154). Aunque el sorafenib actúa bloqueando la vía angiogénica HIF-1 $\alpha$ /VEGF, existe una correlación entre el microambiente hipóxico y la resistencia adquirida al sorafenib, ya que este fármaco favorece la selección de clones resistentes adaptados al déficit de oxígeno y nutrientes. En un estudio se demostró que la hipoxia inducida por el tratamiento continuado con sorafenib confería resistencia a este mediante la activación de HIF-1 $\alpha$  y NF- $\kappa$ B (155). La activación de HIF-1 $\alpha$  también induce la sobreexpresión de bombas ABC, como MDR1 (156) e inhibe la activación de la apoptosis mediante la sobreexpresión de *MCL1* y *BIRC3* (157).

Los CAFs son componentes clave del microambiente tumoral, ya que la mayoría de los HCCs se desarrollan a partir de tejido fibrótico y cirrótico. Estas células son capaces de promover la proliferación, migración y resistencia a fármacos mediante la producción de factores de crecimiento (EGF, PDGF, HFG, etc.) y citoquinas inflamatorias (IL-6, CCL2, etc.) que activan vías de supervivencia (158).

La inflamación crónica característica del HCC favorece la infiltración de células inmunes. Los macrófagos asociados a tumores (TAMs) promueven la angiogénesis, inmunosupresión, metástasis y resistencia a fármacos mediante la expresión de citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento. En concreto, se ha demostrado que las TAMs de tipo M2 confieren resistencia al sorafenib mediante la secreción del factor de crecimiento HGF, que activa las vías de supervivencia HGF/c-Met, MAPK/ERK, y PI3K/AKT (159). Los neutrófilos asociados a tumores (TANs) son también un componente fundamental del infiltrado leucocitario. Estas células reclutan a macrófagos y a células T reguladoras (células supresoras de la respuesta inmune) mediante la secreción de las citoquinas CCL2 y CCL17 y favorecen el crecimiento y la progresión del tumor. La depleción de los TANs mejora la respuesta al sorafenib, lo que sugiere que estas células también están implicadas en la resistencia a este TKI (160).

La reprogramación metabólica es uno de los mecanismos que utilizan las células tumorales para adaptarse al microambiente tumoral. NANOG es uno de los factores implicados en este proceso con el objetivo de adaptarse al metabolismo alterado de la glucosa y a la hipoxia inducida por el sorafenib, además de proporcionar señales que favorecen la supervivencia de las células iniciadoras de tumores, por lo que se relaciona con la resistencia del HCC a este fármaco (161).

### 2.2.7. Transición fenotípica (MOC-7)

La EMT en células tumorales y la generación de CSCs son dos procesos que contribuyen a la heterogeneidad celular intratumoral característica del HCC y favorecen la progresión tumoral, la metástasis y la resistencia a la terapia farmacológica. La EMT es un fenómeno por el cual las células epiteliales pierden la polaridad, se desdiferencian y adquieren características mesenquimales, como un aumento de la capacidad migratoria, mayor invasividad y resistencia a la activación de la apoptosis (162). Por otra parte, las células madre del cáncer de hígado (LCSC, del inglés *liver cancer stem cells*) constituyen una subpoblación de células dentro del tumor con capacidad de autorrenovación ilimitada y alto potencial de proliferación y diferenciación celular. Estas pueden originarse a partir de células progenitoras hepáticas mediante la adquisición de alteraciones que neutralizan las restricciones de proliferación normal presentes en las células madre sanas o bien a partir de hepatocitos maduros que se desdiferencian en respuesta al microambiente inflamatorio y a la acumulación de mutaciones durante la carcinogénesis (163). Las células tumorales que se sufren la EMT adquieren un fenotipo similar a las LCSCs, por lo que ambos tipos celulares tienen una firma genética común, como la alta expresión de algunos marcadores de *stemness* entre los que se encuentran glicoproteínas de adhesión celular (CD44, CD133, CD13, CD24, CD90, EpCAM), la enzima aldehído deshidrogenasa 1A1 (ALDH1A1), y la queratina 19 (KRT19), así como factores de transcripción que inducen la EMT (SNAI1, TWIST1, SLUG, ZEB1) (164,165). Se ha descrito que la activación de numerosas vías de señalización (Wnt/ $\beta$ -catenina, TGF- $\beta$ , Hedgehog, Notch, STAT3) promueve la adquisición y el mantenimiento de propiedades *stemness* e induce la EMT (163).

Las características mesenquimales y de *stemness* que adquieren las células tumorales contribuyen a la resistencia primaria a muchos fármacos antitumorales en HCC. Por ejemplo, la alta expresión de CD133, CD90, CD24 o CD44 se asocia con peor respuesta de los pacientes de HCC al sorafenib (166,167). Estas glicoproteínas de membrana, además de jugar un papel fundamental en las interacciones célula-célula, también están implicadas en las vías de señalización intracelular. Su alta expresión provoca una resistencia a la apoptosis inducida por el sorafenib mediante el aumento de la expresión de BCL2, la activación de varias proteínas quinasa (AKT, AMPK y mTOR) (168,169) así como la sobreexpresión de genes implicados en vías de supervivencia (170). Además, se ha asociado la alta expresión de CD44 y CD133 con la sobreexpresión de

transportadores ABC (83). En general, los marcadores de *stemness* también se relacionan con la resistencia a la quimioterapia convencional (cisplatino, doxorubicina y 5-FU) (171).

La glicoproteína EpCAM participa igualmente en la resistencia del HCC. En un ensayo *in vitro*, la exposición de células derivadas de pacientes de HCC al sorafenib enriqueció la población celular EpCAM<sup>+</sup>, lo que sugiere que esta glicoproteína podría contribuir a la resistencia adquirida al sorafenib (172). Esta subpoblación celular también confiere resistencia a otros agentes antineoplásicos como el 5-FU (173).

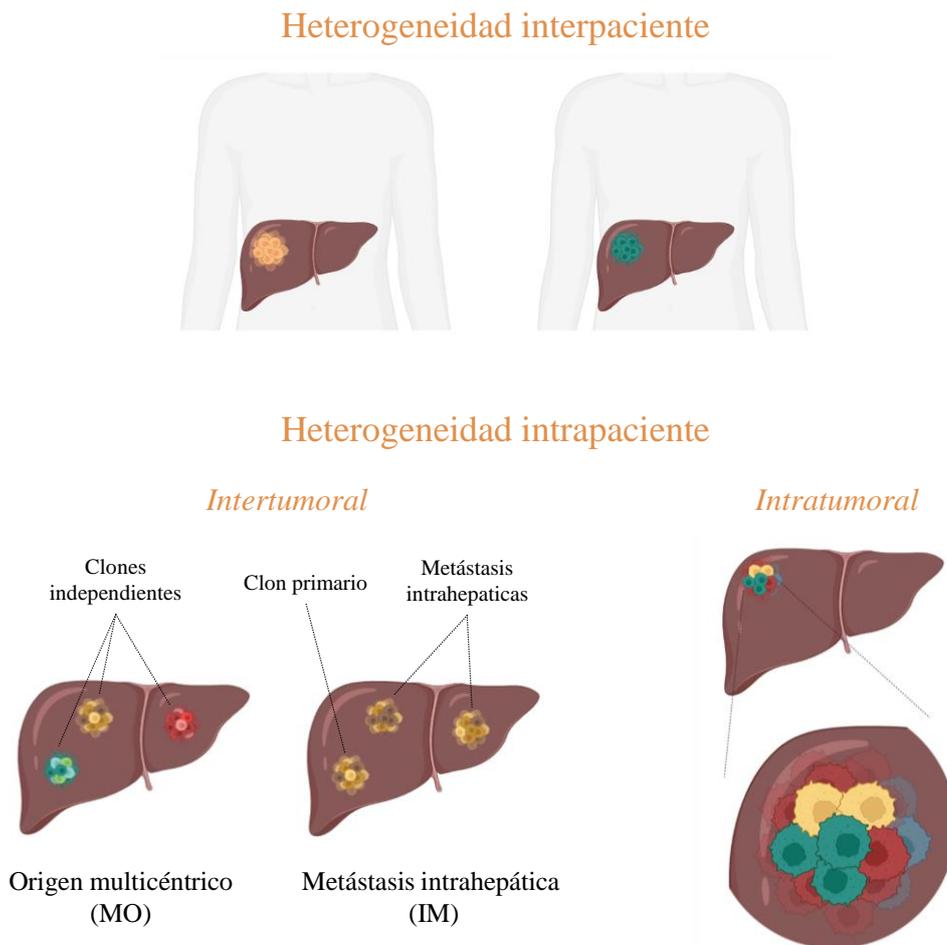
En un subgrupo de tumores de HCC con mal pronóstico se han identificado marcadores típicos de LCSCs y EMT. Estos tumores tienen un fenotipo altamente invasivo, metastásico y resistente a fármacos, asociado a la alta expresión de KRT19 y a la activación de la vía TGF- $\beta$ /SMAD (174,175). TGF- $\beta$  facilita la acumulación de  $\beta$ -catenina en el núcleo, lo que produce la pérdida de marcadores epiteliales y el aumento de expresión de marcadores de *stemness*. La vía de TGF- $\beta$  también aumenta la expresión de receptores de tirosina quinasa, como IGF1R, EGFR, PDGFR, y FGFR1 en las células de HCC, contrarrestando la capacidad del sorafenib para inducir apoptosis (176). De hecho, se han asociado altos niveles plasmáticos de TGF- $\beta$ 1 con una peor respuesta al sorafenib (177) y al regorafenib (178) en pacientes con HCC avanzado.

Otros factores como SOX2, SOX9 y OCT4 también se consideran marcadores de *stemness* en HCC. OCT4 participa en la quimiorresistencia activando el eje OCT4-TCL1-AKT-ABCG2 (82) y SOX9 se relaciona con la resistencia al sorafenib mediante la sobreexpresión de ABCG2 (179).

Las LCSCs son capaces de evadir la destrucción por parte de los macrófagos sobreexpresando CD47, una glicoproteína que inhibe la fagocitosis mediante señales de “don’t-eat-me”. Esta proteína está sobreexpresada en muchos tumores sólidos, incluido el HCC (180) y se ha relacionado con la resistencia al sorafenib (181). Por otra parte, las LCSCs proporcionan un ambiente inmunosupresor capaz de reducir la respuesta inmune antitumoral y mediar la resistencia a la inmunoterapia gracias a varios mecanismos como la activación de vías de señalización de células madre, la baja expresión de moléculas presentadoras de antígenos y la alta expresión de moléculas inmunosupresoras como CD47 (182).

### 2.3. HETEROGENEIDAD EN EL HCC

Uno de los factores responsables de la baja eficacia de la terapia sistémica es la enorme heterogeneidad característica del HCC. Se pueden distinguir diferentes tipos de heterogeneidad tumoral: interpaciente (diferencias a nivel molecular entre los tumores de distintos pacientes), intrapaciente intertumoral (variaciones entre diferentes nódulos tumorales en un mismo paciente) e intratumoral (variaciones entre diferentes regiones del mismo nódulo tumoral de un paciente) (Figura I-6).



**Figura I-6.** Tipos de heterogeneidad tumoral en el carcinoma hepatocelular.

#### 2.3.1. Tipos de heterogeneidad

##### A. Heterogeneidad interpaciente

##### ▪ Heterogeneidad asociada a factores de riesgo

El desarrollo del HCC está asociado a diferentes factores, como infecciones virales hepáticas, consumo excesivo de alcohol y trastornos metabólicos inducidos por la dieta, entre otros. Las diversas etiologías se han correlacionado con determinadas

alteraciones genéticas del tumor, por lo que contribuyen de manera significativa a la heterogeneidad interpaciente. Por ejemplo, el VHB induce inestabilidad cromosómica y mutagénesis insercional. La inserción de este virus en el promotor del gen *TERT*, que provoca la sobreexpresión de la enzima telomerasa, es una de las más frecuentes (10). Se han identificado otras inserciones recurrentes asociadas al VHB que activan algunos oncogenes como *CCNA2* y *CCNE1*, los cuales codifican ciclinas implicadas en el control del ciclo celular. Estas alteraciones oncogénicas definen un subgrupo de HCC agresivo desarrollado principalmente en pacientes no cirróticos que presenta una firma única de reordenamientos estructurales y en el que también es frecuente la inactivación de los genes supresores tumorales *RBI* y *PTEN* (183). En los HCC relacionados con el VHB también son frecuentes las mutaciones inactivantes en los genes *TP53*, *AXIN1* y *KMT2B*, este último implicado en regulación epigenética (22,184). En un grupo pequeño de pacientes con HCC se ha identificado una mutagénesis insercional similar a la que produce el VHB, pero relacionada con la integración de virus adenoasociados de tipo 2 (185).

En el HCC asociado al consumo excesivo de alcohol son frecuentes las mutaciones en *CTNNB1*, *TERT*, *ARID1A* y *SMARCA2* (21,186). Hasta ahora, no se ha encontrado un patrón genético específico en el HCC relacionado con NAFLD. Las variantes en los genes *PNPLA3* y *TM6SF2* se asocian con el desarrollo y severidad de NAFLD, aunque no se ha determinado si confieren susceptibilidad al HCC (187,188).

La exposición a carcinógenos ambientales también se ha relacionado con la aparición de alteraciones genéticas específicas. El ejemplo más conocido es el de la aflatoxina B, que está asociada con una firma genética específica de HCC caracterizada por una alta tasa de transversiones G>T y la mutación específica p.R249S en p53 (189).

Además de las diferencias basadas en las diferentes alteraciones genéticas, la aparición secuencial de éstas puede ser distinta en función de la etiología. Por ejemplo, algunos pacientes sin cirrosis hepática pueden desarrollar adenomas hepatocelulares (HCA), tumores benignos asociados generalmente a la exposición de estrógenos que en ocasiones pueden progresar a HCC. Los HCAs se caracterizan por presentar mutaciones en *CTNNB1* (190), mientras que las mutaciones en el promotor de *TERT* ocurren posteriormente y parecen ser necesarias para la progresión de HCA a HCC (191). Sin embargo, en el desarrollo del HCC a partir de un hígado cirrótico que, como ya se ha

mencionado, representa la mayoría de los casos, se observan primero las mutaciones en el promotor de *TERT*, incluso en etapas pre-cancerosas (24).

A pesar del perfil mutacional específico de los diferentes factores de riesgo, existe una gran heterogeneidad dentro de cada grupo etiológico. Además, en el HCC se encuentran alteradas una gran variedad de vías de señalización, lo que dificulta también la estratificación de pacientes en función de su firma molecular. Varios estudios han identificado las rutas que están alteradas con mayor frecuencia en el HCC e incluyen mutaciones en el promotor del gen de la telomerasa (60%), así como en las vías de Wnt/ $\beta$ -catenina (54%) PI3K/AKT/mTOR (51%), ciclo celular/TP53 (49%), MAPK quinasas (43%), en genes de diferenciación hepática (34%), regulación epigenética (32%), remodelación de la cromatina (28%), y en las vías de estrés oxidativo (12%), JAK/STAT (9%) y TGF- $\beta$ /Smad (5%) (22,192). Además de las alteraciones genéticas, las modificaciones epigenéticas también son muy frecuentes en este tumor. De hecho, se han generado firmas basadas en cambios de metilación que se asocian con distintas subclases moleculares de HCC con diferente pronóstico (193,194).

A diferencia de otros tumores, el HCC rara vez aparece como consecuencia de síndromes monogénicos. Excepcionalmente, se ha observado este tumor en pacientes con mutaciones en la línea germinal del gen *APC* o que presentan enfermedades metabólicas monogénicas raras como la hemocromatosis (alteraciones en *HFE1*), la enfermedad de Wilson (alteraciones en *ATP7B*), la tirosinemia de tipo I (alteraciones en *FAH*) o la enfermedad de la  $\alpha$ -1 antitripsina (alteraciones en *SERPINA*).

- **Heterogeneidad del microambiente tumoral**

La heterogeneidad interpaciente también puede deberse a diferentes componentes del microambiente tumoral, como el sistema inmune, que es característico del paciente con un genoma y un patrón de expresión únicos, y desempeña un papel fundamental en el crecimiento del tumor. En los últimos años ha aumentado el interés por investigar el microambiente inmune tumoral y su heterogeneidad en el HCC debido a la aparición de fármacos de inmunoterapia como opciones de tratamiento sistémico de primera línea para los pacientes con esta enfermedad. Los tumores de distintos pacientes muestran un grado diferente de infiltración de células del sistema inmune y composición de estas.

Atendiendo al grado de infiltración inmune y a los datos de expresión de células inflamatorias y moléculas inmunorreguladoras en los tumores, se ha propuesto una

clasificación del HCC basada en características inmunes que divide a los tumores en diferentes subclases (195):

- **Clase inmune:** representa el 25% de los HCCs y se caracteriza por un alto nivel de infiltración de células inmunitarias como linfocitos T citotóxicos y expresión positiva de marcadores de puntos de control inmunitario, incluyendo PD-1 y PD-L1. A su vez, los tumores de la clase inmune se subdividen en dos grupos según si la respuesta inmune es activa (*active-immune-class*) o exhausta (*exhausted-immune-class*). La clase inmune activa se caracteriza por la sobreexpresión de genes de respuesta inmune adaptativa (receptor de células T, IFN- $\gamma$ , granzina B) y está asociada a una mejor respuesta a los ICIs, mientras que la clase inmune exhausta se caracteriza por la presencia de señales inmunosupresoras (p. ej. células T exhaustas, genes regulados por la señalización TGF- $\beta$  y macrófagos de tipo M2).
- **Clase inmuno-excluida:** representa el 75% restante de los HCCs. Se trata de un grupo muy heterogéneo en el que la principal característica es la evasión inmune (escasez de infiltrados de células T e incremento de células T reguladoras, las cuales tienen un papel inmunosupresor). Las células tumorales pueden evadir la respuesta inmune antitumoral mediante diversos mecanismos. Por ejemplo, se ha descubierto que la activación de la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina favorece el escape inmune mediante el reclutamiento deficiente de células dendríticas y el consiguiente deterioro de la actividad de las células T, promoviendo la resistencia del HCC a la inmunoterapia (127).

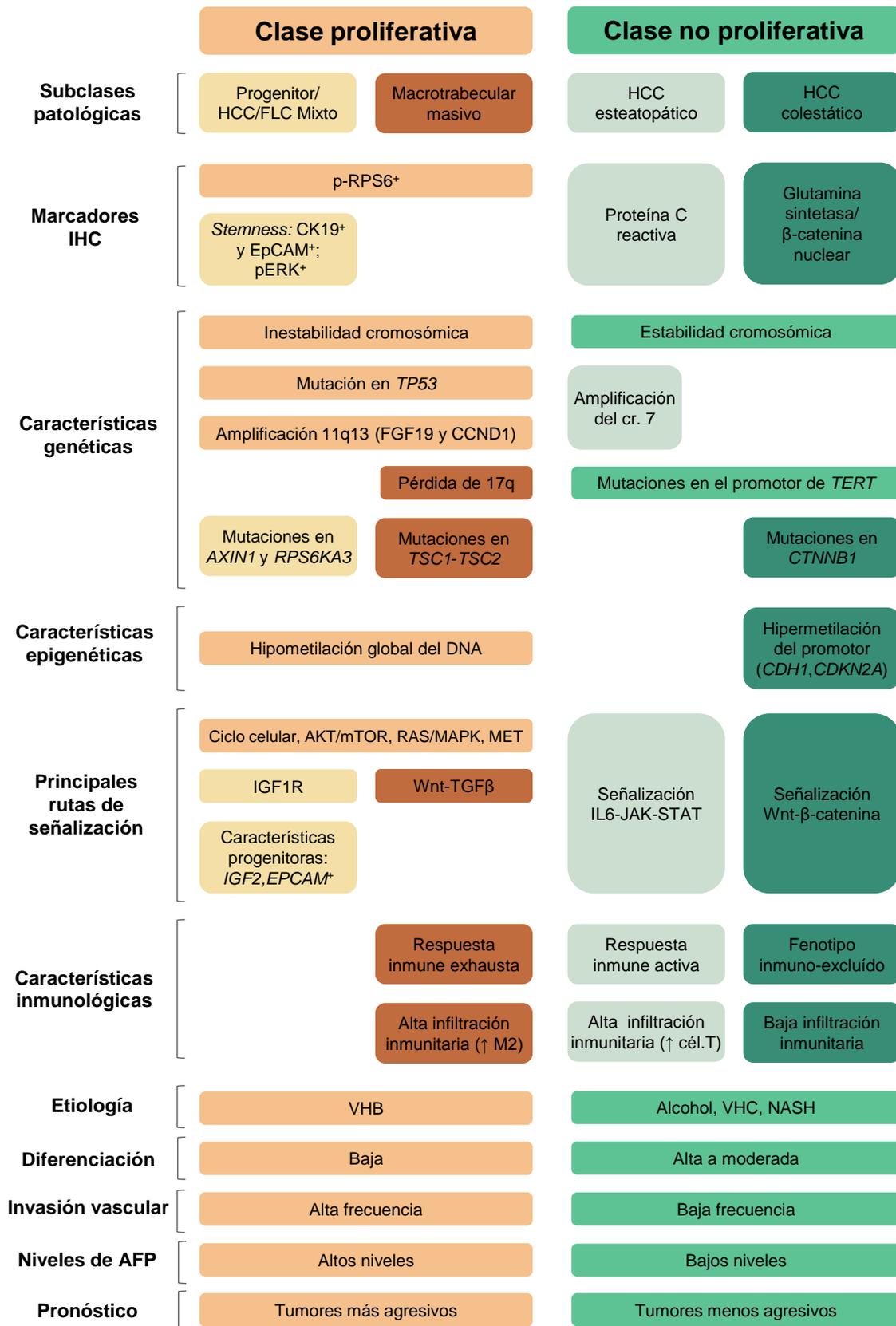
### ▪ **Subclases moleculares en el HCC**

Uno de los principales retos es clasificar los diferentes perfiles moleculares del HCC con el fin de estratificar los pacientes y definir con mayor precisión el pronóstico y las opciones de tratamiento. Sin embargo, las clasificaciones basadas únicamente en el perfil genómico no abarcan todos los factores que contribuyen a la heterogeneidad fenotípica observada en los tumores. Durante las últimas décadas, numerosos estudios han tratado de clasificar los tumores en función del perfil molecular en combinación con características clínicas, histopatológicas, etiológicas e inmunológicas (195–198). La integración de todos estos estudios ha llevado a proponer una clasificación general que

divide a los tumores en dos grupos principales: clase proliferativa y clase no proliferativa (192,199,200) (Figura I-7).

- **Clase proliferativa:** representa alrededor de un 50% de los HCCs e incluye tumores más agresivos y con peor pronóstico, poco diferenciados, con alta invasión vascular y niveles elevados de AFP. Este tipo de tumores es más común en el HCC asociado al VHB. A nivel molecular, estos tumores tienen activadas las vías clásicas de proliferación celular como PI3K/AKT/mTOR, RAS/MAPK y MET. También son frecuentes las mutaciones en *TP53*, amplificaciones en *FGF19* o *CCND1*, la elevada inestabilidad cromosómica y la hipometilación global del DNA (194). A su vez, esta clase se puede dividir en dos subclases: la subclase “Wnt-TGF- $\beta$ ”, caracterizada por la activación de las vías de señalización de Wnt y TGF- $\beta$  y una respuesta inmune exhausta, y otra subclase que presenta un fenotipo similar al de células progenitoras, con expresión de marcadores de células madre (CK19, EpCAM), mutaciones en *AXIN1* y *RPS6KA3*, y activación de las vías de señalización IGF2 y EpCAM.
- **Clase no proliferativa:** corresponde al otro 50% de los HCCs y se caracteriza por ser tumores menos agresivos, con un grado de diferenciación bueno o moderado (con características más próximas a las de los hepatocitos sanos), invasión vascular menos frecuente y bajos niveles de AFP. Estos tumores se relacionan con NASH, esteatohepatitis alcohólica e infección por el VHC. A nivel molecular, esta clase presenta estabilidad cromosómica con frecuentes mutaciones en el promotor de *TERT*. A su vez, pueden diferenciarse dos subgrupos: uno de ellos caracterizado por la activación de Wnt/ $\beta$ -catenina, debido principalmente a mutaciones en *CTNNB1*, que conduce a un fenotipo inmuno-excluido con escasa infiltración de células del sistema inmune, en el que también es frecuente la hipermetilación de *CDH1* y *CDKN2A*. El otro subgrupo, al que denominan “interferón”, presenta una activación de la vía de señalización IL6/JAK/STAT, con un microambiente tumoral de tipo más inflamatorio.

# INTRODUCCIÓN



**Figura I-7.** Clasificación molecular y patológica integrada del carcinoma hepatocelular (HCC). Para cada subclase se muestran las principales asociaciones con características patológicas, inmunohistoquímicas (IHC), genéticas, epigenéticas, inmunológicas y clínicas. AFP,  $\alpha$ -fetoproteína; VHB, virus de la hepatitis B; VHC, virus de la hepatitis C; cél, célula; FLC, carcinoma fibrolamelar; M2, macrófagos M2; NASH, esteatohepatitis no alcohólica. Modificado de (199).

## B. Heterogeneidad intrapaciente intertumoral

Además de la heterogeneidad tumoral entre pacientes, ésta también se puede observar en un mismo paciente por la presencia de múltiples nódulos con diferentes características, lo que se conoce como heterogeneidad intertumoral. Estos nódulos pueden surgir a partir del tumor primario mediante metástasis intrahepática (IM, del inglés *intrahepatic metastasis*) o bien pueden desarrollarse de forma independiente, lo que se conoce como origen multicéntrico (MO, del inglés, *multicentric origin*). Varios estudios han señalado que los HCCs multifocales con distinto origen clonal presentan un comportamiento biológico y una evolución clínica diferentes. En general, se ha observado que los tumores de tipo IM tienen peor pronóstico que los de tipo MO (201,202). Por tanto, es fundamental conocer el origen de los diferentes nódulos para elegir la estrategia terapéutica más adecuada. La discriminación clínica entre ambos tipos puede realizarse teniendo en cuenta la localización y el tamaño de los nódulos tumorales, la invasión de la vena portal o el grado histológico del tumor tras la resección (203). Otro criterio diagnóstico se basa en el tiempo de recurrencia, considerando tumores de tipo IM a aquellos que aparecen durante los dos primeros años tras la resección (evento de recurrencia temprana), mientras que en el caso de recurrencia tardía ( $\geq 2$  años) los tumores son clasificados como HCCs de tipo MO, y probablemente surjan de lesiones preneoplásicas del hígado cirrótico (204). Sin embargo, actualmente no existe un consenso generalizado para el diagnóstico diferencial de ambos tipos de HCC multinodular y los enfoques basados únicamente en criterios clinicopatológicos e histológicos no permiten una discriminación precisa.

Para superar las limitaciones de la discriminación IM/MO basada en características patológicas, se han utilizado una gran variedad de técnicas moleculares para identificar el origen de los diferentes nódulos, como el análisis de variantes de p53 y de los sitios de integración del VHB en el DNA (205,206), variaciones en la secuencia de DNA mitocondrial (207), análisis de la pérdida de heterocigosidad (LOH) mediante marcadores de microsatélites (201), etc. La sensibilidad de todas estas técnicas es limitada porque analizan solo una pequeña proporción de las alteraciones genéticas. Sin embargo, los avances de los últimos años en las técnicas de secuenciación masiva han facilitado el diagnóstico diferencial del HCC multifocal. Varios estudios basados en NGS (del inglés, *next generation DNA sequencing*) han revelado que las tasas de mutación compartida entre diferentes nódulos en el HCC de tipo IM varían entre el 8 y 97%, y uno de estos

estudios ha establecido un valor de corte del 5% para discriminar el HCC de tipo IM con alta sensibilidad (208). La presencia de variaciones estructurales compartidas también facilita la identificación de este tipo de HCC multifocal (208). En cuanto a los análisis transcripcionales, se ha observado que la mayoría de los cambios funcionales son comparables entre lesiones metastásicas, pero bastante diferentes entre tumores de tipo MO (209).

### C. Heterogeneidad intrapaciente intratumoral

Dentro de un mismo nódulo tumoral también puede observarse una alta heterogeneidad entre sus células. Durante décadas se han propuesto varias hipótesis para explicar la heterogeneidad intratumoral del HCC. Los modelos más aceptados son el modelo de evolución clonal y el modelo de las CSCs (Figura I-8). Estos modelos no son mutuamente excluyentes y se cree que ambos pueden contribuir a la heterogeneidad intratumoral.

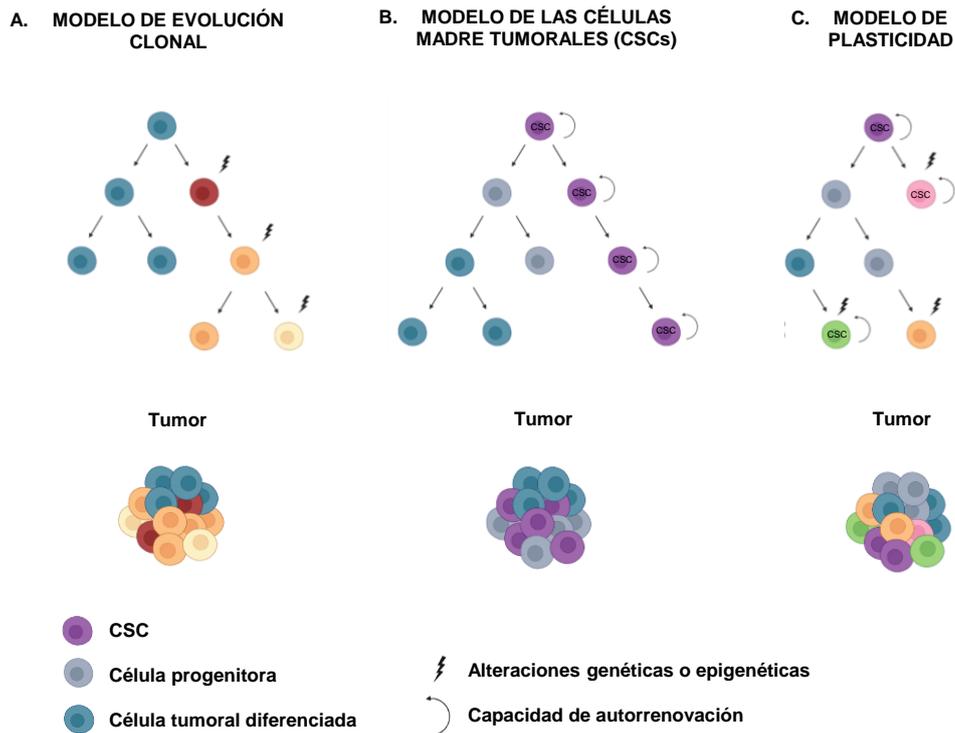
- **Modelo de evolución clonal o modelo estocástico.** Fue descrito por primera vez por Nowell en 1976 (210). Este modelo sugiere que los tumores surgen de una única célula con una serie de mutaciones que le confieren ventaja proliferativa. Durante la progresión del tumor, estas células adquieren alteraciones genéticas adicionales como resultado de la inestabilidad genómica o cambios en el microambiente, dando lugar a la aparición de subclones. Aquellos que presenten una ventaja evolutiva sobre los demás pueden convertirse en los subclones dominantes con el tiempo. En concordancia con esta hipótesis, numerosos estudios han demostrado la existencia de mutaciones troncales y mutaciones de rama mediante la secuenciación del exoma de varias regiones de nódulos tumorales únicos (211,212). Las mutaciones troncales están presentes en todas las células tumorales y probablemente representan eventos tempranos implicados en el inicio del tumor, mientras que las mutaciones de rama solamente se encuentran en algunos subclones tumorales y aparecen más tarde en el desarrollo de este. En un estudio en el que se analizaron 151 muestras de HCC en distintos estadios de progresión tumoral se encontró que las mutaciones en la región codificante de los genes *TP53* y *CTNNB1*, junto con las mutaciones en el promotor de *TERT*, eran las mutaciones troncales más frecuentes. El 51% de los nódulos displásicos y de los HCCs pequeños tenían una mutación en, al menos, uno de estos genes, y el

80% de estas mutaciones estaban presentes tanto en los tumores primarios como en los metastásicos en HCC avanzado (213).

Hay estudios que apoyan otras teorías de evolución tumoral distintas al modelo de evolución clonal. Por ejemplo, mediante el análisis de 286 muestras procedentes de un único tumor de HCC, se determinó la existencia de 20 subclones que mostraban un tamaño y una tasa de crecimiento similar, sugiriendo un modelo no darwiniano (214). Los resultados de este análisis son compatibles con el modelo de evolución neutra, que sostiene que las mutaciones se acumulan con el tiempo sin que ninguna población clonal presente una ventaja selectiva. Otro trabajo en el que se utilizó la secuenciación del genoma de célula única se demostró el modelo de evolución puntuada (215), que defiende la existencia de un gran número de alteraciones genéticas en las etapas tempranas del tumor, pero solamente unos pocos clones se expanden por presión selectiva inherente o exógena.

- **Modelo de las CSCs.** Este modelo, también conocido como modelo jerárquico, sugiere que el inicio y progresión del tumor se debe a una subpoblación de células tumorales, las CSCs, con características de autorrenovación y capacidad para diferenciarse (216). En consecuencia, las CSCs generan heterogeneidad celular estableciendo una jerarquía de diferenciación que da lugar a una variedad de tipos celulares distintos dentro del mismo tumor. Así mismo, se ha demostrado que incluso las CSCs pueden dividirse en varias subpoblaciones con marcadores de membrana plasmática, marcadores moleculares y fenotipos funcionales distintos, lo que contribuye aún más a la heterogeneidad intratumoral del HCC (217).

Aunque el modelo inicial sostiene una jerarquía de diferenciación unidireccional en el que las células tumorales diferenciadas no pueden desdiferenciarse, las evidencias demuestran que esta jerarquía puede ser reversible o plástica, de modo que las células diferenciadas pueden adquirir propiedades de células madre en determinadas circunstancias bajo la influencia de factores intrínsecos (genéticos o epigenéticos) o extrínsecos (microambiente tumoral o tratamiento farmacológico) (220,221).



**Figura I-8. Representación de los diferentes modelos que explican la heterogeneidad intratumoral.**

(A) El modelo de evolución clonal propone que varias poblaciones de células tumorales evolucionan progresivamente por la adquisición de sucesivas mutaciones, generando un tumor heterogéneo con expansión clonal de subclones dominantes. (B) El modelo de las células madre tumorales (CSCs) sostiene que el crecimiento y la progresión del tumor está determinado una pequeña subpoblación de células con alto potencial tumorigénico (CSCs) capaces de autorrenovarse y diferenciarse en todos los tipos celulares fenotípicamente diferentes que forman el tumor. (C) El modelo de plasticidad combina los dos modelos anteriores. Según este modelo las CSCs pueden adquirir mutaciones y generar nuevas ramas de CSCs. Así mismo, la subpoblación de células tumorales no-CSC puede sufrir una transición fenotípica epitelio-mesenquimal y adquirir características similares a las CSCs, lo que contribuye a la gran heterogeneidad y complejidad del tumor.

### 2.3.2. Enfoques para estudiar la heterogeneidad tumoral

Muchos estudios se han centrado en la caracterización de la heterogeneidad del HCC con el fin de comprender mejor la biología compleja del tumor y poder establecer los enfoques terapéuticos más adecuados para cada paciente. Existen numerosas metodologías para estudiar la heterogeneidad tumoral:

- Técnicas multi-ómicas.** Actualmente, la mayoría de los estudios que evalúan la heterogeneidad del HCC utilizan técnicas multi-ómicas basadas en la tecnología NGS como la secuenciación del genoma o exoma completo o secuenciación del transcriptoma. Hasta ahora, la estrategia más utilizada ha sido la del muestreo multirregional de tumores, que permite el análisis de regiones separadas del tumor (211). Aunque este enfoque ha proporcionado conocimientos valiosos sobre la

heterogeneidad del HCC, no tiene en cuenta las diferencias entre los distintos tipos de células presentes en una misma región del tumor. En este sentido, en los últimos años se están desarrollando nuevas tecnologías para el estudio del genoma, exoma o transcriptoma de células individuales, lo que permite un análisis mucho más exhaustivo del tumor (218). Para este tipo de estudios, los tumores sólidos se disgregan en suspensiones de células individuales, y éstas se aíslan mediante diversos métodos, como la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) o la tecnología microfluídica. Una vez separadas, se realiza la amplificación del genoma o transcriptoma completo para su posterior secuenciación mediante NGS (219). Estas tecnologías también se han empleado para estudiar la heterogeneidad de las células del microambiente tumoral del HCC (220,221).

- **Biopsia líquida.** Se trata de otra herramienta especialmente útil para estudiar la heterogeneidad y la presencia de subclones resistentes a fármacos de forma mínimamente invasiva. La biopsia líquida evalúa los componentes liberados por las células tumorales al torrente sanguíneo, como el cfDNA (del inglés, *cell-free DNA*), microvesículas extracelulares, así como las células tumorales circulantes (CTCs). Numerosos grupos ya han sido capaces de analizar el cfDNA y las CTCs de pacientes con HCC mediante técnicas de secuenciación masiva (222).
- **Modelos experimentales.** Los modelos experimentales son herramientas muy útiles para explorar los mecanismos moleculares responsables de la carcinogénesis y estudiar la heterogeneidad de los tumores. Existen diferentes modelos que permiten reproducir la complejidad del HCC. Entre los modelos experimentales *in vitro* empleados caben destacar las líneas celulares primarias derivadas de pacientes y organoides derivados de pacientes (223). También son muy prometedores algunos modelos *in vivo*, como los xenoinjertos derivados de pacientes, los cuales se basan en la implantación de células tumorales de pacientes en ratones inmunodeprimidos. Estos modelos ya se han utilizado con éxito para estudiar la progresión del HCC, identificar nuevos marcadores y realizar cribados preclínicos de fármacos (224,225). Otros modelos *in vivo* que se utilizan comúnmente para el estudio del HCC son aquellos en los que el tumor se desarrolla mediante la exposición a carcinógenos (226) o bien modelos animales de HCC obtenidos mediante modificación genética (227).



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS



### 3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

#### 3.1.1. Muestras humanas

Las muestras tumorales de los pacientes con HCC (n=40) que habían sido obtenidas por resección quirúrgica fueron proporcionadas por los bancos de tumores del Hospital Universitario de Salamanca y del Hospital Clinic de Barcelona. Todos los pacientes habían firmado el consentimiento informado para la utilización de las muestras en investigación biomédica. Los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del área de Salud de cada uno de los hospitales de procedencia. Los datos de los sujetos participantes en el estudio se trataron con confidencialidad y seguridad, de acuerdo con la normativa que se recoge en la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica, el Real Decreto 1716/2011 y la Ley Orgánica 3/2018 de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales. En las tablas MM-1 y MM-2 se recoge la información clínico-patológica más relevante de los pacientes incluidos en el estudio.

**Tabla MM-1.** Datos clínicos de los pacientes con HCC.

Variable	HCC (n=40)
<b>Mediana de edad (IQR)</b>	71 (63-75)
<b>Edad (rango)</b>	19-84
<b>Hombres, n (%)</b>	34 (85)
<b>Mujeres, n (%)</b>	6 (15)
<b>Enfermedad subyacente*</b>	n (%)
<b>Cirrosis</b>	11 (28)
<b>VHB</b>	3 (8)
<b>VHC</b>	11 (28)
<b>Consumo excesivo de alcohol</b>	13 (33)
<b>Esteatosis</b>	13 (33)
<b>Hepatitis crónica</b>	9 (23)
<b>No identificada</b>	3 (8)

IQR, rango intercuartílico; HCC, Carcinoma Hepatocelular; VHB, virus de la hepatitis B, VHC, virus de la hepatitis C. \*Los pacientes pueden tener más de una enfermedad subyacente.

**Tabla MM-2.** Características del tumor de los pacientes con HCC.

Estadio tumoral BCLC	n (%)
<b>BCLC 0</b>	4 (10)
<b>BCLC A</b>	31 (78)
<b>BCLC B</b>	5 (12)
Grado de diferenciación	n (%)
<b>G1</b>	10 (25)
<b>G2</b>	22 (55)
<b>G2-G3</b>	2 (5)
<b>G3</b>	2 (5)
<b>ND</b>	4 (10)
Invasión vascular	n (%)
<b>Si</b>	12 (30)
<b>No</b>	20 (50)
<b>ND</b>	8 (20)

BCLC, *Barcelona Clinic Liver Cancer*; HCC, Carcinoma Hepatocelular; ND, No Disponible;

Así mismo, se utilizaron 47 muestras de tejido tumoral y adyacente al tumor procedentes de pacientes con HCC proporcionadas por el Instituto de Patología de la Universidad de Regensburg para el análisis de expresión proteica. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de Regensburg y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los individuos.

### 3.1.2. Líneas celulares

Se utilizaron las siguientes líneas celulares de origen humano:

- Alexander o PCL/PRF/5 (CRL 8024), de HCC; HepG2 (HB-8065), de hepatoblastoma; y HEK293 (CRL-1573), células embrionarias de riñón, proporcionadas por la American Type Culture Collection (ATCC, LGC Standards, Barcelona).
- HuH-7, de HCC, obtenida del Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (Tokio, Japón) (JCRB JCRB0403).
- Las líneas celulares HLF, HLE, Snu449 y Snu182, todas ellas de HCC, fueron cedidas por el Dr. Diego F. Calvisi del Instituto de Patología de la Universidad de Regensburg (Alemania).

### 3.1.3. Bacterias

Se utilizó la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (*E. coli*), químicamente competente, proporcionada por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca para la producción de plásmidos.

## 3.2. PRODUCTOS

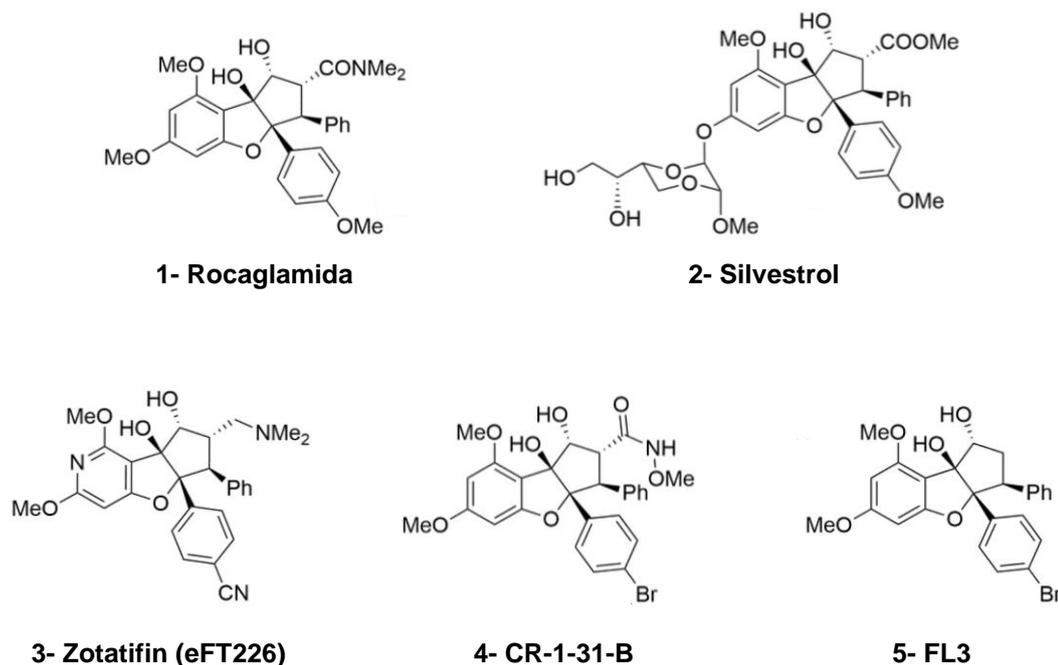
Los productos utilizados en este trabajo se obtuvieron de las siguientes casas comerciales:

- Abcam (Cambridge, Reino Unido): anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (ab6721), anticuerpos anti-eIF4A1 (ab31217), anti-eIF4A2 (ab31218), anti- $\beta$ -actina-HPR (ab20272).
- Addgene (Teddington, Reino Unido): plásmido que contiene la ORF (del inglés, *open reading frame*) de la endonucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes* con codones optimizados para su expresión en células humanas (#60599, pHL-EF1 $\alpha$ -SphcCas9-iP-A) y plásmido que contiene el fragmento genérico para la expresión del RNA guía (#42335, pX335-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9n (D10A)).
- Air Liquide (Valladolid): CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>.
- AppliChem-Panreac (Prosisa, Salamanca): ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetan sulfónico (HEPES),  $\beta$ -mercaptoetanol, glicina, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-Gal) y leche descremada liofilizada.
- BD Biosciences (VWR Internacional, Barcelona): fluido envolvente FACS Flow para citometría de flujo y colágeno tipo I de cola de rata.
- Biomers.net (Donau, Alemania): oligonucleótidos o *primers*.
- Bio-Rad (Madrid): tampón Tris 0,5 M pH 6,8, tampón Tris 1,5 M pH 8,8, persulfato de amonio, acrilamida, membrana de nitrocelulosa, tampón de bloqueo EveryBlot, tetrametiletilendiamina (TEMED), rojo Ponceau, el marcador de pesos moleculares para electroforesis de proteínas “Precision Plus Protein Dual Color™ Standards”, sustrato de Western blot “Clarity Max ECL”.
- BioTools (Madrid): DNA Taq polimerasa, cloruro de magnesio, desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) y desoxiadenosina trifosfato (dATP).
- Cell Signaling Technology (Werfen, Barcelona): anticuerpos anti-AKT (9272), anti-pAKT Ser473 (4060), anti-ARID1A (12354), anti-E-cadherina (3195), y anti-PTEN (9188).

- Condalab (Madrid): agar, extracto de levaduras y triptona.
- GE Healthcare (Thermo Fisher Scientific, Madrid), “illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit”, “illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit”, “illustra PlasmidPrep Mini Spin Kit” y reactivos de detección ECL (*Enhanced chemiluminescence*).
- Merck (Sigma-Aldrich, Madrid): cloruro sódico, etanol, glicerol, isopropanol y metanol.
- MedChemExpress (Estocolmo, Suecia): CR-1-31-B (HY-136453), Rocaglamida (HY-19356), Silvestrol (HY-13251), Zotatifin (HY-112163).
- Millipore (Thermo Fisher): filtros “Steritop™” para la esterilización de medios de cultivo.
- NH DyeAgnostics (Halle, Germany): kit para la normalización de proteínas “Smart Protein Layers SPL Kit Red”.
- Promega Corporation (Madison, EE.UU.): algunas enzimas de restricción, y el plásmido pGEM®-T Easy.
- Pronadisa (Condalab): agarosa de uso habitual, agarosa de alta resolución MS-8, agarosa LM de bajo punto de fusión.
- Roche (Barcelona): tripsina de páncreas porcino.
- Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, EE.UU.): anticuerpos anti-GAPDH (sc-32233) y anti-p53 (sc-126), y anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (sc-516102).
- Selleckchem (Deltaclon, Madrid): tosilato de sorafenib, cabozantinib, regorafenib, mesilato de lenvatinib.
- Sigma-Aldrich (Madrid): ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), albúmina sérica bovina (fracción V), ampicilina, azul de bromofenol, azul de Tripán, bicarbonato sódico, cis-diaminodicloroplatino II (cisplatino), clorhidrato de doxorubicina, D-glucosa, dietilpirocarbonato (DEPC), dimetilsulfóxido (DMSO), ditioneitol (DTT), dodecil sulfato sódico (SDS), yoduro de propidio (IP), IGEPAL, diclorhidrato de puromicina, isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), sulforodamina B, cristal violeta, bromuro de metiltiazolildifenil tetrazolio (MTT), medio de cultivo “Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM)-high glucose”, “Minimum Essential Medium Eagle” (MEM), reactivo de Folin Ciocalteau, piruvato sódico, mezcla de inhibidores de proteasas, polietilenimina

- (PEI), RNasa, sulfato de gentamicina, Tris (trishidroximetil aminometano) base (Trizma) o clorhidrato (Tris-HCl) y Triton X-100.
- Thermo Fisher Scientific: Accuprime® *Pfx* DNA polimerasa de alta fidelidad, AmpliTaq Gold DNA polimerasa, mezcla de antibióticos (penicilina/estreptomocina) y antimicótico (anfotericina B), enzimas de restricción “FastDigest”, HEPES (1 M), piruvato sódico (100 mM), GlutaMAX™ (100X), suero bovino fetal (FBS), el kit comercial para la transcripción reversa (RT) “High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit”, “Lipofectamine™ LTX Reagent” y “Plus™ Reagent”, mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas Halt™, líquido estabilizador “RNAlater”, RNA total de hígado humano, marcadores de peso molecular de DNA (25, 100 y 500 pb y 1 kb plus), marcador de peso molecular de proteínas “PageRuler Plus Prestained Protein Ladder”, tampón de muestra Bolt™ LDS (4X), agente reductor de muestras Bolt™ (10X), tampón de procesamiento Bolt™ MES SDS (20X), membranas de nitrocelulosa iBlot™ 2 Mini/Regular Transfer Stacks, enzima T4 DNA ligasa, medios de cultivo Opti-MEM y RPMI 1640 con Glutamax™, medio SOC, kit GeneArt® Genomic Cleavage Detection, SYBR Green I para teñir DNA en geles de agarosa (“SYBR Safe”), “SYBR Green I PCR Master Mix”, “Taqman® Universal PCR Master Mix”, tarjetas microfluídicas o TLDA, el kit de apoptosis “eBioscience™ Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit” y la solución de tinción del DNA para el ensayo de ciclo celular “FxCycle™ PI/RNase Staining Solution”.
  - VWR Internacional: ácido acético glacial, ácido clorhídrico, carbonato sódico, cloruro sódico, dihidrógeno fosfato potásico, fosfato ácido potásico, fosfato disódico, indicador universal de pH, etanol (grado analítico) y Tween® 20.
  - Whatman (Thermo Fisher): papel de cromatografía Whatman de 3 mm para la transferencia en Western blot.

En la figura MM-1 se muestra la estructura química de los inhibidores del factor de iniciación de la traducción eIF4A que se utilizaron para el estudio llevado a cabo en el capítulo III de esta Tesis Doctoral.



**Figura MM-1.** Estructura química de los rocaglatos naturales (1-2) y derivados sintéticos (3-5). Figura modificada de (228).

### 3.3. MEDIOS INSTRUMENTALES

El agua destilada y ultrapura se obtuvieron mediante un equipo de filtración MilliQ Integral 3 (Merck-Millipore, Madrid).

Para la determinación de pH se utilizó un electrodo de marca Crison micro pH 2002 (Crison Instruments, Barcelona).

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

Las centrifugaciones se realizaron en centrífugas refrigeradas 5417R y 5810R marca Eppendorf (Hamburgo, Alemania), Megafugue-1.0 R (Heraeus Spatach, Hanau, Alemania) y L8-M Ultracentrifuge, rotor 70.1 Ti (Beckman, Brea, EE.UU.). También se utilizaron picofugas Stratagene (VWR International).

Las filtraciones a vacío se realizaron con una bomba Millipore modelo XX5522050 (Merck-Millipore). Para la esterilización de sólidos y líquidos se empleó un autoclave modelo Tuttnaver 2340 M (Grupo Taper).

Para las determinaciones espectrofotométricas de la concentración de proteínas se utilizó el espectrofotómetro Hitachi U-2000 (Grupo Taper) o FLUOstar Omega (BMG Labtech, Germany); y para la determinación de la viabilidad celular, un lector de ELISA modelo Multiskan SkyHigh (Thermo Fisher) o FLUOstar Omega (BMG Labtech, Germany). Las determinaciones espectrofotométricas de la concentración de DNA y RNA se realizaron con un NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher).

Para llevar a cabo la PCR analítica y la RT se utilizó un termociclador Eppendorf Mastercycle egradient (Thermo Fisher). Los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real se realizaron en un aparato QuantStudio™ 3 (Applied Biosystems, Thermo Fisher). Para las tarjetas microfluídicas se utilizó el modelo ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System de la misma compañía.

La secuenciación de los fragmentos de DNA se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca mediante un secuenciador automático capilar ABI PRISM3100-Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Thermo Fisher). Para la visualización de las secuencias se utilizó el programa SnapGene Viewer (Insightful Science, California, EE.UU.), y para el diseño de estudios de restricción de los plásmidos, el programa Gene Construction kit 2.5.13 para MacOS X (Textco, New Hampshire, EE.UU.).

La electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa se realizó en un sistema de geles horizontales sumergidos modelo MT-1001 de la casa Ecogen (Madrid), acoplado a una fuente Bio-Rad Power Pac 3000 (Bio-Rad). La electroforesis de proteínas se llevó a cabo en un sistema de electroforesis modelo Mini-Protean II Cell con fuente de alimentación modelo PowerPac 300. Para la transferencia electroforética a membranas de nitrocelulosa se empleó el sistema Trans-Blot Cell II, todo procedente de Bio-Rad.

Para la visualización de la fluorescencia de los geles de ácidos nucleicos y la luminiscencia de las membranas de Western blot se empleó el equipo de análisis de imagen LAS-4000 (Fujifilm, TDI, Madrid) o ChemiDoc (Bio-Rad). Las imágenes se analizaron con el programa informático MultiGauge v3.0 (Fujifilm) o Image Lab™ (Bio-Rad).

Para el manejo de las bacterias se utilizó una campana de flujo laminar Telstar AV 30/70. Para el cultivo de las bacterias se utilizó una estufa termostaticada a 37°C modelo S-20 (Selecta, Prosisa).

El manejo de cultivos celulares se realizó una campana de flujo laminar modelo Telstar Bio-IIA (Telstar). Las células se mantenían a 37°C en un incubador termostaticado con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% humidificada modelo Hepa Class 100 (Thermo Fisher). Para el cultivo de las líneas celulares se utilizaron placas de cultivo de 96 pocillos (TTP, Prosisa) 24 y 6 pocillos, placas circulares de 10 cm de diámetro, así como frascos de cultivo de 25 y 75 cm<sup>2</sup> de Corning (Thermo Fisher). La esterilización de las soluciones se hizo mediante filtros Sterivex de 0,1 µm (Merck-Millipore). Para el conteo de las células se utilizaron cámaras Neubauer, y para su visualización se utilizó un microscopio de contraste de fases, que además tenía acoplado una lámpara para fluorescencia Nikon Eclipse TE 2000-S (Nikon, Duerolab, Salamanca). Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ (National Institutes of Health, EE.UU.)

Las muestras de RNA y proteínas se conservaron en un congelador -80°C marca Revco (Thermo Fisher). Los viales de almacenamiento de las distintas líneas celulares se conservaban en un contenedor de N<sub>2</sub> líquido (Thermo Fisher).

Las medidas de fluorescencia mediante citometría de flujo se realizaron en un citómetro FACScalibur™ (BD Biosciences, VWR Internacional). Se utilizó el programa informático FlowJo™ de la misma casa comercial para el análisis de datos.

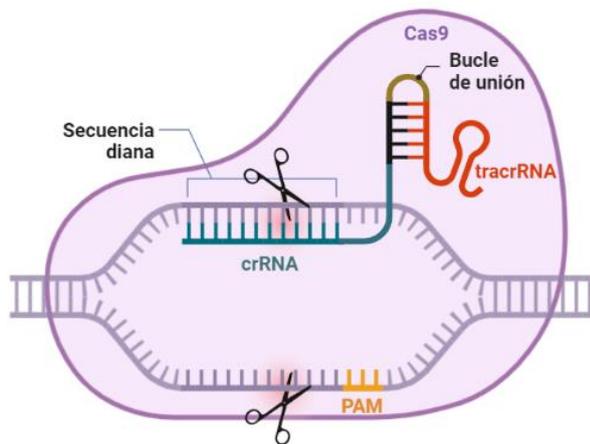
Las incubaciones se llevaron a cabo en un baño termostaticado LAUDA Ecoline Staredition RE 106 (Hucoa-Erlöss) y en un bloque térmico QBA2 Grant (Thermo Fisher).

Se utilizó pequeño equipamiento, como agitadores magnéticos Selecta (Duerolab), agitadores Vortex de Ika Works (Wilmington, EE.UU.) y micropipetas Gilson (Thermo Fisher).

### 3.4. TÉCNICAS DE EDICIÓN GENÓMICA: CRISPR-CAS9

En esta Tesis Doctoral se empleó el sistema de CRISPR-Cas9 como método de silenciamiento génico. Esta herramienta de edición genómica se basa en la generación de un corte de doble cadena (DSB) en una región específica del genoma de las células. En ausencia de un DNA molde, las células eucariotas reparan el daño producido en el DNA mediante el mecanismo NHEJ. La reparación por NHEJ normalmente genera inserciones o deleciones (*indels*) aleatorias en el sitio diana que pueden dar lugar a la aparición de un codón de terminación prematuro debido a un cambio en el marco de lectura, originando una proteína truncada o no funcional.

La tecnología de CRISPR-Cas9 consta de dos componentes principales: la endonucleasa Cas9 y una molécula de RNA que guía a la endonucleasa a un sitio específico del gen diana para generar el DSB (Figura MM-2). Este RNA guía, también denominado sgRNA, está formado por una secuencia de 20 nt complementaria a la secuencia diana (crRNA) unida a un RNA transactivador que se une a la proteína Cas9 (tracrRNA). La actividad endonucleasa de Cas9 en el sitio diana requiere de la presencia de una secuencia conservada corta conocida como motivo adyacente al protoespaciador o PAM, localizada inmediatamente después del extremo 3' de la secuencia diana. Las secuencias PAM varían entre diferentes organismos. En nuestro caso se utilizó la endonucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (*spCas9*), siendo 5'-NGG-3' la secuencia consenso.



**Figura MM-2.** Componentes de la tecnología CRISPR-Cas9 utilizada para el silenciamiento génico.

Para conseguir el silenciamiento del gen de interés mediante la tecnología de CRISPR-Cas9 se emplearon dos vectores:

- El vector comercial pHL-EF1a-SphcCas9-iP-A, que contenía la ORF de la endonucleasa Cas9.

- El vector pGEM-sgc-guía (sgc, del inglés *single guide cassette*), con un con un fragmento que contenía la secuencia codificante del RNA guía específico del gen de interés precedida por la del promotor específico U6.

### 3.4.1. Clonación del fragmento sgc en el vector pGEM-T

El vector de expresión genérico pGEM-sgcX se desarrolló en esta Tesis Doctoral como una herramienta molecular común que permitiría la expresión del RNA guía específico de cada uno de los genes de interés. El fragmento sgc clonado en el plásmido pGEM-T estaba constituido por el promotor U6, seguido del sitio de restricción de *BbsI* para la clonación de la secuencia codificante del crRNA específico de cada gen y de un sgRNA *scaffold* que contenía la secuencia del RNA transactivador y la secuencia terminadora. La estructura de este fragmento aparece detallada en el apartado 5.1.4. Las secuencias de los *primers* utilizados y el protocolo simplificado de clonación se exponen a continuación.

El fragmento sgc se amplificó mediante PCR de alta fidelidad (apartado 3.7.1.) a partir del plásmido comercial pX335-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9n (D10A) que contenía el fragmento de interés. Los *primers* empleados se muestran en la tabla MM-3. El producto obtenido tras la PCR se visualizó por electroforesis en gel de agarosa (apartado 3.7.2.) y la banda del tamaño adecuado se purificó por extracción del DNA contenido en el gel (apartado 3.7.3.). El amplicón purificado se adeniló en los extremos 3' utilizando la enzima Taq polimerasa y se ligó con el plásmido pGEM-T linealizado mediante una reacción catalizada por la enzima DNA ligasa T4. Posteriormente, se transformaron las bacterias *E.coli* DH5 $\alpha$  con 2  $\mu$ l del producto de ligación por choque térmico, tal y como se describe en el apartado 3.6.1, y se sembraron en placas de medio LB con agar suplementado con ampicilina como antibiótico de selección. Se utilizó el test de color blanco/azul para seleccionar únicamente las colonias de bacterias que contenían el plásmido con el inserto (colonias blancas) (apartado 3.6.1.). Algunas de estas bacterias que crecieron en la placa se cultivaron en medio LB líquido suplementado con ampicilina, de las que se extrajo el DNA plasmídico (apartado 3.6.3.). La identidad de los plásmidos purificados se confirmó mediante un estudio de restricción utilizando las enzimas *RsaI* y *PvuII* (apartado 3.7.4.) y por secuenciación (apartado 3.7.5) (tabla MM-3).

**Tabla MM-3.** *Primers* empleados para clonar y secuenciar el fragmento sgc en un vector pGEM-T.

Aplicación	Secuencia	Tipo
Amplificación del fragmento sgc	GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCA	Fw
	CTCTAAAACAAAAAAGCACCGACTCGGTG	Rv
Secuenciación	TGTAAAACGACGGCCAGT	M13F
	CAGGAAACAGCTATGAC	M13R

Fw, *forward*; Rv, *reverse*; sgc, *single guide cassette*; M13, *primer universal*.

### 3.4.2. Diseño de las guías crRNA

Para el diseño de las secuencias que codifican los crRNA específicos de cada uno de los genes de interés se utilizó la herramienta *online* CRISPR-Cas9 *designer checker* (Integrated DNA Technologies o IDT<sup>TM</sup>, Coralville, EE.UU.), la cual proporciona una serie de secuencias de DNA cortas (20 nt) para la región de interés que cumplen el requisito necesario que ha de tener una guía de *spCas9*, esto es, la presencia de una secuencia NGG (motivo PAM) detrás del extremo 3' de la secuencia diana en el genoma. El programa clasifica a las potenciales guías en base a una puntuación *On-target* (mayor probabilidad de corte en el sitio diana) y *Off-target* (menor riesgo de corte en sitios no deseados del genoma).

En primer lugar, se obtuvo la secuencia codificante de la isoforma más larga para cada gen de interés a partir de la base de datos del NCBI y se seleccionó el exón común a todos los transcritos del gen que estuviera más próximo al inicio de la ORF para asegurar el truncamiento de todas las isoformas de la proteína diana y, por tanto, la pérdida de función de esta. La secuencia nucleotídica de ese exón se analizó con la herramienta *online* y, de todas las secuencias guía proporcionadas, se seleccionó aquella con mayor puntuación *On-target* y *Off-target* (tabla MM-4). En el caso de que la secuencia guía de elección no tuviera un nucleótido de guanina en la posición 1, se añadió una guanina adicional en el extremo 5' para asegurar que el crRNA fuera transcrito de forma eficaz por el promotor U6.

Se diseñó una pareja de oligonucleótidos complementarios por cada gen con el programa "OligoAnalyzer 3.1" (IDT<sup>TM</sup>) para obtener la secuencia codificante del crRNA con los extremos compatibles para su ligación con el vector pGEM-sgcX linealizado por la enzima de restricción *BbsI*, que permitiría la inserción de la secuencia codificante del crRNA en la región específica del fragmento sgc (tabla MM-5).

**Tabla MM-4.** Secuencias codificantes del crRNA diseñadas para cada uno de los genes.

Gen	Secuencia	PAM	Exón	Sentido	On-target score	Off-target score
<b>ARID1A</b>	TCAATAGATGACCTCCCCAT	GGG	5	Fw	88	69
<b>CDH1</b>	AGACCAAGTGACCACCTTAG	AGG	13	Fw	77	63
<b>PTEN</b>	CTACCTGTAAAGAATCATC	AGG	6	Fw	73	45
<b>TP53</b>	TCCACTCGGATAAGATGCTG	AGG	6	Rv	85	64

PAM, motivo adyacente al protoespaciador; Fw, *forward*; Rv, *reverse*. Se considera que la guía es Fw si hibrida en la hebra líder y Rv si hibrida en la hebra complementaria.

**Tabla MM-5.** Oligonucleótidos codificantes del crRNA para cada gen de interés diseñados para su clonación en el vector pGEM-sgcX.

Gen	Proteína	Secuencia 5'→3'	Tipo
<b>ARID1A</b>	ARID1A	<u>CACCGT</u> TCAATAGATGACCTCCCCAT	Fw
		AAACATGGGGAGGTCATCTATTGAC	Rv
<b>CDH1</b>	E-Cadherina	<u>CACCGAGACCAAGT</u> GACCACCTTAG	Fw
		AAACCTAAGGTGGTCACTTGGTCTC	Rv
<b>PTEN</b>	PTEN	<u>CACCGCTACCTGT</u> TAAAGAATCATC	Fw
		AAACGATGATTCTTTAACAGGTAGC	Rv
<b>TP53</b>	p53	<u>CACCGTCCACTCGGATAAGAT</u> GCTG	Fw
		AAACCAGCATCTTATCCGAGTGGAC	Rv

Fw, *forward*; Rv, *reverse*. Los extremos cohesivos para la enzima de restricción *BbsI* aparecen subrayados en la secuencia. En negrita se resalta el nucleótido de guanina añadido a la secuencia codificante del crRNA para asegurar su transcripción.

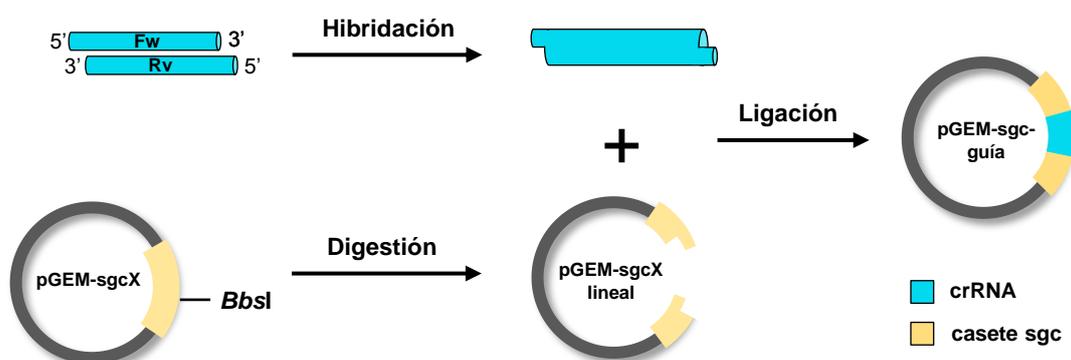
### 3.4.3. Clonación de la secuencia codificante del crRNA en el vector pGEM-sgcX

Cada una de las parejas de oligonucleótidos codificantes del crRNA (Fw y Rv) se hibridó para formar una secuencia de doble cadena que pudiera integrarse en el vector pGEM-sgcX (Figura MM-3). La reacción de hibridación de los oligonucleótidos se llevó a cabo añadiendo la misma cantidad de cada uno de ellos (2 µg) en un tampón de hibridación (Tris-HCl pH 7,9 100 mM, NaCl 1M) e incubando durante 2 min a 95 °C seguidos de 45 min a 25 °C. El calor rompe cualquier estructura secundaria dentro de cada oligonucleótido y el posterior enfriamiento lento facilita la hibridación.

En paralelo se llevó a cabo la linealización del vector pGEM-sgcX con la enzima de restricción *BbsI*, para lo cual se incubó la mezcla de reacción durante 15 min a 37 °C, seguidos de 20 min a 65 °C para la inactivación de la enzima. El producto linealizado se

purificó tras su comprobación mediante electroforesis en gel de agarosa (apartados 3.7.2. y 3.7.3.). A continuación, se realizó la ligación del vector linealizado pGEM-sgcX con los oligonucleótidos hibridados utilizando la enzima DNA ligasa T4, añadiendo una cantidad de vector e inserto en un ratio de 1:14 (vector:inserto). La reacción se incubó durante 1 h a temperatura ambiente seguida de 18 h a 4 °C.

Se transformaron bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  con el producto de reacción de la ligación por choque térmico y se sembraron en placas de medio LB con agar suplementado con ampicilina (apartado 3.6.1.). Se seleccionaron algunas de las colonias que habían crecido en la placa para sembrarlas en medio LB líquido suplementado con el antibiótico, de las que se extrajo posteriormente el DNA plasmídico (apartado 3.6.3.) La identidad de los clones seleccionados se confirmó mediante un estudio de restricción (apartado 3.7.4.) y por secuenciación (apartado 3.7.5.) utilizando el *primer forward* universal M13F.



**Figura MM-3.** Esquema del procedimiento de clonación de la secuencia codificante del crRNA del gen de interés en el plásmido pGEM-sgcX.

#### 3.4.4. Ensayo de detección de escisiones en el genoma o test de la endonucleasa T7

La eficacia de silenciamiento génico por CRISPR-Cas9 se comprobó mediante el ensayo de detección de escisiones en el genoma, también denominado test de la endonucleasa T7. Se trata de un método rápido y fiable basado en la capacidad de la endonucleasa T7 para reconocer y cortar regiones de desapareamiento en heterodúplex de DNA (229). Para ello se utilizó el kit comercial “GeneArt® Genomic Cleavage Detection”. Siguiendo el protocolo, se recogieron las células transfectadas varios días después de la selección con puromicina (población mixta de células modificadas) y se llevó a cabo la lisis celular y extracción del DNA en un solo paso, resuspendiendo las células con tampón de lisis y degradador de proteínas y sometiéndolas a un ciclo de 68 °C durante 15 min, seguido de 95 °C 10 min. A continuación, se amplificó mediante PCR

## MATERIALES Y MÉTODOS

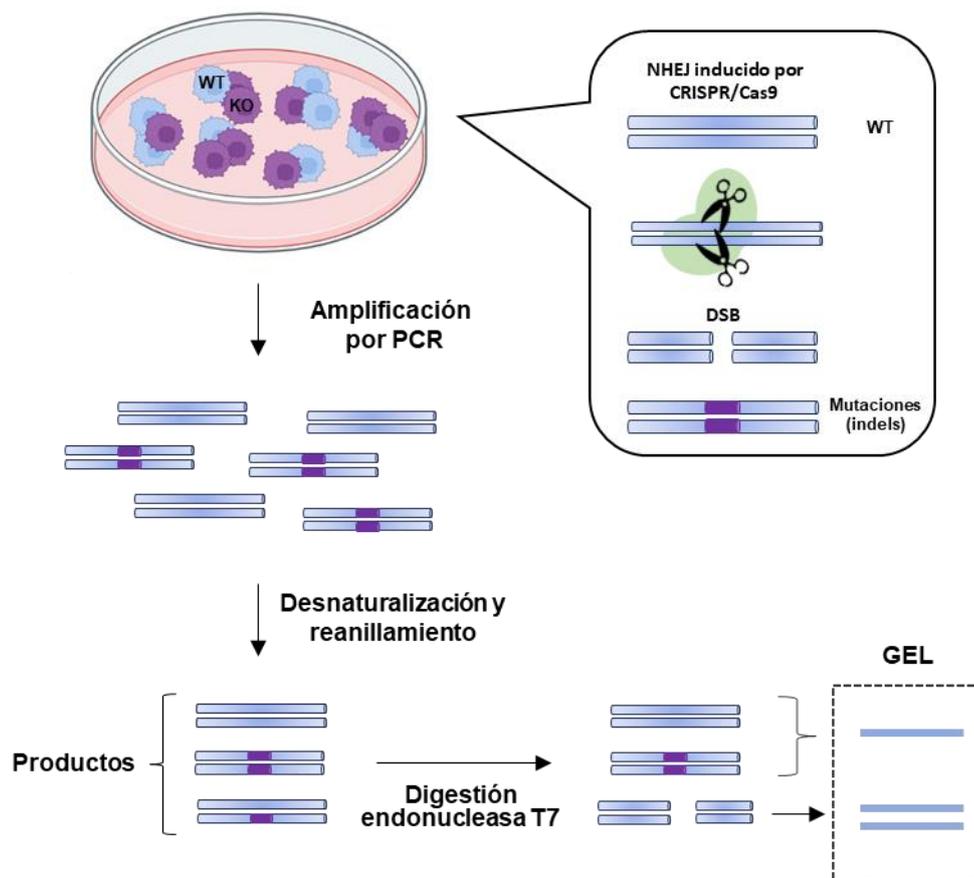
un fragmento de DNA que contenía la región diana donde se pueden haber generado *indels*, utilizando el lisado celular como molde, la enzima AmpliTaq Gold® 360 y los *primers* específicos para cada gen (tabla MM-6). El producto de PCR se visualizó por electroforesis en gel de agarosa (apartado 3.7.3.) y se purificó a partir de la banda del gel (apartado 3.7.4.).

**Tabla MM-6.** *Primers* diseñados para validar la eficacia de silenciamiento del gen de interés en líneas celulares humanas mediante el ensayo de detección de escisiones en el genoma y para la secuenciación de las regiones de interés de cada gen mutadas por el sistema de CRISPR-Cas9 en poblaciones monoclonales de células.

Gen	Secuencia 5'→3'	Tipo	Amplicón (pb)	Fragmentos cortados (pb)
<b>ARID1A</b>	GAGACGTGCCATTGCACTCCA	Fw	567	320
	CAGGCATGAGCCAGAGATGCTTT	Rv		247
<b>CDH1</b>	GCTCTGCTCTCTTCACTCGGCTT	Fw	485	260
	GGCTGGCATAACTTGGGAGTCTCT	Rv		225
<b>PTEN</b>	GGCTACGACCCAGTTACCATAGCA	Fw	271	153
	TCCAATACATGGAAGGATGAGAATTTCAAGCA	Rv		118
<b>TP53</b>	CACCATGAGCGCTGCTCAGA	Fw	353	227
	CTTTGCACATCTCATGGGGTTATAGGGA	Rv		126

Fw, *forward*; Rv, *reverse*; pb, pares de bases.

Posteriormente, se realizó un pasó de desnaturalización de las hebras del DNA por calentamiento del producto de PCR purificado a 95 °C durante 5 min, seguido del reanillamiento de las hebras enfriando progresivamente hasta 25 °C. En este último paso se pueden formar diferentes productos: homodúplex, si se hibridan hebras de DNA complementarias, o heterodúplex, en el caso de que no sean complementarias debido a la presencia de inserciones o deleciones en una de las dos hebras procedente de aquellas células en las que se ha producido modificación genética por CRISPR-Cas9. Puesto que la endonucleasa T7 es capaz de reconocer y digerir estos desapareamientos en el DNA, los productos procedentes del proceso de desnaturalización y reanillamiento se incubaron con la enzima durante 1 h a 37 °C, y los fragmentos resultantes se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa de alta resolución. En él se pueden visualizar tres bandas, una de mayor tamaño correspondiente al amplicón completo, y otras dos de menor tamaño correspondientes a los productos de digestión del heterodúplex por la enzima T7 (Figura MM-4).



**Figura MM.4.** Esquema del ensayo de detección de escisiones en el genoma realizado para validar la eficacia de silenciamiento génico mediante la herramienta de CRISPR-Cas9.

### 3.5. CULTIVOS CELULARES

#### 3.5.1. Medios y procedimientos de cultivo

Para el cultivo de las distintas líneas celulares se emplearon los siguientes medios:

- PLC/PRF/5 y HepG2: MEM suplementado con 2,2 g/l de bicarbonato sódico y 110 g/l de piruvato sódico.
- HuH-7 y HEK293: DMEM suplementado con 1% de Glutamax<sup>TM</sup>.
- HLF y HLE: DMEM suplementado con 1% de Glutamax<sup>TM</sup>, 10 mM de HEPES y 1 mM de piruvato sódico.
- Snu449 y Snu182: RPMI suplementado con 1% Glutamax<sup>TM</sup>, 10 mM de HEPES y 1 mM de piruvato sódico.

Todos los medios fueron suplementados con un 10% de FBS inactivado a 56 °C durante 30 min y un 1% de una mezcla de antibióticos que contiene penicilina 100 U/ml

y estreptomycin 0,1 mg/ml. En el caso de la línea celular HuH-7 se añadió además gentamicina 50 µg/ml. El medio de la línea celulares PLC/PRF/5 y HepG2 fue suplementado con la misma mezcla de antibióticos a la que se le añadió un antimicótico (anfotericina B 0,05 µg/ml).

Para descongelar las células almacenadas en N<sub>2</sub>, los criotubos que las contenían se introdujeron en un baño con agua termostaticado a 37 °C. Una vez descongeladas, las células se centrifugaron 300 *xg* durante 5 min y el precipitado se sembró en un frasco de cultivo. Las células se mantuvieron en incubadores a 37 °C, en atmósfera con un nivel de CO<sub>2</sub> del 5% y humedad relativa del 80% para su crecimiento. Las células HEK293 se cultivaron en superficies recubiertas con colágeno tipo I.

Para llevar a cabo los distintos experimentos *in vitro*, las células se despegaron de su soporte utilizando una solución de tripsina (0,25% de tripsina y 20 mM de EDTA en PBS). Tras la inactivación de la tripsina con medio de cultivo, la suspensión celular se centrifugó a 300 *xg* durante 5 min. El precipitado celular se resuspendió en el medio de cultivo correspondiente y se tomó una alícuota de la suspensión para realizar el conteo celular utilizando la cámara de Neubauer. La alícuota de células se mezclaba con una solución de azul de Tripán (0,4% en PBS) en proporción 1:1 para determinar el número de células vivas. Finalmente, las células se sembraron a la confluencia deseada en los soportes correspondientes según el experimento a realizar, y en caso de congelar las células, estas se resuspendieron en FBS con DMSO al 10% para su posterior almacenamiento en N<sub>2</sub> líquido.

### **3.5.2. Cultivo de células para estudios de expresión génica o de proteínas**

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad celular adecuada en función de la línea celular en un volumen final de 3 ml/pocillo. A las 48 h de la siembra las células se recogieron y se procesaron para la extracción de RNA total y posterior cuantificación de la expresión génica mediante RT-qPCR (apartado 3.8.) o para la extracción de proteínas totales e inmunodetección mediante Western blot (apartado 3.9.).

### 3.5.3. Obtención de modelos celulares *knockout* mediante CRISPR-Cas9

#### A. Transfección transitoria con lípidos catiónicos

Las células se sembraron en placa de 24 pocillos a una densidad variable en función de la línea celular en un volumen de 500  $\mu$ l y se cotransfectaron al día siguiente con el plásmido que contiene la secuencia para la expresión del sgRNA (apartado 3.4.3.), junto con el plásmido que contiene la ORF de la endonucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes* con codones optimizados para su expresión en células humanas (pHL-EF1a-SphcCas9-iP-A). En el caso de las células HepG2, se utilizó el método de transfección *reverse*, una modificación del protocolo de transfección habitual en la que la siembra y la transfección de las células se realiza de forma simultánea con el objetivo de aumentar la eficacia de transfección en esta línea celular.

En todas las líneas celulares se llevó a cabo la transfección mediante la utilización de lípidos catiónicos. Para determinar las condiciones óptimas, previamente se llevó a cabo un experimento en el que se evaluó la eficacia de varias condiciones de transfección por citometría de flujo mediante la medida de intensidad de fluorescencia de la población celular a las 48 h de la transfección con el plásmido pCMV-tdTomato-N1, que codifica la proteína fluorescente Tomato en tándem. En la tabla MM-7 se resumen las condiciones óptimas que se eligieron para conseguir la mejor relación eficacia/toxicidad de transfección en cada línea celular.

Para las células HEK293 se utilizó la polietilenimina (PEI). En este caso, se diluyeron 750 ng de la mezcla de plásmidos en 42  $\mu$ l de NaCl al 0,9% y se añadió PEI en una relación de 5  $\mu$ l/ $\mu$ g de DNA. En aquellas líneas celulares en las que se utilizó el lípido catiónico Lipofectamina LTX, se diluyó la cantidad de plásmido correspondiente en 100  $\mu$ l de medio Opti-MEM y se añadió el reactivo Plus en una proporción de 1  $\mu$ l/ $\mu$ g de DNA, el cual se une a las moléculas de DNA favoreciendo la posterior formación de liposomas. Se dejó incubando la mezcla durante 5 min, y tras ese tiempo se añadió la cantidad óptima de lipofectamina LTX, según la línea celular.

La mezcla con lípidos catiónicos se incubó, en ambos casos, durante 25-30 min a temperatura ambiente para permitir la formación de los liposomas antes de añadirlos al cultivo. A las 24 horas de la transfección se retiró el medio con los complejos lípido-DNA y se sustituyó por un medio de selección con puromicina.

**Tabla MM-7.** Condiciones experimentales utilizadas para transfectar las diferentes líneas celulares con los plásmidos de la estrategia CRISPR-Cas9 y para seleccionar las células transfectadas.

Línea celular	Densidad celular	Reactivo utilizado	Cantidad de DNA	Relación reactivo:DNA (µl:µg)	Puromicina (µg/ml)
HEK293	100.000	PEI	750 ng	5:1	1
PLC/PRF/5	100.000	Lipofectamina LTX	750 ng	4:1	2
HepG2	100.000	Lipofectamina LTX	750 ng	5:1	2

PEI, Polietilenimina

## B. Selección clonal

El plásmido pHL-EF1a-SphcCas9-iP-A contiene, además de la secuencia codificante de la endonucleasa Cas9, un gen de resistencia a puromicina que permitiría seleccionar las células transfectadas.

A las 24 h de la transfección, las células se incubaron durante 72 h con puromicina a una concentración que varía entre 1-2 µg/ml dependiendo de la línea celular, como se indica en la tabla MM-7. Transcurrido ese tiempo, se sustituyó el medio de selección por medio fresco y, una vez recuperadas las células, se recogieron para realizar el ensayo de detección de escisiones en el genoma y evaluar así la eficacia de corte del sistema de CRISPR-Cas9 con el RNA guía utilizado en cada caso (apartado 3.4.4.).

Una vez validados los RNA guía, se procedió a aislar una población monoclonal con ausencia de la proteína de interés a partir de la población policlonal obtenida tras la selección con puromicina. Para ello, se empleó el método de dilución límite en los modelos en los que se utilizó la línea celular PLC/PRF/5 o bien el método de siembra en placa a baja densidad en el caso del modelo de HepG2. Para este último, se sembraron 2500 células en una placa de 10 cm de diámetro, de manera que las células estuvieran aisladas. Una vez que el tamaño de las colonias, teóricamente provenientes de una única célula y por lo tanto con características homogéneas, era lo suficientemente grande como para observarse a simple vista, se tripsinizaron utilizando cilindros de plástico estériles para su aislamiento y se sembraron en placas de 96 pocillos para permitir su crecimiento independiente. Las distintas poblaciones monoclonales obtenidas por cualquiera de los dos métodos se cultivaron y se caracterizaron por secuenciación de la zona de corte del sistema CRISPR-Cas9 en cada gen tras la amplificación de la región a partir de gDNA

(apartados 3.7.1 y 3.7.5.), y mediante la medida de expresión de la proteína de interés por Western blot (apartado 3.9.).

#### **3.5.4. Estudios de viabilidad celular**

Para evaluar el efecto de fármacos antitumorales en los distintos modelos celulares utilizados en esta Tesis Doctoral, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a la densidad celular variable dependiendo de la línea celular. A las 24 h, se añadieron los agentes citostáticos en dosis crecientes a las células y se incubaron durante 48 o 72 h, en función del estudio. Transcurrido ese tiempo se determinó la viabilidad celular mediante el test de formazán o MTT (apartado 3.10.3.) o mediante el test de la sulforodamina B (apartado 3.10.4.).

#### **3.5.5. Estudios de sinergia**

Para evaluar la sinergia entre dos fármacos se llevaron a cabo experimentos de viabilidad celular de manera similar a como se describe en el apartado 3.5.4. No obstante, en este caso se añadieron ambos compuestos simultáneamente combinándolos a distintas dosis, partiendo desde 0 hasta llegar aproximadamente a la concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de cada fármaco. Tras 48 h de incubación con los compuestos, se determinó la viabilidad celular mediante el test de la sulforodamina B (apartado 3.10.4.).

Los resultados de viabilidad celular con las diferentes combinaciones de ambos fármacos se analizaron utilizando la herramienta *online* “SynergyFinder 3.0” (230). Para cuantificar el grado de interacción de la combinación se empleó el modelo de referencia denominado potencia de interacción cero (*zero interaction potency*, ZIP) (231). Este método compara el cambio en la potencia de las curvas dosis-respuesta entre fármacos individuales y sus combinaciones, partiendo del supuesto de que dos fármacos que no interactúan entre ellos sufren cambios mínimos en sus curvas dosis-respuesta.

#### **3.5.6. Estudios de migración celular**

Para estudiar la migración de las células se utilizó el ensayo de cierre de herida o *wound healing assay*. Se trata de un ensayo metodológicamente sencillo basado en la generación de una región libre de células (“herida”) dentro de una monocapa confluyente de células con el fin de analizar la velocidad de migración de las células hacia esa región. Para ello, las células se sembraron en placas de 24 o 6 pocillos a la densidad celular

adecuada para cada línea celular. En el caso de la línea celular HepG2, las células se sembraron en soportes recubiertos con colágeno para facilitar su adhesión a la superficie y la formación de una monocapa. Las células se cultivaron y se mantuvieron con medio sin FBS (en línea celular PLC/PRF/5) o con FBS al 2% (en línea celular HepG2) durante todo el tiempo del experimento con el fin de detener la proliferación celular y evitar así que esta pudiera interferir con la evaluación de la capacidad migratoria de las células. A las 24 h, cuando las células alcanzaron la confluencia, se realizó una herida sobre la monocapa de células con una punta de pipeta estéril y se realizaron capturas de imágenes de determinadas regiones de la herida marcadas previamente a diferentes tiempos con el microscopio invertido.

Para realizar el análisis, se midió la anchura de la herida a los distintos tiempos utilizando el programa de imagen ImageJ (232). Se realizaron 5 medidas por imagen y se analizaron, al menos, tres regiones distintas para cada modelo celular. La distancia de migración se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Distancia de migración a tiempo "x" (píxel)} = \text{anchura de la herida a tiempo inicial} - \text{anchura de la herida a tiempo "x"}$$

### 3.5.7. Ensayo clonogénico o de formación de colonias

Para evaluar la capacidad de los distintos modelos celulares generados de formar colonias, las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 1000 células/pocillo y se mantuvieron en cultivo durante 10 o 15 días (células PLC/PRF/5 y HepG2, respectivamente), cambiando el medio de cultivo cada 2-3 días. Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS y se llevó a cabo la fijación de las células con una solución de metanol: ácido acético en proporción 7:1 a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente se retiró la solución de fijación y se realizó la tinción de las células con cristal violeta al 0,05% (w/v) en metanol al 25% durante 15 min. A continuación, se realizaron varios lavados con agua para eliminar el exceso de cristal violeta. Siempre que fuera posible, se realizó el conteo de las colonias teniendo en cuenta únicamente las colonias con un número mayor aproximado de 50 células.

### 3.5.8. Ensayo de ciclo celular

Para analizar el efecto de fármacos antitumorales sobre el ciclo celular, las células se sembraron en placas de 6 pocillos a la densidad adecuada en función de la línea celular. A las 24 h se añadieron los compuestos citostáticos. Tras 48 h de incubación, las células se recogieron, se lavaron y se resuspendieron en 250  $\mu$ l de PBS frío. A continuación, se realizó la fijación con etanol frío al 70%, añadiendo 3 ml de la solución gota a gota sobre la suspensión celular en agitación para asegurar la fijación de todas las células, y se incubó a 4 °C durante un tiempo mínimo de 30 min. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS en frío, centrifugando las células a 850  $xg$  durante 5 min, y se resuspendieron en 1 ml de PBS. Las células se incubaron con RNasa a una concentración de 20  $\mu$ g/ml a temperatura ambiente durante 30 min, y con yoduro de propidio (PI) a 20  $\mu$ g/ml durante 1 min en oscuridad para la tinción del DNA.

Para la realización de los ensayos de ciclo celular durante mi estancia en el Instituto de Patología de la Universidad de Regensburg (Alemania), se utilizó un protocolo similar al descrito anteriormente. La única diferencia fue la solución de tinción utilizada. En este caso, tras la fijación con etanol y los lavados con PBS, las células se resuspendieron en 300  $\mu$ l de la solución PI/RNasa FxCycle™ y se incubaron durante 20 min en oscuridad a temperatura ambiente.

El contenido de DNA se determinó por citometría de flujo mediante la medida de intensidad de fluorescencia de las células. Para evitar la alteración de los resultados debido a la presencia de dobletes o agregados celulares, se representaron los eventos celulares en un histograma biparamétrico FL-2A/FL-2W o FSC-A/FSC-H, según el citómetro utilizado. Tras seleccionar únicamente la población de células aisladas, los resultados se representaron en un histograma en el que se muestra la distribución de las diferentes fases del ciclo celular en función del contenido de DNA en cada una de ellas. Se analizaron un mínimo de 10.000 células para cada condición. La cuantificación del porcentaje de células en cada fase del ciclo se realizó con el programa FlowJo™.

### 3.5.9. Evaluación de la apoptosis

La apoptosis se determinó utilizando el kit de detección de apoptosis Anexina V/7-aminoaceticina D (7-AAD). La Anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio con gran afinidad por la fosfatidilserina, un fosfolípido localizado predominantemente en la capa interna de la membrana plasmática. En las células

apoptóticas, la fosfatidilserina se transloca a la capa externa de la membrana plasmática y queda expuesta sobre la superficie celular, de manera que Anexina V puede unirse a estas células. En el kit, la Anexina V está conjugada con la molécula fluorescente eFluor™ 450 para poder ser detectada por citometría de flujo, y se utiliza junto con 7-AAD, un colorante de unión a DNA que permite detectar las células en apoptosis tardía, en las que se ha perdido la integridad de la membrana plasmática (Anexina V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup>) y células necróticas (Anexina V<sup>-</sup>/7-AAD<sup>+</sup>), mientras que es excluido de las células en apoptosis temprana (Anexina V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup>).

Para llevar a cabo estos experimentos, las células se sembraron en placas de 6 pocillos a la densidad celular adecuada en función de la línea celular, y al día siguiente se expusieron a concentraciones crecientes de fármacos antitumorales. Tras 48 h de incubación, las células se recogieron, se lavaron con PBS y se resuspendieron en 100 µl de un tampón de unión. A continuación, se añadieron 5 µl de la Anexina V unida al fluorocromo a la suspensión celular y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, las células se lavaron con el tampón de unión y se resuspendieron en 100 µl del mismo, añadiendo 5 µl del fluorocromo 7-AAD e incubando la solución durante 1 min en oscuridad. Como control positivo de apoptosis se utilizaron células incubadas con camptotecina 2 µM, un compuesto capaz de inducir apoptosis celular (233). Se recogieron y se analizaron un mínimo de 30.000 eventos (células) para cada condición por citometría de flujo. Los resultados obtenidos se analizaron con el programa FlowJo™.

### **3.5.10. Estudio de la proliferación celular por citometría de flujo**

La proliferación celular se evaluó por citometría de flujo mediante el marcaje intracelular con el compuesto éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE) (234). Inicialmente este compuesto no es fluorescente, sin embargo, es hidrolizado por las esterasas intracelulares dando lugar a una molécula fluorescente que se une de forma covalente a los grupos aminos de las proteínas y forma conjugados fluorescentes estables en el interior de las células. La división celular produce una reducción secuencial de la intensidad de fluorescencia que puede ser detectada por citometría de flujo, lo que permite que pueda monitorizarse la proliferación celular mediante este método.

Este tipo de experimento se realizó para estudiar la proliferación de las células HEK293 silvestres y con silenciamiento de *ARID1A* tratadas con cisplatino como método

complementario al estudio de viabilidad celular mediante el test de formazán (apartado 3.10.3.). Para ello, las células se sembraron en placa de 6 pocillos a una densidad de 250.000 células/pocillo. Antes de la siembra, se incubaron con 0,1  $\mu\text{M}$  de CFSE durante 15 min a 37 °C. A continuación, se lavaron con PBS para eliminar el exceso de compuesto que no se hubiera unido a las células y se sembraron en la placa. Posteriormente, se incubaron con cisplatino a 2,5  $\mu\text{M}$  durante 48 h. Se determinó la intensidad de fluorescencia de las células a tiempo inicial y a las 48 h tras la incubación con cisplatino mediante citometría de flujo en el canal FL-1.

### 3.6. CULTIVO DE BACTERIAS

Para el cultivo de bacterias se emplearon los siguientes medios:

- Medio Luria-Bertani (LB): 10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura y 10 g/l NaCl (pH 7,0). Las placas de medio LB-agar tenían 15 g/l de agar.
- Medio súper óptimo con represor de catabolitos (SOC): 20 g/l triptona, 5 g/l extracto de levaduras, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgSO}_4$  y 20 mM glucosa (pH 7,0).

#### 3.6.1. Transformación bacteriana por choque térmico

Se mezclaron 5-10 ng del plásmido de interés con 50  $\mu\text{l}$  de una suspensión de bacterias químicamente competentes y se incubaron durante 30 min en hielo. Para facilitar la entrada del plásmido, las bacterias se sometieron a un choque térmico a 42 °C durante 2 min (en el caso de la cepa *E.coli* DH5 $\alpha$ ). A continuación, se mantuvieron en hielo durante 2 min y se incubaron con 250  $\mu\text{l}$  de medio SOC en agitación durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, se sembraron 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión bacteriana en condiciones de esterilidad por extensión con un asa de vidrio en una placa con medio LB y agar suplementado con el antibiótico de selección apropiado (100  $\mu\text{l}/\text{ml}$  en el caso de ampicilina). Las bacterias se incubaron aproximadamente durante 16 h en una estufa a 37 °C para permitir el crecimiento de colonias.

En aquellos casos en los que la clonación del inserto se llevó a cabo en el vector pGEM-T, se utilizó el método de selección blanco/azul para distinguir las bacterias que habían sido transformadas con el plásmido recombinante (colonias blancas) de aquellas que contenían el plásmido sin inserto (colonias azules). Este método se basa en el

principio de la complementación  $\alpha$  del gen de la  $\beta$ -galactosidasa, en el que el péptido  $\alpha$  codificado por el gen *LacZ $\alpha$*  del vector pGEM-T complementa el gen *LacZ* mutante (*lacZ $\Delta$ M15*) de *E. coli*. Como resultado, se produce una enzima  $\beta$ -galactosidasa funcional capaz de hidrolizar el sustrato cromogénico X-Gal (5-bromo-4-cloro-indolil- $\beta$ -D-galactósido) en presencia del inductor IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido), dando lugar a un producto de coloración azul. El sitio de clonación en el vector se encuentra específicamente dentro del marco de lectura del gen *LacZ $\alpha$* ; por tanto, en aquellos casos en los que se inserte la secuencia de interés en el vector, se producirá un desplazamiento del marco de lectura que impide la expresión del péptido  $\alpha$ . Como consecuencia, las bacterias no producirán el compuesto azulado en presencia de los compuestos X-Gal e IPTG y se visualizarán colonias blancas.

Para llevar a cabo este método de selección, se sembraron las bacterias transformadas en placas con medio LB y agar suplementado con ampicilina, a las que se añadieron los compuestos X-Gal e IPTG.

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

Se seleccionaron aquellas colonias de bacterias que habían crecido aisladas en la placa, en ausencia de colonias satélites alrededor (entre 6 y 8, según el objetivo) y, en el caso del método de selección basado en la complementación  $\alpha$ , se eligieron únicamente las colonias blancas. Se rasparon con una punta de pipeta estéril, se inocularon en 6 ml de medio LB suplementado con el antibiótico de selección apropiado y se incubaron 16 h en agitación a 37 °C.

### **3.6.3. Purificación del DNA plasmídico de cultivos bacterianos**

Para la extracción y purificación de plásmidos a partir de cultivos de *E. coli* se utilizó el kit comercial “illustra™ PlasmidPrep Mini Spin”, basado en el uso de columnas con membrana de gel de sílice que adsorbe el DNA y permite su posterior elución. El DNA plasmídico purificado se cuantificó por espectrofotometría a  $\lambda = 260$  nm en un NanoDrop™ 1000 (apartado 3.10.1). Se realizó un estudio de restricción (apartado 3.7.4.) para comprobar la identidad de los plásmidos purificados, seguido del estudio por secuenciación (apartado 3.7.5.).

### 3.7. MÉTODOS COMUNES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Las soluciones de uso común empleadas en varias técnicas de biología molecular fueron las siguientes:

- Tampón TAE 1x: 40 mM Tris base, 1 mM EDTA y 20 mM ácido acético (pH 8,3).
- Tampón TE 1x: 10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA (pH 8,0).

#### 3.7.1. PCR analítica de alta fidelidad

La PCR de alta fidelidad se llevó a cabo con la enzima Taq Polimerasa de Biotools o con los kits “AccuPrime Pfx SuperMix” o “AmpliTaq Gold® 360 Master Mix”, según el estudio. Para llevar a cabo la reacción, se preparó una mezcla con el DNA molde o lisado celular (2  $\mu$ l), los reactivos proporcionados por el kit correspondiente (DNA polimerasa, MgCl<sub>2</sub>, desoxinucleósidos trifosfato o dNTPs y solución tampón) y los *primers* a una concentración final de 200 nM. Una vez preparada la mezcla, los tubos se incubaron en un termociclador con las siguientes condiciones:

- Un ciclo a 95 °C durante 5 min
- 40 ciclos de amplificación con las siguientes condiciones:
  - Desnaturalización: 95 °C, 15 o 30 s según la enzima utilizada.
  - Anillamiento: 60 °C 30 s.
  - Extensión: 68 o 72 °C según enzima durante un tiempo variable (1 min/kb del amplicón).
- Un ciclo de extensión final a 68 o 72 °C durante 10 min.

Los productos obtenidos por PCR se visualizaron tras la realización de una electroforesis en geles de agarosa, como se indica en el siguiente apartado.

#### 3.7.2. Electroforesis en geles de agarosa no desnaturizante

Para la preparación de los geles de agarosa se mezcló tampón TAE con agarosa al 1-2% (p/v) dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA a analizar. Se calentó la mezcla hasta el punto de ebullición para disolver la agarosa y se añadió SYBR<sup>TM</sup> Safe para teñir el DNA y poder visualizarlo por fluorescencia. Tras polimerizar, el gel de agarosa se colocó en una cubeta de electroforesis con tampón TAE y en los pocillos del

gel se depositaron las muestras que previamente se habían mezclado con tampón de carga a una relación 1:10 (v/v). Como patrón de tamaños moleculares de DNA se utilizó un estándar de 100 pb o 1 kb, según el caso. El resultado de la electroforesis se visualizó en el equipo de análisis de imagen LAS-4000.

### **3.7.3. Purificación del DNA contenido en geles de agarosa y de reacciones enzimáticas**

Tras su visualización, en algunos casos fue necesario purificar el DNA contenido en un gel de agarosa de bajo punto de fusión o *low melting*. Para ello, se cortó el fragmento del gel que contenía la banda de DNA de interés y se utilizó el kit “illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification” para extraer y purificar el DNA. La agarosa se mezcló con una solución proporcionada por el kit y se disolvió al calentarla a 60 °C durante 15 min. El DNA contenido en esa mezcla se purificó utilizando las columnas con membrana de sílice del kit y se eluyó en agua o en tampón TE 1x en función de su aplicación posterior.

En el caso del DNA resultante de reacciones enzimáticas que no había sido sometido a electroforesis en gel de agarosa, la purificación se realizó con las columnas del mismo kit siguiendo el protocolo correspondiente.

### **3.7.4. Digestión con enzimas de restricción**

Para llevar a cabo la digestión, el DNA de interés se mezcló con el tampón de reacción adecuado para la enzima utilizada, la enzima de restricción (5 U/ $\mu$ g de DNA) y agua ultrapura. La reacción de restricción se llevó a cabo durante 3 h a 37 °C para las enzimas clásicas o bien 15 min a 37 °C para las enzimas “Fast Digest<sup>TM</sup>”. En aquellos casos en los que el producto se utilizaba para una reacción posterior fue necesario inactivar la enzima mediante incubación de la mezcla a 65-80 °C durante 5-20 min. Los fragmentos de DNA se separaron para su análisis por electroforesis en un gel de agarosa o se purificaron a partir de la mezcla de reacción o del propio gel (apartado 3.7.3.).

### **3.7.5. Secuenciación del DNA**

La secuenciación de los plásmidos y productos de PCR se realizó en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca mediante el método de terminación de cadena de Sanger. Para cada secuencia, se preparó una mezcla que contenía  $\approx$ 500 ng de

DNA plasmídico o 100 ng/kb del producto de PCR y 3,3 pmol de un *primer* específico complementario a la secuencia a analizar disueltos en 8 µl de agua ultrapura. El análisis de los cromatogramas tras la electroforesis capilar se realizó con el programa SnapGene Viewer, y para la visualización de las secuencias de DNA se utilizó el programa Gene Construction Kit o el SnapGene Viewer.

### **3.8. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE mRNA POR RT-qPCR**

#### **3.8.1. Extracción de RNA total**

El RNA total se extrajo a partir de homogenados celulares mediante el kit comercial “illustraRNAspin Mini RNA Isolation Kit”, basado en la purificación del RNA mediante su adsorción a membranas de gel de sílice y posterior elución. Se procesaron un máximo de 5 millones de células siguiendo las instrucciones del proveedor. El RNA total purificado se cuantificó por espectrofotometría a  $\lambda = 260$  nm en el NanoDrop™ 1000 (apartado 3.10.1).

#### **3.8.2. Transcripción reversa (RT)**

El cDNA utilizado como molde en la PCR se obtuvo a partir de 2 µg de RNA total mediante una reacción RT utilizando el kit “High-Capacity cDNA Reverse Transcription”, que contiene la transcriptasa reversa recombinante y optimizada del virus de la leucemia murina de Moloney, una solución tampón de la reacción, dNTPs y una mezcla de *random primers*. Tras añadir el RNA a la mezcla, la reacción se llevó a cabo en un termociclador con las siguientes condiciones de incubación: 10 min a 25 °C, 120 min a 37 °C y un paso final de 5 min a 85 °C para la inactivación de la enzima. El producto de la reacción se diluyó 1/5.

#### **3.8.3. Diseño de *primers***

Los *primers* específicos para cuantificar la expresión de cada uno de los genes estudiados en esta Tesis Doctoral se diseñaron empleando el programa “OligoAnalyzer 3.1” (IDT™) y su especificidad se comprobó con la herramienta “BLAST” (235) (Tabla MM-8).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Tabla MM-8.** *Primers* utilizados para cuantificar los niveles de expresión de los genes humanos de interés por RT-qPCR.

Gen	Proteína	Número de acceso	Secuencia 5' – 3'	Tipo	pb
<b>ARID1A</b>	ARID1A	NM_006015	CCTCCAGCTTGCCTGATCTATCT GCTGGAAATCCCTGATGTGCTCA	Fw Rv	99
<b>AXIN1</b>	AXIN1	NM_003502	GCTGCTCCTGGAGACAGCT GGATCCATACCTGAACTCTCTGCCTT	Fw Rv	79
<b>BAX</b>	BAX	NM_138761	ATGGAGCTGCAGAGGATGATTGC GTTCTGATCAGTTCCGGCACCTT	Fw Rv	185
<b>BIRC5</b>	Survivina	NM_001168	CCAGATGACGACCCCATAGAGGAA GCACCTTCTCCGCAGTTTCCTCA	Fw Rv	190
<b>CDH1</b>	E-Cadherina	NM_004360	GAGAGGAATCCAAAGCCTCAGGTCATAA TCTTGGGTTGGGTCGTTGTAAGT	Fw Rv	134
<b>CDKN1A</b>	p21	NM_000389	GAGGAGGCGCCATGTCAGAA ATTAGCGCATCACAGTCGCGG	Fw Rv	124
<b>CDKN2A</b>	p16-INK4a	NM_000077	GGAGGCCGATCCAGGTCAT CACGGGTCGGGTGAGAGT	Fw Rv	110
<b>FAS</b>	FAS	NM_000043	GCCCTGTCCTCCAGGTGAAA GGCTTTGTCTGTGTAAGTCTTCCC	Fw Rv	103
<b>GADD45A</b>	GADD45A	NM_001924	GAGAGCAGAAGACCGAAAGGATGGATAA ATCTGCAGAGCCACATCTCTGTC	Fw Rv	193
<b>HPRT1</b>	HPRT1	NM_000194	GCCCTGGCGTCGTGATTAGT AGCAAGACGTTTCAGTCTGTCCATAA	Fw Rv	140
<b>LGR5</b>	LGR5	NM_003667	TCAGCGTCTTCACCTCCTACCTAGA CGCAAGACGTAAGTCTCCTCCAGGAA	Fw Rv	104
<b>MET</b>	MET	NM_001127500	GAGGGTCGCTTCATGCAGGTT GGGATCTTCGTGATCTTCTTCCCAGT	Fw R	167
<b>PTEN</b>	PTEN	NM_000314	GGCGGAAGTTCGCAATCCTCAGTTT AGGTAACGGCTGAGGGAAGTCAAA	Fw Rv	123
<b>RASSF1A</b>	RASSF1A	NM_007182	CAGTGCAGCATTGCAAGTT CCACAGGCTCGTCCACGTT	Fw Rv	130
<b>TP53</b>	p53	NM_000546	CGCTGCTCAGATAGCGATGGT TGGTACAGTCAGAGCCAACCTCA	Fw Rv	151
<b>VIM</b>	Vimentina	NM_003380	CGGCAGGTGGACCAGCTAA TCTGAAGCATCTCCTCCTGCAATTTCT	Fw Rv	112

Fw, *forward*; Rv, *reverse*; pb, pares de bases del amplicón generado.

Los *primers* utilizados se diseñaron, en la medida de lo posible, sobre la unión entre dos exones codificantes con el fin de evitar la amplificación de restos de DNA genómico o RNA inmaduro que pudieran interferir en la cuantificación de la expresión del gen a nivel de mRNA. Para ello, se utilizó como molde la secuencia de mRNA específica para cada gen depositada en la base de datos GenBank (236).

Para la determinación de la expresión génica durante mi estancia en la Universidad de Regensburg se utilizaron sondas TaqMan y *primers* específicos para los genes de interés que se obtuvieron de *Applied Biosystem*. En la tabla MM-9 se especifican las características de los componentes TaqMan utilizados.

**Tabla MM-9** Componentes TaqMan utilizados para cuantificar los niveles de expresión de los genes humanos de interés por RT-qPCR.

Gen	Proteína	Número de acceso	ID componentes TaqMan	Colorante sonda	pb
<i>EIF4A1</i>	eIF4A1	NM_001416.3	Hs00426773_gH	FAM-MGB	90
<i>EIF4A2</i>	eIF4A2	NM_001967.3	Hs00756996_g1	FAM-MGB	133
<i>ACTB</i>	$\beta$ -actina	NM_001101.3	Hs01060665_g1	VIC-MGB	63

ID, identificación; pb, pares de bases del amplicón generado.

#### 3.8.4. PCR cuantitativa (qPCR)

La determinación de los niveles de expresión de los genes de interés se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Esta técnica es una variante de la PCR analítica que permite cuantificar el producto amplificado durante la reacción mediante la detección de fluorescencia generada por un fluorocromo que se une a las moléculas de DNA que se van sintetizando o bien a través de sondas TaqMan. Se empleó SYBR Green I como fluorocromo, un componente de la mezcla de reactivos utilizada (SYBR™ Select Green PCR Master Mix).

Las condiciones de tiempo y temperatura para la qPCR fueron las siguientes:

- Un ciclo de 2 min a 50 °C
- Un ciclo de 10 min a 95 °C
- 40 ciclos de 15 s a 95 °C seguido de 1 min a 60 °C.

En algunos casos se añadió un ciclo de disociación (15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C) al final de la reacción para comprobar la especificidad de los *primers*.

La cuantificación se realizó de forma relativa mediante el método comparativo de ciclo umbral (Ct). Este método calcula los cambios de expresión del gen de interés respecto a un gen de referencia, comúnmente denominado *housekeeping gene* o gen normalizador, cuya expresión suele mantenerse constante en las células, por lo que actúa

como control interno para eliminar las posibles variaciones en la cantidad de RNA de partida. Esta cuantificación se calcula de la siguiente manera:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen diana} - Ct \text{ gen normalizador}$$

Como gen normalizador se utilizó *HPRT1* o *ACTB*, y las determinaciones se realizaron siempre por duplicado. Los resultados de expresión relativa de cada gen respecto a la expresión del gen normalizador vienen dados por la siguiente fórmula:

$$R = 2^{-\Delta Ct}$$

### 3.8.5. Tarjetas microfluídicas

Las tarjetas microfluídicas o Taqman low-density arrays (TLDA) son placas de 384 pocillos distribuidos en 8 puertos que permiten realizar hasta 384 reacciones de qPCR simultáneamente, ya que cada pocillo de la placa contiene liofilizados la sonda TaqMan y los *primers* específicos para cada gen de interés. El uso de las TLDA presenta algunas ventajas respecto a la qPCR convencional, entre las que destacan el pequeño volumen de muestra utilizado, así como la sensibilidad, fiabilidad y rapidez del método.

Para nuestros experimentos con líneas celulares se utilizó un formato de TLDA que permitía medir la expresión de 96 genes en cuatro muestras distintas, cargando cada muestra por duplicado en 2 puertos. Las placas se diseñaron de manera específica para analizar la expresión de 94 genes seleccionados previamente que estaban relacionados con diferentes mecanismos de quimiorresistencia y los genes normalizadores *GAPDH* y *ACTB*. Para los tumores de HCC se utilizó otro formato de TLDA que permitía determinar la expresión de 48 de los 96 genes anteriores, incluyendo los dos normalizadores, en 8 muestras distintas.

Para llevar a cabo la reacción, se mezcló cada uno de los cDNAs obtenidos mediante la RT (apartado 3.8.2.) (100 ng/puerto) con la mezcla de reactivos TaqMan Master Mix y se cargó la muestra en cada uno de los puertos. Posteriormente, se centrifugó la placa dos veces a 1200 rpm durante 2 min. Finalmente, se selló la placa y se desencadenó la reacción de qPCR en el aparato ABI Prism 7900HT Sequence Detection System. Los resultados se analizaron por el método comparativo del ciclo umbral (apartado 3.8.4.), y se realizó una doble normalización utilizando los genes *ACTB* y *GAPDH* como controles endógenos.

### 3.9. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

#### 3.9.1. Soluciones empleadas

- Tampón fosfato salino (PBS) 1x: NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM (pH 7,4).
- Tampón RIPA: IGEPAL 1%, desoxicolato sódico 0,5% y SDS 0,1% disueltos en PBS 1x.
- Solución de carga Laemmli 4x: 250 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,008%
- Solución de migración: 25 mM Tris, 192 mM L-glicina y SDS 1%
- Tampón de transferencia: 25 mM Tris-HCl base, 192 mM L-glicina, SDS 1% y metanol 20%
- Solución Rojo Ponceau: rojo Ponceau S 0,1%, ácido acético 0,5%
- Tampón tris salino (TBS) 1x: 2,42 g/l Tris base, 8 g/l NaCl, pH 7,6.
- TBS-Tween: TBS suplementado con Tween-20 al 0,1% (v/v)

#### 3.9.2. Obtención de homogeneizados de cultivos celulares

Para obtener homogeneizados totales de proteínas a partir de cultivos celulares, se tripsinizaron las células, se lavaron con PBS y se resuspendieron en el volumen deseado de RIPA junto con un cóctel de inhibidores de proteasas o bien un cóctel que contenía también inhibidores de fosfatasas, según el caso, ambos al 1% (v/v). Tras incubar los homogeneizados en hielo durante 20 min, con agitación en vórtex cada 5 min, se centrifugaron a 20000  $\times$ g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante se congeló a -80 °C y, posteriormente, se determinaría la concentración de proteínas para continuar con el procedimiento (apartado 3.10.2.).

Los homogeneizados de proteínas a partir de tejido que se utilizaron durante mi estancia en el Instituto de Patología de la Universidad de Regensburg (Alemania) se habían obtenido previamente en este laboratorio y formaban parte de su biobanco.

### 3.9.3. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida

Se prepararon geles separadores de poliacrilamida al 7,5-10% (p/v), dependiendo del tamaño molecular de la proteína de interés, en tampón Tris-HCl utilizando el soporte del sistema “Mini-Protean II Cell”. Una vez que el gel separador había polimerizado, se depositó encima del mismo el gel concentrador preparado al 4% de poliacrilamida junto con un peine para permitir la formación de los pocillos, y se dejó polimerizar de nuevo a temperatura ambiente.

Para la preparación de las muestras, se mezcló el homogeneizado de proteínas de cada muestra (10-50  $\mu$ g) con el tampón de carga 4x y  $\beta$ -mercaptoetanol al 5% para conseguir condiciones reductoras, y en algunos casos las proteínas se desnaturalizaron por calentamiento a 100 °C durante 5 min, según las recomendaciones del anticuerpo específico utilizado para la detección de la proteína de interés. Una vez preparadas, las muestras se cargaron en cada pocillo, así como un marcador de pesos moleculares (“Precision Plus Protein™ Dual Color Standards” o “PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder”), y se desencadenó la electroforesis vertical en una cubeta con la solución de migración a una corriente constante de 200 V durante el tiempo necesario para la completa resolución de la proteína de interés.

Para la realización de los ensayos de detección de proteínas por Western blot durante mi estancia en la Universidad de Regensburg se utilizó un protocolo similar, aunque con algunas modificaciones y diferentes reactivos. En lugar de preparar los geles manualmente, se utilizaron geles prefabricados con gradiente de concentración de poliacrilamida (4-12%) que permitían separar un rango más amplio de proteínas de distinto tamaño. Las muestras procedentes de cultivos celulares se prepararon de manera similar, mezclándolas con un tampón de carga y un agente reductor comerciales (4x Bolt™ LDS Sample Buffer y 10x Bolt™ Sample Reducing Agent, respectivamente). Sin embargo, la preparación de las muestras procedentes de HCC y de tejido hepático adyacente al tumor difirió del protocolo habitual. En este caso, además de añadir a las muestras el tampón de carga y el agente reductor, se emplearon componentes de marcaje de proteínas proporcionados por el kit “Smart Protein Layer (SPL)”. Esta tecnología se basa en el etiquetado fluorescente de las proteínas y permite una normalización más precisa entre muestras sin necesidad de utilizar un gen normalizador. Así, a cada una de las muestras se añadió una etiqueta fluorescente para la visualización de la proteína total, así como un estándar de carga bifluorescente de un tamaño molecular determinado. En

ambos casos, las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 min y se cargaron en los pocillos del gel. La electroforesis vertical se realizó en la cubeta “Mini-Gel-Tank” con la solución de migración (Bolt™ MES SDS Running Buffer) a una corriente constante de 150 V durante 1 h.

#### **3.9.4. Transferencia y tinción de la membrana con rojo Ponceau**

Finalizada la electroforesis, se realizó una transferencia húmeda de las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa. Para ello, se colocaron ambos componentes entre papel *whatman* y esponjas impregnadas en tampón de transferencia, y este montaje se introdujo en una cubeta con tampón de transferencia en frío y agitación, conectada a una corriente constante de 250 mA durante 2 h.

En los ensayos de detección de proteínas llevados a cabo durante mi estancia se utilizó el sistema de transferencia en seco iBlot™ 2 con membranas de nitrocelulosa. Como paso previo, se sumergió el gel durante 5-10 min en etanol al 20% para equilibrarlo y, una vez realizado el montaje con la membrana, se realizó la transferencia a un voltaje constante de 20 V durante 7 min.

Al finalizar el proceso, la membrana de nitrocelulosa se incubó durante 5 min en la solución rojo Ponceau, que se emplea teñir las proteínas, con el fin de comprobar que las proteínas se hubieran transferido correctamente a la membrana. Seguidamente, se realizaron varios lavados con TBS-Tween para retirar la solución de rojo Ponceau y seguir con el protocolo.

#### **3.9.5. Inmunodetección**

Previo a la inmunodetección, se incubó la membrana con leche descremada al 5% (p/v) disuelta en TBS-Tween durante 1 h en agitación para bloquear los sitios de unión inespecíficos para los anticuerpos. A continuación, se retiró la solución de bloqueo y se incubó la membrana con el anticuerpo primario específico frente a la proteína de interés diluido en leche o albúmina sérica bovina (BSA) en TBS-Tween al 5%, según las indicaciones de la casa comercial (Tabla MM-10), durante toda la noche a 4 °C y en agitación.

Posteriormente, se realizaron tres lavados de 15 min con TBS-Tween y la membrana se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente a una dilución 1:2000-1:3000 en leche al 5% (p/v) en TBS-Tween. Los

## MATERIALES Y MÉTODOS

anticuerpos secundarios estaban conjugados con la enzima peroxidasa y se eligieron en función de la especie de la que se había obtenido el anticuerpo primario. Después de realizar tres lavados con TBS-Tween para retirar el exceso de anticuerpo, se procedió al revelado de la membrana.

En el caso de los ensayos realizados durante mi estancia, se utilizó la solución comercial “Pierce™ Protein-Free Blocking Buffer” para el bloqueo de sitios inespecíficos y la dilución de los anticuerpos.

**Tabla MM-10.** Anticuerpos primarios y condiciones empleadas para la detección de proteínas mediante Western blot.

Antígeno	Especie de origen	Dilución	Referencia	Casa comercial
<b>β-actina</b>	<i>Mus musculus</i>	1:5000 (Pierce™ Buffer)	Ab20272	Abcam
<b>AKT</b>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:1000 (BSA 5%)	9272	Cell Signaling
<b>p-AKT Ser473</b>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:1000 (BSA 5%)	4060	Cell Signaling
<b>ARID1A</b>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:1000 (BSA 5%)	12354	Cell Signaling
<b>E-cadherina</b>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:1000 (BSA 5%)	3195	Cell Signaling
<b>eIF4A1</b>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:1000 (Pierce™ Buffer)	ab31217	Abcam
<b>eIF4A2</b>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:1000 (Pierce™ Buffer)	ab31218	Abcam
<b>PTEN</b>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:1000 (BSA 5%)	9188	Cell Signaling
<b>p53</b>	<i>Mus musculus</i>	1:500 (leche 5%)	sc126	Santa Cruz Biotechnology
<b>GAPDH</b>	<i>Mus musculus</i>	1:1000 (leche 5%)	sc32233	Santa Cruz Biotechnology

BSA, albúmina sérica bovina

### 3.9.6. Revelado

El revelado se realizó con un método quimioluminiscente, incubando las membranas con los reactivos de detección ECL (*Enhanced chemiluminescence*). La quimioluminiscencia generada por la enzima peroxidasa unida al anticuerpo secundario se visualizó mediante los equipos de imagen LAS-4000 o ChemiDoc. Los tiempos de exposición se adecuaron a la señal obtenida en cada caso.

### 3.9.7. Cuantificación de la proteína de interés

En aquellos experimentos en los que se utilizaron las muestras de HCC y de tejido hepático adyacente al tumor se cuantificó la proteína de interés para comparar la expresión entre ambos tipos de tejido. Para ello, se llevó a cabo la normalización de la señal según el método estandarizado del kit “Smart Protein Layers”, basado en la tinción fluorescente de proteínas totales y en el uso de un estándar de carga interno. Brevemente, se corrigió la intensidad de la señal de la proteína de interés mediante varios factores de normalización (carga de proteína, etiquetado y cantidad de proteína total). Estos factores de corrección se obtuvieron tras el análisis de las imágenes fluorescentes del gel (GLO= control de carga del gel, GTO = proteína total del gel) y de la membrana (BTO= proteína total de la membrana) utilizando el programa “Image Lab”. El procedimiento detallado del análisis puede encontrarse en las instrucciones del fabricante.

## 3.10. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

### 3.10.1. Cuantificación de ácidos nucleicos

La concentración de DNA y RNA total purificado se valoró por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm en un NanoDrop™ 1000. La posible contaminación con proteínas, solventes orgánicos, EDTA u otros compuestos se evaluó mediante el análisis de las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230.

### 3.10.2. Cuantificación de proteínas totales

La concentración total de proteínas en homogenados de células se determinó utilizando una modificación del método de Lowry realizada por Markwell (237), basado en la reducción de las proteínas con cobre en medio alcalino y la posterior reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla del ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico) con las proteínas tratadas, dando lugar a un producto colorimétrico que puede determinarse mediante espectrofotometría. Se utilizó BSA como proteína estándar para la realización de la curva patrón.

Para medir la concentración de proteínas en homogeneizados de tejidos o células durante mi estancia predoctoral se utilizó el método de Bradford (238), basado en la variación del máximo de absorbancia del compuesto Coomassie Brilliant Blue G-250 cuando éste se une a las proteínas. Este cambio de color se determina

espectrofotométricamente a una longitud de onda de 595 nm. Se utilizó también una solución de BSA como patrón.

### 3.10.3. Determinación de la viabilidad celular por el test de formazán

El test de formazán es un método colorimétrico que se utilizó para la cuantificación del número de células vivas en ensayos de quimiosensibilización celular. Este método se basa en la transformación de la sal de tetrazolio de coloración amarilla bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) por la acción de las hidrogenasas mitocondriales metabólicamente activas en formazán, un compuesto insoluble y de color violeta que posteriormente es solubilizado. La cantidad de formazán producido se cuantifica por espectrofotometría y es directamente proporcional al número de células vivas.

Para los experimentos de viabilidad celular realizados en placa de 96 pocillos se añadieron 110  $\mu$ l de MTT a 0,5 mg/ml en medio de cultivo y la placa se incubó a 37 °C durante 4 h. Posteriormente se añadieron 100  $\mu$ l de SDS al 10% en HCl 0,01 M y se mantuvo en incubación a 37 °C durante 16 h en oscuridad. Finalmente se determinó la absorbancia del formazán por espectrofotometría a una longitud de onda de 595 nm en un lector de ELISA.

En los ensayos de viabilidad celular por MTT realizados durante mi estancia predoctoral se siguió un protocolo similar al descrito anteriormente, con la diferencia del agente empleado para solubilizar los cristales de formazán, que en este caso fue DMSO puro. Tras 15 minutos de incubación en agitación con este compuesto, se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm en el lector de placas FLUOstar Omega.

### 3.10.4. Determinación de la viabilidad celular por el test de sulforodamina B

#### A. Soluciones empleadas

- Tampón fosfato salino (PBS) 1x: NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM (pH 7,4).
- Ácido tricloroacético (TCA): 10% (p/v) en agua
- Ácido acético: 1% (v/v) en agua
- Solución de sulforodamina B (SRB): SRB al 0,057% (p/v) en ácido acético 1%

- Solución de Tris-HCl 10 mM (pH 10,5).

## **B. Procedimiento**

La tinción con SRB es un método colorimétrico alternativo al método de reducción del MTT que se utilizó para la cuantificación del número de células vivas en ensayos de proliferación y de quimiosensibilización celular (239). Se basa en el aumento de afinidad de la SRB por los aminoácidos básicos de las proteínas en condiciones ácidas, de manera que se une selectivamente a estos, proporcionando un índice de contenido de proteínas celulares que se cuantifica por espectrofotometría y es directamente proporcional al número de células vivas.

Para llevar a cabo los ensayos de viabilidad celular mediante esta técnica, en primer lugar, se lavaron con PBS las células en placa de 96 pocillos y, a continuación, se fijaron incubándolas con la solución de TCA al 10% en frío durante 1 h. Posteriormente, las células se lavaron cuatro veces con agua destilada para retirar por completo la solución de fijación y se secaron a 50 °C durante 90 min. Para la tinción con SRB, las células se incubaron con este compuesto a temperatura ambiente durante 30 min. Transcurrido ese tiempo, se lavaron cuatro veces con ácido acético al 1% para retirar el exceso de SRB que no se había unido a las proteínas y se dejaron secar a 50 °C durante 90 min. Para disolver la tinción, se añadieron a cada pocillo 200 µl de la solución Tris 10 mM y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 16 h. Finalmente se determinó la absorbancia del compuesto a una longitud de onda de 540 nm en un lector de ELISA.

### **3.11. ESTUDIO *IN SILICO* DE LA HETEROGENEIDAD DEL HCC EN QUIMIORRESISTENCIA**

#### **3.11.1. Diseño del estudio y recopilación de datos**

Se utilizaron los datos transcriptómicos de la cohorte de pacientes de HCC incluida en la base de datos TCGA (del inglés, *The Cancer Genome Atlas*) denominada TCGA-LIHC (del inglés *Liver Hepatocellular Carcinoma*). En esta cohorte se incluyen los datos de expresión génica de 371 muestras tumorales y 50 muestras adyacentes al tumor. Las muestras procedentes de tumores recurrentes fueron excluidas del estudio. Se obtuvieron los datos de expresión de RNA-seq (plataforma HiSeq Illumina) de la cohorte LIHC mapeados sobre la versión GRCh38 del genoma humano. Como método de normalización se seleccionó FPKM-UQ (del inglés, *fragments per kilobase of transcript*

*per million mapped reads upper quartile*), una versión modificada del método de normalización FPKM (*fragments per kilobase of transcript per million mapped reads*) recomendada por la propia base de datos para facilitar la comparación de la expresión génica entre muestras.

Los datos normalizados de RNA-seq de la cohorte de pacientes TCGA-LIHC, que se encontraban disponibles en el repositorio *Genomic Data Commons* (GDC) del Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU. (NIH), se descargaron mediante el programa R versión 4.2.0 (240) utilizando los paquetes de Bioconductor “TCGAbiolinks” (241) y “SummarizedExperiment” (242). De todos los genes de los que se disponían los niveles de expresión génica, se seleccionaron 94 genes implicados en diferentes mecanismos de quimiorresistencia y malignidad del HCC, junto con los normalizadores *GAPDH* y *ACTB*, y se eliminaron los genes de baja expresión para los análisis posteriores.

Los datos de mutaciones somáticas, así como la información clínica de los pacientes, también se obtuvieron mediante el paquete de R “TCGAbiolinks”. Algunos datos clínicos adicionales fueron proporcionados por la plataforma web cBioPortal que incluye los datos del TCGA (243).

### 3.11.2. Análisis de datos

#### A. Agrupamiento o *clustering* jerárquico

A partir de los datos de expresión de los genes seleccionados en las muestras tumorales de la cohorte TCGA-LIHC, se llevó a cabo el análisis no supervisado de *clustering* jerárquico para clasificar a los pacientes en diferentes grupos en base a su perfil molecular de quimiorresistencia. Previamente, se realizó el procesamiento de los datos mediante una doble normalización de los niveles de expresión utilizando los genes *GAPDH* y *ACTB*, seguida de la transformación logarítmica en base 2 de los valores de expresión normalizados para su representación gráfica en un *heatmap*.

El algoritmo de *clustering* jerárquico se aplicó a las muestras tumorales y a los genes mediante la herramienta *online* “Next-Generation Clustered Heat Maps” desarrollada por el Departamento de Bioinformática y Biología Computacional del centro oncológico MD Anderson (Universidad de Texas, EE.UU.), la cual permitió también la visualización gráfica de los resultados. Se utilizó la distancia euclidiana como distancia métrica de similitud y el método de Ward de varianza mínima como método de

vinculación. Estos parámetros de agrupamiento jerárquico fueron seleccionados en base a la bibliografía (244–246). El análisis del dendrograma obtenido permitió la identificación de los diferentes grupos de muestras o clústers.

### **B. Análisis de supervivencia**

El análisis de supervivencia de los grupos de pacientes identificados mediante el *clustering* jerárquico se realizó utilizando los datos de supervivencia global, definida como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta la muerte o pérdida de seguimiento. Las curvas de supervivencia se estimaron por el método de Kaplan-Meier y se compararon mediante el test estadístico log-rank, también denominado test de Mantel-Cox, utilizando los paquetes de R “TCGAbiolinks”, “Survminer” y “Survival”. Estos paquetes también proporcionaron una tabla representando el número de individuos en riesgo (número de individuos que permanecen en el estudio) a determinados tiempos. Para los análisis de supervivencia univariante y multivariante con las variables clínico-patológicas disponibles de la cohorte del TCGA, se utilizó el modelo de riesgos proporcionales de Cox mediante el paquete de R “Survival”.

### **3.12. ESTUDIO *IN SILICO* PARA LA CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS**

Para predecir la estructura tridimensional de las proteínas silenciadas mediante el sistema de CRISPR-Cas9, tanto en su forma completa como truncada, se empleó la herramienta *online* “Phyre2” (247). Las estructuras generadas se visualizaron con el servidor web de modelado molecular “EzMol” (248).

### **3.13. ANÁLISIS Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO**

El tratamiento de datos y análisis estadístico se realizó con los programas Excel de Microsoft Office (versión 365) y GraphPad Prism 7.

A menos que se especifique otra cosa, los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM), en el caso de que los datos se ajustaran a una distribución normal, o bien se representaron como la mediana y el rango intercuartílico cuando los datos no seguían una distribución normal. Para determinar si las variables continuas presentaban o no dicha distribución se aplicaron los test de normalidad Shapiro-Wilk y D'Agostino-Pearson. La significación estadística de las diferencias entre grupos (p) se calculó mediante pruebas paramétricas o no paramétricas dependiendo de si los datos mostraban o no una distribución normal, respectivamente. Para la comparación de

dos grupos de muestras independientes se utilizó el test paramétrico  $t$  de Student de valores no pareados o bien la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. En los casos donde se compararon dos grupos de muestras pareadas que no presentan una distribución normal, se aplicó la prueba no paramétrica de los rangos con signo de Wilcoxon. Cuando se compararon tres o más grupos, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), cuya significación fue corregida por el test de Bonferroni para comparaciones entre grupos, o bien se empleó el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido del método de Dunn para comparaciones por pares. Para la comparación de dos variables categóricas se utilizó el test exacto de Fisher y, en el caso de que hubiera más de dos variables, el test de  $\chi^2$  de Pearson. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

**CAPÍTULO I:**  
HETEROGENEIDAD EN EL  
PATRÓN DE EXPRESIÓN DE  
GENES DE QUIMIORRESISTENCIA  
EN EL HCC

**CAPÍTULO II: PAPEL DE LOS  
SUPRESORES TUMORALES EN LA  
QUIMIORRESISTENCIA DEL  
CARCINOMA HEPATOCELULAR**

**CAPÍTULO III: eIF4A COMO  
DIANA TERAPÉUTICA EN EL  
CARCINOMA HEPATOCELULAR**



## **6.1. RESULTADOS**



La limitada eficacia de los tratamientos antitumorales actuales frente al HCC avanzado está promoviendo la búsqueda de nuevas dianas y estrategias terapéuticas para mejorar el pronóstico de los pacientes con este tipo de tumor. En este sentido, la inhibición selectiva de la maquinaria de traducción está surgiendo como un nuevo enfoque prometedor para el tratamiento del cáncer.

La desregulación de la síntesis de proteínas ocurre con frecuencia en diversos tipos de cáncer, un fenómeno que se ha relacionado con el crecimiento y la progresión del tumor al potenciar selectivamente la síntesis de proteínas implicadas en la proliferación celular, la activación de la invasión y metástasis, y en otros procesos relacionados con las características neoplásicas (249). La iniciación de la traducción es el paso que limita la velocidad de síntesis de proteínas y está regulada por múltiples factores de iniciación eucarióticos (eIF) (250,251). El complejo eIF4F, que incluye los factores eIF4E, eIF4G y eIF4A, es esencial para el reclutamiento de ribosomas y la iniciación de la traducción cap-dependiente. eIF4E se une a la estructura m<sup>7</sup>G-cap en el extremo 5' de los mRNAs, mientras que eIF4G es una proteína de andamiaje que se une a eIF4E y eIF4A. La proteína eIF4A, el único componente del complejo eIF4F con actividad enzimática, es una helicasa DEAD-box dependiente de ATP que desenrolla las estructuras secundarias del mRNA en las regiones 5'-UTRs para permitir el escaneo del ribosoma hasta encontrar el triplete iniciador AUG. La helicasa eIF4A es necesaria para la traducción eficiente de mRNAs con regiones 5'-UTRs largas y altamente estructuradas (252). Estas estructuras complejas se han encontrado en los 5'-UTRs de muchos oncogenes, incluyendo *KRAS*, *BLC2*, *NOTCH1*, *CDK6* y *CCND1*, por lo que se consideran genes dependientes de eIF4A (253,254).

Existen dos isoformas de eIF4A que participan en la traducción del mRNA, eIF4A1 y eIF4A2, las cuales comparten un ~90% de identidad en la secuencia de aminoácidos (255). A pesar de su similitud, eIF4A1 es esencial para la viabilidad celular pero no eIF4A2, y esta última no puede compensar todas las funciones de eIF4A1, lo que indica que las dos isoformas tienen propiedades biológicas distintas (256,257).

Las características mencionadas del factor eIF4A lo convierten en una interesante diana farmacológica para la terapia antitumoral. Los rocaglatos, también conocidos como flavaglinas, son un grupo de pequeñas moléculas de origen natural con un núcleo común de ciclopenta[b]benzofurano. Estos compuestos suprimen la traducción cap-dependiente mediante la inhibición de la actividad de eIF4A, y presentan un potente efecto antitumoral

(258). Concretamente, estabilizan la unión inespecífica de eIF4A al RNA, impidiendo así su incorporación al complejo eIF4F (259,260), y se ha demostrado que inhiben ambas isoformas de eIF4A (261). Existen más de cien rocaglatos naturales aislados de especies de arbustos del género *Aglaia*, como el silvestrol y la rocaglamida, aunque también se han desarrollado numerosos derivados sintéticos con el objetivo de mejorar su potencia y biodisponibilidad, como los inhibidores FL3, Zotatfin y CR-1-31-B, entre otros (262,263).

En el contexto de una colaboración con el Dr. Diego Calvisi durante una estancia de tres meses en la Universidad de Regensburg (Alemania) que realicé durante mi periodo predoctoral, nos propusimos investigar el efecto antitumoral de los inhibidores de la actividad de eIF4A en líneas celulares derivadas de HCC y evaluar su utilidad como estrategia farmacológica frente a este tipo de tumor.

## 7. CONCLUSIONES



**CONCLUSIÓN PRIMERA:**

El análisis *in silico* de la heterogeneidad en la huella genética de quimiorresistencia del HCC ha permitido identificar dos grupos de pacientes con distinto perfil de expresión de genes. Esta firma molecular, constituida por 59 genes implicados en diversos mecanismos de quimiorresistencia (MOC) y malignidad, es un factor pronóstico independiente.

**CONCLUSION SEGUNDA:**

Aunque la determinación de la expresión de 31 genes MOC en HCC mediante TLDA ha permitido clasificar a los pacientes en dos grupos con un patrón de expresión similar a los identificados en el estudio *in silico*, sería recomendable incorporar un mayor número de genes MOC a esta herramienta. Este análisis sienta las bases para estudios posteriores encaminados a relacionar la firma genética de quimiorresistencia con la respuesta al tratamiento de los pacientes con HCC, con el fin de implementar el uso de esta herramienta en la práctica clínica.

**CONCLUSIÓN TERCERA:**

El estudio *in silico* llevado a cabo con datos genómicos de la cohorte de pacientes con HCC del TCGA ha confirmado la alta frecuencia con la que aparecen alterados en el HCC los genes supresores tumorales *TP53*, *ARID1A*, *PTEN* y *CDH1*, bien por la caída de su expresión o por la presencia de mutaciones somáticas que alteran su función. Así mismo, se ha demostrado la existencia de una relación entre la presencia de mutaciones en *TP53* y *ARID1A* o la baja expresión de *PTEN* y *CDH1* y un peor pronóstico de los pacientes con HCC.

**CONCLUSION CUARTA:**

Mediante la tecnología CRISPR/Cas9 se han obtenido líneas celulares derivadas de HCC con anulación de la expresión de las proteínas supresoras de tumores p53, ARID1A, PTEN y E-cadherina, para evaluar la repercusión de la pérdida de función de estas proteínas en la respuesta a los fármacos antitumorales y en el fenotipo de malignidad.

## CONCLUSIONES

### CONCLUSION QUINTA:

La pérdida de función de p53 en células de HCC incrementa sus características de malignidad, aumenta su resistencia a los agentes quimioterapéuticos clásicos y afecta a su respuesta a algunos inhibidores de tirosina quinasa. La pérdida de función de ARID1A, PTEN y E-cadherina contribuye de manera poco significativa a la respuesta a los agentes antitumorales evaluados y al fenotipo de malignidad en los modelos celulares ensayados.

### CONCLUSION SEXTA:

La expresión de los factores de iniciación de la traducción eIF4A1 y eIF4A2 aumenta en el HCC. Los altos niveles de la isoforma eIF4A1 se relacionan con un peor pronóstico de los pacientes, poniendo de manifiesto su interés como potencial diana farmacológica para el tratamiento de este tumor.

### CONCLUSION SÉPTIMA

Los inhibidores de eIF4A presentan una potente actividad antiproliferativa y un efecto citotóxico *in vitro* mediante la inducción de la apoptosis en líneas celulares de HCC. El efecto sinérgico de la combinación de estos fármacos con otros agentes antitumorales, como el SN-38, abre una nueva vía terapéutica para el tratamiento del HCC y sienta las bases para la exploración de nuevas combinaciones más eficaces de los inhibidores de eIF4A con otros fármacos antitumorales que permitan superar la quimiorresistencia de este tumor.

## 8. BIBLIOGRAFÍA



1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
2. Benson AB. Epidemiology, disease Progression, and Economic Burden of Colorectal Cancer. *J Manag Care Pharm.* 2007;13(6):5–18.
3. Brunt E, Aishima S, Clavien P, Fowler K, Gores G, Gouw A, et al. cHCC-CCA: Consensus Terminology for Primary Liver Carcinomas With Both Hepatocytic and Cholangiocytic Differentiation. *Hepatology.* 2019;68(1):113–26.
4. Villanueva A. Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med.* 2019;380(15):1450–1462.
5. Akinyemiju GB of DLCC, Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, Allen C, Alam N, et al. The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level Results From the Global Burden of Disease Study 2015. *JAMA Oncol.* 2017;3(12):1683–91.
6. Park J, Chen M, Colombo M, Roberts LR, Schwartz M, Chen P, et al. Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death : the BRIDGE Study. *Liver Int Off J Int Assoc Study Live.* 2015;35(9):2155–66.
7. Yang JD, Gyedu A, Afihene MY, Duduyemi BM, Micah E, Kingham TP. Hepatocellular Carcinoma Occurs at an Earlier Age in Africans, Particularly in Association With Chronic Hepatitis B. *Am J Gastroenterol.* 2015;110(11):1629–31.
8. Wands J. Hepatocellular carcinoma and sex. *N Engl J Med.* 2007;357(19):1974–6.
9. Frager SZ, Schwartz JM. Hepatocellular carcinoma : epidemiology , screening , and assessment of hepatic reserve. *Curr Oncol.* 2020;27(Suppl 3):138–43.
10. Paterlini-Bréchet P, Kenichi Saigo YM, Chami M, Gozuacik D, Mugnier C, Lagorce D, et al. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene.* 2003;22(25):3911–6.
11. Chayanupatkul M, Omino R, Mittal S, Kramer JR, Richardson P, Thrift AP, et al. Hepatocellular carcinoma in the absence of cirrhosis in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2017;66(2):355–362.
12. Liu Y, Chang C-CH, Marsh GM, Wu F. Population Attributable Risk of Aflatoxin-Related Liver Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. *Eur J Cancer.* 2012;48(14):2125–36.
13. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease—Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes. *Hepatology.* 2016;64(1):73–84.
14. Anstee QM, Reeves HL, Kotsiliti E, Govaere O, Heikenwalder M. From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(7):411–428.
15. Mittal S, El-serag HB, Sada YH, Duan Z, Temple S, May SB, et al. Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis in US Veterans is Associated with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2016;14(1):124–31.
16. Elmberg M, Hultcrantz R, Ekbom A, Brandt L, Olsson S, Olsson R, et al. Cancer Risk in Patients With Hereditary Hemochromatosis and in Their First-Degree Relatives. *Gastroenterology.* 2003;125(6):1733–41.
17. Eriksson S, Carlson J, Velez R. Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha 1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med.* 1986;314(12):736–739.
18. Ginkel WG Van, Gouw ASH, Jagt EJ Van Der, Jong KP De. Hepatocellular Carcinoma in Tyrosinemia Type 1 Without Clear Increase of AFP. *Pediatrics.* 2015;135(3):e749–e752.
19. Kauppinen R, Mustajoki P. Acute hepatic porphyria and hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 1988;57(1):117–20.

20. Ohkoshi-Yamada M, Kamimura K, Kamimura H, Terai S. Rare complication of hepatocellular carcinoma in Wilson ' s disease. *JGH open an open access J Gastroenterol Hepatol*. 2021;5(10):1220–2.
21. Schulze K, Imbeaud S, Letouzé E, Ludmil B, Ligue EL, Alexandrov LB, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet*. 2015;47(5):505–11.
22. Schulze K, Nault J, Villanueva A. Genetic profiling of hepatocellular carcinoma using next-generation sequencing. *J Hepatol*. 2016;65(5):1031–42.
23. Marquardt JU, Andersen JB, Thorsteirsson SS. Functional and genetic deconstruction of the cellular origin in liver cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015;15:653–67.
24. Nault JC, Mallet M, Pilati C, Calderaro J, Bioulac-sage P, Laurent C, et al. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat Commun*. 2013;4:2218.
25. Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad I Ben, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*. 2012;44(6):694–8.
26. Wahid B, Ali A, Rafique S, Idrees M. New Insights into the Epigenetics of Hepatocellular Carcinoma. *Biomed Res Int*. 2017;1609575.
27. Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, et al. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet*. 2014;46(12):1267–1273.
28. Khalaf AM, Fuentes D, Morshid AI, Burke MR, Kaseb AO, Hassan M, et al. Role of Wnt /  $\beta$  -catenin signaling in hepatocellular carcinoma , pathogenesis , and clinical significance. *J Hepatocell carcinoma*. 2018;5:61–73.
29. Llovet JM, Zucman-rossi J, Pikarsky E, Sangro B, Sherman M, Gores G. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Prim*. 2016;2:16018.
30. Novikova M V, Khromova N V, Kopnin PB. Components of the Hepatocellular Carcinoma Microenvironment and Their Role in Tumor Progression. *Biochemistry (Mosc)*. 2017;82(8):861–873.
31. Lin N, Meng L, Lin J, Chen S, Zhang P, Chen Q, et al. Activated hepatic stellate cells promote angiogenesis in hepatocellular carcinoma by secreting angiopoietin - 1. *J Cell Biochem*. 2019;121(2):1441–1451.
32. Zhu B, Lin N, Zhang M, Zhu Y, Cheng H, Chen S, et al. Activated hepatic stellate cells promote angiogenesis via interleukin - 8 in hepatocellular carcinoma. *J Transl Med*. 2015;13:365.
33. Pietras K, Östman A. Hallmarks of cancer : Interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res*. 2010;316(8):1324–31.
34. He G, Karin M. NF-  $\kappa$  B and STAT3 – key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res*. 2011;21(1):159–68.
35. He G, Yu G, Temkin V, Ogata H, Kuntzen C, Sakurai T, et al. Hepatocyte IKK $\beta$ /NF-kappaB inhibits tumor promotion and progression by preventing oxidative stress-driven STAT3 activation. *Cancer Cell*. 2010;17(3):286–97.
36. Llovet JM and E of CT in HC, Bisceglie AM Di, Bruix J, Kramer BS, Lencioni R, Zhu AX, et al. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(10):698–711.
37. Easloffice@easloffice.eu EA for the S of the LE address:, Liver EA for the S of the. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2018;69(1):182–236.
38. Singal A, Volk ML, Waljee A, Salgia R, Higgins P, Rogers MAM, et al. Meta-analysis: surveillance with ultrasound for early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009;30(1):37–47.

39. Tommaso L Di, Franchi G, Park YN, Fiamengo B, Destro A, Morengi E, et al. Diagnostic Value of HSP70, Glypican 3, and Glutamine Synthetase in Hepatocellular Nodules in Cirrhosis. *Hepatology*. 2007;45(3):725–34.
40. Reig M, Forner A, Rimola J, Ferrer-fàbrega J, Burrel M, Garcia-criado Á, et al. BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. *J Hepatol*. 2022;76(3):681–93.
41. Roayaie S, Jibara G, Tabrizian P, Park J, Yang J, Yan L, et al. The role of hepatic resection in the treatment of hepatocellular cancer. *Hepatology*. 2015;62(2):440–51.
42. Kardashian A, Florman SS, Haydel B, Ruiz RM, Klintmalm GB, Lee DD, et al. Liver Transplantation Outcomes in a U.S. Multicenter Cohort of 789 Patients With Hepatocellular Carcinoma Presenting Beyond Milan Criteria. *Hepatology*. 2020;72(6):2014–28.
43. Lencioni R, Baere T de, Soulen MC, Rilling WS, Geschwind J-FH. Lipiodol transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: A systematic review of efficacy and safety data. *Hepatology*. 2016;64(1):106–16.
44. Bargellini I, Sacco R, Bozzi E, Bertini M, Ginanni B, Romano A, et al. Transarterial chemoembolization in very early and early-stage hepatocellular carcinoma patients excluded from curative treatment : A prospective cohort study. *Eur J Radiol*. 2012;81(6):1173–8.
45. Vogel A, Cervantes A, Chau I, Daniele B, Llovet JM, Meyer T, et al. Hepatocellular carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2018;29(Suppl 4):iv238–55.
46. Lai CL, Wu PC, Chan GC, Lok AS, Lin HJ. Doxorubicin versus no antitumor therapy in inoperable hepatocellular carcinoma. A prospective randomized trial. *Cancer*. 1988;62(3):479–483.
47. Yeo W, Mok TS, Zee B, Leung TWT, Lai PBS, Lau WY, et al. A Randomized Phase III Study of Doxorubicin Versus Cisplatin / Interferon  $\alpha$  -2b / Doxorubicin / Fluorouracil ( PIAF ) Combination Chemotherapy for Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(20):1532–1538.
48. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J-F, et al. Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 2008;359(4):378–90.
49. Cheng A, Kang Y, Chen Z, Tsao C, Qin S, Kim JS, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol*. 2009;10(1):25–34.
50. Cheng A, Kang Y, Lin D, Park J, Kudo M, Qin S, et al. Sunitinib versus sorafenib in advanced hepatocellular cancer: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol*. 2022;31(32):4067–76.
51. Johnson PJ, Qin S, Park J, Poon RTP, Raoul J, Philip PA, et al. Brivanib versus sorafenib as first-line therapy in patients with unresectable, advanced hepatocellular carcinoma: results from the randomized phase III BRISK-FL study. *J Clin Oncol*. 2022;31(28):3517–3524.
52. Cainap C, Qin S, Huang W, Chung IJ, Pan H, Cheng Y, et al. Linifanib Versus Sorafenib in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma : Results of a Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol*. 2015;33(2):172–179.
53. Cheng A-L, Thongprasert S, Lim HY, Sukeepaisarnjaroen W, Yang T-S, Wu C-C, et al. Randomized, open-label phase 2 study comparing frontline dovitinib versus sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2016;64(3):774–84.
54. Zhu AX, Rosmorduc O, Evans TRJ, Ross PJ, Santoro A, Carrilho FJ. SEARCH: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of sorafenib plus erlotinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*. 2022;33(6):559–66.
55. Koeberle D, Dufour J, Demeter G, Li Q, Ribi K, Samaras P, et al. Sorafenib with or without everolimus in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC): a randomized multicenter, multinational phase II trial (SAKK 77/08 and SASL 29). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2016;27(5):856–61.

56. Kudo M, Finn RS, Qin S, Han K, Ikeda K, Piscaglia F, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma : a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*. 2018;391(10126):1163–73.
57. Finn RS, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim T-YY, et al. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 2020;382(20):1894–1905.
58. Vogel A, Martinelli E. Updated treatment recommendations for hepatocellular carcinoma (HCC) from the ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*. 2021;32(6):801–5.
59. Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A, Huang Y, Bodoky G, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2016;389(10064):56–66.
60. Finn RS, Merle P, Granito A, Huang Y, Bodoky G, Pracht M, et al. Outcomes of sequential treatment with sorafenib followed by regorafenib for HCC: additional analyses from the phase 3 RESORCE trial. *J Hepatol*. 2018;69(2):353–358.
61. Abou-Alfa GK, Meyer T, Cheng A-L, El-Khoueiry AB, Rimassa L, Ryoo B-Y, et al. Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 2018;379(1):54–63.
62. Zhu AX, Park JO, Ryoo B, Yen C, Poon R, Pastorelli D, et al. Ramucirumab versus placebo as second-line treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma following first-line therapy with sorafenib ( REACH ): a randomised , double-blind , multicentre , phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(7):859–870.
63. Zhu AX, Kang Y, Yen C, Finn RS, Galle PR, Llovet JM, et al. Articles Ramucirumab after sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma and increased  $\alpha$ -fetoprotein concentrations ( REACH-2 ): a randomised , double-blind , placebo-controlled , phase 3 trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2019;2045(18):1–15. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30937-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30937-9)
64. El-Khoueiry AB, Sangro B, Yau T, Crocenzi TS, Kudo M, Hsu C, et al. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet*. 2017;389(10088):2492–502.
65. Zhu AX, Finn RS, Edeline J, Cattani S, Ogasawara S, Palmer D, et al. Pembrolizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma previously treated with sorafenib ( KEYNOTE-224 ): a non-randomised , open-label phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2018;19(7):940–952.
66. Yau T, Kang Y-K, Kim T-Y, El-Khoueiry AB, Santoro A, Sangro B, et al. Efficacy and Safety of Nivolumab Plus Ipilimumab in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma Previously Treated With Sorafenib The CheckMate 040 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2020;6(11):e204564.
67. Finn RS, Ikeda M, Zhu AX, Sung MW, Baron AD. Phase Ib Study of Lenvatinib Plus Pembrolizumab in Patients With Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Oncol*. 2020;38(26):2960–2970.
68. Kelley RK, Rimassa L, Cheng A, Kaseb A, Qin S, Zhu AX, et al. Cabozantinib plus atezolizumab versus sorafenib for advanced hepatocellular carcinoma ( COSMIC-312 ): a multicentre , open-label , randomised , phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2022;23(8):995–1008.
69. Marin JJG, Briz O, Herraes E, Lozano E, Asensio M, Di Giacomo S, et al. Molecular bases of the poor response of liver cancer to chemotherapy. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2018 Mar;42(3):182–92.
70. Marin JJG, Macias RIR, Monte MJ, Romero MR, Asensio M, Sanchez-martin A, et al. Molecular Bases of Drug Resistance in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6):1663.
71. Huang Y, Anderle P, Bussey KJ, Barbacioru C, Shankavaram U, Dai Z, et al. Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res*. 2004;64(12):4294–301.

72. Giacomini KM, Yee SW, Koleske ML, Zou L, Matsson P, Chen EC, et al. New and Emerging Research on Solute Carrier and ATP Binding Cassette Transporters in Drug Discovery and Development: Outlook From the International Transporter Consortium. *Clin Pharmacol Ther.* 2022;112(3):540–561.
73. Lozano E, Briz O, Macias RIR, Serrano MA, Marin JJG, Herraiez E. Genetic Heterogeneity of SLC22 Family of Transporters in Drug Disposition. *J Pers Med.* 2018;8(2):14.
74. Park JE, Ryoo G, Lee W. Alternative Splicing: Expanding Diversity in Major ABC and SLC Drug Transporters. *AAPS J.* 2017;19(6):1643–1655.
75. Herraiez E, Lozano E, Macias RIR, Vaquero J, Bujanda L, Banales JM, et al. Expression of SLC22A1 Variants May Affect the Response of Hepatocellular Carcinoma and Cholangiocarcinoma to Sorafenib. *Hepatology.* 2013;58(3):1065–73.
76. Al-abdulla R, Lozano E, Macias RIR, Monte MJ, Briz O, Rourke CJO, et al. Epigenetic events involved in organic cation transporter 1-dependent impaired response of hepatocellular carcinoma to sorafenib. *Br J Pharmacol.* 2019;176(6):787–800.
77. Geier A, Macias RIR, Bettinger D, Weiss J, Jahn D, Al-abdulla R, et al. 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.* 2017;8(9):15846–57.
78. Lacy S, Hsu B, Miles D, Aftab D, Wang R, Nguyen L. Metabolism and Disposition of Cabozantinib in Healthy Male Volunteers and Pharmacologic Characterization of Its Major Metabolites. *Drug Metab Dispos.* 2015;43(8):1190–1207.
79. Ohya H, Shibayama Y, Ogura J, Narumi K, Kobayashi M, Iseki K. Regorafenib is transported by the organic anion transporter 1B1 and the multidrug resistance protein 2. *Biol Pharm Bull.* 2015;38(4):582–6.
80. Hu DG, Marri S, Mckinnon RA, Mackenzie PI, Meech R. Deregulation of the Genes that Are Involved in Drug Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion in Hepatocellular Carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther.* 2019;368(3):363–381.
81. Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(22):14298–14302.
82. Wang XQ, Ongkeko WM, Chen L, Yang ZF, Lu P, Chen KK, et al. Octamer 4 (Oct4) mediates chemotherapeutic drug resistance in liver cancer cells through a potential Oct4-AKT-ATP-binding cassette G2 pathway. *Hepatology.* 2010;52(2):528–539.
83. Zhu Z, Hao X, Yan M, Yao M, Ge C, Gu J, et al. Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133+CD44+ population in hepatocellular carcinoma. *Int J cancer.* 2010;126(9):2067–2078.
84. Locher KP. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat Struct Mol Biol.* 2016;23(6):487–493.
85. Kort A, Durmus S, Sparidans RW, Wagenaar E, Beijnen JH, Schinkel AH. Brain and Testis Accumulation of Regorafenib is Restricted by Breast Cancer Resistance Protein (BCRP / ABCG2). *Pharm Res.* 2015;32(7):2205–16.
86. Lagas JS, Van Waterschoot RAB, Sparidans RW, Els Wagenaar J, Beijnen JH, Schinkel AH. Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein limit sorafenib brain accumulation. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(2):319–26.
87. Tandia M, Mhiri A, Paule B, Saffroy R, Cailliez V, Noé G, et al. Correlation between clinical response to sorafenib in hepatocellular carcinoma treatment and polymorphisms of P-glycoprotein (ABCB1) and of breast cancer resistance protein (ABCG2): monocentric study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017;79(4):759–66.
88. Yin W, Xiang D, Wang T, Zhang Y, Pham C V. The inhibition of ABCB1/MDR1 or ABCG2/BCRP enables doxorubicin to eliminate liver cancer stem cells. *Sci Rep.* 2021;11(1):10791.
89. Shibayama Y, Nakano K, Maeda H, Taguchi M, Ikeda R, Sugawara M, et al. Multidrug resistance

- protein 2 implicates anticancer drug-resistance to sorafenib. *Biol Pharm Bull.* 2011;34(3):433–5.
90. Ozeki T, Nagahama M, Fujita K, Suzuki A, Sugino K. Influence of CYP3A4/5 and ABC transporter polymorphisms on lenvatinib plasma trough concentrations in Japanese patients with thyroid cancer. *Sci Rep.* 2019;9(1):5404.
  91. Tomonari T, Takeishi S, Taniguchi T, Tanaka T. MRP3 as a novel resistance factor for sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(6):7207–7215.
  92. Korita P V, Wakai T, Shirai Y, Matsuda Y, Sakata JUN, Takamura M, et al. Multidrug resistance-associated protein 2 determines the efficacy of cisplatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2010;23(4):965–72.
  93. Chen Y, Chen P, Lin P, Hsiao Y, Chu P. ABCG2 Overexpression Confers Poor Outcomes in Hepatocellular Carcinoma of Elderly Patients. *Anticancer Res.* 2016;36(6):2983–8.
  94. Agarwal S, Sane R, Ohlfest JR, Elmquist WF. The role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in the distribution of sorafenib to the brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;336(1):223–33.
  95. Huang W, Hsieh Y, Hung C, Chien P, Chien Y. BCRP/ABCG2 inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma cells to sorafenib. *PLoS One.* 2013;8(12):e83627.
  96. Beretta GL, Cassinelli G, Pennati M, Zuco V, Gatti L. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: The dual role of tyrosine kinase inhibitors as multitargeting agents. *Eur J Med Chem.* 2017;142:271–89.
  97. Ye L, Yang X, Guo E, Chen W, Lu L, Wang Y, et al. Sorafenib metabolism is significantly altered in the liver tumor tissue of hepatocellular carcinoma patient. *PLoS One.* 2014;9(5):e96664.
  98. Boudou-Rouquette P, Narjoz C, Golmard JL, Thomas- A, Mir O, Taieb F, et al. Early sorafenib-induced toxicity is associated with drug exposure and UGT1A9 genetic polymorphism in patients with solid tumors: a preliminary study. *PLoS One.* 2012;7(8):e42875.
  99. Nakajima T, Takayama T, Miyanishi K, Nobuoka A, Hayashi T, Abe T, et al. Reversal of multiple drug resistance in cholangiocarcinoma by the glutathione S-transferase-pi-specific inhibitor O1-hexadecyl-gamma-glutamyl-S-benzylcysteinyl-D-phenylglycine ethylester. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;306(3):861–9.
  100. Yu D-S, Hsieh DS, Chang SY. Increasing expression of GST-pi MIF, and ID1 genes in chemoresistant prostate cancer cells. *Arch Androl.* 2006;52(4):275–281.
  101. Zhao H, Zhao Y, Guo Y, Huang Y, Lin S, Xue C, et al. Clinical significance of the thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase, and thymidine phosphorylase mRNA expressions in hepatocellular carcinoma patients receiving 5-fluorouracil-based transarterial chemoembolization treatment. *Onco Targets Ther.* 2013;6:811–8.
  102. Negri F V, Bello BD, Porta C, Campanini N, Rossi S, Tinelli C, et al. Expression of pERK and VEGFR-2 in advanced hepatocellular carcinoma and resistance to sorafenib treatment. *Liver Int Off J Int Assoc Study Live.* 2015;35(8):2001–2008.
  103. Zheng Y, Zhan M-X, Zhao W, Liu B, Huang J-W, He X, et al. The relationship of kinase insert domain receptor gene polymorphisms and clinical outcome in advanced hepatocellular carcinoma patients treated with sorafenib. *Med Oncol.* 2014;31(10):209.
  104. Caruso S, Calatayud A, Pilet J, Bella T La, Rekik S, Imbeaud S, et al. Analysis of Liver Cancer Cell Lines Identifies Agents With Likely Efficacy Against Hepatocellular Carcinoma and Markers of Response. *Gastroenterology.* 2019;157(3):760–76.
  105. Xiang Q, Chen W, Ren M, Wang J, Zhang H, Deng DYBB, et al. Cabozantinib suppresses tumor growth and metastasis in hepatocellular carcinoma by a dual blockade of VEGFR2 and MET. *Clin Cancer Res.* 2014;20(11):2959–70.
  106. Wong N, Yeo W, Wong W, Wong NL, Chan KY, Mo FK, et al. TOP2A overexpression in hepatocellular carcinoma correlates with early age onset, shorter patients survival and chemoresistance. *Int J cancer.* 2009;124(3):644–52.

107. Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg P V, et al. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res.* 1995;55(7):1407–1412.
108. Ueda S, Shirabe K, Morita K, Umeda K, Kayashima H. Evaluation of ERCC1 expression for cisplatin sensitivity in human hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2011;18(4):1204–11.
109. Yang S, Wang XQ. XLF-mediated NHEJ activity in hepatocellular carcinoma therapy resistance. *BMC Cancer.* 2017;17(1):344.
110. Lu J, Wang X, Zhang T, Huang X, Yao J, Wang C, et al. Prognostic significance of XRCC4 expression in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2017;8(50):87955–70.
111. Woo HG, Wang XW, Budhu A, Kim YH, Kwon SM, Tang Z, et al. Association of TP53 mutations with stem cell-like gene expression and survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2011;140(3):1063–70.
112. Maria KCÆ, Lung L. Mutant p53 expression enhances drug resistance in a hepatocellular carcinoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004;53(6):519–26.
113. Wei J, Meng F, Qu K, Wang Z, Wu Q, Zhang L, et al. Sorafenib inhibits proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma cells via up-regulation of p53 and suppressing FoxM1. *Acta Pharmacol Sin.* 2015;36(2):241–51.
114. Florea A-M, Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel).* 2011;3(1):1351–71.
115. Fernando J, Sancho P, Fernández-Rodríguez CM, Lledó JL, Caja L, Campbell JS, et al. Sorafenib sensitizes hepatocellular carcinoma cells to physiological apoptotic stimuli. *J Cell Physiol.* 2012;227(4):1319–25.
116. Chen D, Wei L, Yu J, Zhang L. Regorafenib inhibits colorectal tumor growth through PUMA-mediated apoptosis. *Clin cancer Res.* 2014;20(13):3472–84.
117. Yang S, Zhang X, Qu H, Qu B, Yin X, Zhao H. Cabozantinib induces PUMA-dependent apoptosis in colon cancer cells via AKT/GSK-3 $\beta$ /NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Cancer Gene Ther.* 2020;27(5):368–77.
118. Manuscript A, Opportunities T. Dysregulation of Apoptotic Signaling in Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *J Cell Biochem.* 2010;104(4):1124–49.
119. Takehara T, Liu X, Fujimoto J, Friedman SL, Takahashi H. Expression and role of Bcl-xL in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology.* 2001;34(1):55–61.
120. Tutusaus A, Stefanovic M, Boix L, Cucarull B, Colell A, Bruix J, et al. Antiapoptotic BCL-2 proteins determine sorafenib/regorafenib resistance and BH3-mimetic efficacy in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2018;9(24):16701–17.
121. Chun E, Lee K. Bcl-2 and Bcl-xL are important for the induction of paclitaxel resistance in human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;315(3):771–9.
122. Cucarull B, Tutusaus A, Subías M, Stefanovic M, Hernández-Alsina T, Boix L, et al. Regorafenib Alteration of the BCL-xL/MCL-1 Ratio Provides a Therapeutic Opportunity for BH3-Mimetics in Hepatocellular Carcinoma Models. *Cancers (Basel).* 2020;12(2):332.
123. Liang J, Zhao W, Tong P, Li P, Zhao Y, Li H. Comprehensive molecular characterization of inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) for therapeutic targeting in cancer. *BMC Med Genomics.* 2020;13(1):7.
124. Fields AC, Cotsonis G, Sexton D, Santoianni R, Cohen C. Survivin expression in hepatocellular carcinoma: correlation with proliferation, prognostic parameters, and outcome. *Mod Pathol.* 2004;17(11):1378–85.
125. Liu F, Dong X, Lv H, Xiu P, Li TAO. Targeting hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  enhances sorafenib antitumor activity via  $\beta$ -catenin/C-Myc-dependent pathways in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett.* 2015;10(2):778–84.

126. Kim JBIN, Lee M, Park SEOY, Lee S, Kim HYERI, Lee HYOSUK, et al. Sorafenib inhibits cancer side population cells by targeting c-Jun N-terminal kinase signaling. *Mol Med Rep.* 2015;12(6):8247–52.
127. Galarreta MR De, Bresnahan E, Molina-sánchez P, Lindblad E, Maier B, Sia D, et al.  $\beta$ -Catenin Activation Promotes Immune Escape and Resistance to Anti-PD-1 Therapy in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Discov.* 2019;9(8):1124–1141.
128. Zhou Q, Lui VWY, Yeo W. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma. *Futur Oncol.* 2011;7(10):1149–67.
129. Tovar V, Alsinet C, Villanueva A, Hoshida Y, Chiang DY, Solé M, et al. IGF activation in a molecular subclass of hepatocellular carcinoma and pre-clinical efficacy of IGF-1R blockage. *J Hepatol.* 2013;52(4):550–9.
130. Ito Y, Takeda T, Sakon M, Tsujimoto M, Higashiyama S, Noda K, et al. Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 2001;84(10):1377–83.
131. Hu TH, Huang CC, Lin PR, Chang HW, Ger LP, Lin YW, et al. Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2003;97(8):1929–1940.
132. Lee JW, Soung YH, Kim SY, Lee HW, Park WS, Nam SW, et al. PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene.* 2005;24(8):1477–80.
133. Wang H, Xu L, Zhu X, Wang P, Chi H, Meng Z. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling mediates sorafenib-induced invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2014;32(4):1465–72.
134. Dong J, Zhai B, Sun W, Hu F, Cheng H, Xu J. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase / AKT / snail signaling pathway contributes to multi-drug resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One.* 2017;12(9):e0185088.
135. Jilkova ZM, Kuyucu AZ, Kurma K, Tayébéh S, Pour A, Roth GS, et al. Combination of AKT inhibitor ARQ 092 and sorafenib potentiates inhibition of tumor progression in cirrhotic rat model of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2018;9(13):11145–58.
136. Tang JJH, Thng DKH, Lim JJ, Toh TB. JAK/STAT signaling in hepatocellular carcinoma. *Hepatic Oncol.* 2020;7(1):HEP18.
137. Ding X, He M, Chan AWH, Song QX, Sze SC, Chen H, et al. Genomic and Epigenomic Features of Primary and Recurrent Hepatocellular Carcinomas. *Gastroenterology.* 2019;157(6):1630-1645.e6.
138. Pandit SK, Sandrini G, Merulla J, Nobili V, Wang X, Zangari A, et al. Mitochondrial Plasticity Promotes Resistance to Sorafenib and Vulnerability to STAT3 Inhibition in Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel).* 2021;13(23):6029.
139. Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* 2007;21(21):2747–61.
140. Sun T, Mao W, Peng H, Wang Q, Jiao L. YAP promotes sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma by upregulating survivin. *Cell Oncol.* 2021;44(3):689–99.
141. Zhang H, Yu Q, Meng L, Huang H, Liu H, Zhang N, et al. TAZ-regulated expression of IL-8 is involved in chemoresistance of hepatocellular carcinoma cells. *Arch Biochem Biophys.* 2020;693:108571.
142. Wang X, Wu BIN, Zhong Z. Downregulation of YAP inhibits proliferation, invasion and increases cisplatin sensitivity in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Lett.* 2018;16(1):585–93.
143. Neuzillet C, Tijeras-raballand A, Mestier L De, Cros J, Faivre S, Raymond E. MEK in cancer and cancer therapy. *Pharmacol Ther.* 2014;141(2):160–71.

144. Ito Y, Sasaki Y, Horimoto M, Wada S, Tanaka Y, Kasahara A, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1998;27(4):951–8.
145. Hoffmann K, Shibo LIN, Xiao ZHI, Longerich T, Büchler MW, Schemmer P. Correlation of gene expression of ATP-binding cassette protein and tyrosine kinase signaling pathway in patients with hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*. 2011;31(11):3883–90.
146. Morimitsu Y, Hsia CHUC, Kojiro M, Tabor E. Nodules of less-differentiated tumor within or adjacent to hepatocellular carcinoma: relative expression of transforming growth factor- $\alpha$  and its receptor in the different areas of tumor. *Hum Pathol*. 1995;26(10):1126–32.
147. Calvisi DF, Ladu S, Conner EA, Seo D, Hsieh J, Factor VM, et al. Inactivation of Ras GTPase-activating proteins promotes unrestrained activity of wild-type Ras in human liver cancer. *J Hepatol*. 2011;54(2):311–9.
148. Pinyol R, Montal R, Bassaganyas L, Sia D, Takayama T, Chau G, et al. Molecular predictors of prevention of recurrence in HCC with sorafenib as adjuvant treatment and prognostic factors in the phase 3 STORM trial. *Gut*. 2019;68(6):1065–75.
149. Giovannini C, Gramantieri L, Chieco P, Minguzzi M, Lago F, Pianetti S, et al. Selective ablation of Notch3 in HCC enhances doxorubicin's death promoting effect by a p53 dependent mechanism. *J Hepatol*. 2009;50(5):969–79.
150. Giovannini C, Baglioni M, Toaldo MB, Ventrucci C, Adamo SD, Cipone M, et al. Notch3 inhibition enhances sorafenib cytotoxic efficacy by promoting GSK3 $\beta$  phosphorylation and p21 down-regulation in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2013;4(10):1618–1631.
151. Wang S, Wang Y, Xun X, Zhang C, Xiang X, Cheng Q, et al. Hedgehog signaling promotes sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma patient-derived organoids. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020;39(1):22.
152. Huynh H, Ong R, Goh KAHY, Lee LY, Puehler F, Scholz A, et al. Sorafenib/MEK inhibitor combination inhibits tumor growth and the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in xenograft models of hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*. 2019;54(3):1123–33.
153. Huynh H, Ngo VC, Koong HN, Poon D, Choo SP, Thng CH, et al. Sorafenib and rapamycin induce growth suppression in mouse models of hepatocellular carcinoma. *J Cell Mol Med*. 2009;13(8B):2673–83.
154. Li X, Yang X, Biskup E, Zhou J, Li H. Co-expression of CXCL8 and HIF-1 $\alpha$  is associated with metastasis and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(26):22880–22889.
155. Liang Y, Zheng T, Song R, Wang J, Yin D, Wang L, et al. Hypoxia-mediated sorafenib resistance can be overcome by EF24 through Von Hippel-Lindau tumor suppressor-dependent HIF-1 $\alpha$  inhibition in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2013;57(5):1847–57.
156. Zhu H, Chen XP, Luo SF, Guan J, Zhang WG, Zhang BX. Involvement of hypoxia-inducible factor-1- $\alpha$  in multidrug resistance induced by hypoxia in HepG2 cells. *J Exp Clin cancer Res*. 2005;24(4):565–574.
157. Sermeus A, Cosse J, Crespín M, Mainfroid V, Longueville F De, Ninane N, et al. Hypoxia induces protection against etoposide-induced apoptosis: molecular profiling of changes in gene expression and transcription factor activity. *Mol Cancer*. 2008;7:27.
158. Baglieri J, Brenner DA, Kisseleva T. The Role of Fibrosis and Liver-Associated Fibroblasts in the Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7):1723.
159. Dong N, Shi X, Wang S, Gao Y, Kuang Z, Xie Q, et al. M2 macrophages mediate sorafenib resistance by secreting HGF in a feed-forward manner in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. 2019;121(1):22–33.
160. Zhou S, Zhou Z, Hu Z, Huang X, Wang Z, Chen E, et al. Tumor-Associated Neutrophils Recruit Macrophages and T-Regulatory Cells to Promote Progression of Hepatocellular Carcinoma and Resistance to Sorafenib. *Gastroenterology*. 2016;150(7):1646–1658.e17.

161. Chen C, Punj V, Tahara SM, Hess S, Machida K, Chen C, et al. Stem-like Cells through Tumorigenic Changes in Oxidative Phosphorylation and Fatty Acid NANOG Metabolically Reprograms Tumor-Initiating Stem-like Cells through Tumorigenic Changes in Oxidative Phosphorylation and Fatty Acid Metabolism. *Cell Metab* [Internet]. 2016;1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.004>
162. Giannelli G, Koudelkova P, Dituri F, Mikulits W. Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2016;65(4):798–808.
163. Lv D, Chen L, Du L, Zhou L, Tang H. Emerging Regulatory Mechanisms Involved in Liver Cancer Stem Cell Properties in Hepatocellular Carcinoma. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:691410.
164. Xiao Y, Lin M, Jiang X, Ye J, Guo T, Shi Y, et al. The Recent Advances on Liver Cancer Stem Cells: Biomarkers, Separation, and Therapy. *Anal Cell Pathol*. 2017;2017:5108653.
165. Stemmler MP, Eccles RL, Brabletz S, Brabletz T. Non-redundant functions of EMT transcription factors. *Nat Cell Biol*. 2019;21(1):102–112.
166. Kim BH, Park J, Kim JS, Lee S, Hong EK. Stem Cell Markers Predict the Response to Sorafenib in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Gut Liver*. 2019;13(3):342–8.
167. Fernando J, Malfettone A, Cepeda EB, Vilarrasa-Blasi R, Bertran E, Raimondi G, et al. A mesenchymal-like phenotype and expression of CD44 predict lack of apoptotic response to sorafenib in liver tumor cells. *Int J Cancer*. 2015;136(4):E161–72.
168. Guan D, Shi J, Zhang Y, Zhao J, Long L, Chen T, et al. Sorafenib enriches epithelial cell adhesion molecule-positive tumor initiating cells and exacerbates a subtype of hepatocellular carcinoma through TSC2-AKT cascade. *Hepatology*. 2015;62(6):1791–803.
169. Lu S, Yao Y, Xu G, Zhou C, Zhang Y, Sun J, et al. CD24 regulates sorafenib resistance via activating autophagy in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis* [Internet]. 2018; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-018-0681-z>
170. Li Y, Chen G, Han Z, Cheng H, Qiao L, Yumin Li. IL-6/STAT3 Signaling Contributes to Sorafenib Resistance in Hepatocellular Carcinoma Through Targeting Cancer Stem Cells. *Onco Targets Ther*. 2020;13:9721–9730.
171. Liu Y-C, Yeh C-T, Lin K-H. Cancer Stem Cell Functions in Hepatocellular Carcinoma and Comprehensive Therapeutic Strategies. *Cells*. 2020;9(6):1331.
172. Yoshida M, Yamashita T, Okada H, Oishi N, Nio K. Sorafenib suppresses extrahepatic metastasis de novo in hepatocellular carcinoma through inhibition of mesenchymal cancer stem cells characterized by the expression of CD90. *Sci Rep*. 2017;7(1):11292.
173. Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang Y, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology*. 2009;136(3):1012–24.
174. Kawai T, Yasuchika K, Ishii T, Katayama H, Yoshitoshi EY, Ogiso S, et al. Keratin 19, a Cancer Stem Cell Marker in Human Hepatocellular Carcinoma. *Clin cancer Res*. 2015;21(13):3081–91.
175. Govaere O, Komuta M, Berkers J, Spee B, Janssen C, Luca F De, et al. Keratin 19: a key role player in the invasion of human hepatocellular carcinomas. *Gut*. 2014;63(4):674–85.
176. Ungerleider N, Han C, Zhang J, Yao L, Wu T. TGF $\beta$  signaling confers sorafenib resistance via induction of multiple RTKs in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Carcinog*. 2017;56(4):1302–11.
177. Lin T, Shao Y, Chan S, Huang C. High Serum Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Levels Predict Outcome in Hepatocellular Carcinoma Patients Treated with Sorafenib. *Clin cancer Res*. 2015;21(16):3678–84.
178. Teufel M, Seidel H, Köchert K, Meinhardt G, Finn RS, Llovet JM, et al. Biomarkers Associated With Response to Regorafenib in Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2019;156(6):1731–41.
179. Wang M, Wang Z, Zhi X, Ding W, Xiong J, Tao T, et al. SOX9 enhances sorafenib resistance

- through upregulating ABCG2 expression in hepatocellular carcinoma. *Biomed Pharmacother.* 2020;129:110315.
180. Willingham SB, Volkmer J, Gentles AJ, Sahoo D, Dalerba P. The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPa) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(17):6662–6667.
  181. Lo J, Eunice LYT, Hiu R, Ching H, Yik B, Cheng L, et al. Nuclear factor kappa B-mediated CD47 up-regulation promotes sorafenib resistance and its blockade synergizes the effect of sorafenib in hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology.* 2015;62(2):534–45.
  182. Dai X, Guo Y, Hu Y, Bao X, Zhu X, Fu Q, et al. Immunotherapy for targeting cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. *Theranostics.* 2021;11(7):3489–3501.
  183. Bayard Q, Meunier L, Peneau C, Renault V, Shinde J, Nault JC, et al. Cyclin A2/E1 activation defines a hepatocellular carcinoma subclass with a rearrangement signature of replication stress. *Nat Commun.* 2018;9(1):5235.
  184. Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J, Franco D, Binot F, et al. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology.* 2001;120(7):1763–73.
  185. Nault JC, Datta S, Imbeaud S, Franconi A, Mallet M, Couchy G, et al. Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat Genet.* 2015;47(10):1187–93.
  186. Nahon P, Nault JC. Constitutional and functional genetics of human alcohol-related hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2017;37(11):1591–601.
  187. Grimaudo S, Pipitone RM, Pennisi G, Celsa C, Cammà C, Di Marco V, et al. Association Between PNPLA3 rs738409 C>G Variant and Liver-Related Outcomes in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2020;18(4):935-944.e3. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2019.08.011>
  188. Chen LZ, Xia HHX, Xin YN, Lin ZH, Xuan SY. TM6SF2 E167K variant, a novel genetic susceptibility variant, contributing to nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Transl Hepatol.* 2015;3(4):265–70.
  189. Gouas D, Shi H, Hainaut P. The aflatoxin-induced TP53 mutation at codon 249 (R249S): Biomarker of exposure, early detection and target for therapy. *Cancer Lett.* 2009;286(1):29–37.
  190. Nault JC, Couchy G, Balabaud C, Morcrette G, Caruso S, Blanc JF, et al. Molecular Classification of Hepatocellular Adenoma Associates With Risk Factors, Bleeding, and Malignant Transformation. *Gastroenterology.* 2017;152(4):880-894.e6.
  191. Pilati C, Letouzé E, Nault JC, Imbeaud S, Boulai A, Calderaro J, et al. Genomic profiling of hepatocellular adenomas reveals recurrent FRK-activating mutations and the mechanisms of malignant transformation. *Cancer Cell.* 2014;25(4):428–41.
  192. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* [Internet]. 2015;149(5):1226-1239.e4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.05.061>
  193. Sun XJ, Wang MC, Zhang FH, Kong X. An integrated analysis of genome-wide DNA methylation and gene expression data in hepatocellular carcinoma. *FEBS Open Bio.* 2018;8(7):1093–103.
  194. Villanueva A, Portela A, Sayols S, Battiston C, Hoshida Y, Méndez-gonzález J, et al. DNA methylation-based prognosis and epdrivers in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2015;61(6):1945–56.
  195. Sia D, Jiao Y, Martinez-Quetglas I, Kuchuk O, Villacorta-Martin C, Castro de Moura M, et al. Identification of an Immune-specific Class of Hepatocellular Carcinoma, Based on Molecular Features. *Gastroenterology.* 2017;153(3):812–26.
  196. Lee JS, Chu IS, Heo J, Calvisi DF, Sun Z, Roskams T, et al. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology.* 2004;40(3):667–76.

197. Boyault S, Rickman DS, De Reyniès A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology*. 2007;45(1):42–52.
198. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and integrative genomic characterization of hepatocellular carcinoma. Vol. 169, *Cell*. 2017. 1327–1341 p.
199. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Prim*. 2021;7(1):6.
200. Rebouissou S, Nault JC. Advances in molecular classification and precision oncology in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* [Internet]. 2020;72(2):215–29. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.08.017>
201. Wang B, Xia CY, Lau WY, Lu XY, Dong H, Yu WL, et al. Determination of clonal origin of recurrent hepatocellular carcinoma for personalized therapy and outcomes evaluation: a new strategy for hepatic surgery. *J Am Coll Surg*. 2013;217(6):1054–62.
202. Wang H, Cong W-M. New strategy to distinguish clonal origin of RHCC/MHCC between intrahepatic metastasis and multicentric occurrence. *Hepatoma Res*. 2018;4(5):14.
203. Li SL, Su M, Peng T, Xiao KY, Shang LM, Xu BH, et al. Clinicopathologic characteristics and prognoses for multicentric occurrence and intrahepatic metastasis in synchronous multinodular hepatocellular carcinoma patients. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2013;14(1):217–23.
204. Yamamoto S, Midorikawa Y, Nagae G, Tatsuno K, Ueda H, Moriyama M, et al. Spatial and temporal expansion of intrahepatic metastasis by molecularly-defined clonality in multiple liver cancers. *Cancer Sci*. 2020;111(2):601–9.
205. Cheung ST, Chen X, Guan XY, Wong SY, Tai LS, Ng IOL, et al. Identify metastasis-associated genes in hepatocellular carcinoma through clonality delineation for multinodular tumor. *Cancer Res*. 2002;62(16):4711–4721.
206. Ng IOL, Guan XY, Poon RTP, Fan ST, Lee JMF. Determination of the molecular relationship between multiple tumour nodules in hepatocellular carcinoma differentiates multicentric origin from intrahepatic metastasis. *J Pathol*. 2003;199(3):345–53.
207. Nomoto S, Yamashita K, Koshikawa K, Nakao A, Sidransky D. Mitochondrial D-loop mutations as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma and plasma. *Clin Cancer Res*. 2002;8(2):481–487.
208. Furuta M, Ueno M, Fujimoto A, Hayami S, Yasukawa S, Kojima F, et al. Whole genome sequencing discriminates hepatocellular carcinoma with intrahepatic metastasis from multi-centric tumors. *J Hepatol*. 2017;66(2):363–73.
209. Miao R, Luo H, Zhou H, Li G, Bu D, Yang X, et al. Identification of prognostic biomarkers in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma and stratification by integrative multi-omics analysis. *J Hepatol*. 2014;61(4):840–9.
210. Nowell P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* (80- ). 1976;194:23–8.
211. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012;366(10):883–892.
212. Xue R, Li R, Guo H, Guo L, Su Z, Ni X, et al. Variable Intra-Tumor Genomic Heterogeneity of Multiple Lesions in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2016;150(4):998–1008.
213. Torrecilla S, Sia D, Harrington AN, Zhang Z, Cabellos L, Cornella H, et al. Trunk mutational events present minimal intra- and inter-tumoral heterogeneity in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2017;67(6):1222–31.
214. Ling S, Hu Z, Yang Z, Yang F, Li Y, Lin P, et al. Extremely high genetic diversity in a single tumor points to prevalence of non-Darwinian cell evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(47):E6496–505.

215. Guo L, Yi X, Chen L, Zhang T, Guo H, Chen Z, et al. Single-Cell DNA Sequencing Reveals Punctuated and Gradual Clonal Evolution in Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2022;162(1):238–252.
216. Ji J, Wang XW. Clinical implications of cancer stem cell biology in hepatocellular carcinoma. *Semin Oncol*. 2012;39(4):461–72.
217. Zheng H, Pomyen Y, Hernandez MO, Li C, Livak F, Tang W, et al. Single cell analysis reveals cancer stem cell heterogeneity in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2018;68(1):127–40.
218. Gawad C, Koh W, Quake SR. Single-cell genome sequencing: current state of the science. *Nat Rev Genet*. 2016;17(3):175–88.
219. Hwang B, Lee JH, Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Exp Mol Med [Internet]*. 2018;50(8):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-018-0071-8>
220. Zhang Q, Lou Y, Yang J, Wang J, Feng J, Zhao Y, et al. Integrated multiomic analysis reveals comprehensive tumour heterogeneity and novel immunophenotypic classification in hepatocellular carcinomas. *Gut*. 2019;68(11):2019–31.
221. Ma L, Hernandez MO, Zhao Y, Mehta M, Tran B, Rae Z, et al. Tumor cell biodiversity drives microenvironmental reprogramming in liver cancer Lichun. *Cancer Cell*. 2019;36(4):418–30.
222. Chan LK, Tsui YM, Ho DWH, Ng IOL. Cellular heterogeneity and plasticity in liver cancer. *Semin Cancer Biol [Internet]*. 2022;82:134–49. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.02.015>
223. Li L, Knutsdottir H, Hui K, Weiss MJ, He J, Philosophe B, et al. Human primary liver cancer organoids reveal intratumor and interpatient drug response heterogeneity. *JCI Insight*. 2019;4(2):e121490.
224. Hu B, Li H, Guo W, Sun YF, Zhang X, Tang WG, et al. Establishment of a hepatocellular carcinoma patient-derived xenograft platform and its application in biomarker identification. *Int J Cancer*. 2020;146(6):1606–17.
225. Zhao Y, Shuen TWH, Toh TB, Chan XY, Liu M, Tan SY, et al. Development of a new patient-derived xenograft humanised mouse model to study human-specific tumour microenvironment and immunotherapy. *Gut*. 2018;67(10):1845–54.
226. Uehara T, Pogribny IP, Rusyn I. The DEN and CCl4-induced mouse model of fibrosis and inflammation-associated hepatocellular carcinoma. *Curr Protoc Pharmacol*. 2014;66:14.30.1-14.30.10.
227. Cho K, Ro SW, Seo SH, Jeon Y, Moon H, Kim DY, et al. Genetically engineered mouse models for liver cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;12(1):14.
228. Nebigil CG, Moog C, Vagner S, Benkirane-Jessel N, Smith DR, Désaubry L. Flavaglines as natural products targeting eIF4A and prohibitins: From traditional Chinese medicine to antiviral activity against coronaviruses. *Eur J Med Chem*. 2020;203:112653.
229. Lowell JL, Klein DA. Heteroduplex resolution using T7 endonuclease I in microbial community analyses. *Biotechniques*. 2000;28(4):676–81.
230. Ianevski A, Giri AK, Aittokallio T. SynergyFinder 3.0: an interactive analysis and consensus interpretation of multi-drug synergies across multiple samples. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(W1):W739–43.
231. Yadav B, Wennerberg K, Aittokallio T, Tang J. Searching for Drug Synergy in Complex Dose-Response Landscapes Using an Interaction Potency Model. *Comput Struct Biotechnol J*. 2015;13:504–13.
232. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671–5.
233. Traganos F, Seiter K, Feldman E, Halicka HD, Darzynkiewicz Z. Induction of apoptosis by

- camptothecin and topotecan. *Ann N Y Acad Sci.* 1996;803:101–110.
234. Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1994;171(1):131–7.
235. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics.* 2009;10:421.
236. Geer LY, Marchler-Bauer A, Geer RC, Han L, He J, He S, et al. The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(SUPPL.1):492–6.
237. Markwell MAK, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem.* 1978;87(1):206–10.
238. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
239. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(13):1107–12.
240. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. R Found Stat Comput Vienna, Austria. 2022;
241. Colaprico A, Silva TC, Olsen C, Garofano L, Cava C, Garolini D, et al. TCGAbiolinks: An R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(8):e71.
242. Morgan M, Obenchain V, Hester J, Pagès H. SummarizedExperiment: SummarizedExperiment container. R Packag version 1280. 2022;
243. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer OS, Sumer SO, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012;2(5):401–404.
244. Farha M, Jairath NK, Lawrence TS, El Naqa I. Characterization of the Tumor Immune Microenvironment Identifies M0 Macrophage-Enriched Cluster as a Poor Prognostic Factor in Hepatocellular Carcinoma. *JCO Clin Cancer Informatics.* 2020;4:1002–13.
245. Colacino JA, Dolinoy DC, Duffy SA, Sartor MA, Chepeha DB, Bradford CR, et al. Comprehensive analysis of DNA methylation in head and neck squamous cell carcinoma indicates differences by survival and clinicopathologic characteristics. *PLoS One.* 2013;8(1):e54742.
246. Peraldo-Neia C, Ostano P, Cavalloni G, Pignochino Y, Sangiolo D, De Cecco L, et al. Transcriptomic analysis and mutational status of IDH1 in paired primary-recurrent intrahepatic cholangiocarcinoma. *BMC Genomics.* 2018;19(1):440.
247. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc [Internet].* 2015;10(6):845–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015-053>
248. Reynolds CR, Islam SA, Sternberg MJE. EzMol: A Web Server Wizard for the Rapid Visualization and Image Production of Protein and Nucleic Acid Structures. *J Mol Biol.* 2018;430(15):2244–8.
249. Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ. Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(4):254–66.
250. Sonenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell.* 2009;136(4):731–45.
251. Hinnebusch AG. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annu Rev Biochem.* 2014;83:779–812.
252. Wolfe AL, Singh K, Zhong Y, Drewe P, Rajasekhar VK, Sanghvi VR, et al. RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer. *Nature.* 2014;513(7516):65–70.

253. Singh K, Lin J, Lecomte N, Mohan P, Gokce A, Viraj R, et al. Targeting eIF4A Dependent Translation of KRAS Signaling Molecules. *Cancer Res.* 2021;81(8):2002–14.
254. Rubio CA, Weisburd B, Holderfield M, Arias C, Fang E, DeRisi JL, et al. Transcriptome-wide characterization of the eIF4A signature highlights plasticity in translation regulation. *Genome Biol.* 2014;15(10):476.
255. Li Q, Imataka H, Morino S, Rogers GW, Richter-Cook NJ, Merrick WC, et al. Eukaryotic Translation Initiation Factor 4AIII (eIF4AIII) Is Functionally Distinct from eIF4AI and eIF4AII. *Mol Cell Biol.* 1999;19(11):7336–46.
256. Lu WT, Wilczynska A, Smith E, Bushell M. The diverse roles of the eIF4A family: You are the company you keep. *Biochem Soc Trans.* 2014;42(1):166–72.
257. Galicia-Vázquez G, Cencic R, Robert F, Agenor AQ, Pelletier J. A cellular response linking eIF4AI activity to eIF4AII transcription. *RNA.* 2012;18(7):1373–84.
258. Potential of Cyclopenta[b]benzofurans from *Aglaia* Species in Cancer Chemotherapy Kim S, Salim A, Swanson S, Douglas Kinghorn A. Potential of cyclopenta[b]benzofurans from *Aglaia* species in cancer chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2006;6(4):319–45.
259. Iwasaki S, Floor SN, Ingolia NT. Rocaglates convert DEAD-box protein eIF4A into a sequence-selective translational repressor. *Nature.* 2016;534(7608):556–61.
260. Cencic R, Carrier M, Galicia-Vázquez G, Bordeleau ME, Sukarieh R, Bourdeau A, et al. Antitumor activity and mechanism of action of the cyclopenta[b]benzofuran, silvestrol. *PLoS One.* 2009;4(4):e5223.
261. Chu J, Zhang W, Cencic R, Devine WG, Beglov D, Henkel T, et al. Amidino-Rocaglates – A potent class of eIF4A inhibitors. *Cell Chem Biol.* 2019;26(11):1586–93.
262. Pan L, Woodard JL, Lucas DM, Fuchs JR, Kinghorn AD. Rocaglamide, silvestrol and structurally related bioactive compounds from *Aglaia* species. *Nat Prod Rep.* 2014;31(7):924–39.
263. Ebada SS, Lajkiewicz N, Porco JR JA, Li-Weber M, Proksch P. Chemistry and biology of rocaglamides (= flavaglines) and related derivatives from *aglaia* species (meliaceae). Vol. 94, *Progress in the chemistry of organic natural products.* 2011. 1–58 p.



## 9. ENGLISH SUMMARY



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

FACULTY OF PHARMACY

Department of Biochemistry and Molecular Biology



IMPACT OF SILENCING TUMOR SUPPRESSOR GENES ON  
THE HETEROGENEITY OF HEPATOCELLULAR  
CARCINOMA CHEMORESISTANCE. IDENTIFICATION OF  
NOVEL PHARMACOLOGICAL TARGETS

Presented by **Anabel Sánchez Martín** to obtain Ph.D. in the  
University of Salamanca

2023



**ABBREVIATIONS**

<b>5-FU:</b>	5-Fluorouracil
<b>7-AAD:</b>	7-Aminoactinomycin D
<b>ABC:</b>	ATP-binding cassette
<b>AFP:</b>	$\alpha$ -Fetoprotein
<b>CI:</b>	Confidence interval
<b>COSMIC:</b>	Catalogue of somatic mutations in cancer
<b>ECOG:</b>	Eastern Cooperative Oncology Group
<b>eIF:</b>	Eukaryotic initiation factors
<b>EMT:</b>	Epithelial-mesenchymal transition
<b>GDSC:</b>	Genomics of Drug Sensitivity in Cancer
<b>GLO:</b>	Gel loading control
<b>GTO:</b>	Gel total protein
<b>HCC:</b>	Hepatocellular carcinoma
<b>HR:</b>	Hazard ratio
<b>IC50:</b>	Inhibitory concentration 50
<b>IQR:</b>	Interquartile range
<b>KO:</b>	Knockout
<b>LOH:</b>	Loss of heterozygosity
<b>MDR:</b>	Multidrug resistance
<b>MOC:</b>	Mechanism of chemoresistance
<b>MRP:</b>	Multidrug resistance-associated protein
<b>OS:</b>	Overall survival
<b>PI:</b>	Propidium iodide
<b>RECIST:</b>	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
<b>RNA-seq:</b>	RNA sequencing
<b>RT-qPCR:</b>	Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
<b>SD:</b>	Standard deviation
<b>SEM:</b>	Standard error of the mean

<b>TCGA:</b>	The Cancer Genome Atlas
<b>TCGA-LIHC:</b>	TCGA-Liver Hepatocellular Carcinoma
<b>TKI:</b>	Tyrosine kinase inhibitor
<b>TLDA:</b>	TaqMan low-density array
<b>TPM:</b>	Transcripts per million
<b>TSG:</b>	Tumor suppressor gene
<b>ZIP:</b>	Zero interaction potency

## AIMS

Liver cancers are among the most frequent malignancies and the third leading cause of cancer death worldwide. Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common type of primary liver cancer in adults, accounting for more than 90% of cases, and usually develops in patients with underlying liver disease such as cirrhosis or chronic liver inflammation.

Potentially curative treatments for HCC, such as surgical resection, liver transplantation, and local radiofrequency ablation, are only considered for early-stage disease. However, this tumor is often diagnosed at more advanced stages when patients cannot benefit from these curative strategies. In these cases, systemic drug therapy is their only therapeutic option. HCC is characterized by high refractoriness to antineoplastic drugs. Despite major progress in the therapeutic approach for advanced HCC patients in recent years due to the approval of several tyrosine kinase inhibitors (TKIs) and immunotherapy-based treatments, the benefits are modest, and a significant proportion of patients still do not respond to these targeted therapies.

The poor response to the anticancer agents used against HCC is due to the multidrug resistance (MDR) phenotype, which results from the interaction of several complex mechanisms of chemoresistance (MOCs) already present in the tumor cells or developed under pharmacological stress. Another factor limiting the success of antitumor therapy in HCC patients is the great molecular heterogeneity of this tumor. Tumor heterogeneity is not limited to differences between patients but also occurs within the same tumor nodule.

There are numerous molecular alterations involved in hepatocarcinogenesis and tumor progression, such as the inactivation of tumor suppressor genes (TSGs). However, the impact of many of these changes on cancer response to drug therapy remains to be elucidated. It is therefore essential to further study the relationship between HCC heterogeneity and MOCs in order to develop strategies permitting a more personalized therapeutic approach based on the molecular characteristics of each tumor. Likewise, it is necessary to identify new targets to broaden the therapeutic options in the fight against HCC. In this sense, Dr. Diego Calvisi's group at the University of Regensburg (Germany), where I spent a short predoctoral stay, is investigating the selective inhibition of the

translational machinery as a promising new approach for cancer treatment, which could be of great interest for HCC.

Considering this background, the **overall aim** of this doctoral thesis was to deepen the study of HCC heterogeneity in the expression profile of chemoresistance-related genes, to investigate the impact of silencing the most relevant HCC-associated TSGs on the lack of response to current treatments and to evaluate new pharmacological strategies based on selective inhibition of translation initiation.

To achieve this general objective, the following partial aims were designed:

**Aim 1:** To perform a retrospective *in silico* analysis in order to characterize the heterogeneity in gene expression signature of chemoresistance in HCC patients as the basis for further studies aimed at developing tools for predicting the lack of response to drug therapy in these patients.

**Aim 2:** To use CRISPR-Cas9 gene editing technology to develop *in vitro* models of HCC cells with inactivation of TSGs relevant in this tumor.

**Aim 3:** To evaluate the impact of the loss of TSGs function on both the sensitivity of HCC cell lines to antitumor drugs and their malignancy phenotype.

**Aim 4:** To evaluate *in vitro* the therapeutic potential of a new pharmacological strategy based on inhibition of the translation initiation factor eIF4A for HCC treatment.

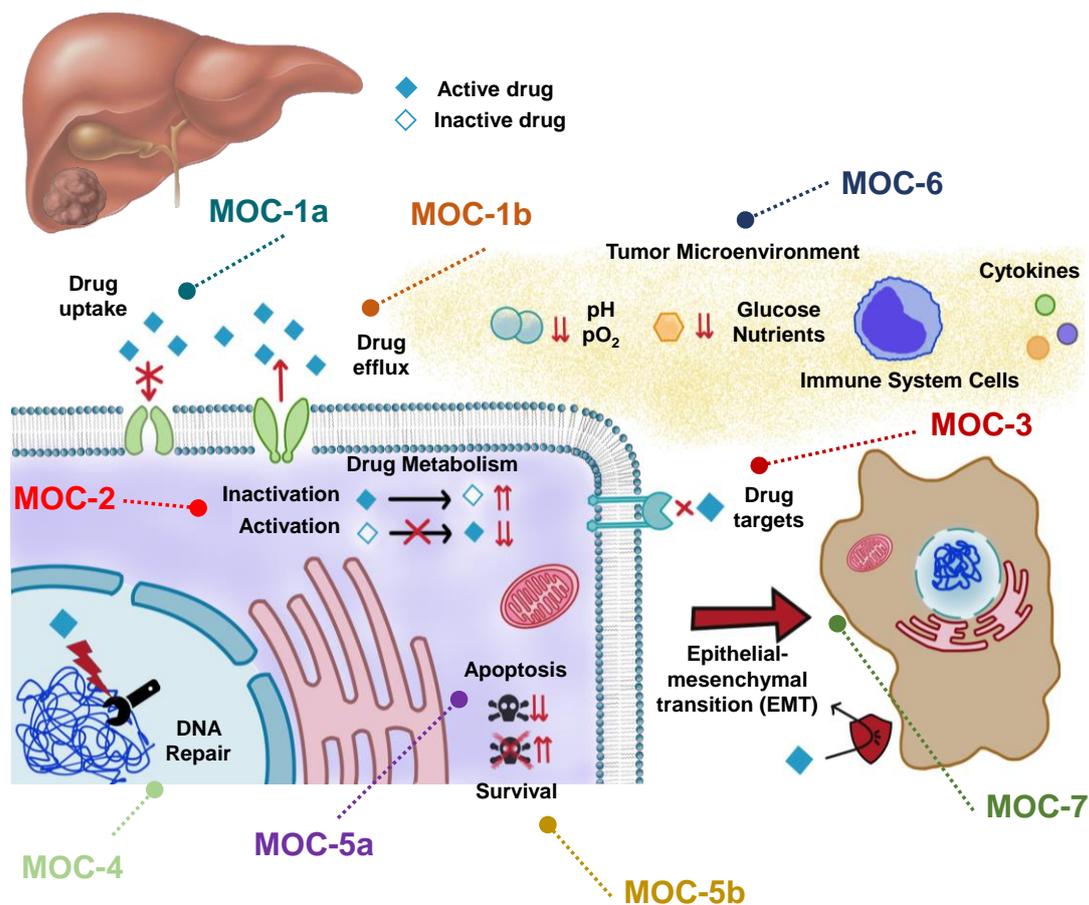
## CHAPTER I. HETEROGENEITY IN THE EXPRESSION PROFILE OF CHEMORESISTANCE-RELATED GENES IN HCC

### INTRODUCTION

HCC is the most common primary liver cancer in adults, consequently being a serious health problem worldwide (1). Generally, this tumor develops in patients with underlying liver disease. The prognosis is poor, with an estimated 5-year survival of 18%, since it is diagnosed at an advanced stage of the disease in most cases, when curative therapeutic options are very limited (2). Many patients do not respond to the systemic therapy currently used against HCC or relapse during the first months of treatment, mainly due to the marked MDR phenotype characteristic of these tumors.

So far, numerous genes and non-coding RNAs involved in different MOCs have been described and classified into seven main groups (Figure I-1) (3,4), which are defined below:

- **MOC-1:** includes the mechanisms that reduce intracellular drug levels by changes in the transportome, either i) by decreasing drug uptake (MOC-1a) or ii) by enhancing drug export (MOC-1b).
- **MOC-2:** encompasses mechanisms that cause an alteration in drug metabolism resulting in a reduced intracellular concentration of active drugs.
- **MOC-3:** refers to changes in the expression or function of drug targets.
- **MOC-4:** includes mechanisms that increase tumor cell ability to repair DNA damage induced by antitumor drugs.
- **MOC-5:** encompasses processes that deregulate the apoptosis/survival balance favoring tumor cell growth, either due to inactivation of apoptosis (MOC-5a) or activation of survival pathways (MOC-5b).
- **MOC-6:** refers to changes in the tumor microenvironment, such as hypoxia, acidification of the extracellular medium, increased inflammatory signals, or reactive oxygen species, which may reduce the effectiveness of antitumor agents.
- **MOC-7:** comprises those mechanisms associated with the appearance of the stem cell phenotype or epithelial-mesenchymal transition (EMT).



**Figure I-1.** Mechanisms of chemoresistance (MOCs) in liver cancer. Modified from (4).

The high heterogeneity of HCC adds additional complexity to problem of reduced efficacy of pharmacological treatments. Our research group had conducted a previous analysis with a small cohort of HCC patients where a high inter-individual heterogeneity in the expression of genes involved in molecular mechanisms of liver tumor chemoresistance was seen (5). In this work, we have taken further steps to advance in the understanding of this question by performing a retrospective analysis to characterize the heterogeneity in the gene expression signature of chemoresistance in HCC, which will set the bases to develop tools for predicting the lack of HCC response to chemotherapy.

## METHODS

An *in silico* study was performed using the transcriptomic data of 371 tumor samples from HCC patients included in the cohort from The Cancer Genome Atlas (TCGA), hereafter referred to as TCGA-LIHC. Normalized RNA-seq data of 72 MOC genes from tumor samples of the TCGA-LIHC cohort were obtained by R version 4.2.0 (6) using TCGAbiolinks (7) and SummarizedExperiment (8) packages. Patient clinical

information was obtained using the R package "TCGAbiolinks" and the web platform cBioPortal (9). Data processing was performed by double normalization of *GAPDH* and *ACTB* expression levels, followed by log<sub>2</sub> transformation of the normalized expression values. Unsupervised hierarchical clustering of tumor samples was performed using the online tool "Next-Generation Clustered Heat Maps" (MD Anderson Cancer Centre, USA). For survival analyses, Kaplan-Meier curves were plotted using the R survival package, comparing survival times by the log-rank test. The Cox proportional-hazards model was used for univariate and multivariate survival analyses based on clinicopathological-molecular variables of the TCGA-LIHC cohort.

TaqMan low-density arrays (TLDA) in an ABI Prism 7900HT Sequence Detection System were used to analyze mRNA levels of MOC genes in tumor samples from patients in the validation cohort. Expression levels were subjected to a double normalization with the *GAPDH* and *ACTB* mRNA levels.

## CHAPTER 2: ROLE OF TUMOR SUPPRESSOR GENES IN CHEMORESISTANCE OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA

### INTRODUCTION

The development of HCC is a complex process that usually occurs in the context of chronic liver disease and is related to the various etiologies of the underlying hepatic condition (10,11). The ongoing inflammation, injury, repair, and aberrant regeneration of hepatocytes contribute to the development of genetic and epigenetic alterations resulting in the formation of low-grade dysplastic nodules. These can progress to high-grade dysplastic nodules and, subsequently, develop into HCC through additional molecular alterations conferring proliferative, invasive, and survival advantages to dysplastic cells (12). The inactivation of TSGs due to genetic and/or epigenetic changes is one of the molecular alterations involved in hepatocarcinogenesis and disease progression. Several studies have shown a relationship between alterations in tumor suppressor genes and the MDR phenotype in other types of cancer (13), but the role of many of these genes in the response to antitumor drugs currently used for HCC remains to be elucidated.

### METHODS

A literature review was conducted to identify the most frequently altered TSGs in HCC. Genomic data obtained from the TCGA-LIHC cohort were used to analyze the presence of mutations and/or expression of the selected genes in tumor samples and correlate with survival data using the Kaplan-Meier survival curves and the log-rank test. CRISPR/Cas9-mediated gene editing was used to inactivate each selected TSG in HCC cell lines. For this, HCC cells were co-transfected with a plasmid containing a guide sequence targeting the TSG, and another containing the ORF of human codon-optimized Cas9 from *Streptococcus pyogenes*. Puromycin was used to enrich the transfected cell population. The efficacy of CRISPR-Cas9-mediated DNA cleavage was evaluated with the GeneArt Genomic Cleavage Detection kit. A monoclonal population was generated by a process of clonal selection. The genomic mutations of the TGS induced by CRISPR-Cas9 were characterized by Sanger sequencing, and the absence of protein expression in the monoclonal populations was verified by Western blot. The functional impact of the generated alterations was evaluated by the analysis of gene expression of each TSG by RT-qPCR. The sensitivity of the *in vitro* models to antitumor drugs was determined by measuring cell viability by MTT test. Expression levels of 94 genes involved in different

MOCs were determined by TLDA. Wound healing assay was performed to analyze cell migration. Cell proliferation was assessed by the sulforhodamine B test, and the ability to form colonies was evaluated by crystal violet staining after 10-15 days from seeding.

### CHAPTER III: eIF4A AS A THERAPEUTIC TARGET IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

#### INTRODUCTION

Dysregulation of protein synthesis is a phenomenon frequently occurring in various types of cancer and has been linked to tumor growth and progression by selectively enhancing the synthesis of proteins involved in cell proliferation, activation of invasion, and metastasis, and in other neoplastic characteristics-related processes (14). Translation initiation is the rate-limiting step in protein synthesis and is regulated by multiple eukaryotic initiation factors (eIFs) (15,16). The eIF4F complex, which includes the eIF4E, eIF4G, and eIF4A factors, is essential for cap-dependent ribosome recruitment and translation initiation. eIF4A, the only component of the eIF4F complex with enzymatic activity, is an ATP-dependent DEAD-box RNA helicase that unwinds mRNA secondary structures in the 5'-UTRs to allow ribosome scanning. The helicase eIF4A is required for the efficient translation of mRNAs with long and highly structured 5'-UTRs (17). These complex structures have been found in the 5'-UTRs of many oncogenes, including *KRAS*, *BLC2*, *NOTCH1*, *CDK6*, and *CCND1*, and are therefore considered eIF4A-dependent genes (18,19).

There are two isoforms of eIF4A involved in mRNA translation, eIF4A1 and eIF4A2, which share ~90% amino acid sequence identity (20). Despite their similarity, eIF4A1 is essential for cell viability but not eIF4A2, which cannot compensate for all the functions of eIF4A1, indicating that the two isoforms have distinct biological properties (21,22).

The eIF4A characteristics make it an interesting drug target for antitumor therapy. Rocaglates, also known as flavaglines, are a group of naturally occurring small molecules with a common cyclopenta[b]benzofuran core. These compounds suppress cap-dependent translation by inhibiting eIF4A activity and exhibit potent antitumor effects (23). Specifically, they stabilize the nonspecific binding of eIF4A to RNA, thereby preventing its incorporation into the eIF4F complex (24,25), and have been shown to inhibit both eIF4A isoforms (26). More than one hundred natural rocaglates have been isolated from *Aglaia* species, such as rocaglamide and silvestrol. Nevertheless, numerous synthetic derivatives have also been developed to improve their potency and

bioavailability, such as the inhibitors FL3, zotatifin, and CR-1-31-B, among others (27,28).

In the context of a collaboration with Dr. Diego Calvisi during a three-month stay at the University of Regensburg (Germany) in my predoctoral period, we aimed to investigate the antitumor effect of eIF4A inhibitors in HCC-derived cell lines and evaluate their usefulness as a pharmacological strategy against this type of tumor.

## METHODS

The *in silico* study of *EIF4A1* and *EIF4A2* expression using the transcriptomic data from the TCGA-LIHC cohort was performed using the UALCAN analysis tool (29). Protein levels of HCC samples and adjacent non-tumor samples were measured by Western blot. Fluorescent staining of total proteins and an internal loading standard were used for protein normalization by the Smart Protein Layers kit. The expression levels of *EIF4A1* and *EIF4A2* genes and their corresponding proteins were analyzed in HCC cell lines by RT-qPCR and Western blot, respectively. Cell viability after incubation with eIF4A inhibitors for 48 h was determined using the MTT test. Cell cycle was analyzed by flow cytometry using propidium iodide DNA staining. Apoptosis was determined by flow cytometry using the Annexin V/7-Aminoactinomycin D (7-AAD) kit. Expression levels of 94 genes involved in different MOCs were measured by TLDA. Synergy studies were performed by determining cell viability by the sulforhodamine B test after exposure of cells for 48 h to drug combinations at different concentrations, starting from 0 to the  $IC_{50}$  of each drug. The results were analyzed using the online tool Synergy Finder (30) and the zero interaction potency (ZIP) model was used to distinguish the type of drug-drug interaction and quantify the magnitude of antagonistic and synergistic effects (31).

## CONCLUSIONS

### FIRST CONCLUSION:

The *in silico* analysis of the heterogeneity in the gene expression signature of HCC chemoresistance has identified two groups of patients with different expression profiles. This molecular signature, consisting of 59 genes, involved in several mechanisms of chemoresistance (MOC) and malignancy, is an independent prognostic factor.

### SECOND CONCLUSION:

The expression analysis of 31 MOC genes using TaqMan low-density arrays has allowed us to classify in HCC patients into two groups with a similar expression pattern to those identified in the *in silico* study. Nevertheless, it would be advisable to incorporate a higher number of MOC genes into this tool. This analysis provides the basis for further studies aimed at relating the chemoresistance gene signature with the response to the treatment of HCC patients to implement the use of this tool in clinical practice.

### THIRD CONCLUSION:

The *in silico* study carried out with the genomic data from the TCGA cohort of HCC patients has confirmed that the tumor suppressor genes *TP53*, *ARID1A*, *PTEN*, and *CDH1* are frequently altered in HCC, either by a reduction in their expression or by the presence of somatic mutations altering their function. In addition, mutations in *TP53* and *ARID1A* or the low *PTEN* and *CDH1* expression are associated with a worse prognosis of HCC patients.

### FOURTH CONCLUSION:

Using CRISPR/Cas9 technology, *in vitro* knockout models of the tumor suppressors p53, ARID1A, PTEN, and E-cadherin in HCC cell lines have been developed to evaluate the impact of the loss of function of these proteins on the response to antitumor drugs and on the malignancy phenotype.

### FIFTH CONCLUSION:

Loss of p53 function in HCC cells enhances their malignancy characteristics, increases their resistance to classical chemotherapeutic agents, and affects their response to some tyrosine kinase inhibitors. Loss of function of ARID1A, PTEN, and E-cadherin

does not contribute significantly to the response to the evaluated antitumor agents and to the malignancy phenotype in the tested cell models.

**SIXTH CONCLUSION:**

Expression of the translation initiation factors eIF4A1 and eIF4A2 is increased in HCC. High levels of the eIF4A1 isoform are associated with worse prognosis of HCC patients, demonstrating the interest of this protein as a potential pharmacological target for the treatment of this tumor.

**SEVENTH CONCLUSION:**

eIF4A inhibitors exhibit potent antiproliferative activity and a cytotoxic effect *in vitro* by inducing apoptosis in HCC cell lines. The synergistic effect of the combination of these compounds with other antitumor agents, such as SN-38, represents a new therapeutic approach for the treatment of HCC and provides the basis for the exploration of new and more effective combinations of eIF4A inhibitors with other antitumor agents to overcome HCC chemoresistance.

## REFERENCES

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
2. Villanueva A. Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med.* 2019;380(15):1450–1462.
3. Marin JJG, Briz O, Herraes E, Lozano E, Asensio M, Di Giacomo S, et al. Molecular bases of the poor response of liver cancer to chemotherapy. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2018 Mar;42(3):182–92.
4. Marin JJG, Macias RIR, Monte MJ, Romero MR, Asensio M, Sanchez-martin A, et al. Molecular Bases of Drug Resistance in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel).* 2020;12(6):1663.
5. Martinez-Becerra P, Vaquero J, Romero MR, Lozano E, Anadon C, Macias RIR, et al. No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors. *Mol Pharm.* 2012;9(6):1693–704.
6. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. R Found Stat Comput Vienna, Austria. 2022;
7. Colaprico A, Silva TC, Olsen C, Garofano L, Cava C, Garolini D, et al. TCGAbiolinks: An R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(8):e71.
8. Morgan M, Obenchain V, Hester J, Pagès H. SummarizedExperiment: SummarizedExperiment container. R Packag version 1280. 2022;
9. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer OS, Sumer SO, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012;2(5):401–404.
10. Schulze K, Imbeaud S, Letouzé E, Ludmil B, Ligue EL, Alexandrov LB, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet.* 2015;47(5):505–11.
11. Schulze K, Nault J, Villanueva A. Genetic profiling of hepatocellular carcinoma using next-generation sequencing. *J Hepatol.* 2016;65(5):1031–42.
12. Marquardt JU, Andersen JB, Thorgeirsson SS. Functional and genetic deconstruction of the cellular origin in liver cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015;15:653–67.
13. Lai D, Visser-Grieve S, Yang X. Tumour suppressor genes in chemotherapeutic drug response. *Biosci Rep.* 2012;32(4):361–74.
14. Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ. Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(4):254–66.
15. Sonenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell.* 2009;136(4):731–45.
16. Hinnebusch AG. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annu Rev Biochem.* 2014;83:779–812.
17. Wolfe AL, Singh K, Zhong Y, Drewe P, Rajasekhar VK, Sanghvi VR, et al. RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer. *Nature.* 2014;513(7516):65–70.
18. Singh K, Lin J, Lecomte N, Mohan P, Gokce A, Viraj R, et al. Targeting eIF4A Dependent Translation of KRAS Signaling Molecules. *Cancer Res.* 2021;81(8):2002–14.
19. Rubio CA, Weisburd B, Holderfield M, Arias C, Fang E, DeRisi JL, et al. Transcriptome-wide characterization of the eIF4A signature highlights plasticity in translation regulation. *Genome Biol.* 2014;15(10):476.

20. Li Q, Imataka H, Morino S, Rogers GW, Richter-Cook NJ, Merrick WC, et al. Eukaryotic Translation Initiation Factor 4AIII (eIF4AIII) Is Functionally Distinct from eIF4AI and eIF4AII. *Mol Cell Biol*. 1999;19(11):7336–46.
21. Lu WT, Wilczynska A, Smith E, Bushell M. The diverse roles of the eIF4A family: You are the company you keep. *Biochem Soc Trans*. 2014;42(1):166–72.
22. Galicia-Vázquez G, Cencic R, Robert F, Agenor AQ, Pelletier J. A cellular response linking eIF4AI activity to eIF4AII transcription. *RNA*. 2012;18(7):1373–84.
23. Potential of Cyclopenta[b]benzofurans from Aglaia Species in Cancer Chemotherapy Kim S, Salim A, Swanson S, Douglas Kinghorn A. Potential of cyclopenta[b]benzofurans from Aglaia species in cancer chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem*. 2006;6(4):319–45.
24. Iwasaki S, Floor SN, Ingolia NT. Rocaglates convert DEAD-box protein eIF4A into a sequence-selective translational repressor. *Nature*. 2016;534(7608):556–61.
25. Cencic R, Carrier M, Galicia-Vázquez G, Bordeleau ME, Sukarieh R, Bourdeau A, et al. Antitumor activity and mechanism of action of the cyclopenta[b]benzofuran, silvestrol. *PLoS One*. 2009;4(4):e5223.
26. Chu J, Zhang W, Cencic R, Devine WG, Beglov D, Henkel T, et al. Amidino-Rocaglates – A potent class of eIF4A inhibitors. *Cell Chem Biol*. 2019;26(11):1586–93.
27. Pan L, Woodard JL, Lucas DM, Fuchs JR, Kinghorn AD. Rocaglamide, silvestrol and structurally related bioactive compounds from Aglaia species. *Nat Prod Rep*. 2014;31(7):924–39.
28. Ebada SS, Lajkiewicz N, Porco JR JA, Li-Weber M, Proksch P. Chemistry and biology of rocaglamides (= flavaglines) and related derivatives from aglaia species (meliaceae). Vol. 94, *Progress in the chemistry of organic natural products*. 2011. 1–58 p.
29. Chandrashekar DS, Karthikeyan SK, Korla PK, Patel H, Shovon AR, Athar M, et al. UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia*. 2022;25:18–27.
30. Ianevski A, Giri AK, Aittokallio T. SynergyFinder 3.0: an interactive analysis and consensus interpretation of multi-drug synergies across multiple samples. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(W1):W739–43.
31. Yadav B, Wennerberg K, Aittokallio T, Tang J. Searching for Drug Synergy in Complex Dose-Response Landscapes Using an Interaction Potency Model. *Comput Struct Biotechnol J*. 2015;13:504–13.