

VNIVERSIDAD D SALAMANCA

Departamento de Fisiología y Farmacología



TESIS DOCTORAL

Desarrollo y evaluación en modelos experimentales de colangiocarcinoma de herramientas de ingeniería genética para el marcaje y quimiosensibilización tumoral

Paula Sanchón Sánchez

2023

VNiVERSiDAD D SALAMANCA

Departamento de Fisiología y Farmacología



TESIS DOCTORAL

Desarrollo y evaluación en modelos experimentales de colangiocarcinoma de herramientas de ingeniería genética para el marcaje y quimiosensibilización tumoral

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

Salamanca, 8 de febrero de 2023

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

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "Desarrollo y evaluación en modelos experimentales de colangiocarcinoma de herramientas de ingeniería genética para el marcaje y quimiosensibilización tumoral" presentada por Dña. Paula Sanchón Sánchez para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. D. José Juan García Marín, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología, la Dra. D^a. Elisa Lozano Esteban, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Fisiología y Farmacología y el Dr. D. Oscar 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 día 8 de febrero de 2023.

Fdo.: José Juan García Marín

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

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "Desarrollo y evaluación en modelos experimentales de colangiocarcinoma de herramientas de ingeniería genética para el marcaje y quimiosensibilización tumoral" presentada por Dña. Paula Sanchón Sánchez para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. D. José Juan García Marín, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología, la Dra. D^a. Elisa Lozano Esteban, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Fisiología y Farmacología y el Dr. D. Oscar 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 día 8 de febrero de 2023.

Fdo.: María Jesús Monte Río

D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA, D^a. ELISA LOZANO ESTEBAN, PROFESORA CONTRATADA DOCTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA, Y D. OSCAR BRIZ SÁNCHEZ, PROFESOR CONTRATADO DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada "Desarrollo y evaluación en modelos experimentales de colangiocarcinoma de herramientas de ingeniería genética para el marcaje y quimiosensibilización tumoral" presentada por Dña. Paula Sanchón Sánchez para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección conjunta en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día 8 de febrero de 2023.

Fdo.: José Juan García Marín

Fdo.: Elisa Lozano Esteban

Fdo.: Oscar Briz Sánchez

FINANCIACIÓN

La doctoranda ha disfrutado durante la realización de esta Tesis Doctoral de un contrato de investigación para la Formación de Profesorado Universitario (FPU), del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Convocatoria 2017. (FPU17/02822; BOE-B-2017-72875), una ayuda complementaria de movilidad para estancias breves destinada a beneficiarios FPU (EST19/00448; BOE-B-2020-47021) y una beca del programa *Short Term Scientific Mission (STSM)* dentro de la acción europea COST (*Euro-Cholangio-Net COST action-18122*) (ECOST-STSM-Request-CA18122-48577) en *Institute of Cancer Sciences* en la Universidad de Glasgow (Reino Unido).

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

Comisión Europea. *IMI2 Actions. Translational Safety Biomarker Pipeline* (TransBioLine): “*Enabling development and implementation of novel safety biomarkers in clinical trials and diagnosis of disease*”. Investigador principal: José Juan García Marín. Periodo: 2019-2024.

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

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.

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

Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III. Proyectos de Investigación en Salud (AES 2019) Modalidad proyectos en salud cofinanciados con Fondos FEDER. Proyecto PI19/00189 “Identificación de biomarcadores diagnóstico y pronóstico en pacientes con cáncer biliar”. Investigador Principal: Rocío I Rodríguez Macías. Periodo: 2021-2023.

Universidad de Salamanca. Programa I para la financiación de grupos de Investigación. Proyectos de investigación. Modalidad C2. “Utilidad de la detección de la proteína de membrana NTCP en vesículas extracelulares como biomarcador sérico para el diagnóstico y el pronóstico del carcinoma hepatocelular”. Investigador Principal: Elisa Lozano Esteban.

Convocatoria proyectos de investigación intramurales del CIBERehd 2022. “Identificación de dianas moleculares para terapias innovadoras del hepatoblastoma”. Investigador Principal de la Universidad de Salamanca: Elisa Lozano Esteban.

Fundación Universidad de Salamanca. PLAN TCUE 2021-2023. Prueba de concepto. “Prueba de concepto de la utilidad de proteínas ABC en medicina personalizada en cáncer biliar”. Investigador Principal: Rocío I Rodríguez Macías.

PUBLICACIONES

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha contribuido a las siguientes publicaciones científicas:

Alonso-Peña, M., Sanchez-Martin, A., **Sanchon-Sanchez, P.**, Soto-Muñiz, M., Espinosa-Escudero, R., & Marin, J. (2019). Pharmacogenetics of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Cancer drug resistance (Alhambra, Calif.)*, 2(3), 680–709. <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.006>

Alonso-Peña, M., Espinosa-Escudero, R. A., Soto-Muñiz, M., **Sanchon-Sanchez, P.**, Sanchez-Martin, A., & Marin, J. J. (2019). Role of transportome in the pharmacogenomics of hepatocellular carcinoma and hepatobiliary cancer. *Pharmacogenomics*, 20(13), 957–970. <https://doi.org/10.2217/pgs-2019-0033>

Marin, J., Perez-Silva, L., Macias, R., Asensio, M., Peleteiro-Vigil, A., Sanchez-Martin, A., Cives-Losada, C., **Sanchon-Sanchez, P.**, Sanchez De Blas, B., Herraez, E., Briz, O., & Lozano, E. (2020). Molecular Bases of Mechanisms Accounting for Drug Resistance in Gastric Adenocarcinoma. *Cancers*, 12(8), 2116. <https://doi.org/10.3390/cancers12082116>

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

Marin, J., **Sanchon-Sanchez, P.**, Cives-Losada, C., Del Carmen, S., González-Santiago, J. M., Monte, M. J., & Macias, R. (2021). Novel Pharmacological Options in the Treatment of Cholangiocarcinoma: Mechanisms of Resistance. *Cancers*, 13(10), 2358. <https://doi.org/10.3390/cancers13102358>

Casolino, R., Amato, F., Rae, C., Puttagunta, S., Braconi, C., & **Collaborators*** (2022). Receptor tyrosine kinase co-amplification and benefit from HER2 inhibitors in biliary tract cancers. *Journal of hepatology*, 76(5), 1227–1229. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.01.012> *Collaborators: Nash, T., MacLeod,

M., **Sanchon-Sanchez, P.**, Roxburgh, P., Evans, J., Graham, J., Duthie, F., Valeri, N., Herzyj, P., Galbraith, J.

Espinosa-Escudero R, Herraes E, Sanchez-Martin A, **Sanchon-Sanchez P**, Marin JJG, Monte MJ. Cholestasis associated to inborn errors in bile acid synthesis. *Explor Dig Dis.* 2022; 1:137–53. <https://doi.org/10.37349/edd.2022.00010>.

COMUNICACIONES

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos o jornadas científicas, publicándose en el libro de resúmenes tras su presentación:

Sanchon-Sanchez, P., Briz, O., R. Macias, R. I., Lozano, E., G. Marin, J.J. Papel de la disfunción de *TP53* en la quimiorresistencia del colangiocarcinoma. 44º Congreso de la SEBBM. Málaga, España. 2022. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Tipo de comunicación: póster.

Sanchon-Sanchez, P., Briz, O., R. Macias, R. I., Lozano, E., G. Marin, J.J. Papel de la disfunción de *TP53* en la quimiorresistencia del colangiocarcinoma. XVI Jornadas Científicas CIBER Enfermedades Hepáticas y Digestivas. Barcelona, España. 2022. CIBER Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd). Tipo de comunicación: póster.

Sanchon-Sanchez, P., Briz, O., R. Macias, R. I., Lozano, E., Reviejo, M., Ortiz-Rivero, S., Herraiz, E., R. Macias, R. I., G. Marin, J.J. *Role of p53 dysfunction in cholangiocarcinoma chemoresistance. 4th Meeting of translational hepatology.* Santiago de Compostela, España. 2022. Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). Tipo de comunicación: póster.

Sanchon-Sanchez, P., Lozano, E., Briz, O., R. Macias, R. I., Reviejo, M., Ortiz-Rivero, S., Serrano, M.A., Marin, J.J.G. Impacto de la disfunción de p53 en la quimiorresistencia del colangiocarcinoma. IX Jornadas de Investigadoras de Castilla y León. Salamanca, España. 2023. Universidad de Salamanca, Universidad de Burgos, Universidad de León y Universidad de Valladolid. Tipo de comunicación: póster.

Sanchon-Sanchez, P., Lozano, E., Briz, O., R. Macias, R. I., Reviejo, M., Ortiz-Rivero, S., Serrano, M.A., Marin, J.J.G. Impacto de la disfunción de p53 en la quimiorresistencia del colangiocarcinoma. 48º Congreso Anual AEEH. Madrid, España. 2023. Asociación Española para el Estudio del Hígado. Tipo de comunicación: póster.

La doctoranda también ha participado en otros proyectos de los que se han derivado las siguientes participaciones en congresos nacionales e internacionales:

Herraez, E., R. Romero, M. Monte, M. J., R. Macias, R. I., **Sanchon-Sanchez, P.**, Espinosa-Escudero, R.A., Pérez, M. J., Serrano, M. A., G. Marín, J. J. Impaired expression in liver and placenta of key genes involved in progesterone metabolism during cholestasis of pregnancy. 41º Congreso de la SEBBM. Santander, España. 2018. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Tipo de comunicación: póster.

Herraez, E., R. Romero, M. Monte, M. J., R. Macias, R. I., **Sanchon-Sanchez, P.**, Espinosa-Escudero, R.A., Pérez, M. J., Serrano, M. A., G. Marín, J. J. *Impaired expression in liver and placenta of key genes involved in progesterone metabolism during cholestasis of pregnancy.* XXXIX Congreso de la SECF. Cádiz, España. 2018. Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas. Tipo de comunicación: póster.

Sanchon-Sanchez, P., R. Romero, M., Herraez, E., Macias, R. I., Asensio, M., Cives-Losada, C., Sanchez de Blas, B., G. Temprano, A., Monte, M. J., G. Marín, J. J. *Role of Akr1c2 and Srd5a1 hydroxysteroid dehydrogenase in altered progesterone metabolism during intrahepatic colestasis of pregnancy.* 42nd Congreso de la SEBBM. Madrid, España. 2019. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Tipo de comunicación: oral.

Sanchón-Sánchez, P., R. Romero, M., Herraez, E., G. Temprano, A., Macias, R.I., Monte, M. J., G. Marín, J. J. Papel de las enzimas SRD5A1 y AKR1C2 en las alteraciones del metabolismo de la progesterona durante la colestasis intrahepática gestacional. 1ª Reunión de Hepatología Traslacional. Status Quo y nuevos horizontes en el estudio del hígado. San Sebastián, España. 2019. Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). Tipo de comunicación: oral y póster.

Lozano, E., Asensio, M., Pérez-Silva, L., **Sanchon-Sanchez, P.**, Reviejo, M., Serrano, M. A., Bañales, J. M., Briz, O., Marín, J. J. G. *MRP3-mediated chemoresistance in cholangiocarcinoma: Target for chemosensitization through restoring SOX17 expression.* XIV Jornadas Científicas CIBERehd. Online. 2020. CIBER Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd). Tipo de comunicación: póster.

Amato, F., Rae, C., Casolino, R., **Sanchon-Sanchez, P.**, Vita, F., Prete, M. G., Nash, T., McLeod, M., Crawford, D., Leonard, A., Herzyk, P., Galbraith, J., Braconi, C. *Liquid Biopsy in biliary tract cancer patients undergoing first line combination chemotherapy. AMMF's Hybrid European Cholangiocarcinoma Conference 2022.* Reino Unido. 2022. AMMF – The UK's only Cholangiocarcinoma Charity. Tipo de comunicación: póster.

Amato, F., Vita, F., Rae, C., Sanchon-Sanchez, P., Marco Martin, S., McGarry, L., McLeod, M., Crawford, D., Casolino, R., Braconi, C. *Patient-derived myeloid cells can drive chemoresistance in biliary tract cancer. ENS-CCA Edinburgh 2022 & CA18122 COST Action meeting.* Edimburgo, Reino Unido. 2022. European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA).

Amato, F., Rae, C., Casolino, R., Vita, F., **Sanchon-Sanchez, P.**, McGarry, L., McLeod, M., Crawford, D., Casolino, R., Braconi, C. *Patients' derived myeloid cells can drive chemoresistance in biliary tract cancer. 16th ILCA Annual Conference 2022.* Madrid, España. 2022. The International Liver Cancer Association (ILCA). Tipo de comunicación: póster.

ABREVIATURAS

5-FU: 5-fluorouracilo

AAV: virus adenoasociados

Ad: adenovirus

ADNc: ADN complementario

ADNdc: ADN cadena doble

ADNsc: ADN cadena sencilla

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*

ANOVA: Análisis de varianza

ARNlnc: *ARN long non-coding*

ARNsc: ARN cadena sencilla

BIRC5: *Baculoviral IAP repeat containing 5*

BSA: albúmina sérica bovina

CAR-T: *Chimeric antigen receptor T-cell*, células T con receptores quiméricos para antígenos

CCA: colangiocarcinoma

CMV: Citomegalovirus

CNV: variaciones en el número de copias

COSMIC: *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*

CRC: carcinoma colorrectal

CTD: dominio C-terminal

D: cebador directo

DBD: dominio de unión al ADN

dCCA: colangiocarcinoma distal

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

DOX: doxiciclina.

DVL: proteína Dishevelled

eCCA: colangiocarcinoma extrahepático

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EF1 α : *Human elongation factor-1 alpha*

EGFP: *Enhanced Green Fluorescence Protein*, proteína fluorescente verde mejorada

EMT: transición del fenotipo epitelial al mesenquimal

FBS: suero bovino fetal, *fetal bovine serum*

FISH: hibridación *in situ* fluorescente

FOLFIRINOX: 5-FU, irinotecan y oxaliplatino.

FOLFOX: ácido folínico, 5-FU y oxaliplatino

FZD: receptores Frizzled

GAPDH: *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GSK3 β : *Glycogen synthase kinase 3 beta*

GEMOX: gemcitabina y oxaliplatino

HCC: carcinoma hepatocelular

HPRT1: *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*

I: virus cuyo genoma se integra en la célula huésped

IC₅₀: concentración de inhibición de la mediana

iCCA: colangiocarcinoma intrahepático

IGEC: *Inducible Gene Expression Cassette*

IHQ: inmunohistoquímica

IL-6: interleucina 6

IRES: *Internal ribosome entry site*

iRFP: proteína fluorescente infrarroja

ITR: *Inverted terminal repeats*, repeticiones terminales invertida

LEF: factor potenciador linfático

LRP5/6: *Low density lipoprotein receptor-related proteins 5 and 6*

MCS: *multiple cloning site*, sitio de clonación múltiple

MDR: *multiple drug resistance*, fenotipo de resistencia a múltiples fármacos

MEM: *Minimum Essential Medium Eagle*

miARN: micro-ARN

MOC: mecanismo de quimiorresistencia

MOI: *multiplicity of infection*, multiplicidad de infección

NAFLD: enfermedad del hígado graso no alcohólico

N.D.: no determinado

NI: virus cuyo genoma no se integra en la célula huésped

NLS: señal de localización nuclear

NT: no tumoral

OD: dominio de oligomerización

ORF: *open reading frame*

PBS: *Phosphate buffered saline*, tampón fosfato salino

pCCA: colangiocarcinoma perihiliar

PEI: polietilenimina

Poli(A): secuencia de poliadenilación

pr: promotor

PRD: dominio rico en prolina

PSC: colangitis esclerosante primaria

PSI: *percent spliced-in*

R: cebador reverso

RQ: índice de cambio relativo

RT-qPCR: Quantitative reverse transcription PCR

rtTA: transactivador reverso controlado por tetraciclina

S.D. desviación estándar.

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SNP: *Single-nucleotide polymorphism*, cambios de un único nucleótido

T: tumoral

TAD: dominio de transactivación

TALLEN: nucleasas efector TAL

TBS: solución salina tamponada con Tris

TCF: factor de células T

TCGA: *The Cancer Genome Atlas*

TetO: operador tet

TetR: proteína represora de Tet

TKI: inhibidor de tirosina quinasas

TLDA: *Taqman low density arrays*

TP53: *Tumor Protein 53*

TRE: elemento de respuesta a tetraciclina.

tTA: proteína transactivadora de tetraciclina

UAF: unidades arbitrarias de fluorescencia

UTR: *untranslated region.*

WT: *Wild type*, silvestre

XELOX: capecitabina y oxaliplatino

ZFN: nucleasas de dedos de zinc

ÍNDICE

1. OBJETIVOS	7
2. INTRODUCCIÓN	11
2.1. CÁNCER HEPÁTICO	13
2.1.1. Colangiocarcinoma (CCA).....	15
2.1.1.1. Características anatómicas.....	15
2.1.1.2. Factores de riesgo.....	17
2.1.1.3. Características clínicas.....	18
2.1.1.4. Diagnóstico.....	18
2.1.1.5. Estadificación.....	19
2.1.1.6. Pronóstico.....	19
2.1.1.7. Tratamiento.....	20
2.2. MECANISMOS DE QUIMIORRESISTENCIA EN EL CCA	23
2.2.1. Cambios en el transporte de fármacos (MOC-1).....	24
2.2.2. Metabolismo de fármacos (MOC-2).....	25
2.2.3. Dianas moleculares de fármacos (MOC-3).....	26
2.2.4. Mecanismos de reparación del ADN (MOC-4).....	26
2.2.5. Desregulación de vías de supervivencia y apoptosis (MOC-5).....	26
2.2.6. Microambiente tumoral (MOC-6).....	27
2.2.7. Cambios fenotípicos (MOC-7).....	28
2.3. ESTRATEGIAS DE SENSIBILIZACIÓN	29
2.3.1. Herramientas de edición génica.....	29
2.3.1.1. Herramientas vectorizadas.....	30

Vectores virales	30
2.3.1.2. Herramientas inducibles	32
Sistemas regulados por tetraciclinas.....	33
2.3.2. Alteraciones moleculares en el CCA.....	35
2.3.2.1. Vía de señalización WNT/ β -catenina	36
Vía canónica	36
WNT/ β -catenina en células hepáticas	38
2.3.2.2. <i>TP53</i>	40
Generalidades	40
Mutaciones de p53 y CCA.....	42
3. MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	51
3.1.1. Muestras humanas	51
3.1.2. Modelos animales	52
3.1.3. Líneas celulares	53
3.1.4. Bacterias.....	54
3.2. PRODUCTOS.....	54
3.2.1. Soluciones comunes utilizadas en varias técnicas	58
3.3. MEDIOS INSTRUMENTALES	59
3.4. TÉCNICAS DE CLONACIÓN.....	61
3.4.1. Obtención de la construcción molde IGEC.....	61
3.4.2. Procedimiento general	62
3.4.3. Digestión de la ORF del transgén y del plásmido pUC19-IGEC receptor.....	63
3.4.4. Ligación de la ORF del transgén y del plásmido pUC19-IGEC receptor ..	64

3.4.5. Digestión de la construcción IGEC-transgén y del plásmido lentiviral pWPI-pL.....	64
3.4.6. Ligación de las construcciones del transgén y del plásmido lentiviral pWPI-pL.....	65
3.4.7. Obtención de construcciones con expresión constitutiva del gen.....	65
3.5. CULTIVO DE BACTERIAS.....	65
3.5.1. Transformación de bacterias por choque térmico	66
3.5.2. Selección de colonias y crecimiento en medio líquido	66
3.5.3. Purificación del ADN plasmídico de cultivos de bacterias	66
3.5.4. Estudio de restricción.....	67
3.6. PRODUCCIÓN DE VECTORES VIRALES.....	67
3.6.1. Fundamento	67
3.6.2. Producción y purificación de vectores lentivirales portadores de la construcción IGEC-transgén.....	67
3.6.3. Titrado de lentivirus por citometría de flujo	69
3.6.4. Transducción de células	69
3.7. ESTUDIOS FUNCIONALES <i>IN VITRO</i>	70
3.7.1. Estudios de proliferación celular.....	71
3.7.2. Estudios de muerte celular	72
3.7.3. Estudios de viabilidad celular	72
3.7.4. Determinación de la viabilidad celular.....	72
3.8. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	73
3.8.1. Visualización de la fluorescencia	73
3.9. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ARNm POR RT-qPCR	74
3.9.1. Extracción y cuantificación de ARN total.....	74

3.9.2. Retrotranscripción (RT)	74
3.9.3. Diseño de cebadores	75
3.9.4. Amplificación cuantitativa (qPCR).....	76
3.9.5. Tarjetas microfluídicas (TLDA)	76
3.9.6. Análisis de los resultados: Cuantificación Relativa.....	77
3.10. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	77
3.10.1. Obtención de homogeneizados de cultivos celulares.....	77
3.10.2. Determinación de proteínas totales	77
3.10.3. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) ...	78
3.10.4. Transferencia	78
3.10.5. Inmunodetección	78
3.10.6. Revelado	79
3.11. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)	79
3.12. MÉTODOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	80
3.12.1. PCR de alta fidelidad	80
3.12.2. Digestión con enzimas de restricción	80
3.12.3. Electroforesis en gel de agarosa no desnaturizante	81
3.12.4. Purificación del ADN	81
3.12.5. Secuenciación de ADN	81
3.13. RECUENTO DE CÉLULAS TRANSDUCIDAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	81
3.14. ESTUDIOS <i>IN SILICO</i> DE LOS GENES DE INTERÉS.....	82
3.15. ANÁLISIS Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	82

CAPÍTULO I. Desarrollo de una herramienta de expresión génica inducible para la visualización de tumores <i>in vivo</i>	85
4.1. RESULTADOS.....	87
CAPÍTULO II. Papel de proteínas inhibidoras de la vía WNT en la sensibilidad de células de CCA a fármacos antitumorales	89
5.1. RESULTADOS.....	91
CAPÍTULO III. Papel de p53 en la quimiosensibilización	93
6.1. RESULTADOS.....	95
7. CONCLUSIONES	97
8. BIBLIOGRAFÍA	101
9. ENGLISH SUMMARY	127

1. OBJETIVOS

El colangiocarcinoma (CCA), o cáncer del árbol biliar, es el segundo tipo más frecuente de tumores hepáticos primarios malignos, después del carcinoma hepatocelular. Este tumor hepático destaca por su agresividad, etiología compleja, diagnóstico tardío ante la falta de síntomas y signos específicos tempranos y las reducidas opciones terapéuticas. La curación solo es posible a través de la resección quirúrgica en estadios iniciales del tumor, pero ésta sucede pocas veces, debido al avanzado estado de la enfermedad en el momento de la detección. Por ello, en la mayoría de los casos, las opciones terapéuticas quedan reducidas a medidas paliativas como la quimioterapia o la radioterapia.

La combinación de los fármacos gemcitabina y cisplatino es el tratamiento de elección de primera línea. Sin embargo, su eficacia es muy reducida debido a la existencia o al desarrollo de complejos y variados mecanismos de resistencia a los fármacos antitumorales, lo que determina la urgente necesidad de buscar otras estrategias terapéuticas más efectivas.

El avance de las metodologías ómicas ha permitido identificar ciertas dianas moleculares que participan en el desarrollo del CCA. Entre ellas, se encuentra el gen *TP53*, uno de los más frecuentemente mutados en el CCA. Por otra parte, la alteración de vía de señalización WNT/ β -catenina, también parece jugar un papel de gran relevancia en la progresión del CCA, relacionándose la expresión aberrante de sus integrantes con una mayor malignidad.

Teniendo en cuenta este marco teórico, el **objetivo global** de la Tesis Doctoral fue el estudio y evaluación de dichas dianas moleculares sobre las que actuar para aumentar la sensibilidad del CCA a los fármacos antitumorales.

Este objetivo se puede dividir en cuatro objetivos parciales:

Objetivo 1: Evaluar la utilidad de la expresión forzada de los elementos GSK3 β , axina 1 y axina 2 del complejo de destrucción de β -catenina como potenciales dianas para la supresión de la hiperactividad de la vía WNT/ β -catenina y modulación de la quimiorresistencia en CCA.

Objetivo 2: Estudiar la implicación de la expresión forzada del supresor tumoral *TP53* en la modulación de la quimiorresistencia en modelos celulares de CCA.

Objetivo 3: Para llevar a cabo la expresión forzada de los genes de interés concernientes a los objetivos anteriores de forma inducible y gradual, se planteó el desarrollo de una herramienta basada en el sistema inducible de tetraciclinas y con especificidad tumoral.

Objetivo 4: Dada la potencial utilidad de la herramienta desarrollada en el objetivo anterior para la expresión inducible de transgenes de interés en células tumorales, se planteó como prueba de concepto, utilizarla con la proteína fluorescente infrarroja iRFP como herramienta para la visualización de tumores generados en ratones.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. CÁNCER HEPÁTICO

Hay tres tipos principales de cáncer hepático primario: el carcinoma hepatocelular (HCC), que tiene su origen en los hepatocitos y constituye el 85-90 % de los casos, seguido del colangiocarcinoma (CCA), cuyo origen son los colangiocitos y con una incidencia mucho menor, y afectando mayoritariamente a niños se encuentra el hepatoblastoma, derivado de los hepatoblastos. Estos tumores primarios se asocian a hepatopatías subyacentes como la cirrosis y la hepatitis crónica y se caracterizan por presentar un diagnóstico tardío, en etapas avanzadas. Por otra parte, dentro del concepto de cáncer de hígado también se incluyen neoplasias metastásicas, que son más frecuentes que los propios tumores primarios; como por ejemplo las procedentes del cáncer de colon, incrementando así la incidencia global de este grupo de enfermedades hepáticas (Porth, 2007).

El HCC fue el sexto con mayor incidencia mundial en el año 2020 (4,7 %) para todas las edades y teniendo en cuenta los dos sexos, solo superado por el cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal (CRC), cáncer de próstata y cáncer de estómago (Figura I-1A, B). Sin embargo, para la misma población, la tasa de mortalidad fue mayor, ocupando la tercera posición (8,3 % de muertes por cáncer) por detrás solo del cáncer de pulmón y CRC (Figura I-1C) (Ferlay et al., 2021; Sung et al., 2021).

En Europa, las tasas de incidencia y mortalidad se mantienen similares a las tasas a nivel mundial para hombres y mujeres de todas las edades: 4,2 % y 7,6 %, respectivamente. Sin embargo, presentan una estratificación de géneros, con una mayor incidencia (6,8 %, quinta posición) y mortalidad (10,5 %, segunda posición) en hombres; mientras que en mujeres no aparece entre los más incidentes, pero sí representa la sexta causa de mortalidad por cáncer (5,7 %) (Figura I-2) (Ferlay et al., 2021; Sung et al., 2021).

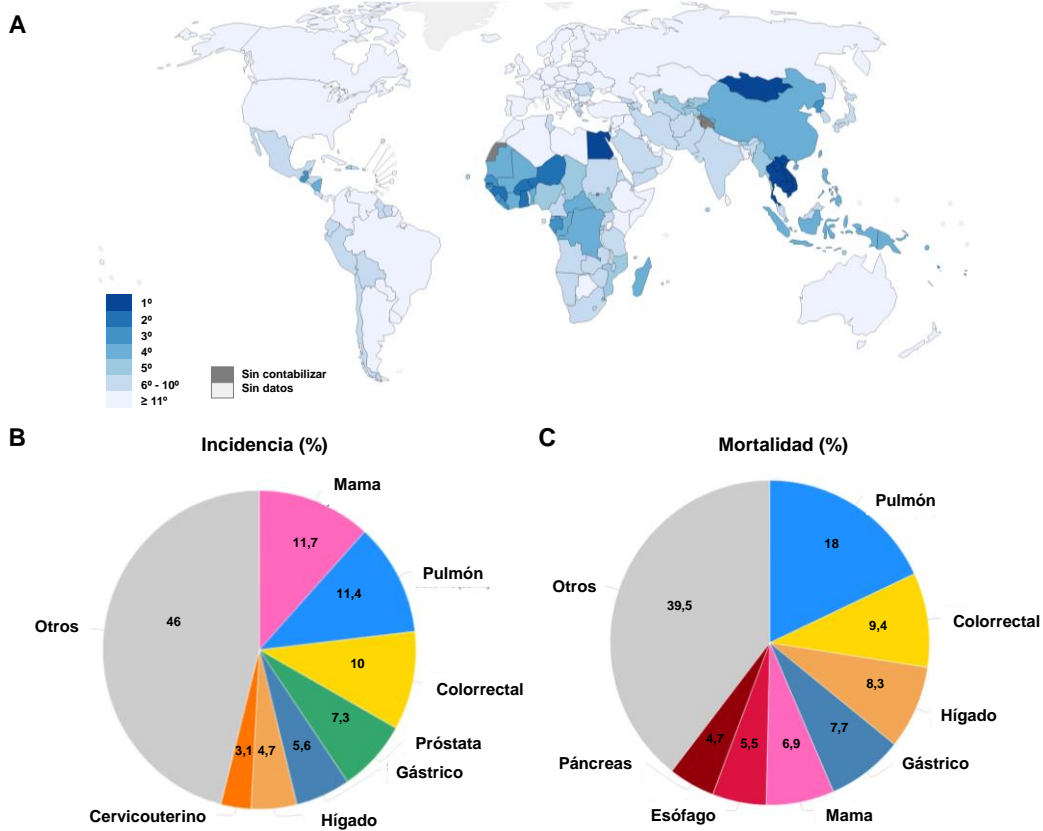


Figura I-1. (A) Mapa representativo de la incidencia estimada de tumores hepáticos en 2020. Tasas de (B) incidencia y (C) mortalidad en 2020 del cáncer en el mundo para ambos sexos y todas las edades. Datos teniendo en cuenta hombres y mujeres y todos los grupos de edad. Figura modificada de *GLOBOCAN 2020/IARC*. Organización Mundial de la Salud.

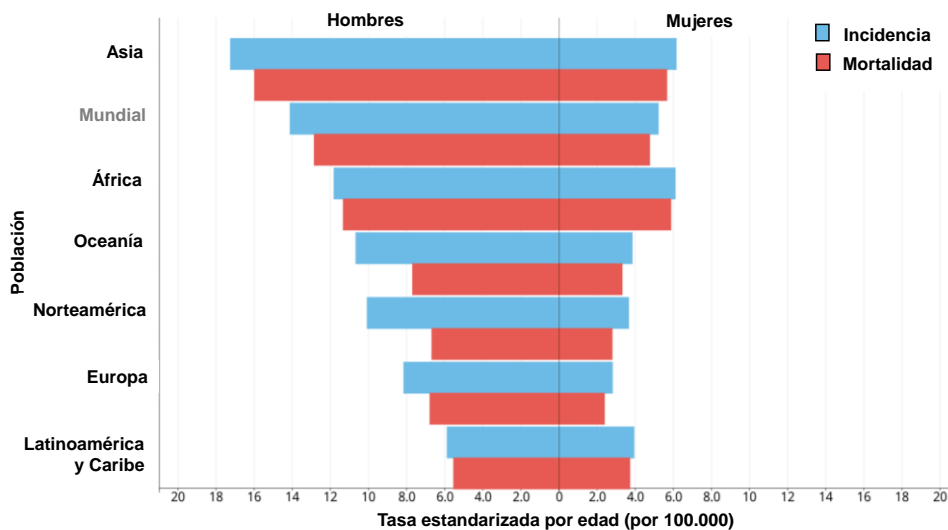


Figura I-2. Tasa de incidencia y mortalidad mundial (estandarizada por edad, por 100.000 personas-año) de tumores hepáticos en 2020 según el sexo. La población estándar mundial utilizada en *GLOBOCAN* corresponde a la modificación de Doll et al., 1966 de la propuesta inicial (Segi, 1950). Figura modificada de *GLOBOCAN 2020/IARC*. Organización Mundial de la Salud.

2.1.1. Colangiocarcinoma (CCA)

Es un cáncer hepático primario raro, mucho menos frecuente que el HCC. Sin embargo, es el segundo tipo de tumor hepático más frecuente, y en concreto el colangiocarcinoma intrahepático (iCCA), localizado en los pequeños conductos del parénquima hepático, representa el 10-15 % de los cánceres hepáticos primarios, que corresponde al 3-5 % de las enfermedades neoplásicas gastrointestinales. Su incidencia mundial continúa en auge debido a diversos factores (Bertuccio et al., 2019; Patel & Benipal, 2019). Aunque la edad media de diagnóstico de los pacientes es de 50 años, la mayoría de los casos diagnosticados corresponde a pacientes mayores de 65 años. La incidencia de la enfermedad varía globalmente, pues en la etiología tienen importancia los factores genéticos y ambientales (Banales et al., 2020; Clements et al., 2020; Doherty et al., 2017; Goeppert et al., 2019).

El CCA engloba distintos tipos de tumores hepáticos del árbol biliar, que se caracterizan por ser muy heterogéneos (clínica y patológicamente) y con un pronóstico funesto, a pesar de los avances quirúrgicos en los últimos años. El 90 % de los casos de CCA se caracterizan por ser adenocarcinomas, y, por tanto, malignos (Khan et al., 2012). Presenta una reducida tasa de supervivencia a los 5 años: el 95 % de los pacientes fallece en este periodo (Clements et al., 2020). Además de su propia complejidad, la falta de estrategias diagnósticas diferenciales no invasivas que permitan diferenciar entre HCC e iCCA o colangitis esclerosante primaria (PSC) y CCA, dificulta su abordaje clínico (Arbelaiz et al., 2017; Bertuccio et al., 2019).

2.1.1.1. Características anatómicas

El CCA se origina en las células epiteliales del árbol biliar y según la localización anatómica del tumor dentro del árbol biliar se pueden clasificar en tres subtipos: intrahepático, iCCA; perihiliar, pCCA y distal, dCCA (Figura I-3A). Este hecho justifica que su huella genética, etiología, características clínicas y pronóstico también sean diferentes (Lowery et al., 2018). También se ha propuesto una clasificación histológica o histopatológica del CCA de acuerdo con la OMS (Khan et al., 2012) y/o categorizarlo atendiendo a los distintos patrones de crecimiento tumoral: crecimiento en masa periférica o crecimiento infiltrante periductal o intraductal (Figura I-3B) (Banales et al., 2020; Nakanuma et al., 2010).

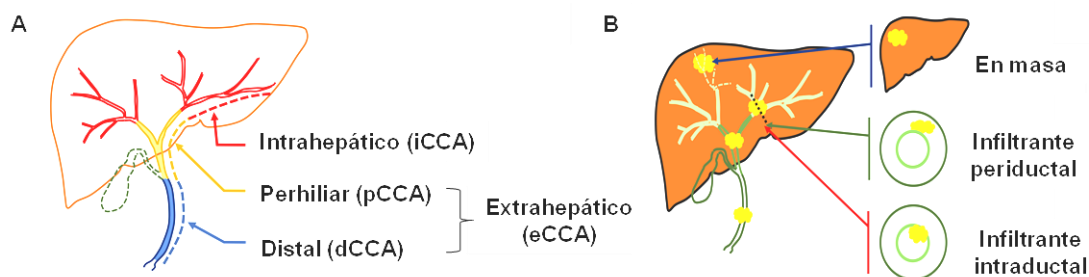


Figura I-3. Clasificación según (A) localización anatómica y (B) patrones de crecimiento tumoral del CCA. Figura traducida de (Kendall et al., 2019).

El iCCA se origina en cualquier punto del árbol biliar dentro del hígado, por encima de la unión hiliar, desde los conductos biliares de segundo orden hasta los conductillos biliares intrahepáticos pequeños. En base a sus características genómicas y epigenómicas, se pueden diferenciar cuatro subgrupos de iCCA, lo que presenta implicaciones a nivel pronóstico (Goepfert et al., 2019). Si el tumor se origina en los conductos biliares que están fuera del hígado, se considera colangiocarcinoma extrahepático (eCCA). Las vías biliares extrahepáticas engloban la parte de los conductos hepáticos que está fuera del hígado y el colédoco. Estas vías se subdividen en la región perihiliar y la distal, siendo el conducto cístico la barrera anatómica entre ambas. Así, los pCCA tienen lugar en el hilio: zona externa del hígado donde se produce la unión de los conductos hepáticos derecho e izquierdo, originando el conducto hepático común, próxima al origen del conducto cístico. También se conocen como tumores de Klastkin. Por otra parte, los tumores de la región distal de las vías biliares extrahepáticas (dCCA) incluyen el colédoco que desemboca en el intestino delgado. En los eCCA, además del origen de aparición, difiere la etiología, embriología, biología, las manifestaciones clínicas, el manejo y pronóstico, así como la epidemiología, siendo más frecuente el pCCA. En términos generales, el eCCA comprende el 75 % de los casos de CCA, mientras que el iCCA el 25 % restante (Banales et al., 2020; Bertuccio et al., 2019; Clements et al., 2020; Doherty et al., 2017; Marin, Prete, et al., 2020).

Por otro lado, la tasa de mortalidad también varía en el iCCA y el eCCA. Para el iCCA, ha aumentado a nivel global en las últimas dos décadas, siendo mayor en hombres (1-2/100.000); mientras que en el eCCA ha disminuido en ambos sexos, siendo en la mayoría de los países (<1/100.000), por el uso extendido de

colecistectomía laparoscópica. El incremento de la tasa de mortalidad de iCCA se debe a un aumento de la incidencia, causada posiblemente por el aumento de los factores de riesgo asociados. La tasa de mortalidad experimenta grandes cambios a nivel global como se aprecia en la Figura I-2, reforzando la idea de que, a pesar de ser la misma patología, entre sus diferencias, se encuentran los factores etiológicos (Bertuccio et al., 2019; Clements et al., 2020).

2.1.1.2. Factores de riesgo

Esta patología presenta una etiología compleja y en la mayoría de los casos desconocida, ya que los factores de riesgo conocidos representan menos del 30 % de todos los casos (Khan et al., 2012). A pesar de ser factores de diversa índole, están relacionados con una inflamación crónica y lesiones del epitelio de los conductos biliares (Angosto & García, 1987).

Algunos de los factores implicados en el desarrollo de CCA son alteraciones hepáticas previas (PSC, cirrosis, enfermedad de hígado alcohólico, enfermedad de Caroli, hepatitis crónica B o C, y hemocromatosis), enfermedades del árbol biliar (coledocolitiasis, colelitiasis, colecistolitiasis), pancreatitis crónica, enfermedad inflamatoria intestinal, parásitos hepáticos (*Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*), diabetes mellitus tipo 2, NAFLD, obesidad, hipertensión, consumo de alcohol, tabaquismo, fármacos y toxinas ambientales como (thorotrast, dioxinas, nitrosaminas, 1,2-dicloropropano y asbestos). En esta etiología, el metaanálisis de Clements et al., 2020 basado en 25 estudios casos-control correspondientes a 7 zonas geográficas distintas, determinó que los factores de riesgo fuertemente relacionados con CCA, tanto intrahepático como extrahepático, son los cálculos en los conductos biliares, la cirrosis y los virus de hepatitis B y C. Sin embargo, entre todos estos factores, las hepatitis virales y la cirrosis parecen estar más relacionados con iCCA, mientras que los factores como colelitiasis, coledocolitiasis y colecistolitiasis relacionados con los conductos biliares extrahepáticos, tienen mayor relevancia en eCCA. Además, hábitos tóxicos como el consumo de alcohol y tabaco y la diabetes mellitus tipo 2 están asociados a ambos subtipos.

2.1.1.3. Características clínicas

A la dificultad diagnóstica propia de estos tumores, se une la falta de signos y síntomas tempranos, así como la refractariedad tumoral, dificultando aún más el éxito clínico. Entre las manifestaciones clínicas características están el dolor abdominal, la astenia, el malestar, la pérdida de peso, la ictericia, la anorexia y la hinchazón abdominal o sensación de una masa en el hipocondrio derecho. Aunque éstas varían dependiendo del subtipo de CCA, los tumores extrahepáticos suelen obstruir las vías biliares, por lo que son comunes los signos y síntomas resultantes de esta obstrucción: ictericia, acolia, coluria, prurito, pérdida de peso, dolor abdominal y test de funcionalidad hepática anormal. Sin embargo, los tumores intrahepáticos suelen ser de crecimiento más lento, lo que dificulta clínicamente su diferenciación de un adenocarcinoma metastásico (Banales et al., 2020; Doherty et al., 2017).

2.1.1.4. Diagnóstico

La dificultad de diagnóstico radica en que la presentación clínica en etapas iniciales es asintomática. El signo más frecuente en pCCA y dCCA es la ictericia por la obstrucción del tracto biliar. Este signo en el iCCA está asociado a estadios más avanzados. Conforme avanza la enfermedad, destaca la sintomatología inespecífica anteriormente mencionada, y por ello, en la mayoría de los individuos, su diagnóstico suele ser tardío y se detecta en pruebas de rutina en estadios avanzados de la enfermedad, es decir III o IV, de acuerdo con la 8ª edición de la clasificación elaborada por *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (Amin et al., 2017; Doherty et al., 2017), lo que contribuye a que la tasa de supervivencia a los 5 años sea baja, cercana al 7 %, a pesar de todos los avances en el conocimiento, el diagnóstico y las estrategias terapéuticas para abordarlo (American Cancer Society, 2019; Centers for Disease Control and Prevention, 2021; Izquierdo-Sanchez et al., 2022).

La evaluación para el diagnóstico y la estadificación de la enfermedad se realiza mediante la combinación de métodos de imagen (ecografía abdominal, tomografía computerizada, imagen por resonancia magnética con contraste intravenoso, tomografía por emisión de positrones, y ultrasonido con contraste), pruebas de laboratorio como las de funcionalidad hepática y la detección sérica de la elevación de biomarcadores tumorales no específicos (CA19-9, CA-125 y CEA) y el análisis histológico de muestras tumorales mediante técnicas de hibridación *in situ*

fluorescente (FISH) combinada con citología (Figura I-4) (Doherty et al., 2017; Khan et al., 2012). Además, el biomarcador CA 19-9 es útil en el seguimiento de la enfermedad o en la respuesta al tratamiento (Yazici et al., 2014). En el diagnóstico del iCCA, suele ser complejo diferenciarlo de metástasis y de HCC, por lo que las pruebas inmunohistoquímicas son determinantes (Khan et al., 2012).

2.1.1.5. Estadificación

La estadificación más empleada del CCA, tanto intrahepático como extrahepático, se basa en el sistema TNM de la AJCC (Amin et al., 2017). Después de realizar el procedimiento quirúrgico y el examen patológico del fragmento tumoral. Los CCA pueden clasificarse de forma diferente para el cáncer de vías biliares intrahepáticas (según sea estadio 0, IA, IB, II, IIIA, IIIB o IV), perihiliares (estadio 0, I, II, IIIA, IIIB, IIIC, IVA o IVB) y distales (estadio 0, I, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IV) lo que tiene interés debido a las diferencias en la biología tumoral y en la respuesta a la terapia (Yazici et al., 2014; Instituto Nacional del Cáncer, 2022). Sin embargo este estadiaje no tiene en cuenta factores pronósticos como la presencia de sintomatología relacionada al cáncer o el grado de disfuncionalidad hepática (Banales et al., 2020).

Además, desde el punto de vista clínico, los diferentes tipos de CCA se catalogan como tumores operables y tumores inoperables, por lo que su pronóstico también será diferente.

2.1.1.6. Pronóstico

La repercusión pronóstica es diferente dependiendo si se trata de tumores operables o no, por tanto, la localización anatómica del tumor condiciona el pronóstico de la enfermedad. Desgraciadamente, la mayoría de los tumores de vías biliares son difíciles de extirpar quirúrgicamente por su proximidad a los vasos sanguíneos y su extensión. La resección quirúrgica completa es la única opción curativa para estos tumores. Así, la afección ganglionar y la invasión perineural son considerados factores de pronóstico adverso en los tumores operables. Además, otros factores que se pueden relacionar con peor pronóstico de iCCA son antecedentes de PSC, elevada concentración del biomarcador tumoral CA 19-9, un patrón de

crecimiento tumoral periductal infiltrante y la invasión de los vasos sanguíneos intrahepáticos (National Cancer Institute, 2022).

2.1.1.7. Tratamiento

El tratamiento de elección, siempre que sea posible, es la resección hepática con márgenes negativos (hepatectomía subtotal) que permita una adecuada funcionalidad hepática remanente, pues es la única opción curativa para el CCA. Sin embargo, en la mayoría de los tumores de las vías biliares (incluyendo los casos de cáncer metastásico y recidivante) su resección no es posible, ya que el tumor ha invadido la vena porta, otras partes del hígado, el colédoco o los ganglios linfáticos adyacentes (Figura I-4) (National Cancer Institute, 2022; Valle et al., 2016).

Además de la resección quirúrgica, las estrategias de manejo de los pacientes incluyen tratamiento adyuvante posterior como la quimioterapia sistémica o la radiación terapéutica dirigida/localizada. Como quimioterapia adyuvante se recomienda la administración de capecitabina que mejora la supervivencia de los pacientes con tumores operables (Lamarca et al., 2020; Primrose et al., 2019). No obstante, en algunos casos la administración de quimioterapia adyuvante no determina un efecto significativo sobre la supervivencia general (Ebata et al., 2018; Edeline et al., 2019; Kim et al., 2011).

También se puede contemplar el trasplante hepático para iCCA y pCCA, siempre que se cumplan ciertos requisitos como son tamaño tumoral <3 cm, sin afectación de los nódulos linfáticos ni metástasis y sin biopsia endoscópica o percutánea previa, aunque son pocos los pacientes que reúnen estos criterios de selección tan estrictos (Angosto & García, 1987).

Como aproximadamente el 70 % de los casos de CCA se diagnostican en estadios avanzados, se convierten en tumores inoperables, ya que presentan una gran extensión de los límites tumorales o invasión vascular. En estos tumores las opciones de tratamiento se reducen exclusivamente a medidas paliativas como la quimioterapia y la radioterapia (Instituto Nacional del Cáncer, 2022; Forner et al., 2019; Yazici et al., 2014).

La quimioterapia sistémica es la opción mayoritaria para los pacientes con márgenes quirúrgicos positivos y un estado funcional y orgánico apropiado. Para

ellos, los agentes clásicos empleados son las fluoropirimidinas como la gemcitabina, el 5-fluorouracilo (5-FU), o su profármaco capecitabina y los derivados del platino (cisplatino y oxaliplatino). Sin embargo, es importante resaltar que, en la mayoría de los casos, los pacientes con CCA presentan una respuesta a la quimioterapia muy mediocre (Doherty et al., 2017; National Cancer Institute, 2022; Yazici et al., 2014).

La combinación gemcitabina/cisplatino es el tratamiento estándar de primera línea para pacientes con tumores biliares avanzados inoperables, mejorando modestamente la supervivencia (estudio fase III, NCT00262769, (Valle et al., 2010)) (Eckel & Schmid, 2007; Okusaka et al., 2010; Valle et al., 2016). También se utilizan combinaciones como gemcitabina y oxaliplatino (GEMOX) (Jang et al., 2010) y capecitabina y oxaliplatino (XELOX) (ensayo fase III, NCT01470443).

En caso de que el paciente no responda a este tratamiento, se recurre a la selección de un tratamiento de segunda línea (5-FU, capecitabina y S-1, que es una combinación oral de tegafur, gimeracil y oteracil), cuyo beneficio es aún más limitado y hay escasa evidencia sobre las indicaciones para su selección, tal y como se manifiesta en las revisiones sistemáticas (Lamarca et al., 2014; Marin, Prete, et al., 2020), siendo los pacientes más jóvenes y con un buen estado de salud general los que muestran mejores resultados.

En esta segunda línea también se encuentran las estrategias combinadas FOLFOX (ácido folínico, 5-FU y oxaliplatino) (ensayo fase III, NCT01926236) (Bridgewater et al., 2013; Lamarca et al., 2021), FOLFIRINOX (5-FU, irinotecan y oxaliplatino) (Belkouz et al., 2019), la administración de S-1 en monoterapia ha mostrado una modesta eficacia para pacientes que no respondían a la gemcitabina (Sasaki et al., 2012; Suzuki et al., 2013), el etopósido toniribate (EDO-S7.1), cuya eficacia todavía requiere confirmación (Pape et al., 2019), y también hay ensayos clínicos con modificaciones de la combinación 5-FU/leucovorina (NCT03043547 y NCT04005339) en pacientes previamente tratados con regímenes basados en gemcitabina.

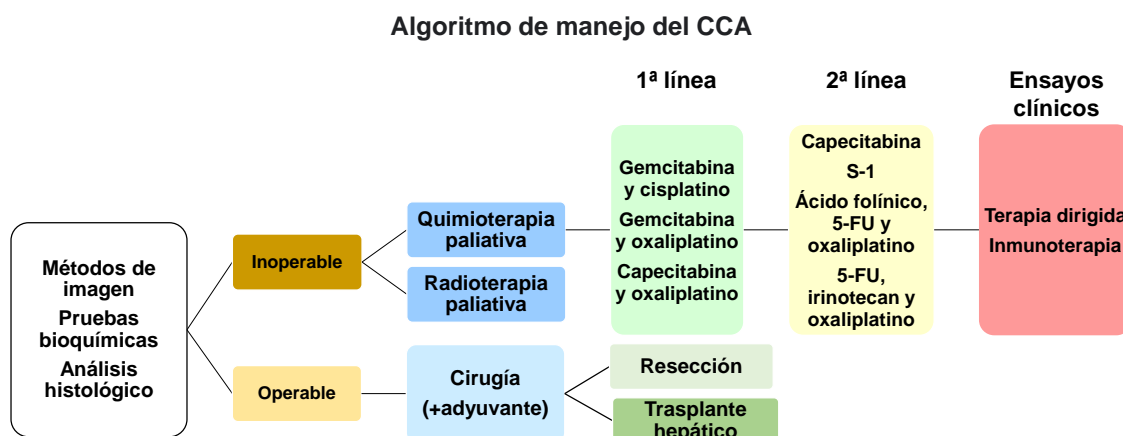


Figura I-4. Esquema del manejo diagnóstico y tratamiento del CCA. El tratamiento adyuvante generalmente es capecitabina. El trasplante hepático solo es posible en situaciones muy concretas.

Entre los nuevos agentes quimioterapéuticos, que se encuentran en distintas fases de ensayos clínicos, destacan los fármacos dirigidos a dianas específicas como el inhibidor de IDH ivosidenib (ensayo fase III, NCT02989857), los inhibidores multiquinasa, los inhibidores del receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos, FGFR2 para los que ya se han completado ensayos en fase II como el pemigatinib (NCT02924376), el infigratinib, (NCT02150967) y el futibatinib (NCT02052778), anticuerpos anti-EGFR (Rizzo et al., 2020) e inhibidores MEK1/MEK2 (Vaishnavi et al., 2020). Otra alternativa novedosa es la inmunoterapia como el tratamiento con el anticuerpo monoclonal pembrolizumab para pacientes cuyo perfil genético revela una deficiencia en la reparación de errores del ADN (Lee et al., 2020; Marabelle et al., 2020; Piha-Paul et al., 2020).

En definitiva, el aumento en la incidencia, la dificultad de diagnóstico temprano, y la escasa eficiencia del tratamiento disponible para los pacientes con CCA, hace necesaria la investigación en medicina personalizada, con el objetivo de encontrar dianas moleculares y fármacos efectivos capaces de mejorar las expectativas de vida de estos pacientes.

2.2. MECANISMOS DE QUIMIORRESISTENCIA EN EL CCA

Una característica común a los principales tumores hepáticos primarios (HCC, CCA y hepatoblastoma) es su alta refractariedad a la quimioterapia. A nivel molecular, la existencia e interacción de múltiples y complejos mecanismos de quimiorresistencia (MOC) a los agentes antitumorales, en la que intervienen más de un centenar de genes, lo que hace que, junto con la gran heterogeneidad tumoral, su abordaje terapéutico sea difícil.

La respuesta de las células tumorales al tratamiento farmacológico varía conforme pasa el tiempo y la exposición al mismo, así el fenotipo celular cambia, produciéndose la expresión de genes relacionados con los MOCs. Esto define una huella genética y dinámica, que conforma el denominado “resistoma” (Marin et al., 2018, 2019).

Estos mecanismos se han categorizado en 7 grupos, atendiendo el perfil fenotípico de resistencia a los fármacos (Figura I-5) y empleando distintos tipos de modelos experimentales: ensayos *in vitro* (de elementos subcelulares, de cultivos celulares primarios y de cultivos de líneas celulares comerciales, y de cultivos celulares en 3D) y modelos experimentales *in vivo*, principalmente en roedores, con implantes subcutáneos, intrahepáticos o con inducción de carcinogénesis de manera química o genéticamente modificados (Alonso-Peña et al., 2019; Marin et al., 2021; Marin & Macias, 2021).

Por ello es necesario profundizar en el conocimiento de los MOCs, con el fin de identificar el perfil génico completo y exacto, que permita el desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas.

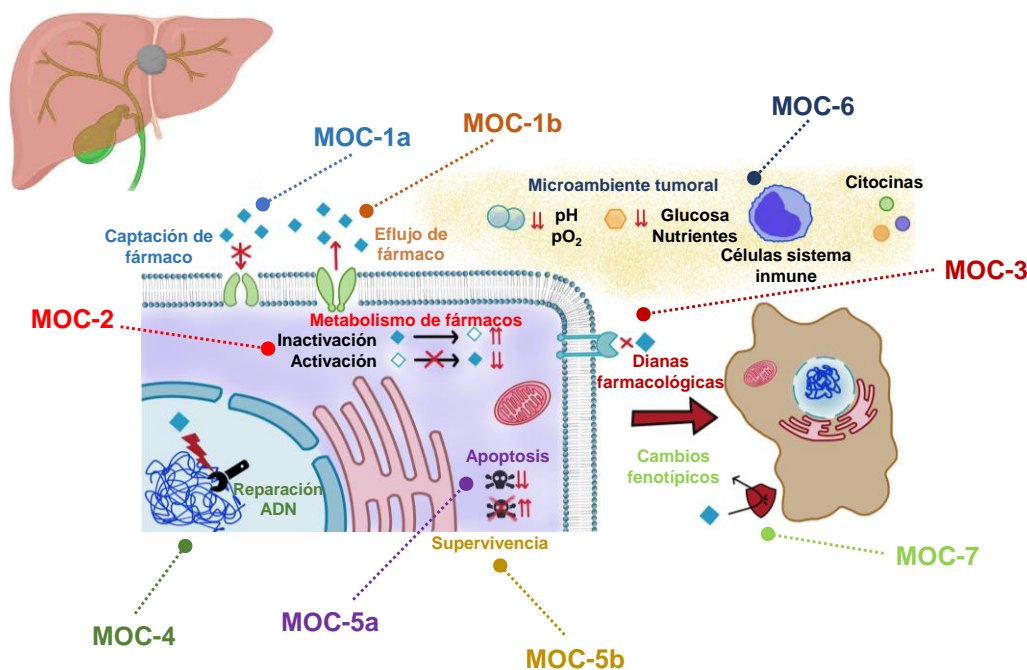


Figura I-5. Mecanismos de resistencia a fármacos antitumorales en tumores hepáticos. Figura modificada de (Marin, Macias, et al., 2020).

2.2.1. Cambios en el transporte de fármacos (MOC-1)

El primer grupo de mecanismos de resistencia a fármacos antitumorales son cambios destinados a reducir los niveles intracelulares de moléculas farmacológicas, debido a una menor captación del fármaco (MOC-1a) por parte de las proteínas transportadoras de membrana pertenecientes a la familia de proteínas portadoras de soluto (SLC, por sus siglas en inglés). También puede ser por un mayor eflujo de fármacos (MOC-1b), generalmente por la superfamilia de proteínas transportadores dependientes de ATP (ABC). Este conjunto de proteínas implicadas en el transporte de fármacos al interior o exterior celular se engloba en lo que se denomina “transportoma”. Por tanto, alteraciones en la secuencia o expresión de los genes que codifican dichas proteínas, afectarán su disponibilidad y a la eficacia del fármaco en la célula tumoral (Marin, Macias, et al., 2020).

Entre los cambios relacionados con el MOC-1a se ha observado una marcada reducción de la expresión de OCT1 (*SLC22A1*) en CCA, con la aparición de una elevada proporción de variantes de *splicing* que originan formas truncadas y no funcionales de la proteína (Herraez et al., 2013; Martínez-Becerra et al., 2012). Esto se traduce en bajos niveles de transportador funcional en la membrana plasmática y,

por tanto, falta de respuesta a fármacos que son sustratos de este transportador, como el sorafenib. Por otra parte, los transportadores de nucleósidos (CNTs y ENTs, familias SLC28 y SLC29, respectivamente) están involucrados en la captación de gemcitabina; así su expresión, principalmente la de ENT1, puede predecir la respuesta a este fármaco en pacientes con CCA (Borbath et al., 2012). También se ha encontrado una regulación a la baja de la expresión del transportador de cobre CTR1 (*SLC31A1*), capaz de transportar cisplatino (Martinez-Becerra et al., 2012). Un estudio prospectivo mostró una asociación entre la presencia de variantes del gen *SLC31A1* y la respuesta del cáncer biliar al tratamiento combinado gemcitabina/cisplatino (Pongmaneratanakul et al., 2017).

Por otra parte, la sobreexpresión de proteínas ABC es una respuesta habitual a la exposición de las células tumorales a la quimioterapia. Las bombas exportadoras ABC participan activamente en el eflujo de una gran variedad de agentes antitumorales y, por tanto, en la reducción de su concentración intracelular. Cambios en estos transportadores, contribuyen al fenotipo de resistencia a múltiples fármacos o MDR y constituyen el denominado grupo MOC-1b. Se ha encontrado una alta expresión de MDR1 o glicoproteína P (*ABCB1*) en carcinoma de vesícula biliar, donde puede desempeñar un papel en la exportación de diversos antitumorales como doxorrubicina, etopósido, paclitaxel, vinblastina y, probablemente, sorafenib (Wang et al., 2004). Adicionalmente, entre los miembros de la familia ABCC, las isoformas principales en CCA son MRP3 y MRP1, aunque MRP4 y MRP5 también presentan una expresión aumentada en el tejido tumoral en comparación con el tejido pareado adyacente (Martinez-Becerra et al., 2012; Srimunta et al., 2012).

2.2.2. Metabolismo de fármacos (MOC-2)

Las alteraciones en el metabolismo de los agentes antineoplásicos (MOC-2) pueden ser por disminución en la activación de profármacos o por un aumento de la inactivación de fármacos, lo que supone, la reducción de la cantidad de fármaco activo en las células tumorales.

Una reducción en la expresión de orotato fosforribosil transferasa (OPRT), implicada en la activación de 5-FU, se ha relacionado con una disminución de la respuesta al mismo (Hahnvajawong et al., 2012). Mientras que un aumento de la expresión de NQO1 se ha relacionado con la resistencia a 5-FU, doxorrubicina o

gemcitabina en células de CCA (Zeekpudsa et al., 2014). La regulación al alza de enzimas de detoxificación de fase II como la enzima glutatión-S-transferasa pi (GSTpi, *GSTP1*) que neutraliza los derivados del platino, se ha asociado con la resistencia a estos antitumorales (Nakajima et al., 2003). Las metalotioneínas, capaces de neutralizar los fármacos derivados del irinotecán y del platino, se sobreexpresan en CCA, y esta elevada expresión se ha asociado con un mal pronóstico clínico (Schmitz et al., 2009).

2.2.3. Dianas moleculares de fármacos (MOC-3)

Variantes nucleotídicas en genes que codifican dianas moleculares de fármacos como el receptor de estrógenos (diana del tamoxifeno), la timidilato sintasa (diana del 5-FU), EGFR y IGFR (dianas de los TKIs) y mTOR (diana de la rapamicina), también puede ser responsable del fenotipo celular resistente a los fármacos que actúan sobre estas dianas (Habara et al., 2001; Marin et al., 2015; Vaquero et al., 2018).

2.2.4. Mecanismos de reparación del ADN (MOC-4)

Este mecanismo se basa en cambios que afectan a la estructura de ADN, ya sea de manera directa (cisplatino) o indirecta (5-FU). En estos procesos de reparación del ADN, ERCC1 es una de las enzimas clave, perteneciente a la familia de genes cuyo mecanismo de reparación es por escisión de nucleótidos. En pacientes con cáncer de las vías biliares avanzado tratados con cisplatino, los niveles de expresión de ERCC1 tienen valor pronóstico (Hwang et al., 2011) mientras que el análisis de polimorfismos de este gen junto con *CTRI* supone un criterio de selección para terapia combinada de gemcitabina con derivados platinados (Pongmaneratanakul et al., 2017). En células de CCA, se ha relacionado un aumento de su expresión con una resistencia a estos agentes (Suksawat et al., 2019).

2.2.5. Desregulación de vías de supervivencia y apoptosis (MOC-5)

Este grupo engloba las alteraciones en genes implicados en mecanismos de proliferación/supervivencia y apoptosis, lo que supone una desregulación en el balance entre factores pro-apoptóticos y anti-apoptóticos, reduciéndose la muerte celular por apoptosis (MOC-5a) y favoreciéndose las vías supervivencia (MOC-5b).

Los cambios en oncogenes y supresores tumorales juegan un papel importante en la respuesta a los fármacos antitumorales. Entre los genes más frecuentemente alterados en los tumores hepáticos primarios, se encuentra el supresor tumoral *TP53*. Su alteración está relacionada con disminución de los procesos apoptóticos como respuesta a la quimioterapia (Namwat et al., 2008; Wu et al., 2020).

Por otra parte, la familia de proteínas reguladoras Bcl-2 participa en procesos de muerte celular al inducir o inhibir la apoptosis. Se ha determinado un aumento de la expresión *BCL2* en CCA (Martinez-Becerra et al., 2012). Estudios *in vitro* sugieren que, en células de CCA, la regulación de Bcl-2 al alza junto con la disminución de Bax se asocia con resistencia al 5-FU, cisplatino y gemcitabina (Wattanawongdon et al., 2015; Yoon et al., 2011). Además, la proteína survivina (*BIRC5*), miembro de la familia de inhibidores de apoptosis, también se encuentra regulada al alza (Martinez-Becerra et al., 2012). Estudios *in vitro* revelaron que esto, junto con la regulación a la baja del factor pro-apoptótico *TP73*, generalmente se asocia a la resistencia a 5-FU (Namwat et al., 2008). En pacientes con CCA, la regulación al alza de la mutación $\Delta 133p53$ de p53, se ha asociado con un aumento de la resistencia al 5-FU (Nutthasirikul et al., 2015); mientras que la resistencia al cisplatino se ha correlacionado con la falta de expresión del gen supresor tumoral *FoxO3* (Guan et al., 2016).

2.2.6. Microambiente tumoral (MOC-6)

Las condiciones del microambiente tumoral caracterizado principalmente por hipoxia, falta de nutrientes y pH ácido, puede reducir la eficacia a la quimioterapia, al afectar la progresión del tumor, la metástasis y la respuesta a los fármacos antitumorales. El CCA es un tumor rico en estroma, por lo que factores producidos por este pueden influir en la respuesta celular al tratamiento. Los fibroblastos asociados al cáncer se han relacionado con la proliferación y, por tanto, con el mal pronóstico de los pacientes (Chuaysri et al., 2009). La laminina-332, proteína de la matriz extracelular, se sobreexpresa en tumores hepáticos con altos niveles de CK19 e induce la resistencia a doxorrubicina y sorafenib (Chuaysri et al., 2009; Govaere et al., 2016). También presentan una elevada expresión de factores proinflamatorios como LIF, confiriendo a las células tumorales resistencia a la apoptosis inducida por la quimioterapia (Morton et al., 2015). Por otra parte, la elevada expresión del factor

de transcripción OCT4, fundamental durante el desarrollo embrionario, en células de CCA se ha asociado con resistencia a la gemcitabina (Choodetwattana et al., 2019).

2.2.7. Cambios fenotípicos (MOC-7)

Son los mecanismos que se han estudiado más recientemente, y son el resultado de la transición del fenotipo epitelial al mesenquimal (EMT) de las células tumorales, así como la adquisición de características de células madre. Estos cambios engloban la alteración en la expresión de oncogenes y genes supresores tumorales, que se asocia a un fenotipo más maligno. Por ejemplo, el aumento de expresión de la lipocalina-2 estimula la transformación fenotípica, disminuyendo la expresión de supresores tumorales, lo que resulta en una mayor resistencia a la quimioterapia (Chiang et al., 2016). Así, el anticuerpo monoclonal nimotuzumab se presenta como terapia novedosa al impedir la metástasis por supresión de la EMT (Padthaisong et al., 2017).

Las proteínas del grupo de alta movilidad, implicadas en diversos procesos celulares, HMGA1 promueven la proliferación y la EMT de las células tumorales. En muestras de CCA, el aumento de su expresión se propone como responsable de la tumorigenicidad y la resistencia a la gemcitabina (Quintavalle et al., 2017). En este sentido, también se ha demostrado que la interacción entre las vías de señalización de la interleucina 6 (IL-6) y del factor de crecimiento transformante beta 1 participa en la EMT y en la resistencia a la gemcitabina (Yamada et al., 2013).

Por tanto, la identificación de los perfiles de quimiorresistencia en cada tumor podría ayudar a seleccionar el tratamiento más adecuado. Sin embargo, aunque a nivel preclínico se ha descrito y estudiado la importancia de los MOCs, hay pocos ensayos clínicos que respalden la asociación entre los perfiles de expresión de los MOCs y la respuesta al tratamiento (Marin & Macias, 2021). Todos estos avances permitirán una medicina más personalizada en un futuro cercano, al prever la respuesta del paciente al tratamiento antitumoral y, en consecuencia, optar por el tratamiento más apropiado o incluso, para diseñar fármacos más eficaces capaces de vencer estas resistencias.

2.3. ESTRATEGIAS DE SENSIBILIZACIÓN

2.3.1. Herramientas de edición génica

Los avances en biología molecular e ingeniería genética junto con la aparición de resistencias a los fármacos convencionales y su falta de especificidad frente a las células tumorales han sido factores determinantes en el interés por el desarrollo de la terapia y edición génicas (Li et al., 2020; Zheng et al., 2020).

La terapia génica puede ser llevada a cabo en células aisladas a partir de una biopsia del tejido del paciente, que una vez transfectadas, se trasplantan de nuevo (*ex vivo*) o en células que se modifican dentro del propio tejido (*in vivo*). Entre las técnicas empleadas con fines terapéuticos para el abordaje de diferentes patologías destacan el empleo de herramientas basadas en nucleótidos como ARNs reguladores para la edición o adición génica (Galanopoulos et al., 2021; Karimian et al., 2019; Montaña-Samaniego et al., 2020; Weng et al., 2020), la estrategia CAR-T basada en el empleo de células inmunes genéticamente modificadas (Bailey & Maus, 2019; Zhou et al., 2020) y la viroterapia oncolítica, que consiste en el empleo de vectores virales modificados genéticamente capaces de infectar selectivamente las células tumorales (Lan et al., 2020).

El desarrollo de diferentes estrategias de edición génica permite la modificación específica de secuencias genómicas en células eucariotas para, en última instancia, implementarse en la práctica clínica, al presentarse como una estrategia prometedora para la prevención y tratamiento de enfermedades. Se caracterizan por su variedad y versatilidad, ya que comprenden desde moléculas capaces de inducir cambios en el material genético como las herramientas basadas en enzimas como las nucleasas de dedos de zinc (ZFN), las nucleasas efector TAL (TALEN), hasta el desarrollo y mejora de vectores portadores de material génico, así como de sistemas que se basan y/o combinan diferentes estrategias de edición como es el caso de las nucleasas guiadas por ARN como el sistema CRISPR/Cas (Guernet & Grumolato, 2017; Li et al., 2020; Santana-Armas & Tros de Ilarduya, 2021).

2.3.1.1. Herramientas vectorizadas

El aspecto clave de las terapias génicas es conseguir la liberación de la suficiente cantidad de material genético en las células diana. Para ello, existen diferentes tipos de vectores encargados de dirigir el gen de interés hacia las células diana, de manera segura, eficiente y específica (Figura I-6). Sin embargo, lograr una vectorización exitosa, no sólo depende de los vectores, sino también del tipo de tejido, la célula diana y el método de liberación (Montaño-Samaniego et al., 2020).

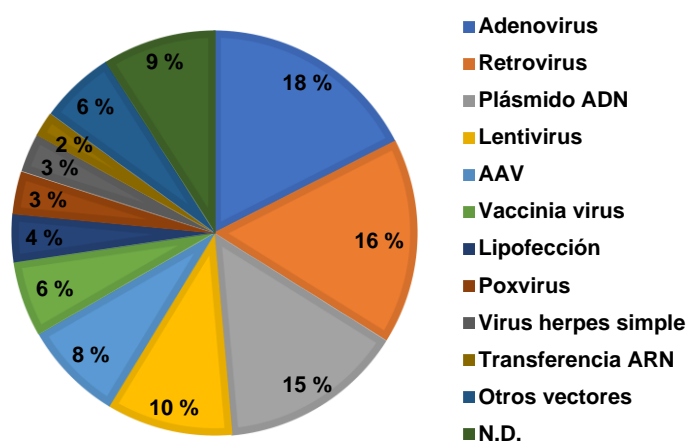


Figura I-6. Vectores empleados como herramientas de transferencia génica en ensayos clínicos. AAV: virus adenoasociados. N.D. información no disponible. Datos obtenidos de *The Journal of Gene Medicine* (<https://a873679.fmphost.com/fmi/webd/GTCT>).

Los vectores no virales destacan por su seguridad, su menor inmunogenicidad y su mayor simplicidad, a pesar de la limitada eficacia *in vivo*. Los vectores virales, de origen variable, se caracterizan por su alta capacidad de transducción. Generalmente son los vectores de elección y son más adecuados para la incorporación de material genético en células de mamífero, a pesar de su posible inmunogenicidad, toxicidad, mutagenicidad o mayor coste (Galanopoulos et al., 2021; Karimian et al., 2019; Li et al., 2020; Zheng et al., 2020).

Vectores virales

El tipo de vector viral se elige en función del tejido diana y la estrategia génica deseada (Athanasopoulos et al., 2017). Las propiedades que determinan la idoneidad de un vector viral son una alta capacidad de carga, un adecuado tropismo por las células dianas específicas, una alta eficacia de transducción, así como una reducida genotoxicidad, citotoxicidad y respuesta inmune. Estos vectores se utilizan para

modificar genéticamente células *ex vivo* o *in vivo* (Brayshaw et al., 2021; Slade, 2001). Sin embargo, en la práctica, su uso está limitado por la inducción de inmunogenicidad, oncogenicidad y su baja capacidad de transporte. Aunque desde la década de los 90 se han modificado estos virus, por ejemplo, con polímeros en la superficie, con el fin de reducir su inmunogenicidad y mejorar su seguridad (Hong & Yun, 2019; Redd Bowman et al., 2019; Sun et al., 2019).

Los vectores virales se pueden clasificar atendiendo a diversas categorías como la naturaleza de su genoma (ADN/ARN, cadena sencilla o doble) o su capacidad de integración en la célula huésped (Athanasopoulos et al., 2017; Slade, 2001).

Hasta la fecha, aproximadamente el 80 % de los vectores empleados en terapia génica que se encuentran en fase de ensayos clínicos, corresponden a vectores virales, de acuerdo con los datos proporcionados por *The Journal of Gene Medicine*, de ensayos clínicos de terapia génica en el mundo (Figura I-6). Los vectores virales más usados para edición génica de células humanas tanto en ensayos preclínicos en el laboratorio como en pacientes son los vectores adenovirales, retrovirales, lentivirales y virus adenoasociados, representando más del 50 % de vectores empleados en terapia génica, cuyas características se recogen en la Tabla I-1. Los vectores virales son capaces de entrar en la célula por diferentes mecanismos, así como de transferir su material genético (Athanasopoulos et al., 2017; DiCarlo et al., 2017; Galanopoulos et al., 2021).

Específicamente, como vectores virales dirigidos al hígado, los AAV recombinantes han sido los más empleados incluso en ensayos clínicos. Se han desarrollado nuevos serotipos de AAV y a nivel experimental lentivirus capaces de transducir específicamente los hepatocitos, minimizando la expresión transgénica en células no hepáticas transducidas (van Haasteren et al., 2018).

Tabla I-1. Características de los principales vectores virales.

Vector viral	Tipo (I/NI)	Material genético	Capacidad (kb)	Diámetro (nm)	Más estudiados	Desventaja
Ad	NI	ADNdc sin envoltura	8 – 30*	150	Serotipos 2 y 5	Respuesta inmune
Retrovirus	I	ARNsc con envoltura	8	100	Basados en VIH y HTLV	No infecta células quiescentes
Lentivirus	I	ARNsc con envoltura	14	150	Basados en VIH-1	Posible mutagénesis
AAV	I	ADNsc sin envoltura	4,5	22	AAV5, AAV8 y AAV9 AAV3 (ahora)	Pequeño tamaño

Ad: Adenovirus. AAV: Adenoasociados. ADNdc: ADN cadena doble. ADNsc: ADN cadena sencilla. ARNsc: ARN cadena sencilla. HTLV: virus linfotrópico de células T humanas. VIH: virus de la inmunodeficiencia humana. Según si su genoma se integra (I) o no (NI) en la célula huésped. *8 kb en los Ad normales y 30 kb en Ad dependientes de *helper*.

2.3.1.2. Herramientas inducibles

Para hacer frente a las limitaciones que presentan las primeras estrategias de edición génica, se apuesta por el desarrollo de mecanismos que permitan una expresión génica controlada. Así, regulando la expresión del transgén se mejora la seguridad de estas aproximaciones y se reducen las complicaciones de estas herramientas con potencial terapéutico (DiCarlo et al., 2017; T. Das et al., 2016).

Para ello, se han desarrollado sistemas artificiales controlados a nivel transcripcional por pequeñas moléculas que “encienden” o “apagan” la expresión de los genes del sistema. Estos sistemas inducibles destacan por ser reversibles, permitir una expresión estable y eficiente, con pocos efectos secundarios adversos. Además, son flexibles, es decir, atienden a los requerimientos y diseños experimentales (Kallunki et al., 2019).

Existen cuatro tipos de sistemas inducibles, dependientes de fármacos, que se usan para el control de la expresión génica e implementables *in vivo*: los sistemas regulados por tetraciclina y rapamicina, los sistemas basados en el receptor de esteroides mamíferos y los sistemas basados en el receptor de esteroides de insectos. Estos sistemas difieren en los mecanismos moleculares de acción y en las

características farmacológicas del inductor. Solo los regulados por tetraciclina y rapamicina se han probado en modelos animales superiores, donde se ha puesto de manifiesto la activación de la respuesta inmune; tras la puesta a punto de manera exitosa en modelos murinos (le Guiner et al., 2007; Stieger et al., 2009).

A continuación, se profundizará en los sistemas regulados por tetraciclina como herramienta empleada en esta Tesis Doctoral.

Sistemas regulados por tetraciclinas

Estos sistemas son los más usados, incluso en los ensayos de terapia génica, ya que permite un control estrecho de la expresión génica *in vitro* e *in vivo* en levaduras, plantas, células de insectos y mamíferos. Se basan en el operón de resistencia a tetraciclinas Tn10 de *Escherichia coli*, constituido por la proteína represora de Tet (TetR) y la secuencia de ADN del operador Tet (TetO). TetR se une como dímero a TetO bloqueando la actividad de los promotores asociados e inhibiendo la transcripción génica. La unión de tetraciclina o sus derivados provoca un cambio conformacional en TetR que evita su unión a TetO, produciéndose la activación del promotor y, por tanto, la expresión génica (Stieger et al., 2009; T. Das et al., 2016; Ting et al., 2005).

Para la adaptación del sistema a células de mamífero, fueron necesarias modificaciones de los elementos reguladores. Los cambios se basan en la expresión constitutiva de la proteína quimérica transactivadora de tetraciclina (tTA), formada por la proteína transactivadora del virus del *Herpes simplex* VP16 y la proteína represora de tetraciclina (TetR), que reconoce una región compuesta por siete repeticiones del dominio TetO, también denominada elemento de respuesta a tetraciclina (TRE). La unión de la tetraciclina a una proteína transactivadora (tTA) o represora (rtTA), y la unión de este complejo al elemento de respuesta a tetraciclina (TRE), produce la activación o bloqueo del promotor Tet-inducible (Kluge et al., 2018; Kohan, 2008; le Guiner et al., 2007; T. Das et al., 2016).

En el sistema TetOff (Figura I-7A), en ausencia de tetraciclina, la tTA dimerizada se une a su sitio en el ADN (TRE), provoca la activación del promotor asociado a TRE, un promotor constitutivo (e. g. el promotor mínimo de CMV), permitiendo así la expresión del gen diana adyacente. En presencia de tetraciclina,

tTA sufre un cambio conformacional en el dominio TetR, evitando su unión al ADN, se libera de TRE y se previene la expresión génica. Este sistema es útil para aquellas expresiones génicas que deben mantenerse activas durante largos periodos; pues para inhibir la expresión génica, la administración de tetraciclina o sus derivados debería ser continua. Por ambas razones, las aplicaciones en la práctica clínica están limitadas, restringiendo su uso a los primeros ensayos *in vivo*.

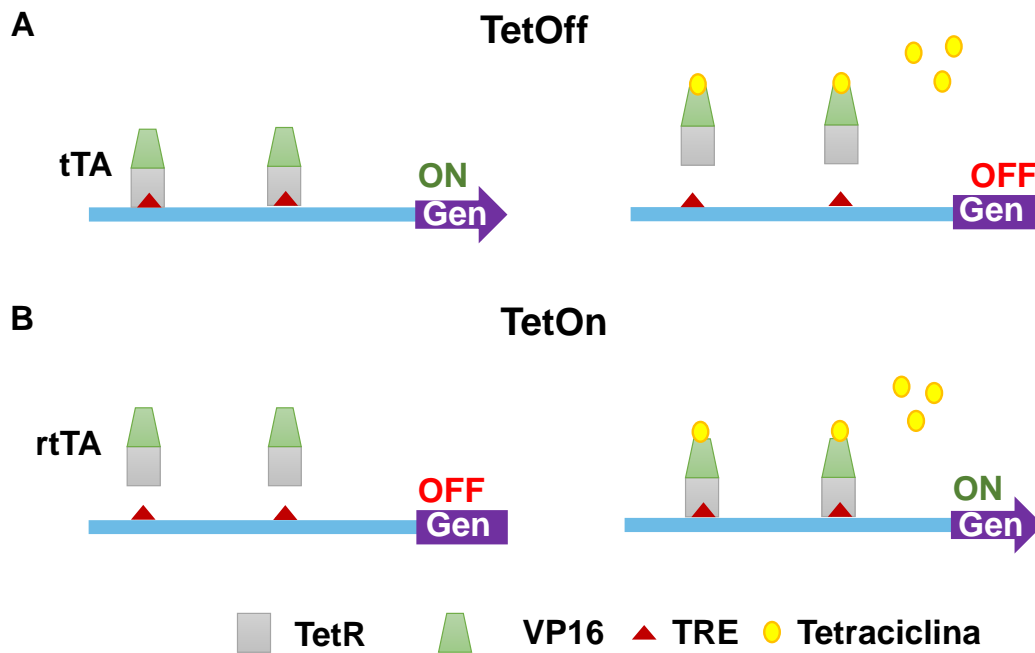


Figura I-7. Esquema representativo de los sistemas de expresión génica regulable por tetraciclina (A) TetOff y (B) TetOn. TetR: proteína represora de Tet. TRE: elemento de respuesta a tetraciclina. tTA: proteína transactivadora de tetraciclina. rtTA: proteína represora de tetraciclina.

En el sistema TetOn (Figura I-7B), el mecanismo de acción es contrario, pues la inducción génica tiene lugar con la administración de tetraciclina. Así, con este sistema se consigue solo una expresión transitoria y más rápida del gen de interés. En este caso, cuatro mutaciones en la proteína TetR que conforma tTA, produjeron un cambio en su interacción con TRE, denominándose transactivador reverso de tetraciclina (rtTA) (Gossen et al., 1995). Es el sistema preferible, al permitir controlar el tiempo, el grado de expresión génica y evitar los potenciales efectos adversos de una expresión génica constitutiva o la administración continua de las tetraciclinas para suprimir la expresión. Sin embargo, entre sus limitaciones están la expresión génica basal en ausencia de doxiciclina, así como a la actividad intrínseca del propio

promotor (le Guiner et al., 2007; Stieger et al., 2009; T. Das et al., 2016; Ting et al., 2005).

Los ligandos de tetraciclinas pueden ser empleados en clínica, porque se ha probado su seguridad; siendo la doxiciclina y minociclina las más empleadas por su elevada distribución tisular, reducida toxicidad y elevados niveles de inducción génica. Estos sistemas se han empleado para regular la expresión génica *in vivo* en roedores, ratones y primates no humanos (solo los TetOn) en diferentes órganos y tejidos (Brayshaw et al., 2021; le Guiner et al., 2007; Stieger et al., 2009).

2.3.2. Alteraciones moleculares en el CCA

Una de las principales rutas sobreactivadas en CCA es la de WNT/ β -catenina (Zhang et al., 2012), junto con alteraciones de otras vías de señalización intracelular oncogénicas y pro-inflamatorias, como las de ciclooxigenasa-2 (COX2), prostaglandina E2 (PGE2), *MYC*, *ERBB*, *TNF* y *VEGF*, implicadas en el desarrollo y progresión de la enfermedad (Andersen et al., 2012; Sirica, 2008).

Específicamente, se han identificado mutaciones en oncogenes y genes supresores tumorales como *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A*, *BRAF*, *BAP1*, *CTNNB1*, *SMAD4*, *PTEN*, traslocaciones cromosómicas de *FGFR2* (Furubo et al., 1999; Khan et al., 2006; Lowery et al., 2018; Tannapfel et al., 2003; Xu et al., 2006). También mutaciones en genes supresores tumorales localizados en el brazo corto del cromosoma 3 se han relacionado con un pronóstico adverso y una peor supervivencia de pacientes con iCCA (You et al., 2017). Además, la sobreexpresión de IL-6 y β -catenina (Jusakul et al., 2017; Sugawara et al., 1998; Sugimachi et al., 2001).

Por otro lado, se ha comprobado que la epigenética juega un papel importante en el desarrollo de CCA, tanto intrahepático como extrahepático (Goeppert et al., 2019; O'Rourke et al., 2018), pues se ha descrito la metilación de múltiples genes supresores tumorales. La hipermetilación de los sitios CpG presentes en regiones promotoras de estos genes (algunos con una frecuencia de metilación elevada como *RASSF1A*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *APC*, *CDH1*, *TP73* entre otros), conlleva su silenciamiento a nivel funcional. El 85 % de los tumores analizados en el trabajo llevado a cabo por Yang et al., 2005 sobre 72 CCAs presentaron metilación en al menos un gen supresor tumoral. Además, estos múltiples cambios en varios genes

afectan más al desarrollo tumoral por participar en varias vías de señalización celular como la de Ras, WNT, RB y la vía de p53 (Jusakul et al., 2017; Yang et al., 2005).

2.3.2.1. Vía de señalización WNT/ β -catenina

La vía de señalización WNT/ β -catenina, muy conservada evolutivamente, está implicada en múltiples procesos fisiológicos y patológicos de los animales. Es necesaria tanto para el desarrollo del organismo (embriogénesis) como para el mantenimiento de la homeostasis en el individuo adulto, implicada en la migración, estabilidad genética, apoptosis y la autorrenovación de los tejidos por las células madre (Pai et al., 2017; Steinhart & Angers, 2018).

Tras la unión de WNT a su receptor, la cascada de señalización se puede activar de dos maneras: canónica y no canónica, según sean dependientes o no de los mecanismos de β -catenina (Katoh & Katoh, 2007; Polakis, 2012; Steinhart & Angers, 2018).

La β -catenina, codificada por el gen *CTNNB1*, es la proteína clave en la vía. Se encuentra en múltiples localizaciones subcelulares, participando principalmente en la formación de uniones adherentes en epitelios de mamíferos, ayudando a anclar las cadherinas al citoesqueleto de actina. Sin embargo, una pequeña proporción se encuentra tanto en el citoplasma, como en el núcleo actuando como factor de transcripción en la vía canónica, regulando la expresión de diversos genes. Estos niveles citoplasmáticos están muy controlados por el complejo de destrucción (Hülsken et al., 1994; Kimelman & Xu, 2006; Pai et al., 2017).

Cualquier alteración en la regulación de la vía, como una sobreexpresión de los ligandos WNT, una menor expresión de sus proteínas reguladoras negativas o mutaciones en alguno de sus componentes, se han vinculado con el desarrollo de enfermedades en diversos órganos y tejidos (Clevers, 2006; Katoh & Katoh, 2007; MacDonald et al., 2009).

Vía canónica

La vía de activación canónica, además de ser la más estudiada y depender de β -catenina, es la característica en el tejido hepático. Esta vía regula la expresión de genes relacionados con renovación celular (por células madre), proliferación y diferenciación (Russell & Monga, 2018). Está regulada por la presencia o ausencia

de los ligandos WNTs. Además de WNT y la propia β -catenina, las quinasas CK1 α y GSK3 β junto con las proteínas multidominio APC y axina, juegan un papel fundamental en la regulación de esta, al constituir el complejo multiproteico de destrucción de la β -catenina.

Estas proteínas quinasas tienen un papel dual: por un lado, en presencia de ligandos, actúan fosforilando a LRP, que promueve el reclutamiento del complejo de destrucción en la membrana plasmática inactivándolo. Por otro lado, en ausencia de ligandos, tienen un papel antagónico, al llevar a cabo la fosforilación de β -catenina en el complejo de destrucción. Mientras que las proteínas axina y APC, actúan como andamiaje del complejo, permitiendo la interacción con β -catenina.

La unión de proteínas WNT al extremo N-terminal del receptor FZD, transmembrana, conlleva la interacción de éste al correceptor LRP5/6, produciéndose la activación de la vía. También la interacción de FZD con la proteína citoplasmática Dishevelled (DVL), provocando que el complejo de destrucción de la β -catenina se dirija a la membrana plasmática y sea inactivo (Figura I-8). Este hecho permite que la proteína β -catenina se estabilice, aumente su concentración citoplasmática y se produzca su traslocación al núcleo. En el núcleo, la β -catenina actúa como coactivador, reemplazando a Groucho y uniéndose al complejo formado por el factor de células T (TCF)/factor potenciador linfático (LEF), junto con proteínas de la familia Legless y coactivadores PYGO, que estimula la transcripción de genes diana. Este complejo promueve la transcripción de genes diana específicos de tejido o de estadio de desarrollo, importantes para la proliferación, la diferenciación y la apoptosis como *BIRC5*, *FGF20*, *WISP1*, *MYC*, *CCND1*, *CCNE1*, *PPAR γ* , *CD44*, *DKK1* y diversas *MMP*, u otros como *AXIN2* indicador general de actividad de la vía (Clevers, 2006; Gordon & Nusse, 2006; Hoppler & Kavanagh, 2007; Perugorria et al., 2019; Schaefer & Peifer, 2019; Zhang et al., 2012).

En ausencia de ligandos WNT, la β -catenina se encuentra dentro del complejo citoplasmático de destrucción. En este caso, el complejo receptor no interacciona con DVL y no se fosforilan. Las proteínas quinasas, que forman parte del complejo de destrucción, CK1 α y GSK3 β fosforilan a β -catenina en residuos Ser/Thr altamente conservados próximos al extremo N-terminal (primero en la Ser45 por CK1 α y posteriormente, en Thr41 y Ser33/37 por GSK3 β). Así, la β -catenina será reconocida

por un dominio del complejo E3 ubiquitina ligasa, para su poliubiquitinación y posterior destrucción por el proteasoma. A nivel nuclear, la unión del correpresor transcripcional Groucho a TCF/LEF, forma un complejo represor de la transcripción, inhibiendo la transcripción de los genes diana de la vía (Clevers, 2006; MacDonald et al., 2009; Roose & Clevers, 1999).

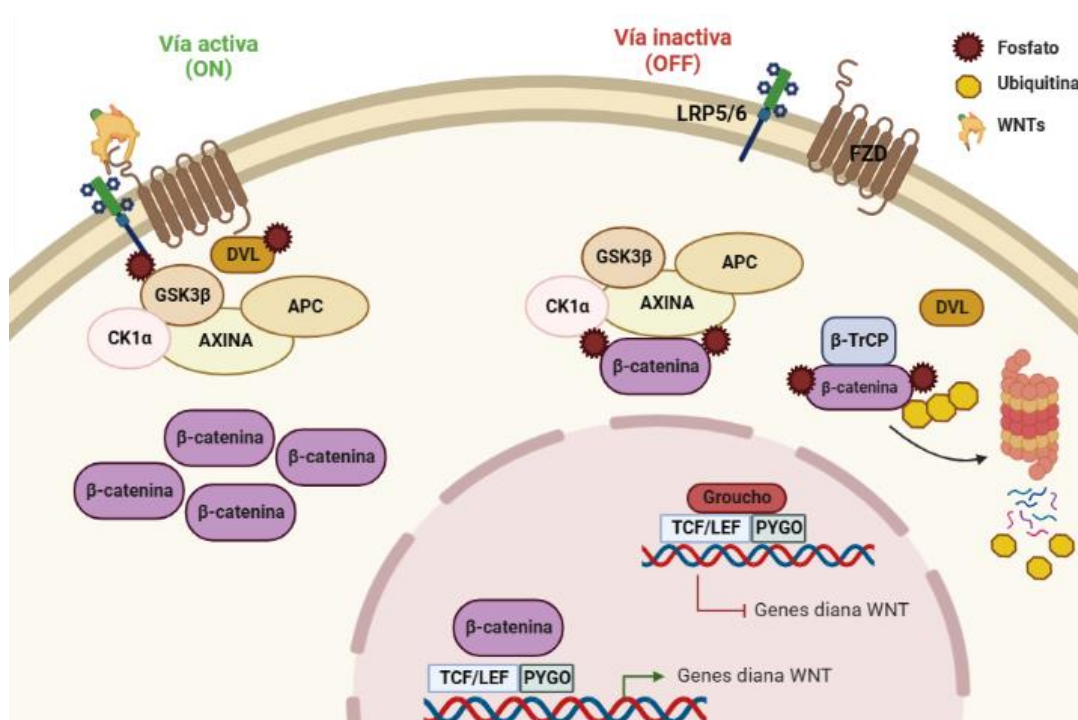


Figura I-8. Esquema de la vía canónica de señalización de la ruta WNT/ β -catenina. Figura creada con BioRender (<https://biorender.com/>).

WNT/ β -catenina en células hepáticas

En condiciones fisiológicas, la vía WNT/ β -catenina participa en la organogénesis hepática y biliar (proliferación, supervivencia y maduración de los hepatoblastos) y en el mantenimiento de la homeostasis hepática postnatal. En patologías hepáticas, es indicador del desarrollo de enfermedades tanto no tumorales como cancerosas hepáticas y del árbol biliar. Dado que en un hígado maduro y sano la vía está inactiva, salvo en los nichos de células madre, el denominador común en todas las patologías es su activación aberrante, consecuencia de los cambios genéticos o epigenéticos en diversos componentes de la vía (Koni et al., 2020; Pai et al., 2017; Perugorria et al., 2019; Russell & Monga, 2018; Steinhart & Angers, 2018; Wang et al., 2019).

La activación aberrante de la vía de señalización WNT/ β -catenina se ha encontrado en hepatoblastoma (Armengol et al., 2011; Curia et al., 2008; Sumazin et al., 2017), HCC (Laurent-Puig et al., 2001; Satoh et al., 2000) y CCA, aunque la información relativa a las alteraciones génicas y de expresión (Tabla I-2) indica frecuencias de mutaciones inferiores al 3 % en CCA.

Tabla I-2. Cambios en los principales genes de la vía WNT/ β -catenina en HCC y CCA.

Gen	HCC		CCA	
	Frecuencia de mutaciones (%) (n)	CNV (n)	Frecuencia de mutaciones (%) (n)	CNV (n)
<i>APC</i>	3,18 (1414)	6,2 % aumento 0,5 % disminución (373)	3,11 (1513)	N.D.
<i>AXIN1</i>	10,19 (1983)	2,9 % aumento 0,8 % disminución (373)	2,24 (803)	N.D.
<i>AXIN2</i>	2,70 (1224)	8,3 % aumento (373)	0,73 (689)	N.D.
<i>CSNK1A1</i>	3,77 (2284)	6,2 % aumento 2,4 % disminución (373)	2,67 (861)	N.D.
<i>CTNNB1</i>	19,61 (5736)	3,7 % aumento (373)	1,77 (1693)	N.D.
<i>GSK3B</i>	0,99 (1113)	7,0 % aumento 1,3 % disminución (373)	0,30 (665)	N.D.

Datos obtenidos de la base de datos *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer* (COSMIC, <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) aplicando los filtros *liver-hepatocellular carcinoma* para HCC y *bile duct-adenocarcinoma* para CCA. CNV: variaciones en el número de copias. N.D.: información no disponible.

Se ha descrito que, en CCA, la hiperactivación de esta vía está causada principalmente por una elevación de los ligandos WNT como WNT3A, WNT5A, WNT7B y WNT10A en biopsias de CCA humano (Loilome et al., 2014) y Wnt3a expresado por los macrófagos en el estroma tumoral de modelos animales de CCA (Boulter et al., 2012). Además, el supresor tumoral SOX17 (Lozano et al., 2020; Merino-Azpitarte et al., 2017) y la E3 ubiquitina ligasa RNF43 (Ong et al., 2012; Pangestu et al., 2021; Talabnin et al., 2016), ambos reguladores negativos de esta vía, presentan unos niveles de expresión reducidos en CCA, relacionándose con la sobreexpresión de la vía en CCA.

En modelos animales de CCA se han descrito diversos agentes implicados en estas alteraciones, como son un cambio en el microambiente tumoral, capaz de mantener elevada la actividad de la vía canónica de WNT y promoviendo la proliferación y migración celular (Boulter et al., 2012, 2015; Wang et al., 2015) así como con la adquisición de resistencia a agentes quimioterapéuticos (Wang et al., 2015; Yuan et al., 2020). Mientras que su inhibición farmacológica se ha demostrado que tiene efectos antitumorales (Boulter et al., 2015).

Por estos motivos, es importante conocer el mecanismo de acción de la vía WNT/ β -catenina con el fin de poder desarrollar estrategias terapéuticas antitumorales cuyas dianas farmacológicas sean proteínas de la vía y específicas de células tumorales, para así no interferir en las funciones fisiológicas en el resto de los tejidos (MacDonald et al., 2009). Actualmente, moléculas inhibidoras, como PRI-724 que impide la unión de CBP/ β -catenina o el anticuerpo DKN-01 frente a la proteína DKK1, antagonista de la vía por su unión al correceptor LRP5/6, están en ensayo para emplearse como potenciales tratamientos antitumorales en pacientes con tumores sólidos, al inhibir la vía de señalización, y, por tanto, reducir la proliferación de estas células tumorales (Kim et al., 2020).

2.3.2.2. *TP53*

Generalidades

El gen humano *TP53*, localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13.1), es un gen supresor tumoral conocido como “guardián del genoma” y que codifica la proteína p53. Los mecanismos moleculares específicos por los que actúa como supresor tumoral, todavía no se conocen con claridad y por eso, sigue siendo objeto de estudio. Actúa como factor de transcripción homotetramérico en respuesta a estrés celular, contribuyendo a mantener la homeostasis celular en numerosas vías metabólicas y participando en la regulación de ciertos genes diana (Olivier et al., 2010), entre los que se encuentran principalmente *CDKN1A*, *BAX* y *MDM2* (Leroy et al., 2014).

En ausencia de estímulo estresante, p53 se encuentra en el citoplasma unida a MDM2, una proteína con actividad E3 ubiquitina ligasa, que actúa como regulador negativo directo de su actividad transcripcional mediante su ubiquitinación. Así,

promueve su degradación y los niveles de p53 se mantienen bajos. A su vez, MDM2 se encuentra bajo el control transcripcional de p14ARF, codificada por *CDKN2A*. En el 4 % y el 10 % de los cánceres biliares *MDM2* se encuentra amplificado y *CDKN2A* presenta una deleción, respectivamente, lo que favorece la disfunción de p53 (Wu et al., 2020). Por el contrario, ante diversos tipos de estrés (intrínseco o extrínseco), en respuesta al daño del ADN, se activan por fosforilación ATM, ATR y p53 que se liberan de MDM2. Esto provoca la activación de la proteína, su estabilización y acumulación, regulando la transcripción de los genes dianas (Figura I-9). Otros reguladores negativos de p53 son MDMX que potencia la acción de MDM2 y WIP1 (*PPM1D*), cuya actividad fosfatasa inactiva al p53 fosforilado (Kasthuber & Lowe, 2017; Leroy et al., 2014; Monti et al., 2020).

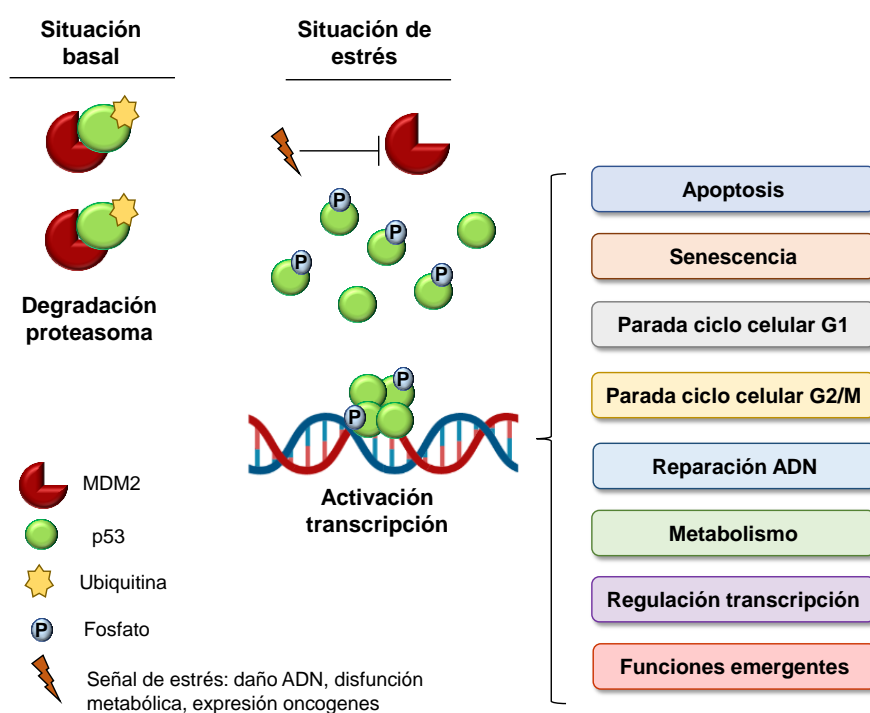


Figura I-9. Modelo de activación de la proteína supresora de tumores p53 y funciones que regula como factor de transcripción.

El gen *TP53* humano presenta un patrón transcripcional complejo, por sus diferentes orígenes de transcripción y sitios de *splicing*, codificando para 8 variantes de ARNm y 12 isoformas de proteína distintas. La secuencia génica abarca unos 20 kb de ADN genómico y presenta 11 exones. La proteína p53 tiene 393 aminoácidos, un tamaño de 43,7 kDa y 5 dominios estructurales y funcionales (Figura I-10A).

Presenta 64 residuos conservados en todos los vertebrados, y para dos de ellos (Phe19 y Trp23) no se han descrito mutaciones, pues son esenciales para la unión con la proteína represora MDM2, y su cambio podría ser letal para la célula. Así, destaca la importancia de las funciones de p53 silvestre para el buen funcionamiento celular; y, la implicación de las formas alteradas de p53 en los procesos tumorales. Muchas de las mutaciones están presentes en varios tumores, correlacionándose con la malignidad tumoral y un mal diagnóstico (Bourdon et al., 2005; Kastenhuber & Lowe, 2017; Leroy et al., 2014; Levine, 2021; Soussi & Wiman, 2015).

El papel principal de p53 como regulador negativo del ciclo celular (G1/S y G2/M), no es el único. p53 responde a señales de estrés celular (expresión oncogénica, daño en el ADN, hipoxia, alteraciones metabólicas y replicativas), regulando la síntesis de genes diana involucrados en otras funciones celulares como la apoptosis, la senescencia, la reparación del ADN o el metabolismo celular. Recientemente, se ha determinado su papel en procesos de regulación de pequeñas moléculas de ARN no codificante (ARNlnc y miARN) (Akula et al., 2019; Leroy et al., 2014; Shi et al., 2021; Soussi & Wiman, 2015; Suzuki et al., 2009). Otras funciones emergentes asociadas son la regulación del microambiente celular como el desarrollo de características fenotípicas propias de células madre, la diferenciación, invasión y metástasis y la respuesta inmunológica (Figura I-9) (Aubrey et al., 2016).

Su actividad está regulada por una serie de modificaciones postraduccionales como la fosforilación, acetilación y ubiquitinación, que favorecen o impiden su unión en los sitios de reconocimiento del ADN y, por tanto, que ejerza su función como factor de transcripción de un gran número de genes. La transcripción de los genes diana dependerá del tipo de estrés, el tipo celular y su estado de diferenciación y los factores ambientales (Aubrey et al., 2016; Kastenhuber & Lowe, 2017).

Como p53 participa en múltiples mecanismos moleculares, cambios génicos tiene implicaciones en la patogénesis, diagnóstico, pronóstico y tratamiento de tumores humanos, por lo que su estudio tiene un gran interés clínico.

Mutaciones de p53 y CCA

Es el gen más frecuentemente mutado en los cánceres humanos (1-92 %) (COSMIC, 2022) resultando en la inactivación o alteración de sus funciones

biológicas. Todas las mutaciones somáticas y germinales descritas se encuentran recogidas en la base de datos de *TP53* (National Cancer Institute, 2019).

Las mutaciones de *TP53* se pueden clasificar según los efectos en la función proteica de p53: pérdida de función, función parcial y/o sensibles a la temperatura; similares a la forma silvestre o supertransactivadoras, alteraciones en la especificidad (activa o parcialmente activa para ciertas dianas e inactiva para otras), dominantes negativas (inhibe la isoforma silvestre de la proteína en heterocigosis), ganancia de función (adquieren nuevas actividades oncogénica como aumento de la capacidad tumorigénica, metastásica, resistencia farmacológica o inestabilidad genómica) (Dutta et al., 2020; Monti et al., 2020).

En condiciones normales, p53 silvestre tiene una vida media corta y se expresa en los tejidos a niveles bajos. Sin embargo, p53 mutante presenta altos niveles en células tumorales, al no regularse negativamente por MDM2, acumulándose en el núcleo de células tumorales, pudiendo suponer un efecto oncogénico unido a la pérdida de la función silvestre (Kamp et al., 2016; Leroy et al., 2014).

Las mutaciones somáticas son las más frecuentes, con una prevalencia superior al 30 % en tumores hepáticos; siendo el más frecuentemente mutado en CCA, tal y como recoge la Tabla I-3. No obstante, específicamente, las alteraciones en p53 son más frecuentes en los CCA de origen extrahepático (con valores mayores que el 45 %) que intrahepáticos (próximos al 20 %), según la información disponible en la base de datos *cBioPortal for Cancer Genomics* (Cerami et al., 2012; Gao et al., 2013).

Como se puede observar en la Figura I-10 correspondiente a datos de tumores del árbol biliar, no existe un único *hotspot*, la mayoría de las mutaciones se encuentran en la región central (exones 4-9), que codifica el dominios de unión de p53 al ADN, relacionándose la mutagénesis con la inactivación de su actividad transcripcional. Los tipos de mutaciones más frecuentes son los que suponen un cambio de sentido (*missense*), representando casi un 82 %; mientras que las mutaciones sin sentido (*nonsense*) que codifican una variante proteica truncada o inactiva suponen el 5,63 % de las mutaciones.

Tabla I-3. 20 genes que aparecen mutados con mayor frecuencia en los tumores de los conductos biliares.

Función	Gen	Proteína	Frecuencia de aparición (%)		
			COSMIC	GDC Data portal, NCI	cBioPortal
Supresores tumorales	<i>TP53</i>	p53	28,0	27,2	25,1
	<i>CDKN2A</i>	p16 ^{INK4a}	3,3		2,8
	<i>ATM</i>	ATM	3,6		5,3
	<i>FBXW7</i>	FBXW7	3,7		2,1
	<i>BAP1</i>	BAP1	8,0		13,9
	<i>LRP1B</i>	LRP1B	7,7	10,4	7,6
Remodelación de la cromatina	<i>ARID1A</i>	ARID1A	12,0	9,2	17,9
	<i>PBRM1</i>	PBRM1	7,3		9,6
	<i>KMT2C</i>	KMT2C	5,1		5,2
	<i>KMT2D</i>	KMT2D	4,0		4,7
Vía EGFR/RAS/MAPK	<i>KRAS</i>	RASK	18,5		12,9
	<i>BRAF</i>	BRAF	3,4		4,5
	<i>NF1</i>	NF1	4,3		-
Microambiente tumoral	<i>IDH1</i>	IDHC	10,0		14,8
	<i>IDH2</i>	IDHP	2,3		3,1
Vía WNT/ β -catenina	<i>APC</i>	APC	3,1		3,7
	<i>CTNNB1</i>	β -catenina		22,8	1,5
Vía TGF- β	<i>SMAD4</i>	SMAD4	8,3		7,1
Vía PI3K-AKT-mTOR	<i>PIK3CA</i>	p110 α	5,4		4,9
	<i>PTEN</i>	PTEN	3,9		3,1

El número de muestras depositado en la base de datos COSMIC varió entre 716 y 3296, dependiendo de cada gen. En la base de datos del *National Cancer Institute GDC Data portal* (n=412) se recopiló la información para tumores hepáticos y conductos biliares intrahepáticos. Para aquellos genes en los que no se recogen datos, la frecuencia de mutaciones para los casos testados era de 100 %. La base de datos *cBioPortal for Cancer Genomics* (n=1540) proporciona información sobre las mutaciones en las muestras de neoplasias papilares intraductales de las vías biliares. Datos actualizados en diciembre de 2022.

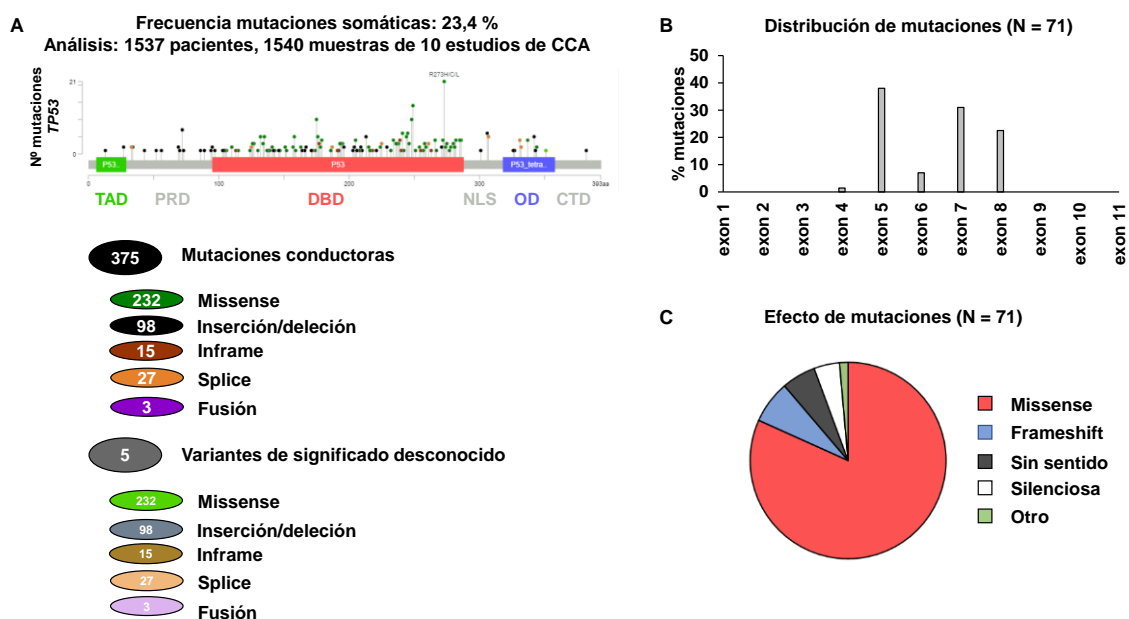


Figura I-10. (A) Cantidad, (B) localización y (C) tipo de eventos mutagénicos en el gen *TP53* humano en muestras de pacientes con CCA. CTD: dominio C-terminal. DBD: dominio de unión al ADN. NLS: señal de localización nuclear. OD: dominio de oligomerización. TAD: dominio de transactivación. PRD: dominio rico en prolina. Datos extraídos de la base de datos de *cBioPortal for Cancer Genomics* (<http://cbioportal.org>) y de la base de datos de *TP53* (<https://tp53.isb-cgc.org/>. Versión R20, julio 2019).

Estos datos también se corresponden con los observados en general en los tumores humanos (Leroy et al., 2014), donde las mutaciones con cambio de sentido son las mayoritarias. Entre ellas, 8 sustituciones de aminoácidos representan el 27 % de los mutantes de p53 identificados en tumores humanos (R175H, G245S, R248Q, R248W, R249S, R273H, R273S y R282W). Mientras que en menor proporción se encuentran las mutaciones sin sentido (8 % de las mutaciones); siendo la más común la c.637C>T (R213*) (Kamp et al., 2016; Leroy et al., 2014; Monti et al., 2020). También existen mutaciones germinales de *TP53* que se heredan y son la causa de tumores hereditarios y espontáneos como el síndrome de Li-Fraumeni (Levine, 2021).

Desde hace más de una década, existe información disponible sobre la relación de p53 y CCA, ya sea por alteraciones génicas como se recoge en la revisión bibliográfica de Khan et al., 2005 o por cambios en los niveles de expresión, donde un aumento de la expresión de p53 se ha asociado como indicador de patología (Arora et al., 1999) o se ha detectado una sobreexpresión de p53 en carcinomas de vesícula y árbol biliares (Washington, 1996).

Los niveles de expresión de p53 en muestras de CCA y su tejido adyacente no tumoral, presentan variabilidad. Algunas muestras presentan una caída de la expresión de ARNm de *TP53* en el tejido tumoral en comparación con su muestra pareada, pero mayoritariamente, la expresión génica de p53 no cambia o incluso aumenta. Así pues, conocer el nivel de expresión de ciertos genes diana de p53 como *PPM1D* (que codifica una Ser/Thr fosfatasa, que regula negativamente p38 MAPK, reduciendo la fosforilación de p53 y por tanto inactivándolo) y *PAI-1* (que codifica una serpina, proteína inhibidora principal del activador tisular del plasminógeno y la uroquinasa, así como componente de la inmunidad innata) puede ser útil para su empleo como marcador diagnóstico de CCA y pronóstico del estado de p53 (Puetkasichonpasutha et al., 2020).

Otro estudio llevado a cabo en población asiática muestra una relación entre mutaciones de p53 (61,1 % de los casos) y tumores del árbol biliar. También se ha establecido una correlación positiva conjunta entre los genes más mutados (*KRAS* y *TP53*) en tumores hepatobiliopancreáticos en varias cohortes muestrales de pacientes (Ahmad et al., 2021). Por otro lado, en otra cohorte de pacientes con tumores biliares relacionan mutaciones en *TP53* con mutaciones en otros genes (por ejemplo, *TERT*, *CDKN2A*, *LRP1B*) (Lin et al., 2021).

Las mutaciones de *TP53* están asociadas con un peor pronóstico de los pacientes con cáncer, también en tumores del tracto biliar (Lin et al., 2021). Concretamente, algunos estudios señalan que esta frecuencia de mutaciones es elevada en eCCA y tumores de la vesícula biliar, donde supera el 40 % de los casos (Simbolo et al., 2019; Wardell et al., 2018), mientras que en iCCA (Goeppert et al., 2019; Nakamura et al., 2015) y el resto de los tumores hepáticos y gastrointestinales, es del 25 % (Borger et al., 2012; Nakamura et al., 2015).

Además, el análisis de perfiles génicos a través de la secuenciación del exoma en pacientes con ciertos tipos de cáncer, revelan que mutaciones de *TP53* se correlacionan con patrones de cambios de un único nucleótido (SNP) y variaciones en el número de copias (CNV) (Ciriello et al., 2013; Kasthuber & Lowe, 2017).

Por último, hay estudios que apuntan que el valor pronóstico y predictivo del perfil mutacional de *TP53* es muy variable de acuerdo con el tipo tumoral y/o el tratamiento. Por lo que el análisis de *TP53* es complejo y sus indicaciones en la

práctica clínica deberán tener en cuenta la naturaleza tumoral: origen, estadio, factores ambientales como infección viral o bacteriana (Leroy et al., 2014; Olivier et al., 2010).

Por ello, atendiendo a todas estas evidencias, p53 mutante se presenta como potencial diana para el desarrollo de nuevos fármacos, ya sea para eliminar la isoforma mutante acumulada en células tumorales o restaurar la silvestre (Monti et al., 2020), por ejemplo, por inhibición de sus reguladores negativos MDM2, MDMX y WIP1. En este sentido los datos disponibles relativos a su efecto sobre la sensibilidad a la gemcitabina se limitan a estudios realizados en cáncer de páncreas (Wu et al., 2020), por lo que el estudio del papel de p53 en la quimiorresistencia del CCA es de gran interés y motivó la realización de parte de los bloques experimentales de esta Tesis Doctoral.

3.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Muestras humanas

Las muestras de tejido hepático de pacientes con CCA (n=32), tomadas de piezas procedentes de la resección quirúrgica, se obtuvieron del banco de tumores del Hospital Universitario de Salamanca. En la Tabla MM-1 se recoge la información clínica más relevante acerca de los pacientes incluidos en el estudio. El 18,8 % de los pacientes con CCA presentaban alguna enfermedad subyacente. Ninguno de los pacientes había recibido tratamiento farmacológico previo a la resección quirúrgica del tumor.

Todos los pacientes habían firmado el consentimiento informado para el uso de las muestras de tejido en investigación biomédica. Los datos personales fueron tratados con confidencialidad y seguridad, de acuerdo con la normativa que se recoge en el Real Decreto 1720/2007, del 21 de diciembre, y los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Área de Salud de Salamanca.

Tabla MM-1. Características clínicas y demográficas de la cohorte de pacientes con CCA de Salamanca.

Variable	CCA (n=32)
Edad, mediana \pm SD	71,4 \pm 6,8
Edad, rango	58-84
Género, n (%)	
Mujeres	23 (72)
Hombres	9 (28)
Tipo de CCA, n (%)	
iCCA	16 (50)
pCCA	3 (9)
dCCA	13 (41)
Enfermedad subyacente, n (%)	
Cirrosis	1 (3)
Hepatitis C	1 (3)
Hepatitis crónica	2 (6)
Colangitis	1 (3)
Colecistitis	4 (12)
Colelitiasis	3 (9)
Esteatosis	3 (9)
Diabetes	8 (25)
Sin alteraciones detectadas	3 (9)
N.D.	11 (34)
Estadio tumoral, n (%)	
I	8 (25)
II	18 (56)
III	1 (3)
IV	4 (12)
N.D.	1 (3)
Grado de diferenciación, n (%)	
G1	10 (31)
G2	13 (41)
G3	2 (6)
G4	1 (3)
N.D.	6 (19)

dCCA: colangiocarcinoma distal. iCCA: colangiocarcinoma intrahepático. pCCA: colangiocarcinoma perihiliar. N.D.: información no disponible. S.D. desviación estándar.

3.1.2. Modelos animales

Para el desarrollo de tumores subcutáneos se utilizaron ratones *nude* atímicos hembra (Ico:Swiss *nu/nu*, Charles River, Barcelona), a los que se le implantaron de manera subcutánea en el dorso 10^7 células HepG2 transducidas con IGEC-V2-iRFP,

resuspendidas en Matrigel estéril, como se describe en detalle en trabajos previos (Al-Abdulla et al., 2019).

Por otro lado, se empleó otro modelo animal, con ratones macho CD1 en los que se indujo el desarrollo de tumores hepáticos por un método de modificación génica mediante inyección hidrodinámica en combinación con la integración somática mediada por *sleeping beauty* de plásmidos portadores de varias combinaciones de dos oncogenes, entre las que se incluyeron *MET* y *KRAS* mutados (Chen & Calvisi, 2014; Hu et al., 2016). Cuatro semanas tras la inyección hidrodinámica de los plásmidos para la generación de tumores, se administraron de manera intravenosa a través de la vena de la cola $5 \cdot 10^6$ TU de lentivirus portadores de IGEC-V2-iRFP.

En ambos casos los animales se mantuvieron en aisladores ubicados en salas con condiciones controladas para garantizar un ambiente estéril. Estos ratones recibieron bebida y comida (pienso granulado comercial) *ad libitum* y se mantuvieron en habitaciones con temperatura (20-25°C) y humedad relativa (40-70 %) controladas, dotadas de un sistema de iluminación regulable que establecía un ciclo de luz/oscuridad (12 h/12 h) constante.

Para la visualización de los tumores desarrollados subcutáneamente o generados mediante modificación genética introduciendo oncogenes de forma estable en los hepatocitos, se utilizó como reportero la proteína iRFP introducida en IGEC-V2 que se monitorizaba con el equipo de imagen *IVIS Lumina S5* como se describe en el apartado 3.8.1.

Los animales fueron manipulados según las especificaciones establecidas por la legislación vigente tanto europea (Directiva 63/2010/UE) como española (RD 53/2013) para la protección y el uso de animales utilizados en experimentación. Todos los protocolos experimentales empleados fueron aprobados por el Comité de Bioética para el uso de animales de laboratorio de la Universidad de Salamanca.

3.1.3. Líneas celulares

En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- Proporcionadas por la colección americana *American Type Culture Collection* (LGC Standards, Barcelona): Alexander o PLC/PRF/5 (CRL 8024) de HCC

humano; HepG2 (HB-8065) de hepatoblastoma humano; HEK293T (CRL-11268), derivadas de las células HEK293 embrionarias de riñón humano, para la producción de vectores lentivirales, y CCRF S-180 II (CCL-8) de sarcoma de ratón.

- De la casa comercial *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* (Braunschweig, Alemania): TFK-1 (ACC 344) y EGI-1 (ACC 385) de eCCA humano.
- Las células HuH-28 de iCCA humano, procedentes del banco de células japonés *Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank*.
- Las células humanas HuCCT1 de iCCA y Witt de eCCA fueron cedidas por el Dr. Jesús M. Bañales del Instituto de Investigación BioDonostia, San Sebastián.

3.1.4. Bacterias

- Se utilizaron bacterias de la cepa DH5 α de *E. coli*, químicamente competentes, proporcionadas por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca para la producción de plásmidos.
- Las bacterias “*E. coli* químicamente competentes resistentes al fago *One Shot*TM *Mach1*TM *TI*” (Thermo Fisher Scientific), de elevada eficacia de transformación y “*E. coli* químicamente competentes *One Shot*TM *Stbl3*TM” (Thermo Fisher Scientific) para clonación de ADN con secuencias inestables, se utilizaron para generar los plásmidos pUC19 y pWPI portadores de las construcciones más complejas.

3.2. PRODUCTOS

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

- Abbot Laboratorios (Madrid): isofluorano (Forane®).
- Abcam (Reino Unido): anticuerpo axina 2 (ab32197) y secundario anti-IgG de conejo (ab6721).

- Addgene (Reino Unido): plásmido comercial pAAV-Ptet-RFP-shR-rtTA (35625)
- Air Liquide (Valladolid): CO₂ y N₂ líquido.
- AppliChem (Madrid): ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico (HEPES), solución de eosina al 1 %, glicina y leche descremada liofilizada.
- B. Braun (Alemania): sutura de seda.
- BD Biosciences (Madrid): fluido envolvente *FACS Flow* para citometría de flujo y colágeno tipo I de cola de rata.
- Biomers.net (Alemania): cebadores.
- Bio-Rad (Madrid): acrilamida, membranas de nitrocelulosa, persulfato de amonio, tampón Tris 0,5 M pH 6,8, tampón Tris 1,5 M pH 8,8, tetrametiletilendiamina (TEMED) y marcador de pesos moleculares para electroforesis de proteínas *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards*.
- Biotools (Madrid): enzima ADN Taq polimerasa.
- Cell Signaling Technology (EE. UU.): anticuerpos para axina 1 (C76H11), GSK3β (#12456) y β-catenina fosforilada (#9561)
- Condalab (Madrid): agar, extracto de levaduras y triptona.
- GE Healthcare (Barcelona): Reactivos de detección ECL (*ECL™ Western Blotting Analysis System*) que incluyen los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa y los kits *illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification*, *illustra PlasmidPrep Mini Spin* e *illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit*.
- GenScript (Reino Unido): plásmido con la ORF del gen *GSK3B* (clon ID OHu23207) y *AXIN1* (clon ID OHu21546).
- Leica Biosystems (Barcelona): anticuerpos p53 (clone DO-7) y β-catenina (clone 17C2) para detección por inmunohistoquímica (IHQ).
- Menarini Diagnostics (Barcelona): portaobjetos Optiplus™.

- Merck (Sigma Aldrich, Madrid): acetato sódico anhidro, ácido fosfomolibdico, cloruro sódico, etanol, formaldehído, glicerol, hidróxido sódico, isopropanol, β -mercaptoetanol, metanol, *Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix*, reactivo de *Folin Ciocalteau*, medio de montaje permanente *DEXPEX* y filtros *Steritop™* de 0,1 μ m de tamaño de poro para la esterilización de medios de cultivo.
- Promega Corporation (EE. UU.): algunas enzimas de restricción, T4 ADN ligasa, y plásmidos pGEM®-T Easy y pUC19.
- Pronadisa (Madrid): agarosa de alta resolución MS-8 y agarosa de bajo punto de fusión.
- Prosisalab (Salamanca): placas de cultivo de 96 pocillos.
- Santa Cruz Biotechnology (EE. UU.): anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (sc-516102), anticuerpos para survivina (D-8) (sc-17779), GAPDH (6C5) (sc-32233), p53 (DO-1) (sc-126) y β -catenina (E-5) (sc-7963).
- Selleckchem (EE. UU.): inhibidor XAV-939.
- Sigma-Aldrich (Madrid): ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), albúmina sérica bovina (fracción V), ampicilina, azul de bromofenol, azul de Tripán, bicarbonato sódico, cis-diaminodicloroplatino II (cisplatino), cloroquina, dimetilsulfóxido (DMSO), dodecil sulfato sódico (SDS), 5-FU, igepal CA-630, yoduro de propidio, cloruro de litio, los medios de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose* (DMEM) y *Minimum Essential Medium Eagle* (MEM), cóctel de inhibidores de proteasas (4-(2-aminoetil) bencenosulfonilfluoruro 104 mM, pepstatina A 1,5 mM, E-64 1,64 mM, bestatina 4 mM, leupeptina 2 mM y aprotinina 80 μ M), oxaliplatino, gemcitabina, paraformaldehído, polibreno (bromuro de hexadimetrina), polietilenimina (PEI), piruvato sódico, SN-38, tripsina de páncreas porcino, Tris (trishidroximetil aminometano) base (Trizma) o clorhidrato (Tris-HCl) y Triton X-100.
- Thermo Fisher Scientific (Madrid): el kit de ADN polimerasa de alta fidelidad *AccuPrime Pfx SuperMix*, aminoácidos no esenciales 100x, mezcla de

antibióticos (penicilina/estreptomicina) y antimicótico (anfotericina B), enzimas de restricción *FastDigest*TM y la enzima ligasa T4, suplemento de glutamina *GlutaMAX*, el kit de apoptosis de células muertas con anexina V para citometría de flujo, frascos de cultivo de 25 y 75 cm², placas de cultivo de 6, 12, 24 y 96 pocillos, placas de cultivo de 10 cm de diámetro estériles, el kit comercial para la retrotranscripción (RT) *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*, líquido estabilizador “RNAlater”, marcador de peso molecular de ADN (*1 Kb Plus DNA Ladder*), marcador de peso molecular de proteínas *PageRuler*TM *Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa*, anticuerpo monoclonal p21 (GT1032) (MA5-31479), medio de cultivo *RPMI 1640* con *Glutamax*TM-I, medio SOC, suero bovino fetal (FBS), filtro de jeringa de PVDF estéril de tamaño de poro 0,2 μm y 0,45 μm, *SYBR*TM *Safe DNA Gel Stain* para teñir ADN en geles de agarosa, la mezcla de reactivos de qPCR *SYBR*[®] *Select Master Mix* y *Taqman*[®] *Universal PCR Master Mix* y las tarjetas microfluídicas o TLDA.

- Tocris (Reino Unido): inhibidor ICG-001.
- Vector (EE. UU.): Solución de hematoxilina (H3401).
- Vitro Master diagnóstica (Reino Unido): anticuerpo p21/Waf-1 DCS-60.2 (MAD-000787QD-7) para inmunohistoquímica
- VWR International (Barcelona): ácido acético glacial, ácido clorhídrico, carbonato sódico, cloruro cálcico, cloruro magnésico, cloruro potásico, dihidrógeno fosfato potásico, fosfato ácido potásico, fosfato disódico, etanol (grado analítico), metanol, indicador universal de pH, medio de montaje *Entellan*[®], mezcla de glicoles y resinas para realizar cortes en el criostato *Tissue-Tek*[®] *O.C.T compound*, sulfato magnésico y *Tween*[®] 20.
- Whatman (Madrid): papel de cromatografía Whatman de 3 mm para la transferencia en Western blot.

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

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

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

3.2.1. Soluciones comunes utilizadas en varias técnicas

- Solución de carga Laemmli 2x: 0,125 M Tris-HCl pH 6,8; 4 % SDS; 20 % glicerol, 10 % β -mercaptoetanol, 0,004 % azul de bromofenol.
- Solución de colágeno: 34 ml agua ultrapura, 19 μ l ácido acético glacial y 1 ml colágeno tipo I de cola de rata.
- Solución salina: La solución salina se preparaba mediante la disolución de NaCl en agua destilada para una concentración final de 150 mM.
- Tampón de electroforesis: 25 mM Tris-HCl; 192 mM L-glicina y 1 % (p/v) SDS.
- Tampón de transferencia: 25 mM Tris-HCl; 192 mM L-glicina y 20 % (v/v) metanol, pH 8,3.
- Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na_2HPO_4 0,5 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, pH 7,4.
- Tampón RIPA: 1 % (p/v) igepal CA-630; 0,5 % (p/v) desoxicolato sódico y 0,1 % (p/v) SDS disueltos en PBS 1X pH 7,4.
- Tampón TAE pH 8,3: 40 mM Tris base, 1 mM EDTA y 20 mM ácido acético.
- Tampón Tris salino (TBS): 2,42 g/l Trizma base; 8 g/l NaCl, pH 7,6.
- Tampón TBS-Tween (TBS-T): TBS suplementado con 0,1 % (v/v) de Tween-20.
- Tampón TE pH 8,0: 10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA.

3.3. MEDIOS INSTRUMENTALES

Las muestras se conservaron en congeladores verticales a -20°C y en ultracongeladores verticales de -86°C Forma™ serie 900 (Thermo Fisher Scientific).

El agua destilada y ultrapura se obtuvieron con un equipo de purificación de agua *Milli-Q® Integral Water Purification Systems* (Merck).

Para hacer filtraciones a vacío se empleó una bomba *Millipore modelo XX5522050* (Millipore Ibérica, Madrid). Para la esterilización de materiales sólidos y líquidos, y material de cultivos celulares se empleó un autoclave, modelo Presoclave III 80 L (J.P. SELECTA, Barcelona).

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

Las centrifugaciones se realizaron en centrífugas refrigeradas 5417R y 5810R de la marca Eppendorf (Alemania), *L8-M Ultracentrifuge* y rotor SW 28 Ti (Beckman Coulter Inc., EE. UU.) y en la microcentrífuga Galaxy Ministar (VWR International).

Para el cultivo de bacterias se utilizó una estufa termostatzada a 37°C modelo S-20 (J.P. SELECTA).

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

La electroforesis de proteínas se llevó a cabo en un sistema de electroforesis modelo *Mini-PROTEAN® Tetra cell* con fuente de alimentación modelo PowerPac 300. La transferencia electroforética a membranas de nitrocelulosa se realizó en un sistema *Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell*, todo procedente de la casa comercial Bio-Rad.

Para la visualización de la fluorescencia de los geles de ácidos nucleicos y la luminiscencia de las membranas de Western blot se empleó un equipo de análisis de imagen *LAS-4000* (Fujifilm, TDI, Madrid) y *ChemiDoc Imaging Systems* (Bio-Rad). La captura de imágenes se llevó a cabo con una cámara refrigerada del equipo, sin filtros

y con una apertura del diafragma del objetivo de f 0,8 cuando se trataba de quimioluminiscencia, y con filtro Y515 y diafragma del objetivo f 1,5 para SYBR Green, con luz azul como fuente de excitación.

Para la manipulación de los cultivos celulares se utilizó una campana de flujo laminar modelo *AV-30/70* (Telstar, Barcelona); las células se mantenían a 37°C en un incubador termostatzado con atmósfera de CO₂ humidificada modelo Hepa Class 100 (Thermo Fisher Scientific). Los viales de almacenamiento de las distintas líneas celulares se conservaban en un contenedor de N₂ líquido (Thermo Fisher Scientific). Para HEK293T se utilizaron frascos de cultivo pretratados con 0,5 mg/ml de colágeno. Para visualizar las células se utilizó un microscopio de contraste de fases, que tenía acoplado una lámpara para fluorescencia Nikon Eclipse TE 2000-S (Nikon, DueroLab). Para contar las células se utilizaron cámaras de contaje *Neubauer improved*.

La monitorización de los animales *in vivo* se llevó a cabo en el quipo *IVIS Lumina S5 Imaging System* (PerkinElmer, EE. UU.).

Para llevar a cabo las RT y PCR analíticas se utilizó un termociclador *Eppendorf Mastercycler EP Gradient* (Thermo Fisher Scientific). Los termocicladores empleados en los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real fueron los equipos *ABI PRISM® 7300 Sequence Detection System* y *QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Para las tarjetas microfluídicas se utilizó el modelo *ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System* de la misma compañía.

Las homogeneizaciones de tejidos hepáticos se realizaron con el homogenizador *Bullet Blender Storm* (Next Advance, EE.UU.).

Los cortes histológicos se realizaron con un criostato modelo 1900UV, (Leica Biosystems) para muestras congeladas. Para las muestras de IHQ, se empleó el sistema de preparación de muestras automático y tinción *BOND-III™* y *BenchMark ULTRA* (Leica Biosystems).

El análisis por citometría de flujo de la captación o eflujo de compuestos fluorescentes se realizó en un citómetro *FACScalibur*, de la casa BD Biosciences. El

programa informático utilizado para la adquisición y análisis de datos fue el *CellQuestPro*, de la misma casa comercial.

Para las determinaciones analíticas, los pesos se realizaron en balanzas electrónicas digitales *Precisa 125 A* y *Sartorius BL 150S* (Grupo Taper, Madrid) y para el pH se utilizó un electrodo *Crison PH BASIC 20* (Crison Instruments, Barcelona). Para las medidas espectrofotométricas se utilizó un espectrofotómetro *Hitachi U-2000 Spectrophotometer UV VIS* (Grupo Taper), un *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific) para la concentración de ADN y ARN y un lector de ELISA BioTek ELx808 (Thermo Fisher Scientific) para determinar la viabilidad celular.

También se contó con pequeño equipamiento como agitadores de placas calefactoras modelo ARE, 370°C, aluminio (Fisherbrand™), agitadores Vortex de Ika Works (Wilmington, EE.UU.) y micropipetas Gilson (Prosisalab).

Respecto a diferentes programas informáticos empleados para la visualización de las secuencias y diseño de estudios de restricción de los plásmidos se usó el programa *Gene Construction kit (GCK) 2.5.13* para MacOS X (Textco, New Hampshire, EE.UU.). Para el análisis de la secuenciación de los fragmentos de ADN se utilizó el programa *4Peaks* (Nucleobytes B.V., Países Bajos). Para el análisis de las imágenes de los estudios *in vivo* se empleó el software *Living Image 4.7.3** (IVIS Imaging Systems)* (PerkinElmer). El análisis de las imágenes de geles de electroforesis o Western blot se analizaron con el programa informático *MultiGauge v3.0* (Fujifilm).

3.4. TÉCNICAS DE CLONACIÓN

3.4.1. Obtención de la construcción molde IGEC

El desarrollo de la herramienta de edición génica a la que denominamos IGEC por su acrónimo anglosajón (*Inducible Gene Expression Cassette*) se llevó a cabo en diferentes procesos a partir de una secuencia molde que contenía la región codificante del transactivador reverso (rtTA) y el elemento de respuesta a tetraciclina (TRE), constituido por tres repeticiones de la secuencia TetO bacteriana de 19 pb (TCCCTATCAGTGATAGAGA), con un espaciador corto, flanqueado por sitios de clonación múltiple (MCS) que contenían las secuencias de reconocimiento para diversas enzimas de restricción.

En primer lugar, se eligieron las enzimas que conformarían los MCS, teniendo en cuenta que no presentasen sitios de corte en ninguna otra zona de la construcción. Mediante PCR, se obtuvo la secuencia de rtTA del plásmido comercial pAAV-Ptet-RFP-shR-rtTA (Addgene) generándose el MCS1 con la secuencia introducida por el cebador. A continuación, a través de procesos de hibridación de dos parejas de oligonucleótidos, se obtuvo la región TRE-MCS2-RS2. La digestión con la enzima de restricción *AxyI* de la región rtTA-MCS1-RS1 y la posterior ligación con la región TRE-MCS2, constituyó la construcción IGEC molde o genérica bidireccional basada en el sistema controlado por tetraciclinas TetOn. Esta construcción fue la base para las modificaciones posteriores originarias de las versiones posteriores (Figura MM-1A).

3.4.2. Procedimiento general

Para la obtención de las construcciones de interés portadoras de iRFP o los genes supresores tumorales de elección (*GSK3B*, *AXIN1*, *AXIN2* y *TP53*), se llevaron a cabo diferentes procedimientos de biología molecular e ingeniería genética que se describen a continuación.

En primer lugar, utilizando cebadores específicos de cada secuencia, se obtuvieron las ORF de los genes de interés, a partir de un ADN molde que presentase una adecuada expresión. En los casos de *GSK3B* y *AXIN1* se adquirieron de los plásmidos comerciales de *GenScript* que contenían su secuencia codificante. La ORF de la variante corta de *GSK3B* se clonó a partir de una muestra comercial de ADNc de hígado humano. La identidad de todos los plásmidos clonados se comprobó por secuenciación.

El material de partida se amplificó por PCR analítica de alta fidelidad para tener una cantidad adecuada para proceder con el resto del proceso, consistente en la digestión con las enzimas apropiadas para las posteriores ligaciones en el plásmido de destino. Por electroforesis en gel de agarosa no desnaturalizante, se seleccionó el fragmento de interés y se purificó el ADN contenido en la banda de gel de agarosa.

Para cada gen de interés hubo dos reacciones de digestión con enzimas de restricción y, posteriormente, dos reacciones de ligación (Figura MM-2). Estas

reacciones tuvieron lugar de manera alternas y se describen a continuación (apartados 3.4.6-3.4.9)

Tanto el amplicón (inserto) como el vector de destino (pUC19 o pWPI, según correspondiese) se sometieron a una digestión con las enzimas de restricción adecuadas para generar extremos extendidos. En el caso de *AXIN2*, se subclonó en el plásmido comercial *pGEM[®]-T Easy* linealizado para facilitar el proceso de clonación. Así, el vector linealizado permitía la posterior unión del inserto con dicho vector en una reacción de ligación. Si la digestión originaba más de un fragmento, éstos fueron separados en un gel de agarosa. Con el fin de mejorar el rendimiento del proceso de ligación, independientemente de si se había separado previamente por electroforesis, el ADN digerido se purificó por columna de gel de sílice.

3.4.3. Digestión de la ORF del transgén y del plásmido pUC19-IGEC receptor

A lo largo del proceso de clonación de cada gen, se llevaron a cabo dos reacciones con enzimas de restricción independientes en el tiempo. El primer paso consistió en la digestión de la ORF del gen de interés y del plásmido molde pUC19-IGEC, que contenía IGEC con el elemento TRE, *prBIRC5*, *rtTA* y *prCMV*, receptor de la ORF, como paso intermedio a la clonación en el plásmido lentiviral pWPI.

Se llevó a cabo la digestión con las enzimas cuyo sitio de restricción se encontraba en las regiones adaptadoras introducidas con los cebadores en la PCR analítica para la amplificación de la ORF de interés. Con cada pareja de enzimas de restricción también se realizó la digestión del plásmido sencillo pUC19-IGEC receptor de la ORF (Tabla MM-2). Las reacciones de digestión del vector e insertos también fueron independientes (apartado 3.12.2.).

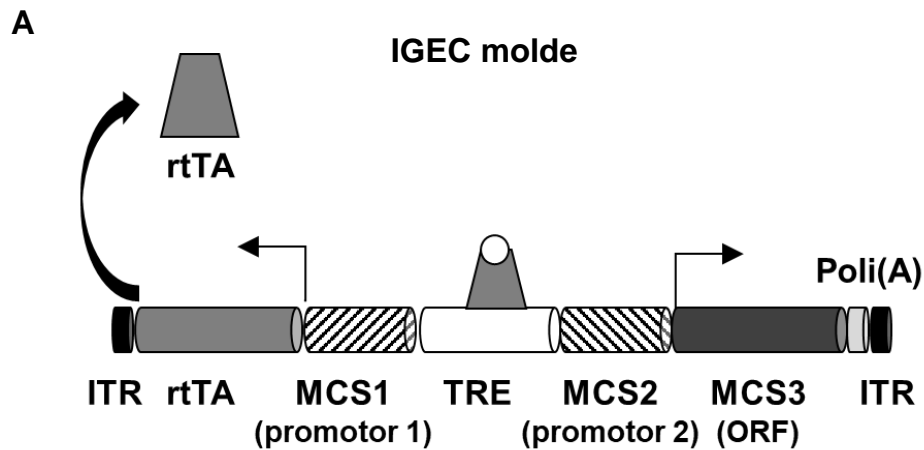


Figura MM-1. Representación esquemática de los componentes del sistema (A) IGEC molde. Las flechas indican el sentido de lectura de cada parte de la construcción, siendo opuestos a ambos lados del TRE, para hacer el sistema bidireccional. ITR: repeticiones terminales invertidas. Poli(A): secuencia de poliadenilación. rtTA: transactivador reverso controlado por tetraciclina. TRE: elemento de respuesta a tetraciclina.

3.4.4. Ligación de la ORF del transgén y del plásmido pUC19-IGEC receptor

En primer lugar, se realizó la ligación de la ORF del gen de interés y del plásmido sencillo pUC19-IGEC.

La mezcla de reacción de ligación estaba compuesta por 75-100 ng del vector de destino (en este caso pUC19-IGEC) y el inserto (ORF del gen) en relación 1:15 (v/v), 1 μ l de ligasa T4, 2 μ l de su tampón de reacción, completando hasta un volumen final de 20 o 50 μ l con agua ultrapura. También se realizó un control negativo de ligación que contenía todos los componentes de la mezcla menos el inserto. La reacción se mantenía termostaticado en baño a 22°C durante un tiempo variable de al menos 2 h. Por último, se inactivaba la reacción de ligación a 65°C durante 10 min.

3.4.5. Digestión de la construcción IGEC-transgén y del plásmido lentiviral pWPI-pL

La segunda etapa consistió en la digestión de la construcción pUC19-IGEC que ya contenía la ORF de interés y el plásmido pWPI-pL, portador de secuencias lentivirales, así como de la secuencia IRES-EGFP necesaria para la posterior producción de los vectores lentivirales.

Se seleccionaron enzimas cuyo sitio de restricción se encontraba en las secuencias del MCS introducidas. Con cada pareja de enzimas de restricción también se realizó la digestión del plásmido pWPI (Tabla MM-2). Las reacciones de digestión del vector e insertos también eran independientes. La mezcla de reacción y condiciones del proceso de digestión fueron las descritas en el apartado 3.12.2. También se hizo una separación en gel de agarosa y purificación del fragmento posterior, para aumentar el rendimiento del proceso.

3.4.6. Ligación de las construcciones del transgén y del plásmido lentiviral pWPI-pL

Tras la segunda digestión, se llevó a cabo la ligación de la construcción del gen de interés (IGEC) y del plásmido pWPI-pL digeridos, pues es el que permite las producciones lentivirales portadoras de nuestras construcciones. La mezcla de reacción y condiciones del proceso de ligación fueron las mismas que las descritas en el apartado 3.4.3.

3.4.7. Obtención de construcciones con expresión constitutiva del gen

Para todos los genes seleccionados, excepto iRFP, se generaron plásmidos pWPI para la producción de lentivirus que expresasen de manera constitutiva el transgén de interés. En estos casos el producto de amplificación de la ORF en cuestión se sometió directamente a una digestión con las enzimas apropiadas para su ligación en el vector pWPI que contiene el promotor *EF1 α* humano (*prEF1 α*) para la expresión constitutiva del transgén (Tabla MM-3).

3.5. CULTIVO DE BACTERIAS

Para el cultivo de bacterias se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

- Medio Luria-Broth (LB): Extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l, NaOH 80 mg/l, triptona 10 g/l, pH 7,0. Para la elaboración de placas al medio LB se le añadió 15 g/l de agar.
- Medio SOC: Extracto de levadura 5 g/l, glucosa 20 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM NaCl 10 mM y triptona 20 g/l; pH 7,0.

3.5.1. Transformación de bacterias por choque térmico

Se mezclaron 3 μ l (5-15 ng DNA) del producto de ligación con 50 μ l de bacterias *E. coli*, incubándose 30 min en hielo. A continuación, para facilitar la entrada del plásmido, las bacterias se sometieron a un choque térmico, elevando la temperatura a 42°C durante 2 min, luego se mantuvo la mezcla en hielo 2 min. Se añadieron 250 μ l de medio SOC sobre dicha mezcla y se incubó en agitación a 37°C durante 1 h. Posteriormente, aproximadamente, un tercio del volumen se sembró en condiciones de esterilidad por extensión con un asa de vidrio en una placa con medio LB y agar suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina. Se incubaron en una estufa a 37°C, durante toda la noche.

3.5.2. Selección de colonias y crecimiento en medio líquido

Se comprobaron las diferencias en el crecimiento de colonias entre las placas en que se había producido la ligación y la placa que contenía el control negativo de ligación. Se seleccionó un número variable de colonias de bacterias aisladas que habían crecido en la placa y que no presentaban colonias satélites alrededor. Se capturaron con una punta de pipeta estéril y se inocularon en 6 ml de medio LB suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina. Finalmente, se incubaron en agitación a 37°C, durante toda la noche.

3.5.3. Purificación del ADN plasmídico de cultivos de bacterias

Se utilizó el kit comercial *illustra PlasmidPrep Mini Spin*, diseñado para la extracción del ADN plasmídico de cultivos de *E. coli* mediante su adsorción en columnas de gel de sílice, seguido de su posterior elución. El ADN plasmídico purificado se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm en un NanoDrop. Para evaluar la posible contaminación con proteínas, solventes orgánicos y otros compuestos, se determinó la relación de absorbancias a las diferentes longitudes de onda, 260/280 nm y 260/230 nm, respectivamente. Posteriormente, se realizó un estudio de restricción, con el fin de comprobar la identidad de los distintos clones seleccionados.

3.5.4. Estudio de restricción

El ADN de cada clon aislado se sometió a un estudio de restricción con el objetivo de determinar su identidad. Para ello, se utilizaron 250 ng de ADN del clon, siguiendo el procedimiento de digestión descrito en el apartado 3.12.2. Aquellos clones cuyo patrón de bandas real coincidía con el teórico, se enviaron al Servicio de Secuenciación para validar la identidad de la secuencia (apartado 3.12.5.).

3.6. PRODUCCIÓN DE VECTORES VIRALES

3.6.1. Fundamento

Los lentivirus son retrovirus cuyo genoma se compone de un ARN lineal monocatenario, que como se recoge en el apartado 2.3.1.1., son vectores muy empleados como herramientas de edición génica. En nuestro caso elegimos los vectores lentivirales de segunda generación, debido a su versatilidad y capacidad para transducir tanto células en proliferación como quiescentes. Junto con su mayor tropismo celular, además, presentan una capacidad de transferencia de material génico de hasta 14 kb, permitiendo una expresión génica estable y de larga duración en el tiempo, dado que su genoma se integra en el genoma de la célula huésped. Por estas razones, son vectores idóneos para realizar estudios *in vitro* e incluso algunos ensayos *in vivo*, dada su baja respuesta inmunogénica, con el fin de estudiar el efecto de la sobreexpresión o silenciamiento de un gen de interés. Sin embargo, también constituye la principal desventaja del uso de lentivirus puesto que la inserción del ADN viral no es específica, sino al azar, pudiendo originar mutagénesis en las células diana (Athanasopoulos et al., 2017; Redd Bowman et al., 2020).

3.6.2. Producción y purificación de vectores lentivirales portadores de la construcción IGEC-transgén

La producción de vectores lentivirales de segunda generación se realizó siguiendo el protocolo habitual de cotransfección de las células HEK293T, necesitando para ello tres plásmidos diferentes: 2 plásmidos empaquetadores que codifican las proteínas estructurales del virus, y nuestro plásmido pWPI que contenía IGEC o la ORF del gen de interés (en cuyo caso sería controlado por el *prEF1 α*) (Figura MM-4). La secuencia de la construcción está flanqueada por las secuencias

terminales largas repetidas (ITR), cuya función es facilitar la integración del transgén en el genoma de la célula huésped. Por razones de bioseguridad, los plásmidos que se transfectan carecen de la parte del genoma que codifica la maquinaria de replicación.

Para llevar a cabo la producción lentiviral, se sembraron 10^7 células HEK293T en placas de cultivo de 10 cm² que previamente habían estado en contacto con colágeno. Se incubaron durante un tiempo mínimo de 6 h hasta que las células estuvieran bien adheridas a la superficie, para la posterior transfección con 1 mg/ml PEI en 150 mM NaCl a pH 7,5 y los siguientes plásmidos:

- El vector de transferencia pWPI-IGEC-transgén o pWPI-transgén. Este plásmido contiene tras IGEC la secuencia IRES y la EGFP que nos iba a servir como gen reportero para el seguimiento de las células transducidas de manera sencilla por microscopía de fluorescencia y por citometría de flujo.
- El plásmido psPAX2, cuyos genes *Gag*, *Pol*, *Rev* y *Tat*, codifican proteínas estructurales del virus.
- El vector de expresión pMD2.G, que codifica la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G).

Para formar los complejos PEI: ADN se mezclaron 6 µg del plásmido psPAX2, 4,5 µg del plásmido pMD2.G y 6 µg del plásmido de transferencia, disueltos en 1,2 ml de solución salina (150 mM NaCl), con 60 µl de PEI. La mezcla se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y se añadió gota a gota a la placa de cultivo de células HEK293T. Para mejorar la eficacia de transfección se añadió al cultivo cloroquina a 25 µM, compuesto inhibidor de la degradación del ADN plasmídico por los lisosomas, aumentando el rendimiento de la producción de algunos vectores virales (Gavrilescu & van Etten, 2007). A las 24 h, se retiró el medio de cultivo con los complejos de transfección y se sustituyó por medio nuevo. Se recogió el medio de cultivo de las placas a las 48, 56 y 72 h después de la transfección, que se purificó utilizando filtros de 0,45 µm de tamaño de poro y se ultracentrifugó a 20.000 rpm, a 16°C durante 130 min para concentrar las partículas lentivirales. El precipitado se resuspendió en 200 µl medio base DMEM, conservándose a -80°C hasta su uso.

3.6.3. Titrado de lentivirus por citometría de flujo

Las células HEK293T fueron sembradas en placas de 96 pocillos previamente impregnadas con colágeno, a una densidad de 20.000 células/pocillo. Las células fueron transducidas unas 6 h después, cuando estaban adheridas a los pocillos, para ello, partiendo de una mezcla 1:200 de solución lentiviral en medio de cultivo con polibreno 1x, se prepararon diluciones decrecientes de dicha solución viral recogida con medio de cultivo y se añadieron a la placa. A continuación, se centrifugó a 1800 xg, a 32°C durante 90 min y se dejó en el incubador *overnight*. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por medio nuevo con doxiciclina a 2.000 ng/ml y sin ella. Tres días tras la transducción, se determinó el porcentaje de células EGFP positivas por citometría de flujo. La concentración de partículas virales se calculó por la fórmula:

$$\text{Título (TU/ml)} = (10^{-\text{ED}_{50}} \cdot 2 \cdot \text{número de células}) / V$$

donde,

TU: unidades transformantes (partículas virales infectivas)

ED50: logaritmo decimal de la dilución de la suspensión viral que consiguió traducir el 50 % de las células

V: volumen del medio de cultivo (ml)

3.6.4. Transducción de células

Para estudiar la expresión de los diferentes genes analizados en las distintas líneas celulares con las que se ha trabajado en esta Tesis Doctoral, se sembraron las células en placas de 24 pocillos (con una densidad de 60.000 células/pocillo) o 6 pocillos (300.000 células/pocillo) en un volumen final de 1 ml/pocillo o 3 ml/pocillo. A las 24 h, las células se transdujeron con los lentivirus recombinantes en presencia de polibreno a la multiplicidad de infección (MOI) óptima para cada línea celular. Se centrifugaron las placas a 1.800 xg, a 32°C durante 90 min. Tras 24 h, se retiró el medio de cultivo y se añadió medio nuevo. En aquellos casos en los que las células fueron transducidas con IGEC, las células fueron incubadas con doxiciclina 1.000 ng/ml durante 24 o 48 h, tiempo tras el cual, las células se recogían

y se procesaban para la obtención de ARN total (apartado 3.9.1) o de proteínas totales (apartado 3.10.2).

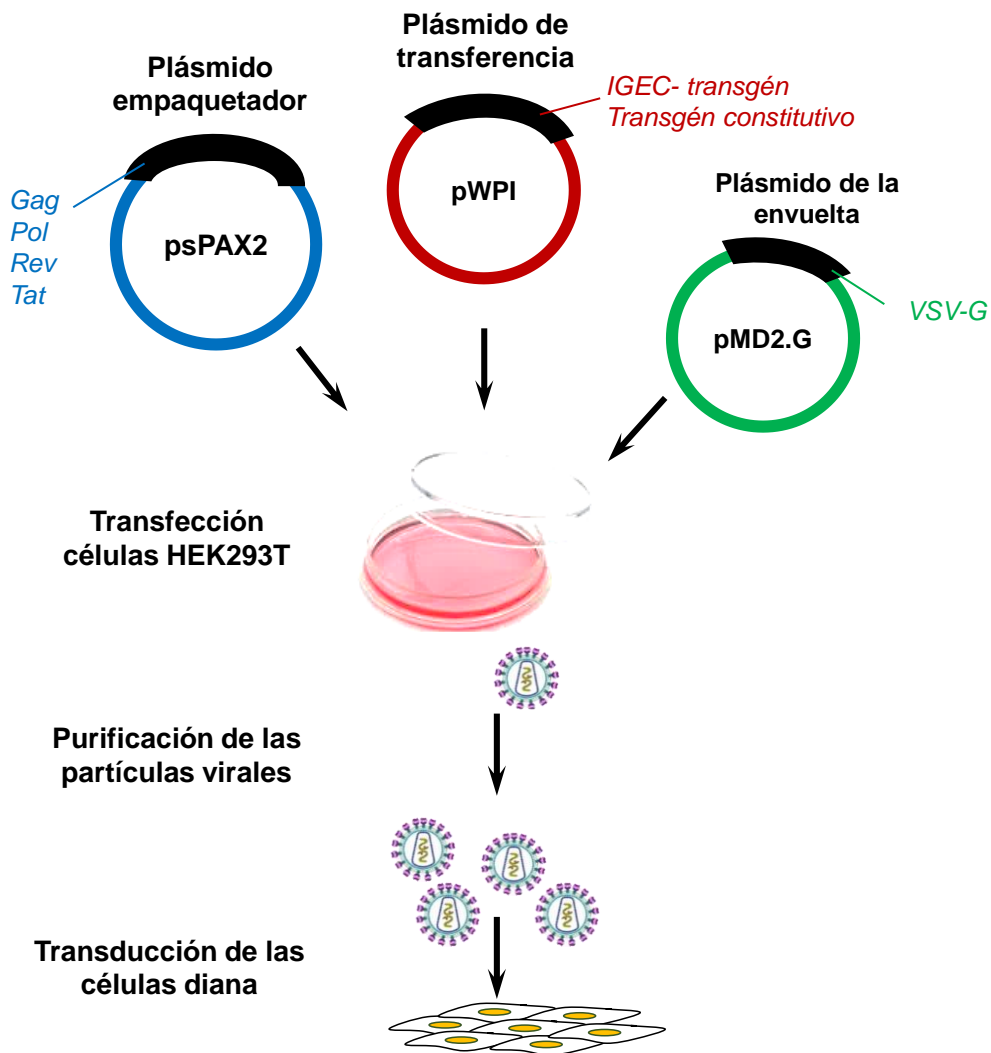


Figura MM-4. Esquema representativo de la producción de los vectores lentivirales y posterior transducción de todas las líneas celulares de elección. *Gag*, que codifica una proteína estructural precursora de la partícula lentiviral con los componentes de la matriz, la cápside y la nucleocápside). *Pol*, codifica una proteína precursora que contiene componentes de la transcriptasa inversa y la integrasa. *Rev*, codifica una proteína implicada en la exportación nuclear. *Tat*, codifica el transactivador que se une a su elemento de unión para activar la transcripción. *VSV-G*, codifica la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular, que constituye la envoltura, permitiendo un amplio tropismo.

3.7. ESTUDIOS FUNCIONALES *IN VITRO*

Para el cultivo de cada tipo celular, se utilizaron los siguientes medios base:

- DMEM suplementado con 1 % *GlutaMAX*[™] y 1 % (v/v) de una mezcla de antibióticos (penicilina 20 U/ml y estreptomycin 0,02 mg/ml) para el cultivo

de células HEK293T. Este medio base, pero suplementado con 2,2 g/l de bicarbonato sódico; 2,38 g/l de HEPES, 1 % (v/v) de la mezcla de penicilina/estreptomicina y 1 % (v/v) del cóctel comercial de aminoácidos no esenciales se empleó para las células EGI-1.

- RPMI-1640 suplementado con 1 % *GlutaMAX*TM y con 1 % (v/v) de una mezcla de antibióticos (penicilina 20 U/ml y estreptomicina 0,02 mg/ml) para el cultivo de las células TFK-1 y HuH-28.
- MEM suplementado con 2,2 g/l de bicarbonato sódico y 110 mg/l de piruvato sódico y 1 % (v/v) de una mezcla de antibióticos y antimicóticos (penicilina (20 U/ml), estreptomicina (0,02 mg/ml) y anfotericina B (0,05 µg/ml)) para las células PLC/PRF/5 y HepG2. Este mismo medio base se suplementó con 1 % (v/v) del cóctel comercial de aminoácidos no esenciales para la línea celular CCRF S-180 II.

Todos los medios fueron suplementados con un 10 % de FBS inactivado (56°C durante 30 min), excepto el medio para las células CCRF S-180 II que utilizó un 5 % FBS.

Los cultivos celulares se mantuvieron en incubadores a 37°C, en atmósfera del 5 % de CO₂ en aire y humedad relativa del 80 %. Las células HEK293T fueron cultivadas en superficies previamente tratadas con colágeno tipo I.

Para realizar los pases del cultivo o sembrar células para los experimentos pertinentes, las células se despegaron con una solución de tripsina (0,25 % de tripsina y 20 mM de EDTA en PBS) a 37°C durante un tiempo variable, dependiendo del tipo celular y se inactivaba en su propio medio de cultivo.

3.7.1. Estudios de proliferación celular

Para estudiar el efecto de la sobreexpresión de los genes de interés en la proliferación celular en las líneas de CCA humano, se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 6.000 células/pocillo. Una vez adheridas, 6 – 8 h después, se transdujeron con los lentivirus portadores de las construcciones de interés a las condiciones adecuadas en función de cada vector viral. También se mantuvieron células sin transducir como controles. Al día siguiente se cambió el medio de cultivo para eliminar las posibles partículas virales que no hubiesen entrado a las células y se

mantuvo el cultivo hasta 3 días después de la transducción, cuando se realizó el test de formazán o MTT.

3.7.2. Estudios de muerte celular

Para determinar el efecto de la sobreexpresión del supresor tumoral *TP53* en la muerte de las células de CCA humano EGI-1 y TFK-1, se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 60.000 células/pocillo. Una vez adheridas, 6 – 8 h tras la siembra, se transdujeron con los vectores lentivirales portadores de la construcción *TP53* para su expresión constitutiva, a MOI 3. Al día siguiente, se retiraron los virus y 48 h después de la siembra, se recogieron las células siguiendo una serie de lavados y centrifugaciones en frío (4°C), se resuspendieron en una solución de trabajo que contenía el anticuerpo anti-anexina V-FITC y yoduro de propidio, incubándose 15 min a temperatura ambiente en oscuridad, para posteriormente detener la reacción con tampón de medida y poder determinar la cantidad de células necróticas, en apoptosis temprana y en apoptosis tardía por citometría de flujo.

3.7.3. Estudios de viabilidad celular

Para valorar el efecto de los fármacos antitumorales de uso convencional en clínica en las distintas líneas celulares empleadas en esta Tesis Doctoral, las células se sembraron en placas de 96 pocillos (6.000 células/pocillo). 6-8 h después de la siembra, se transdujeron con los virus a las condiciones adecuadas para cada uno. Al día siguiente, se retiraron los virus del medio de cultivo y se añadieron los agentes citostáticos: cisplatino (30 μ M), oxaliplatino (30 μ M), 5-FU (8 μ M), gemcitabina (10 μ M), SN-38 (0,25 μ M) y sorafenib (5 μ M), a los que se exponían las células durante 72 h, para después realizar el test de formazán o MTT.

3.7.4. Determinación de la viabilidad celular

El test de formazán es un método colorimétrico utilizado para cuantificar la viabilidad celular en ensayos de proliferación celular. Se basa en la transformación por las deshidrogenasas mitocondriales de una sal de tetrazolio (MTT, amarilla) en formazán (violeta) (Alley et al., 1988; Scudiero et al., 1988).

3.8. ESTUDIOS *IN VIVO*

Para analizar la utilidad de la construcción IGEC como sistema de seguimiento y visualización de tumores en modelos animales utilizamos ratones atómicos con implante subcutáneo de células transducidas con IGEC-V2-iRFP, y ratones CD1 con desarrollo de hepatocarcinoma mediante la herramienta de *sleeping beauty* generada como se detalló en el apartado 3.1.2.

En el primer modelo (ratones atómicos con implante subcutáneo) se realizó una primera visualización de las células implantadas mediante la señal emitida por la proteína iRFP que había sido inducida mediante el tratamiento con doxiciclina en el cultivo dos días previos al implante. A continuación, se fue realizando una monitorización semanal del crecimiento del tumor, así como de la señal infrarroja emitida; para lo cual se administraba doxiciclina (100 mg/kg peso corporal, por vía intraperitoneal) y los animales se mantenían durante 24 h en ayunas para evitar posible autofluorescencia emitida por el pienso de la dieta.

3.8.1. Visualización de la fluorescencia

En el modelo de generación de tumores hepáticos en ratones CD1 mediante *sleeping beauty*, cuatro semanas tras la inyección de los plásmidos se administraron vectores lentivirales portadores de la construcción IGEC-V2-iRFP como se detalló en el apartado 3.1.2. Tras dos semanas, se les administró vía intraperitoneal doxiciclina (100 mg/kg peso corporal, en solución salina) (Jiménez-Martínez et al., 2019; Yamada et al., 2018). La pauta de administración fue continua para poder visualizar las células tumorales marcadas con proteína infrarroja en el equipo *IVIS Lumina S5*, manteniéndoles también en ayunas 24 h.

La captura de señal fluorescente en los animales *in vivo* se hizo a través del equipo *IVIS Lumina S5*, manteniendo la anestesia de los ratones con isoflurano. En los ratones CD1, se rasuró el pelo de la zona abdominal para evitar un incremento de la señal fluorescente.

El análisis de imagen y cuantificación de la señal se llevó a cabo con el software *Living Image 4.7.3***. Se detectó la señal fluorescente de la proteína iRFP a tiempos de exposición cortos (<0,5 s) ajustando los parámetros de campo de visión, altura de la platina y sensibilidad y resolución de la imagen (*binning*). La intensidad

de la señal se determinó en *Radiant Efficiency* cuyas unidades son $photons/s/cm^2/steradian$ (*sr*) por $\mu W/cm^2$. También se llevaron a cabo los ajustes de la imagen manteniendo la misma escala de color (máximo, mínimo, brillo y contraste) para eliminar el ruido de fondo y así poder comparar imágenes entre sí.

3.9. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ARNm POR RT-qPCR

3.9.1. Extracción y cuantificación de ARN total

Para extraer el ARN total a partir de homogenados celulares o de muestras de tejido hepático se utilizó el kit comercial *illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit*, que se basa en la elución del ARN adsorbido en la membrana de sílice en agua ultrapura libre de ARNasas, siguiendo las instrucciones del proveedor.

El ARN purificado se cuantificó determinando la absorción a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (*Nanodrop 1000 Spectrophotometer*). Para evaluar la posible contaminación con proteínas, solventes orgánicos y otros compuestos, se determinó la relación de absorbancias a las diferentes longitudes de onda, 260/280 nm y 260/230 nm, respectivamente.

3.9.2. Retrotranscripción (RT)

Para sintetizar el ADNc, que se usaría como molde en la PCR, se realizó una RT del ARN total extraído utilizando el kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* que contiene la transcriptasa reversa (*MultiScribe™ Reverse Transcriptase*) de un virus de la leucemia murina de Moloney recombinante (rMoMuLV).

Para llevar a cabo la síntesis del ADNc se mezclaron 2 μg del ARN total con una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), *random primers*, que actuaron como cebadores de la transcripción, la enzima y su tampón. La reacción en el termociclador se inició incubando la mezcla 10 min a 25°C, seguidos de un ciclo de 120 min a 37°C. Por último, se calentaron 5 min a 85°C, para inactivar la retrotranscriptasa, evitando así su posible interferencia en pasos posteriores.

3.9.3. Diseño de cebadores

La amplificación cuantitativa a tiempo real requiere el empleo de un par de cebadores (directo y reverso) gen- y especie-específicos. La secuencia nucleotídica de las diversas isoformas génicas de interés se obtuvo de la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>).

Para el diseño de los cebadores específicos de cada uno de los genes estudiados por RT-qPCR en esta Tesis Doctoral, cuyas secuencias de nucleótidos se recogen en la Tablas MM-4, siempre que fue posible, se intentó que la secuencia perteneciese a una región entre exones, para así en la amplificación descartar la contaminación de ADN genómico y de ARNm inmaduro. Esta secuencia suele corresponder al extremo 5', pues permitirá la amplificación de más cantidad de secuencias, incluso aquellas que presenten en el extremo 3' la cola de poli(A) parcialmente degradada. También se tuvo en cuenta el tamaño del amplicón.

Se empleó el programa *online OligoAnalyzer 3.1* (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/Oligoanalyzer>) (*Integrated DNA Technologies*) y su especificidad se comprobó con el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Una vez diseñados, los cebadores fueron suministrados liofilizados por la casa comercial Biomers.net. Antes de su uso, se reconstituyeron en agua ultrapura y se valoraron por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm.

3.9.4. Amplificación cuantitativa (qPCR)

La qPCR a tiempo real es una variante de la PCR analítica que permite cuantificar de forma absoluta o relativa el producto amplificado durante la reacción mediante la detección de fluorescencia. Las reacciones de amplificación para un volumen total de 20 μl , estaban constituidas por 10 μl de *SYBR® Select Master Mix* una mezcla con los reactivos necesarios, la pareja de cebadores específica (cebador directo y reverso) a las concentraciones optimizadas (100 nM o 50 nM), 2 μl de ADNc y el resto de volumen hasta 20 μl de agua ultrapura.

Las condiciones de tiempo y temperatura para la qPCR fueron las mismas en todos los casos: una primera incubación de las muestras 2 min a 50°C, seguidos de 10 min a 95°C, y, por último, se sometieron a 40 ciclos de 15 s a 95°C y de 1 min a 60°C. Tras la amplificación, las muestras se calentaron en el termociclador desde 60°C a 95°C, mientras que se monitorizó la fluorescencia para obtener las curvas de desnaturalización del DNA amplificado.

La abundancia del ADN del gen de interés se corrigió por la del gen normalizador *HPRT1*, determinado paralelamente en cada muestra. Las determinaciones se realizaron siempre por duplicado y se incluyeron blancos de reacción, donde se sustituyó el ADNc por agua ultrapura.

3.9.5. Tarjetas microfluídicas (TLDA)

Las tarjetas o placas microfluídicas (*Taqman low density arrays*, TLDA) son placas formadas por 384 pocillos, permitiendo realizar estas reacciones de PCR simultáneamente, ya que cada pocillo de la placa contiene liofilizada la sonda Taqman para el gen de interés. Las TLDA utilizadas fueron del formato de 96, así en cada TLDA se cargaban cuatro muestras por duplicado, por lo que para cada muestra se analizaban 94 genes de interés y los controles endógenos *GAPDH* y *ACTB*.

Las ventajas en el uso de TLDA con respecto a la qPCR convencional son el menor volumen de ADNc necesario, además de ser un método más económico y rápido, también es sensible y fiable.

Para rellenar la TLDA se mezclaba cada uno de los ADNc obtenidos en la reacción de RT (100 ng/puerto) con la mezcla de reactivos *TaqMan™ Universal PCR*

Master Mix, y se cargaba en todos los puertos. Después se centrifugaba la placa dos veces a 300 xg durante 1 min, se sellaba y se desencadenaba la reacción.

Para analizar los resultados, se llevó a cabo una cuantificación relativa como se describe en el apartado siguiente. Para normalizar los valores de Ct de los genes diana se utilizaron los genes *GAPDH* y *ACTB* como controles endógenos (la media de sus valores de ΔCt) y se expresó en %.

3.9.6. Análisis de los resultados: Cuantificación Relativa

La cuantificación relativa se basa en el método de comparación de Ct (*Threshold cycle* o ciclo umbral). Los resultados, normalizados por el gen endógeno correspondiente en cada caso, se expresaron como porcentaje respecto a su abundancia.

$$(\%) = 2^{-\Delta Ct},$$

donde,

$$\Delta Ct = Ct (\text{gen diana}) - Ct (\text{gen endógeno})$$

3.10. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

3.10.1. Obtención de homogeneizados de cultivos celulares

Para obtener homogeneizados proteicos a partir de un cultivo celular, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron en PBS. A continuación, se añadió el volumen deseado de tampón de lisis RIPA suplementado con 1 % (v/v) del cóctel de inhibidores de proteasas (80 μ l de mezcla para cada millón de células) y se raspó la superficie de cultivo con una espátula.

Posteriormente, el homogeneizado se incubó durante 30 min sobre hielo y se centrifugó a 16.000 xg durante 20 min, a 4°C. Finalmente, el sobrenadante (homogeneizado celular) se dividió en alícuotas y se almacenó a -80°C hasta su uso.

3.10.2. Determinación de proteínas totales

Para medir la concentración total de proteínas se utilizó una modificación del método de Lowry realizada por Markwell (Markwell et al., 1978). Como patrón se utilizó una solución madre de albúmina sérica bovina (BSA). El producto resultante

se determinó mediante la lectura espectrofotométrica (*Hitachi U-2000 Spectrophotometer UV VIS*) de la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm.

3.10.3. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis vertical se llevó a cabo en geles de poliacrilamida del 7,5-10 % (p/v), dependiendo del tamaño molecular de la proteína de interés, en Tris-HCl utilizando el sistema *Mini-PROTEAN® Tetra cell* y se dejó polimerizar durante 1 h a temperatura ambiente, primero el gel separador y sobre éste, el gel concentrador. Se introdujo el peine adecuado, evitando crear burbujas, según el número de muestras que se deseara cargar en él y se dejó polimerizar.

La electroforesis se realizó en una cubeta con tampón de migración a una intensidad constante de 15 mA para el gel concentrador, incrementándose a 30 mA para el gel separador.

Las muestras (30-50 µg de proteínas) se trataron añadiendo un volumen de 0,125 M Tris-HCl pH 6,8 conteniendo SDS 4,6 % (p/v), 5 % (v/v) de β-mercaptoetanol, 4 % (p/v) de azul de bromofenol y 0,05 volúmenes de glicerol. Se incubaron durante 5 min en un baño de agua hirviendo, según la proteína de interés. Se utilizaron los marcadores de pesos moleculares de proteínas *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa* o *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards*.

3.10.4. Transferencia

Tras la electroforesis, se llevó a cabo la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa. Se realizó en una cubeta (*Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell*) con tampón de transferencia, a una corriente constante (250 mA) durante 90-120 min, en frío y en agitación en un agitador magnético calefactor.

3.10.5. Inmunodetección

Las membranas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación con BSA o leche descremada al 1-5 % (p/v) en tampón TBS-T.

A continuación, se incubaban toda la noche a 4°C en agitación con el anticuerpo primario correspondiente. Los anticuerpos primarios empleados se recogen en la Tabla MM-5 diluidos al 1 % en BSA o en leche descremada al 1 % o 5 % (p/v) en TBS-T, según las indicaciones del proveedor. Tras lavar la membrana con TBS-T, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación con el anticuerpo secundario adecuado unido a peroxidasa (HRP).

3.10.6. Revelado

El revelado se realizó mediante un método quimioluminiscente y un equipo de análisis de imagen *LAS-4000* o *ChemiDoc*. La membrana lavada en TBS-T, se incubó en oscuridad durante 1 min, sin agitación, con los reactivos de detección *ECL™ Western Blotting Analysis System*, mezclados a partes iguales. Los tiempos de exposición en el equipo de análisis de imagen se adecuaron para obtener una señal detectable con el menor ruido de fondo.

3.11. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

Para el marcaje de proteínas por IHQ en cortes de tejidos humanos se utilizaron las plataformas automatizadas *BOND-III™* y *BenchMark ULTRA* del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca. Las muestras se obtuvieron de un TMA previamente generado en nuestro grupo de investigación.

Las secciones de tejidos se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla MM-6) y tras el lavado con *Bond Wash Solution*, con el anticuerpo secundario marcado con HRP. Después de un segundo lavado con la solución de lavado, se incubó con diaminobenzidina (DAB) y se realizó una contratinción con hematoxilina. Por último, se llevó a cabo una deshidratación en alcoholes de gradación creciente, inmersión en xilol y montaje con medio permanente “DEXPEX”. Las imágenes se analizaron con el programa OlyVIA.

3.12. MÉTODOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.12.1. PCR de alta fidelidad

La PCR de alta fidelidad para la obtención de las ORF de los genes de interés se llevó a cabo con la enzima Taq polimerasa o con el kit *AccuPrime Pfx SuperMix*. Se preparó una mezcla con ADN molde (de diferente origen para cada ORF) y los reactivos suministrados por el kit siguiendo las indicaciones del proveedor. La mezcla se incubó en un termociclador con las siguientes condiciones: 1 ciclo a 95°C, 5 min; 40 ciclos de 95°C, 15 s; 58°C, 30 s y 68°C durante un tiempo variable (1 min por cada kb del amplicón); y un ciclo final de extensión a 68°C durante 10 min. En todos los casos se utilizó un gradiente de temperatura de anillamiento para la elección de la temperatura más adecuada, y en algunos casos, solo se logró la amplificación de la ORF disminuyendo 5°C la temperatura de anillamiento, para facilitar la unión de los cebadores (Tabla MM-7) a la hebra molde y que fuese más estable el dímero cebador-ADN molde durante los cinco primeros ciclos. En algunos casos se añadió a la mezcla de PCR DMSO al 5 % (v/v) que relaja las tensiones entre las hebras, facilitando la amplificación de las regiones más difíciles al disminuir las estructuras secundarias del ADN. Los productos obtenidos en la PCR se visualizaron en una electroforesis de geles de agarosa al 1-2 % y las bandas de los tamaños adecuados se purificaron por extracción del ADN contenido en la agarosa (apartado 3.12.4.).

3.12.2. Digestión con enzimas de restricción

La mezcla de digestión para 1 µg de ADN contenía 1 µl de cada enzima de restricción (5 U/µg de ADN), el tampón de reacción 10x correspondiente y agua ultrapura hasta un volumen final de 20 µl.

Las condiciones de digestión dependieron de las enzimas de restricción empleadas. En el caso de que fueran enzimas *FastDigest* bastó con mantener la reacción a 37°C durante 7 min. En caso de que no fueran enzimas *FastDigest*, sino clásicas, las condiciones de digestión específicas para cada enzima venían determinadas por el proveedor, pero generalmente eran 37°C durante 3 h. A continuación, se paraba la digestión mediante la inactivación de las enzimas a la temperatura y tiempo recomendados. Los fragmentos de ADN se separaban para su

análisis por electroforesis en gel de agarosa y se visualizaba el patrón de bandas resultante en un equipo de imagen.

3.12.3. Electroforesis en gel de agarosa no desnaturalizante

La preparación de los geles de agarosa se hizo a partir de tampón TAE con 1-2 % de agarosa (p/v), dependiendo del tamaño de los amplicones a analizar. Se calentó la mezcla hasta su ebullición para disolver la agarosa y se añadió 10 % de *SYBR™ Safe DNA Gel Stain* (v/v) para teñir el ADN y visualizarlo por fluorescencia. Como patrón de tamaños moleculares de ADN se empleó un estándar de 1 kb. Las bandas correspondientes a los fragmentos de ADN se visualizaron en un equipo de análisis de imagen.

3.12.4. Purificación del ADN

El producto de amplificación contenido en los geles de agarosa o el producto de reacciones enzimáticas se purificó con el fin de aumentar la pureza del ADN. Para la purificación por columna del ADN se empleó el kit *illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification*, extrayendo el ADN según las indicaciones del proveedor.

3.12.5. Secuenciación de ADN

La identidad de los plásmidos clonados y de los productos de PCR se determinó mediante secuenciación convencional (Sanger) de terminación de la cadena en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca. Las muestras contenían 400-600 ng de ADN plasmídico o 100 ng para productos de PCR de 1 kb de longitud y 3,3 pmol de un cebador específico disueltos en 8 µl de agua ultrapura o solo el ADN molde en un volumen de 5 µl de agua, si el cebador era añadido por el servicio.

3.13. RECUENTO DE CÉLULAS TRANSDUCIDAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para cuantificar la cantidad de células que expresaban las construcciones de interés tras la transducción viral se determinó mediante citometría de flujo la fluorescencia celular debida a la expresión de los genes reporteros EGFP o iRFP.

Para ello las células se sembraron a la densidad adecuada en una placa de 96 pocillos. Pasadas 24 h se añadieron a la placa los lentivirus en medio de cultivo con polibreno 1x. A continuación, la placa se centrifugó a 1.800 $\times g$ durante 90 min a 32°C, con el fin de facilitar el proceso de infección. Tras 16 h de incubación, se realizó un cambio del medio de cultivo y se añadió doxiciclina en los casos necesarios (lentivirus portadores del sistema IGEC). A tiempo final, se determinó el porcentaje de células fluorescentes por la expresión de EGFP e iRFP mediante citometría de flujo.

3.14. ESTUDIOS *IN SILICO* DE LOS GENES DE INTERÉS

Los niveles de expresión de los genes de interés, sus dianas, así como de los genes normalizadores *ACTB* y *GAPDH*, para pacientes con CCA se obtuvieron de la base de datos *The Cancer Genome Atlas* (TCGA, TCGA-CHOL) que cuenta con un número relativamente pequeño de muestras humanas (n=9 para tejido adyacente no tumoral, NT y n=36 para tejido tumoral, T) a través de la herramienta gratuita R y RStudio. También se usaron otras bases de datos como COSMIC, *SpliceSeq* (<https://bioinformatics.mdanderson.org/TCGASpliceSeq>), *cBioPortal for Cancer Genomics* (<http://cbioportal.org>), *National Cancer Institute GDC Data portal* (<https://portal.gdc.cancer.gov/>), *GEMiCCL (Gene Expression and Mutations in Cancer Cell Lines)* (<https://www.kobic.kr/GEMICCL/>), *Cellosaurus* (<https://www.expasy.org/resources/cellosaurus>) y la base de datos de TP53 (<https://tp53.isb-cgc.org/>. Versión R20, julio 2019).

3.15. ANÁLISIS Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

En primer lugar, para explorar la normalidad de los datos se realizó la prueba de Shapiro-Wilks dado el tamaño muestral. También se realizaron los diagramas de *Box-plot* para la confirmación de la normalidad y detección de datos atípicos. Teniendo en cuenta los datos, se llevaron a cabo pruebas estadísticas paramétricas o no paramétricas, según los resultados a analizar.

Para la determinación de la significación estadística (p) se aplicó la prueba t de *Student* de valores pareados o no pareados o sus versiones para datos no paramétricos como la prueba de Wilcoxon o de Mann-Whitney, según correspondiese. En los casos donde se compararon tres o más grupos, se realizó un

análisis de varianza, ANOVA o Kruskal-Wallis, dependiendo si los datos seguían una distribución paramétrica o no, respectivamente. Para determinar la significación de las comparaciones múltiples se realizó la prueba de Bonferroni, Dunnett o Dunn, según correspondiese. Para el análisis estadístico sobre la relación entre los niveles de expresión de *TP53* y *CDKN1A*, se empleó el método de mínimos cuadrados. El manejo de los datos y análisis estadístico fue realizado con los programas *Excel* de *Microsoft Office* y *GraphPad Prism 6* (*GraphPad Software, Inc.*).

CAPÍTULO I.

Desarrollo de una herramienta
de expresión génica inducible
para la visualización de
tumores *in vivo*

4.1. RESULTADOS

Los sistemas de expresión inducible son herramientas adecuadas para la manipulación de la expresión génica de manera controlada y reversible (Das et al., 2016; Gossen & Bujard, 1992). Uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue desarrollar una herramienta génica basada en el mecanismo de acción del sistema controlado por tetraciclinas TetOn, a la que se denominó IGEC. El diseño experimental consistió en generar una construcción génica que permitiese la expresión inducible y específica en las células de un gen de interés (transgén) en respuesta a la administración de tetraciclinas como agente inductor.

La segunda etapa de este estudio consistió en evaluar el potencial de esta herramienta para su uso en células de CCA con doble intencionalidad dependiendo del transgén que se incorporase. Por un lado, se apostó por el empleo de IGEC como herramienta marcadora para permitir el seguimiento del crecimiento tumoral en ratones, tanto generados tras el implante de células tumorales como formados en el animal tras manipulación génica de células sanas. Para ello, se decidió incorporar en la construcción la ORF de una proteína fluorescente en el infrarrojo cercano (iRFP), debido a que la radiación a estas longitudes de onda de emisión presenta una mayor capacidad de penetración en los tejidos vivos que la radiación con otras longitudes de onda. Por otro lado, en otros objetivos de esta Tesis Doctoral se utilizó el IGEC como vector para la expresión modulada de genes supresores tumorales.

CAPÍTULO II.

Papel de proteínas inhibidoras
de la vía WNT en la
sensibilidad de células de CCA
a fármacos antitumorales

5.1. RESULTADOS

La falta de un tratamiento efectivo frente al CCA hace que sea muy necesaria la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos más eficaces.

Una de las vías de señalización más importantes en CCA es la ruta WNT/ β -catenina. Esta vía intracelular está relacionada con el desarrollo, proliferación, comunicación y supervivencia de las células sanas. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que alteraciones en esta vía contribuyen al desarrollo del CCA (Boulter et al., 2015; Perugorria et al., 2019; Zhang et al., 2013). Además, estudios previos indican que la hiperactividad de esta vía de señalización en CCA se asocia, entre otros, con un aumento de expresión de *BIRC5*, que codifica la proteína survivina, relacionándose con un aumento de algunas características de malignidad como la elevada tasa de proliferación y la invasividad celular, así como con un peor pronóstico de estos pacientes (Chang et al., 2004; Javle et al., 2004; Koprowski et al., 2015; Obama et al., 2005; Zhong et al., 2015).

Por ello, nos planteamos como uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral el dilucidar si ciertos elementos de la ruta WNT/ β -catenina podrían estar implicados en modular la sensibilidad a fármacos antitumorales.

CAPÍTULO III.

Papel de p53 en la
quimiosensibilización

6.1. RESULTADOS

El gen *TP53*, que codifica la proteína supresora tumoral p53, es el gen con mayor frecuencia de mutaciones en tumores hepáticos primarios, ya sean variantes genéticas o CNV (COSMIC, 2022).

La frecuencia de aparición de variantes genéticas de *TP53* en CCA es elevada, mayor del 25 % (National Cancer Institute, 2019). Sin embargo, estas alteraciones aparecen principalmente en eCCA, en los que su frecuencia llega a ser del 45 % (Goepfert et al., 2020; Simbolo et al., 2019; Wardell et al., 2018). Mientras que en los iCCA esta frecuencia es del 20 % (Cerami et al., 2012; Gao et al., 2013; Wang et al., 2022). La mayoría de las variantes genéticas conllevan cambios de aminoácidos y la pérdida de la funcionalidad proteica. La disminución de la expresión de *TP53* o la pérdida de su función están implicados en el fenotipo MDR en muchos tipos de cáncer, pero su papel en el CCA es menos conocido. Por ello, quisimos estudiar en líneas celulares de CCA el efecto de la expresión de la variante silvestre de *TP53* en el perfil de expresión de genes de quimiorresistencia y la sensibilidad a fármacos utilizados frente a este tipo de tumor.

7. CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN PRIMERA

Se ha desarrollado una herramienta de ingeniería genética, denominada IGEC, que contiene un elemento de respuesta a tetraciclinas (TRE), para llevar a cabo la expresión forzada e inducible del gen de interés. Esta construcción versátil, permite la clonación de la ORF del transgén bajo el control transcripcional bidireccional de dos promotores, uno con selectividad para células tumorales y otro para tipo celular.

CONCLUSIÓN SEGUNDA

Los vectores lentivirales con la construcción IGEC portadora de la secuencia codificante de una proteína fluorescente infrarroja, son una herramienta útil para la visualización de tumores hepáticos en ratones intactos, ya que esta fluorescencia atraviesa los tejidos con mínimo apantallamiento.

CONCLUSIÓN TERCERA

La expresión forzada de manera individual de las proteínas GSK3 β , axina 1 y axina 2, que forman parte del complejo de destrucción de la β -catenina, no consigue disminuir la actividad exacerbada de la vía de señalización WNT/ β -catenina en CCA ni tampoco modificar el fenotipo de quimiorresistencia de estas células.

CONCLUSIÓN CUARTA

La expresión forzada de *TP53* en células de CCA modifica el resistoma, afectando principalmente a la expresión de genes implicados en el balance entre apoptosis y supervivencia, favoreciendo la apoptosis en respuesta a fármacos antitumorales.

CONCLUSIÓN QUINTA

La expresión forzada de p53 silvestre en células de CCA puede ser una aproximación terapéutica eficaz, al presentar un efecto dual, actuando como supresor tumoral y potenciando la respuesta farmacológica, principalmente a agentes antitumorales derivados del platino.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah, E. A., Fanelli, M. F., Buim, M. E. C., Machado Netto, M. C., Gasparini Junior, J. L., Souza E Silva, V., Dettino, A. L. A., Mingues, N. B., Romero, J. V., Ocea, L. M. M., Rocha, B. M. M., Alves, V. S., Araújo, D. V., & Chinen, L. T. D. (2015). Thymidylate synthase expression in circulating tumor cells: A new tool to predict 5-fluorouracil resistance in metastatic colorectal cancer patients. *International Journal of Cancer*, 137(6). <https://doi.org/10.1002/ijc.29495>
- Agha-Mohammadi, S., O'Malley, M., Etemad, A., Wang, Z., Xiao, X., & Lotze, M. T. (2004). Second-generation tetracycline-regulatable promoter: Repositioned tet operator elements optimize transactivator synergy while shorter minimal promoter offers tight basal leakiness. *Journal of Gene Medicine*, 6(7). <https://doi.org/10.1002/jgm.566>
- Ahler, E., Sullivan, W. J., Cass, A., Braas, D., York, A. G., Bensinger, S. J., Graeber, T. G., & Christofk, H. R. (2013). Doxycycline Alters Metabolism and Proliferation of Human Cell Lines. *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064561>
- Ahmad, S., Badr, B., Khan, A., Rehman, R., Ghias, K., Muhammad, J. S., & Khan, M. R. (2021). The Role of K-Ras and P53 in Biliary Tract Carcinoma. En *Journal of the Pakistan Medical Association* (Vol. 71, Issue 10, pp. 2378-2384). Pakistan Medical Association. <https://doi.org/10.47391/JPMA.11-1322>
- Akula, S. M., Abrams, S. L., Steelman, L. S., Emma, M. R., Augello, G., Cusimano, A., Azzolina, A., Montalto, G., Cervello, M., & McCubrey, J. A. (2019). RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/PTEN/AKT/mTORC1 and TP53 pathways and regulatory miRs as therapeutic targets in hepatocellular carcinoma. En *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (Vol. 23, Issue 11, pp. 915-929). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1685501>
- Al-Abdulla, R., Lozano, E., Macias, R. I. R., Monte, M. J., Briz, O., O'Rourke, C. J., Serrano, M. A., Banales, J. M., Avila, M. A., Martinez-Chantar, M. L., Geier, A., Andersen, J. B., & Marin, J. J. G. (2019). Epigenetic events involved in organic cation transporter 1-dependent impaired response of hepatocellular carcinoma to sorafenib. *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/bph.14563>
- Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H., & Boyd, M. R. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research*, 48(3), 589-601.
- Alonso-Peña, M., Sanchez-Martin, A., Sanchon-Sanchez, P., Soto-Muñiz, M., Espinosa-Escudero, R., & Marin, J. J. G. (2019). Pharmacogenetics of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. En *Cancer Drug Resistance* (Vol. 2, Issue 3). <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.006>
- American Cancer Society. (2019). What is liver cancer? American Cancer Society. Retrieved July 26, 2022, from <https://www.cancer.org/cancer/liver-cancer/about/what-is-liver-cancer.html>
- Amin, M. B., Greene, F. L., & Edge, S. B. (2017). *Ajcc cancer staging manual*. AJCC, American Joint Committee on Cancer.
- Andersen, J. B., Spee, B., Blechacz, B. R., Avital, I., Komuta, M., Barbour, A., Conner, E. A., Gillen, M. C., Roskams, T., Roberts, L. R., Factor, V. M., & Thorgeirsson, S. S. (2012). Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors. *Gastroenterology*, 142(4). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.005>
- Angosto, C. M., & García, F. F. (1987). Aspectos bioquímicos y farmacológicos en disfunciones Hepáticas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Arbelaiz, A., Azkargorta, M., Krawczyk, M., Santos-Laso, A., Lapitz, A., Perugorria, M. J., Erice, O., Gonzalez, E., Jimenez-Agüero, R., Lacasta, A., Ibarra, C., Sanchez-Campos, A., Jimeno, J. P., Lammert, F., Milkiewicz, P., Marzioni, M., Macias, R. I. R., Marin, J. J. G., Patel, T., ... Banales, J. M. (2017). Serum extracellular vesicles contain protein biomarkers for primary sclerosing cholangitis and cholangiocarcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 66(4), 1125-1143. <https://doi.org/10.1002/hep.29291>
- Armengol, C., Cairo, S., Fabre, M., & Buendia, M. A. (2011). Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: The hepatoblastoma model. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 43(2). <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.07.012>

- Arora, D. S., Ramsdale, J., Lodge, J. P. A., & Wyatt, J. I. (1999). p53 but not bcl-2 is expressed by most cholangiocarcinomas: A study of 28 cases. *Histopathology*, 34(6). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1999.00654.x>
- Ashida, K., Terada, T., Kitamura, Y., & Kaibara, N. (1998). Expression of E-cadherin, α -catenin, β -catenin, and CD44 (standard and variant isoforms) in human cholangiocarcinoma: An immunohistochemical study. *Hepatology*, 27(4). <https://doi.org/10.1002/hep.510270412>
- Athanasopoulos, T., Munye, M. M., & Yáñez-Muñoz, R. J. (2017a). Nonintegrating Gene Therapy Vectors. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 31(5), 753-770. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2017.06.007>
- Athanasopoulos, T., Munye, M. M., & Yáñez-Muñoz, R. J. (2017b). Nonintegrating Gene Therapy Vectors. En *Hematology/Oncology Clinics of North America* (Vol. 31, Issue 5, pp. 753-770). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2017.06.007>
- Aubrey, B. J., Strasser, A., & Kelly, G. L. (2016). Tumor-suppressor functions of the TP53 pathway. En *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* (Vol. 6, Issue 5). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026062>
- Bailey, S. R., & Maus, M. v. (2019). Gene editing for immune cell therapies. En *Nature Biotechnology* (Vol. 37, Issue 12, pp. 1425-1434). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0137-8>
- Banales, J. M., Marin, J. J. G., Lamarca, A., Rodrigues, P. M., Khan, S. A., Roberts, L. R., Cardinale, V., Carpino, G., Andersen, J. B., Braconi, C., Calvisi, D. F., Perugorria, M. J., Fabris, L., Boulter, L., Macias, R. I. R., Gaudio, E., Alvaro, D., Gradilone, S. A., Strazzabosco, M., ... Gores, G. J. (2020). Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 17(9), 557-588. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0310-z>
- Barrilleaux, B., & Knoepfler, P. (2011). Transduction of human cells with polymer-complexed ecotropic lentivirus for enhanced biosafety. *Journal of Visualized Experiments*, 53. <https://doi.org/10.3791/2822>
- Baugh, E. H., Ke, H., Levine, A. J., Bonneau, R. A., & Chan, C. S. (2018). Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers? En *Cell Death and Differentiation* (Vol. 25, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.180>
- Belkouz, A., Vos-Geelen, J. de, Eskens, F., Mathot, R. A. A., van Gulik, T., van Oijen, M. G. H., Punt, C. J. A., Wilmink, J., & Kluempfen, H.-J. (2019). Efficacy and safety of FOLFIRINOX in advanced biliary tract cancer after failure of gemcitabine plus cisplatin: A phase II trial. *Journal of Clinical Oncology*, 37(15_suppl), 4086. https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.4086
- Bell, J. B., Podetz-Pedersen, K. M., Aronovich, E. L., Belur, L. R., & McIvor, R. S. (2007). Preferential delivery of the sleeping beauty transposon system to livers of mice by hydrodynamic injection. *Nature Protocols*, 2(12). <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.471>
- Bengala, C., Bertolini, F., Malavasi, N., Boni, C., Aitini, E., Dealis, C., Zironi, S., Depenni, R., Fontana, A., del Giovane, C., Luppi, G., & Conte, P. (2010). Sorafenib in patients with advanced biliary tract carcinoma: A phase II trial. *British Journal of Cancer*, 102(1). <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605458>
- Ben-Josef, E., Guthrie, K. A., El-Khoueiry, A. B., Corless, C. L., Zalupski, M. M., Lowy, A. M., Thomas, C. R., Alberts, S. R., Dawson, L. A., Micetich, K. C., Thomas, M. B., Siegel, A. B., & Blanke, C. D. (2015). SWOG S0809: A phase II intergroup trial of adjuvant capecitabine and gemcitabine followed by radiotherapy and concurrent capecitabine in extrahepatic cholangiocarcinoma and gallbladder carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 33(24). <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.60.2219>
- Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S. W., Luzio, J. P., Simari, R., & Weissberg, P. (1998). Cell surface trafficking of Fas: A rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science*, 282(5387). <https://doi.org/10.1126/science.282.5387.290>
- Bertuccio, P., Malvezzi, M., Carioli, G., Hashim, D., Boffetta, P., El-Serag, H. B., la Vecchia, C., & Negri, E. (2019). Global trends in mortality from intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma. *Journal of Hepatology*, 71(1), 104-114. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.03.013>

- Boeck, J. de, & Verfaillie, C. (2021). Doxycycline inducible overexpression systems: How to induce your gene of interest without inducing misinterpretations. En *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 32, Issue 17). <https://doi.org/10.1091/mbc.E21-04-0177>
- Borbath, I., Verbrugge, L., Lai, R., Gigot, J. F., Humblet, Y., Piessevaux, H., & Sempoux, C. (2012). Human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) expression is a potential predictive tool for response to gemcitabine in patients with advanced cholangiocarcinoma. *European Journal of Cancer*, 48(7). <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.11.006>
- Borger, D. R., Tanabe, K. K., Fan, K. C., Lopez, H. U., Fantin, V. R., Straley, K. S., Schenkein, D. P., Hezel, A. F., Ancukiewicz, M., Liebman, H. M., Kwak, E. L., Clark, J. W., Ryan, D. P., Deshpande, V., Dias-Santagata, D., Ellisen, L. W., Zhu, A. X., & Iafrate, A. J. (2012). Frequent Mutation of Isocitrate Dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in Cholangiocarcinoma Identified Through Broad-Based Tumor Genotyping. *The Oncologist*, 17(1). <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2011-0386>
- Boulter, L., Govaere, O., Bird, T. G., Radulescu, S., Ramachandran, P., Pellicoro, A., Ridgway, R. A., Seo, S. S., Spee, B., van Rooijen, N., Sansom, O. J., Iredale, J. P., Lowell, S., Roskams, T., & Forbes, S. J. (2012). Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. *Nature Medicine*, 18(4). <https://doi.org/10.1038/nm.2667>
- Boulter, L., Guest, R. v., Kendall, T. J., Wilson, D. H., Wojtacha, D., Robson, A. J., Ridgway, R. A., Samuel, K., van Rooijen, N., Barry, S. T., Wigmore, S. J., Sansom, O. J., & Forbes, S. J. (2015). WNT signaling drives cholangiocarcinoma growth and can be pharmacologically inhibited. *Journal of Clinical Investigation*, 125(3). <https://doi.org/10.1172/JCI76452>
- Bourdon, J. C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D. P., Saville, M. K., & Lane, D. P. (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes and Development*, 19(18). <https://doi.org/10.1101/gad.1339905>
- Brattsand, M. (2020). Doxycycline at Low Concentrations Could Influence Your Experimental Results When Working With Prostate Cancer Cell Lines. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 28(2). <https://doi.org/10.26717/bjstr.2020.28.004636>
- Brayshaw, L. L., Martinez-Fleites, C., Athanasopoulos, T., Southgate, T., Jespers, L., & Herring, C. (2021). The role of small molecules in cell and gene therapy. En *RSC Medicinal Chemistry* (Vol. 12, Issue 3, pp. 330-352). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d0md00221f>
- Bridgewater, J., Palmer, D., Cunningham, D., Iveson, T., Gillmore, R., Waters, J., Harrison, M., Wasan, H., Corrie, P., & Valle, J. (2013). Outcome of second-line chemotherapy for biliary tract cancer. En *European Journal of Cancer* (Vol. 49, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.11.024>
- Burgess, A. W., Faux, M. C., Layton, M. J., & Ramsay, R. G. (2011). Wnt signaling and colon tumorigenesis - A view from the periphery. En *Experimental Cell Research* (Vol. 317, Issue 19). <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.08.010>
- Bykov, V. J. N., Eriksson, S. E., Bianchi, J., & Wiman, K. G. (2018). Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. En *Nature Reviews Cancer* (Vol. 18, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.109>
- Campomenosi, P., Monti, P., Aprile, A., Abbondandolo, A., Frebourg, T., Gold, B., Crook, T., Inga, A., Resnick, M. A., Iggo, R., & Fronza, G. (2001). P53 mutants can often transactivate promoters containing a p21 but not Bax or PIG3 responsive elements. *Oncogene*, 20(27). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204468>
- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A., Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A. P., Sander, C., & Schultz, N. (2012). Centers for Disease Control and Prevention. (2021). Liver cancer. Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved July 26, 2022, from <https://www.cdc.gov/cancer/liver/>
- The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discovery*, 2(5). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>
- Chan, K. T., & Lung, M. L. (2004). Mutant p53 expression enhances drug resistance in a hepatocellular carcinoma cell line. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 53(6). <https://doi.org/10.1007/s00280-004-0767-4>

- Chang, Q., Liu, Z. R., Wang, D. Y., Kumar, M., Chen, Y. B., & Qin, R. Y. (2004). Survivin expression induced by doxorubicin in cholangiocarcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, *10*(3). <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i3.415>
- Chen, H. Y., Lang, Y. D., Lin, H. N., Liu, Y. R., Liao, C. C., Nana, A. W., Yen, Y., & Chen, R. H. (2019). miR-103/107 prolong Wnt/ β -catenin signaling and colorectal cancer stemness by targeting Axin2. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41053-z>
- Chen, X., & Calvisi, D. F. (2014). Hydrodynamic transfection for generation of novel mouse models for liver cancer research. En *American Journal of Pathology* (Vol. 184, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.12.002>
- Chiang, K. C., Yeh, T. sen, Wu, R. C., Pang, J. H. S., Cheng, C. T., Wang, S. Y., Juang, H. H., & Yeh, C. N. (2016). Lipocalin 2 (LCN2) is a promising target for cholangiocarcinoma treatment and bile LCN2 level is a potential cholangiocarcinoma diagnostic marker. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep36138>
- Choi, W., Cogdell, D., Feng, Y., Hamilton, S. R., & Zhang, W. (2006). Transcriptional activation of the carboxylesterase 2 gene by the p53 pathway. *Cancer Biology and Therapy*, *5*(11). <https://doi.org/10.4161/cbt.5.11.3271>
- Choodetwattana, P., Proungvitaya, S., Jearanaikoon, P., & Limpai boon, T. (2019). The upregulation of OCT4 in acidic extracellular pH is associated with gemcitabine resistance in cholangiocarcinoma cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *20*(9). <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.9.2745>
- Chuaysri, C., Thuwajit, P., Paupairoj, A., Chau-In, S., Suthiphongchai, T., & Thuwajit, C. (2009). Alpha-smooth muscle actin-positive fibroblasts promote biliary cell proliferation and correlate with poor survival in cholangiocarcinoma. *Oncology Reports*, *21*(4). https://doi.org/10.3892/or_00000309
- Chung, Y. M., Park, S. H., Park, J. K., Kim, Y. T., Kang, Y. K., & Yoo, Y. do. (2000). Establishment and characterization of 5-fluorouracil-resistant gastric cancer cells. *Cancer Letters*, *159*(1). [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(00\)00535-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(00)00535-8)
- Ciriello, G., Miller, M. L., Aksoy, B. A., Senbabaoglu, Y., Schultz, N., & Sander, C. (2013). Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nature Genetics*, *45*(10). <https://doi.org/10.1038/ng.2762>
- Clément-Lacroix, P., Ai, M., Morvan, F., Roman-Roman, S., Vayssière, B., Belleville, C., Estrera, K., Warman, M. L., Baron, R., & Rawadi, G. (2005). Lrp5-independent activation of Wnt signaling by lithium chloride increases bone formation and bone mass in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(48). <https://doi.org/10.1073/pnas.0505259102>
- Clements, O., Eliahoo, J., Kim, J. U., Taylor-Robinson, S. D., & Khan, S. A. (2020). Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Hepatology*, *72*(1), 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.09.007>
- Clevers, H. (2006). Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. En *Cell* (Vol. 127, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018>
- Condiotti, R., Curran, M. A., Nolan, G. P., Giladi, H., Ketzinel-Gilad, M., Gross, E., & Galun, E. (2004). Prolonged liver-specific transgene expression by a non-primate lentiviral vector. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *320*(3). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.044>
- COSMIC. (2022). TP53 gene - cosmic. TP53 Gene - Somatic Mutations in Cancer. Retrieved October 28, 2022, from <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=TP53>
- Costello, A., Lao, N. T., Gallagher, C., Capella Roca, B., Julius, L. A. N., Suda, S., Ducrée, J., King, D., Wagner, R., Barron, N., & Clynes, M. (2019). Leaky Expression of the TET-On System Hinders Control of Endogenous miRNA Abundance. *Biotechnology Journal*, *14*(3). <https://doi.org/10.1002/biot.201800219>
- Curia, M. C., Zuckermann, M., de Lellis, L., Catalano, T., Lattanzio, R., Aceto, G., Veschi, S., Cama, A., Otte, J. B., Piantelli, M., Mariani-Costantini, R., Cetta, F., & Battista, P. (2008). Sporadic childhood hepatoblastomas show activation of β -catenin, mismatch repair defects and p53 mutations. *Modern Pathology*, *21*(1). <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800977>

- Dalsgaard, T., Cecchi, C. R., Askou, A. L., Bak, R. O., Andersen, P. O., Hougaard, D., Jensen, T. G., Dagnæs-Hansen, F., Mikkelsen, J. G., Corydon, T. J., & Aagaard, L. (2018). Improved Lentiviral Gene Delivery to Mouse Liver by Hydrodynamic Vector Injection through Tail Vein. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 12. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.07.005>
- Danieau, G., Morice, S., Renault, S., Brion, R., Biteau, K., Amiaud, J., Cadé, M., Heymann, D., Lézot, F., Verrecchia, F., Rédini, F., & Royer, B. B. le. (2021). Icg-001, an inhibitor of the β -catenin and camp response element-binding protein dependent gene transcription, decreases proliferation but enhances migration of osteosarcoma cells. *Pharmaceuticals*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/ph14050421>
- Das, A. T., Zhou, X., Metz, S. W., Vink, M. A., & Berkhout, B. (2016). Selecting the optimal Tet-On system for doxycycline-inducible gene expression in transiently transfected and stably transduced mammalian cells. *Biotechnology Journal*, 11(1). <https://doi.org/10.1002/biot.201500236>
- de Galarreta, M. R., Bresnahan, E., Molina-Sánchez, P., Lindblad, K. E., Maier, B., Sia, D., Puigvehi, M., Miguela, V., Casanova-Acebes, M., Dhainaut, M., Villacorta-Martin, C., Singhi, A. D., Moghe, A., von Felden, J., Grinspan, L. T., Wang, S., Kamphorst, A. O., Monga, S. P., Brown, B. D., ... Lujambio, A. (2019). β -catenin activation promotes immune escape and resistance to anti-PD-1 therapy in hepatocellular carcinoma. *Cancer Discovery*, 9(8). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0074>
- de La Monte, S. M., Sohn, Y. K., & Wands, J. R. (1997). Correlates of p53- and Fas (CD95)-mediated apoptosis in Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 152(1). [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(97\)00131-7](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(97)00131-7)
- Denning, W., Das, S., Guo, S., Xu, J., Kappes, J. C., & He1, Z. (2013). Optimization of the transductional efficiency of lentiviral vectors: Effect of sera and polycations. *Molecular Biotechnology*, 53(3). <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9528-5>
- DiCarlo, J. E., Deeconda, A., & Tsang, S. H. (2017). Viral vectors, engineered cells and the CRISPR revolution. En *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1016, pp. 3-27). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-3-319-63904-8_1
- Doherty, B., Nambudiri, V. E., & Palmer, W. C. (2017). Update on the Diagnosis and Treatment of Cholangiocarcinoma. *Current Gastroenterology Reports*, 19(1), 2. <https://doi.org/10.1007/s11894-017-0542-4>
- Doll R, Payne P, Waterhouse JAH, editors (1966). Cancer incidence in five continents, Vol. I. Geneva: Union Internationale Contre le Cancer. ISBN: 978-3-540-03475-9.
- Dutta, S., Pregartner, G., Rücker, F. G., Heitzer, E., Zebisch, A., Bullinger, L., Berghold, A., Döhner, K., & Sill, H. (2020). Functional classification of tp53 mutations in acute myeloid leukemia. *Cancers*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/cancers12030637>
- Ebata, T., Hirano, S., Konishi, M., Uesaka, K., Tsuchiya, Y., Ohtsuka, M., Kaneoka, Y., Yamamoto, M., Ambo, Y., Shimizu, Y., Ozawa, F., Fukutomi, A., Ando, M., Nimura, Y., Nagino, M., Nakamori, S., Ajiki, T., Baba, H., Yamaguchi, R., ... Yanaga, K. (2018). Randomized clinical trial of adjuvant gemcitabine chemotherapy versus observation in resected bile duct cancer. *British Journal of Surgery*, 105(3). <https://doi.org/10.1002/bjs.10776>
- Eckel, F., & Schmid, R. M. (2007). Chemotherapy in advanced biliary tract carcinoma: A pooled analysis of clinical trials. *British Journal of Cancer*, 96(6). <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603648>
- Edeline, J., Benabdelghani, M., Bertaut, A., Watelet, J., Hammel, P., Joly, J. P., Boudjema, K., Fartoux, L., Bouhier-Leporrier, K., Jouve, J. L., Faroux, R., Guerin-Meyer, V., Kurtz, J. E., Assénat, E., Seitz, J. F., Baumgaertner, I., Tougeron, D., de la Fouchardière, C., Lombard-Bohas, C., ... Phelip, J. M. (2019). Gemcitabine and oxaliplatin chemotherapy or surveillance in resected biliary tract cancer (Prodige 12-accord 18-Unicancer GI): A randomized phase III study. *Journal of Clinical Oncology*, 37(8). <https://doi.org/10.1200/JCO.18.00050>
- El-Deiry, W. S. (2016). p21(WAF1) mediates cell-cycle inhibition, relevant to cancer suppression and therapy. En *Cancer Research* (Vol. 76, Issue 18). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2055>
- El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75(4). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90500-P](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90500-P)

- Emami, K. H., Nguyen, C., Ma, H., Kim, D. H., Jeong, K. W., Eguchi, M., Moon, R. T., Teo, J. L., Oh, S. W., Kim, H. Y., Moon, S. H., Hall, J. R., & Kahn, M. (2004). A small molecule inhibitor of β -catenin/cyclic AMP response element-binding protein transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(34). <https://doi.org/10.1073/pnas.0404875101>
- Faux, M. C., Coates, J. L., Catimel, B., Cody, S., Clayton, A. H. A., Layton, M. J., & Burgess, A. W. (2008). Recruitment of adenomatous polyposis coli and β -catenin to axin-puncta. *Oncogene*, *27*(44). <https://doi.org/10.1038/onc.2008.205>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, *149*(4), 778-789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
- Fields, S., & Jang, S. K. (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science*, *249*(4972). <https://doi.org/10.1126/science.2144363>
- Filonov, G. S., Piatkevich, K. D., Ting, L. M., Zhang, J., Kim, K., & Verkhusha, V. v. (2011). Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging. *Nature Biotechnology*, *29*(8). <https://doi.org/10.1038/nbt.1918>
- Fiorini, C., Cordani, M., Padroni, C., Blandino, G., di Agostino, S., & Donadelli, M. (2015). Mutant p53 stimulates chemoresistance of pancreatic adenocarcinoma cells to gemcitabine. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1853*(1). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.10.003>
- Fischer, M., Quaas, M., Steiner, L., & Engeland, K. (2016). The p53-p21-DREAM-CDE/CHR pathway regulates G2/M cell cycle genes. *Nucleic Acids Research*, *44*(1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkv927>
- Forner, A., Vidili, G., Rengo, M., Bujanda, L., Ponz-Sarvisé, M., & Lamarca, A. (2019). Clinical presentation, diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. En *Liver International* (Vol. 39, Issue S1). <https://doi.org/10.1111/liv.14086>
- Frangioni, J. v. (2003). In vivo near-infrared fluorescence imaging. En *Current Opinion in Chemical Biology* (Vol. 7, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2003.08.007>
- Furubo, S., Harada, K., Shimonishi, T., Katayanagi, K., Tsui, W., & Nakanuma, Y. (1999). Protein expression and genetic alterations of p53 and ras in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Histopathology*, *35*(3). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.1999.00705.x>
- Galanopoulos, M., Doukatas, A., Gkeros, F., Viazis, N., & Liatsos, C. (2021). Room for improvement in the treatment of pancreatic cancer: Novel opportunities from gene targeted therapy. En *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 27, Issue 24, pp. 3568-3580). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i24.3568>
- Gang, E. J., Hsieh, Y. T., Pham, J., Zhao, Y., Nguyen, C., Huantes, S., Park, E., Naing, K., Klemm, L., Swaminathan, S., Conway, E. M., Pelus, L. M., Crispino, J., Mullighan, C. G., McMillan, M., Müschen, M., Kahn, M., & Kim, Y. M. (2014). Small-molecule inhibition of CBP/catenin interactions eliminates drug-resistant clones in acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene*, *33*(17). <https://doi.org/10.1038/onc.2013.169>
- Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., Cerami, E., Sander, C., & Schultz, N. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science Signaling*, *6*(269). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>
- Gavrilescu, L. C., & van Etten, R. A. (2007). Production of replication-defective retrovirus by transient transfection of 293T cells. *Journal of Visualized Experiments*, *10*. <https://doi.org/10.3791/550>
- Gerlach, J. P., Emmink, B. L., Nojima, H., Kranenburg, O., & Maurice, M. M. (2014). Wnt signalling induces accumulation of phosphorylated β -catenin in two distinct cytosolic complexes. *Open Biology*, *4*(11). <https://doi.org/10.1098/rsob.140120>
- Goepfert, B., Folseraas, T., Roessler, S., Kloor, M., Volckmar, A. L., Endris, V., Buchhalter, I., Stenzinger, A., Grzyb, K., Grimsrud, M. M., Gornicka, B., von Seth, E., Reynolds, G. M., Franke, A., Gotthardt, D. N., Mehrabi, A., Cheung, A., Verheij, J., Arola, J., ... Karlsen, T. H. (2020). Genomic Characterization of Cholangiocarcinoma in Primary Sclerosing Cholangitis Reveals Therapeutic Opportunities. *Hepatology*, *72*(4). <https://doi.org/10.1002/hep.31110>

- Goeppert, B., Toth, R., Singer, S., Albrecht, T., Lipka, D. B., Lutsik, P., Brocks, D., Baehr, M., Muecke, O., Assenov, Y., Gu, L., Endris, V., Stenzinger, A., Mehrabi, A., Schirmacher, P., Plass, C., Weichenhan, D., & Roessler, S. (2019). Integrative Analysis Defines Distinct Prognostic Subgroups of Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Hepatology*, *69*(5). <https://doi.org/10.1002/hep.30493/supinfo>
- Goodenowe, D. B., Cook, L. L., Liu, J., Lu, Y., Jayasinghe, D. A., Ahiahonu, P. W. K., Heath, D., Yamazaki, Y., Flax, J., Krenitsky, K. F., Sparks, D. L., Lerner, A., Friedland, R. P., Kudo, T., Kamino, K., Morihara, T., Takeda, M., & Wood, P. L. (2007). Peripheral ethanolamine plasmalogen deficiency: A logical causative factor in Alzheimer's disease and dementia. *Journal of Lipid Research*, *48*(11). <https://doi.org/10.1194/jlr.P700023-JLR200>
- Gordon, M. D., & Nusse, R. (2006). Wnt signaling: Multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. En *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 281, Issue 32). <https://doi.org/10.1074/jbc.R600015200>
- Gossen, M., & Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(12). <https://doi.org/10.1073/pnas.89.12.5547>
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W., & Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, *268*(5218). <https://doi.org/10.1126/science.7792603>
- Govaere, O., Wouters, J., Petz, M., Vandewynckel, Y. P., van den Eynde, K., van den Broeck, A., Verhulst, S., Dollé, L., Gremeaux, L., Ceulemans, A., Nevens, F., van Grunsven, L. A., Topal, B., Vankelecom, H., Giannelli, G., van Vlierberghe, H., Mikulits, W., Komuta, M., & Roskams, T. (2016). Laminin-332 sustains chemoresistance and quiescence as part of the human hepatic cancer stem cell niche. *Journal of Hepatology*, *64*(3). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.011>
- Guan, L., Zhang, L., Gong, Z., Hou, X., Xu, Y., Feng, X., Wang, H., & You, H. (2016). FoxO3 inactivation promotes human cholangiocarcinoma tumorigenesis and chemoresistance through Keap1-Nrf2 signaling. *Hepatology*, *63*(6). <https://doi.org/10.1002/hep.28496>
- Guernet, A., & Grumolato, L. (2017). CRISPR/Cas9 editing of the genome for cancer modeling. En *Methods* (Vols. 121-122, pp. 130-137). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.03.007>
- Gurney, A., & Hoey, T. (2016). From Research to the Clinic: Targeting Stem Cell Pathways in Cancer. En *Cancer Stem Cells: Targeting the Roots of Cancer, Seeds of Metastasis, and Sources of Therapy Resistance*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803892-5.00017-6>
- Ha, N. C., Tonzuka, T., Stamos, J. L., Choi, H. J., & Weis, W. I. (2004). Mechanism of phosphorylation-dependent binding of APC to β -catenin and its role in β -catenin degradation. *Molecular Cell*, *15*(4). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.08.010>
- Habara, K., Ajiki, T., Kamigaki, T., Nakamura, T., & Kuroda, Y. (2001). High expression of thymidylate synthase leads to resistance to 5-fluorouracil in biliary tract carcinoma in vitro. *Japanese Journal of Cancer Research*, *92*(10). <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2001.tb01068.x>
- Hahnvanawong, C., Chaiyagool, J., Seubwai, W., Bhudhisawasdi, V., Namwat, N., Khuntikeo, N., Sripa, B., Pugkhem, A., & Tassaneeyakul, W. (2012). Orotate phosphoribosyl transferase mRNA expression and the response of cholangiocarcinoma to 5-fluorouracil. *World Journal of Gastroenterology*, *18*(30). <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i30.3955>
- He, S., & Tang, S. (2020). WNT/ β -catenin signaling in the development of liver cancers. En *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 132). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110851>
- He, Z., Hu, X., Liu, W., Dorrance, A., Garzon, R., Houghton, P. J., & Shen, C. (2017). P53 suppresses ribonucleotide reductase via inhibiting mTORC1. *Oncotarget*, *8*(25). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17440>
- Herraez, E., Lozano, E., Macias, R. I. R., Vaquero, J., Bujanda, L., Banales, J. M., Marin, J. J. G., & Briz, O. (2013). Expression of SLC22A1 variants may affect the response of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma to sorafenib. *Hepatology*, *58*(3). <https://doi.org/10.1002/hep.26425>

- Hill, M. A., Alexander, W. B., Guo, B., Kato, Y., Patra, K., O'Dell, M. R., McCall, M. N., Whitney-Miller, C. L., Bardeesy, N., & Hezel, A. F. (2018). Kras and Tp53 Mutations Cause Cholangiocyte- and Hepatocyte-Derived Cholangiocarcinoma. *Cancer Research*, 78(16). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1123>
- Hock, A. K., Lee, P., Maddocks, O. D., Mason, S. M., Blyth, K., & Vousden, K. H. (2014). IRFP is a sensitive marker for cell number and tumor growth in high-throughput systems. *Cell Cycle*, 13(2). <https://doi.org/10.4161/cc.26985>
- Hoffman, W. H., Biade, S., Zilfou, J. T., Chen, J., & Murphy, M. (2002). Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *Journal of Biological Chemistry*, 277(5). <https://doi.org/10.1074/jbc.M106643200>
- Hong, J., & Yun, C.-O. (2019). Overcoming the limitations of locally administered oncolytic virotherapy. *BMC Biomedical Engineering*, 1(1). <https://doi.org/10.1186/s42490-019-0016-x>
- Hoppler, S. P., & Kavanagh, C. L. (2007). Wnt signalling: Variety at the core. *Journal of Cell Science*, 120(3). <https://doi.org/10.1242/jcs.03363>
- Hu, H. bin, Kuang, L., Zeng, X. M., Li, B., Liu, E. Y., & Zhong, M. Z. (2012). Predictive value of thymidylate synthase expression in gastric cancer: A systematic review with meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(1). <https://doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.1.261>
- Hu, J., Che, L., Li, L., Pilo, M. G., Cigliano, A., Ribback, S., Li, X., Latte, G., Mela, M., Evert, M., Dombrowski, F., Zheng, G., Chen, X., & Calvisi, D. F. (2016). Co-activation of AKT and c-Met triggers rapid hepatocellular carcinoma development via the mTORC1/FASN pathway in mice. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep20484>
- Huang, J., Guo, X., Li, W., & Zhang, H. (2017). Activation of Wnt/ β -catenin signalling via GSK3 inhibitors direct differentiation of human adipose stem cells into functional hepatocytes. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep40716>
- Huang, S. M. A., Mishina, Y. M., Liu, S., Cheung, A., Stegmeier, F., Michaud, G. A., Charlat, O., Wiellette, E., Zhang, Y., Wiessner, S., Hild, M., Shi, X., Wilson, C. J., Mickanin, C., Myer, V., Fazal, A., Tomlinson, R., Serluca, F., Shao, W., ... Cong, F. (2009). Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature*, 461(7264). <https://doi.org/10.1038/nature08356>
- Huang, Y., Liu, N., Liu, J., Liu, Y., Zhang, C., Long, S., Luo, G., Zhang, L., & Zhang, Y. (2019). Mutant p53 drives cancer chemotherapy resistance due to loss of function on activating transcription of PUMA. *Cell Cycle*, 18(24). <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1688951>
- Huang, Y., Zheng, J., Chen, D., Li, F., Wu, W., Huang, X., Wu, Y., Deng, Y., & Qiu, F. (2017). Transcriptome profiling identifies a recurrent CRYL1-IFT88 chimeric transcript in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 8(25). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17244>
- Hülsken, J., Birchmeier, W., & Behrens, J. (1994). E-cadherin and APC compete for the interaction with β -catenin and the cytoskeleton. *Journal of Cell Biology*, 127(6 II). <https://doi.org/10.1083/jcb.127.6.2061>
- Hwang, I. G., Jang, J. S., Do, J. H., Kang, J. H., Lee, G. W., Oh, S. Y., Kwon, H. C., Jun, H. J., Lim, H. Y., Lee, S., Chi, K. C., & Lee, S. J. (2011). Different relation between ERCC1 overexpression and treatment outcomes of two platinum agents in advanced biliary tract adenocarcinoma patients. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 68(4). <https://doi.org/10.1007/s00280-011-1558-3>
- Ikeguchi, M., Ueda, T., Sakatani, T., Hirooka, Y., & Kaibara, N. (2002). Expression of survivin messenger RNA correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Diagnostic Molecular Pathology*, 11(1). <https://doi.org/10.1097/00019606-200203000-00007>
- Ito, T., Shiraki, K., Sugimoto, K., Yamanaka, T., Fujikawa, K., Ito, M., Takase, K., Moriyama, M., Kawano, H., Hayashida, M., Nakano, T., & Suzuki, A. (2000). Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 31(5). <https://doi.org/10.1053/he.2000.6496>
- Izquierdo-Sanchez, L., Lamarca, A., la Casta, A., Buettner, S., Utpatel, K., Klümpen, H. J., Adeva, J., Vogel, A., Lleo, A., Fabris, L., Ponz-Sarvisé, M., Brustia, R., Cardinale, V., Braconi, C., Vidili, G., Jamieson, N. B., Macias, R. I., Jonas, J. P., Marzioni, M., ... Banales, J. M. (2022). Cholangiocarcinoma landscape in Europe: Diagnostic, prognostic and therapeutic insights from the ENSCCA Registry. *Journal of Hepatology*, 76(5). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.12.010>

- Jang, J., Lee, J., Kim, S. T., Lee, K. Y., Cho, J. Y., Kweon, D. H., Kwon, S. T., Koh, Y. H., Kim, S., & Yoon, K. (2012). Polycation-mediated enhancement of retroviral transduction efficiency depends on target cell types and pseudotyped Env proteins: Implication for gene transfer into neural stem cells. *Neurochemistry International*, *60*(8). <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.02.033>
- Jang, J. S., Lim, H. Y., Hwang, I. G., Song, H. S., Yoo, N., Yoon, S., Kim, Y. H., Park, E., Byun, J. H., Lee, M. A., Oh, S. J., Lee, K. H., Kim, B. S., Oh, S. C., Kim, S. Y., & Lee, S. J. (2010). Gemcitabine and oxaliplatin in patients with unresectable biliary cancer including gall bladder cancer: A Korean Cancer Study Group phase II trial. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *65*(4). <https://doi.org/10.1007/s00280-009-1069-7>
- Javle, M. M., Tan, D., Yu, J., LeVea, C. M., Li, F., Kuvshinoff, B. W., & Gibbs, J. F. (2004). Nuclear survivin expression predicts poor outcome in cholangiocarcinoma. *Hepato-Gastroenterology*, *51*(60).
- Jeong, J. H. (2016). Inducible Mouse Models for Cancer Drug Target Validation. *Journal of Cancer Prevention*, *21*(4), 243-248. <https://doi.org/10.15430/jcp.2016.21.4.243>
- Jho, E., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.-K., Freund, J.-N., & Costantini, F. (2002). Wnt/ β -Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(4). <https://doi.org/10.1128/mcb.22.4.1172-1183.2002>
- Jie, Y., Yang, X., & Chen, W. (2021). Expression and gene regulation network of TYMS and BCL2L1 in colorectal cancer based on data mining. *PeerJ*, *9*. <https://doi.org/10.7717/peerj.11368>
- Jiménez-Martínez, Y., Griñán-Lisón, C., Khaldy, H., Martín, A., Cambrils, A., Grau, A. I., Jiménez, G., Marchal, J. A., & Boulaiz, H. (2019). LdrB toxin with in vitro and in vivo antitumor activity as a potential tool for cancer gene therapy. *Cancers*, *11*(7). <https://doi.org/10.3390/cancers11071016>
- Jöbsis, F. F. (1977). Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science*, *198*(4323). <https://doi.org/10.1126/science.929199>
- Jusakul, A., Cutcutache, I., Yong, C. H., Lim, J. Q., Huang, M. N., Padmanabhan, N., Nellore, V., Kongpetch, S., Ng, A. W. T., Ng, L. M., Choo, S. P., Myint, S. S., Thanan, R., Nagarajan, S., Lim, W. K., Ng, C. C. Y., Boot, A., Liu, M., Ong, C. K., ... Tan, P. (2017). Whole-genome and epigenomic landscapes of etiologically distinct subtypes of cholangiocarcinoma. *Cancer Discovery*, *7*(10), 1116-1135. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0368>
- Kallunki, T., Barisic, M., Jäättelä, M., & Liu, B. (2019). How to choose the right inducible gene expression system for Mammalian studies? En *Cells* (Vol. 8, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells8080796>
- Kamp, W. M., Wang, P. yuan, & Hwang, P. M. (2016). TP53 mutation, mitochondria and cancer. En *Current Opinion in Genetics and Development* (Vol. 38, pp. 16-22). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.02.007>
- Karimian, A., Azizian, K., Parsian, H., Rafieian, S., Shafiei-Irannejad, V., Kheyrollah, M., Yousefi, M., Majidinia, M., & Yousefi, B. (2019). CRISPR/Cas9 technology as a potent molecular tool for gene therapy. En *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 234, Issue 8, pp. 12267-12277). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.27972>
- Kastenhuber, E. R., & Lowe, S. W. (2017). Putting p53 in Context. En *Cell* (Vol. 170, Issue 6, pp. 1062-1078). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>
- Katoh, M., & Katoh, M. (2007). WNT signaling pathway and stem cell signaling network. En *Clinical Cancer Research* (Vol. 13, Issue 14). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2316>
- Kawazoe, H., Bilim, V. N., Ugolkov, A. v., Yuuki, K., Naito, S., Nagaoka, A., Kato, T., & Tomita, Y. (2012). GSK-3 inhibition in vitro and in vivo enhances antitumor effect of sorafenib in renal cell carcinoma (RCC). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *423*(3). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.147>
- Kendall, T., Verheij, J., Gaudio, E., Evert, M., Guido, M., Goepfert, B., & Carpino, G. (2019). Anatomical, histomorphological and molecular classification of cholangiocarcinoma. En *Liver International* (Vol. 39, Issue S1, pp. 7-18). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/liv.14093>

- Khan, S. A., Davidson, B. R., Goldin, R. D., Heaton, N., Karani, J., Pereira, S. P., Rosenberg, W. M. C., Tait, P., Taylor-Robinson, S. D., Thillainayagam, A. v, Thomas, H. C., & Wasan, H. (2012). Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. *Gut*, *61*(12), 1657-1669. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301748>
- Khan, S. A., Taylor-Robinson, S. D., Carmichael, P. L., Habib, N., Lemoine, N. R., & Thomas, H. C. (2006). Analysis of p53 mutations for a mutational signature in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *International Journal of Oncology*, *28*(5). <https://doi.org/10.3892/ijo.28.5.1269>
- Khan, S. A., Thomas, H. C., Toledano, M. B., Cox, I. J., & Taylor-Robinson, S. D. (2005). p53 mutations in human cholangiocarcinoma: A review. En *Liver International* (Vol. 25, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2005.01106.x>
- Kim, M. J., Huang, Y., & Park, J. il. (2020). Targeting wnt signaling for gastrointestinal cancer therapy: Present and evolving views. En *Cancers* (Vol. 12, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/cancers12123638>
- Kim, T. H., Han, S. S., Park, S. J., Lee, W. J., Woo, S. M., Moon, S. H., Yoo, T., Kim, S. S., Kim, S. H., Hong, E. K., Kim, D. Y., & Park, J. W. (2011). Role of adjuvant chemoradiotherapy for resected extrahepatic biliary tract cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, *81*(5). <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.12.019>
- Kim, Y., Jang, M., Lim, S., Won, H., Yoon, K. S., Park, J. H., Kim, H. J., Kim, B. H., Park, W. S., Ha, J., & Kim, S. S. (2011). Role of cyclophilin B in tumorigenesis and cisplatin resistance in hepatocellular carcinoma in humans. *Hepatology*, *54*(5). <https://doi.org/10.1002/hep.24539>
- Kimelman, D., & Xu, W. (2006). β -Catenin destruction complex: Insights and questions from a structural perspective. En *Oncogene* (Vol. 25, Issue 57). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210055>
- Kluge, J., Terfehr, D., & Kück, U. (2018). Inducible promoters and functional genomic approaches for the genetic engineering of filamentous fungi. En *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 102, Issue 15, pp. 6357-6372). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9115-1>
- Kohan, D. E. (2008). Progress in gene targeting: Using mutant mice to study renal function and disease. En *Kidney International* (Vol. 74, Issue 4, pp. 427-437). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.146>
- Kong, J., Shen, S., Zhang, Z., & Wang, W. (2020). Identification of hub genes and pathways in cholangiocarcinoma by coexpression analysis. *Cancer Biomarkers*, *27*(4). <https://doi.org/10.3233/CBM-190038>
- Koni, M., Pinnarò, V., & Brizzi, M. F. (2020). The wnt signalling pathway: A tailored target in cancer. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 20). <https://doi.org/10.3390/ijms21207697>
- Koprowski, S., Sokolowski, K., Kunnimalaiyaan, S., Clark Gamblin, T., & Kunnimalaiyaan, M. (2015). Curcumin-mediated regulation of Notch1/hairy and enhancer of split-1/survivin: Molecular targeting in cholangiocarcinoma. En *Journal of Surgical Research* (Vol. 198, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.jss.2015.03.029>
- Kwon, W. S., Rha, S. Y., Choi, Y. H., Lee, J. O., Park, K. H., Jung, J. J., Kim, T. S., Jeung, H. C., & Chung, H. C. (2006). Ribonucleotide reductase M1 (RRM1) 2464G>A polymorphism shows an association with gemcitabine chemosensitivity in cancer cell lines. *Pharmacogenetics and Genomics*, *16*(6). <https://doi.org/10.1097/01.fpc.0000204999.29924.da>
- Lamarca, A., Edeline, J., McNamara, M. G., Hubner, R. A., Nagino, M., Bridgewater, J., Primrose, J., & Valle, J. W. (2020). Current standards and future perspectives in adjuvant treatment for biliary tract cancers. En *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 84). <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.101936>
- Lamarca, A., Hubner, R. A., David Ryder, W., & Valle, J. W. (2014). Second-line chemotherapy in advanced biliary cancer: A systematic review. En *Annals of Oncology* (Vol. 25, Issue 12). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu162>
- Lamarca, A., Palmer, D. H., Wasan, H. S., Ross, P. J., Ma, Y. T., Arora, A., Falk, S., Gillmore, R., Wadsley, J., Patel, K., Anthoney, A., Maraveyas, A., Iveson, T., Waters, J. S., Hobbs, C., Barber, S., Ryder, W. D., Ramage, J., Davies, L. M., ... Valle, J. W. (2021). Second-line FOLFOX chemotherapy versus active symptom control for advanced biliary tract cancer (ABC-06): a phase 3,

- open-label, randomised, controlled trial. *The Lancet Oncology*, 22(5). [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00027-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00027-9)
- Lamartina, S., Silvi, L., Roscilli, G., Casimiro, D., Simon, A. J., Davies, M. E., Shiver, J. W., Rinaudo, C. D., Zampaglione, I., Fattori, E., Colloca, S., Gonzalez Paz, O., Laufer, R., Bujard, H., Cortese, R., Ciliberto, G., & Toniatti, C. (2003). Construction of an rtTA2s-M2/tTskid-based transcription regulatory switch that displays no basal activity, good inducibility, and high responsiveness to doxycycline in mice and non-human primates. *Molecular Therapy*, 7(2). [https://doi.org/10.1016/S1525-0016\(02\)00051-5](https://doi.org/10.1016/S1525-0016(02)00051-5)
- Lan, Q., Xia, S., Wang, Q., Xu, W., Huang, H., Jiang, S., & Lu, L. (2020). Development of oncolytic virotherapy: from genetic modification to combination therapy. En *Frontiers of Medicine* (Vol. 14, Issue 2, pp. 160-184). Higher Education Press. <https://doi.org/10.1007/s11684-020-0750-4>
- Lau, D. K., Mouradov, D., Wasenang, W., Luk, I. Y., Scott, C. M., Williams, D. S., Yeung, Y. H., Limpiboon, T., Iatropoulos, G. F., Jenkins, L. J., Reehorst, C. M., Chionh, F., Nikfarjam, M., Croagh, D., Dhillon, A. S., Weickhardt, A. J., Muramatsu, T., Saito, Y., Tebbutt, N. C., ... Mariadason, J. M. (2019). Genomic Profiling of Biliary Tract Cancer Cell Lines Reveals Molecular Subtypes and Actionable Drug Targets. *iScience*, 21. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.10.044>
- Laurent-Puig, P., Legoix, P., Bluteau, O., Belghiti, J., Franco, D., Binot, F., Monges, G., Thomas, G., Bioulac-Sage, P., & Zucman-Rossi, J. (2001). Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*, 120(7). <https://doi.org/10.1053/gast.2001.24798>
- le Guiner, C., Stieger, K., Snyder, R. O., Rolling, F., & Moullier, P. (2007). Immune Responses to Gene Product of Inducible Promoters. En *Current Gene Therapy* (Vol. 7).
- Lee, E., Salic, A., Krüger, R., Heinrich, R., & Kirschner, M. W. (2003). The roles of APC and axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway. *PLoS Biology*, 1(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000010>
- Lee, J. K., Capanu, M., O'Reilly, E. M., Ma, J., Chou, J. F., Shia, J., Katz, S. S., Gansukh, B., Reidy-Lagunes, D., Segal, N. H., Yu, K. H., Chung, K. Y., Saltz, L. B., & Abou-Alfa, G. K. (2013). A phase II study of gemcitabine and cisplatin plus sorafenib in patients with advanced biliary adenocarcinomas. *British Journal of Cancer*, 109(4). <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.432>
- Lee, S. H., Lee, H. S., Lee, S. H., Woo, S. M., Kim, D. U., & Bang, S. (2020). Efficacy and safety of pembrolizumab for gemcitabine/cisplatin-refractory biliary tract cancer: A multicenter retrospective study. *Journal of Clinical Medicine*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/jcm9061769>
- Leroy, B., Anderson, M., & Soussi, T. (2014). TP53 mutations in human cancer: Database reassessment and prospects for the next decade. En *Human Mutation* (Vol. 35, Issue 6, pp. 672-688). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/humu.22552>
- Levine, A. J. (2021). Spontaneous and inherited TP53 genetic alterations. En *Oncogene* (Vol. 40, Issue 41, pp. 5975-5983). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01991-3>
- Levine, A. J., Momand, J., & Finlay, C. A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. En *Nature* (Vol. 351, Issue 6326). <https://doi.org/10.1038/351453a0>
- Li, H., Yang, Y., Hong, W., Huang, M., Wu, M., & Zhao, X. (2020). Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. En *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 5, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0089-y>
- Li, L., Xiang, Y., Zeng, Y., Xiao, B., Yu, W., Duan, C., Xia, X., Zhang, T., Zeng, Y., Liu, Y., & Dai, R. (2020). GSK-3 β inhibition promotes doxorubicin-induced apoptosis in human cholangiocarcinoma cells via FAK/AKT inhibition. *Molecular Medicine Reports*, 22(5). <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11502>
- Li, Y. X., Lin, Z. bin, & Tan, H. R. (2004). Wild type p53 increased chemosensitivity of drug-resistant human hepatocellular carcinoma Bel7402/5-FU cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(1).
- Liang, R., Chen, W., Chen, X. Y., Fan, H. N., Zhang, J., & Zhu, J. S. (2021). Dihydroartemisinin inhibits the tumorigenesis and invasion of gastric cancer by regulating STAT1/KDR/MMP9 and

- P53/BCL2L1/CASP3/7 pathways. *Pathology Research and Practice*, 218. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.153318>
- Liau, J. Y., Tsai, J. H., Yuan, R. H., Chang, C. N., Lee, H. J., & Jeng, Y. M. (2014). Morphological subclassification of intrahepatic cholangiocarcinoma: Etiological, clinicopathological, and molecular features. *Modern Pathology*, 27(8). <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.241>
- Lillacci, G., Benenson, Y., & Khammash, M. (2018). Synthetic control systems for high performance gene expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 46(18). <https://doi.org/10.1093/nar/gky795>
- Lin, D., Mercer, W. E., Pierce, J. H., & Givol, D. (1994). Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent Pathway. *Cancer Research*, 54(13).
- Lin, J., Cao, Y., Yang, X., Li, G., Shi, Y., Wang, D., Long, J., Song, Y., Mao, J., Xie, F., Bai, Y., Zhang, L., Yang, X., Wan, X., Wang, A., Guan, M., Zhao, L., Hu, K., Pan, J., ... Zhao, H. (2021). Mutational spectrum and precision oncology for biliary tract carcinoma. *Theranostics*, 11(10), 4585-4598. <https://doi.org/10.7150/thno.56539>
- Liu, F., Song, Y. K., & Liu, D. (1999). Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Therapy*, 6(7). <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300947>
- Liu, W., Zhan, Z., Zhang, M., Sun, B., Shi, Q., Luo, F., Zhang, M., Zhang, W., Hou, Y., Xiao, X., Li, Y., & Feng, H. (2021). KAT6A, a novel regulator of β -catenin, promotes tumorigenicity and chemoresistance in ovarian cancer by acetylating COP1. *Theranostics*, 11(13). <https://doi.org/10.7150/thno.57455>
- Liu, X., Su, K., Sun, X., Jiang, Y., Wang, L., Hu, C., Zhang, C., Lu, M., Du, X., & Xing, B. (2021). Sec62 promotes stemness and chemoresistance of human colorectal cancer through activating Wnt/ β -catenin pathway. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 40(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01934-6>
- Loew, R., Heinz, N., Hampf, M., Bujard, H., & Gossen, M. (2010). Improved Tet-responsive promoters with minimized background expression. *BMC Biotechnology*, 10, 81. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-81>
- Loilome, W., Bungkanjana, P., Techasen, A., Namwat, N., Yongvanit, P., Puapairoj, A., Khuntikeo, N., & Riggins, G. J. (2014). Activated macrophages promote Wnt/ β -catenin signaling in cholangiocarcinoma cells. *Tumor Biology*, 35(6). <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1698-2>
- Lowery, M. A., Ptashkin, R., Jordan, E., Berger, M. F., Zehir, A., Capanu, M., Kemeny, N. E., O'Reilly, E. M., El-Dika, I., Jarnagin, W. R., Harding, J. J., D'Angelica, M. I., Cercek, A., Hechtman, J. F., Solit, D. B., Schultz, N., Hyman, D. M., Klimstra, D. S., Saltz, L. B., & Abou-Alfa, G. K. (2018). Comprehensive Molecular Profiling of Intrahepatic and Extrahepatic Cholangiocarcinomas: Potential Targets for Intervention. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 24(17), 4154-4161. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0078>
- Lozano, E., Asensio, M., Perez-Silva, L., Banales, J. M., Briz, O., & Marin, J. J. G. (2020). MRP3-Mediated Chemoresistance in Cholangiocarcinoma: Target for Chemosensitization Through Restoring SOX17 Expression. *Hepatology*, 72(3). <https://doi.org/10.1002/hep.31088>
- Lozano, E., Macias, R. I. R., Monte, M. J., Asensio, M., del Carmen, S., Sanchez-Vicente, L., Alonso-Peña, M., Al-Abdulla, R., Munoz-Garrido, P., Satriano, L., O'Rourke, C. J., Banales, J. M., Avila, M. A., Martinez-Chantar, M. L., Andersen, J. B., Briz, O., & Marin, J. J. G. (2019). Causes of hOCT1-Dependent Cholangiocarcinoma Resistance to Sorafenib and Sensitization by Tumor-Selective Gene Therapy. *Hepatology*, 70(4). <https://doi.org/10.1002/hep.30656>
- Luger, A. L., Sauer, B., Lorenz, N. I., Engel, A. L., Braun, Y., Voss, M., Harter, P. N., Steinbach, J. P., & Ronellenfitsch, M. W. (2018). Doxycycline impairs mitochondrial function and protects human glioma cells from hypoxia-induced cell death: Implications of using tet-inducible systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5). <https://doi.org/10.3390/ijms19051504>
- Ma, L., Wang, X., Jia, T., Wei, W., Chua, M. S., & So, S. (2015). Tankyrase inhibitors attenuate WNT/ β -catenin signaling and inhibit growth of hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget*, 6(28). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4455>

- MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. En *Developmental Cell* (Vol. 17, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>
- Maguire, M., Nield, P. C., Devling, T., Jenkins, R. E., Park, B. K., Polański, R., Vlatković, N., & Boyd, M. T. (2008). MDM2 regulates dihydrofolate reductase activity through monoubiquitination. *Cancer Research*, 68(9). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5271>
- Makrides, S. C. (2003). Vectors for gene expression in mammalian cells. En *New Comprehensive Biochemistry* (Vol. 38). [https://doi.org/10.1016/S0167-7306\(03\)38002-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7306(03)38002-0)
- Mancinelli, R., Carpino, G., Petrungaro, S., Mammola, C. L., Tomaipitnca, L., Filippini, A., Facchiano, A., Ziparo, E., & Giampietri, C. (2017). Multifaceted roles of GSK-3 in cancer and autophagy-related diseases. En *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2017). <https://doi.org/10.1155/2017/4629495>
- Marabelle, A., Le, D. T., Ascierto, P. A., di Giacomo, A. M., de Jesus-Acosta, A., Delord, J. P., Geva, R., Gottfried, M., Penel, N., Hansen, A. R., Piha-Paul, S. A., Doi, T., Gao, B., Chung, H. C., Lopez-Martin, J., Bang, Y. J., Frommer, R. S., Shah, M., Ghorri, R., ... Diaz, L. A. (2020). Efficacy of pembrolizumab in patients with noncolorectal high microsatellite instability/ mismatch repair-deficient cancer: Results from the phase II KEYNOTE-158 study. *Journal of Clinical Oncology*, 38(1). <https://doi.org/10.1200/JCO.19.02105>
- Marin, J. J. G., Briz, O., Herraes, E., Lozano, E., Asensio, M., di Giacomo, S., Romero, M. R., Osorio-Padilla, L. M., Santos-Llamas, A. I., Serrano, M. A., Armengol, C., Efferth, T., & Macias, R. I. R. (2018). Molecular bases of the poor response of liver cancer to chemotherapy. En *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* (Vol. 42, Issue 3, pp. 182-192). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2017.12.006>
- Marin, J. J. G., Herraes, E., Lozano, E., Macias, R. I. R., & Briz, O. (2019). Models for understanding resistance to chemotherapy in liver cancer. En *Cancers* (Vol. 11, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers11111677>
- Marin, J. J. G., Lozano, E., Briz, O., Al-Abdulla, R., Serrano, M. A., & Macias, R. I. R. (2015). Molecular Bases of Chemoresistance in Cholangiocarcinoma. *Current Drug Targets*, 18(8). <https://doi.org/10.2174/1389450116666150223121508>
- Marin, J. J. G., & Macias, R. I. R. (2021). Understanding drug resistance mechanisms in cholangiocarcinoma: assisting the clinical development of investigational drugs. En *Expert Opinion on Investigational Drugs* (Vol. 30, Issue 7, pp. 675-679). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/13543784.2021.1916912>
- Marin, J. J. G., Macias, R. I. R., Monte, M. J., Romero, M. R., Asensio, M., Sanchez-Martin, A., Cives-Losada, C., Temprano, A. G., Espinosa-Escudero, R., Reviejo, M., Bohorquez, L. H., & Briz, O. (2020). Molecular bases of drug resistance in hepatocellular carcinoma. En *Cancers* (Vol. 12, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/cancers12061663>
- Marin, J. J. G., Prete, M. G., Lamarca, A., Tavolari, S., Landa-Magdalena, A., Brandi, G., Segatto, O., Vogel, A., Macias, R. I. R., Rodrigues, P. M., Casta, A. la, Mertens, J., Rodrigues, C. M. P., Fernandez-Barrena, M. G., da Silva Ruivo, A., Marzioni, M., Mentrasti, G., Acedo, P., Munoz-Garrido, P., ... working group 6 of the COST-action 18122 (Euro-Cholangio-NET) as part of the European Network for the study of Cholangiocarcinoma (ENSCCA). (2020). Current and novel therapeutic opportunities for systemic therapy in biliary cancer. *British Journal of Cancer*, 123(7), 1047-1059. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0987-3>
- Marin, J. J. G., Sanchon-Sanchez, P., Cives-Losada, C., del Carmen, S., González-Santiago, J. M., Monte, M. J., & Macias, R. I. R. (2021). Novel pharmacological options in the treatment of cholangiocarcinoma: Mechanisms of resistance. En *Cancers* (Vol. 13, Issue 10). <https://doi.org/10.3390/cancers13102358>
- Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L., & Tolbert, N. E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*, 87(1), 206-210. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90586-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90586-9)
- Martinez-Becerra, P., Monte, I., Romero, M. R., Serrano, M. A., Vaquero, J., Macias, R. I. R., del Rio, A., Grañé-Boladeras, N., Jimenez, F., San-Martin, F. G., Pastor-Anglada, M., & Marin, J. J. G.

- (2012). Up-regulation of FXR isoforms is not required for stimulation of the expression of genes involved in the lack of response of colon cancer to chemotherapy. *Pharmacological Research*, 66(5). <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.07.005>
- Martinez-Becerra, P., Vaquero, J., Romero, M. R., Lozano, E., Anadon, C., MacIas, R. I. R., Serrano, M. A., Grañé-Boladeras, N., Muñoz-Bellvis, L., Alvarez, L., Sangro, B., Pastor-Anglada, M., & Marin, J. J. G. (2012). No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors. *Molecular Pharmaceutics*, 9(6). <https://doi.org/10.1021/mp300028a>
- Martin-Orozco, E., Sanchez-Fernandez, A., Ortiz-Parra, I., & Ayala-San Nicolas, M. (2019). WNT Signaling in Tumors: The Way to Evade Drugs and Immunity. En *Frontiers in Immunology* (Vol. 10). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02854>
- Matsuda, T., Kato, T., Kiyotani, K., Tarhan, Y. E., Saloura, V., Chung, S., Ueda, K., Nakamura, Y., & Park, J. H. (2017). p53-independent p21 induction by MELK inhibition. *Oncotarget*, 8(35). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18488>
- Mazzoni, S. M., & Fearon, E. R. (2014). AXIN1 and AXIN2 variants in gastrointestinal cancers. En *Cancer Letters* (Vol. 355, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.09.018>
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Bertrand, F. E., Davis, N. M., Abrams, S. L., Montalto, G., D'Assoro, A. B., Libra, M., Nicoletti, F., Maestro, R., Basecke, J., Cocco, L., Cervello, M., & Martelli, A. M. (2014). Multifaceted roles of GSK-3 and Wnt/ β -catenin in hematopoiesis and leukemogenesis: Opportunities for therapeutic intervention. En *Leukemia* (Vol. 28, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/leu.2013.184>
- Merino-Azpitarte, M., Lozano, E., Perugorria, M. J., Esparza-Baquer, A., Erice, O., Santos-Laso, Á., O'Rourke, C. J., Andersen, J. B., Jiménez-Agüero, R., Lacasta, A., D'Amato, M., Briz, Ó., Jalan-Sakrikar, N., Huebert, R. C., Thelen, K. M., Gradilone, S. A., Aransay, A. M., Lavín, J. L., Fernández-Barrena, M. G., ... Banales, J. M. (2017). SOX17 regulates cholangiocyte differentiation and acts as a tumor suppressor in cholangiocarcinoma. *Journal of Hepatology*, 67(1), 72-83. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.02.017>
- Montaño-Samaniego, M., Bravo-Estupiñan, D. M., Méndez-Guerrero, O., Alarcón-Hernández, E., & Ibáñez-Hernández, M. (2020). Strategies for Targeting Gene Therapy in Cancer Cells With Tumor-Specific Promoters. En *Frontiers in Oncology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.605380>
- Monti, P., Menichini, P., Speciale, A., Cutrona, G., Fais, F., Taiana, E., Neri, A., Bomben, R., Gentile, M., Gattei, V., Ferrarini, M., Morabito, F., & Fronza, G. (2020). Heterogeneity of TP53 Mutations and P53 Protein Residual Function in Cancer: Does It Matter? En *Frontiers in Oncology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.593383>
- Morton, S. D., Cadamuro, M., Brivio, S., Vismara, M., Stecca, T., Massani, M., Nicolò Bassi, Furlanetto, A., Joplin, R. E., Floreani, A., Fabris, L., & Strazzabosco, M. (2015). Leukemia inhibitory factor protects cholangiocarcinoma cells from drug-induced apoptosis via a PI3K/AKT-dependent Mcl-1 activation. *Oncotarget*, 6(28). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4482>
- Moshkovsky, A. R., & Kirschner, M. W. (2022). The nonredundant nature of the Axin2 regulatory network in the canonical Wnt signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(9). <https://doi.org/10.1073/pnas.2108408119>
- Mucaki, E. J., Zhao, J. Z. L., Lizotte, D. J., & Rogan, P. K. (2019). Predicting responses to platinum chemotherapy agents with biochemically-inspired machine learning. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-018-0034-5>
- Mukai, F., Ishiguro, K., Sano, Y., & Fujita, S. C. (2002). Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 β . *Journal of Neurochemistry*, 81(5). <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00918.x>
- Nakajima, T., Takayama, T., Miyanishi, K., Nobuoka, A., Hayashi, T., Abe, T., Kato, J., Sakon, K., Naniwa, Y., Tanabe, H., & Niitsu, Y. (2003). Reversal of multiple drug resistance in cholangiocarcinoma by the glutathione S-transferase- π -specific inhibitor O 1-hexadecyl- γ -glutamyl-S-benzylcysteinyl-D-phenylglycine ethylester. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306(3). <https://doi.org/10.1124/jpet.103.052696>

- Nakamura, H., Arai, Y., Totoki, Y., Shiota, T., Elzawahry, A., Kato, M., Hama, N., Hosoda, F., Urushidate, T., Ohashi, S., Hiraoka, N., Ojima, H., Shimada, K., Okusaka, T., Kosuge, T., Miyagawa, S., & Shibata, T. (2015). Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nature Genetics*, *47*(9). <https://doi.org/10.1038/ng.3375>
- Nakanuma, Y., Sato, Y., Harada, K., Sasaki, M., Xu, J., & Ikeda, H. (2010). Pathological classification of intrahepatic cholangiocarcinoma based on a new concept. *World Journal of Hepatology*, *2*(12). <https://doi.org/10.4254/wjh.v2.i12.419>
- Namwat, N., Amimanan, P., Loilome, W., Jearanaikoon, P., Sripa, B., Bhudhisawasdi, V., & Tassaneeyakul, W. (2008). Characterization of 5-fluorouracil-resistant cholangiocarcinoma cell lines. *Chemotherapy*, *54*(5). <https://doi.org/10.1159/000151541>
- National Cancer Institute. (2019). The TP53 database: ISB-CGC. TP53 Database. Retrieved October 28, 2022, from <https://tp53.isb-cgc.org/>
- National Cancer Institute. (2022). What is bile duct cancer (cholangiocarcinoma)? Retrieved September 1, 2022, from <https://www.cancer.gov/types/liver/bile-duct-cancer>
- Neoptolemos, J. P., Moore, M. J., Cox, T. F., Valle, J. W., Palmer, D. H., McDonald, A. C., Carter, R., Tebbutt, N. C., Dervenis, C., Smith, D., Glimelius, B., Charnley, R. M., Lacaine, F., Scarfe, A. G., Middleton, M. R., Anthoney, A., Ghaneh, P., Halloran, C. M., Lerch, M. M., ... Büchler, M. W. (2012). Effect of adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid or gemcitabine vs observation on survival in patients with resected periampullary adenocarcinoma: The ESPAC-3 periampullary cancer randomized trial. *JAMA*, *308*(2). <https://doi.org/10.1001/jama.2012.7352>
- Nutthasirikul, N., Limpai boon, T., Leelayuwat, C., Patrakitkomjorn, S., & Jearanaikoon, P. (2013). Ratio disruption of the $\Delta 133p53$ and TAp53 isoform equilibrium correlates with poor clinical outcome in intrahepatic cholangiocarcinoma. *International Journal of Oncology*, *42*(4). <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1818>
- Nutthasirikul, N. V., Hahnvajanawong, C., Techasen, A., Limpai boon, T., Wat, C. L., Chau-In, S., & Jearanaikoon, P. (2015). Targeting the $\Delta 133p53$ isoform can restore chemosensitivity in 5-fluorouracil-resistant cholangiocarcinoma cells. *International Journal of Oncology*, *47*(6), 2153-2164. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3188>
- Obama, K., Ura, K., Li, M., Katagiri, T., Tsunoda, T., Nomura, A., Satoh, S., Nakamura, Y., & Furukawa, Y. (2005). Genome-wide analysis of gene expression in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology*, *41*(6). <https://doi.org/10.1002/hep.20718>
- Okusaka, T., Nakachi, K., Fukutomi, A., Mizuno, N., Ohkawa, S., Funakoshi, A., Nagino, M., Kondo, S., Nagaoka, S., Funai, J., Koshiji, M., Nambu, Y., Furuse, J., Miyazaki, M., & Nimura, Y. (2010). Gemcitabine alone or in combination with cisplatin in patients with biliary tract cancer: A comparative multicentre study in Japan. *British Journal of Cancer*, *103*(4). <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605779>
- Olivier, M., Hollstein, M., & Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. En *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (Vol. 2, Issue 1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001008>
- Ong, C. K., Subimerb, C., Pairojkul, C., Wongkham, S., Cutcutache, I., Yu, W., McPherson, J. R., Allen, G. E., Ng, C. C. Y., Wong, B. H., Myint, S. S., Rajasegaran, V., Heng, H. L., Gan, A., Zang, Z. J., Wu, Y., Wu, J., Lee, M. H., Huang, D., ... Teh, B. T. (2012). Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Nature Genetics*, *44*(6). <https://doi.org/10.1038/ng.2273>
- O'Rourke, C. J., Munoz-Garrido, P., Aguayo, E. L., & Andersen, J. B. (2018). Epigenome dysregulation in cholangiocarcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1864*(4), 1423-1434. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.06.014>
- Padthaisong, S., Thanee, M., Techasen, A., Namwat, N., Yongvanit, P., Liwatthakun, A., Hankla, K., Sangkhamanon, S., & Loilome, W. (2017). Nimotuzumab inhibits cholangiocarcinoma cell metastasis via suppression of the epithelial-mesenchymal transition process. *Anticancer Research*, *37*(7). <https://doi.org/10.21873/anticancerS.11729>
- Pai, S. G., Carneiro, B. A., Mota, J. M., Costa, R., Leite, C. A., Barroso-Sousa, R., Kaplan, J. B., Chae, Y. K., & Giles, F. J. (2017). Wnt/beta-catenin pathway: Modulating anticancer immune

- response. En *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 10, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0471-6>
- Pangestu, N. S., Chueakwon, P., Talabnin, K., Khiaowichit, J., & Talabnin, C. (2021). RNF43 overexpression attenuates the Wnt/ β -catenin signalling pathway to suppress tumour progression in cholangiocarcinoma. *Oncology Letters*, 22(6). <https://doi.org/10.3892/ol.2021.13107>
- Panka, D. J., Cho, D. C., Atkins, M. B., & Mier, J. W. (2008). GSK-3 β inhibition enhances sorafenib-induced apoptosis in melanoma cell lines. *Journal of Biological Chemistry*, 283(2). <https://doi.org/10.1074/jbc.M705343200>
- Pape, U.-F., Kasper, S., Meiler, J., Sinn, M., Vogel, A., Mueller, L., Burkhard, O., Caca, K., Heeg, S., Rodriguez Laval, V., Kuhl, A. A., Arsenic, R., Jansen, H., Mehrling, T., Hilgier, K., Wagner, I., & Utku, N. (2019). Post-hoc analyses of a subgroup of patients with advanced biliary tract cancer (BTC) who crossed over to treatment with etoposide toniribate (EDO-S7.1) in a randomized phase II study. *Annals of Oncology*, 30. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz247.051>
- Park, H., Shapiro, G. I., Gao, X., Mahipal, A., Starr, J., Furqan, M., Singh, P., Ahrorov, A., Gandhi, L., Ghosh, A., Hickman, D., Gallacher, P. D., Wennborg, A., Attar, E. C., Awad, M. M., Das, S., & Dumbrova, E. E. (2022). Phase Ib study of eprenetapopt (APR-246) in combination with pembrolizumab in patients with advanced or metastatic solid tumors. *ESMO Open*, 7(5), 100573. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2022.100573>
- Patel, N., & Benipal, B. (2019). Incidence of Cholangiocarcinoma in the USA from 2001 to 2015: A US Cancer Statistics Analysis of 50 States. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.3962>
- Peng, Y. yun, He, Y. hua, Chen, C., Xu, T., Li, L., Ni, M. ming, Meng, X. ming, Huang, C., & Li, J. (2016). NLRC5 regulates cell proliferation, migration and invasion in hepatocellular carcinoma by targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Cancer Letters*, 376(1). <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.006>
- Perego, P., Giarola, M., Righetti, S. C., Supino, R., Caserini, C., Delia, D., Pierotti, M. A., Miyashita, T., Reed, J. C., & Zunino, F. (1996). Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems. *Cancer Research*, 56(3), 556-562.
- Perugorria, M. J., Olaizola, P., Labiano, I., Esparza-Baquer, A., Marzioni, M., Marin, J. J. G., Bujanda, L., & Banales, J. M. (2019). Wnt- β -catenin signalling in liver development, health and disease. En *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 16, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0075-9>
- Picanço, V., Heinz, S., Bott, D., Behrmann, M., Covas, D. T., Seifried, E., & Tonn, T. (2007). Recombinant expression of coagulation factor VIII in hepatic and non-hepatic cell lines stably transduced with third generation lentiviral vectors comprising the minimal factor VIII promoter. *Cytotherapy*, 9(8). <https://doi.org/10.1080/14653240701656053>
- Piha-Paul, S. A., Oh, D. Y., Ueno, M., Malka, D., Chung, H. C., Nagrial, A., Kelley, R. K., Ros, W., Italiano, A., Nakagawa, K., Rugo, H. S., de Braud, F., Varga, A. I., Hansen, A., Wang, H., Krishnan, S., Norwood, K. G., & Doi, T. (2020). Efficacy and safety of pembrolizumab for the treatment of advanced biliary cancer: Results from the KEYNOTE-158 and KEYNOTE-028 studies. *International Journal of Cancer*, 147(8). <https://doi.org/10.1002/ijc.33013>
- Poeta, M. L., Manola, J., Goldwasser, M. A., Forastiere, A., Benoit, N., Califano, J. A., Ridge, J. A., Goodwin, J., Kenady, D., Saunders, J., Westra, W., Sidransky, D., & Koch, W. M. (2007). TP53 Mutations and Survival in Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New England Journal of Medicine*, 357(25). <https://doi.org/10.1056/nejmoa073770>
- Polakis, P. (2012). Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008052>
- Pongmaneratanakul, S., Tanasanvimon, S., Pengsuparp, T., & Areepium, N. (2017). Prevalence of CTR1 and ERCC1 polymorphisms and response of biliary tract cancer to gemcitabine-platinum chemotherapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 18(3). <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.3.857>
- Porth, C. (2007). FISIOPATOLOGÍA: Salud-Enfermedad: Un Enfoque Conceptual: 7a. Edición. Médica Panamericana.

- Primrose, J. N., Neoptolemos, J., Palmer, D. H., Malik, H. Z., Prasad, R., Mirza, D., Anthony, A., Corrie, P., Falk, S., Finch-Jones, M., Wasan, H., Ross, P., Wall, L., Wadsley, J., Evans, J., Stocken, D., Praseedom, R., Ma, Y. T., Davidson, B., ... Coxon, F. (2019). Capecitabine compared with observation in resected biliary tract cancer (BILCAP): a randomised, controlled, multicentre, phase 3 study. *The Lancet Oncology*, 20(5). [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30915-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30915-X)
- Proffitt, K. D., Madan, B., Ke, Z., Pendharkar, V., Ding, L., Lee, M. A., Hannoush, R. N., & Virshup, D. M. (2013). Pharmacological inhibition of the Wnt acyltransferase PORCN prevents growth of WNT-driven mammary cancer. *Cancer Research*, 73(2). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2258>
- Puetkasichonpasutha, J., Namwat, N., Sa-Ngiamwibool, P., Titapun, A., & Suthiphongchai, T. (2020). Evaluation of p53 and its target gene expression as potential biomarkers of cholangiocarcinoma in Thai patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 21(3), 791-798. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.3.791>
- Qiao, Y., Wang, J., Karagoz, E., Liang, B., Song, X., Shang, R., Evert, K., Xu, M., Che, L., Evert, M., Calvisi, D. F., Tao, J., Wang, B., Monga, S. P., & Chen, X. (2019). Axis inhibition protein 1 (Axin1) Deletion-Induced Hepatocarcinogenesis Requires Intact β -Catenin but Not Notch Cascade in Mice. *Hepatology*, 70(6). <https://doi.org/10.1002/hep.30556>
- Qin, A., Wu, J., Zhai, M., Lu, Y., Huang, B., Lu, X., Jiang, X., & Qiao, Z. (2020). Axin1 inhibits proliferation, invasion, migration and EMT of hepatocellular carcinoma by targeting miR-650. *American Journal of Translational Research*, 12(3), 1114-1122.
- Qu, L., Wang, Y., Gong, L., Zhu, J., Gong, R., & Si, J. (2013). Suicide gene therapy for hepatocellular carcinoma cells by survivin promoter-driven expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Oncology Reports*, 29(4). <https://doi.org/10.3892/or.2013.2248>
- Quintavalle, C., Burmeister, K., Piscuoglio, S., Quagliata, L., Karamitopoulou, E., Sepe, R., Fusco, A., Terracciano, L. M., Andersen, J. B., Pallante, P., & Matter, M. S. (2017). High mobility group A1 enhances tumorigenicity of human cholangiocarcinoma and confers resistance to therapy. *Molecular Carcinogenesis*, 56(9). <https://doi.org/10.1002/mc.22671>
- Redd Bowman, K. E., Lu, P., vander Mause, E. R., & Lim, C. S. (2019). Advances in delivery vectors for gene therapy in liver cancer. En *Therapeutic Delivery* (Vol. 11, Issue 1, pp. 833-850). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.4155/tde-2019-0076>
- Redd Bowman, K. E., Lu, P., vander Mause, E. R., & Lim, C. S. (2020). Advances in delivery vectors for gene therapy in liver cancer. *Therapeutic Delivery*, 11(1), 833-850. <https://doi.org/10.4155/tde-2019-0076>
- Reya, T., & Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. En *Nature* (Vol. 434, Issue 7035). <https://doi.org/10.1038/nature03319>
- Rizzo, A., Frega, G., Ricci, A. D., Palloni, A., Abbati, F., de Lorenzo, S., Deserti, M., Tavolari, S., & Brandi, G. (2020). Anti-EGFR monoclonal antibodies in advanced biliary tract cancer: A systematic review and meta-analysis. En *In Vivo* (Vol. 34, Issue 2). <https://doi.org/10.21873/invivo.11798>
- Roose, J., & Clevers, H. (1999). TCF transcription factors: Molecular switches in carcinogenesis. En *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1424, Issues 2-3). [https://doi.org/10.1016/S0304-419X\(99\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S0304-419X(99)00026-8)
- Russell, J. O., & Monga, S. P. (2018). Wnt/ β -Catenin Signaling in Liver Development, Homeostasis, and Pathobiology. En *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* (Vol. 13). <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-044010>
- Santana-Armas, M. L., & Tros de Ilarduya, C. (2021). Strategies for cancer gene-delivery improvement by non-viral vectors. En *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 596). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120291>
- Sasaki, T., Isayama, H., Nakai, Y., Mizuno, S., Yamamoto, K., Yagioka, H., Yashima, Y., Kawakubo, K., Kogure, H., Togawa, O., Matsubara, S., Ito, Y., Sasahira, N., Hirano, K., Tsujino, T., Toda, N., Tada, M., Omata, M., & Koike, K. (2012). Multicenter phase II study of S-1 monotherapy as second-line chemotherapy for advanced biliary tract cancer refractory to gemcitabine. *Investigational New Drugs*, 30(2). <https://doi.org/10.1007/s10637-010-9553-9>

- Satoh, S., Daigo, Y., Furukawa, Y., Kato, T., Miwa, N., Nishiwaki, T., Kawasoe, T., Ishiguro, H., Fujita, M., Tokino, T., Sasaki, Y., Imaoka, S., Murata, M., Shimano, T., Yamaoka, Y., & Nakamura, Y. (2000). AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nature Genetics*, *24*(3). <https://doi.org/10.1038/73448>
- Schaefer, K. N., & Peifer, M. (2019). Wnt/Beta-Catenin Signaling Regulation and a Role for Biomolecular Condensates. En *Developmental Cell* (Vol. 48, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.01.025>
- Schmitz, K. J., Lang, H., Kaiser, G., Wohlschlaeger, J., Sotiropoulos, G. C., Baba, H. A., Jasani, B., & Schmid, K. W. (2009). Metallothionein overexpression and its prognostic relevance in intrahepatic cholangiocarcinoma and extrahepatic hilar cholangiocarcinoma (Klatskin tumors). *Human Pathology*, *40*(12). <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.01.026>
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., & Boyd, M. R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*, *48*(17), 4827-4833.
- Segi, Mitsuo. (1950). Cancer mortality for selected sites in 24 countries. *Cancer Mortality for Selected Sites in 24 Countries*.
- Selvakumaran, M., Lin, H. K., Miyashita, T., Wang, H. G., Krajewski, S., Reed, J. C., Hoffman, B., & Liebermann, D. (1994). Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene*, *9*(6), 1791-1798.
- Sendra, L., Herrero, M. J., & Aliño, S. F. (2018). Translational advances of hydrofection by hydrodynamic injection. En *Genes* (Vol. 9, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/genes9030136>
- Seo, Y. H., Joo, Y. E., Choi, S. K., Rew, J. S., Park, C. S., & Kim, S. J. (2003). Prognostic significance of p21 and p53 expression in gastric cancer. *The Korean Journal of Internal Medicine*, *18*(2). <https://doi.org/10.3904/kjim.2003.18.2.98>
- Sharma, P., Shimura, T., Banwait, J. K., & Goel, A. (2020). Andrographis-mediated chemosensitization through activation of ferroptosis and suppression of β -catenin/Wnt-signaling pathways in colorectal cancer. *Carcinogenesis*, *41*(10). <https://doi.org/10.1093/carcin/bgaa090>
- Shen, D. Y., Zhang, W., Zeng, X., & Liu, C. Q. (2013). Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling downregulates P-glycoprotein and reverses multi-drug resistance of cholangiocarcinoma. *Cancer Science*, *104*(10). <https://doi.org/10.1111/cas.12223>
- Shen, L., Nishioka, T., Guo, J., & Chen, C. (2012). Geminin functions downstream of p53 in K-ras-induced gene amplification of dihydrofolate reductase. *Cancer Research*, *72*(23). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1862>
- Shi, T., Morishita, A., Kobara, H., & Masaki, T. (2021). The role of micrnas in cholangiocarcinoma. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 14). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22147627>
- Simbolo, M., Mafficini, A., Vicentini, C., Ruzzenente, A., Rusev, B., Brunelli, M., Pedron, S., Bertuzzo, F., Barbi, S., Fassan, M., Corbo, V., Bagante, F., Turri, G., Luchini, C., Lawlor, R., Guglielmi, A., Bassi, C., & Scarpa, A. (2019). Perihilar and distal extrahepatic cholangiocarcinomas show different genetic profiles but share MYC copy gain and TP53 mutation as independent poor prognostic markers. *Annals of Oncology*, *30*. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz155.185>
- Simms, L. A., Radford-Smith, G., Biden, K. G., Buttenshaw, R., Cummings, M., Jass, J. R., Young, J., Meltzer, S. J., & Leggett, B. A. (1998). Reciprocal relationship between the tumor suppressors p53 and BAX in primary colorectal cancers. *Oncogene*, *17*(15). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202109>
- Sirica, A. E. (2008). Role of ErbB family receptor tyrosine kinases in intrahepatic cholangiocarcinoma. En *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 14, Issue 46). <https://doi.org/10.3748/wjg.14.7033>
- Slade, N. (2001). Viral vectors in gene therapy. *Periodicum Biologorum*, *103*(2), 139-143. <https://doi.org/10.3390/diseases6020042>

- Song, J., Xie, C., Jiang, L., Wu, G., Zhu, J., Zhang, S., Tang, M., Song, L., & Li, J. (2018). Transcription factor AP-4 promotes tumorigenic capability and activates the Wnt/ β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma. *Theranostics*, *8*(13). <https://doi.org/10.7150/thno.25194>
- Soussi, T., & Wiman, K. G. (2015). TP53: An oncogene in disguise. En *Cell Death and Differentiation* (Vol. 22, Issue 8, pp. 1239-1249). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.53>
- Sprengel, R., & Hasan, M. T. (2007). Tetracycline-controlled genetic switches. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *178*. https://doi.org/10.1007/978-3-540-35109-2_3
- Srimunta, U., Sawanyawisuth, K., Kraiklang, R., Pairojkul, C., Puapairoj, A., Titipungul, T., Hahnvajjanawong, C., Tassaneeyakul, W., Wongkham, C., Wongkham, S., & Vaeteewoottacharn, K. (2012). High Expression of ABCC1 Indicates Poor Prognosis in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *13*(SUPPL.1). <https://doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.KKSuppl.125>
- Stakheev, D., Taborska, P., Strizova, Z., Podrazil, M., Bartunkova, J., & Smrz, D. (2019). The WNT/ β -catenin signaling inhibitor XAV939 enhances the elimination of LNCaP and PC-3 prostate cancer cells by prostate cancer patient lymphocytes in vitro. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41182-5>
- Steinhart, Z., & Angers, S. (2018). Wnt signaling in development and tissue homeostasis. En *Development (Cambridge, England)* (Vol. 145, Issue 11). <https://doi.org/10.1242/dev.146589>
- Stieger, K., Belbellaa, B., le Guiner, C., Moullier, P., & Rolling, F. (2009). In vivo gene regulation using tetracycline-regulatable systems. En *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 61, Issues 7-8, pp. 527-541). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.12.016>
- Sugawara, H., Yasoshima, M., Katayanagi, K., Kono, N., Watanabe, Y., Harada, K., & Nakanuma, Y. (1998). Relationship between interleukin-6 and proliferation and differentiation in cholangiocarcinoma. *Histopathology*, *33*(2). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.1998.00445.x>
- Sugimachi, K., Taguchi, K. I., Aishima, S. I., Tanaka, S., Shimada, M., Kajiyama, K., Sugimachi, K., & Tsuneyoshi, M. (2001). Altered expression of β -catenin without genetic mutation in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Modern Pathology*, *14*(9). <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880409>
- Suksawat, M., Klanrit, P., Phetcharaburanin, J., Namwat, N., Khuntikeo, N., Titapun, A., Jarearnrat, A., Sa-Ngiamwibool, P., Techasen, A., & Loilome, W. (2019). In vitro and molecular chemosensitivity in human cholangiocarcinoma tissues. *PLoS ONE*, *14*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222140>
- Sumazin, P., Chen, Y., Treviño, L. R., Sarabia, S. F., Hampton, O. A., Patel, K., Mistretta, T. A., Zorman, B., Thompson, P., Heczey, A., Comerford, S., Wheeler, D. A., Chintagumpala, M., Meyers, R., Rakheja, D., Finegold, M. J., Tomlinson, G., Parsons, D. W., & López-Terrada, D. (2017). Genomic analysis of hepatoblastoma identifies distinct molecular and prognostic subgroups. *Hepatology*, *65*(1). <https://doi.org/10.1002/hep.28888>
- Sun, Y., Lv, X., Ding, P., Wang, L., Sun, Y., Li, S., Zhang, H., & Gao, Z. (2019). Exploring the functions of polymers in adenovirus-mediated gene delivery: Evading immune response and redirecting tropism. En *Acta Biomaterialia* (Vol. 97, pp. 93-104). Acta Materialia Inc. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.06.059>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Suzuki, E., Ikeda, M., Okusaka, T., Nakamori, S., Ohkawa, S., Nagakawa, T., Boku, N., Yanagimoto, H., Sato, T., & Furuse, J. (2013). A multicenter phase II study of S-1 for gemcitabine-refractory biliary tract cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *71*(5). <https://doi.org/10.1007/s00280-013-2106-0>
- Suzuki, H. I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., & Miyazono, K. (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*, *460*(7254). <https://doi.org/10.1038/nature08199>

- Sykes, S. M., Stanek, T. J., Frank, A., Murphy, M. E., & McMahon, S. B. (2009). Acetylation of the DNA binding domain regulates transcription-independent apoptosis by p53. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(30). <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.026096>
- T. Das, A., Tenenbaum, L., & Berkhout, B. (2016). Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. *Current Gene Therapy*, *16*(3), 156-167. <https://doi.org/10.2174/1566523216666160524144041>
- Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T., & Takada, S. (2006). Monounsaturated Fatty Acid Modification of Wnt Protein: Its Role in Wnt Secretion. *Developmental Cell*, *11*(6). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.10.003>
- Takada, T., Amano, H., Yasuda, H., Nimura, Y., Matsushiro, T., Kato, H., Nagakawa, T., & Nakayama, T. (2002). Is postoperative adjuvant chemotherapy useful for gallbladder carcinoma? A phase III multicenter prospective randomized controlled trial in patients with resected pancreaticobiliary carcinoma. *Cancer*, *95*(8). <https://doi.org/10.1002/cncr.10831>
- Talabnin, C., Janthavon, P., Thongsom, S., Suginta, W., Talabnin, K., & Wongkham, S. (2016). Ring finger protein 43 expression is associated with genetic alteration status and poor prognosis among patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Human Pathology*, *52*. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.12.027>
- Tang, Q., Efe, G., Chiarella, A. M., Leung, J., Chen, M., Yamazoe, T., Su, Z., Pitarresi, J. R., Li, J., Islam, M., Karakasheva, T., Klein-Szanto, A. J., Pan, S., Hu, J., Natsugoe, S., Gu, W., Stanger, B. Z., Wong, K. K., Alan Diehl, J., ... Rustgi, A. K. (2021). Mutant p53 regulates Survivin to foster lung metastasis. *Genes and Development*, *35*(78). <https://doi.org/10.1101/gad.340505.120>
- Tang, Y., Luo, J., Zhang, W., & Gu, W. (2006). Tip60-Dependent Acetylation of p53 Modulates the Decision between Cell-Cycle Arrest and Apoptosis. *Molecular Cell*, *24*(6). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.11.021>
- Tannapfel, A., Sommerer, F., Benicke, M., Katalinic, A., Uhlmann, D., Witzigmann, H., Hauss, J., & Wittekind, C. (2003). Mutations of the BRAF gene in cholangiocarcinoma but not in hepatocellular carcinoma. *Gut*, *52*(5). <https://doi.org/10.1136/gut.52.5.706>
- Tian, X. H., Hou, W. J., Fang, Y., Fan, J., Tong, H., Bai, S. L., Chen, Q., Xu, H., & Li, Y. (2013). XAV939, a tankyrase 1 inhibitor, promotes cell apoptosis in neuroblastoma cell lines by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *32*(1). <https://doi.org/10.1186/1756-9966-32-100>
- Ting, D. T., Kyba, M., & Daley, G. Q. (2005). Inducible Transgene Expression in Mouse Stem Cells. *En From: Methods in Molecular Medicine* (Vol. 105). <https://doi.org/10.1385/1-59259-826-9:023>
- Tokumoto, N., Ikeda, S., Ishizaki, Y., Kurihara, T., Ozaki, S., Iseki, M., Shimizu, Y., Itamoto, T., Arihiro, K., Okajima, M., & Asahara, T. (2005). Immunohistochemical and mutational analyses of Wnt signaling components and target genes in intrahepatic cholangiocarcinomas. *International Journal of Oncology*, *27*(4). <https://doi.org/10.3892/ijco.27.4.973>
- Toshiyuki, M., & Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, *80*(2). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90412-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90412-3)
- Uchida, N., Hsieh, M. M., Hayakawa, J., Madison, C., Washington, K. N., & Tisdale, J. F. (2011). Optimal conditions for lentiviral transduction of engrafting human CD34 + cells. *Gene Therapy*, *18*(11). <https://doi.org/10.1038/gt.2011.63>
- Vaishnavi, A., Scherzer, M. T., Kinsey, C. G., Parkman, G. L., Truong, A., Ghazi, P., Schuman, S., Battistone, B., Garrido-Laguna, I., & McMahon, M. (2020). Inhibition of MEK1/2 Forestalls the Onset of Acquired Resistance to Entrectinib in Multiple Models of NTRK1-Driven Cancer. *Cell Reports*, *32*(5). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107994>
- Valente, J. F. A., Queiroz, J. A., & Sousa, F. (2018). p53 as the Focus of Gene Therapy: Past, Present and Future. *Current Drug Targets*, *19*(15). <https://doi.org/10.2174/1389450119666180115165447>
- Valle, J. W., Borbath, I., Khan, S. A., Hugué, F., Gruenberger, T., Arnold, D., & ESMO Guidelines Committee. (2016). Biliary cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, *27*(suppl 5), v28-v37. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw324>

Valle, J., Wasan, H., Palmer, D. H., Cunningham, D., Anthoney, A., Maraveyas, A., Madhusudan, S., Iveson, T., Hughes, S., Pereira, S. P., Roughton, M., & Bridgewater, J. (2010). Cisplatin plus Gemcitabine versus Gemcitabine for Biliary Tract Cancer. *New England Journal of Medicine*, *362*(14). <https://doi.org/10.1056/nejmoa0908721>

van Haasteren, J., Hyde, S. C., & Gill, D. R. (2018). Lessons learned from lung and liver in-vivo gene therapy: implications for the future. En *Expert Opinion on Biological Therapy* (Vol. 18, Issue 9, pp. 959-972). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1506761>

Vaquero, J., Lobe, C., Tahraoui, S., Claperon, A., Mergey, M., Merabtene, F., Wendum, D., Coulouarn, C., Housset, C., Desbois-Mouthon, C., Praz, F., & Fouassier, L. (2018). The IgF2/IR/IGF1R pathway in tumor cells and myofibroblasts mediates resistance to EGFR inhibition in cholangiocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, *24*(17). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3725>

Vilchez, V., Turcios, L., Marti, F., & Gedaly, R. (2016). Targeting Wnt/ β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma treatment. En *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 22, Issue 2). <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i2.823>

Voloshanenko, O., Erdmann, G., Dubash, T. D., Augustin, I., Metzger, M., Moffa, G., Hundsrucker, C., Kerr, G., Sandmann, T., Anchang, B., Demir, K., Boehm, C., Leible, S., Ball, C. R., Glimm, H., Spang, R., & Boutros, M. (2013). Wnt secretion is required to maintain high levels of Wnt activity in colon cancer cells. *Nature Communications*, *4*. <https://doi.org/10.1038/ncomms3610>

Wang, B. L., Zhai, H. Y., Chen, B. Y., Zhai, S. P., Yang, H. Y., Chen, X. P., Zhao, W. T., & Meng, L. (2004). Clinical relationship between MDR1 gene and gallbladder cancer. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International*, *3*(2).

Wang, Q., An, Y., Wang, F., Zhang, G., Zhang, L., Dong, H., Xin, J., Li, Y., Ji, S., & Guo, X. (2021). OSchol: an online consensus survival web server for cholangiocarcinoma prognosis analysis. *HPB*, *23*(4). <https://doi.org/10.1016/j.hpb.2020.08.011>

Wang, W., Liu, P., Lavrijsen, M., Li, S., Zhang, R., Li, S., van de Geer, W. S., van de Werken, H. J. G., Peppelenbosch, M. P., & Smits, R. (2021). Evaluation of AXIN1 and AXIN2 as targets of tankyrase inhibition in hepatocellular carcinoma cell lines. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87091-4>

Wang, W., Smits, R., Hao, H., & He, C. (2019). Wnt/ β -catenin signaling in liver cancers. En *Cancers* (Vol. 11, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/cancers11070926>

Wang, W., Zhong, W., Yuan, J., Yan, C., Hu, S., Tong, Y., Mao, Y., Hu, T., Zhang, B., & Song, G. (2015). Involvement of Wnt/ β -catenin signaling in the mesenchymal stem cells promote metastatic growth and chemoresistance of cholangiocarcinoma. *Oncotarget*, *6*(39), 42276-42289. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5514>

Wang, X. Y., Zhu, W. W., Wang, Z., Huang, J. B., Wang, S. H., Bai, F. M., Li, T. E., Zhu, Y., Zhao, J., Yang, X., Lu, L., Zhang, J. B., Jia, H. L., Dong, Q. Z., Chen, J. H., Andersen, J. B., Ye, D., & Qin, L. X. (2022). Driver mutations of intrahepatic cholangiocarcinoma shape clinically relevant genomic clusters with distinct molecular features and therapeutic vulnerabilities. *Theranostics*, *27*(1). <https://doi.org/10.7150/THNO.63417>

Wang, Z., Tang, H., Xue, Y., Xue, L., Li, H., & Chong, T. (2020). Clinical application of drug sensitive gene detection in postoperative instillation for non-muscle invasive bladder cancer. *BMC Nephrology*, *21*(1). <https://doi.org/10.1186/s12882-020-02073-4>

Wardell, C. P., Fujita, M., Yamada, T., Simbolo, M., Fassan, M., Karlic, R., Polak, P., Kim, J., Hatanaka, Y., Maejima, K., Lawlor, R. T., Nakanishi, Y., Mitsushashi, T., Fujimoto, A., Furuta, M., Ruzzenente, A., Conci, S., Oosawa, A., Sasaki-Oku, A., ... Nakagawa, H. (2018). Genomic characterization of biliary tract cancers identifies driver genes and predisposing mutations. *Journal of Hepatology*, *68*(5). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.009>

Washington, K. (1996). Expression of p53 in adenocarcinoma of the gallbladder and bile ducts. *Liver*, *16*(2). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0676.1996.tb00712.x>

Wattanawongdon, W., Hahnvajjanawong, C., Namwat, N., Kanchanawat, S., Boonmars, T., Jearanaikoon, P., Leelayuwat, C., Techasen, A., & Seubwai, W. (2015). Establishment and

- characterization of gemcitabine-resistant human cholangiocarcinoma cell lines with multidrug resistance and enhanced invasiveness. *International Journal of Oncology*, 47(1). <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3019>
- Weng, Y., Huang, Q., Li, C., Yang, Y., Wang, X., Yu, J., Huang, Y., & Liang, X. J. (2020). Improved Nucleic Acid Therapy with Advanced Nanoscale Biotechnology. En *Molecular Therapy - Nucleic Acids* (Vol. 19, pp. 581-601). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.12.004>
- Wiese, M., Walther, N., Diederichs, C., Schill, F., Monecke, S., Salinas, G., Sturm, D., Pfister, S. M., Dressel, R., Johnsen, S. A., & Kramm, C. M. (2017). The β -catenin/CBP-antagonist ICG-001 inhibits pediatric glioma tumorigenicity in a Wnt-independent manner. *Oncotarget*, 8(16). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15934>
- Wu, C. E., Pan, Y. R., Yeh, C. N., & Lunec, J. (2020). Targeting P53 as a future strategy to overcome gemcitabine resistance in biliary tract cancers. *Biomolecules*, 10(11), 1-17. <https://doi.org/10.3390/biom10111474>
- Wu, Y., Lin, J. C., Piluso, L. G., Dhahbi, J. M., Bobadilla, S., Spindler, S. R., & Liu, X. (2014). Phosphorylation of p53 by TAF1 Inactivates p53-Dependent Transcription in the DNA Damage Response. *Molecular Cell*, 53(1). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.031>
- Xia, M. Y., Zhao, X. Y., Huang, Q. L., Sun, H. Y., Sun, C., Yuan, J., He, C., Sun, Y., Huang, X., Kong, W., & Kong, W. J. (2017). Activation of Wnt/ β -catenin signaling by lithium chloride attenuates d-galactose-induced neurodegeneration in the auditory cortex of a rat model of aging. *FEBS Open Bio*, 7(6). <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12220>
- Xia, X., Zhang, Y., Zieth, C. R., & Zhang, S. C. (2007). Transgenes delivered by lentiviral vector are suppressed in human embryonic stem cells in a promoter-dependent manner. *Stem Cells and Development*, 16(1). <https://doi.org/10.1089/scd.2006.0057>
- Xie, B., Li, L., Zhang, Z., Zhao, L., Cheng, J., Zhou, C., Cheng, J., Yan, J., Chen, J., Yi, J., Wang, B., Jin, S., & Wei, H. (2021). MicroRNA-1246 by targeting AXIN2 and GSK-3 β overcomes drug resistance and induces apoptosis in chemo-resistant leukemia cells. *Journal of Cancer*, 12(14). <https://doi.org/10.7150/JCA.58522>
- Xu, X., Kobayashi, S., Qiao, W., Li, C., Xiao, C., Radaeva, S., Stiles, B., Wang, R. H., Ohara, N., Yoshino, T., LeRoith, D., Torbenson, M. S., Gores, G. J., Wu, H., Gao, B., & Deng, C. X. (2006). Induction of intrahepatic cholangiocellular carcinoma by liver-specific disruption of Smad4 and Pten in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 116(7). <https://doi.org/10.1172/JCI27282>
- Yamada, D., Kobayashi, S., Wada, H., Kawamoto, K., Marubashi, S., Eguchi, H., Ishii, H., Nagano, H., Doki, Y., & Mori, M. (2013). Role of crosstalk between interleukin-6 and transforming growth factor-beta 1 in epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in biliary tract cancer. *European Journal of Cancer*, 49(7). <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.002>
- Yamada, M., Suzuki, Y., Nagasaki, S. C., Okuno, H., & Imayoshi, I. (2018). Light Control of the Tet Gene Expression System in Mammalian Cells. *Cell Reports*, 25(2). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.026>
- Yang, B., House, M. G., Guo, M., Herman, J. G., & Clark, D. P. (2005). Promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma. *Modern Pathology*, 18(3), 412-420. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800287>
- Yasumatsu, R., Nakashima, T., Uryu, H., Ayada, T., Wakasaki, T., Kogo, R., Masuda, M., Fukushima, M., & Komune, S. (2008). Correlations between thymidylate synthase expression and chemosensitivity to 5-fluorouracil, cell proliferation and clinical outcome in head and neck squamous cell carcinoma. *Chemotherapy*, 55(1). <https://doi.org/10.1159/000175465>
- Yazici, C., Niemeyer, D. J., Iannitti, D. A., & Russo, M. W. (2014). Hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma: an update. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 8(1), 63-82. <https://doi.org/10.1586/17474124.2014.852468>
- Yeh, Y., Guo, Q., Connelly, Z., Cheng, S., Yang, S., Prieto-Dominguez, N., & Yu, X. (2019). Wnt/Beta-Catenin Signaling and Prostate Cancer Therapy Resistance. En *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1210). https://doi.org/10.1007/978-3-030-32656-2_16

- Yin, C., Knudson, C. M., Korsmeyer, S. J., & van Dyke, T. (1997). Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature*, *385*(6617). <https://doi.org/10.1038/385637a0>
- Yokoo, T., Kamimura, K., Abe, H., Kobayashi, Y., Kanefuji, T., Ogawa, K., Goto, R., Oda, M., Suda, T., & Terai, S. (2016). Liver-targeted hydrodynamic gene therapy: Recent advances in the technique. *World Journal of Gastroenterology*, *22*(40). <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i40.8862>
- Yoon, H., Min, J. K., Lee, J. W., Kim, D. G., & Hong, H. J. (2011). Acquisition of chemoresistance in intrahepatic cholangiocarcinoma cells by activation of AKT and extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *405*(3). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.11.130>
- You, H. L., Huang, W. T., Liu, T. T., Weng, S. W., & Eng, H. L. (2017). Mutations of candidate tumor suppressor genes at chromosome 3p in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Experimental and Molecular Pathology*, *103*(3), 249-254. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.11.002>
- Yuan, S., Tao, F., Zhang, X., Zhang, Y., Sun, X., & Wu, D. (2020). Role of Wnt/ β -Catenin Signaling in the Chemoresistance Modulation of Colorectal Cancer. *BioMed Research International*, *2020*. <https://doi.org/10.1155/2020/9390878>
- Zeekpudsa, P., Kukongviriyapan, V., Senggunprai, L., Sripa, B., & Prawan, A. (2014). Suppression of NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 enhanced the susceptibility of cholangiocarcinoma cells to chemotherapeutic agents. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *33*(1). <https://doi.org/10.1186/1756-9966-33-11>
- Zelmer, A., & Ward, T. H. (2013). Noninvasive fluorescence imaging of small animals. *Journal of Microscopy*, *252*(1). <https://doi.org/10.1111/jmi.12063>
- Zhan, T., Ambrosi, G., Wandmacher, A. M., Rauscher, B., Betge, J., Rindtorff, N., Häussler, R. S., Hinsenkamp, I., Bamberg, L., Hessling, B., Müller-Decker, K., Erdmann, G., Burgermeister, E., Ebert, M. P., & Boutros, M. (2019). MEK inhibitors activate Wnt signalling and induce stem cell plasticity in colorectal cancer. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09898-0>
- Zhang, F., Wan, M., Xu, Y., Li, Z., Leng, K., Kang, P., Cui, Y., & Jiang, X. (2017). Long noncoding RNA PCAT1 regulates extrahepatic cholangiocarcinoma progression via the Wnt/ β -catenin-signaling pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *94*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.025>
- Zhang, J., Han, C., & Wu, T. (2012). MicroRNA-26a promotes cholangiocarcinoma growth by activating β -catenin. *Gastroenterology*, *143*(1). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.03.045>
- Zhang, K. S., Zhou, Q., Wang, Y. F., & Liang, L. J. (2013). Inhibition of Wnt signaling induces cell apoptosis and suppresses cell proliferation in cholangiocarcinoma cells. *Oncology Reports*, *30*(3). <https://doi.org/10.3892/or.2013.2560>
- Zhang, W. W., Li, L., Li, D., Liu, J., Li, X., Li, W., Xu, X., Zhang, M. J., Chandler, L. A., Lin, H., Hu, A., Xu, W., & Lam, D. M. K. (2018). The First Approved Gene Therapy Product for Cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 Years in the Clinic. *Human Gene Therapy*, *29*(2). <https://doi.org/10.1089/hum.2017.218>
- Zhang, X., Taoka, R., Liu, D., Matsuoka, Y., Tohi, Y., Kakehi, Y., & Sugimoto, M. (2021). Knockdown of rrm1 with adenoviral shRNA vectors to inhibit tumor cell viability and increase chemotherapeutic sensitivity to gemcitabine in bladder cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(8). <https://doi.org/10.3390/ijms22084102>
- Zheng, N., Li, L., & Wang, X. (2020). Molecular mechanisms, off-target activities, and clinical potentials of genome editing systems. *Clinical and Translational Medicine*, *10*(1), 412-426. <https://doi.org/10.1002/ctm2.34>
- Zhong, F., Yang, J., Tong, Z. T., Chen, L. L., Fan, L. L., Wang, F., Zha, X. L., & Li, J. (2015). Guggulsterone inhibits human cholangiocarcinoma Sk-ChA-1 and Mz-ChA-1 cell growth by inducing caspase-dependent apoptosis and downregulation of survivin and Bcl-2 expression. *Oncology Letters*, *10*(3). <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3391>
- Zhong, Z., & Virshup, D. M. (2020). Wnt signaling and drug resistance in cancer. *Molecular Pharmacology*, *97*(2). <https://doi.org/10.1124/MOL.119.117978>

Zhou, S., Chen, W., Cole, J., & Zhu, G. (2020). Delivery of nucleic acid therapeutics for cancer immunotherapy. *Medicine in Drug Discovery*, 6, 100023. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2020.100023>

Zhou, X., Vink, M., Klaver, B., Berkhout, B., & Das, A. T. (2006). Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution. *Gene Therapy*, 13(19). <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302780>

Zhu, Z. B., Chen, Y., Makhija, S. K., Lu, B., Wang, M., Rivera, A. A., Yamamoto, M., Wang, S., Siegal, G. P., Curiel, D. T., & McDonald, J. M. (2006). Survivin promoter-based conditionally replicative adenoviruses target cholangiocarcinoma. *International Journal of Oncology*, 29(5). <https://doi.org/10.3892/ijo.29.5.1319>

9.
ENGLISH
SUMMARY

VNiVERSiDAD D SALAMANCA

Department of Physiology and Pharmacology



DOCTORAL THESIS

Development and evaluation in experimental models of cholangiocarcinoma of genetic engineering tools for tumor labelling and chemosensitization

Presented by **Paula Sanchón Sánchez** to obtain
Ph.D. in the University of Salamanca

2023

ABBREVIATIONS

5-FU: 5-fluorouracil

AJCC: American Joint Committee on Cancer

AU: Arbitrary unit

BIRC5: Baculoviral IAP repeat containing 5

CCA: Cholangiocarcinoma

CMV: Cytomegalovirus

COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer

CRC: Colorectal cancer

dCCA: Distal cholangiocarcinoma

DOX: Doxycycline

DVL: Dishevelled

eCCA: Extrahepatic cholangiocarcinoma

EF1 α : Human elongation factor-1 alpha

EGFP: Enhanced green fluorescent protein

FPKM-UQ: Fragments per kilobase of transcript per million mapped reads upper quartile

FZD: Frizzled receptors

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GSK3 β : Glycogen synthase kinase 3 beta

GFP: Green fluorescent protein

HCC: Hepatocellular carcinoma

HPRT1: Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1

IC₅₀: Half maximal inhibitory concentration

iCCA: Intrahepatic cholangiocarcinoma

IGEC: Inducible gene expression cassette

IHC: Immunohistochemistry

IRES: Internal ribosome entry site

iRFP: Infrared fluorescent protein

ITR: Inverted terminal repeat

LRP5/6: Low density lipoprotein receptor-related proteins 5 and 6

MCS: Multicloning site

MDR: Multidrug resistance

MOC: Mechanism of chemoresistance

MOI: Multiplicity of infection.

N.D.: No determined

NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease

NT: Non-tumor

pCCA: Perihilar cholangiocarcinoma

Poly(A): Polyadenylation tail

PSC: Primary sclerosing cholangitis

QR: Quantification ratio

RT-qPCR: Quantitative reverse transcription PCR

rtTA: Reverse tetracycline transactivator

S.D.: Standard deviation

T: Tumor

TCF/LEF: T-cell factor/lymphoid enhancer factor

TCGA: The Cancer Genome Atlas

TLDA: Taqman low density arrays

TP53: Tumor Protein 53

TRE: Tetracycline response element

WB: Western blot

WT: Wild type

AIMS

Advances in omics methodologies have made it possible to identify certain molecular targets involved in the development of CCA. Among them is the *TP53* gene, one of the CCA's most frequently mutated genes. On the other hand, the alteration of the WNT/ β -catenin signaling pathway also appears to play a highly relevant role in CCA progression. The aberrant expression of this pathway's elements has been related to greater malignancy.

Considering this theoretical framework, the **main aim** of the Doctoral Thesis was to study and evaluate these molecular targets on which to act to increase the sensitivity of CCA to antitumor drugs.

This general aim can be divided into four:

Aim 1: To evaluate the usefulness of inducing forced expression of three elements (GSK3 β , axin 1, and axin 2) of the β -catenin destruction complex as potential targets for suppressing WNT/ β -catenin pathway hyperactivity and modulating CCA chemoresistance.

Aim 2: To study the usefulness of inducing forced expression of the tumor suppressor *TP53* in modulating chemoresistance in cell models of CCA.

Aim 3: To carry out the inducible forced expression of genes of interest, for instance, concerning the previous aims, based on the inducible tetracycline system, a genetic engineering tool with tumor specificity was developed.

Aim 4: As a proof-of-concept, the tool's potential usefulness developed in aim three for the inducible forced expression of transgenes of interest in tumor cells, infrared fluorescent protein iRFP was selected to visualize tumors generated in mice.

INTRODUCTION

Cholangiocarcinoma (CCA)

CCA, the second most common type of liver tumor, encompasses a type of liver tumor of the biliary tree, which is characterized by being very heterogeneous and with a poor prognosis, despite surgical advances in recent years. Their worldwide incidence continues to rise due to several factors (Bertuccio et al., 2019; Patel & Benipal, 2019). Although the average age at diagnosis is 50 years, most diagnosed cases are in patients over 65 (Banales et al., 2020; Clements et al., 2020; Doherty et al., 2017; Goeppert et al., 2019). Most CCA cases (90%) are characterized as adenocarcinomas, and therefore malignant (Khan et al., 2012). It has a low 5-year survival rate: 95% of patients die within this period (Clements et al., 2020). In addition to its complexity, the lack of non-invasive diagnostic strategies to differentiate between HCC and iCCA or primary sclerosing cholangitis (PSC) and CCA, makes its clinical management difficult (Arbelaiz et al., 2017; Bertuccio et al., 2019).

Anatomical features

CCA originates in the biliary tree and depending on the anatomical location of the tumor within the biliary tree, they can be classified into three subtypes: intrahepatic, iCCA; perihilar, pCCA and distal, dCCA (Figure 1). This fact means that their genetic fingerprint, etiology, clinical features, and prognosis are also different (Lowery et al., 2018).

iCCA can be located anywhere along the biliary tree within the liver, above the hilar junction, from the second-order bile ducts to the small intrahepatic bile ducts (Goeppert et al., 2019). However, if the tumor originates in the bile ducts outside the liver, it is considered extrahepatic cholangiocarcinoma (eCCA). The extrahepatic bile ducts encompass the part of the hepatic ducts outside the liver and common bile duct. These ducts are subdivided into the perihilar and distal regions, with the cystic duct being the border. Thus, pCCAs occur in the hilum: the external area of the liver where the right and left hepatic ducts meet, giving rise to the common hepatic duct, close to the origin of the cystic duct. They are also known as Klastkin's tumors. On the other hand, tumors of the distal region of the extrahepatic bile ducts (dCCA)

include the common bile duct that flows into the small intestine. In addition to the origin, eCCAs differ in etiology, embryology, biology, clinical manifestations, management, prognosis, and epidemiology, with pCCA being more common. Overall, eCCA comprises 75% of the cases of CCA, while iCCA includes the remaining 25% (Banales et al., 2020; Bertuccio et al., 2019; Clements et al., 2020; Doherty et al., 2017; Marin et al., 2020).

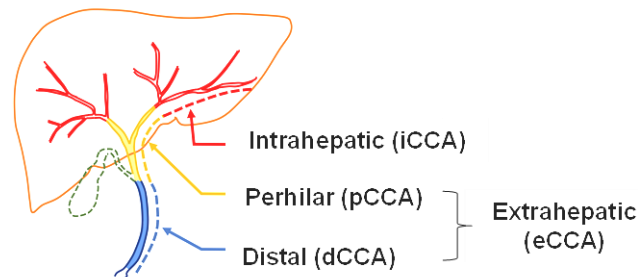


Figure 1. Anatomical classification of CCA. Figure translated from (Kendall et al., 2019).

On the other hand, the mortality rate also varies in iCCA and eCCA. For iCCA, it has increased globally in the last two decades, being higher in men (1-2/100,000); whereas in eCCA it has decreased in both sexes, being in most countries (<1/100,000) (Bertuccio et al., 2019; Clements et al., 2020).

Risk factors

CCA has a complex and, in most cases, unknown etiology, with known risk factors accounting for less than 30% of all cases (Khan et al., 2012). Although the characteristics are diverse, they are related to chronic inflammation and lesions of the bile duct epithelium (Angosto & García, 1987). Some of the factors implicated in the development of CCA are previous liver disorders, diseases of the biliary tree, chronic pancreatitis, inflammatory bowel disease, liver parasites (*Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*), type 2 diabetes mellitus, NAFLD, obesity, hypertension, alcohol consumption, smoking, drugs, and environmental toxins (Clements et al., 2020).

Diagnosis, staging and prognosis

The diagnostic difficulty of these tumors is compounded by the lack of early signs and symptoms, as well as tumor refractoriness, making clinical success even more difficult. Common clinical manifestations include abdominal pain, asthenia,

malaise, weight loss, jaundice, anorexia, and abdominal swelling or a sensation of a mass in the right hypochondrium (Banales et al., 2020; Doherty et al., 2017). The difficulty in diagnosis lies in the fact that the clinical presentation in initial stages is asymptomatic. The most frequent sign in pCCA and dCCA is jaundice due to biliary tract obstruction. This sign in iCCA is associated with more advanced stages. As the disease progresses, the non-specific symptomatology stands out, the reason why in most individuals, its diagnosis is usually late and is detected in routine tests in advanced stages of the disease (Amin et al., 2017; Doherty et al., 2017), and contributes to a low 5-year survival rate of around 7% (American Cancer Society, 2019; Centers for Disease Control and Prevention, 2021).

Assessment for diagnosis and staging of the disease is performed by a combination of imaging techniques, laboratory analysis such as liver function tests and serum detection of elevated non-specific tumor biomarkers (CA19-9, CA-125 and CEA) and histological analysis of tumor samples (Figure 2) (Doherty et al., 2017; Khan et al., 2012).

The staging of CCA, which follows the AJCC TNM system (Amin et al., 2017), is performed after the surgical procedure and pathological examination of the tumor fragment. This classification is different for iCCA, pCCA, and dCCA due to differences in tumor biology and therapy (Yazici et al., 2014; National Cancer Institute, 2022).

In addition, the different types of CCA will be differentiated into the resectable tumor, in case the tumor is localized, or unresectable tumor, and therefore their prognosis will also be different. Unfortunately, most bile duct tumors are difficult to remove surgically (National Cancer Institute, 2022).

Treatment

The treatment of choice, whenever possible, is liver resection with negative margins (subtotal hepatectomy) allowing adequate subsequent liver function, as this is the only curative option for CCA (Figure 2) (National Cancer Institute, 2022; Valle et al., 2016). In addition to surgical resection, patient management strategies include subsequent adjuvant treatment such as systemic chemotherapy or targeted/localized therapeutic radiation. As adjuvant chemotherapy, the administration of capecitabine is recommended to improve survival in patients with resectable tumors (Lamarca et

al., 2020; Primrose et al., 2019). Liver transplantation could also be considered for iCCA and pCCA, provided that strict requirements are met (Angosto & García, 1987).

Approximately 70% of CCA cases are diagnosed in advanced stages, so they become unresectable tumors, because they present a large extension of tumor boundaries or vascular invasion. In these cases, treatment options are reduced exclusively to palliative measures such as chemotherapy and radiotherapy (National Cancer Institute, 2022; Forner et al., 2019; Yazici et al., 2014).

Systemic chemotherapy is the primary choice. The classic agents used are fluoropyrimidines such as gemcitabine, 5-fluorouracil (5-FU), or capecitabine and platinum derivatives (cisplatin and oxaliplatin). The gemcitabine/cisplatin combination is the standard first-line treatment for patients with advanced unresectable biliary tumors, modestly improving survival (Eckel & Schmid, 2007; Okusaka et al., 2010; Valle et al., 2016). Combinations such as gemcitabine and oxaliplatin (Jang et al., 2010) and capecitabine and oxaliplatin (phase III trial, NCT01470443) are also possible.

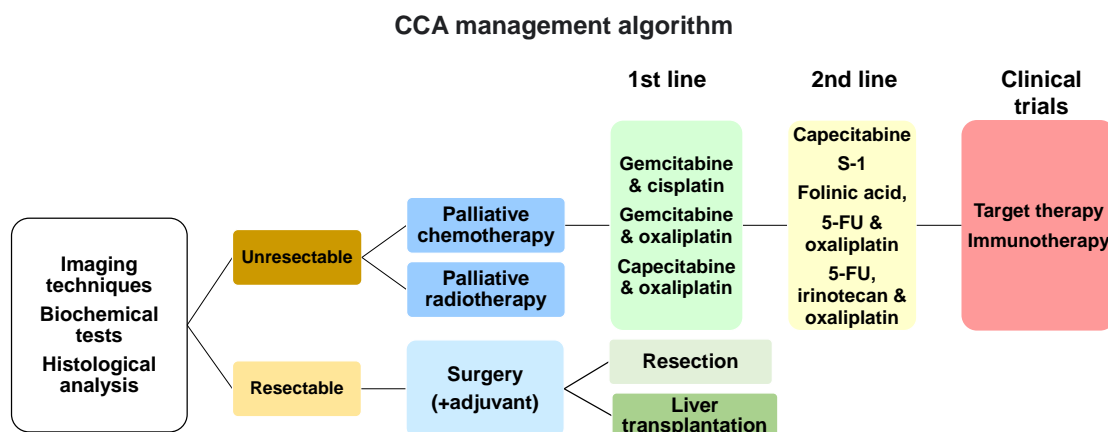


Figure 2. CCA clinical management and treatment.

In the case of patients who do not respond to this treatment, second-line treatment based on 5-FU, capecitabine and S-1 (an oral combination of tegafur, gimeracil and oteracil) is selected. The benefit of which is even more limited and there is little evidence on the indications for its selection, as shown in the systematic reviews (Lamarca et al., 2014; Marin, Prete, et al., 2020). This second line also includes the strategy of the combinations, such as folinic acid, 5-FU and oxaliplatin

(Bridgewater et al., 2013; Lamarca et al., 2021); 5-FU, irinotecan and oxaliplatin (Belkouz et al., 2019); S-1 monotherapy (Sasaki et al., 2012; Suzuki et al., 2013) and etoposide toniribate (Pape et al., 2019). Among the new chemotherapeutic agents, which are in various phases of clinical trials, the most promising ones are targeted drugs and immunotherapy (Lee et al., 2020; Marabelle et al., 2020).

In sum, the increase in incidence, the difficulty of early diagnosis, and the scarcity of available treatment to which patients can respond and improve their prognosis, makes research into personalized medicine urgently needed, to find molecular targets and effective drugs capable of improving the lives of patients suffering from the disease.

Molecular alterations in CCA

One of the main pathways overexpressed in CCA is WNT/ β -catenin (Zhang et al., 2012), along with alterations of other intracellular oncogenic and pro-inflammatory signaling pathways, such as cyclooxygenase-2 (COX2), prostaglandin E2 (PGE2), *MYC*, *ERBB*, *TNF* and *VEGF*, involved in the development and progression of the disease (Andersen et al., 2012; Sirica, 2008). Specifically, mutations in oncogenes and tumor suppressor genes have been identified such as *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A*, *BRAF*, *BAP1*, *CTNNB1*, *SMAD4*, *PTEN*, and chromosomal translocations of *FGFR2* (Furubo et al., 1999; Khan et al., 2006; Lowery et al., 2018; Tannapfel et al., 2003; Xu et al., 2006). In addition, IL-6 and β -catenin overexpression (Jusakul et al., 2017; Sugawara et al., 1998; Sugimachi et al., 2001) have been associated with an adverse prognosis in patients with CCA.

WNT/ β -catenin signaling pathway

The WNT/ β -catenin signaling pathway participates in multiple physiological and pathological processes in animals. It is required for both embryogenesis and maintenance of homeostasis in the adult individuals, control of cell migration, genetic stability, apoptosis and tissue self-renewal by stem cells (Pai et al., 2017; Steinhart & Angers, 2018). Upon binding of WNT to its receptor, the signaling cascade can be activated in two ways: canonical and non-canonical, whether they are or not dependent on β -catenin mechanisms (Katoh & Katoh, 2007; Polakis, 2012; Steinhart & Angers, 2018).

β -catenin, is the critical protein in the pathway. It is found in multiple subcellular locations, participating in the formation of tight junctions, helping to anchor cadherins to the actin cytoskeleton. However, a small proportion of β -catenin is found both in the cytoplasm and in the nucleus, where it acts as a transcription factor in the canonical pathway, regulating the expression of various genes. These cytoplasmic levels are tightly controlled by the destruction complex (Hülsken et al., 1994; Kimelman & Xu, 2006; Pai et al., 2017). The canonical activation pathway is the characteristic one occurring in liver tissue (Figure 3). This process is regulated by the presence or absence of WNTs ligands. In addition, the kinases CK1 α and GSK3 β , together with the multidomain proteins APC and AXIN play a key role in its regulation, constituting the β -catenin destruction complex. These protein kinases, in the presence of ligands, conduct LRP phosphorylation, which promotes the recruitment of the destruction complex to the plasma membrane and inactivates it. This allows the β -catenin protein to stabilize, increasing its cytoplasmic concentration, which leads to its translocation to the nucleus, where β -catenin acts as a coactivator, joining the complex formed by TCF/LEF and PYGO coactivators. The complex stimulates the transcription of target genes such as *BIRC5*, *MYC*, *CCND1*, *AXIN2*, among others. On the other hand, in the absence of WNT ligands, β -catenin is bound to the cytoplasmic destruction complex. In this case, the protein kinases CK1 α and GSK3 β phosphorylate β -catenin at highly conserved Ser/Thr residues near the N-terminal end (first at Ser45 by CK1 α and subsequently at Thr41 and Ser33/37 by GSK3 β). Phosphorylated β -catenin is recognized by E3 ubiquitin ligase complex for polyubiquitination and subsequent destruction by the proteasome (Clevers, 2006; Gordon & Nusse, 2006; Hoppler & Kavanagh, 2007; Perugorria et al., 2019; Schaefer & Peifer, 2019; Zhang et al., 2012).

WNT/ β -catenin in CCA

Hyperactivation of the WNT/ β -catenin pathway is caused by an elevation of WNT ligands such as WNT3A, WNT5A, WNT7B and WNT10A in biopsies of human CCA (Loilome et al., 2014) and Wnt3a in the tumor stroma of animal models of CCA (Boulter et al., 2012). In addition, two negative regulators of this pathway, the tumor suppressor SOX17 (Lozano et al., 2020; Merino-Azpitarte et al., 2017) and the E3 ubiquitin ligase RNF43 (Ong et al., 2012; Pangestu et al., 2021; Talabnin et

al., 2016) have been found down-regulated in CCA, which correlates with the up-regulation of the WNT/ β -catenin pathway in this tumor. In animal models of CCA, it seems that several agents are involved in these alterations, such as a change in the tumor microenvironment, capable of maintaining the elevated activity of the canonical WNT pathway and promoting cell proliferation and migration (Boulter et al., 2012, 2015; Wang et al., 2015) as well as the development of resistance to chemotherapeutic agents (Wang et al., 2015; Yuan et al., 2020). In contrast, its pharmacological inhibition has been shown to have anti-tumor effects (Boulter et al., 2015).

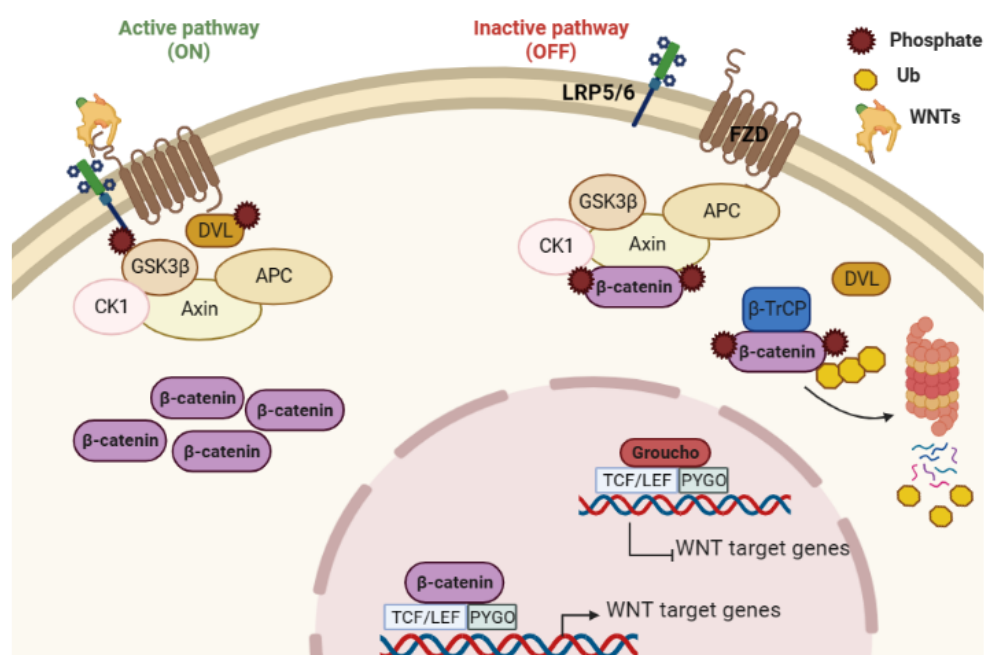


Figure 3. Scheme of the canonical WNT/ β -catenin pathway. Ub: ubiquitin. Figure created with BioRender (<https://biorender.com/>).

TP53 function and regulation

The gene *TP53* is located on the short arm of chromosome 17 (17p13.1), is a tumor suppressor gene known as the "guardian of the genome" and encodes for the p53 protein. The specific molecular mechanisms by which it acts as a tumor suppressor are not yet clearly understood. It acts as a transcription factor in response to cellular stress, contributing to the maintenance of cellular homeostasis in numerous metabolic pathways and participating in the regulation of several genes (Olivier et al., 2010). Its central target genes include *CDKN1A*, *BAX* and *MDM2* (Leroy et al., 2014).

In the absence of stressful stimuli, p53 is found in the cytoplasm bound to MDM2, an E3 ubiquitin protein ligase, which acts as a direct negative regulator of its transcriptional activity by ubiquitinating it. Thus, it promotes its degradation and p53 levels remain low. Conversely, under various types of stress (intrinsic or extrinsic), p53 undergoes post-translational modifications (it is released from MDM2), leading to activation of the protein, its stabilization and accumulation, regulating the transcription of target genes (Figure 4) (Kastenhuber & Lowe, 2017; Leroy et al., 2014; Monti et al., 2020).

The primary role of p53 as a negative regulator of the cell cycle (G1/S and G2/M) is not the only one, as it regulates the synthesis of target genes involved in apoptosis, senescence, DNA repair or cell metabolism. Recently, its role in regulating of small non-coding RNA molecules and the cellular microenvironment has been identified (Figure 4) (Aubrey et al., 2016; Akula et al., 2019; Leroy et al., 2014; Shi et al., 2021; Suzuki et al., 2009).

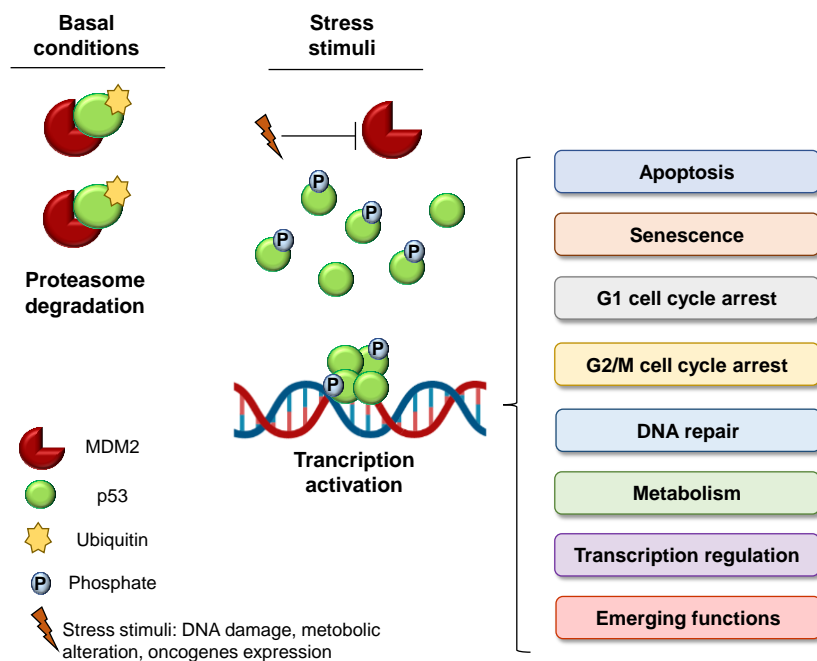


Figure 4. Activation model of the p53 and its functions under regulation.

***TP53* mutations and CCA**

TP53 is the most frequently mutated gene in human cancers (up to 92%) (COSMIC, 2022) resulting in inactivation or alteration of its biological functions. Under normal conditions, wild type p53 has a short half-life and is expressed in tissues at low levels. However, mutant p53 shows high levels in tumor cells, as it is not negatively regulated by MDM2 and accumulates in the nucleus of tumor cells, potentially leading to an oncogenic effect coupled with loss of wild-type function (Kamp et al., 2016; Leroy et al., 2014).

Somatic mutations are the most frequent ones, with a prevalence of more than 30% in liver tumors (<https://tp53.isb-cgc.org/>). *TP53* is the most frequently mutated in CCA (28%, 27.2%, and 25.1% according to COSMIC, GDC Data portal, and cBioPortal, respectively). Data from biliary tree tumors, reveal that most of the mutations are found in the central region (exons 4-9), which codes for the DNA binding domains. *TP53* mutagenesis has been related to the impairment of their transcriptional activity. The most frequent types of mutations are missense mutations (82%), while nonsense mutations coding for a truncated or inactivated protein variant account for 5.6% of mutations.

Since the beginning of the century, information has been available on the relationship between p53 and CCA, either by gene alterations as reported in the literature review of Khan et al., 2005 and several studies (Ahmad et al., 2021; Lin et al., 2021) or by changes in expression levels, where *TP53* overexpression has been considered an indicator of pathogenesis (Arora et al., 1999; Puetkasichonpasutha et al., 2020; Washington, 1996). Therefore, mutant p53 is a potential target for the development of new drugs, either to eliminate the aberrant isoform accumulated in tumor cells or to restore normal p53 function (Monti et al., 2020).

MATERIALS AND METHODS

Samples from surgically removed, CCA and from paired adjacent liver nontumor tissue (n=32) were obtained from the biobank of the University Hospital of Salamanca.

In vivo xenograft model using female nude mice (Swiss *nu/nu*) was performed by subcutaneous injection of HepG2 cells in both dorsal flanks. The sleeping beauty method was used to induce liver tumors in male CD1 mice. These animals were used to visualize tumors with tool named IGEC-V2 generated in this thesis and administered by hydrodynamic injection.

The cell lines used were obtained from human CCA, EGI-1, TFK-1, HuH-28, HuCCT1, and Witt; HCC, PLC/PRF/5; hepatoblastoma, HepG2; a derivative from embryonic kidney, HEK293T and a mouse sarcoma, CCRF S-180 II.

Lentiviruses for IGEC cassettes, *GSK3B*, *AXIN1*, *AXIN2*, and *TP53* overexpression were produced to transduce the cells. To quantify the number of cells expressing the constructs of interest after viral transduction, EGFP or iRFP expression was determined by flow cytometry.

Gene expression was evaluated in different human CCA cells and samples by RT-qPCR and/or TLDA. Protein expression of transduced cells was determined by immunoblotting assays and the presence of the proteins of interest in CCA samples was evaluated by immunohistochemistry. Cell proliferation and cytostatic activity was measured in CCA cells by the formazan (MTT) test. Cell death was determined by using the flow cytometry-based assays annexin-V and propidium iodide.

In silico studies were carried out employing several databases. Results were statistically analyzed using appropriate tests (t-student, paired t-test, Bonferroni method of multiple range testing, analyses of variance, and Ordinary Squared Minimums) depending on what is required in each case.

CHAPTER I: DEVELOPMENT OF AN INDUCIBLE GENE EXPRESSION TOOL FOR *IN VIVO* VISUALIZATION

Inducible expression systems are suitable tools for manipulating gene expression in a controlled and reversible manner (Das et al., 2016; Gossen & Bujard, 1992). One of the objectives of this Doctoral Thesis was to develop a gene tool based on the mechanism of action of the tetracycline controlled TetOn system, which was named IGEC (*Inducible Gene Expression Cassette*). The experimental design generated a gene construct that would allow the inducible and cell-specific expression of a gene of interest (transgene) in response to the administration of tetracyclines as an inducing agent.

CHAPTER II: ROLE OF WNT PATHWAY INHIBITORY PROTEINS IN THE SENSITIVITY OF CCA CELLS TO ANTITUMOR DRUGS

One of the most important signaling pathways in CCA is the WNT/ β -catenin pathway, which is involved in the development, proliferation, communication, and survival of healthy cells. However, several studies have shown that alterations in this pathway contribute to the development of CCA (Boulter et al., 2015; Perugorria et al., 2019; Zhang et al., 2013). Furthermore, previous studies indicate that hyperactivity of this signaling pathway in CCA is associated, among others, with an increased expression of *BIRC5*, which encodes the survivin protein, and is related to an increase in some features of malignancy such as high proliferation rate and cell invasiveness, as well as with a worse prognosis of these patients (Chang et al., 2004; Javle et al., 2004; Koprowski et al., 2015; Obama et al., 2005; Zhong et al., 2015).

Therefore, one of the aims of this Doctoral Thesis was to elucidate whether the forced expression of essential elements controlling the WNT/ β -catenin pathway could affect the chemoresistance phenotype by changing the overall activity of this pathway.

CHAPTER III: THE ROLE OF p53 IN CHEMOSENSITISATION

Decreased *TP53* expression or loss of *TP53* function is involved in the MDR phenotype in many types of cancer, but its role in CCA is less well known. Therefore, we wanted to study the effect of the expression of wild-type *TP53* on the expression profile of chemoresistance genes and sensitivity to drugs used against this type of tumor in CCA cell lines.

CONCLUSIONS

FIRST CONCLUSION

A genetic engineering tool named IGEC, containing a tetracycline response element (TRE), has been developed to carry out an inducible forced expression of the gene of interest. IGEC is a versatile tool because it allows easy cloning of the desired ORF under the bidirectional transcriptional control of two promoters, endowing both tumor and tissue specificity.

SECOND CONCLUSION

Lentiviral vectors carrying the IGEC cassette containing the ORF of a protein with infrared fluorescence able to cross body tissues with minimal quenching, are a useful tool for the visualization in intact mice of liver tumors.

THIRD CONCLUSION

Individual forced expression of GSK3 β , axin 1 and axin 2 proteins, which are part of the β -catenin destruction complex, fails to decrease the exacerbated activity of the WNT/ β -catenin signaling pathway in CCA. Moreover, this genetic manipulation does not significantly modify the chemoresistance phenotype of these cells.

FOURTH CONCLUSION

Forced expression of *TP53* in CCA cells modifies the resistome, mainly affecting the expression of genes that have an impact on the balance between apoptosis and survival, inducing a shift towards favored apoptosis activation in response to anti-tumor drugs.

FIFTH CONCLUSION

Imposing high expression levels of wild-type p53 in CCA cells can be an effective anti-tumor therapeutic strategy, because this manipulation results in a dual effect, acting as a tumor suppressor and an enhancer of drug response, mainly to platinum-derived anti-tumor agents.

REFERENCES

- Ahmad, S., Badr, B., Khan, A., Rehman, R., Ghias, K., Muhammad, J. S., & Khan, M. R. (2021). The Role of K-Ras and P53 in Biliary Tract Carcinoma. In *Journal of the Pakistan Medical Association* (Vol. 71, Issue 10, pp. 2378–2384). Pakistan Medical Association. <https://doi.org/10.47391/JPMA.11-1322>
- Akula, S. M., Abrams, S. L., Steelman, L. S., Emma, M. R., Augello, G., Cusimano, A., Azzolina, A., Montalto, G., Cervello, M., & McCubrey, J. A. (2019). RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/PTEN/AKT/mTORC1 and TP53 pathways and regulatory miRs as therapeutic targets in hepatocellular carcinoma. In *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (Vol. 23, Issue 11, pp. 915–929). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1685501>
- Al-Abdulla, R., Lozano, E., Macias, R. I. R., Monte, M. J., Briz, O., O'Rourke, C. J., Serrano, M. A., Banales, J. M., Avila, M. A., Martinez-Chantar, M. L., Geier, A., Andersen, J. B., & Marin, J. J. G. (2019). Epigenetic events involved in organic cation transporter 1-dependent impaired response of hepatocellular carcinoma to sorafenib. *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/bph.14563>
- American Cancer Society. (2019). What is liver cancer? American Cancer Society. Retrieved July 26, 2022, from <https://www.cancer.org/cancer/liver-cancer/about/what-is-liver-cancer.html>
- Amin, M. B., Greene, F. L., & Edge, S. B. (2017). *Ajcc cancer staging manual*. AJCC, American Joint Committee on Cancer.
- Andersen, J. B., Spee, B., Blechacz, B. R., Avital, I., Komuta, M., Barbour, A., Conner, E. A., Gillen, M. C., Roskams, T., Roberts, L. R., Factor, V. M., & Thorgeirsson, S. S. (2012). Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors. *Gastroenterology*, *142*(4). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.005>
- Angosto, C. M., & García, F. F. (1987). Aspectos bioquímicos y farmacológicos en disfunciones Hepáticas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Arbelaiz, A., Azkargorta, M., Krawczyk, M., Santos-Laso, A., Lapitz, A., Perugorria, M. J., Erice, O., Gonzalez, E., Jimenez-Agüero, R., Lacasta, A., Ibarra, C., Sanchez-Campos, A., Jimeno, J. P., Lammert, F., Milkiewicz, P., Marzioni, M., Macias, R. I. R., Marin, J. J. G., Patel, T., ... Banales, J. M. (2017). Serum extracellular vesicles contain protein biomarkers for primary sclerosing cholangitis and cholangiocarcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *66*(4), 1125–1143. <https://doi.org/10.1002/hep.29291>
- Armengol, C., Cairo, S., Fabre, M., & Buendia, M. A. (2011). Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: The hepatoblastoma model. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *43*(2). <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.07.012>
- Arora, D. S., Ramsdale, J., Lodge, J. P. A., & Wyatt, J. I. (1999). p53 but not bcl-2 is expressed by most cholangiocarcinomas: A study of 28 cases. *Histopathology*, *34*(6). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1999.00654.x>
- Ashida, K., Terada, T., Kitamura, Y., & Kaibara, N. (1998). Expression of E-cadherin, α -catenin, β -catenin, and CD44 (standard and variant isoforms) in human cholangiocarcinoma: An immunohistochemical study. *Hepatology*, *27*(4). <https://doi.org/10.1002/hep.510270412>
- Aubrey, B. J., Strasser, A., & Kelly, G. L. (2016). Tumor-suppressor functions of the TP53 pathway. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* (Vol. 6, Issue 5). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026062>
- Banales, J. M., Marin, J. J. G., Lamarca, A., Rodrigues, P. M., Khan, S. A., Roberts, L. R., Cardinale, V., Carpino, G., Andersen, J. B., Braconi, C., Calvisi, D. F., Perugorria, M. J., Fabris, L., Boulter, L., Macias, R. I. R., Gaudio, E., Alvaro, D., Gradilone, S. A., Strazzabosco, M., ... Gores, G. J. (2020). Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *17*(9), 557–588. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0310-z>
- Baugh, E. H., Ke, H., Levine, A. J., Bonneau, R. A., & Chan, C. S. (2018). Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers? In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 25, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.180>

- Belkouz, A., Vos-Geelen, J. de, Eskens, F., Mathot, R. A. A., van Gulik, T., van Oijen, M. G. H., Punt, C. J. A., Wilmink, J., & Kluempfen, H.-J. (2019). Efficacy and safety of FOLFIRINOX in advanced biliary tract cancer after failure of gemcitabine plus cisplatin: A phase II trial. *Journal of Clinical Oncology*, *37*(15_suppl), 4086. https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.4086
- Bell, J. B., Podetz-Pedersen, K. M., Aronovich, E. L., Belur, L. R., & McIvor, R. S. (2007). Preferential delivery of the sleeping beauty transposon system to livers of mice by hydrodynamic injection. *Nature Protocols*, *2*(12). <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.471>
- Bengala, C., Bertolini, F., Malavasi, N., Boni, C., Aitini, E., Dealis, C., Zironi, S., Depenni, R., Fontana, A., del Giovane, C., Luppi, G., & Conte, P. (2010). Sorafenib in patients with advanced biliary tract carcinoma: A phase II trial. *British Journal of Cancer*, *102*(1). <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605458>
- Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S. W., Luzio, J. P., Simari, R., & Weissberg, P. (1998). Cell surface trafficking of Fas: A rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science*, *282*(5387). <https://doi.org/10.1126/science.282.5387.290>
- Bertuccio, P., Malvezzi, M., Carioli, G., Hashim, D., Boffetta, P., El-Serag, H. B., la Vecchia, C., & Negri, E. (2019). Global trends in mortality from intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma. *Journal of Hepatology*, *71*(1), 104–114. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.03.013>
- Boeck, J. de, & Verfaillie, C. (2021). Doxycycline inducible overexpression systems: How to induce your gene of interest without inducing misinterpretations. In *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 32, Issue 17). <https://doi.org/10.1091/mbc.E21-04-0177>
- Boulter, L., Govaere, O., Bird, T. G., Radulescu, S., Ramachandran, P., Pellicoro, A., Ridgway, R. A., Seo, S. S., Spee, B., van Rooijen, N., Sansom, O. J., Iredale, J. P., Lowell, S., Roskams, T., & Forbes, S. J. (2012). Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. *Nature Medicine*, *18*(4). <https://doi.org/10.1038/nm.2667>
- Boulter, L., Guest, R. v., Kendall, T. J., Wilson, D. H., Wojtacha, D., Robson, A. J., Ridgway, R. A., Samuel, K., van Rooijen, N., Barry, S. T., Wigmore, S. J., Sansom, O. J., & Forbes, S. J. (2015). WNT signaling drives cholangiocarcinoma growth and can be pharmacologically inhibited. *Journal of Clinical Investigation*, *125*(3). <https://doi.org/10.1172/JCI176452>
- Bridgewater, J., Palmer, D., Cunningham, D., Iveson, T., Gillmore, R., Waters, J., Harrison, M., Wasan, H., Corrie, P., & Valle, J. (2013). Outcome of second-line chemotherapy for biliary tract cancer. In *European Journal of Cancer* (Vol. 49, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.11.024>
- Burgess, A. W., Faux, M. C., Layton, M. J., & Ramsay, R. G. (2011). Wnt signaling and colon tumorigenesis - A view from the periphery. In *Experimental Cell Research* (Vol. 317, Issue 19). <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.08.010>
- Bykov, V. J. N., Eriksson, S. E., Bianchi, J., & Wiman, K. G. (2018). Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 18, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.109>
- Campomenosi, P., Monti, P., Aprile, A., Abbondandolo, A., Frebourg, T., Gold, B., Crook, T., Inga, A., Resnick, M. A., Iggo, R., & Fronza, G. (2001). P53 mutants can often transactivate promoters containing a p21 but not Bax or PIG3 responsive elements. *Oncogene*, *20*(27). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204468>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2021). Liver cancer. Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved July 26, 2022, from <https://www.cdc.gov/cancer/liver/>
- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A., Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A. P., Sander, C., & Schultz, N. (2012). The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discovery*, *2*(5). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>
- Chan, K. T., & Lung, M. L. (2004). Mutant p53 expression enhances drug resistance in a hepatocellular carcinoma cell line. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *53*(6). <https://doi.org/10.1007/s00280-004-0767-4>

- Chang, Q., Liu, Z. R., Wang, D. Y., Kumar, M., Chen, Y. B., & Qin, R. Y. (2004). Survivin expression induced by doxorubicin in cholangiocarcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 10(3). <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i3.415>
- Chen, X., & Calvisi, D. F. (2014). Hydrodynamic transfection for generation of novel mouse models for liver cancer research. In *American Journal of Pathology* (Vol. 184, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.12.002>
- Choi, W., Cogdell, D., Feng, Y., Hamilton, S. R., & Zhang, W. (2006). Transcriptional activation of the carboxylesterase 2 gene by the p53 pathway. *Cancer Biology and Therapy*, 5(11). <https://doi.org/10.4161/cbt.5.11.3271>
- Chung, Y. M., Park, S. H., Park, J. K., Kim, Y. T., Kang, Y. K., & Yoo, Y. do. (2000). Establishment and characterization of 5-fluorouracil-resistant gastric cancer cells. *Cancer Letters*, 159(1). [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(00\)00535-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(00)00535-8)
- Clément-Lacroix, P., Ai, M., Morvan, F., Roman-Roman, S., Vayssière, B., Belleville, C., Estrera, K., Warman, M. L., Baron, R., & Rawadi, G. (2005). Lrp5-independent activation of Wnt signaling by lithium chloride increases bone formation and bone mass in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(48). <https://doi.org/10.1073/pnas.0505259102>
- Clements, O., Eliahoo, J., Kim, J. U., Taylor-Robinson, S. D., & Khan, S. A. (2020). Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Hepatology*, 72(1), 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.09.007>
- Clevers, H. (2006). Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. In *Cell* (Vol. 127, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018>
- COSMIC. (2022). TP53 gene - cosmic. TP53 Gene - Somatic Mutations in Cancer. Retrieved October 28, 2022, from <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=TP53>
- Curia, M. C., Zuckermann, M., de Lellis, L., Catalano, T., Lattanzio, R., Aceto, G., Veschi, S., Cama, A., Otte, J. B., Piantelli, M., Mariani-Costantini, R., Cetta, F., & Battista, P. (2008). Sporadic childhood hepatoblastomas show activation of β -catenin, mismatch repair defects and p53 mutations. *Modern Pathology*, 21(1). <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800977>
- Dalsgaard, T., Cecchi, C. R., Askou, A. L., Bak, R. O., Andersen, P. O., Hougaard, D., Jensen, T. G., Dagnæs-Hansen, F., Mikkelsen, J. G., Corydon, T. J., & Aagaard, L. (2018). Improved Lentiviral Gene Delivery to Mouse Liver by Hydrodynamic Vector Injection through Tail Vein. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 12. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.07.005>
- Danieau, G., Morice, S., Renault, S., Brion, R., Biteau, K., Amiaud, J., Cadé, M., Heymann, D., Lézet, F., Verrecchia, F., Rédini, F., & Royer, B. B. le. (2021). Icg-001, an inhibitor of the β -catenin and camp response element-binding protein dependent gene transcription, decreases proliferation but enhances migration of osteosarcoma cells. *Pharmaceuticals*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/ph14050421>
- Das, A. T., Zhou, X., Metz, S. W., Vink, M. A., & Berkhout, B. (2016). Selecting the optimal Tet-On system for doxycycline-inducible gene expression in transiently transfected and stably transduced mammalian cells. *Biotechnology Journal*, 11(1). <https://doi.org/10.1002/biot.201500236>
- de Galarreta, M. R., Bresnahan, E., Molina-Sánchez, P., Lindblad, K. E., Maier, B., Sia, D., Puigvehi, M., Miguela, V., Casanova-Acebes, M., Dhainaut, M., Villacorta-Martin, C., Singhi, A. D., Moghe, A., von Felden, J., Grinspan, L. T., Wang, S., Kamphorst, A. O., Monga, S. P., Brown, B. D., ... Lujambio, A. (2019). β -catenin activation promotes immune escape and resistance to anti-PD-1 therapy in hepatocellular carcinoma. *Cancer Discovery*, 9(8). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0074>
- de La Monte, S. M., Sohn, Y. K., & Wands, J. R. (1997). Correlates of p53- and Fas (CD95)-mediated apoptosis in Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 152(1). [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(97\)00131-7](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(97)00131-7)
- Doherty, B., Nambudiri, V. E., & Palmer, W. C. (2017). Update on the Diagnosis and Treatment of Cholangiocarcinoma. *Current Gastroenterology Reports*, 19(1), 2. <https://doi.org/10.1007/s11894-017-0542-4>

- Dutta, S., Pregartner, G., Rücker, F. G., Heitzer, E., Zebisch, A., Bullinger, L., Berghold, A., Döhner, K., & Sill, H. (2020). Functional classification of tp53 mutations in acute myeloid leukemia. *Cancers*, *12*(3). <https://doi.org/10.3390/cancers12030637>
- Eckel, F., & Schmid, R. M. (2007). Chemotherapy in advanced biliary tract carcinoma: A pooled analysis of clinical trials. *British Journal of Cancer*, *96*(6). <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603648>
- El-Deiry, W. S. (2016). p21(WAF1) mediates cell-cycle inhibition, relevant to cancer suppression and therapy. In *Cancer Research* (Vol. 76, Issue 18). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2055>
- El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, *75*(4). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90500-P](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90500-P)
- Emami, K. H., Nguyen, C., Ma, H., Kim, D. H., Jeong, K. W., Eguchi, M., Moon, R. T., Teo, J. L., Oh, S. W., Kim, H. Y., Moon, S. H., Hall, J. R., & Kahn, M. (2004). A small molecule inhibitor of β -catenin/cyclic AMP response element-binding protein transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(34). <https://doi.org/10.1073/pnas.0404875101>
- Fields, S., & Jang, S. K. (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science*, *249*(4972). <https://doi.org/10.1126/science.2144363>
- Filonov, G. S., Piatkevich, K. D., Ting, L. M., Zhang, J., Kim, K., & Verkhusha, V. v. (2011). Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging. *Nature Biotechnology*, *29*(8). <https://doi.org/10.1038/nbt.1918>
- Fiorini, C., Cordani, M., Padroni, C., Blandino, G., di Agostino, S., & Donadelli, M. (2015). Mutant p53 stimulates chemoresistance of pancreatic adenocarcinoma cells to gemcitabine. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1853*(1). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.10.003>
- Fischer, M., Quaas, M., Steiner, L., & Engeland, K. (2016). The p53-p21-DREAM-CDE/CHR pathway regulates G2/M cell cycle genes. *Nucleic Acids Research*, *44*(1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkv927>
- Forner, A., Vidili, G., Rengo, M., Bujanda, L., Ponz-Sarvisé, M., & Lamarca, A. (2019). Clinical presentation, diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. In *Liver International* (Vol. 39, Issue S1). <https://doi.org/10.1111/liv.14086>
- Furubo, S., Harada, K., Shimonishi, T., Katayanagi, K., Tsui, W., & Nakanuma, Y. (1999). Protein expression and genetic alterations of p53 and ras in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Histopathology*, *35*(3). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.1999.00705.x>
- Gang, E. J., Hsieh, Y. T., Pham, J., Zhao, Y., Nguyen, C., Huantes, S., Park, E., Naing, K., Klemm, L., Swaminathan, S., Conway, E. M., Pelus, L. M., Crispino, J., Mullighan, C. G., McMillan, M., Mischen, M., Kahn, M., & Kim, Y. M. (2014). Small-molecule inhibition of CBP/catenin interactions eliminates drug-resistant clones in acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene*, *33*(17). <https://doi.org/10.1038/onc.2013.169>
- Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., Cerami, E., Sander, C., & Schultz, N. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science Signaling*, *6*(269). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>
- Gerlach, J. P., Emmink, B. L., Nojima, H., Kranenburg, O., & Maurice, M. M. (2014). Wnt signalling induces accumulation of phosphorylated β -catenin in two distinct cytosolic complexes. *Open Biology*, *4*(11). <https://doi.org/10.1098/rsob.140120>
- Goepfert, B., Folseraas, T., Roessler, S., Kloor, M., Volckmar, A. L., Endris, V., Buchhalter, I., Stenzinger, A., Grzyb, K., Grimsrud, M. M., Gornicka, B., von Seth, E., Reynolds, G. M., Franke, A., Gotthardt, D. N., Mehrabi, A., Cheung, A., Verheij, J., Arola, J., ... Karlsen, T. H. (2020). Genomic Characterization of Cholangiocarcinoma in Primary Sclerosing Cholangitis Reveals Therapeutic Opportunities. *Hepatology*, *72*(4). <https://doi.org/10.1002/hep.31110>
- Goepfert, B., Toth, R., Singer, S., Albrecht, T., Lipka, D. B., Lutsik, P., Brocks, D., Baehr, M., Muecke, O., Assenov, Y., Gu, L., Endris, V., Stenzinger, A., Mehrabi, A., Schirmacher, P., Plass, C., Weichenhan, D., & Roessler, S. (2019). Integrative Analysis Defines Distinct Prognostic Subgroups

- of Intrahepatic Cholangiocarcinoma. 2091 *Hepatology*, 69(5).
<https://doi.org/10.1002/hep.30493/supinfo>
- Goodenowe, D. B., Cook, L. L., Liu, J., Lu, Y., Jayasinghe, D. A., Ahiahonu, P. W. K., Heath, D., Yamazaki, Y., Flax, J., Krenitsky, K. F., Sparks, D. L., Lerner, A., Friedland, R. P., Kudo, T., Kamino, K., Morihara, T., Takeda, M., & Wood, P. L. (2007). Peripheral ethanolamine plasmalogen deficiency: A logical causative factor in Alzheimer's disease and dementia. *Journal of Lipid Research*, 48(11). <https://doi.org/10.1194/jlr.P700023-JLR200>
- Gordon, M. D., & Nusse, R. (2006). Wnt signaling: Multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 281, Issue 32). <https://doi.org/10.1074/jbc.R600015200>
- Gossen, M., & Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(12). <https://doi.org/10.1073/pnas.89.12.5547>
- Gurney, A., & Hoey, T. (2016). From Research to the Clinic: Targeting Stem Cell Pathways in Cancer. In *Cancer Stem Cells: Targeting the Roots of Cancer, Seeds of Metastasis, and Sources of Therapy Resistance*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803892-5.00017-6>
- Ha, N. C., Tonzuka, T., Stamos, J. L., Choi, H. J., & Weis, W. I. (2004). Mechanism of phosphorylation-dependent binding of APC to β -catenin and its role in β -catenin degradation. *Molecular Cell*, 15(4). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.08.010>
- He, S., & Tang, S. (2020). WNT/ β -catenin signaling in the development of liver cancers. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 132). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110851>
- He, Z., Hu, X., Liu, W., Dorrance, A., Garzon, R., Houghton, P. J., & Shen, C. (2017). P53 suppresses ribonucleotide reductase via inhibiting mTORC1. *Oncotarget*, 8(25). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17440>
- Hill, M. A., Alexander, W. B., Guo, B., Kato, Y., Patra, K., O'Dell, M. R., McCall, M. N., Whitney-Miller, C. L., Bardeesy, N., & Hezel, A. F. (2018). Kras and Tp53 Mutations Cause Cholangiocyte- and Hepatocyte-Derived Cholangiocarcinoma. *Cancer Research*, 78(16). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1123>
- Hock, A. K., Lee, P., Maddocks, O. D., Mason, S. M., Blyth, K., & Vousden, K. H. (2014). IRFP is a sensitive marker for cell number and tumor growth in high-throughput systems. *Cell Cycle*, 13(2). <https://doi.org/10.4161/cc.26985>
- Hoffman, W. H., Biade, S., Zilfou, J. T., Chen, J., & Murphy, M. (2002). Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *Journal of Biological Chemistry*, 277(5). <https://doi.org/10.1074/jbc.M106643200>
- Hoppler, S. P., & Kavanagh, C. L. (2007). Wnt signalling: Variety at the core. *Journal of Cell Science*, 120(3). <https://doi.org/10.1242/jcs.03363>
- Hu, J., Che, L., Li, L., Pilo, M. G., Cigliano, A., Ribback, S., Li, X., Latte, G., Mela, M., Evert, M., Dombrowski, F., Zheng, G., Chen, X., & Calvisi, D. F. (2016). Co-activation of AKT and c-Met triggers rapid hepatocellular carcinoma development via the mTORC1/FASN pathway in mice. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep20484>
- Huang, J., Guo, X., Li, W., & Zhang, H. (2017). Activation of Wnt/ β -catenin signalling via GSK3 inhibitors direct differentiation of human adipose stem cells into functional hepatocytes. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep40716>
- Huang, S. M. A., Mishina, Y. M., Liu, S., Cheung, A., Stegmeier, F., Michaud, G. A., Charlat, O., Wietliffe, E., Zhang, Y., Wiessner, S., Hild, M., Shi, X., Wilson, C. J., Mickanin, C., Myer, V., Fazal, A., Tomlinson, R., Serluca, F., Shao, W., ... Cong, F. (2009). Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature*, 461(7264). <https://doi.org/10.1038/nature08356>
- Huang, Y., Liu, N., Liu, J., Liu, Y., Zhang, C., Long, S., Luo, G., Zhang, L., & Zhang, Y. (2019). Mutant p53 drives cancer chemotherapy resistance due to loss of function on activating transcription of PUMA. *Cell Cycle*, 18(24). <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1688951>

- Huang, Y., Zheng, J., Chen, D., Li, F., Wu, W., Huang, X., Wu, Y., Deng, Y., & Qiu, F. (2017). Transcriptome profiling identifies a recurrent CRYL1-IFT88 chimeric transcript in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, *8*(25). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17244>
- Hülsken, J., Birchmeier, W., & Behrens, J. (1994). E-cadherin and APC compete for the interaction with β -catenin and the cytoskeleton. *Journal of Cell Biology*, *127*(6 II). <https://doi.org/10.1083/jcb.127.6.2061>
- Jang, J. S., Lim, H. Y., Hwang, I. G., Song, H. S., Yoo, N., Yoon, S., Kim, Y. H., Park, E., Byun, J. H., Lee, M. A., Oh, S. J., Lee, K. H., Kim, B. S., Oh, S. C., Kim, S. Y., & Lee, S. J. (2010). Gemcitabine and oxaliplatin in patients with unresectable biliary cancer including gall bladder cancer: A Korean Cancer Study Group phase II trial. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *65*(4). <https://doi.org/10.1007/s00280-009-1069-7>
- Javle, M. M., Tan, D., Yu, J., LeVea, C. M., Li, F., Kuvshinoff, B. W., & Gibbs, J. F. (2004). Nuclear survivin expression predicts poor outcome in cholangiocarcinoma. *Hepato-Gastroenterology*, *51*(60).
- Jho, E., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.-K., Freund, J.-N., & Costantini, F. (2002). Wnt/ β -Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(4). <https://doi.org/10.1128/mcb.22.4.1172-1183.2002>
- Jöbsis, F. F. (1977). Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science*, *198*(4323). <https://doi.org/10.1126/science.929199>
- Jusakul, A., Cutcutache, I., Yong, C. H., Lim, J. Q., Huang, M. N., Padmanabhan, N., Nellore, V., Kongpetch, S., Ng, A. W. T., Ng, L. M., Choo, S. P., Myint, S. S., Thanan, R., Nagarajan, S., Lim, W. K., Ng, C. C. Y., Boot, A., Liu, M., Ong, C. K., ... Tan, P. (2017). Whole-genome and epigenomic landscapes of etiologically distinct subtypes of cholangiocarcinoma. *Cancer Discovery*, *7*(10), 1116–1135. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0368>
- Kallunki, T., Barisic, M., Jäätelä, M., & Liu, B. (2019). How to choose the right inducible gene expression system for Mammalian studies? In *Cells* (Vol. 8, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells8080796>
- Kamp, W. M., Wang, P. yuan, & Hwang, P. M. (2016). TP53 mutation, mitochondria and cancer. In *Current Opinion in Genetics and Development* (Vol. 38, pp. 16–22). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.02.007>
- Kastenhuber, E. R., & Lowe, S. W. (2017). Putting p53 in Context. In *Cell* (Vol. 170, Issue 6, pp. 1062–1078). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>
- Katoh, M., & Katoh, M. (2007). WNT signaling pathway and stem cell signaling network. In *Clinical Cancer Research* (Vol. 13, Issue 14). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2316>
- Kawazoe, H., Bilim, V. N., Ugoikov, A. v., Yuuki, K., Naito, S., Nagaoka, A., Kato, T., & Tomita, Y. (2012). GSK-3 inhibition in vitro and in vivo enhances antitumor effect of sorafenib in renal cell carcinoma (RCC). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *423*(3). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.147>
- Kendall, T., Verheij, J., Gaudio, E., Evert, M., Guido, M., Goepfert, B., & Carpino, G. (2019). Anatomical, histomorphological and molecular classification of cholangiocarcinoma. In *Liver International* (Vol. 39, Issue S1, pp. 7–18). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/liv.14093>
- Khan, S. A., Davidson, B. R., Goldin, R. D., Heaton, N., Karani, J., Pereira, S. P., Rosenberg, W. M. C., Tait, P., Taylor-Robinson, S. D., Thillainayagam, A. v, Thomas, H. C., & Wasan, H. (2012). Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. *Gut*, *61*(12), 1657–1669. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301748>
- Khan, S. A., Taylor-Robinson, S. D., Carmichael, P. L., Habib, N., Lemoine, N. R., & Thomas, H. C. (2006). Analysis of p53 mutations for a mutational signature in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *International Journal of Oncology*, *28*(5). <https://doi.org/10.3892/ijo.28.5.1269>
- Khan, S. A., Thomas, H. C., Toledano, M. B., Cox, I. J., & Taylor-Robinson, S. D. (2005). p53 mutations in human cholangiocarcinoma: A review. In *Liver International* (Vol. 25, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2005.01106.x>

- Kim, Y., Jang, M., Lim, S., Won, H., Yoon, K. S., Park, J. H., Kim, H. J., Kim, B. H., Park, W. S., Ha, J., & Kim, S. S. (2011). Role of cyclophilin B in tumorigenesis and cisplatin resistance in hepatocellular carcinoma in humans. *Hepatology*, *54*(5). <https://doi.org/10.1002/hep.24539>
- Kimelman, D., & Xu, W. (2006). β -Catenin destruction complex: Insights and questions from a structural perspective. In *Oncogene* (Vol. 25, Issue 57). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210055>
- Kluge, J., Terfehr, D., & Kück, U. (2018). Inducible promoters and functional genomic approaches for the genetic engineering of filamentous fungi. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 102, Issue 15, pp. 6357–6372). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9115-1>
- Kong, J., Shen, S., Zhang, Z., & Wang, W. (2020). Identification of hub genes and pathways in cholangiocarcinoma by coexpression analysis. *Cancer Biomarkers*, *27*(4). <https://doi.org/10.3233/CBM-190038>
- Koprowski, S., Sokolowski, K., Kunnimalaiyaan, S., Clark Gamblin, T., & Kunnimalaiyaan, M. (2015). Curcumin-mediated regulation of Notch1/hairy and enhancer of split-1/survivin: Molecular targeting in cholangiocarcinoma. In *Journal of Surgical Research* (Vol. 198, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.jss.2015.03.029>
- Kwon, W. S., Rha, S. Y., Choi, Y. H., Lee, J. O., Park, K. H., Jung, J. J., Kim, T. S., Jeung, H. C., & Chung, H. C. (2006). Ribonucleotide reductase M1 (RRM1) 2464G>A polymorphism shows an association with gemcitabine chemosensitivity in cancer cell lines. *Pharmacogenetics and Genomics*, *16*(6). <https://doi.org/10.1097/01.fpc.0000204999.29924.da>
- Lamarca, A., Edeline, J., McNamara, M. G., Hubner, R. A., Nagino, M., Bridgewater, J., Primrose, J., & Valle, J. W. (2020). Current standards and future perspectives in adjuvant treatment for biliary tract cancers. In *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 84). <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.101936>
- Lamarca, A., Hubner, R. A., David Ryder, W., & Valle, J. W. (2014). Second-line chemotherapy in advanced biliary cancer: A systematic review. In *Annals of Oncology* (Vol. 25, Issue 12). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu162>
- Lamarca, A., Palmer, D. H., Wasan, H. S., Ross, P. J., Ma, Y. T., Arora, A., Falk, S., Gillmore, R., Wadsley, J., Patel, K., Anthoney, A., Maraveyas, A., Iveson, T., Waters, J. S., Hobbs, C., Barber, S., Ryder, W. D., Ramage, J., Davies, L. M., ... Valle, J. W. (2021). Second-line FOLFOX chemotherapy versus active symptom control for advanced biliary tract cancer (ABC-06): a phase 3, open-label, randomised, controlled trial. *The Lancet Oncology*, *22*(5). [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00027-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00027-9)
- Lau, D. K., Mouradov, D., Wasenang, W., Luk, I. Y., Scott, C. M., Williams, D. S., Yeung, Y. H., Limpiboon, T., Iatropoulos, G. F., Jenkins, L. J., Reehorst, C. M., Chionh, F., Nikfarjam, M., Croagh, D., Dhillon, A. S., Weickhardt, A. J., Muramatsu, T., Saito, Y., Tebbutt, N. C., ... Mariadason, J. M. (2019). Genomic Profiling of Biliary Tract Cancer Cell Lines Reveals Molecular Subtypes and Actionable Drug Targets. *IScience*, *21*. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.10.044>
- Lee, E., Salic, A., Krüger, R., Heinrich, R., & Kirschner, M. W. (2003). The roles of APC and axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway. *PLoS Biology*, *1*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000010>
- Lee, J. K., Capanu, M., O'Reilly, E. M., Ma, J., Chou, J. F., Shia, J., Katz, S. S., Gansukh, B., Reidy-Lagunes, D., Segal, N. H., Yu, K. H., Chung, K. Y., Saltz, L. B., & Abou-Alfa, G. K. (2013). A phase II study of gemcitabine and cisplatin plus sorafenib in patients with advanced biliary adenocarcinomas. *British Journal of Cancer*, *109*(4). <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.432>
- Lee, S. H., Lee, H. S., Lee, S. H., Woo, S. M., Kim, D. U., & Bang, S. (2020). Efficacy and safety of pembrolizumab for gemcitabine/cisplatin-refractory biliary tract cancer: A multicenter retrospective study. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(6). <https://doi.org/10.3390/jcm9061769>
- Leroy, B., Anderson, M., & Soussi, T. (2014). TP53 mutations in human cancer: Database reassessment and prospects for the next decade. In *Human Mutation* (Vol. 35, Issue 6, pp. 672–688). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/humu.22552>
- Levine, A. J., Momand, J., & Finlay, C. A. (1991). The p53 tumor suppressor gene. In *Nature* (Vol. 351, Issue 6326). <https://doi.org/10.1038/351453a0>

- Li, L., Xiang, Y., Zeng, Y., Xiao, B., Yu, W., Duan, C., Xia, X., Zhang, T., Zeng, Y., Liu, Y., & Dai, R. (2020). GSK-3 β inhibition promotes doxorubicin-induced apoptosis in human cholangiocarcinoma cells via FAK/AKT inhibition. *Molecular Medicine Reports*, 22(5). <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11502>
- Li, Y. X., Lin, Z. bin, & Tan, H. R. (2004). Wild type p53 increased chemosensitivity of drug-resistant human hepatocellular carcinoma Bel7402/5-FU cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(1).
- Liang, R., Chen, W., Chen, X. Y., Fan, H. N., Zhang, J., & Zhu, J. S. (2021). Dihydroartemisinin inhibits the tumorigenesis and invasion of gastric cancer by regulating STAT1/KDR/MMP9 and P53/BCL2L1/CASP3/7 pathways. *Pathology Research and Practice*, 218. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.153318>
- Lillacci, G., Benenson, Y., & Khammash, M. (2018). Synthetic control systems for high performance gene expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 46(18). <https://doi.org/10.1093/nar/gky795>
- Lin, D., Mercer, W. E., Pierce, J. H., & Givol, D. (1994). Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent Pathway. *Cancer Research*, 54(13).
- Lin, J., Cao, Y., Yang, X., Li, G., Shi, Y., Wang, D., Long, J., Song, Y., Mao, J., Xie, F., Bai, Y., Zhang, L., Yang, X., Wan, X., Wang, A., Guan, M., Zhao, L., Hu, K., Pan, J., ... Zhao, H. (2021). Mutational spectrum and precision oncology for biliary tract carcinoma. *Theranostics*, 11(10), 4585–4598. <https://doi.org/10.7150/thno.56539>
- Liu, F., Song, Y. K., & Liu, D. (1999). Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Therapy*, 6(7). <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300947>
- Loilome, W., Bungkanjana, P., Techasen, A., Namwat, N., Yongvanit, P., Puapairoj, A., Khuntikeo, N., & Riggins, G. J. (2014). Activated macrophages promote Wnt/ β -catenin signaling in cholangiocarcinoma cells. *Tumor Biology*, 35(6). <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1698-2>
- Lowery, M. A., Ptashkin, R., Jordan, E., Berger, M. F., Zehir, A., Capanu, M., Kemeny, N. E., O'Reilly, E. M., El-Dika, I., Jarnagin, W. R., Harding, J. J., D'Angelica, M. I., Cercek, A., Hechtman, J. F., Solit, D. B., Schultz, N., Hyman, D. M., Klimstra, D. S., Saltz, L. B., & Abou-Alfa, G. K. (2018). Comprehensive Molecular Profiling of Intrahepatic and Extrahepatic Cholangiocarcinomas: Potential Targets for Intervention. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 24(17), 4154–4161. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0078>
- Lozano, E., Asensio, M., Perez-Silva, L., Banales, J. M., Briz, O., & Marin, J. J. G. (2020). MRP3-Mediated Chemoresistance in Cholangiocarcinoma: Target for Chemosensitization Through Restoring SOX17 Expression. *Hepatology*, 72(3). <https://doi.org/10.1002/hep.31088>
- Lozano, E., Macias, R. I. R., Monte, M. J., Asensio, M., del Carmen, S., Sanchez-Vicente, L., Alonso-Peña, M., Al-Abdulla, R., Munoz-Garrido, P., Satriano, L., O'Rourke, C. J., Banales, J. M., Avila, M. A., Martinez-Chantar, M. L., Andersen, J. B., Briz, O., & Marin, J. J. G. (2019). Causes of hOCT1-Dependent Cholangiocarcinoma Resistance to Sorafenib and Sensitization by Tumor-Selective Gene Therapy. *Hepatology*, 70(4). <https://doi.org/10.1002/hep.30656>
- Ma, L., Wang, X., Jia, T., Wei, W., Chua, M. S., & So, S. (2015). Tankyrase inhibitors attenuate WNT/ β -catenin signaling and inhibit growth of hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget*, 6(28). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4455>
- Maguire, M., Nield, P. C., Devling, T., Jenkins, R. E., Park, B. K., Polański, R., Vlatković, N., & Boyd, M. T. (2008). MDM2 regulates dihydrofolate reductase activity through monoubiquitination. *Cancer Research*, 68(9). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5271>
- Mancinelli, R., Carpino, G., Petrungraro, S., Mammola, C. L., Tomaipitnca, L., Filippini, A., Facchiano, A., Ziparo, E., & Giampietri, C. (2017). Multifaceted roles of GSK-3 in cancer and autophagy-related diseases. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2017). <https://doi.org/10.1155/2017/4629495>
- Marabelle, A., Le, D. T., Ascierto, P. A., di Giacomo, A. M., de Jesus-Acosta, A., Delord, J. P., Geva, R., Gottfried, M., Penel, N., Hansen, A. R., Piha-Paul, S. A., Doi, T., Gao, B., Chung, H. C., Lopez-Martin, J., Bang, Y. J., Frommer, R. S., Shah, M., Ghorri, R., ... Diaz, L. A. (2020). Efficacy of pembrolizumab in patients with noncolorectal high microsatellite instability/ mismatch repair–

- deficient cancer: Results from the phase II KEYNOTE-158 study. *Journal of Clinical Oncology*, 38(1). <https://doi.org/10.1200/JCO.19.02105>
- Marin, J. J. G., Macias, R. I. R., Monte, M. J., Romero, M. R., Asensio, M., Sanchez-Martin, A., Cives-Losada, C., Temprano, A. G., Espinosa-Escudero, R., Reviejo, M., Bohorquez, L. H., & Briz, O. (2020). Molecular bases of drug resistance in hepatocellular carcinoma. In *Cancers* (Vol. 12, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/cancers12061663>
- Marin, J. J. G., Prete, M. G., Lamarca, A., Tavorari, S., Landa-Magdalena, A., Brandi, G., Segatto, O., Vogel, A., Macias, R. I. R., Rodrigues, P. M., Casta, A. I., Mertens, J., Rodrigues, C. M. P., Fernandez-Barrena, M. G., da Silva Ruivo, A., Marzioni, M., Mentrasti, G., Acedo, P., Munoz-Garrido, P., ... working group 6 of the COST-action 18122 (Euro-Cholangio-NET) as part of the European Network for the study of Cholangiocarcinoma (ENSCCA). (2020). Current and novel therapeutic opportunities for systemic therapy in biliary cancer. *British Journal of Cancer*, 123(7), 1047–1059. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0987-3>
- Martinez-Becerra, P., Monte, I., Romero, M. R., Serrano, M. A., Vaquero, J., Macias, R. I. R., del Rio, A., Grañé-Boladeras, N., Jimenez, F., San-Martin, F. G., Pastor-Anglada, M., & Marin, J. J. G. (2012). Up-regulation of FXR isoforms is not required for stimulation of the expression of genes involved in the lack of response of colon cancer to chemotherapy. *Pharmacological Research*, 66(5). <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.07.005>
- Martin-Orozco, E., Sanchez-Fernandez, A., Ortiz-Parra, I., & Ayala-San Nicolas, M. (2019). WNT Signaling in Tumors: The Way to Evade Drugs and Immunity. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02854>
- Matsuda, T., Kato, T., Kiyotani, K., Tarhan, Y. E., Saloura, V., Chung, S., Ueda, K., Nakamura, Y., & Park, J. H. (2017). p53-independent p21 induction by MELK inhibition. *Oncotarget*, 8(35). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18488>
- Mazzoni, S. M., & Fearon, E. R. (2014). AXIN1 and AXIN2 variants in gastrointestinal cancers. In *Cancer Letters* (Vol. 355, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.09.018>
- Merino-Azpitarte, M., Lozano, E., Perugorria, M. J., Esparza-Baquer, A., Erice, O., Santos-Laso, Á., O'Rourke, C. J., Andersen, J. B., Jiménez-Agüero, R., Lacasta, A., D'Amato, M., Briz, Ó., Jalan-Sakrikar, N., Huebert, R. C., Thelen, K. M., Gradilone, S. A., Aransay, A. M., Lavín, J. L., Fernández-Barrena, M. G., ... Banales, J. M. (2017). SOX17 regulates cholangiocyte differentiation and acts as a tumor suppressor in cholangiocarcinoma. *Journal of Hepatology*, 67(1), 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.02.017>
- Monti, P., Menichini, P., Speciale, A., Cutrona, G., Fais, F., Taiana, E., Neri, A., Bomben, R., Gentile, M., Gattei, V., Ferrarini, M., Morabito, F., & Fronza, G. (2020). Heterogeneity of TP53 Mutations and P53 Protein Residual Function in Cancer: Does It Matter? In *Frontiers in Oncology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.593383>
- Mucaki, E. J., Zhao, J. Z. L., Lizotte, D. J., & Rogan, P. K. (2019). Predicting responses to platinum chemotherapy agents with biochemically-inspired machine learning. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-018-0034-5>
- Mukai, F., Ishiguro, K., Sano, Y., & Fujita, S. C. (2002). Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 β . *Journal of Neurochemistry*, 81(5). <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00918.x>
- Namwat, N., Amimanan, P., Loilome, W., Jearanaikoon, P., Sripa, B., Bhudhisawasdi, V., & Tassaneeyakul, W. (2008). Characterization of 5-fluorouracil-resistant cholangiocarcinoma cell lines. *Chemotherapy*, 54(5). <https://doi.org/10.1159/000151541>
- National Cancer Institute. (2022). What is bile duct cancer (cholangiocarcinoma)? Retrieved September 1, 2022, from <https://www.cancer.gov/types/liver/bile-duct-cancer>
- Nutthasirikul, N., Limpiboon, T., Leelayuwat, C., Patrakitkomjorn, S., & Jearanaikoon, P. (2013). Ratio disruption of the Δ 133p53 and TAp53 isoform equilibrium correlates with poor clinical outcome in intrahepatic cholangiocarcinoma. *International Journal of Oncology*, 42(4). <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1818>
- Nutthasirikul, N. V., Hahnvajjanawong, C., Techasen, A., Limpiboon, T., Wat, C. L., Chau-In, S., & Jearanaikoon, P. (2015). Targeting the Δ 133p53 isoform can restore chemosensitivity in 5-

- fluorouracil-resistant cholangiocarcinoma cells. *International Journal of Oncology*, 47(6), 2153–2164. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3188>
- Obama, K., Ura, K., Li, M., Katagiri, T., Tsunoda, T., Nomura, A., Satoh, S., Nakamura, Y., & Furukawa, Y. (2005). Genome-wide analysis of gene expression in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology*, 41(6). <https://doi.org/10.1002/hep.20718>
- Okusaka, T., Nakachi, K., Fukutomi, A., Mizuno, N., Ohkawa, S., Funakoshi, A., Nagino, M., Kondo, S., Nagaoka, S., Funai, J., Koshiji, M., Nambu, Y., Furuse, J., Miyazaki, M., & Nimura, Y. (2010). Gemcitabine alone or in combination with cisplatin in patients with biliary tract cancer: A comparative multicentre study in Japan. *British Journal of Cancer*, 103(4). <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605779>
- Olivier, M., Hollstein, M., & Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. In *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (Vol. 2, Issue 1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001008>
- Ong, C. K., Subimerb, C., Pairojkul, C., Wongkham, S., Cutcutache, I., Yu, W., McPherson, J. R., Allen, G. E., Ng, C. C. Y., Wong, B. H., Myint, S. S., Rajasegaran, V., Heng, H. L., Gan, A., Zang, Z. J., Wu, Y., Wu, J., Lee, M. H., Huang, D., ... Teh, B. T. (2012). Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Nature Genetics*, 44(6). <https://doi.org/10.1038/ng.2273>
- Pai, S. G., Carneiro, B. A., Mota, J. M., Costa, R., Leite, C. A., Barroso-Sousa, R., Kaplan, J. B., Chae, Y. K., & Giles, F. J. (2017). Wnt/beta-catenin pathway: Modulating anticancer immune response. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 10, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0471-6>
- Pangestu, N. S., Chueakwon, P., Talabnin, K., Khiaowichit, J., & Talabnin, C. (2021). RNF43 overexpression attenuates the Wnt/ β -catenin signalling pathway to suppress tumor progression in cholangiocarcinoma. *Oncology Letters*, 22(6). <https://doi.org/10.3892/ol.2021.13107>
- Panka, D. J., Cho, D. C., Atkins, M. B., & Mier, J. W. (2008). GSK-3 β inhibition enhances sorafenib-induced apoptosis in melanoma cell lines. *Journal of Biological Chemistry*, 283(2). <https://doi.org/10.1074/jbc.M705343200>
- Pape, U.-F., Kasper, S., Meiler, J., Sinn, M., Vogel, A., Mueller, L., Burkhard, O., Caca, K., Heeg, S., Rodriguez Laval, V., Kuhl, A. A., Arsenic, R., Jansen, H., Mehrling, T., Hilgier, K., Wagner, I., & Utku, N. (2019). Post-hoc analyses of a subgroup of patients with advanced biliary tract cancer (BTC) who crossed over to treatment with etoposide toniribate (EDO-S7.1) in a randomized phase II study. *Annals of Oncology*, 30. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz247.051>
- Patel, N., & Benipal, B. (2019). Incidence of Cholangiocarcinoma in the USA from 2001 to 2015: A US Cancer Statistics Analysis of 50 States. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.3962>
- Peng, Y. yun, He, Y. hua, Chen, C., Xu, T., Li, L., Ni, M. ming, Meng, X. ming, Huang, C., & Li, J. (2016). NLRC5 regulates cell proliferation, migration and invasion in hepatocellular carcinoma by targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Cancer Letters*, 376(1). <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.006>
- Perugorria, M. J., Olaizola, P., Labiano, I., Esparza-Baquer, A., Marzioni, M., Marin, J. J. G., Bujanda, L., & Banales, J. M. (2019). Wnt- β -catenin signalling in liver development, health and disease. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 16, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0075-9>
- Picanço, V., Heinz, S., Bott, D., Behrmann, M., Covas, D. T., Seifried, E., & Tonn, T. (2007). Recombinant expression of coagulation factor VIII in hepatic and non-hepatic cell lines stably transduced with third generation lentiviral vectors comprising the minimal factor VIII promoter. *Cytotherapy*, 9(8). <https://doi.org/10.1080/14653240701656053>
- Piha-Paul, S. A., Oh, D. Y., Ueno, M., Malka, D., Chung, H. C., Nagrial, A., Kelley, R. K., Ros, W., Italiano, A., Nakagawa, K., Rugo, H. S., de Braud, F., Varga, A. I., Hansen, A., Wang, H., Krishnan, S., Norwood, K. G., & Doi, T. (2020). Efficacy and safety of pembrolizumab for the treatment of advanced biliary cancer: Results from the KEYNOTE-158 and KEYNOTE-028 studies. *International Journal of Cancer*, 147(8). <https://doi.org/10.1002/ijc.33013>
- Poeta, M. L., Manola, J., Goldwasser, M. A., Forastiere, A., Benoit, N., Califano, J. A., Ridge, J. A., Goodwin, J., Kenady, D., Saunders, J., Westra, W., Sidransky, D., & Koch, W. M. (2007). TP53

Mutations and Survival in Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck . *New England Journal of Medicine*, 357(25). <https://doi.org/10.1056/nejmoa073770>

Polakis, P. (2012). Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008052>

Primrose, J. N., Neoptolemos, J., Palmer, D. H., Malik, H. Z., Prasad, R., Mirza, D., Anthony, A., Corrie, P., Falk, S., Finch-Jones, M., Wasan, H., Ross, P., Wall, L., Wadsley, J., Evans, J., Stocken, D., Praseedom, R., Ma, Y. T., Davidson, B., ... Coxon, F. (2019). Capecitabine compared with observation in resected biliary tract cancer (BILCAP): a randomised, controlled, multicentre, phase 3 study. *The Lancet Oncology*, 20(5). [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30915-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30915-X)

Proffitt, K. D., Madan, B., Ke, Z., Pendharkar, V., Ding, L., Lee, M. A., Hannoush, R. N., & Virshup, D. M. (2013). Pharmacological inhibition of the Wnt acyltransferase PORCN prevents growth of WNT-driven mammary cancer. *Cancer Research*, 73(2). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2258>

Puetkasichonpasutha, J., Namwat, N., Sa-Ngiamwibool, P., Titapun, A., & Suthiphongchai, T. (2020). Evaluation of p53 and its target gene expression as potential biomarkers of cholangiocarcinoma in Thai patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 21(3), 791–798. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.3.791>

Qiao, Y., Wang, J., Karagoz, E., Liang, B., Song, X., Shang, R., Evert, K., Xu, M., Che, L., Evert, M., Calvisi, D. F., Tao, J., Wang, B., Monga, S. P., & Chen, X. (2019). Axis inhibition protein 1 (Axin1) Deletion-Induced Hepatocarcinogenesis Requires Intact β -Catenin but Not Notch Cascade in Mice. *Hepatology*, 70(6). <https://doi.org/10.1002/hep.30556>

Qin, A., Wu, J., Zhai, M., Lu, Y., Huang, B., Lu, X., Jiang, X., & Qiao, Z. (2020). Axin1 inhibits proliferation, invasion, migration and EMT of hepatocellular carcinoma by targeting miR-650. *American Journal of Translational Research*, 12(3), 1114–1122.

Qu, L., Wang, Y., Gong, L., Zhu, J., Gong, R., & Si, J. (2013). Suicide gene therapy for hepatocellular carcinoma cells by survivin promoter-driven expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Oncology Reports*, 29(4). <https://doi.org/10.3892/or.2013.2248>

Reya, T., & Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. In *Nature* (Vol. 434, Issue 7035). <https://doi.org/10.1038/nature03319>

Sasaki, T., Isayama, H., Nakai, Y., Mizuno, S., Yamamoto, K., Yagioka, H., Yashima, Y., Kawakubo, K., Kogure, H., Togawa, O., Matsubara, S., Ito, Y., Sasahira, N., Hirano, K., Tsujino, T., Toda, N., Tada, M., Omata, M., & Koike, K. (2012). Multicenter phase II study of S-1 monotherapy as second-line chemotherapy for advanced biliary tract cancer refractory to gemcitabine. *Investigational New Drugs*, 30(2). <https://doi.org/10.1007/s10637-010-9553-9>

Schaefer, K. N., & Peifer, M. (2019). Wnt/ β -Catenin Signaling Regulation and a Role for Biomolecular Condensates. In *Developmental Cell* (Vol. 48, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.01.025>

Selvakumaran, M., Lin, H. K., Miyashita, T., Wang, H. G., Krajewski, S., Reed, J. C., Hoffman, B., & Liebermann, D. (1994). Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene*, 9(6), 1791–1798.

Sendra, L., Herrero, M. J., & Aliño, S. F. (2018). Translational advances of hydrofection by hydrodynamic injection. In *Genes* (Vol. 9, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/genes9030136>

Seo, Y. H., Joo, Y. E., Choi, S. K., Rew, J. S., Park, C. S., & Kim, S. J. (2003). Prognostic significance of p21 and p53 expression in gastric cancer. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 18(2). <https://doi.org/10.3904/kjim.2003.18.2.98>

Shen, D. Y., Zhang, W., Zeng, X., & Liu, C. Q. (2013). Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling downregulates P-glycoprotein and reverses multi-drug resistance of cholangiocarcinoma. *Cancer Science*, 104(10). <https://doi.org/10.1111/cas.12223>

Shi, T., Morishita, A., Kobara, H., & Masaki, T. (2021). The role of micrnas in cholangiocarcinoma. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 14). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22147627>

Simbolo, M., Mafficini, A., Vicentini, C., Ruzzenente, A., Rusev, B., Brunelli, M., Pedron, S., Bertuzzo, F., Barbi, S., Fassan, M., Corbo, V., Bagante, F., Turri, G., Luchini, C., Lawlor, R., Guglielmi, A., Bassi, C., & Scarpa, A. (2019). Perihilar and distal extrahepatic cholangiocarcinomas show different genetic profiles but share MYC copy gain and TP53 mutation as independent poor prognostic markers. *Annals of Oncology*, *30*. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz155.185>

Simms, L. A., Radford-Smith, G., Biden, K. G., Buttenshaw, R., Cummings, M., Jass, J. R., Young, J., Meltzer, S. J., & Leggett, B. A. (1998). Reciprocal relationship between the tumor suppressors p53 and BAX in primary colorectal cancers. *Oncogene*, *17*(15). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202109>

Sirica, A. E. (2008). Role of ErbB family receptor tyrosine kinases in intrahepatic cholangiocarcinoma. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 14, Issue 46). <https://doi.org/10.3748/wjg.14.7033>

Song, J., Xie, C., Jiang, L., Wu, G., Zhu, J., Zhang, S., Tang, M., Song, L., & Li, J. (2018). Transcription factor AP-4 promotes tumorigenic capability and activates the Wnt/ β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma. *Theranostics*, *8*(13). <https://doi.org/10.7150/thno.25194>

Soussi, T., & Wiman, K. G. (2015). TP53: An oncogene in disguise. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 22, Issue 8, pp. 1239–1249). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.53>

Sprengel, R., & Hasan, M. T. (2007). Tetracycline-controlled genetic switches. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *178*. https://doi.org/10.1007/978-3-540-35109-2_3

Stakheev, D., Taborska, P., Strizova, Z., Podrazil, M., Bartunkova, J., & Smrz, D. (2019). The WNT/ β -catenin signaling inhibitor XAV939 enhances the elimination of LNCaP and PC-3 prostate cancer cells by prostate cancer patient lymphocytes in vitro. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41182-5>

Steinhart, Z., & Angers, S. (2018). Wnt signaling in development and tissue homeostasis. In *Development (Cambridge, England)* (Vol. 145, Issue 11). <https://doi.org/10.1242/dev.146589>

Sugawara, H., Yasoshima, M., Katayanagi, K., Kono, N., Watanabe, Y., Harada, K., & Nakanuma, Y. (1998). Relationship between interleukin-6 and proliferation and differentiation in cholangiocarcinoma. *Histopathology*, *33*(2). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.1998.00445.x>

Sugimachi, K., Taguchi, K. I., Aishima, S. I., Tanaka, S., Shimada, M., Kajiyama, K., Sugimachi, K., & Tsuneyoshi, M. (2001). Altered expression of β -catenin without genetic mutation in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Modern Pathology*, *14*(9). <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880409>

Sumazin, P., Chen, Y., Treviño, L. R., Sarabia, S. F., Hampton, O. A., Patel, K., Mistretta, T. A., Zorman, B., Thompson, P., Heczey, A., Comerford, S., Wheeler, D. A., Chintagumpala, M., Meyers, R., Rakheja, D., Finegold, M. J., Tomlinson, G., Parsons, D. W., & López-Terrada, D. (2017). Genomic analysis of hepatoblastoma identifies distinct molecular and prognostic subgroups. *Hepatology*, *65*(1). <https://doi.org/10.1002/hep.28888>

Suzuki, E., Ikeda, M., Okusaka, T., Nakamori, S., Ohkawa, S., Nagakawa, T., Boku, N., Yanagimoto, H., Sato, T., & Furuse, J. (2013). A multicenter phase II study of S-1 for gemcitabine-refractory biliary tract cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *71*(5). <https://doi.org/10.1007/s00280-013-2106-0>

Suzuki, H. I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., & Miyazono, K. (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*, *460*(7254). <https://doi.org/10.1038/nature08199>

Sykes, S. M., Stanek, T. J., Frank, A., Murphy, M. E., & McMahon, S. B. (2009). Acetylation of the DNA binding domain regulates transcription-independent apoptosis by p53. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(30). <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.026096>

T. Das, A., Tenenbaum, L., & Berkhout, B. (2016). Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. *Current Gene Therapy*, *16*(3), 156–167. <https://doi.org/10.2174/1566523216666160524144041>

Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T., & Takada, S. (2006). Monounsaturated Fatty Acid Modification of Wnt Protein: Its Role in Wnt Secretion. *Developmental Cell*, *11*(6). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.10.003>

- Talabnin, C., Janthavon, P., Thongsom, S., Suginta, W., Talabnin, K., & Wongkham, S. (2016). Ring finger protein 43 expression is associated with genetic alteration status and poor prognosis among patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Human Pathology*, 52. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.12.027>
- Tang, Q., Efe, G., Chiarella, A. M., Leung, J., Chen, M., Yamazoe, T., Su, Z., Pitarresi, J. R., Li, J., Islam, M., Karakasheva, T., Klein-Szanto, A. J., Pan, S., Hu, J., Natsugoe, S., Gu, W., Stanger, B. Z., Wong, K. K., Alan Diehl, J., ... Rustgi, A. K. (2021). Mutant p53 regulates Survivin to foster lung metastasis. *Genes and Development*, 35(78). <https://doi.org/10.1101/gad.340505.120>
- Tang, Y., Luo, J., Zhang, W., & Gu, W. (2006). Tip60-Dependent Acetylation of p53 Modulates the Decision between Cell-Cycle Arrest and Apoptosis. *Molecular Cell*, 24(6). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.11.021>
- Tannapfel, A., Sommerer, F., Benicke, M., Katalinic, A., Uhlmann, D., Witzigmann, H., Hauss, J., & Wittekind, C. (2003). Mutations of the BRAF gene in cholangiocarcinoma but not in hepatocellular carcinoma. *Gut*, 52(5). <https://doi.org/10.1136/gut.52.5.706>
- Tian, X. H., Hou, W. J., Fang, Y., Fan, J., Tong, H., Bai, S. L., Chen, Q., Xu, H., & Li, Y. (2013). XAV939, a tankyrase 1 inhibitor, promotes cell apoptosis in neuroblastoma cell lines by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 32(1). <https://doi.org/10.1186/1756-9966-32-100>
- Tokumoto, N., Ikeda, S., Ishizaki, Y., Kurihara, T., Ozaki, S., Iseki, M., Shimizu, Y., Itamoto, T., Arihiro, K., Okajima, M., & Asahara, T. (2005). Immunohistochemical and mutational analyses of Wnt signaling components and target genes in intrahepatic cholangiocarcinomas. *International Journal of Oncology*, 27(4). <https://doi.org/10.3892/ijo.27.4.973>
- Toshiyuki, M., & Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80(2). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90412-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90412-3)
- Valente, J. F. A., Queiroz, J. A., & Sousa, F. (2018). p53 as the Focus of Gene Therapy: Past, Present and Future. *Current Drug Targets*, 19(15). <https://doi.org/10.2174/1389450119666180115165447>
- Valle, J. W., Borbath, I., Khan, S. A., Huguet, F., Gruenberger, T., Arnold, D., & ESMO Guidelines Committee. (2016). Biliary cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 27(suppl 5), v28–v37. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw324>
- Vilchez, V., Turcios, L., Marti, F., & Gedaly, R. (2016). Targeting Wnt/ β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma treatment. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 22, Issue 2). <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i2.823>
- Voloshanenko, O., Erdmann, G., Dubash, T. D., Augustin, I., Metzger, M., Moffa, G., Hundsrucker, C., Kerr, G., Sandmann, T., Anchang, B., Demir, K., Boehm, C., Leible, S., Ball, C. R., Glimm, H., Spang, R., & Boutros, M. (2013). Wnt secretion is required to maintain high levels of Wnt activity in colon cancer cells. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms3610>
- Wang, Q., An, Y., Wang, F., Zhang, G., Zhang, L., Dong, H., Xin, J., Li, Y., Ji, S., & Guo, X. (2021). OSchol: an online consensus survival web server for cholangiocarcinoma prognosis analysis. *HPB*, 23(4). <https://doi.org/10.1016/j.hpb.2020.08.011>
- Wang, W., Liu, P., Lavrijsen, M., Li, S., Zhang, R., Li, S., van de Geer, W. S., van de Werken, H. J. G., Peppelenbosch, M. P., & Smits, R. (2021). Evaluation of AXIN1 and AXIN2 as targets of tankyrase inhibition in hepatocellular carcinoma cell lines. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87091-4>
- Wang, W., Zhong, W., Yuan, J., Yan, C., Hu, S., Tong, Y., Mao, Y., Hu, T., Zhang, B., & Song, G. (2015). Involvement of Wnt/ β -catenin signaling in the mesenchymal stem cells promote metastatic growth and chemoresistance of cholangiocarcinoma. *Oncotarget*, 6(39), 42276–42289. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5514>
- Wang, Z., Tang, H., Xue, Y., Xue, L., Li, H., & Chong, T. (2020). Clinical application of drug sensitive gene detection in postoperative instillation for non-muscle invasive bladder cancer. *BMC Nephrology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12882-020-02073-4>

- Wardell, C. P., Fujita, M., Yamada, T., Simbolo, M., Fassan, M., Karlic, R., Polak, P., Kim, J., Hatanaka, Y., Maejima, K., Lawlor, R. T., Nakanishi, Y., Mitsuhashi, T., Fujimoto, A., Furuta, M., Ruzzenente, A., Conci, S., Oosawa, A., Sasaki-Oku, A., ... Nakagawa, H. (2018). Genomic characterization of biliary tract cancers identifies driver genes and predisposing mutations. *Journal of Hepatology*, *68*(5). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.009>
- Washington, K. (1996). Expression of p53 in adenocarcinoma of the gallbladder and bile ducts. *Liver*, *16*(2). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0676.1996.tb00712.x>
- Wiese, M., Walther, N., Diederichs, C., Schill, F., Monecke, S., Salinas, G., Sturm, D., Pfister, S. M., Dressel, R., Johnsen, S. A., & Kramm, C. M. (2017). The β -catenin/CBP-antagonist ICG-001 inhibits pediatric glioma tumorigenicity in a Wnt-independent manner. *Oncotarget*, *8*(16). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15934>
- Wu, C. E., Pan, Y. R., Yeh, C. N., & Lunec, J. (2020). Targeting P53 as a future strategy to overcome gemcitabine resistance in biliary tract cancers. *Biomolecules*, *10*(11), 1–17. <https://doi.org/10.3390/biom10111474>
- Wu, Y., Lin, J. C., Piluso, L. G., Dhabhi, J. M., Bobadilla, S., Spindler, S. R., & Liu, X. (2014). Phosphorylation of p53 by TAF1 Inactivates p53-Dependent Transcription in the DNA Damage Response. *Molecular Cell*, *53*(1). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.031>
- Xia, M. Y., Zhao, X. Y., Huang, Q. L., Sun, H. Y., Sun, C., Yuan, J., He, C., Sun, Y., Huang, X., Kong, W., & Kong, W. J. (2017). Activation of Wnt/ β -catenin signaling by lithium chloride attenuates d-galactose-induced neurodegeneration in the auditory cortex of a rat model of aging. *FEBS Open Bio*, *7*(6). <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12220>
- Xia, X., Zhang, Y., Zieth, C. R., & Zhang, S. C. (2007). Transgenes delivered by lentiviral vector are suppressed in human embryonic stem cells in a promoter-dependent manner. *Stem Cells and Development*, *16*(1). <https://doi.org/10.1089/scd.2006.0057>
- Xu, X., Kobayashi, S., Qiao, W., Li, C., Xiao, C., Radaeva, S., Stiles, B., Wang, R. H., Ohara, N., Yoshino, T., LeRoith, D., Torbenson, M. S., Gores, G. J., Wu, H., Gao, B., & Deng, C. X. (2006). Induction of intrahepatic cholangiocellular carcinoma by liver-specific disruption of Smad4 and Pten in mice. *Journal of Clinical Investigation*, *116*(7). <https://doi.org/10.1172/JCI27282>
- Yang, B., House, M. G., Guo, M., Herman, J. G., & Clark, D. P. (2005). Promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma. *Modern Pathology*, *18*(3), 412–420. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800287>
- Yazici, C., Niemeyer, D. J., Iannitti, D. A., & Russo, M. W. (2014). Hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma: an update. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, *8*(1), 63–82. <https://doi.org/10.1586/17474124.2014.852468>
- Yin, C., Knudson, C. M., Korsmeyer, S. J., & van Dyke, T. (1997). Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature*, *385*(6617). <https://doi.org/10.1038/385637a0>
- Yuan, S., Tao, F., Zhang, X., Zhang, Y., Sun, X., & Wu, D. (2020). Role of Wnt/ β -Catenin Signaling in the Chemoresistance Modulation of Colorectal Cancer. *BioMed Research International*, *2020*. <https://doi.org/10.1155/2020/9390878>
- Zhang, F., Wan, M., Xu, Y., Li, Z., Leng, K., Kang, P., Cui, Y., & Jiang, X. (2017). Long noncoding RNA PCAT1 regulates extrahepatic cholangiocarcinoma progression via the Wnt/ β -catenin-signaling pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *94*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.025>
- Zhang, J., Han, C., & Wu, T. (2012). MicroRNA-26a promotes cholangiocarcinoma growth by activating β -catenin. *Gastroenterology*, *143*(1). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.03.045>
- Zhang, K. S., Zhou, Q., Wang, Y. F., & Liang, L. J. (2013). Inhibition of Wnt signaling induces cell apoptosis and suppresses cell proliferation in cholangiocarcinoma cells. *Oncology Reports*, *30*(3). <https://doi.org/10.3892/or.2013.2560>
- Zhang, W. W., Li, L., Li, D., Liu, J., Li, X., Li, W., Xu, X., Zhang, M. J., Chandler, L. A., Lin, H., Hu, A., Xu, W., & Lam, D. M. K. (2018). The First Approved Gene Therapy Product for Cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 Years in the Clinic. *Human Gene Therapy*, *29*(2). <https://doi.org/10.1089/hum.2017.218>

- Zhang, X., Taoka, R., Liu, D., Matsuoka, Y., Tohi, Y., Kakehi, Y., & Sugimoto, M. (2021). Knockdown of *rrm1* with adenoviral shRNA vectors to inhibit tumor cell viability and increase chemotherapeutic sensitivity to gemcitabine in bladder cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8). <https://doi.org/10.3390/ijms22084102>
- Zhong, F., Yang, J., Tong, Z. T., Chen, L. L., Fan, L. L., Wang, F., Zha, X. L., & Li, J. (2015). Guggulsterone inhibits human cholangiocarcinoma Sk-ChA-1 and Mz-ChA-1 cell growth by inducing caspase-dependent apoptosis and downregulation of survivin and Bcl-2 expression. *Oncology Letters*, 10(3). <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3391>
- Zhong, Z., & Virshup, D. M. (2020). Wnt signaling and drug resistance in cancer. *Molecular Pharmacology*, 97(2). <https://doi.org/10.1124/MOL.119.117978>
- Zhou, X., Vink, M., Klaver, B., Berkhout, B., & Das, A. T. (2006). Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution. *Gene Therapy*, 13(19). <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302780>
- Zhu, Z. B., Chen, Y., Makhija, S. K., Lu, B., Wang, M., Rivera, A. A., Yamamoto, M., Wang, S., Siegal, G. P., Curiel, D. T., & McDonald, J. M. (2006). Survivin promoter-based conditionally replicative adenoviruses target cholangiocarcinoma. *International Journal of Oncology*, 29(5). <https://doi.org/10.3892/ijo.29.5.1319>

