

VNIVERSIDAD D SALAMANCA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Fisiología y Farmacología



EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE LA UTILIDAD DE
NUEVOS DERIVADOS DE ÁCIDOS BILIARES EN EL
TRATAMIENTO DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR
(BATKI_s) Y EN LA MONITORIZACIÓN EXTRACORPÓREA
DE LA FUNCIÓN HEPATOBILIAR (NIRBAD_s).

TESIS DOCTORAL

Beatriz Sánchez de Blas

2023

VNiVERSiDAD D SALAMANCA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Fisiología y Farmacología



EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE LA UTILIDAD DE
NUEVOS DERIVADOS DE ÁCIDOS BILIARES EN EL
TRATAMIENTO DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR
(BATKI_s) Y EN LA MONITORIZACIÓN EXTRACORPÓREA
DE LA FUNCIÓN HEPATOBILIAR (NIRBAD_s).

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

Salamanca, 16 de mayo de 2023

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

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "Evaluación preclínica de la utilidad de nuevos derivados de ácidos biliares en el tratamiento del carcinoma hepatocelular (BATKIs) y en la monitorización extracorpórea de la función hepatobiliar (NIRBADs)" presentada por Dña. Beatriz Sánchez de Blas para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección conjunta del Dr. D. José Juan García Marín, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología, la Dra. Dña. Marta Rodríguez Romero, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, y el Dr. D. Álvaro Gacho Temprano, Investigador Postdoctoral Margarita Salas financiado por los fondos europeos NextGenerationEU del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a 16 de mayo de dos mil veintitrés.



Fdo. José Juan García Marín

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

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "Evaluación preclínica de la utilidad de nuevos derivados de ácidos biliares en el tratamiento del carcinoma hepatocelular (BATKIs) y en la monitorización extracorpórea de la función hepatobiliar (NIRBADs)" presentada por Dña. Beatriz Sánchez de Blas para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección conjunta del Dr. D. José Juan García Marín, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología, la Dra. Dña. Marta Rodríguez Romero, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, y el Dr. D. Álvaro Gacho Temprano, Investigador Postdoctoral Margarita Salas financiado por los fondos europeos NextGenerationEU del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a 16 de mayo de dos mil veintitrés.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Jesús Monte Río', is centered on the page.

Fdo. M^a Jesús Monte Río

D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA, Dña. MARTA RODRÍGUEZ ROMERO, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, Y D. ÁLVARO GACHO TEMPRANO INVESTIGADOR POSTDOCTORAL MARGARITA SALAS DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada "Evaluación preclínica de la utilidad de nuevos derivados de ácidos biliares en el tratamiento del carcinoma hepatocelular (BATKIs) y en la monitorización extracorpórea de la función hepatobiliar (NIRBADs)" presentada por Dña. Beatriz Sánchez de Blas 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 16 de mayo de dos mil veintitrés.



Fdo. José Juan García Marín



Fdo. Marta Rodríguez Romero



Fdo. Álvaro Gacho Temprano

FINANCIACIÓN

La doctoranda ha disfrutado durante la realización de esta Tesis Doctoral de un contrato financiado por la Universidad de Salamanca (“Programa III: Ayudas para contratos predoctorales. Convocatoria 2018 de ayudas para financiar treinta y cuatro contratos predoctorales de la Universidad de Salamanca. Cofinanciadas por el Banco Santander”).

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

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

Asociación Española 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 (USAL): José Juan García Marín. Periodo: 2018-2021. PROYECTO NACIONAL.

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

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

Fundación La Marató de TV3. Ref. 201916-31. “Contribution of mitochondrial oxysterol and bile acid metabolism to liver carcinogenesis”. Coordinador: José Carlos

Fernández Checa. Investigador Principal (USAL): José Juan García Marín. Periodo: 2020-2023. PROYECTO NACIONAL.

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

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. PROYECTO REGIONAL.

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

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

Fundación General de la Universidad de Salamanca. Plan TCUE. Convocatoria itinerario para la transferencia de resultados (ITR) de la Universidad de Salamanca Edición 2021. Plan de Transferencia de Conocimiento Universidad-Empresa 2018-2020. “Desarrollo de nuevas estrategias vectorizadas basadas en la Química Click para el diagnóstico de hepatopatías y tratamiento de cáncer enterohepático mediante la unión de derivados de ácidos biliares a moléculas con actividad farmacológica”. Investigador Principal (USAL): Marta Rodríguez Romero. Periodo 2021. PROYECTO LOCAL.

PATENTES

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral han sido concedidas dos **Patentes** en la Oficina Española de Patentes y Marcas:

Patente registrada a fecha de 17/12/2020 ante la Oficina de Patentes y Marcas con número de registro 202031262 referente a: “**Sondas para la evaluación no invasiva de la funcionalidad hepática a tiempo real**”, a nombre de UNIVERSIDAD DE SALAMANCA. Inventores/autores/obtenedores: Álvaro Gacho Temprano, Beatriz Sánchez de Blas, Francisco Bermejo González, María Concepción Pérez Melero, Marta Rodríguez Romero, José Juan García Marín.

Patente registrada a fecha de 08/06/2021 ante la Oficina de Patentes y Marcas con número de registro 202130526 referente a: “**Agentes citostáticos vectorizados para el tratamiento del cáncer hepático y digestivo**”, a nombre de UNIVERSIDAD DE SALAMANCA. Inventores/autores/obtenedores: Álvaro Gacho Temprano, Beatriz Sánchez de Blas, Francisco Bermejo González, María Concepción Pérez Melero, Marta Rodríguez Romero, José Juan García Marín.

PUBLICACIONES Y CONGRESOS

Publicaciones

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

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

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

Sanchez De Blas B, Temprano AG, Marin JJG, Romero MR. “Monitoring the hepatobiliary function using image techniques and labeled cholephilic compounds”. *Explor Dig Dis*. 2023, 2:18–33. <https://doi.org/10.37349/edd.2023.00015>.

Comunicaciones a Congresos

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes Congresos:

Temprano AG, **Sanchez de Blas B**, Mori M, Bermejo F, Romero MR, Marin JJG, Perez-Melero C. “Synthesis and biological evaluation of conjugate drugs bearing bile acid carriers to target liver tumours”. XXVI EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC-ISMC 2021). Online. 2021. Tipo de comunicación: póster.

Temprano AG, **Sanchez de Blas B**, Espinosa-Escudero R, Cives-Losada C, Lozano E, Briz O, Perez-Melero C, Bermejo F, Romero MR, Marin JJG. "Extracorporeal non-invasive assessment of the hepatobiliary function using novel bile acid derivatives with near-infrared fluorescence". International Liver Congress 2021. Online. 2021. Tipo de comunicación: póster.

Temprano AG, **Sanchez de Blas B**, Espinosa-Escudero R, Cives-Losada C, Lozano E, Briz O, Monte MJ, Perez-Melero C, Bermejo F, Romero MR, Marin JJG. "Determinación extracorpórea no invasiva de la función hepatobiliar utilizando nuevos derivados de ácidos biliares con fluorescencia en el infrarrojo cercano". 3ª Reunión de Hepatología Traslacional. Alicante (España). 2021. Tipo de comunicación: póster.

Asensio M, Temprano AG, **Sanchez de Blas B**, Espinosa-Escudero R, Cives-Losada C, Lozano E, Briz O, Monte MJ, Perez-Melero C, Bermejo F, Romero MR, Marin JJG. "Determinación extracorpórea no invasiva de la función hepatobiliar utilizando nuevos derivados de ácidos biliares con fluorescencia en el infrarrojo cercano". XV Jornadas Científicas CIBERehd. Barcelona (España). 2021. Tipo de comunicación: póster.

Romero MR, Temprano AG, **Sanchez de Blas B**, Espinosa-Escudero R, Cives-Losada C, Lozano E, Briz O, Monte MJ, Perez-Melero C, Bermejo F, Marin JJG. "Determinación extracorpórea no invasiva de la función hepatobiliar utilizando nuevos derivados de ácidos biliares con fluorescencia en el infrarrojo cercano". 47º Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). Madrid (España). 2022. Tipo de comunicación: póster.

Romero MR, **Sanchez de Blas B**, Temprano AG, Espinosa-Escudero R, Cives-Losada C, Cinca-Fernando P, Lozano E, Briz O, Mori M, Monte MJ, Perez-Melero C, Bermejo F, Marin JJG. "Usefulness of novel bile acid derivatives with near-infrared fluorescence for extracorporeal non-invasive real-time determination of the hepatobiliary function". Falk Symposium 229. XXVI International Bile Acid Meeting: Bile Acids in Health and Disease. Amsterdam (Holanda). 2022. Tipo de comunicación: póster.

Sanchez de Blas B, Temprano AG, Espinosa-Escudero R, Cives-Losada C, Cinca-Fernando P, Lozano E, Briz O, Mori M, Serrano MA, Monte MJ, Perez-Melero C, Bermejo F, Romero MR, Marin JJG. "Uso de derivados de ácidos biliares con fluorescencia en el infrarrojo cercano para la determinación no invasiva de la función hepatobiliar". 44º Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Málaga. 2022. Tipo de comunicación: póster.

Sanchez de Blas B, Temprano AG, Romero MR, Briz O, Monte MJ, Lozano E, Perez-Melero C, Mori M, Bermejo F, Marin JJG. "Novel bile acid derivatives to selectively shuttle tyrosine kinase inhibitors to liver cancer cells" 4th Meeting of Translational Hepatology - Liver Cancer. Santiago de Compostela (España). Asociación Española para el Estudio del Hígado. 2022. Tipo de comunicación: póster.

Además, la doctoranda ha participado en otros proyectos que han contribuido a las siguientes participaciones en Congresos:

Sanchon-Sanchez P, Romero MR, Herraiez E, Macias RIR, Asensio M, Cives-Losada C, **Sanchez de Blas B**, Temprano AG, Monte MJ, Marin JJG. "Role of AKR1C2 and SRD5A1 hydroxysteroid dehydrogenases in altered progesterone metabolism during intrahepatic cholestasis of pregnancy". 42nd Congress of the Spanish Society of Biochemistry and Molecular Biology. Sociedad Española de Bioquímica y Biología molecular (SEBBM). Madrid (España). 2019. Tipo de comunicación: oral.

Espinosa-Escudero R, Alonso-Pena M, Herraiez E, Monte MJ, Briz O, Sanchez-Martin M, Garcia-Tunon I, Berrocal P, Cives-Losada C, **Sanchez de Blas B**, Prieto J, Marin JJG. "Toxicidad del ácido trihidroxicolestanoico (THCA) en modelos *in vitro* e *in vivo* de deficiencia parcial de acil-cooxidasas 2 (ACOX2)". XIV Jornadas Científicas del CIBERehd. Online. 2020. Tipo de comunicación: póster.

*A mi familia,
por su apoyo incondicional*

5-FU:	5-fluorouracilo
AB:	Ácido biliar
ABC:	<i>ATP-binding cassette</i>
AcOEt:	Acetato de etilo
AFP:	α -Fetoproteína
AcOEt:	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
Å:	Ångström
ARN:	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP:	Adenosín trifosfato
ASBT:	<i>Apical Sodium Bile-Acid Transporter</i>
AST	Aspartato aminotransferasa
BATKI	<i>Bile Acid Tyrosine Kinase Inhibitor</i>
BCLC:	<i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i>
BCRP:	<i>Breast cancer resistance protein</i>
BSA:	Albúmina sérica bovina
BSEP	<i>Bile Salt Export Pump</i>
C24	Esteroides de 24 átomos de carbono
C27	Esteroides de 27 átomos de carbono
CA	<i>Cholic acid</i>
CDCA	<i>Chenodeoxycholic acid</i>
CoA	Coenzima A
CAF:	Cancer-associated fibroblast
CCA:	Colangiocarcinoma
cDNA:	DNA complementario
CRISPR:	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CSC:	<i>Cancer stem cell</i>
Ct:	Ciclo umbral

ABREVIATURAS

CYP:	Citocromo P450
CYP7A1:	Colesterol 7 α -hidrolasa
d:	doblete
DCA	<i>Deoxycolic acid</i>
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DHCA	Ácido 3 α ,7 α -dihidroxicolestanoico
DMAP	Dimetilaminopiridina
dATP:	Desoxiadenosina trifosfato
DMEM:	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimetilformamida
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
dNTP:	Desoxinucleósido trifosfato
dt	Doble triplete
ECL:	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
ECOG:	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
ECOG-PS:	<i>Eastern Cooperative Oncology Group-Performance Status</i>
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EEM:	Error estándar de la media
EMT:	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
eq	Equivalente
ERK	<i>Extracellular-Signal-Regulated Kinase</i>
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FBS:	Suero bovino fetal
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i>
FGFR:	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos
FOLFOX:	Ácido folínico, 5-fluorouracilo y oxaliplatino
FXR	<i>Farnedois X Receptor</i>

Fw:	<i>Forward primer</i>
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GCA	<i>Glycocholic acid</i>
GCDCA	<i>Glycochenodeoxycholic acid</i>
GDCA	<i>Glycodeoxycholic acid</i>
HCC:	Carcinoma hepatocelular
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HOMO	<i>Highest occupied molecular orbital</i>
HMQC	<i>Heteronuclear multiple quantum correlation</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC-MS/MS	<i>Cromatografía líquida de alta presión acoplado a espectrometría de masas en tándem</i>
HRMS:	Espectrometría de masas de alta resolución
HSC:	<i>Hepatic stellate cell</i>
Hz	Hercio
IAP:	Inhibidor de la apoptosis
IC₅₀:	Concentración inhibitoria 50
ICI:	<i>Immune checkpoint inhibitor</i>
IR	Infrared radiation
KO:	<i>Knock-out</i>
LCA	<i>Lithocholic acid</i>
MDR:	<i>MultiDrug Resistance</i>
MEM:	<i>Minimum Essential Medium</i>
MOC:	<i>Mechanisms of chemoresistance</i>
MRP:	Proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos
NAFLD:	Enfermedad de hígado graso no alcohólico
NASH:	Esteatohepatitis no alcohólica
NIR	<i>Near-Infrared Radiation</i>
NIRBAD	<i>Near Infrared Radiation Bile Acid Derivative</i>

ABREVIATURAS

NTCP	<i>Na⁺-Taurocholate Cotransporting Polypeptide</i>
o:	Orto
OATP:	<i>Organic anion transporting polypeptides</i>
ORF:	<i>Open reading frame</i>
OST	<i>Organic Solute Transporters</i>
p:	Para
Pb:	Pares de bases de nucleótidos
PBS:	Tampón fosfato salino
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGFR:	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
P.f.:	Punto de fusión
PXR	<i>Pregnane X Receptor</i>
qPCR:	PCR cuantitativa
RMN ¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RT:	Transcripción reversa
Rv:	<i>Reverse primer</i>
s	Singlete
S₂N	Sustitución nucleofílica bimolecular
SDS:	Dodecil sulfato sódico
SLC:	<i>Solute carrier protein</i>
SOC:	Medio súper óptimo con represor de catabolitos
SPL:	Smart Protein Layer
SRB:	Sulforodamina B
t:	triplete
TBS:	Tampón tris salino
TCA:	<i>Taurocholic acid</i>
TCDC	<i>Taurochenodeoxycholic acid</i>
TGF-β:	Factor de crecimiento transformante β

TKI:	<i>Tyrosine kinase inhibitor</i>
TKR	<i>Tyrosine Kinase Receptor</i>
THCA	<i>Ácido 3α, 7α, 12α-trihidroxicolestanoico</i>
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>
TLCA	<i>Taurolithocholic acid</i>
TLDA:	<i>Taqman low-density array</i>
TUDCA	<i>Taurourdodeoxycholic acid</i>
TOF	<i>Time-of-flight (cuadrupolo-tiempo de vuelo)</i>
TOP2A:	<i>Topoisomerasa IIα</i>
UAF:	<i>Unidades arbitrarias de fluorescencia</i>
UDCA	<i>Ursodeoxycholic acid</i>
UGT1A9:	<i>UDP-glucuronil-transferasa 1A9</i>
VEGFA:	<i>Factor de crecimiento endotelial vascular A</i>
VEGFR:	<i>Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular</i>
VHB:	<i>Virus de la hepatitis B</i>
VHC:	<i>Virus de la hepatitis C</i>
WT:	<i>Wild-type</i>
ZIP:	<i>Zero interaction potency</i>
λ:	<i>Longitud de onda</i>
δ:	<i>Desplazamiento químico</i>

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

2. INTRODUCCIÓN
 - 2.1. SISTEMA HEPATOBILIAR
 - 2.1.1. Anatomía y fisiología del sistema hepatobiliar
 - 2.1.2. Funciones del hígado

 - 2.2. ÁCIDOS BILIARES
 - 2.2.1. Estructura y biosíntesis
 - 2.2.2. Circulación enterohepática de ácidos biliares
 - 2.2.3. Transportadores hepáticos de ácidos biliares
 - 2.2.4. Papel fisiológico de los ácidos biliares

 - 2.3. MONITORIZACIÓN DE LA FUNCIÓN HEPATOBILIAR
 - 2.3.1. Técnicas de imagen para el diagnóstico y tratamiento de alteraciones hepatobiliares
 - 2.3.2. Sondas trazadoras de la función hepatobiliar

 - 2.4. CÁNCER HEPÁTICO
 - 2.4.1. Carcinoma hepatocelular: epidemiología, factores de riesgo, diagnóstico y tratamiento
 - 2.4.2. Mecanismos moleculares de resistencia al tratamiento farmacológico
 - 2.4.3. Vectorización de ácidos biliares como estrategia de superación de la quimiorresistencia

3. MATERIALES Y MÉTODOS
 - 3.1. MATERIAL BIOLÓGICO
 - 3.1.1. Líneas celulares
 - 3.1.2. Animales

 - 3.2. PRODUCTOS

 - 3.3. MEDIOS INSTRUMENTALES

 - 3.4. CULTIVOS CELULARES

 - 3.5. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ARN_M POR RT-qPCR CUANTITATIVA

 - 3.6. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

 - 3.7. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA

 - 3.8. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

- 3.9. DETERMINACIONES POR HPLC-MS/MS
- 3.10. EXPERIMENTOS *IN VIVO*
- 3.11. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA
- 3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- 4. CAPÍTULO I: EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA UTILIDAD DE AGENTES CITOSTÁTICOS VECTORIZADOS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER HEPÁTICO
- 5. CAPÍTULO II: EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE SONDAS FLUORESCENTES (NIRBAD_s) PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN HEPATOBILIAR
- 6. CONCLUSIONES
- 7. BIBLIOGRAFÍA

1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Los tumores hepáticos representan el sexto tipo de cáncer más frecuente y la tercera causa de muerte por dicha enfermedad en todo el mundo. Entre ellos, el carcinoma hepatocelular (HCC) es el más frecuente, representando el 85-90 % de todos los tipos de cáncer hepático. El HCC se caracteriza por una alta tasa de mortalidad, ya que su desarrollo silencioso y su difícil detección hacen que las opciones terapéuticas sean muy limitadas cuando se alcanza un diagnóstico, ya que en la mayoría de los casos el tumor se encuentra en estado avanzado. El tratamiento empleado actualmente en estos pacientes, para los que ya no son posibles las opciones curativas, es decir, la resección quirúrgica, el trasplante hepático o la ablación local, son estrategias terapéuticas paliativas, como la inmunoterapia y la farmacoterapia basada en el empleo de inhibidores de receptores con actividad tirosina quinasa (TKIs, de sus siglas en inglés *Tyrosine Kinase Inhibitors*), ya que la quimioterapia clásica carece de eficacia frente al HCC. Entre los TKIs más utilizados en la última década se encuentra el sorafenib, que aún es el tratamiento de primera línea empleado para el HCC. Su efecto antitumoral se debe a su actividad multiquinasa que ejerce por interacción con varios receptores de esta familia, inhibiendo la angiogénesis y la progresión tumoral. Sin embargo, su eficacia es muy modesta con un impacto pequeño en lo que al pronóstico se refiere, ya que, en el mejor de los casos, no consigue alargar la supervivencia de los pacientes más allá de un año. En algunas ocasiones, debido a su buena tolerabilidad, se ha empleado en combinación con otros fármacos, como el erlotinib. Sin embargo, no se han encontrado ventajas terapéuticas respecto al uso de estos agentes por separado.

Sumado a lo anterior, la existencia de mecanismos de quimiorresistencia (MOCs, del inglés *mechanisms of chemoresistance*), ya sean intrínsecos o adquiridos, en las células tumorales contribuye a la escasa eficacia de los tratamientos. Entre los siete mecanismos MOC descritos se encuentran la reducción en los niveles de expresión de las proteínas transportadoras de membrana (MOC-1a), así como el incremento en el número o actividad de bombas de eflujo de fármacos (MOC-1b). El transportoma, por tanto, juega un papel fundamental en estos dos MOCs y, dentro de éstos, destacan las proteínas que conforman la familia SLC (*Solute Carriers*), las cuales pueden ser determinantes en la concentración intracelular de los agentes antitumorales. Así, la alta refractariedad de los pacientes de HCC a los tratamientos quimioterápicos, que compromete su supervivencia a largo plazo, es debida en parte a la adquisición de un fenotipo de resistencia a múltiples

1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

fármacos o MDR (del inglés *MultiDrug Resistance*), resultado de la acción conjunta de los MOCs anteriormente comentados.

Es por ello por lo que para aumentar la disponibilidad de los fármacos y, al mismo tiempo, disminuir los efectos adversos sobre el tejido sano se han diseñado nuevas moléculas con actividad farmacológica que puedan presentar vectorización hacia estas dianas. Entre las estrategias utilizadas en las últimas décadas, para el desarrollo de terapias dirigidas mediante la vectorización de fármacos hacia los tejidos hepáticos, se ha investigado a los ácidos biliares (ABs), ya que presentan una estructura que les otorga un alto hepatotropismo y una gran versatilidad química para su uso en terapias vectorizadas.

Por otro lado, la evaluación de la función hepatobiliar es importante en clínica, no sólo para el diagnóstico de diversas patologías hepáticas como puede ser la colestasis, sino que también resulta imprescindible para el buen manejo y seguimiento de los pacientes oncológicos, especialmente aquellos hepatectomizados. En la práctica clínica actual se utilizan la ultrasonografía, la resonancia magnética o la colescintigrafía con radiomarcadores para complementar los test bioquímicos clásicos, como la medida de transaminasas en suero, y obtener así un diagnóstico más preciso mediante estas pruebas de imagen.

A lo largo de la trayectoria del grupo de Hepatología Experimental y Vectorización de Fármacos (HEVEPHARM), se ha llevado a cabo la síntesis y evaluación de distintos compuestos mediante la vectorización de ABs con moléculas con actividad farmacológica. Entre ellos, podemos destacar recientemente los BATKIs, del inglés *Bile Acid* y *TKI*, mediante la unión de un fármaco citostático con actividad inhibidora de tirosina quinasa (erlotinib o sorafenib), y el compuesto NIRBAD, del inglés *Near InfraRed Bile Acid Derivative*, mediante la conjugación de la azida derivada del ácido cólico y una molécula fluorescente con emisión en el rango infrarrojo cercano del espectro, que se encuentran actualmente en fases preliminares de estudio como citostáticos y como moléculas trazadoras de la funcionalidad hepática, respectivamente.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el **objetivo global** de esta Tesis Doctoral ha sido el de avanzar en la evaluación preclínica de derivados vectorizados pertenecientes a la familia BADER (del inglés, *Bile Acid and Derivative*), con estructura de ABs conjugados con moléculas de interés farmacológico, tanto *in vitro* como *in vivo*, como agentes antitumorales potencialmente útiles (BATKI) para mejorar el tratamiento del

1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

HCC o para ser utilizados como sondas fluorescentes (NIRBAD) para llevar a cabo la evaluación extracorpórea en tiempo real de la función hepatobiliar.

Para alcanzar este objetivo global se planteó el desarrollo de los siguientes objetivos parciales:

Objetivo 1: Estudiar *in vitro* de la actividad citostática y antitumoral de compuestos de la familia BATKI, en distintas líneas celulares derivadas de tumores hepáticos.

Objetivo 2: Caracterizar los elementos del transportoma (MOC-1a) implicados en la vectorización de compuestos de la familia BATKI.

Objetivo 3: Sintetizar y caracterizar las propiedades químicas y fisicoquímicas de nuevas moléculas de la familia NIRBAD.

Objetivo 4: Llevar a cabo estudios preclínicos (*in vitro* e *in vivo*) del hepatotropismo de los compuestos de la familia NIRBAD para evaluar su utilidad como moléculas trazadoras de la función hepatobiliar normal y patológica.

1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

2. INTRODUCCIÓN

2.1. SISTEMA HEPATOBILIAR

2.1.1. Anatomía y fisiología del sistema hepatobiliar

El sistema hepatobiliar está formado por el hígado, donde se produce la bilis, y el sistema biliar, responsable de su transporte y almacenamiento.

El hígado es el órgano sólido más voluminoso del organismo y está constituido principalmente por los hepatocitos, células epiteliales parenquimales, que se disponen en cordones de una célula de grosor, dejando entre sí espacios vasculares denominados sinusoides hepáticos donde hay mezcla de sangre arterial y venosa, y otros espacios intercelulares que reciben el nombre de canaliculos biliares, por los que circula la bilis que producen los propios hepatocitos.

El sistema o tracto biliar está constituido por los canaliculos biliares, los ductulos biliares o canales de Hering, los ductos biliares intrahepáticos y extrahepáticos, el conducto hepático común, el conducto cístico y el conducto biliar común, así como por la vesícula biliar; si bien esta última a diferencia del resto del árbol biliar, no está presente en todos los organismos vertebrados (Figura I-1).

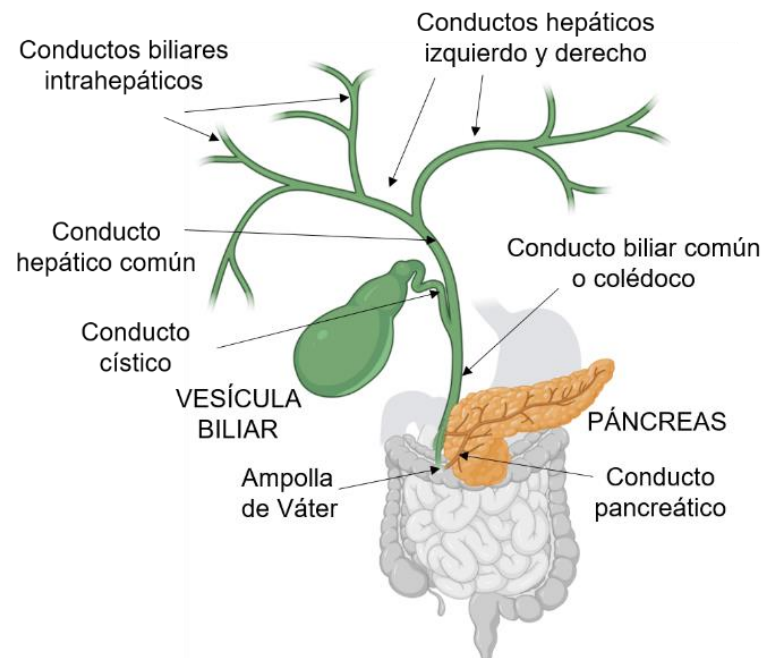


Figura I-1. Representación de las principales vías del árbol biliar. Los conductos biliares intrahepáticos convergen en los conductos hepáticos izquierdo y derecho, de mayor diámetro. El conducto biliar común permite el paso de la bilis hacia la vesícula biliar conectada a éste por medio del conducto cístico. A través del colédoco, la bilis llega al intestino delgado, en donde la unión con el conducto pancreático forma la ampolla de Váter.

2. INTRODUCCIÓN

Hepatocitos

Los hepatocitos son las principales células del hígado y representan más del 80 % de su volumen. La estructura del parénquima hepático es compleja y a nivel microscópico se distinguen unidades funcionales denominadas lobulillos hepáticos con una morfología hexagonal característica, delimitada por tejido conectivo (131). En cada lobulillo hepático (Figura I-2) se distingue una zona central donde se encuentra la vena central intralobulillar y desde esta área irradian los hepatocitos dispuestos en hileras, entre las que se encuentran canales o espacios correspondientes a los sinusoides y a los canalículos biliares. Los canalículos biliares convergen en conductillos y estos, a su vez, en conductos biliares situados en los vértices de cada lobulillo, donde junto a una rama de la arteria hepática y una rama de la vena porta forman lo que se conoce como tríada portal (Figura I-2).

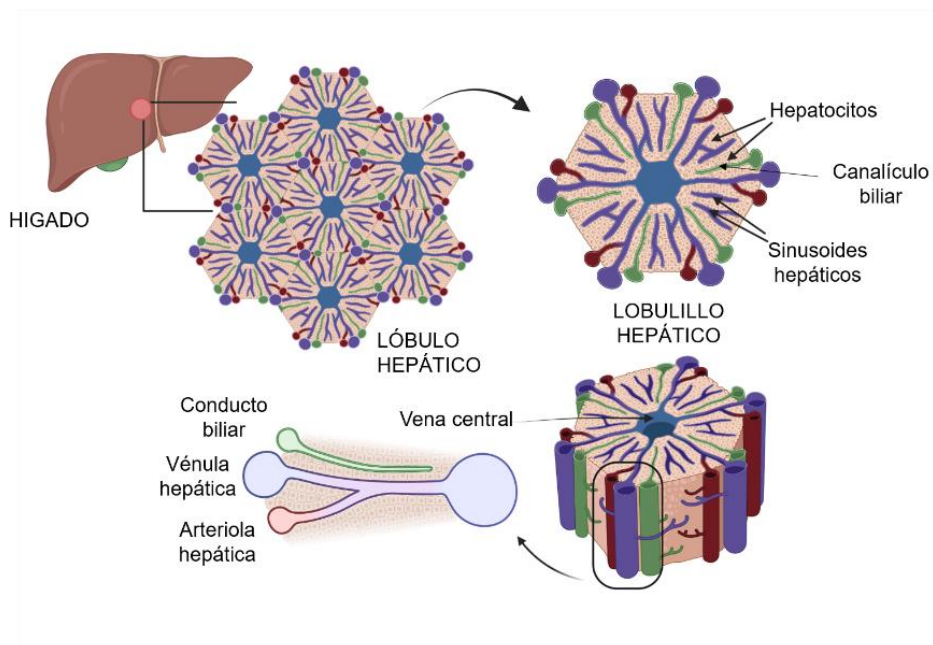


Figura I-2. Organización de la arquitectura hepática. El parénquima hepático está constituido por una red de lóbulos hepáticos que, a su vez, están formados por unidades funcionales denominadas lobulillos hepáticos. En cada vértice de estos, podemos encontrar una tríada portal formada por la unión de una rama de la arteria hepática, otra de la vena hepática y el conducto biliar, donde desembocan los canalículos biliares de menor diámetro.

Los hepatocitos son células que presentan una marcada polaridad (Meier, 1988), y en ellos se pueden diferenciar tres regiones:

- Membrana sinusoidal o basal. Orientada hacia el espacio de Disse y con microvellosidades que favorecen el intercambio con la sangre sinusoidal.
- Membrana lateral. Situada entre hepatocitos adyacentes permitiendo la comunicación celular a través de uniones estrechas (*tight junctions*), desmosomas y uniones comunicantes (*gap junctions*).
- Membrana canalicular o apical. Forma los canalículos biliares por invaginación de las membranas plasmáticas de dos hepatocitos contiguos.

Colangiocitos

Los colangiocitos son células epiteliales que recubren los conductos intra y extrahepáticos del árbol biliar y representan entre el 3 y el 5 %. Su principal función fisiológica es modificar la bilis primaria producida por los hepatocitos mediante el transporte de iones, solutos y agua a través de sus membranas apical y basolateral (164). Las uniones estrechas y *gap junctions* entre colangiocitos adyacentes son imprescindibles para mantener su polaridad y función. Se pueden distinguir las siguientes partes:

- Membrana apical luminal. Presenta microvellosidades que incrementan la superficie celular y un único cilio primario que se proyecta hacia el conducto biliar. Dicho cilio tiene funciones sensoriales y participa en procesos de secreción y diferenciación celular. También se localizan bombas de eflujo transmembrana dependientes de ATP, como la proteína de resistencia a múltiples fármacos o MDR1 (*Multidrug Resistance Protein 1*, gen *ABCB1*), que permita la excreción de cationes orgánicos hacia la bilis para que su acumulación no resulte tóxica para los colangiocitos, así como transportadores para la absorción de ácidos biliares (ABs), aminoácidos, glucosa e iones de la bilis (Boyer, 2013; Scoazec et al., 1997).
- Membrana basolateral. Tiene transportadores para la excreción de moléculas captadas en la bilis por medio de la membrana apical a sangre.

Los colangiocitos son morfológicamente heterogéneos y pueden dividirse en grandes y pequeños por su tamaño. Los primeros aparecen en los conductos de mayor calibre, con una mayor diferenciación y forma cuboide (Figura I-3). Los colangiocitos pequeños se localizan en conductos biliares de menor diámetro y están menos diferenciados. También presentan diferente expresión de algunas proteínas (6), lo que otorga también

2. INTRODUCCIÓN

heterogeneidad funcional a los colangiocitos (Kanno et al., 2000; Marzioni et al., 2002; Glaser et al., 2009)

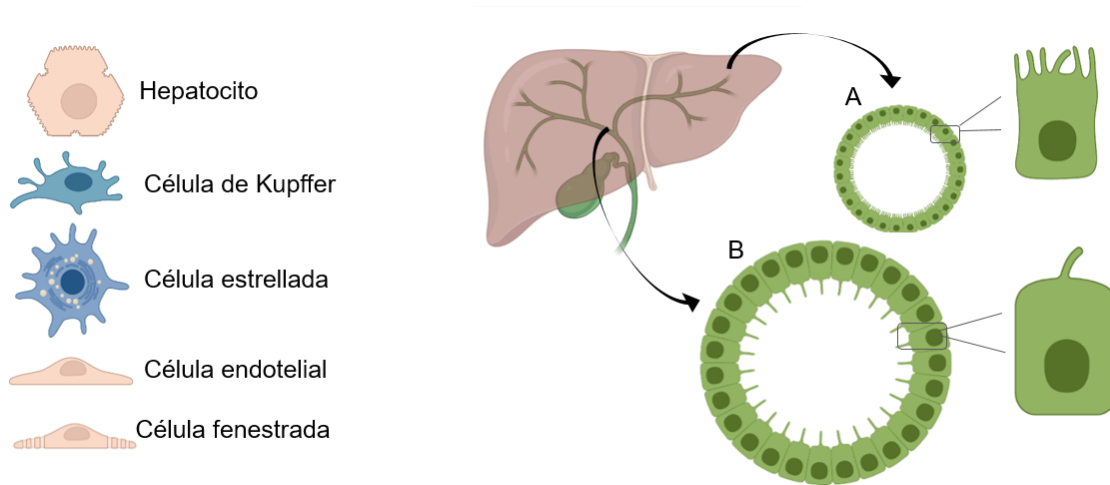


Figura I-3. Tipos celulares que forman el hígado y las vías biliares. En A) se representan los colangiocitos que constituyen los conductos biliares pequeños y en B) los colangiocitos que tapizan los conductos de mayor diámetro.

Otros tipos celulares

Además de los hepatocitos y colangiocitos, existen otros tipos celulares que representan en torno a un 6 % del volumen del hígado: las células endoteliales que recubren los sinusoides y permiten el intercambio de solutos entre los hepatocitos y la sangre; las células de Kupffer, que son macrófagos hepáticos que fagocitan bacterias y eliminan productos extraños; las células hepáticas estrelladas o células de Ito, que son lipocitos que almacenan grasa y vitamina A y, además, sintetizan proteínas del tejido conectivo en respuesta a lesiones hepáticas; y linfocitos o *pit cells*, que se encuentran recubriendo los sinusoides y también en el espacio de Disse. (45, 82).

Árbol biliar

El sistema biliar está formado por una red de conductos que transportan la bilis hacia la vesícula biliar para su almacenamiento en el ayuno o bien hasta el duodeno para

favorecer la digestión durante el estado postprandial. Los conductos biliares según su localización se clasifican en intrahepáticos y extrahepáticos.

La organización de los conductos intrahepáticos, de menor a mayor diámetro, es la siguiente: los ductos biliares o colangiololes terminales, que se originan en los canales de Hering y finalizan en los ductos interlobulares; los ductos septales, que comienzan en la confluencia de dos o más conductos biliares interlobulares; los conductos segmentarios y los conductos hepáticos izquierdo y derecho. Estos últimos, finalmente convergen en los conductos biliares extrahepáticos (164) (Figura I-1).

Las vías biliares extrahepáticas incluyen al conducto hepático común (región perihiliar) y al conducto cístico, por los que se transporta la bilis desde el hígado hasta la vesícula biliar; también forman parte de estas vías biliares el conducto biliar común o colédoco (región distal), que desemboca en el duodeno junto con el conducto pancreático principal (45).

2.1.2. Funciones del hígado

El hígado es un gran centro metabólico en el organismo pero, además, desempeña un papel importante de apoyo en la actividad del sistema inmune y la regulación endocrina del crecimiento. Entre sus múltiples funciones (Willatts, 1990; Kalra et al., 2022) podemos encontrar:

- Metabolismo de glúcidos. Actúa como reservorio de glucógeno y participa en la homeostasis de la glucosa mediante procesos de glucogenogénesis y glucogenolisis. También sintetiza glucosa por gluconeogénesis a partir de diferentes moléculas precursoras.
- Metabolismo de lípidos. Lleva a cabo la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, la cetogénesis, la β -oxidación de los ácidos grasos, la síntesis y el catabolismo del colesterol a partir del cual se sintetizan ABs, así como la producción de fosfolípidos y de la mayoría de lipoproteínas.
- Metabolismo de proteínas. En el hígado tiene lugar la síntesis de proteínas plasmáticas (albúmina), la degradación de bases púricas y pirimidínicas, el catabolismo proteico como fuente de energía y también la producción de urea para la eliminación de iones amonio.

2. INTRODUCCIÓN

- Formación y secreción de la bilis, que favorece la digestión y absorción de las grasas, y la excreción de productos de desecho procedentes de la sangre.
- Depósito de vitaminas (vitaminas A, D, B12), glucógeno, hierro en forma de ferritina y cobre.
- Síntesis de los factores de la coagulación (fibrinógeno, protrombina, globulina aceleradora, factores VII, IX y X) y del grupo hemo.
- Detoxificación de compuestos endógenos y xenobióticos. El hígado elimina a través de la bilis compuestos colefílicos que pueden ser endógenos, como los ABs o productos de desecho del metabolismo, o bien xenobióticos. Además, representa una de las principales vías para la eliminación del calcio del organismo.

2.2. ÁCIDOS BILIARES

2.2.1. Estructura y biosíntesis

Los ABs son ácidos carboxílicos sintetizados en los hepatocitos a partir de la molécula de colesterol por reacciones de hidroxilación y saturación del núcleo esteroideo, y ruptura oxidativa de la cadena lateral, procesos que tienen lugar en subcompartimentos celulares como el retículo endoplasmático (RE) y en los peroxisomas, respectivamente. Se trata de moléculas de naturaleza anfipática, en la que se distinguen dos regiones, una hidrofílica y otra hidrofóbica (Figura I-4).

En cuanto a su estructura química, los ABs están formados por un núcleo esteroideo y una cadena lateral. En mamíferos los ABs tienen 24 átomos de carbono, son saturados, con uno o varios grupos hidroxilo y con un grupo carboxilato en la cadena lateral (137) (Figura I-4).

El núcleo esteroide de los ABs es un anillo de ciclopentanoperhidrofenantreno formado por tres ciclohexanos (anillos A, B y C) y un ciclopentano (anillo D). Además, presenta dos grupos metilo en los carbonos C10 y C13, que es una característica estructural común a todos los ABs y a su precursor el colesterol.

La cadena lateral, unida al anillo D por el carbono C17, normalmente presenta 5 átomos de carbono y termina en un grupo carboxilato. Además, en la posición 20 presenta un grupo metilo, de ahí que la mayoría de los ABs estén formados por 24 átomos de carbono (52) (Figura I-4).

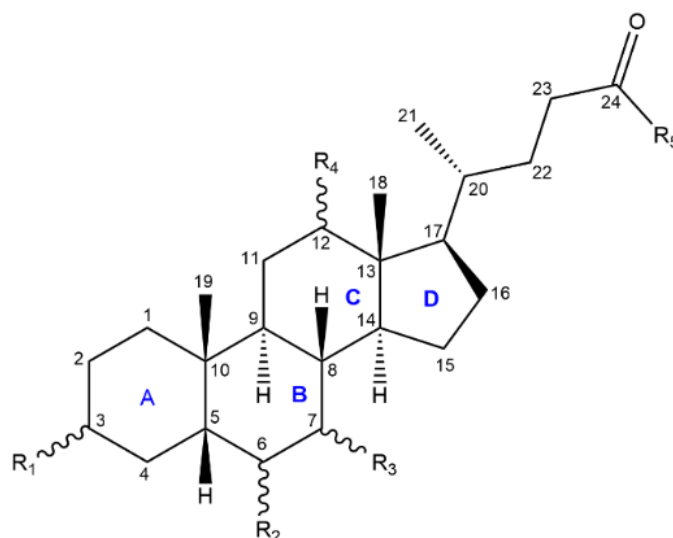


Figura I-4. Estructura general de un ácido biliar. R1, R2, R3 y R4 pueden ser OH o H. R5 puede ser OH si es un ácido carboxílico C24 o un NH-R si se encuentra conjugado con un aminoácido como puede ser la glicina.

Los ABs primarios (Figura I-5) sintetizados en el hígado son el ácido cólico (CA: ácido 3 α , 7 α , 12 α -trihidroxi-5 β -colanoico) (Figura I-5A) y el ácido quenodesoxicólico (CDCA: ácido 3 α , 7 α -dihidroxi-5 β -colanoico) (Figura I-5B). Cuando estos se conjugan con glicina y taurina en la cadena lateral dan lugar a los ácidos glicocólico (GCA), taurocólico (TCA), glicokenodesoxicólico (GCDCA) y tauroquenodesoxicólico (TCDC), respectivamente. Además, las modificaciones realizadas por la microbiota intestinal dan lugar a la formación de ABs secundarios, en los que se elimina el grupo hidroxilo de la posición 7 α , y se forman los ácidos desoxicólico (DCA) y litocólico (LCA).

2. INTRODUCCIÓN

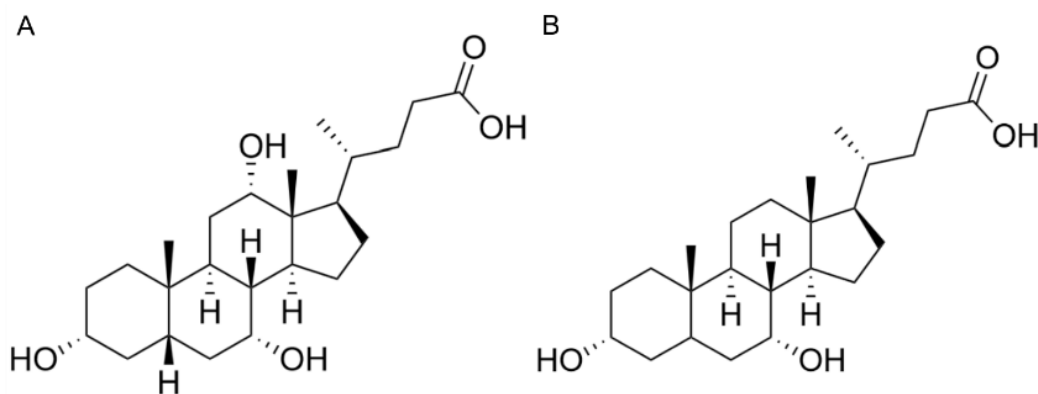
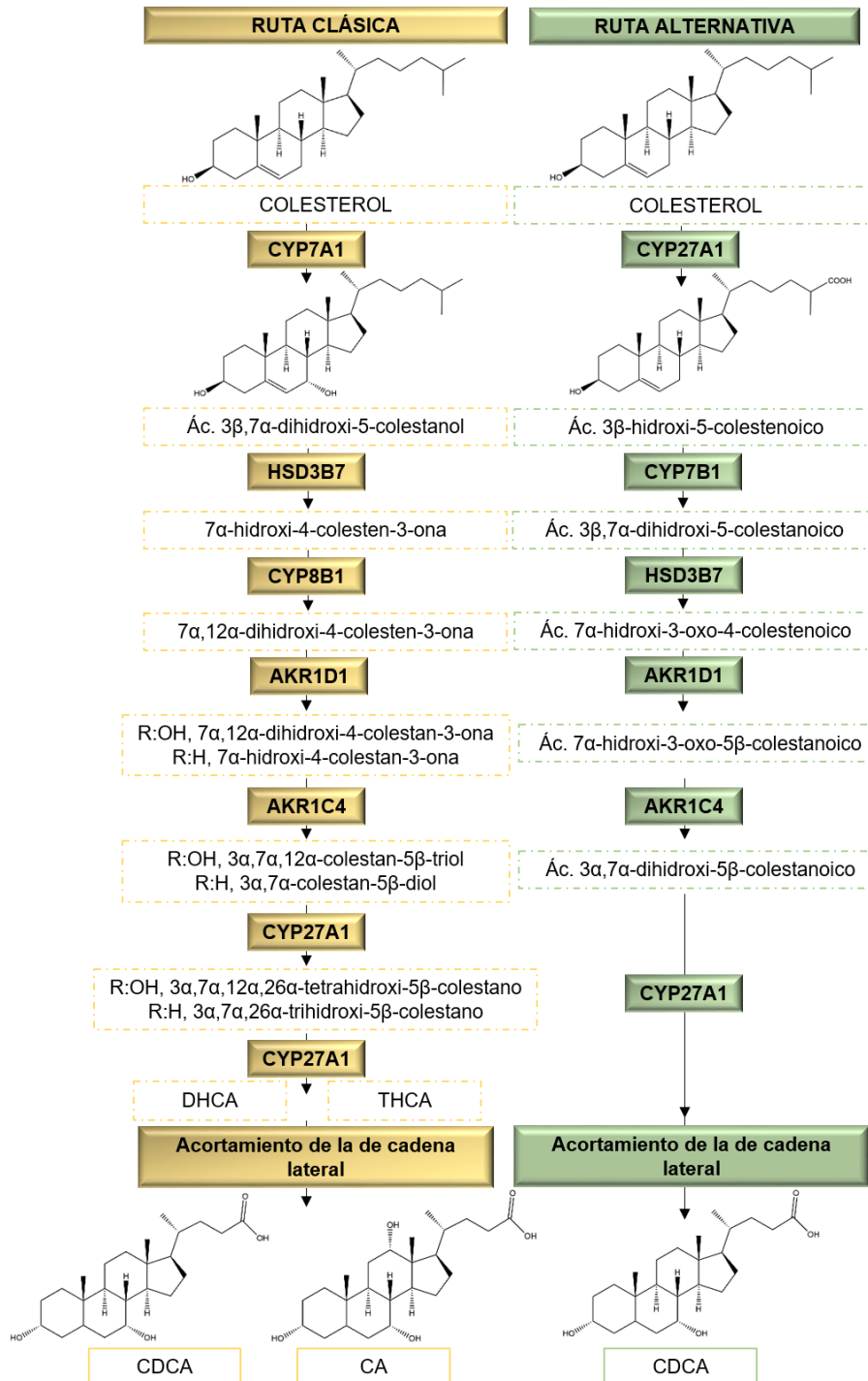


Figura I-5. Estructura química de los ABs primarios. (A) Ácido cólico y (B) ácido quenodesoxicólico.

La síntesis de los ABs primarios es un proceso complejo que se desarrolla en varios compartimentos subcelulares: RE, mitocondrias, peroxisomas y citosol; y en el que intervienen al menos 17 enzimas. Según el orden en el que se lleven a cabo las reacciones se distinguen cuatro vías diferentes (Figura I-6) (142):

- **Ruta clásica o neutra.** Tiene lugar la modificación del anillo esteroide, seguida de la escisión de la cadena lateral. Sus productos principales son el CA y CDCA (Chiang, 1998). El paso limitante de esta vía es la hidroxilación en el C7 del núcleo esteroide catalizada por la enzima microsomal colesterol 7α -hidroxilasa codificada por el gen CYP7A1 (Chiang, 2009) (Figura I-6).
- **Ruta alternativa o ácida.** El producto mayoritario de esta vía es el CDCA (8) donde los compuestos intermediarios tienen carácter ácido (Figura I-6). El paso limitante es la hidroxilación en el C27 de la cadena lateral llevada a cabo por la enzima mitocondrial esteroide 27-hidroxilasa (gen CYP27A1) y que da lugar al ácido 3β -trihidroxi-5-colestenoico. En esta ruta tiene lugar la funcionalización de la cadena lateral (formación de ABs de 27 átomos de carbono) antes que las modificaciones del esqueleto esteroide.
- **Ruta de Yamasaki.** Comparte con la vía alternativa la obtención inicial de ácido 3β -hidroxi-5-colestenoico (147) catalizada por la enzima CYP27A1 (Figura I-7A). El principal AB sintetizado es el CDCA tras el acortamiento de la cadena lateral por β -oxidación peroxisomal y posteriores modificaciones en el RE del núcleo esteroide del ácido $3\beta,7\alpha$ -dihidroxi-5-colestenoico

- Ruta de 25-hidroxilación.** Se trata de una ruta alternativa en el metabolismo de los ABs (Figura I-7). La enzima CYP3A4 cataliza la reacción de 25-hidroxilación del 5 β -colestano-3 α ,7 α ,12 α -triol (37) para formar 5 β -colestano-3 α ,7 α ,12 α ,23R,25-pentol (16) y este es hidroxilado de nuevo por CYP27A1 obteniéndose 5 β -colestano-3 α ,7 α ,12 α ,25-tetraol. En las últimas etapas, tras la formación de un intermediario con un grupo carbonilo en la posición 24, actúan varias enzimas citosólicas para obtener CA (154).



2. INTRODUCCIÓN

Figura I-6. Esquema de las rutas clásica y alternativa de síntesis de ácidos biliares. CYP7A1: Colesterol 7 α -hidroxilasa; HSD3B7: 3 β -hidroxi- Δ 5-C27-esteroide oxidoreductasa; CYP8B1: Esterol 12 α -hidroxilasa; AKR1D1: Δ 4-3-oxoesteroide-5 β -reductasa; AKR1C4: 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa; CYP27A1: Esterol 27-hidroxilasa; CYP7B: Oxiestero 7 α -hidroxilasa.

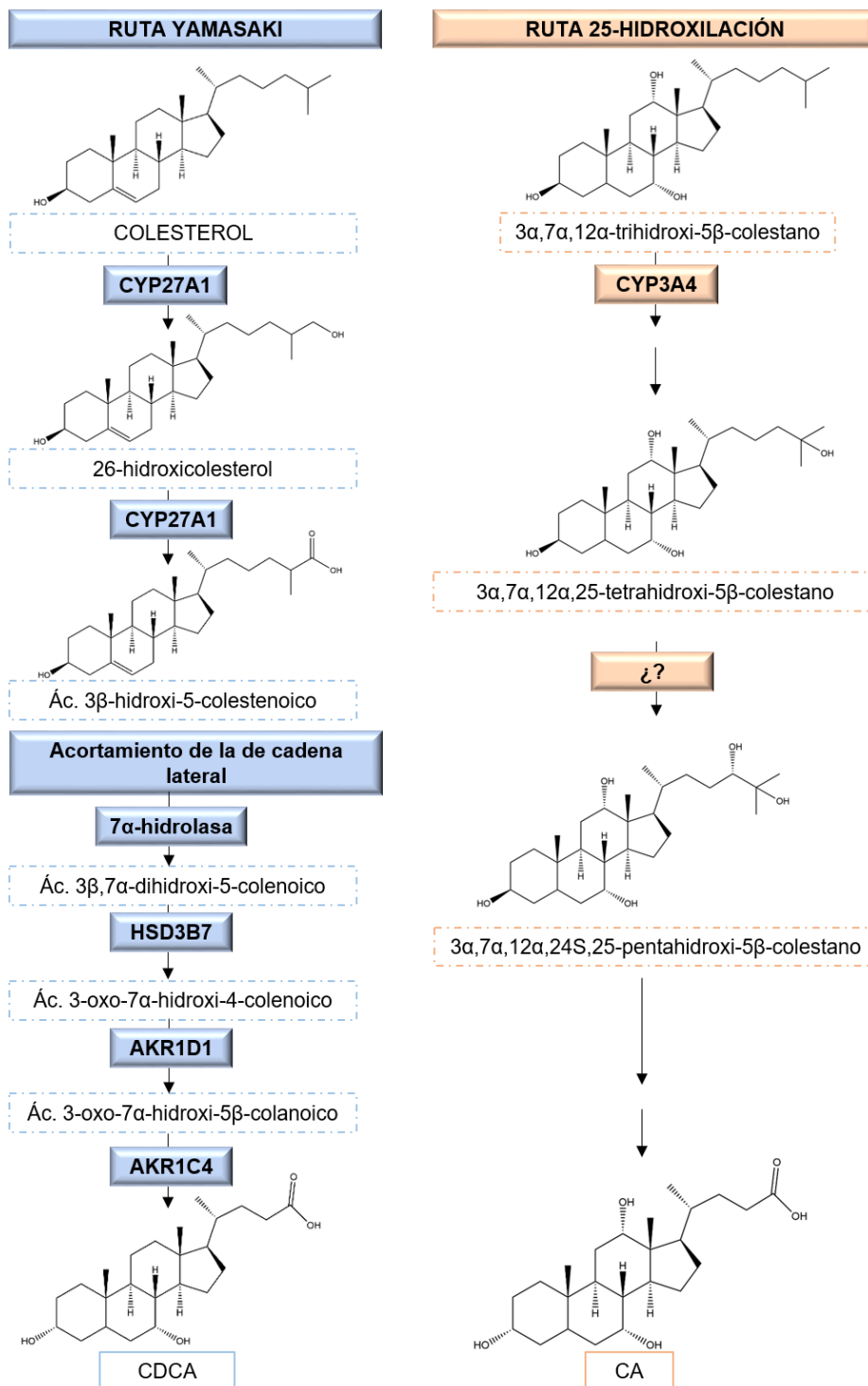


Figura I-7. Esquema de las rutas Yamasaki y de 25-hidroxilación de síntesis de ácidos biliares. CYP7A1: Colesterol 7 α -hidroxilasa; HSD3B7: 3 β -hidroxi- Δ 5-C27-esteroide oxidoreductasa; CYP8B1:

Esterol 12 α -hidroxilasa; AKR1D1: Δ 4-3-oxoesteroide-5 β -reductasa; AKR1C4: 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa; CYP27A1: Esterol 27-hidroxilasa; CYP7B: Oxiesterol 7 α -hidroxilasa.

2.2.2. Circulación enterohepática de ácidos biliares

La circulación enterohepática (Figura I-8) es un término que hace referencia al recorrido cíclico que realizan los ABs desde que son secretados a bilis hasta que regresan de nuevo a los hepatocitos por los que son captados desde sangre portal, liberados en el intestino delgado para favorecer la digestión de las grasas y, posteriormente, absorbidos en el íleon terminal. Una vez en el hígado, son secretados de nuevo a bilis repitiéndose el ciclo (136).

Este eficaz mecanismo de reciclado de ABs es posible gracias a la existencia de diferentes transportadores en la membrana de los ileocitos, colangiocitos y hepatocitos. De esta forma, la cantidad total circulante de ABs permanece constante ($2,3 \pm 0,43$ mg), ya que menos del 5 % del pool de ABs se elimina en heces, y esos niveles son restituidos mediante la síntesis de novo a partir del colesterol en los hepatocitos.

Es importante señalar que en la formación de la bilis intervienen dos mecanismos: uno de ellos es dependiente de ABs y el otro no. Por un lado, en el flujo biliar dependiente de ABs, la secreción activa de éstos genera un arrastre osmótico de agua hacia el canalículo biliar. Por otro, el flujo biliar independiente de ABs está relacionado con la secreción a bilis de glutatión (GSH) y otros aniones orgánicos, como la bilirrubina, por el transportador MRP2 (gen *ABCC2*); y de bicarbonato, mediante la proteína AE2 (gen *SLC4A2*) que actúa como intercambiador de aniones $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$. independiente de sodio.

En primer lugar, los ABs son secretados al canalículo y, posteriormente, concentrados y almacenados en la vesícula biliar. La salida de ABs está mediada por la bomba exportadora BSEP (*ABCB11*, del inglés *Bile Salt Export Pump*) (161), localizada en la membrana canalicular. Esta bilis primaria que se produce está formada principalmente por agua, colesterol, ABs, bilirrubina conjugada e iones, y modifica su composición a lo largo de su trayecto por el sistema biliar. La bilis colangiolar o secundaria resultante se alcaliniza debido a un aumento en la concentración de bicarbonato por la salida de éste a través de la proteína AE2 de la membrana apical de los

2. INTRODUCCIÓN

colangiocitos, impulsada por el eflujo previo de Cl⁻ por el canal CFTR (gen *ABCC7*, *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), en un proceso mediado por la liberación de secretina durante la digestión (112, 168). La bilis también se fluidifica, ya que la fuerza osmótica que ejerce el bicarbonato arrastra agua hacia la luz del canalículo a través de la acuaporina AQP1. Por su parte, la llegada de ácidos grasos al intestino delgado tras la ingesta de alimento provoca la liberación de colecistoquinina (CCK) y, como consecuencia, la contracción y el vaciado de la vesícula biliar. Así, la bilis se libera al duodeno para favorecer la digestión de grasas y absorción de nutrientes y vitaminas liposolubles.

Posteriormente, aproximadamente el 95 % de los ABs se reabsorben a nivel intestinal, principalmente en el íleon terminal mediante el transportador dependiente de sodio ASBT (gen *SLC10A2*, del inglés *Apical Sodium/Bile acid coTransporter*) de la membrana apical de los ileocitos. Se transportan en sangre portal unidos a proteínas plasmáticas, y su captación está mediada por las proteínas transportadoras de la membrana sinusoidal de los hepatocitos: NTCP (*Na⁺/Taurocholate Co-transporting Polypeptide*, gen *SLC10A1*) (80). Estos ABs no conjugados recaptados por los hepatocitos son transportados en el citosol por la glutatión-S-transferasa hacia la región canalicular y en este trayecto intracelular se conjugan con glicina y taurina. Una vez conjugados, son secretados de nuevo al canalículo, generándose así el flujo biliar dependiente de ABs.

Durante esta recirculación existe una fracción de ABs que, en lugar de llegar al intestino, es captada por los colangiocitos en lo que se denomina ruta colédoco-hepática o colhepática (179). De esta forma, a través de los transportadores de su membrana basolateral t-ASBT (forma truncada de ASBT), MDR3 (gen *ABCB4*, *MultiDrug Resistance protein 3*) y el transportador de solutos orgánicos heteromérico OST α/β (genes *SLC51A* y *SLC51A*, del inglés *Organic Solute Transporter*), los ABs no conjugados son transportados al plexo vascular peribiliar y regresan a los hepatocitos para ser secretados de nuevo a bilis.

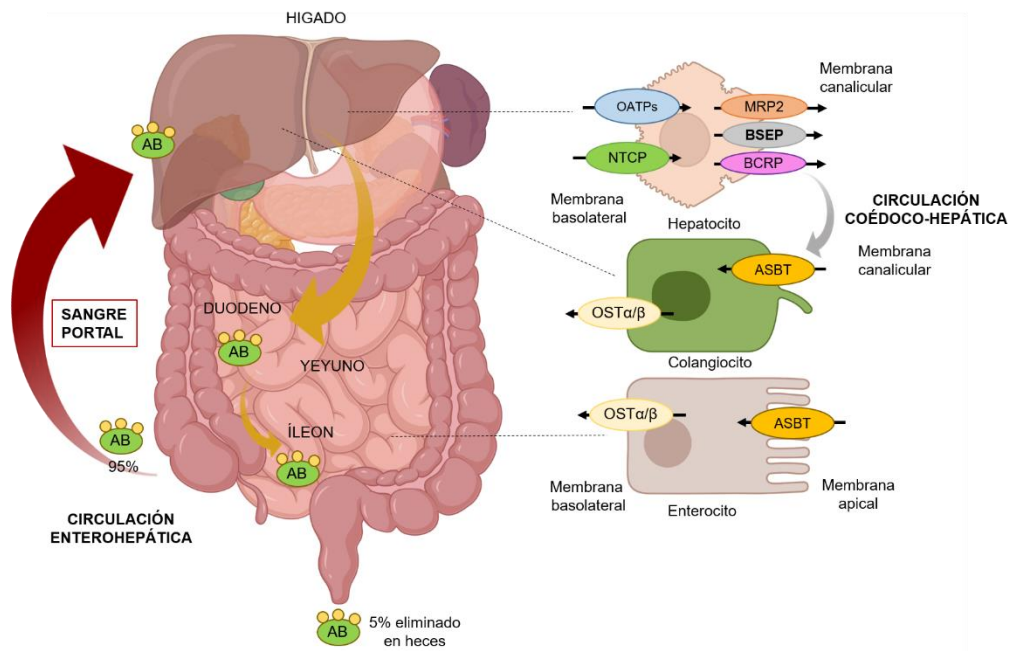


Figura I-8. Principales transportadores involucrados en el proceso de circulación enterohepática y en la ruta colédoco-hepática de los ácidos biliares.

2.2.3. Transportadores hepáticos de ácidos biliares

La actividad de proteínas transportadoras que permiten el paso de los ABs a través de las membranas lipídicas es clave para su correcta homeostasis hepática. Estos transportadores (Figura I-9) tienen estructuras diferentes y están implicados en procesos de captación y eflujo importantes para la generación del flujo biliar y la circulación enterohepática.

Los hepatocitos realizan la captación de ABs de sangre portal por transportadores de la superfamilia SLC, a la que pertenecen los transportadores dependientes de sodio pertenecientes a la familia SLC10A y los transportadores de aniones orgánicos (OATP, del inglés *Organic Anion Transporting Polypeptides*) de la familia SLCO. En la secreción de los ABs hacia el canículo participan las bombas exportadoras de la superfamilia ABC o *ATP-Binding Cassette* (121), entre la que destacan las proteínas asociadas a resistencia a múltiples fármacos (MRPs).

2. INTRODUCCIÓN

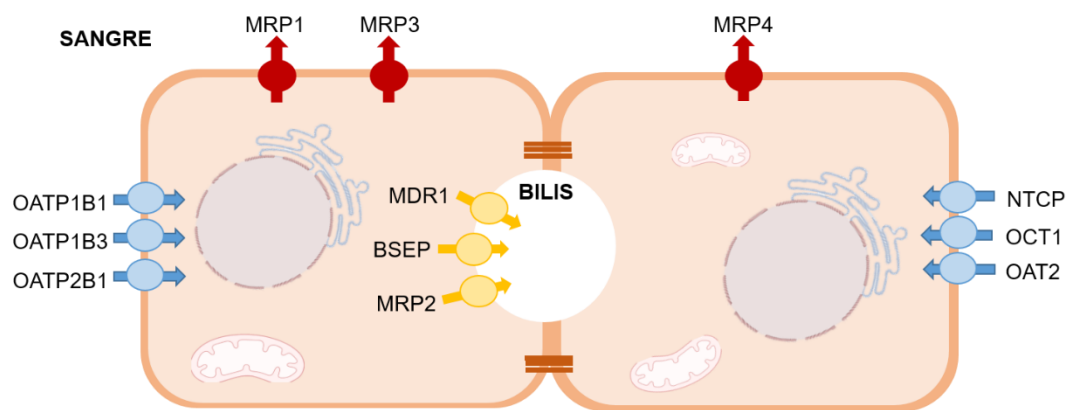


Figura I-9. Esquema con las proteínas más relevantes del transportoma hepático.

Transportadores de ácidos biliares dependientes de sodio

La principal proteína responsable de la captación sodio-dependiente de ABs desde sangre portal al interior del hepatocito es NTCP (gen *SLC10A1*). NTCP es una glucoproteína con 9 dominios alfa transmembrana (130) que forma parte de la familia SLC10A, y comparte una alta homología con la proteína Ntcp (gen *Slc10a1*) de roedores (43, 44). Se localiza en la membrana basolateral de los hepatocitos y desempeña un importante papel en la circulación enterohepática. NTCP cotransporta una molécula de ABs por cada dos iones sodio, a favor del gradiente de sodio que genera la bomba Na^+/K^+ ATPasa (Meier, 1988). Además de en el transporte de ABs primarios, NTCP participa en la captación de ABs, tanto conjugados como no conjugados, aunque estos últimos en menor medida. Además, interviene en el transporte de compuestos sulfatados (Stieger, 2011), hormonas tiroideas, bromosulfoftaleína (47) y algunos fármacos (85, 132).

Algunos estudios sobre la comparativa funcional de la proteína en humanos y roedores han mostrado perfiles similares de farmacocinética e inhibición (34), y, sin embargo, algunas diferencias importantes en lo que a especificidad de sustrato se refiere. Un ejemplo de ello es la rosuvastatina, una potente estatina que se emplea para disminuir los niveles de colesterol y prevenir eventos cardiovasculares al actuar como inhibidor selectivo competitivo de la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) (51) y que se ha demostrado que es sustrato de la NTCP humana, pero no de Ntcp en roedores.

También se ha descrito que el transporte mediado por NTCP de algunos agentes empleados en pruebas de imagen como el gadoxetato disódico (Gd-EOB-DTPA) (93), y también de derivados fluorescentes de ABs, como la colilisilfluoresceína (29), podría resultar interesante en la determinación de la función hepatobiliar. Sin embargo, distintas patologías hepáticas (Chen et al., 2008; Keitel et al., 2005; Zollner, G. et al., 2001; Zollner et al., 2003) alteran los niveles de expresión de NTCP, lo que hace que esta proteína no sea la mejor candidata para estudios de dinámica hepática.

Transportadores independientes de sodio

La familia de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATPs), codificada por los genes *SLCO*, participa en menor medida que NTCP en la captación de ABs por los hepatocitos y lo hace de manera independiente de sodio (Meier & Stieger, 2002). Entre los 11 miembros que se han descrito en humanos, en hígado se expresan principalmente las isoformas OATP1B1 (*SLCO1B1*), OATP1B3 (*SLCO1B3*), OATP1A2 (*SLCO1A2*) y OATP2B1 (*SLCO2B1*).

No existen homólogos directos de estos genes en roedores, pero sí isoformas con características similares. En rata, se han descrito principalmente las isoformas: *Oatp1a1* (*Slco1a1*), *Oatp1a4* (*Slco1a4*) y *Otp1b2* (*Slco1b2*).

Estos transportadores se caracterizan por presentar una amplia especificidad de sustrato: ABs conjugados, bilirrubina, algunos fármacos como el metotrexato y derivados de estos con ABs. Entre todas las isoformas, la proteína OATP1B1 es la que presenta mayor participación en la captación de ABs, después de NTCP, aunque también tiene otros sustratos como esteroides conjugados y hormonas tiroideas, entre otros. OATP1B3 se expresa en la membrana basolateral de los hepatocitos (75) y entre sus sustratos están: bilirrubina, bromosulfoftaleína (BSP), sulfato de deshidroepiandrosterona (DHEAS), CCK, hormonas tiroideas, ouabaína, digoxina y rifampicina (Geier et al., 2007). A pesar de que está bien establecido que el transporte mediado por los OATPs es independiente de ATP y sodio, no está descrito el mecanismo exacto. Son capaces de efectuar transporte bidireccional y algunas evidencias parecen indicar que podrían intercambiar sus sustratos por bicarbonato o glutatión intracelulares, con diferencia entre los OATPs (140).

Además de los OATPs, dentro de este grupo de transportadores independientes de sodio, se encuentran los transportadores de aniones (OATs) y de cationes (OCTs)

2. INTRODUCCIÓN

orgánicos. Del primer grupo, solo se expresa en hígado OAT2 (gen *SLC22A7*) (155). Entre los OCTs, destaca OCT1 (gen *SLC22A*), que se expresa en hígado y otros tejidos, como intestino delgado, colon y riñón, y podría estar implicado en la captación de agentes antitumorales como el sorafenib (Geier et al., 2017).

Transportadores de la familia ABC

El transporte canalicular de los ABs es clave para la formación de la bilis y la circulación enterohepática. La mayor parte de las proteínas implicadas en este proceso pertenecen a la superfamilia de proteínas ABC (del inglés, *ATP-binding cassette*). Según su estructura, los transportadores ABC suelen contener cuatro dominios: dos de ellos citoplasmáticos o de unión a nucleótidos (NBDs, del inglés *Nucleotide-Binding Domains*) y dos transmembrana (TMDs, del inglés *Transmembrane Domains*) (176, 191). Se han identificado un total de 48 genes ABC, que se clasifican en 7 familias diferentes (ABCA a ABCG), y que expulsan de la célula una gran variedad de sustratos, utilizando para ello la energía obtenida de la hidrólisis del ATP, gracias a sus NBDs.

La proteína MDR1 participa, principalmente, en el transporte de cationes orgánicos hidrofóbicos y de multitud de fármacos, entre ellos, antitumorales, lo que explicaría que un aumento de su expresión en algunos tumores se relacione con la falta de respuesta a la terapia farmacológica, como veremos más adelante. A esta misma familia pertenece el transportador MDR3 (gen *ABCB4*), implicado en la secreción canalicular de compuestos colefílicos. Es una flipasa que participa en la translocación de fosfatidilcolina hacia la cara externa de la membrana canalicular para la formación de micelas y para neutralizar la acción detergente de los ABs. Se ha asociado la presencia de polimorfismos en MDR3 en pacientes con lesión hepática inducida por fármacos (DILI, *Drug-Induced Liver Injury*) (143) y en mujeres embarazadas con colestasis intrahepática gestacional (CIG). Además, mutaciones en el gen *ABCB4* dan lugar a un trastorno hereditario autosómico recesivo llamado colestasis intrahepática familiar progresiva tipo 3. En roedores, este transportador recibe el nombre de Mdr2 y se ha relacionado su deficiencia con daño ductal y colestasis (Smith et al., 1998).

La proteína BSEP es la principal responsable de la secreción canalicular de ABs conjugados (88). La presencia de mutaciones en *ABCB11* puede dar lugar a colestasis intrahepática familiar progresiva de tipo 2 y se ha asociado también a la CIG.

Las proteínas asociadas a resistencia a múltiples fármacos (MRPs) forman parte de la familia ABCC. Su principal función es la secreción de compuestos xenobióticos hacia bilis para proteger a la célula. Las isoformas MRP2 y MRP3 se expresan, principalmente, en hígado y también en riñón e intestino. MRP2 se localiza en la región apical y desempeña un papel importante en la detoxificación hepática mediante el transporte de un amplio espectro de compuestos y, en particular, de conjugados con glutatión, glucuronato y sulfato, así como compuestos lipofílicos, y de multitud de fármacos antitumorales, entre los que se encuentran algunos como metotrexato, cisplatino o antraciclinas (26, 62). MRP3 y MRP4 se expresan en la membrana sinusoidal de los hepatocitos y participan en el transporte de ABs o de su cotransporte con glutatión (26).

Algunos miembros de la familia ABCG (ABCG5 y ABCG8) participan en el transporte del colesterol y, entre ellos, destaca la proteína BCRP (del inglés *Breast Cancer Resistance Protein*, gen *ABCG2*). Está localizada en la membrana canalicular del hepatocito y presenta una amplia especificidad de sustratos, incluyendo ABs sulfatados.

Otros transportadores

Existen otros transportadores extrahepáticos que participan en la captación de los ABs a nivel intestinal. Entre ellos, en la membrana apical de los ileocitos está el transportador ASBT, que se expresa principalmente en íleon distal y cotransporta dos iones sodio por cada AB, preferentemente conjugado. Por su parte, el eflujo de ABs por la membrana basolateral de los enterocitos tiene lugar por un mecanismo de difusión facilitada mediado por el dímero OST- α /OST- β (26).

2.2.4. Papel fisiológico de los ácidos biliares

Los ABs desempeñan un gran conjunto de funciones a nivel fisiológico. Entre ellas, las más destacadas son las que se detallan a continuación.

En el hígado, como se ha comentado anteriormente, los ABs son los responsables de la generación del flujo biliar dependiente de ABs, debido al arrastre osmótico de agua a la luz canalicular. Favorecen la contracción canalicular y el bombeo de la bilis hacia los conductos colectores del sistema biliar. También, estimulan la secreción biliar de lípidos (fosfolípidos y colesterol, entre otros). Los ABs regulan la biosíntesis del colesterol,

2. INTRODUCCIÓN

modulan el número de receptores de membrana para las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y, por tanto, su concentración plasmática (86).

En la bilis, los ABs permiten la solubilización de compuestos lipófilos (22), como el colesterol o las porfirinas, mediante la formación de micelas.

A nivel intestinal, los ABs favorecen la digestión de las grasas que se ingieren en la dieta y la absorción de estas, además de vitaminas liposolubles (A, E, K, D) (Monte et al., 2009; J.G. Marin et al., 2015) mediante la activación de las lipasas. Asimismo, regulan la liberación de CCK (59) y de enzimas pancreáticas (76), inducen la secreción de agua y electrolitos y favorecen la absorción de calcio (71). Por otro lado, su actividad bacteriostática protege de posibles infecciones en el tracto intestinal.

Asimismo, se ha descrito que los ABs participan en la regulación del metabolismo de la glucosa y la homeostasis energética de la célula (92, 175), además de desempeñar una importante función como moléculas señalizadoras (18, 53). Provocan la activación de cascadas intracelulares (58) al actuar como ligandos del receptor de ABs acoplado a proteína G, TGR5, y de los receptores nucleares FXR (*Farnesoid X Receptor*) y PXR (*Pregnane X Receptor*) (69). Participan también en la respuesta inflamatoria mediada por las células de Kupffer (118).

Se ha descrito también que los ABs son necesarios en el proceso de regeneración hepática (Fan et al., 2015; Huang et al., 2006) y algunos estudios han demostrado que elevadas concentraciones son capaces de inducir procesos apoptóticos (Marin et al., 1993).

Por otro lado, varios estudios sugieren que los ABs más hidrófobos como LCA, DCA y CDCA, son los principales promotores de la carcinogénesis y pueden contribuir al desarrollo de HCC (36, 61, 124, 135). No obstante, otros ABs como el ácido ursodesoxicólico (UDCA) (Liu et al., 2007; Lim et al., 2010; Zhu et al., 2014) el ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) y el CDCA a altas concentraciones ($> 100 \mu\text{M}$) inhiben la proliferación de las células tumorales e inducen la apoptosis. Además, la desregulación de la homeostasis de los ABs conduce a una mayor acumulación hepática de ABs e inflamación en patologías como la cirrosis hepática y NASH, que son factores de riesgo para el desarrollo de HCC. Debido a su naturaleza anfipática, los ABs pueden alterar la membrana plasmática y activar la proteína quinasa C (PKC) y la fosfolipasa A2 (PLA2), induciendo la vía p38-MAPK-p53-NF κ B (63). De esta forma, la inflamación puede

suprimir la actividad reguladora del FXR, lo que contribuye a la acumulación de ABs y a la hepatocarcinogénesis (Yang et al., 2007; Xu et al., 2012).

2.3. MONITORIZACIÓN DE LA FUNCIÓN HEPATOBILIAR

La determinación de la función hepática en clínica, generalmente, se basa en la realización de test diagnósticos que miden los niveles de distintos parámetros bioquímicos en suero. El aumento de factores como la fosfatasa alcalina (FA), aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT), bilirrubina total (BT), entre otros, puede ser la consecuencia de lesión a nivel hepático (64, 122). Sin embargo, estas enzimas no son indicadores muy específicos ya que el abanico de patologías en los que se alteran sus niveles es bastante amplio.

También se utilizan modelos clínicos para la estratificación y evaluación pronóstica de los pacientes con hepatopatías crónicas como la cirrosis. Uno de ellos es la escala Child-Pugh (169) que utiliza cinco criterios como marcadores de daño hepático (Tabla I-1); otro es el modelo de enfermedad hepática terminal (MELD, en inglés *Model for End-stage Liver Disease*) que usa como parámetros la bilirrubina y la creatinina séricas, y el cociente internacional normalizado (INR, del inglés *International Normalised Ratio*) del tiempo de protrombina para predecir la supervivencia de los pacientes que esperan un trasplante (141).

Tabla I-1. Parámetros utilizados en la escala Child-Pugh para la estratificación de la gravedad de la enfermedad hepática.

Parámetros pronósticos	Puntuación		
	1	2	3
Encefalopatía	Ninguna	Grado I-II	Grado III-IV
Ascitis	Ausente	Leve	Moderada

2. INTRODUCCIÓN

Bilirrubina (mg/dl)	<2	2-3	>3
Albúmina (g/l)	>3,5	2,8-3,5	<2,8
Tiempo de protrombina prolongado/INR (s)	<4/<1,7	4-6/1,7-2,2	>6/2,2

2.3.1. Técnicas de imagen para el diagnóstico y el tratamiento de alteraciones hepatobiliares

La realización de los test y las escalas anteriormente comentados se puede complementar con el uso de distintas técnicas de imagen que permiten un mejor diagnóstico y por tanto un mejor tratamiento de la patología.

Entre las técnicas de imagen que se emplean para evaluar la función hepatobiliar se encuentran las que se describen a continuación:

- **Ultrasonografía o ecografía.** Es la técnica de elección para la monitorización de alteraciones del tracto biliar, la identificación de lesiones en el hígado, la detección de esplenomegalia o el diagnóstico de esteatosis hepática, entre otros. Es un procedimiento muy sensible y el menos costoso de los que se emplean para estudiar la arquitectura del hígado. La ultrasonografía transabdominal, por ejemplo, se utiliza para la detección de quistes, abscesos y tumores hepáticos, y puede ser de gran ayuda para la elección de un tratamiento eficaz en algunas patologías como la cirrosis hepática o la hemocromatosis, una enfermedad hereditaria del metabolismo del hierro que hace que este se acumule en el organismo. Otra técnica es la elastografía por ultrasonidos o sonoelastografía que se basa en el empleo de ondas sonoras para evaluar las propiedades mecánicas de los tejidos, como la elasticidad o rigidez, en respuesta a la presión que se ejerce sobre estos. Dentro de este procedimiento se incluye: la elastografía de ondas de cizallamiento o transitoria y la elastografía de deformación o estática. Este método no invasivo se utiliza cada vez más para evaluar el grado de fibrosis hepática (127). Además, se ha visto que este método puede ser una alternativa segura a la biopsia hepática en pacientes con hepatitis viral crónica y de utilidad interesante en la evaluación de otras patologías hepáticas, no sólo fibrosis, como el síndrome de obstrucción sinusoidal hepática (SOS) y en el síndrome de Budd-Chiari, una enfermedad vascular hepática poco frecuente en la que se produce la obstrucción

parcial o completa del flujo venoso, haciendo posible el diagnóstico precoz y un tratamiento eficaz (32).

- **Colescintigrafía, escintigrafía, gammagrafía hepatobiliar o HIDA scan (*hepatobiliary IDA*).** Es una técnica que requiere del uso de marcadores radiactivos para evaluar la anatomía y la función del sistema biliar. Además, es un método sensible y específico para la detección de fugas biliares, que son lesiones iatrogénicas que surgen por complicaciones quirúrgicas, principalmente asociadas al uso de la cirugía por laparoscopia, o por traumatismos abdominales. Normalmente se utiliza un derivado del ácido iminodiacético (IDA, por sus siglas en inglés) unido al radioisótopo de tecnecio-99 (^{99m}Tc) como radiomarcador (89). Es una técnica empleada para el diagnóstico de colecistitis aguda, atresia biliar, y también se emplea para el seguimiento de pacientes que sufren complicaciones tras la resección quirúrgica, la cirugía laparoscópica o el trasplante hepático. Además, es el método de elección para evaluar la función hepática después de un tratamiento quimioterápico, y permite conocer el estado de diferenciación celular en tumores hepáticos.
- **Tomografía computarizada (TC).** Es un método que se usa para la detección de diferentes alteraciones del sistema hepatobiliar: acumulación de grasa en el parénquima hepático, inflamación, abscesos, y para el estadiaje y estratificación del carcinoma hepatocelular (HCC) previamente diagnosticado por otras técnicas (35). Existen algunas variantes que permiten una mejor resolución, como la TC multidetector (TCMD); otras hacen posible el estudio del metabolismo, como la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT o *Single-Photon Emission Computerized Tomography*) (151) o la tomografía por emisión de positrones (PET o *Positron Emission Tomography*) (Sharma et al., 2013).
- **Tomografía por resonancia magnética (RMN, o MRI del inglés *Magnetic Resonance Imaging*).** Las imágenes se obtienen utilizando imanes que generan un potente campo magnético y ondas de radio. No utiliza radiación ionizante, lo que le confiere una ventaja frente a la TC. La difusión por resonancia magnética (DWI-MRI, del inglés *Diffusion-weighted Magnetic Resonance Imaging*), un subtipo de esta técnica, se basa en la detección del movimiento browniano de las moléculas de agua de un tejido, el cual se ve alterado en algunas condiciones como la isquemia o en las masas tumorales (170). Para el diagnóstico de fibrosis, junto con la ultrasonografía, se usa también la RMN en contraste de fase (en inglés

2. INTRODUCCIÓN

Magnetic Resonance Elastography o MRE). La RMN dinámica mejorada con contraste (DCE-MRI, *Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging*), por su parte, permite conocer el estado de vascularización de los tumores primarios o metastásicos y evaluar así la eficacia del tratamiento antiangiogénico empleado.

- **Colangiografía.** Existen diferentes aproximaciones de esta técnica. La colangiografía transhepática percutánea (CTHP) es un método mínimamente invasivo para el estudio y tratamiento de obstrucciones de los conductos biliares. La colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE) se emplea para realizar el diagnóstico de estenosis biliar, para biopsiar muestras de tejido o eliminar los cálculos biliares del árbol biliar extrahepático (77). También está la colangiografía intraoperativa (CIO) (172) utilizada para favorecer el manejo del paciente tanto durante intervenciones de colecistectomía por litiasis biliar como en el postoperatorio, ya que ofrece imágenes por rayos X del sistema biliar. Estas técnicas tienen algunas complicaciones asociadas como hemobilia, generación de bilomas o fugas biliares.

2.3.2. Sondas trazadoras de la función hepatobiliar

En muchas ocasiones, las pruebas de imagen se complementan con el uso de compuestos trazadores, empleados por sus características de hepatotropismo, por su metabolismo o por ser secretados de forma eficiente a la bilis (compuestos colefílicos). A continuación, se detallan las principales moléculas trazadoras empleadas en el diagnóstico de la función hepática:

- **Test del verde de indocianina.** El verde de indocianina (ICG) (Figura I-10A) es un pigmento capaz de emitir luz con una longitud de onda en el infrarrojo cercano (NIR, *Near InfraRed*) que contiene una tricarbocianina. Tras su administración intravenosa se une a las proteínas plasmáticas y es secretado a bilis a través de transportadores como los OATPs y MDR1. Cuando esta molécula es excitada en el NIR emite fluorescencia que puede ser detectada de manera extracorpórea. Esto hace que tenga numerosas aplicaciones como la evaluación de la función hepática antes de la resección quirúrgica, lo que reduce los riesgos durante la cirugía y el postoperatorio (148); o la identificación de tumores hepáticos metastásicos. Además de ser utilizado para el diagnóstico en pruebas de función hepática,

también se emplea en angiografías para determinar el volumen sanguíneo y el gasto cardíaco (134).

- **Marcadores basados en el radioisótopo ^{99m}Tc .** Se han sintetizado numerosos compuestos derivados del ^{99m}Tc (Figura I-9B) con el objetivo de cuantificar la función hepática: ^{99m}Tc -IDA, ^{99m}Tc -mebrofenina, ^{99m}Tc -GSA (^{99m}Tc marcado con galactosil albúmina) (Figura I-10C) y ^{99m}Tc -MHSA del inglés *Mebrofenine Human Serum Albumin*. Como se ha indicado anteriormente, entre estos, destaca el uso de ^{99m}Tc -IDA como trazador en la SPECT para el diagnóstico de patologías como la cirrosis biliar primaria o la hepatitis aguda (70, 174).
- **Agentes de contraste derivados de gadolinio.** El gadolinio se usa como agente de contraste en RMN (2). Sin embargo, debido a que es un antagonista del calcio, se administra quelatado con diversas estructuras para prevenir su toxicidad, dando lugar a moléculas derivadas del ácido gadoxético (Figura I-10D), como el gadoxetato disódico (Gd-EOB-DTPA, en inglés *Gadolinium EthOxyBenzyl-DiethyleneTriaminePentaAcetic acid*.) empleado para el diagnóstico de lesiones hepáticas y HCC o el gadobenato de dimeglumina, llamado Gd-BOPTA por su nombre sinónimo en inglés *Gadolinium BenzylOxyPropionicTetraAcetate*, empleado para la evaluación de la hepatitis y la fibrosis hepática (Liu et al., 2021).
- **Sondas radiactivas derivadas de azúcares para el estudio del metabolismo.** Destacan las moléculas trazadoras como [^{18}F]-Fluorodesoxiglucosa (18F-FDG del inglés *2-[^{18}F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose*, [^{18}F]-Fluorodesoxigalactosa (18F-FDGal o *2-[^{18}F]-fluoro-2-deoxy-D-galactose*) (Figura I-9E) que se utilizan en test basados en el metabolismo. La técnica PET se usa en combinación con 18F-FDG (48) para el diagnóstico de metástasis hepáticas, estadiaje de los tumores y seguimiento de la respuesta al tratamiento 18F-FDGal permite cuantificar el metabolismo hepático, lo que resulta interesante en el diagnóstico de carcinogénesis antes de que puedan observarse alteraciones morfológicas detectadas por pruebas como la resonancia magnética.
- **ABs marcados con isótopos radiactivos.** Debido al marcado hepatotropismo y la estructura química de los ABs es posible sintetizar derivados de estos con potencial para su uso en clínica. Entre ellos, el uso de 11C-colilsarcosina (11C-CSar o *[N-methyl-11C]cholylsarcosine* en inglés) (Figura I-10F) permite

2. INTRODUCCIÓN

determinar la función hepatobiliar basándose en el aclaramiento hepático de este compuesto, que se observa ralentizado en pacientes colestáticos (126).

- **Derivados de ABs con fluorescencia.** La obtención de derivados de ABs por unión de una molécula fluorescente a su cadena lateral ha resultado interesante para investigar el papel de los transportadores de ABs en células hepáticas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Algunas moléculas como la colilglicilamidofluoresceína (CGamF) (Figura I-10G) y otras análogas (CDCGamF y UDCGamF), se han empleado para estudiar el transporte intracelular de ABs conjugados. Además, se ha sintetizado colillisilfluoresceína (CLF, *cholyl-L-lysyl-fluorescein*) (Figura I-9G) para el estudio *in vivo* de la función hepática y los mecanismos de producción de la bilis (171). También se han utilizado otros derivados conjugados con 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (Figura I-10G) o con el fluorocromo *Pacific Blue* para estudios por citometría de flujo tanto de la captación como de la dinámica de ABs (138).

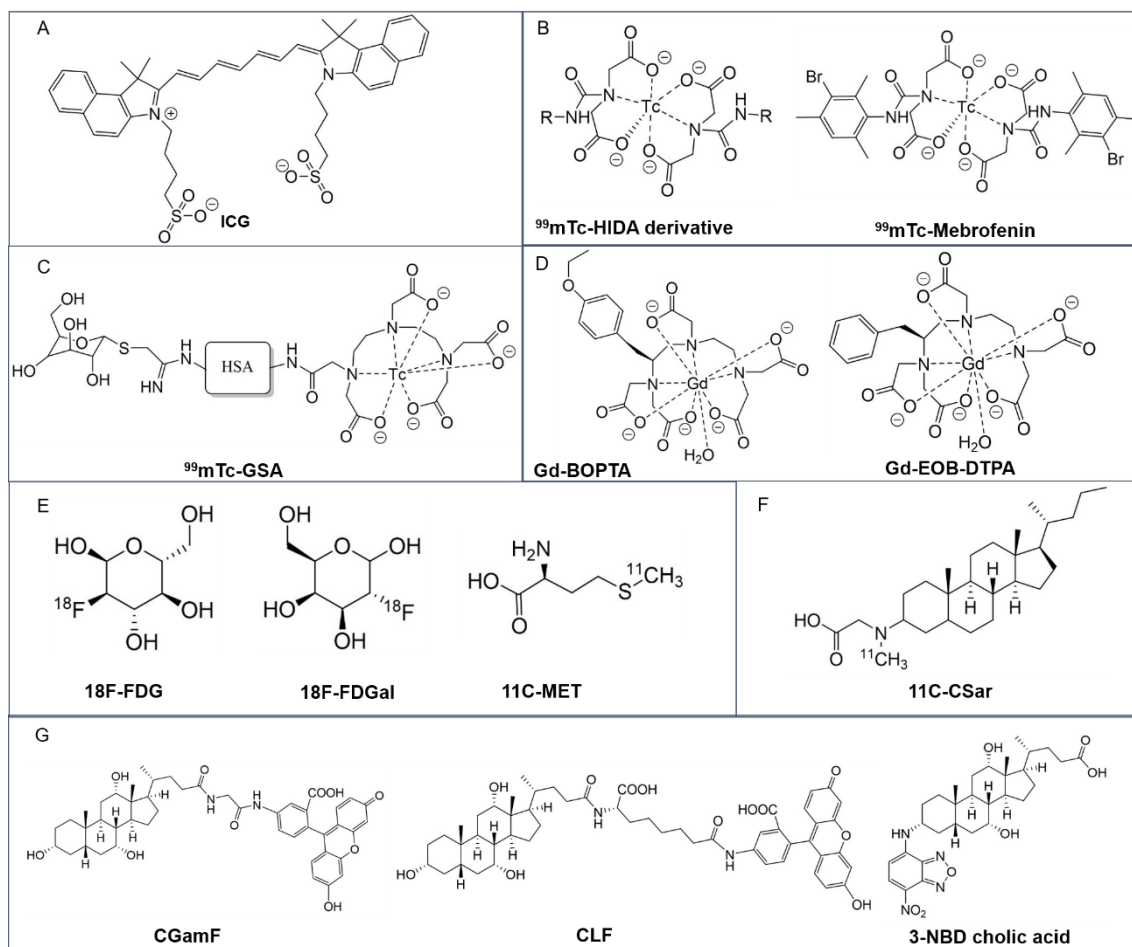


Figura I-10. Estructura química de sondas y marcadores fluorescentes empleados en estudios de la función hepatobiliar. ¹¹C-CSar: ¹¹C-colilsarcosina, ¹¹C-MET: ¹¹C-metionina, ¹⁸F-FDG: [¹⁸F]Fluorodesoxiglucosa, ¹⁸F-FDGal: [¹⁸F]Fluorodesoxigalactosa, IDA: *ácido iminodiacético*, ^{99m}Tc: Tecnecio ^{99m}, CGamF: Colilglicilamidofluoresceína, CLF: Colililsilfluoresceína, Gd-BOPTA: Gadobenato de dimeglumina, Gd-EOB-DTPA: Gadoxetato disódico, GSA: Galactosil albúmina, ICG: verde de indocianina, NBD: Nitrobenzoxadiazol (144).

2.4. CÁNCER HEPÁTICO

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer de hígado es el sexto tipo de cáncer más frecuente a nivel mundial y ocupa el tercer puesto en cuanto a número de muertes por esta enfermedad (Figura I-11) (163).

Los tumores hepáticos se han clasificado en cuanto a su origen en primarios y secundarios. Dentro de los primarios, es decir, aquellos que derivan de células hepáticas, se engloban: el HCC, derivado de los hepatocitos y que representa entre el 85-90 % de los casos; el colangiocarcinoma (CCA), que tiene su origen en las células colangiolares (en torno a un 15 % de los casos) (5); y otros menos frecuentes como el hepatocolangiocarcinoma mixto (HCC-CCA) (Choi & Ro, 2022), o el hepatoblastoma (HB) (Sharma et al., 2017), un tumor pediátrico con origen en los hepatoblastos. Los tumores secundarios son aquellos que se desarrollan como resultado de la metástasis de tumores con origen en otros órganos.

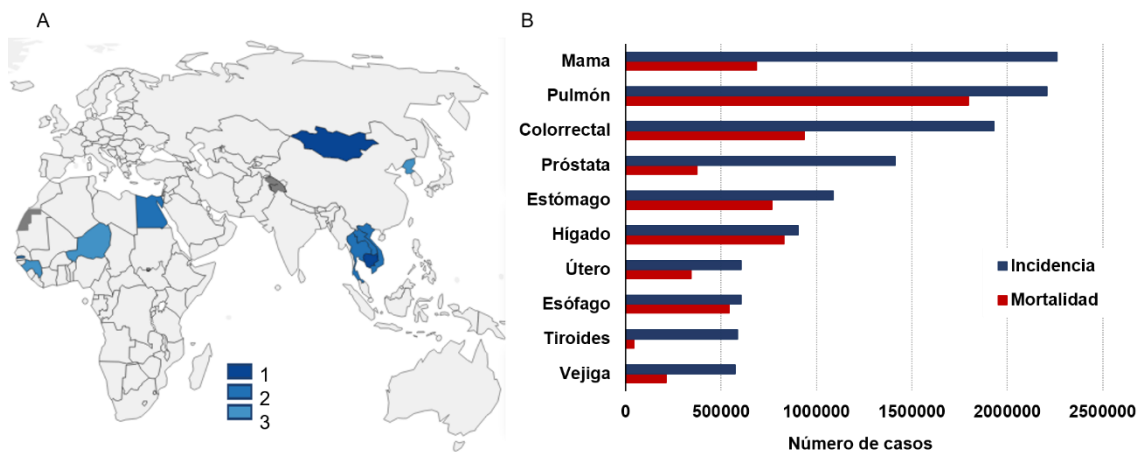


Figura I-11. (A) Distribución geográfica del cáncer hepático según la tasa de mortalidad estimada por edad (TME) en el año 2020 en países donde este tipo de cáncer se encuentra entre los tres más frecuentes, según los datos de *Global Cancer Observatory*. (B) Incidencia (en color azul) y mortalidad (en color rojo) de los tipos de cáncer más frecuentes en el año 2020 expresadas como número total de casos, incluyendo todas las edades y ambos sexos; se puede observar que el cáncer hepático ocupa la sexta y tercera posición, respectivamente, según los datos de *Global Cancer Observatory* (<https://gco.iarc.fr/>).

2.4.1. Carcinoma hepatocelular: epidemiología, factores de riesgo, diagnóstico y tratamiento

Epidemiología

El HCC es el cáncer hepático primario más frecuente en adultos (163), seguido por el CCA. Su incidencia presenta variabilidad geográfica siendo más frecuente en regiones asiáticas y africanas (Llovet et al., 2016; Liu & Liu, 2022) aunque en los últimos años ha aumentado en muchos países occidentales (Singal et al., 2020) (Figura I-11). Se observan también diferentes tasas de incidencia atendiendo a características demográficas de la población (edad, sexo o etnia) (173), y prácticamente se igualan con las tasas de mortalidad, debido al mal pronóstico de HCC.

Factores de riesgo

El HCC, se desarrolla generalmente como consecuencia de una enfermedad crónica subyacente, aunque no siempre sucede así. Entre los factores de riesgo más importantes que contribuyen al desarrollo de la enfermedad se encuentran: la infección por los virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC), el consumo excesivo de alcohol, la contaminación por aflatoxinas (aflatoxina B1), el tabaquismo; y otros factores englobados dentro del síndrome metabólico, como la obesidad, la diabetes tipo II y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH, siglas del término en inglés *NonAlcoholic SteatoHepatitis*) (El-Serag & Rudolph, 2007; Llovet et al., 2021; McGlynn et al., 2021). Algunos trastornos hereditarios como la hemocromatosis (HFE), la tirosinemia causada por la actividad defectuosa de la enzima fumarilacetoacetato hidrolasa (FAH) (129), la deficiencia en alfa-1-antitripsina (AAT, del inglés *Alpha-1 antitrypsin deficiency*) provocada por mutaciones en el gen *SERPINA1* (74), la enfermedad de Wilson que es un trastorno del metabolismo del cobre causado por mutaciones del gen *ATP7B* (24) o algunas porfirias que cursan con mutaciones en genes relacionados con el metabolismo del grupo hemo (*HMBS* o *UROD*) (Chen et al., 2016; Singal, 2019) son otro factor importante que se ha observado que está relacionado con el desarrollo de la enfermedad hepática progresiva y que aumenta la susceptibilidad al HCC (114). Se ha descrito que mutaciones en genes como *TP53* y *CTNGB1* están relacionados con la carcinogénesis hepática al alterar el control del ciclo celular o activar distintas cascadas de señalización celular, como la ruta Wnt/ β -catenina (De La Coste et al., 1998; Llovet et al., 2021). En el inicio del proceso tumoral parece jugar un papel importante el aumento de la expresión de la telomerasa transcriptasa inversa (*TERT*), una de las alteraciones más frecuentes observadas en HCC (Lee et al., 2016; Amisaki et al., 2019). La patogenia del HCC es, por tanto, un proceso complejo, ya que supone la interrelación de multitud de factores como la predisposición genética,

2. INTRODUCCIÓN

factores de riesgo víricos y sin origen viral, el microambiente celular y, en gran medida, la gravedad de la enfermedad hepática crónica subyacente.

Diagnóstico

La alta mortalidad del HCC está asociada, en gran parte, a que cursa de manera asintomática hasta que no aparecen las manifestaciones clínicas (dolor abdominal, hepatomegalia o ictericia) en las etapas más avanzadas de la enfermedad. Es por ello por lo que las guías de práctica clínica establecen programas de vigilancia de los pacientes de alto riesgo, con el fin de conseguir un diagnóstico precoz, un correcto seguimiento y un aumento de la supervivencia (178). En cuanto al diagnóstico de HCC, generalmente, se emplean distintos métodos no invasivos (110). Se utilizan técnicas de imagen como la ecografía abdominal, la TC o la DCE-MRI, y la determinación de los niveles séricos de alfa-fetoproteína y otros marcadores tumorales (AFP-L3, glipican-3 o factor de crecimiento hepatocitario) (42). Aunque la especificidad y sensibilidad de las pruebas radiológicas es elevada (Llovet et al., 2021), se recomienda la biopsia del tumor para una mejor caracterización molecular (38), que permita la elección de la mejor terapia disponible.

Tratamiento

Para establecer el tratamiento más adecuado se realiza la estratificación de los pacientes en función de su pronóstico y opciones terapéuticas, siguiendo la clasificación *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC) (133). La BCLC agrupa a los pacientes teniendo en cuenta tanto el estadio tumoral y la sintomatología clínica (medida por la escala *Eastern Cooperative Oncology Group*, ECOG), como la disfunción hepática asociada, que se evalúa mediante la escala Child-Pugh, anteriormente mencionada (Tabla I-1). Siguiendo las estrategias indicadas en este sistema, los tumores en estadios precoces son susceptibles de terapias curativas (resección, trasplante hepático o ablación local) que proporcionan una supervivencia a 5 años mayor al 70 %, mientras que, en etapas intermedias y avanzadas, sólo la quimioembolización y la terapia sistémica han conseguido aumentar de 1 a 1,5 años la supervivencia de los pacientes (Llovet et al., 2021).

Estrategias terapéuticas de primera línea

Actualmente, las únicas opciones terapéuticas que han mostrado beneficios en la supervivencia de los pacientes con HCC avanzado son la inmunoterapia y la terapia dirigida basada en el uso de inhibidores de tirosina quinasas (TKIs, del inglés *Tyrosine Kinase Inhibitors*) (Figura I-11). Antes de la aprobación del sorafenib en 2007 por la FDA (del inglés, *Food and Drug Administration*) se empleaba la doxorubicina (73) para el tratamiento de HCC avanzado. Sin embargo, al igual que sucede con otros quimioterápicos convencionales, como el cisplatino, el oxaliplatino o el 5-fluorouracilo, la ausencia de eficacia y sus efectos tóxicos hacen que no estén aprobados para este fin.

El uso de sorafenib como terapia de primera línea, se estableció conforme a los resultados obtenidos en ensayos clínicos en fase III, como el SHARP (Llovet et al., 2008), en el que se demostró que el sorafenib aumentaba la supervivencia de los pacientes con HCC avanzado cuando se comparaba con el grupo placebo. Otros estudios (Bruix et al., 2017) evidenciaron, además, que era más eficaz en tumores no metastásicos y en aquellos asociados al VHC. El mecanismo de acción del sorafenib se basa en su actividad de inhibición multiquinasa mediante la interacción con distintos receptores como los del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFRs) y el del factor de crecimiento derivado de plaquetas β (PDGFR- β), entre otros, inhibiendo así la angiogénesis y la progresión del tumor. Durante la última década, se han llevado a cabo diversos estudios para la búsqueda de nuevos tratamientos de primera línea. No obstante, en ninguno de estos ensayos clínicos se encontró un fármaco o combinación de estos que mostrara mejoras significativas con respecto a supervivencia de los pacientes frente al sorafenib.

En el año 2018 se aprobó el uso de otro TKI, el lenvatinib, en base a los resultados del ensayo clínico de fase III REFLECT (84), en el que se comparaba su eficacia con la del sorafenib. Los datos observados establecieron que la supervivencia global (13,6 vs 12,3 meses, para el lenvatinib y el sorafenib, respectivamente) y la tolerabilidad eran similares en ambos casos, pero el lenvatinib mejoraba la supervivencia libre de progresión. Este TKI actúa sobre receptores VEGF1-3, receptores de los factores de crecimiento de fibroblastos FGFR1-4 (del inglés, *Fibroblast Growth Factor Receptor*), del factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGFR- α (*Platelet-derived growth factor receptor*), RET (*REarranged during Transfection*) y KIT, y presenta una actividad más potente sobre los primeros que el sorafenib, lo que conlleva un perfil de efectos adversos diferentes entre los dos fármacos. En el caso del sorafenib, predomina la reacción cutánea

2. INTRODUCCIÓN

mano-pie y el lenvatinib se caracteriza por un mayor grado de proteinuria e hipertensión; en ambos, esta toxicidad provoca la retirada del tratamiento en el ~15 % de los casos (84).

Actualmente, el desarrollo de la inmunoterapia ha supuesto un avance en el abordaje terapéutico del HCC avanzado (Llovet et al., 2022). El estudio IMbrave150 (33) comparó la eficacia del sorafenib frente a la combinación de los anticuerpos atezolizumab (anticuerpo anti-PDL1) y bevacizumab (anticuerpo anti-VEGF) y demostró una mejora tanto en la supervivencia global (13,4 vs 19,2 meses) como en la supervivencia libre de progresión (4,3 vs 6,8 meses) con el tratamiento combinado. Además, su perfil de tolerabilidad era mejor, con efectos adversos más leves. A pesar de que presentan algunas contraindicaciones, debido a estos hallazgos favorables, la combinación de atezolizumab más bevacizumab se ha convertido en el tratamiento de elección frente al HCC avanzado (Llovet et al., 2021).

Estrategias terapéuticas de segunda línea

Cuando el tratamiento de primera línea fracasa, es necesario recurrir al uso de otros fármacos de segunda línea. Hoy en día, las guías de práctica clínica recomiendan, en base a los resultados positivos obtenidos en ensayos de fase III, el uso de regorafenib, cabozantinib y ramucirumab tras la progresión tumoral después del tratamiento con sorafenib (Figura I-12).

El regorafenib es un TKI que actúa sobre los receptores VEGFR1–3, principalmente, y fue el primer fármaco de segunda línea aprobado. De acuerdo con el ensayo clínico RESORCE (Bruix et al., 2016), el regorafenib mostró una mayor supervivencia global (10,6 vs 7,8 meses) en comparación con el grupo placebo, en pacientes que habían sido tratados previamente con sorafenib. En el ensayo en fase III CELESTIAL (1) se demostró que el cabozantinib, que ejerce su actividad inhibidora multiquinasa sobre los receptores VEGFR2, AXL and MET, mejoraba tanto la supervivencia global como libre de progresión si se comparaba con el placebo, igual que sucedía con el regorafenib. En cuanto al ramucirumab (anticuerpo anti-VEGFR2), es la única terapia guiada por biomarcador y según el ensayo REACH-2 (Zhu et al., 2019) también mostró una mejora de la supervivencia global en pacientes con altos niveles de alfa-fetoproteína.

Debido a los ensayos prometedores en ensayos en fases I y II, además de las terapias ya mencionadas, la FDA ha aprobado otros tres tratamientos de segunda línea con nivolumab y pembrolizumab (anticuerpos monoclonales inhibidores de PD1), y la

combinación nivolumab más ipilimumab (anticuerpo frente a CTLA-4), como resultado de ensayos prometedores en fases I y II. Estas nuevas estrategias de inmunoterapia tienen como objetivo incrementar la capacidad de respuesta de las células tumorales a los inhibidores de los puntos de control inmunitario o ICIs. Estos ICIs (del inglés *Immune Checkpoint Inhibitors*) han mostrado una actividad prometedora en combinación con agentes antiangiogénicos. Además, la eficacia de algunas combinaciones como lenvatinib/pembrolizumab observadas en fases I-II, ha impulsado el desarrollo de estudios en fase III para comparar el uso de esta terapia combinada frente al lenvatinib en solitario. Asimismo, otros ensayos en fase III están en marcha para evaluar la eficacia de otros TKIs, como el cabozantinib, frente a la combinación de éste con atezolizumab.

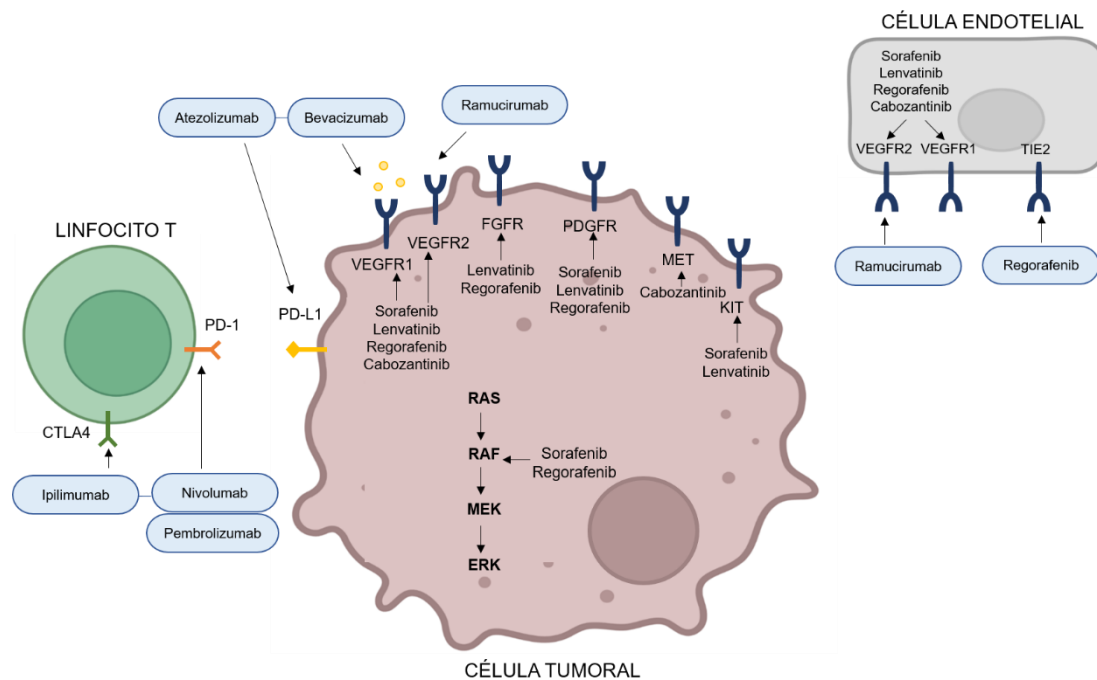


Figura I-12. Mecanismo de acción de las terapias sistémicas usadas en el tratamiento del HCC avanzado (Modificada de (Llovet et al., 2021).

2.4.2. Mecanismos moleculares de resistencia al tratamiento farmacológico

Uno de los principales problemas que presenta el HCC avanzado es la alta refractariedad al tratamiento, ya sea por falta de respuesta de los pacientes antes de la exposición a los fármacos (resistencia intrínseca), o bien por las recidivas que se producen a lo largo del tratamiento (resistencia secundaria o adquirida).

2. INTRODUCCIÓN

Los mecanismos moleculares implicados en la falta de respuesta del HCC son complejos, interrelacionados entre sí y no se conocen con claridad. Para profundizar en su estudio, se ha hecho una clasificación de estos MOCs (del inglés *Mechanisms Of Chemoresistance*) (Figura I-13) en los 7 grupos que se detallan a continuación (Marin et al., 2018; Marin et al., 2020):

- **MOC-1.** Hace referencia a aquellos mecanismos que provocan una disminución de la concentración intracelular del fármaco, debido a una reducción en su captación (MOC-1a) o a una mayor expulsión por las bombas de eflujo. (MOC-1b). Este MOC se abordará con más detalle en el siguiente apartado.
- **MOC-2.** Incluye mecanismos relacionados con la alteración del metabolismo del fármaco que hacen que se reduzca su forma activa en el interior celular. Se ha descrito que los altos niveles de expresión de la enzima dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD), que participa en el metabolismo del 5-fluorouracilo, están relacionados con un peor pronóstico de los pacientes de HCC tratados con este fármaco. Además, la presencia de mutaciones en enzimas de la familia CYP y UGT que conllevan una menor expresión de éstas es responsable de la toxicidad a los tratamientos con sorafenib y regorafenib al alterar sus perfiles de farmacocinética.
- **MOC-3.** Engloba a los cambios de las dianas de los fármacos antitumorales. Generalmente, este MOC se debe a la reactivación de rutas de señalización sobre las que ejerce su inhibición el agente antitumoral. Un ejemplo de esto son los receptores VEGFR-2 y ERK fosforilado (p-ERK) cuyos altos niveles de expresión podrían emplearse como marcadores de un peor pronóstico en pacientes con HCC avanzado tratados con sorafenib.
- **MOC-4.** Incluye los distintos mecanismos de reparación de los daños en el ADN que provocan algunos fármacos.
- **MOC-5.** A este grupo pertenecen los mecanismos responsables de la inactivación de la apoptosis (MOC-5a) o de la activación de vías de supervivencia (MOC-5b), alterando el equilibrio apoptosis/supervivencia y favoreciendo la proliferación de las células tumorales.
- **MOC-6.** Son cambios que se producen en el microambiente tumoral y pueden disminuir la actividad de los fármacos antitumorales.

- **MOC-7.** Incluye mecanismos relacionados con la transición epitelio-mesenquimal, de manera que las células epiteliales adquieren un fenotipo de célula madre que contribuye a la progresión tumoral, metástasis y refractariedad al tratamiento.

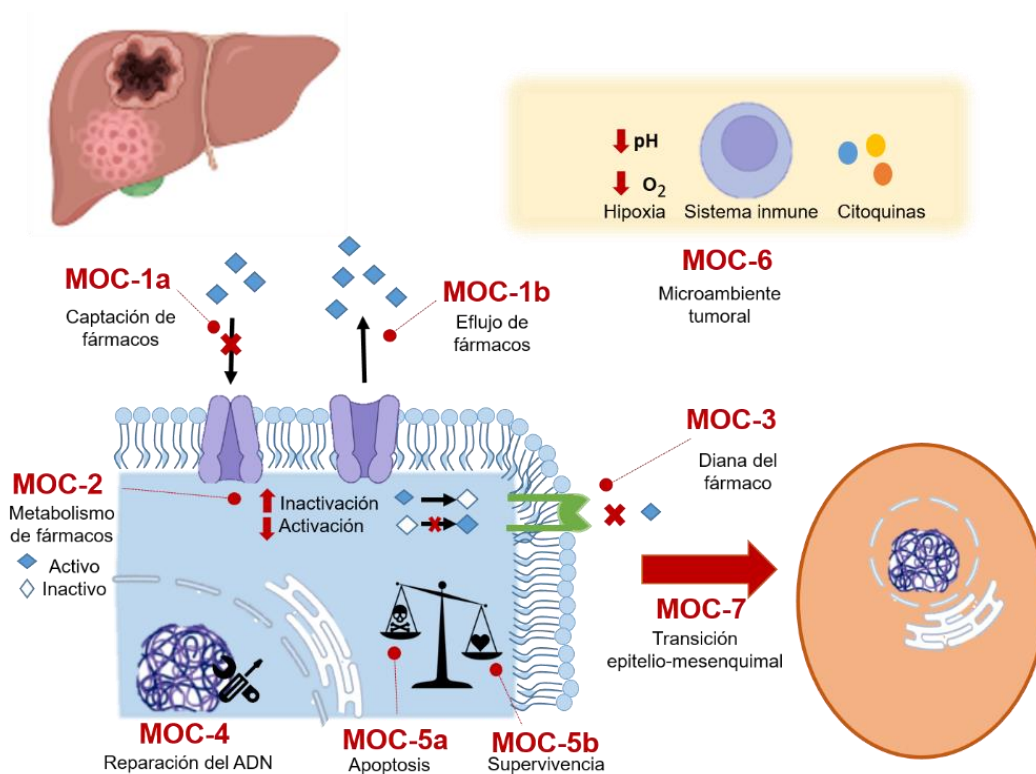


Figura I-13. Mecanismos de quimiorresistencia en cáncer hepático Modificado de (Marin et al., 2020).

Mecanismos de quimiorresistencia que afectan al transportoma: MOC-1

El MOC-1, como se ha comentado anteriormente, engloba a los mecanismos que provocan cambios en el transportoma de la célula, es decir, en el conjunto de proteínas de transporte que se expresan en esta y que determinan la concentración intracelular de compuestos endógenos y exógenos, incluidos los fármacos antitumorales.

Para que los TKIs puedan entrar en la célula, debido a su carácter poco lipofílico y su elevado peso molecular, requieren la presencia de proteínas específicas en la membrana plasmática de la célula tumoral.

La acción farmacológica de los TKIs depende de sus niveles en el interior celular por lo que cambios en la expresión o función de los transportadores pueden estar

2. INTRODUCCIÓN

estrechamente relacionados con la refractariedad de los tumores a la terapia y con una menor supervivencia de los pacientes (Huang & Sadée, 2006).

Las proteínas transportadoras son las responsables de la captación de los fármacos (MOC-1a) y pertenecen a la superfamilia *SLC*.

Entre ellas, la proteína OCT1 (gen *SLC22A1*) disminuye su expresión en HCC y presenta mutaciones y variantes de splicing que alteran su función (50). Se ha demostrado que está implicada en la captación de sorafenib (94), pero no de regorafenib (3). También se ha relacionado su pérdida de expresión en la membrana con una menor supervivencia global de los pacientes (Geier et al., 2017).

Las proteínas OATP1B1 y OATP1B3 participan en el transporte de cabozantinib (87) y, además, OATP1B1 puede mediar la captación de regorafenib (125) y, probablemente, de lenvatinib (Marin et al., 2020). Igual que sucede con OCT1, los niveles de expresión de OATP1B3 disminuyen en tejido tumoral respecto a tejido sano, por lo que estos cambios podrían contribuir a la falta de respuesta del HCC a los TKIs (Hu et al., 2019; Chen et al., 2020).

La proteína SLC46A3 (gen *SLC46A3*) se expresa en la membrana lisosomal de varios tejidos principalmente en intestino delgado e hígado y tiene como sustratos ABs y esteroides conjugados (estrón-3-sulfato) (167). Además, se ha demostrado que transporta con eficacia el fármaco maitansina empleado en combinación con trastuzumab en el tratamiento de inmunoterapia de algunos tumores (46). Parece estar implicada en la resistencia al regorafenib y la disminución de su expresión parece estar relacionada con tumores más agresivos (Marin et al., 2020).

Por otro lado, la sobreexpresión de los transportadores de expulsión de fármacos (MOC-1b) pertenecientes en su mayoría a la superfamilia ABC es otra de las principales causas que contribuyen a la quimiorresistencia del HCC.

La proteína BCRP desempeña un papel importante en el eflujo de sorafenib. Se ha descrito una mayor expresión de BCRP en HCC que en tejido adyacente tumoral, y este incremento se ha relacionado con una menor supervivencia de los pacientes, por lo que se ha propuesto como marcador para predecir la respuesta al tratamiento con sorafenib (Huang et al., 2013).

La proteína MDR1 transporta algunos TKIs como el regorafenib y el sorafenib. También se ha sugerido su participación en el eflujo de lenvatinib, ya que la coadministración del inhibidor de la bomba elacridar junto con lenvatinib es capaz de inhibir la proliferación de líneas celulares de HCC resistentes al fármaco y activar vías de apoptosis (162). Otro sustrato es la doxorubicina, que incrementa su concentración intracelular e induce apoptosis en líneas de HCC cuando se inhiben tanto MDR1 como BCRP (183).

Las proteínas MRPs, y especialmente MRP2, contribuyen en gran medida a la falta de respuesta de las células tumorales a la terapia farmacológica. MRP2 participa en el transporte de sorafenib, regorafenib, cabozantinib y lenvatinib. Además, está relacionado con la resistencia a los derivados del platino, ya que transporta cisplatino y sus niveles de expresión determinan la eficacia del tratamiento con este fármaco en pacientes (78).

En los últimos años, se ha descrito que varios TKIs interactúan con las bombas ABC y pueden inhibir su actividad y expresión, lo que podría resultar en un aumento de la sensibilidad a otros fármacos. Este hecho pondría de manifiesto el potencial de los TKIs como agentes quimiosensibilizantes, abriendo camino a nuevas estrategias clínicas de tratamiento (7).

2.4.3 Vectorización de ABs como estrategia de superación de la quimiorresistencia

2.4.3.1. Consideraciones generales

Las funciones biológicas de los ABs están relacionadas con su naturaleza antipática. Además, la presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3,7 y 12 en el esqueleto esteroideo y un grupo carboxilato en la cadena lateral les otorga diferentes propiedades físicoquímicas que permiten su funcionalización en dichas posiciones para desarrollar distintos fármacos. Este hecho hace que los ABs sean buenos candidatos para la obtención de nuevos derivados, mejorando la estabilidad metabólica, la biodisponibilidad y la absorción de la molécula de partida. Su marcado hepatotropismo y su función en la regulación de receptores transmembrana les confiere ventajas como lanzaderas de fármacos para poder dirigirlos hacia los tejidos diana de interés (Kramer & Wess, 1996). Es por ello por lo que los ABs se han empleado para la síntesis de compuestos vectorizados con potencial interés clínico para el tratamiento de la inflamación y el cáncer (Blanchet & Brunel, 2018; Navacchia et al., 2021; Melloni et al., 2022).

2. INTRODUCCIÓN

2.4.3.2. Estrategias de vectorización clásica

Los ABs se han empleado como caballos de Troya para la administración de fármacos debido a sus propiedades fisicoquímicas. Su capacidad como agentes solubilizantes y modificadores de la permeabilidad puede mejorar la biodisponibilidad de fármacos poco solubles o con una permeabilidad de membrana baja. Otra ventaja que presentan los ABs es que pueden mediar la absorción de fármacos complejos por transportadores específicos de membrana. Para realizar la funcionalización de los ABs, se suele recurrir a la reactividad de los grupos hidroxilo y carboxilo presentes en su estructura para generar diversos compuestos al unirlos mediante diferentes funciones como pueden ser éster, amida o amina. En bibliografía podemos encontrar una gran cantidad de estos compuestos mediante la conjugación de los ABs con moléculas con acción farmacológica modificando así sus propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas para conseguir una mayor eficacia de la terapia (128).

Se ha demostrado que conjugados de ABs con fármacos de distinta estructura y aplicaciones clínicas presentan selectividad hacia el circuito enterohepático debido a las interacciones ligando-receptor con los transportadores hepáticos, principalmente ASBT. Entre estas moléculas usadas para formar derivados con ABs podemos encontrar: inhibidores de la HMG-CoA reductasa (Figura I-14A), antifibróticos, citostáticos como el clorambucilo o el 5-fluorouracilo, mifepristona o péptidos (Kramer, 2011).

Dentro de este enfoque de diseño de derivados de ABs como estrategia para la superación de la resistencia tumoral a los fármacos, encontramos los compuestos BAMET. Estos son el resultado de la unión de un AB y un metal de transición, de forma que se consigue un efecto citostático sumado a las propiedades organotrópicas del AB (23). Entre estos compuestos está el BAMET-R2 (Marin et al., 1998), unión de cisplatino con GCA; el BAMET-D3, formado por el GCA unido a una poliamida y el BAMET-UD2 (Figura I-14B), combinación de cisplatino con dos moléculas de UDCA. Se ha demostrado en ensayos *in vitro* e *in vivo* que mantienen las propiedades organotrópicas y citostáticas de las moléculas de partida, y además la eficacia del BAMET-UD2 era similar a la del cisplatino, pero con menos toxicidad (Monte et al., 2005; Larena et al., 2001). Actualmente, se siguen investigando las diferentes propiedades de derivados de ABs unidos a cisplatino (150).

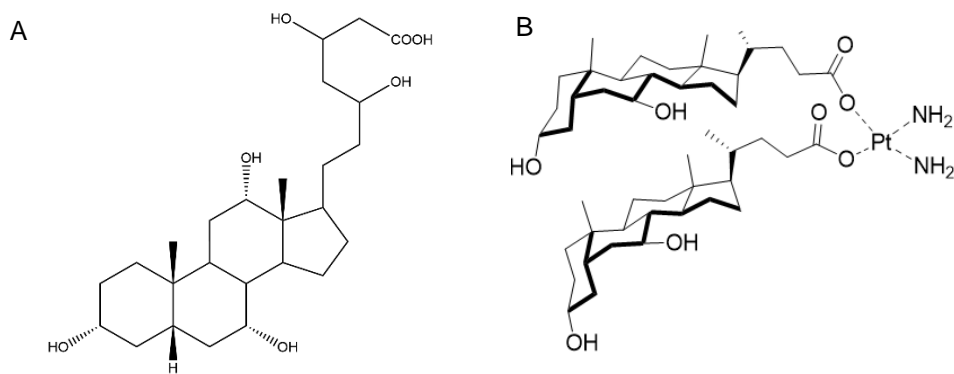
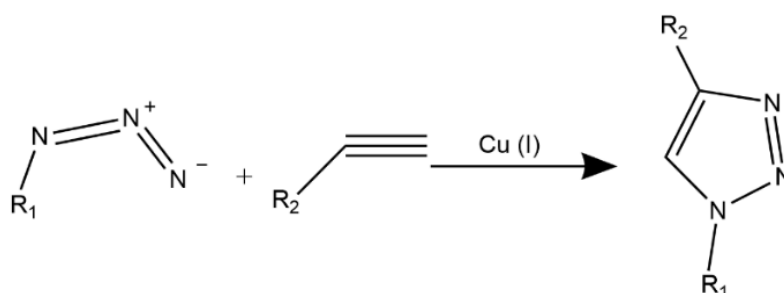


Figura I-14. Estructuras químicas de dos ejemplos de derivados de ácidos biliares. (A) Inhibidor de HMG-CoA reductasa. (B) BAMET-UD-2, derivado de ácido biliar con platino.

2.4.3.3. Química click en la síntesis de derivados de ácidos biliares

Una de las estrategias empleadas en la síntesis de derivados de ABs son las reacciones *click*. Este término de química *click* fue acuñado por Barry Sharpless en el año 2001 para describir reacciones químicas que son versátiles, modulares, rápidas, eficientes, con altos rendimientos y muy selectivas, que planteaban nuevas estrategias para simplificar la síntesis de compuestos y, entre ellos, nuevos fármacos. Dentro de este grupo heterogéneo de reacciones podemos encontrar: reacciones de cicloadición 1,3-dipolares, de sustitución nucleofílica, de adición a dobles o triples enlaces C-C, entre otras (49). Uno de los ejemplos más conocidos es la cicloadición 1,3-dipolar azida-alquino catalizada con cobre(I), que produce un anillo de 1,2,3-triazol de cinco miembros 1,4-disustituido muy estable y resistente a la hidrólisis (Figura I-15) (139, 181).

Gracias a la versatilidad de los ABs y las reacciones *click*, se han sintetizado numerosos compuestos derivados de estos unidos a moléculas de distinta naturaleza como aminoácidos, péptidos, antivirales y antitumorales (104) para mejorar su biodisponibilidad (25).



2. INTRODUCCIÓN

Figura I-15. Ejemplo de reacción *click*. Cicloadición 1,3-dipolar entre una azida y un alquino catalizada por Cu (I), en la que se forma una molécula triazólica.

También se han sintetizado conjugados de ABs con β -lactámicos (Figura I-16) para el desarrollo de fármacos usando reacciones de cicloadición 1,3-dipolar, obteniendo buenos resultados ya que la mayoría de dichos compuestos presentaron una actividad antifúngica significativa y una acción antibacteriana moderada frente a las diferentes cepas estudiadas.

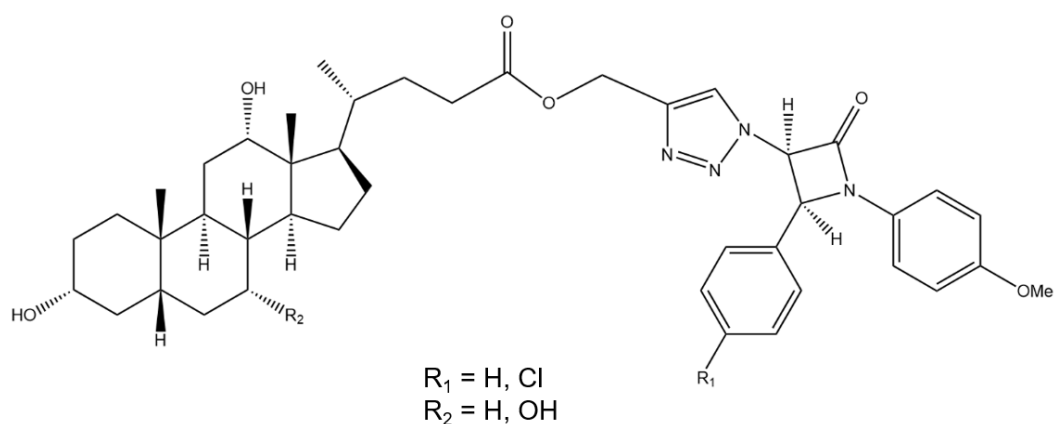


Figura I-16. Ejemplo de un derivado de AB con un β -lactámico por unión a través de un anillo triazólico mediante enlace éster (185).

La elección de un triazol como puente entre dos moléculas como pueden ser un AB y una farmacológicamente activa no es trivial, ya que la estructura de triazol ha demostrado poseer unas propiedades muy similares a las de un enlace amida gracias a su elevado momento dipolar, considerándose como un bioisómero de este. Además de sus propiedades estructurales, el triazol posee la capacidad de formar enlaces de hidrógeno e interacciones dipolo-dipolo que hacen que tengan una gran importancia en el campo de las ciencias farmacéuticas.

2.4.3.4. Encapsulación de ácidos biliares en nanopartículas

Otra de las estrategias empleadas para superar la refractariedad tumoral consiste en la encapsulación de los fármacos en nanopartículas de forma que estos lleguen a sus tejidos diana y se acumulen en los tumores. Se han llevado a cabo numerosas investigaciones para sintetizar liposomas conjugados con ABs para el transporte de bortezomib hacia células colorrectales (159) o cisplatino para hacerlo capaz de atravesar

de manera eficiente la barrera hematoencefálica (83). En un estudio reciente realizado por Ye et al., desarrollaron nanoliposomas con un derivado de CA y clorhidrato de irinotecán, que permitía una mayor acumulación del fármaco en el hígado y que podría resultar beneficioso para potenciar la actividad del irinotecán en HCC (186). En los últimos años, se ha recurrido al desarrollo de macromoléculas en búsqueda de nuevas opciones farmacológicas entre las se encuentran los dendrímeros. Estos son polímeros con una estructura muy ramificada y grupos terminales que permiten su funcionalización con distintas moléculas y son capaces de incrementar la biodisponibilidad de fármacos hidrofóbicos. Se sintetizan mediante química *click*, por lo que es posible la obtención de derivados de ABs que presenten estas estructuras poliméricas unidas a través de anillos triazólicos, y que pueden emplearse como sistemas para la administración de fármacos y que han mostrado actividad antitumoral *in vitro*.

2. INTRODUCCIÓN

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Líneas celulares

En esta Tesis Doctoral se emplearon las siguientes líneas celulares:

- Alexander o PCL/PRF/5 (CRL 8024), de HCC humano proporcionadas por la *American Type Culture Collection* (ATCC, LGC Standards, Barcelona).
- HuH7, también derivada de HCC y obtenida del *Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank* (Tokio, Japón) (JCRB JCRB0403).
- CHO: la línea celular silvestre CHO K1, de ovario de hámster chino, y la sublínea establemente transfectada con OATP1B1 (CHO OATP1B1) fueron generosamente cedidas por el Dr. Bruno Stieger, del Hospital Universitario de Zúrich (Suiza). También se emplearon las sublíneas CHO OATP1B3 y CHO NTCP, obtenidas en trabajos previos de nuestro grupo de investigación.

3.1.2. Animales

Para los experimentos *in vivo* se utilizaron ratas Wistar, de entre 250 y 300 g de peso corporal, así como ratones cepa CD1, procedentes del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca (SEA). Los ratones *Mdr 2 KO* empleados en los experimentos de esta Tesis fueron proporcionados por la Dra. Malu Martínez-Chantar (CIC bioGUNE - Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias). También se emplearon ratones de la cepa C57BL/6 en el marco de una colaboración con el Dr. Jan G. Hengstler (Centro de Investigación Leibniz para el Entorno Laboral y los Factores Humanos, Dortmund, Alemania).

Los animales se mantuvieron en condiciones de temperatura (20-25 °C) y humedad controladas (40-70 %), con un ciclo de luz/oscuridad (12 h/12 h) constante, y recibieron agua y pienso granulado comercial *ad libitum*.

Los animales fueron tratados según las especificaciones establecidas por la legislación de la Unión Europea (Directiva 63/2010/UE) y la normativa española vigente para el uso y cuidado de animales empleados en experimentación (Real Decreto 53/2013). Los protocolos experimentales llevados a cabo fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca (CBE).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2. PRODUCTOS

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

- Abbot Laboratorios (Madrid): isoflurano (Forane[®]) y pentobarbital sódico (Nembutal N.R.).
- Air Liquide (Valladolid): dióxido de carbono y nitrógeno líquido.
- Applied Biosystems (Madrid): “*SYBR Green I PCR Master Mix*”.
- AppliChem-Panreac (Prosisa, Salamanca): ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetsulfónico (HEPES), β-mercaptoetanol, leche descremada liofilizada y glicina.
- BD Biosciences (VWR Internacional, Barcelona): fluido envolvente FACS-Flow para citometría de flujo.
- Biomers.net (Donau, Alemania): *primers*.
- Bio-Rad (Madrid): tampón Tris 0,5 M pH 6,8, tampón Tris 1,5 M pH 8,8, persulfato de amonio, acrilamida, membrana de nitrocelulosa, tetrametiletilendiamina (TEMED), rojo Ponceau, el marcador de pesos moleculares de proteínas “*Precision Plus Protein Dual ColorTM Standards*”, “*High range*”, “*Low range*” y “*Kaleidoscope*”), sustrato de Western blot “*Clarity Max ECL*”.
- GE Healthcare (Thermo Fisher Scientific, Madrid): “*illustraTM RNAspin Mini RNA Isolation Kit*” y reactivos de detección ECL (*Enhanced ChemoLuminescence*).
- Leo Laboratorios S.A. (Madrid): heparina.
- Merck (Sigma-Aldrich, Madrid): acetato sódico anhidro, etanol, formaldehído 37 %, isopropanol, cloruro sódico, etanol, tartrato disódico.
- Millipore (Thermo Fisher): filtros “*SteritopTM*” para la esterilización de medios de cultivo.
- Pronadisa (Condalab): agarosa de alta resolución MS-8.
- Sigma-Aldrich (Madrid): albúmina sérica bovina (BSA, fracción V), ampicilina, azul de Tripán, bicarbonato de sodio, 2-cloroetanol, dimetilsulfóxido (DMSO), dodecil sulfato sódico (SDS), bromuro de metiltiazolildifenil tetrazolio (MTT), verde de indocianina (ICG), medio de cultivo “*Dulbecco’s Modified Eagle’s*

Medium (DMEM)-high glucose”, faloidina, reactivo de Folin Ciocalteu, piruvato sódico, mezcla de inhibidores de proteasas, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), Tris (trishidroximetilaminometano) base (Trizma) o clorhidrato (Tris-HCl) y Triton X-100.

- Thermo Fisher Scientific (Madrid): aminoácidos no esenciales 100 x, mezcla de antibióticos (penicilina/estreptomicina) y antimicótico (anfotericina B), kit comercial para la transcripción reversa (RT) “*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*”, kit de RNA ribosómico 18S “*TaqMan™ Ribosomal RNA Control Reagents*”, suplemento de glutamina GlutaMAX™, suero bovino fetal (FBS), “*SYBR Green I PCR Master Mix*”, metanol, suplemento de glutamina GlutaMAX™, RNA later.
- VWR Internacional (Barcelona): ácido acético glacial, ácido clorhídrico, carbonato sódico, cloruro sódico, dihidrógenofosfato potásico, fosfato ácido potásico, fosfato disódico, carbonato de potasio, indicador universal de pH y Tween® 20.
- Whatman (Thermo Fisher, Madrid): papel de cromatografía Whatman para la transferencia en Western blot.

3.3. MEDIOS INSTRUMENTALES

Para la realización de las pesadas se han empleado balanzas electrónicas digitales *Precisa 125 A* y *Sartorius BL 150S* (Grupo Taper, Madrid). Para realizar las pesadas de los animales se empleó una balanza electrónica digital *Precisa modelo 600 C* (Grupo Taper).

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

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

El agua destilada y el agua ultrapura se obtuvieron mediante equipos de filtración de agua del sistema *MiliQ Integral 3* (Merck-Millipore).

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

3. MATERIALES Y MÉTODOS

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

Para la esterilización de materiales sólidos y líquidos y material empleado en cultivos celulares se utilizó un autoclave modelo *Tuttnaver 2340 M* (Grupo Taper).

Para llevar a cabo la RT se utilizó un termociclador *Eppendorf Mastercycle epgradient* (Thermo Fisher). Los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real en tubos de 0,2 ml se realizaron en un equipo *QuantStudio™ 3* (Applied Biosystems, Thermo Fisher).

Las determinaciones espectrofotométricas de la concentración de ARN, así como de ADN se realizaron en un *NanoDrop™ 1000* (Thermo Fisher).

Para las medidas espectrofotométricas de la concentración de proteínas se usó un espectrofotómetro *Hitachi U-2000* (Grupo Taper) y un lector de ELISA modelo *Multiskan SkyHigh* (Thermo Fisher) para la medida de la viabilidad celular. Para la cuantificación fluorimétrica se empleó un espectrofotómetro de fluorescencia *HITACHI F-4500* y cubetas de silicio con un 1 cm de paso óptico y un detector R3788 con un rango de medida comprendido entre 200 a 730 nm.

Para el manejo de los cultivos celulares en condiciones de esterilidad y seguridad se empleó una campana de flujo laminar modelo *Telstar Bio-IIA* (Telstar). Las células se mantuvieron a 37 °C en un incubador termostatzado con atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada modelo *Hepa Class 100* (Thermo Fisher) y se visualizaron mediante un microscopio *Leitz Fluovert FS* (Leitz). Se utilizaron placas multipocillo y *flasks* de 25 y 75 cm² (Corning, Thermo Fisher) para el cultivo de las líneas celulares. La esterilización de las soluciones y medios de cultivo se hizo mediante filtro *Sterivex* de 0,1 µm (Merck-Millipore). Para llevar a cabo el recuento de las células se utilizaron cámaras *Neubauer* y colorante azul de Tripán.

Los experimentos de citometría de flujo se realizaron en un citómetro *FACScalibur™* (BD Biosciences) y, para el análisis de datos, se usó el programa informático *CellQuest Pro™*.

Para la visualización de la fluorescencia de los geles, el revelado de las membranas de Western blot o la monitorización de los derivados fluorescentes de ácidos biliares se utilizó un equipo de análisis de imagen *Fujifilm LAS-4000* (TDI, Madrid), y el análisis de las imágenes se realizó con el programa informático *MultiGauge v3.0* (Fujifilm).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los vasos sanguíneos se canularon con catéteres *Braun* de tamaño 0,5 mm x 0,9 mm y de *FepTeflon* de 0,7 mm x 16 mm (B. Braun Surgical GMBH, Melsungen, Alemania). Para canular el conducto biliar se usaron cánulas de polietileno *PE-10* (Biotrol Pharma, París, Francia).

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

Se empleó también un sistema cromatográfico acoplado a un detector de masas, HPLC-MS/MS, de la casa Agilent Technologies (Santa Clara, EE.UU.). Este sistema se compone de un equipo de HPLC serie 1200 formado por: una bomba cuaternaria con desgasificador de vacío (modelo G12354A) que permite mezclas en baja presión de hasta cuatro solventes; un inyector de 20 Tl de capacidad (modelo G1328B); un detector ultravioleta/visible (modelo G1314B) de longitud de onda variable y programable y una columna de fase reversa Zorbax C18 de 30 mm x 2,1 mm y 3,5 Tm de tamaño de poro, termostatzada a 35 °C (Agilent Technologies, Madrid). El Detector de Masas Triple Cuadrupolo (modelo G6410A) está acoplado a una fuente de ionización a presión atmosférica (API) serie 6000 (modelo G1948B). Todo el sistema se controló desde un ordenador Pentium IV (modelo HP LP2065) utilizando el software Q-TOF, QQQ, TOF (Agilent Technologies) que permite tanto el control del HPLC como del detector de masas.

Además, se contó con pequeño equipamiento como agitadores magnéticos *Selecta* (Duerolab), vórtex de *Ika Works* (Wilmington, EE.UU.) y micropipetas *Gilson* (Thermo Fisher).

Las muestras de ARN y proteínas se conservaron en congeladores -80 °C marca *Revco* (Thermo Fisher). Las distintas líneas celulares se almacenaron y conservaron en criotubos en un contenedor de N₂ líquido (Thermo Fisher).

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

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los espectros de infrarrojo (IR) se registraron en un espectrofotómetro *Nicolet IR100* (Thermo Fisher), realizándolos en forma de película en nujol o en CH₂Cl₂, con una ventana de NaCl, expresando las bandas obtenidas en cm⁻¹.

La cromatografía de capa fina se realizó en placas de 0,2 mm de gel de sílice 60 F254 soportada en aluminio (Merck) y se visualizaron con una lámpara ultravioleta de $\lambda = 254$ nm.

Se emplearon los espectrómetros *Bruker WP-200-SY* (200 MHz para ¹H y 50 MHz para ¹³C), *Varian 200 Mercury VS 2000* (200 MHz para ¹H y 50 MHz para ¹³C) y *Bruker Advance DRX* 400 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C para registrar los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) del Servicio de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad de Salamanca.

3.4. CULTIVOS CELULARES

3.4.1. Medios de cultivo

Para los experimentos *in vitro* con cultivos celulares se utilizaron los siguientes medios estériles:

- CHO: DMEM 5671 suplementado con 50 g/l de L-prolina y GlutaMAX™.
- HuH7: DMEM suplementado con 2 mM de L-glutamina, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml y gentamicina 50 µg/ml para la línea celular.
- Alexander: MEM suplementado con 1 mM de piruvato sódico y 26,2 mM de bicarbonato sódico. (2,2 g/L de bicarbonato sódico y 110 mg/L de piruvato sódico).

Todos los medios se suplementaron con un 10 % de suero bovino fetal inactivado (a 56 °C durante 30 minutos) y un 1 % de una mezcla de antibióticos y antimicóticos que contiene penicilina (20 U/ml) y estreptomicina (0,02 mg/ml). El medio de las células Alexander se suplementó con la misma mezcla de antibióticos que además contenía el antimicótico anfotericina B (0,05 µg/ml).

Los cultivos celulares siempre se manejaron en condiciones de esterilidad. La descongelación de los criotubos se realizó en un baño a 37 °C y se centrifugaron las células para eliminar el DMSO. Las células se mantuvieron en un incubador a 37 °C, en atmósfera del 5 % de CO₂ con aire y una humedad relativa del 80 %. Se emplearon *flask*

de cultivo de 25 y 75 cm² de Corning (Thermo Fisher Scientific), placas de cultivo de 6, 12, 24 y 96 pocillos (Duerolab) y filtros *Sterivex* (Merck-Millipore) de tamaño de poro 0,1 µM para la esterilización de los medios de cultivo y soluciones. Para la siembra de células para diferentes tipos de experimentos o bien para realizar los pases para el mantenimiento del cultivo o su congelación en criotubos, se realizó una tripsinización (0,25 % de tripsina y 20 mM de EDTA en PBS) de las células y se recogían en medio de cultivo.

3.4.2. Cultivos de células para estudios de expresión génica

Para realizar los estudios de expresión génica, las células se sembraron en placas de 6 pocillos en un volumen final de 3 ml/pocillo a una densidad celular adecuada en función de la línea. Tras el tiempo necesario para que se alcanzara la subconfluencia del cultivo (48-72h), las células se tripsinizaron y se procesaron para la obtención de ARN total (apartado 3.5.1) o para la extracción de proteínas totales (apartado 3.8.2).

3.4.3. Ensayos de viabilidad celular

Para estudiar el efecto de los fármacos antineoplásicos y citostáticos en las diferentes líneas celulares utilizadas en esta Tesis Doctoral, se realizaron ensayos de viabilidad celular. Para ello, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a la densidad adecuada para cada línea. Tras 24 horas de la siembra, se añadieron los compuestos citostáticos a los que se exponían las células durante periodos de tiempo variables en función del tipo de estudio: 2, 4 o 6 horas, en el caso de los ensayos de exposición a tiempos cortos, o bien 72h. En todos los casos, después de 72 horas de la adición de los compuestos, se realizó el test de formazán (111).

3.4.4. Experimentos de transporte por citometría de flujo

Las células se sembraron en *flask* de 25 cm² a una densidad variable en función de la línea celular (generalmente, entre 5x10⁵ y 1x10⁶ células/*flask*). El experimento se inició a las 72 horas de la siembra de células, tiempo necesario para que se alcanzara la confluencia del cultivo. Las células, tras la tripsinización, se lavaron con PBS, se precipitaron y se resuspendieron en medio de captación (NaCl 96 mM; Hepes 50 mM; KCl 5,3 mM; KH₂PO₄ 1,1 mM; CaCl₂ 1,8 mM; MgSO₄·7·H₂O 0,8 mM; glucosa anhidra 11 mM).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar el experimento, las células se resuspendieron en medio de captación y se incubaron con el compuesto de interés durante 15 minutos, en presencia o ausencia de un inhibidor a 100 μ M (TCA o rifampicina). La captación se detuvo por adición de 900 μ l de medio de captación a 4 °C, y se midió la fluorescencia de las células en el citómetro de flujo en los canales FL1 y FL3.

3.5. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ARNm POR RT-qPCR CUANTITATIVA

3.5.1. Extracción del ARN total

La extracción ARN total de homogenados celulares o de tejido se realizó lisando estos con una mezcla de buffer de lisis y β -mercaptoetanol (1:1000) siguiendo las instrucciones del proveedor del kit comercial “*illustraRNAspin Mini RNA Isolation Kit*”, basado en la elución del ARN adsorbido previamente a columnas de sílice.

Finalmente, el ARN purificado se cuantificó por espectrofotometría a $\lambda=260$ nm en un *NanoDropTM 1000*.

3.5.2. Transcripción inversa (RT)

El ADN complementario (ADNc) utilizado como molde en la RT-qPCR cuantitativa se sintetizó por transcripción reversa a partir del ARN purificado. Para ello, se usó el kit comercial “*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*” (Thermo Fisher Scientific), con los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción.

3.5.3. Diseño de *primers*

Para diseñar los “*primers*” específicos de cada uno de los genes estudiados en esta Tesis Doctoral, cuyas secuencias se muestran en la Tabla MM-1, se empleó el programa *OligoAnalyzer* 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/Oligoanalyzer>) (*Integrated DNA Technologies*, Coralville, EE.UU.). Su especificidad se comprobó con el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los *primers* se diseñaron, siempre que fue posible, sobre la unión de dos exones codificantes utilizando como molde la secuencia del ARNm publicada en la base de datos *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) específica para cada gen.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla MM-1. *Primers* empleados para cuantificar la expresión de genes por RT-qPCR. F: *forward*; R: *reverse*.

Gen	Proteína	Secuencia 5' → 3'	Tipo	Nº de acceso
<i>ABCB1</i>	MDR1	GCGCGAGGTCGGAATGGAT	F	NM_000927
		CCATGGATGATGGCAGCCAAAGTT	R	
<i>ABCC1</i>	MRP1	CCGCTCTGGGACTGGAATGT	F	NM_004996
		GTGTCATCTGAATGTAGCCTCGGT	R	
<i>ABCC2</i>	MRP2	TGAAGAGGAAGCCACAGTCCATGA	F	NM_000392
		TTCAGATGCCTGCCATTGGACCTA	R	
<i>GAPDH</i>	GAPDH	TGAGCCCGCAGCCTCC	F	NM_002046
		TACGACCAAATCCGTTGACTCC	R	
<i>HRPT1</i>	HPRT1	GCCCTGGCGTCGTGATTAGT	F	NM_000194
		AGCAAGACGTTTCAGTCCTGTCCATAA	R	
<i>SLCO1B3</i>	OATP1B3	AGATTGTGTAAAGGAATCTGGGTCACA	F	NM_019844
		AGTGCAAAGCCAATGACTGGAC	R	
<i>SLCO1B1</i>	OATP1B1	TGCAATGGATTGAAGATGTTCTTGGCA	F	NM_006446
		GCAAATTTCCAATTTCAAAGCTTCCGTCA	R	

3.5.4. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

Los niveles de expresión de genes se determinaron mediante RT-qPCR. Para ello, se empleó el fluorocromo SYBR Green I, de la mezcla de reactivos “*SYBR Select Master Mix*” (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), y el termociclador *QuantStudio™ 3* (Thermo Fisher Scientific).

Esta variante de la PCR analítica permite cuantificar de forma absoluta o relativa el producto amplificado durante la reacción mediante la detección de fluorescencia. Las condiciones de tiempo y de temperatura establecidos para la PCR fueron las siguientes: un ciclo de 2 minutos a 50 °C para la activación de la uracil-N-glicosilasa (UNG) AmpErase™, un ciclo de 10 minutos a 95 °C para la activación de la ADN polimerasa, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C para la desnaturalización y de 1 minuto a 60 °C para la hibridación y extensión del ADN.

Todas las determinaciones se realizaron siempre por duplicado.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La cuantificación relativa de la expresión se basó en la comparación del ciclo umbral (Ct). De esta forma, para corregir las variaciones existentes en la cantidad de ARN de partida se utilizó un gen endógeno o control interno, como elemento normalizador: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa/*GAPDH*, hipoxantina guanina fosforribosil transferasa/*HPRT1* o ARNr *18S*, en función de la muestra problema. Para la determinación del nivel de expresión del gen normalizador ARNr *18S* se utilizaron los reactivos comerciales “*Taqman™ Ribosomal RNA Control Reagents Kit*” y la mezcla de reacción “*Taqman™ Universal PCR Master Mix*”. Así, la expresión del gen diana normalizada frente al control interno en la muestra (ΔCt) viene dada por la fórmula:

$$\Delta Ct \text{ gen diana muestra} = Ct \text{ gen diana} - Ct \text{ gen control interno}$$

Además, según los casos, se utilizó un calibrador, al que se le otorgó el valor de 1 o 100 % de expresión del gen de interés, para poder comparar los resultados entre diferentes análisis. Finalmente, la expresión del gen diana, normalizada frente al control endógeno, y relativa al calibrador/muestra control, viene dada por la fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra problema} - \Delta Ct \text{ calibrador}$, normalizados.

3.6. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

3.6.1. Soluciones empleadas

- **Tampón fosfato salino (PBS):** 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 0,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4.
- **Tampón RIPA:** 1 % Nonidet P-40, 0,5 % desoxicolato sódico y 0,1 % SDS disueltos en PBS.
- **Solución de carga 4x:** 250 mM Tris-HCl base pH 6,8, 9,2 % SDS, 10 % glicerol, 20 % -mercaptoetanol, 0,08 % azul de bromofenol.
- **Tampón de migración:** 25 mM Tris-HCl base, 192 mM L-glicina y 1 % SDS.
- **Tampón de transferencia:** 25 mM Tris-HCl base, 192 mM L-glicina, 1 % SDS y 20 % metanol.
- **Solución rojo Ponceau:** 0,1 % rojo Ponceau S, 0,5 % ácido acético.
- **Tampón Tris salino (TBS):** 20 mM Tris-HCl base, 137 mM NaCl, pH 7,6.
- **TBS-Tween:** TBS suplementado con 0,1 % de Tween-20 (v/v).

3.6.2. Obtención de homogenados de cultivos celulares

Para obtener un homogenado total de proteínas a partir de un cultivo celular, se tripsinizaron las células, se lavaron con PBS y se resuspendieron en el volumen deseado de RIPA (PBS, Nonidet P40 1%, desoxicolato sódico 0.5%, SDS 0.1%) y un cóctel de inhibidores de proteasas (IP) al 1 % (v/v) (100 µl de RIPA con 1 µl de IP para cada millón de células). Se incubó el homogenado durante 20 minutos en hielo con agitación en vórtex cada 5 minutos y se centrifugó a 20.000 xg durante 20 min a 4 °C. Se congeló el sobrenadante a -80 °C hasta su uso, separando una alícuota para la posterior determinación de la concentración de proteínas (apartado 3.8.2.).

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

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

Para la carga de las muestras en el gel, se emplearon 20-100 µg de proteínas en cada pocillo, así como un marcador de pesos moleculares (“*Precision Plus Protein™ Standards*”, “*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*” o “*Prestained SDS-PAGE Standards, low range*”).

La electroforesis vertical se realizó en una cubeta con solución de migración a una corriente constante de 15 mA para el gel concentrador y 30 mA para el gel separador, durante el tiempo necesario para una correcta resolución de la proteína de interés.

3.6.4. Transferencia y tinción de la membrana con rojo Ponceau

Una vez acabada la electroforesis, se llevó a cabo la transferencia húmeda de las proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). Para ello, se utilizó una cubeta con tampón de transferencia frío y en agitación, conectada a una fuente de alimentación con una corriente constante de 250 mA durante 90-120 min, en función del peso molecular de la proteína de interés.

Tras finalizar la transferencia, cuando se requería, la membrana de nitrocelulosa se tiñó incubando con rojo Ponceau durante 5 minutos para ver la carga total de proteínas en cada calle y comprobar la eficacia de la transferencia.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.6.5. Inmunodetección

Antes de la inmunodetección se realizó un bloqueo de 1 h a temperatura ambiente y en agitación con BSA o leche descremada al 1-5 % (p/v) diluida en tampón TBS-Tween, según las especificaciones de cada anticuerpo. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente a 4 °C y en agitación, durante toda la noche. Los anticuerpos primarios se utilizaron diluidos en leche o BSA al 5 % (p/v) en TBS-Tween, según las recomendaciones de la casa comercial (Tabla MM-2).

3.6.6. Revelado

La detección se realizó mediante un método quimioluminiscente y un equipo de análisis de imagen LAS-4000 (Fujifilm). Las membranas se incubaron con los reactivos ECL (*Enhanced ChemioLuminescence*) en oscuridad durante 1 minuto y los tiempos de exposición en el equipo de imagen se ajustaron para obtener una señal adecuada en cada caso.

3.7. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA

3.7.1. Soluciones empleadas

Tampón fosfato salino (PBS): 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 0,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4.

3.7.2. Fijación

En primer lugar, se sembraron las células en placa de 24 pocillos sobre un cubreobjetos estéril de vidrio a una densidad preestablecida para obtener una confluencia del 60-90% en el momento de la fijación.

Según los anticuerpos y las proteínas a marcar, la fijación se llevó a cabo durante un 1 minuto con metanol puro a -20 °C, o bien durante 20 minutos con paraformaldehído al 4 % (p/v) a temperatura ambiente, seguido de un paso de permeabilización con Triton X-100 al 0,01-0,5 % (v/v) durante 4 min. Para finalizar la fijación se realizaron 4 lavados con PBS, en todos los casos.

3.7.3. Inmunodetección

Para bloquear las uniones inespecíficas, el cubreobjetos con las células fijadas se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos con FBS al 5 % (v/v) disuelto en PBS. A continuación, los cubreobjetos se incubaron durante 1 hora con la solución de anticuerpos primarios correspondientes diluidos en PBS y después se lavaron tres veces con PBS durante 10 minutos. Seguidamente, se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo secundario adecuado: anti-IgG de ratón, rata, cabra o conejo conjugados con Alexa Fluor-488® o Alexa Fluor-594® (dilución 1:1000) durante 1 hora en oscuridad. A la mezcla con los anticuerpos secundarios se añadió DAPI para teñir los núcleos (dilución 1:5000). Tras realizar tres lavados de 10 minutos con PBS, se colocó el cubreobjetos sobre un portaobjetos añadiendo medio de montaje.

El marcaje se visualizó a través de un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemania) en el servicio de microscopía del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca.

Tabla MM-2. Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas por Western blot e inmunofluorescencia.

Antígeno	Referencia	Especie de origen	Dilución	Casa Comercial
OATP1B3	NBP1-80980	Conejo	1/5000 (WB) 1/100 (IF)	Novus
Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	ab2871	Ratón	1/75 (IF)	Abcam
GAPDH	6c5	Ratón	1:1000 (WB)	Santa Cruz

WB, Western blot; IF, inmunofluorescencia.

3.8. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

3.8.1. Cuantificación de ácidos nucleicos

La concentración de ADN y ARN total purificado se valoró por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm en un *NanoDrop*TM 1000. Se analizaron las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 para evaluar posibles contaminaciones con proteínas o solventes.

3.8.2. Cuantificación 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), basado en la reducción de las proteínas con cobre en medio alcalino y la posterior reducción del ácido fosfomolibdico fosfotúngstico con las proteínas tratadas. El producto resultante puede ser determinado espectrofotométricamente ($\lambda=660$ nm). Como patrón se utilizó BSA.

3.8.3. Determinación de la viabilidad celular por el test de formazán

El test de formazán es un método colorimétrico utilizado para cuantificar la viabilidad celular en ensayos de proliferación y quimiosensibilidad, basado en la reducción metabólica de una sal de tetrazolio soluble en medio acuoso (MTT, de color amarillo) en formazán (insoluble y de color un violeta), por acción de las deshidrogenasas mitocondriales (Marshall et al., 1995).

Tras 72 horas de exposición de los compuestos a los agentes citostáticos, se añadió el MTT 0,5 mg/ml (110 μ L/pocillo). Después de un periodo de 4 horas de incubación a 37 °C, se añadió la solución de lisis (SDS 10 mM, HCl 10 %) y se volvió a incubar *overnight*. Por último, se procedió al análisis de la placa en un lector ELISA modelo *Multiskan SkyHigh* a una longitud de onda de 595 nm.

Como blanco espectrofotométrico, se emplearon pocillos a los que únicamente se añadió medio de cultivo sin células; y como control, pocillos en los que se sembraron células a las que no se añadió el tratamiento con fármacos, sólo DMSO si este era utilizado como cosolvente. A ambos se les añadieron el MTT y la solución de lisis, igual que a las células tratadas.

3.8.4. Determinación de parámetros bioquímicos de funcionalidad hepática y renal

La determinación de parámetros bioquímicos hepáticos y renales en muestras de suero se realizó mediante un analizador automático de química seca *Spotchem EZ SP-4430* utilizando tiras reactivas *Spotchem II Liver-1* y *Spotchem II Kidney-3*. Los parámetros analizados cuantitativamente fueron los siguientes: aspartato aminotransferasa (GOT o AST, UI/dL), alanina aminotransferasa (GPT o ALT, UI/dI),

albúmina (Alb, g/dl), bilirrubina (T-Bil, mg/dl) y proteína total (T-Pro, g/dl) en el estudio de la funcionalidad hepática; y albúmina, BUN (nitrógeno ureico en sangre, mg/dl), ácido úrico (mg/dl) y creatina (Cre, mg/dl), como marcadores de la funcionalidad renal.

3.8.5. Determinación de la fluorescencia de NIRBAD en bilis

La determinación de la fluorescencia en las muestras de bilis recogidas se llevó a cabo mediante la medida en el espectrofluorímetro *HITACHI F-4500*. Para la medida se ajustaron previamente en el equipo los parámetros de longitudes de onda de excitación/emisión del compuesto cuyos valores son 675/709 nm para el NIRBAD-1, 684/722 nm para el NIRBAD-2, 683/721 nm para el NIRBAD-3 y 664/718 nm para la molécula de partida alquinocianina 718. Los valores de fluorescencia obtenidos se expresaron en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF).

En primer lugar, se realizó una recta patrón del compuesto de interés con concentraciones desde 5 hasta 500 μ M partiendo de una preparación *stock* del compuesto fluorescente 10 mM y empleando como solvente una mezcla de PBS/metanol 85:15. Las muestras se mantuvieron en oscuridad durante los experimentos para evitar su degradación.

Una vez medidas las disoluciones patrón, se analizaron las muestras de bilis recogidas durante los experimentos. Para la medida de las muestras de bilis de las ratas tratadas con los NIRBAD, se realizaron diferentes diluciones para cada compuesto para ajustar los valores de fluorescencia obtenidos dentro del rango de la recta patrón.

Finalmente, se analizaron los resultados y se calculó la concentración del compuesto en bilis a partir de los datos de fluorescencia y el ajuste a la recta patrón.

3.9. DETERMINACIONES POR HPLC-MS/MS

La separación cromatográfica de los ABs se realizó en una columna de fase reversa de 15 cm de longitud, empleando como fase móvil una mezcla de agua con acetato de amonio 5 mM y ácido fórmico 0,01 %; y metanol con acetato de amonio 5 mM y ácido fórmico 0,01 %, a un flujo de 0,5 ml/min. Se trabajó utilizando un método de elución en gradiente de 16 minutos de duración, en el que la proporción inicial era 73:27 de metanol:agua, y se incrementaba la concentración de metanol de forma lineal durante 10

3. MATERIALES Y MÉTODOS

minutos hasta alcanzar el 93 %. Posteriormente, se volvía a las condiciones iniciales en 1 minuto y se mantenían durante los 5 minutos finales.

La determinación de los ABs en el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo se llevó a cabo utilizando ionización negativa, con el fin de obtener los aniones moleculares de cada uno de los compuestos analizados. Las condiciones de trabajo para la fuente iónica fueron: temperatura del gas (N₂) 350°C, flujo del gas 11 ml/min, presión del nebulizador 45 psi, voltaje 2.500 V.

El método de determinación de los compuestos NIRBAD se puso a punto empleando el método utilizado para los ABs. Para medir la abundancia de los tres compuestos (NIRBAD-1, NIRBAD-2 y NIRBAD-3) se empleó el método de trabajo MRM, que utiliza el modo SIM para seleccionar una relación m/z específica en ambos cuadrupolos y se siguió la transición específica de cada uno de los iones precursores (ion molecular - H⁺) a los respectivos iones producto resultantes. En el caso del NIRBAD-1 se siguió la transición específica de 606,0 m/z a 579,0 m/z y 411,0 m/z ; para el NIRBAD-2, la transición del ion precursor 583,7 m/z a los iones producto 565,7 m/z y 281,2 m/z , y para el NIRBAD-3 se siguió la transición 605 m/z a 578 m/z y 281 m/z .

Para la cuantificación de estas especies moleculares se midieron rectas patrón de cada compuesto en solución metanólica con concentraciones entre 0,1 μM y 25 μM .

3.10. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

3.10.1. Estudios de imagen y monitorización de derivados fluorescentes de ácidos biliares

Para conocer la farmacodinámica de los compuestos NIRBAD tras su administración intravenosa en el animal sujeto de estudio (ratón y rata) se realizaron estudios *in vivo* de monitorización de su fluorescencia. Para ello, los animales se anestesiaban con pentobarbital sódico (i.p. 50 mg/kg peso corporal) y se inyectaba una dosis de 1000 nmoles de NIRBAD. en un volumen constante de solución salina, usando como cosolvente DMSO (10 o 12,5 % según si el experimento era en ratón o en rata, respectivamente). La fluorescencia NIR se detectó por lámparas de IR en el equipo de imagen *Fujifilm LAS-4000* y se realizó un seguimiento de la señal mediante la captura de imágenes a distintos tiempos en función del diseño experimental hasta la finalización del ensayo. El equipo emplea una lámpara de infrarrojo cercano (710 nm) como fuente de

excitación y registra la radiación NIR emitida. Para el análisis de las imágenes se utilizó el programa informático *Multi Gauge V3.0*. También se realizaron estos mismos experimentos de monitorización en rata utilizando la molécula ICG para estudiar cómo era su perfil de aclaramiento hepático en comparación con el de los compuestos NIRBAD.

Una vez finalizado el estudio de monitorización, se recuperaron los animales de la anestesia. Al día siguiente, no se observaron parámetros físicos ni de conducta asociados al dolor.

Estos experimentos se llevaron a cabo, además de en un modelo control (animales sin ningún tratamiento previo), en otros modelos fisiopatológicos para conocer cómo se producía el aclaramiento hepático de la sonda NIRBAD-1 en estas condiciones. Estos modelos fueron los siguientes:

Modelo de colestasis hepatocelular aguda provocada por administración de faloidina.

Para llevar a cabo este modelo se emplearon ratas Wistar macho de entre 250 y 280 gramos. En primer lugar, se administró NIRBAD-1 (1000 nmol i.v.) y se realizó su seguimiento como se ha descrito anteriormente. Tras treinta minutos de la monitorización del compuesto, se administró una dosis de 75 µg/100 g peso corporal i.v. de la micotoxina faloidina. Dos horas después de la inyección de la faloidina, se volvió a administrar un segundo bolo de NIRBAD-1 (1000 nmol i.v.) y se realizó su seguimiento por imagen durante una hora más. Tras la finalización de la toma de imágenes, se canuló el conducto biliar como se describe en el apartado 3.10.2. Al final del periodo experimental se recogió sangre por venopunción de la vena cava y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos para la recogida de suero. Posteriormente, se realizó el análisis de diferentes parámetros bioquímicos, como se describe en el apartado 3.8.4.

Modelo de daño hepático en ratones Mdr2 KO. Se emplearon ratones Mdr2 KO para el estudio de la monitorización de NIRBAD-1. Se utilizaron también ratones Mdr2 KO en los que se había silenciado la proteína CNNM4, en el marco de un proyecto de colaboración con la Dra. Malu Martínez-Chantar (CIC bioGUNE).

Modelo de colestasis obstructiva por ligadura del conducto biliar (BDL). Se emplearon ratones de la cepa CD1 a los que se realizó una cirugía para ligar el conducto biliar provocando una situación de colestasis obstructiva. En primer lugar, se rasuró y desinfectó el campo operatorio y en ratones anestesiados con isoflurano (Forane®) se practicó una laparotomía ventral de unos 5 cm aproximadamente. A continuación, se

3. MATERIALES Y MÉTODOS

disecó el conducto biliar común y se realizó una doble ligadura. Para terminar, se suturaron con puntos continuos el peritoneo y el músculo, y con puntos individuales en “U” la capa de la piel, y se impregnó la región abdominal con un antiséptico tópico para evitar posibles infecciones. Los animales se recuperaron de la anestesia bajo una lámpara calefactora. Tras siete días de la cirugía, se realizó una evaluación de la función hepatobiliar mediante la monitorización con NIRBAD-1.

3.10.2. Estudios de secreción biliar

Los estudios de secreción biliar se realizaron en ratas Wistar macho de entre 250 y 280 g. Tras la anestesia del animal con pentobarbital sódico (i.p., 50 mg/Kg p.c.) se inició la intervención quirúrgica con una laparotomía ventral media, se disecó el conducto biliar común y se introdujo una cánula de polietileno.

Diez minutos después de la interrupción de la circulación enterohepática, se comenzó con la recogida de las muestras de bilis en periodos de diez minutos y en viales previamente tarados. Pasados los primeros veinte minutos de recogida de bilis basal, se realizaba la administración de los compuestos NIRBAD vía intravenosa. Posteriormente, se pesaron los viales y se determinó así el flujo biliar por diferencia de pesada, al considerar que la densidad relativa de la bilis es aproximadamente igual a uno (1 g/mL) (Klaassen, 1974).

Por último, estas muestras de bilis obtenidas se analizaron según se detalla en el apartado “Determinación de la fluorescencia de NIRBAD en bilis” (apartado 3.8.5.).

3.10.3. Estudios de microscopía confocal intravital

Para conocer cómo era la carga y distribución de los compuestos NIRBAD a nivel intrahepático en los lobulillos se empleó un microscopio confocal intravital para su visualización. Para ello, se anestesiaron ratones de la cepa C57BL/6 a los que se administraba el compuesto NIRBAD (50 µl de una dilución 1 mM, i.v.) y se monitorizó la señal fluorescente durante sesenta minutos, registrando tanto la señal de rodamina que se empleaba para teñir las células como el NIRBAD de interés.

3.11. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

3.11.1. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

Se prepararon las muestras para el estudio de resonancia magnética nuclear de protón y carbono evaporando todos los solventes orgánicos y acuosos por destilación a presión reducida. Se evaluaron tanto los compuestos intermedios de la reacción como los productos finales de la síntesis (Figura MM-1).

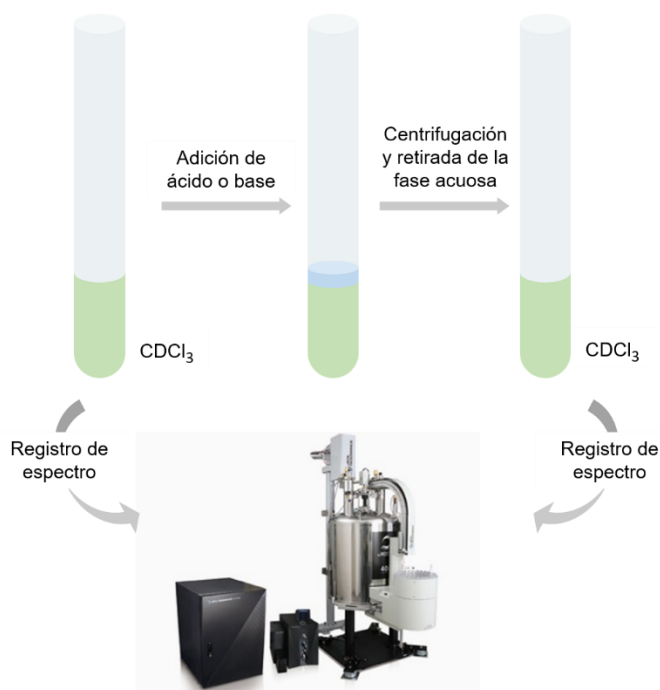


Figura MM-1. Esquema de lavado de disolvente deuterado con una disolución acuosa básica o ácida para mejorar la resolución de las señales de RMN.

Para el análisis se usó el espectrómetro Bruker WP-200-SY (200 MHz para ^1H y 50 MHz para ^{13}C), Varian 200 Mercury VS 2000 (200 MHz para ^1H y 50 MHz para ^{13}C) y/o Bruker Advance DRX (400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C). Posteriormente, se procedió a la asignación de cada una de las señales correspondiente a cada protón y/o carbono, de manera que quedaran totalmente identificados los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) usando como estándar interno la señal del disolvente. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hercios (Hz), con las siguientes abreviaturas para explicar las multiplicidades: s, singlete; d, doblete; t, triplete; m, multiplete; q, cuartete; quin,

3. MATERIALES Y MÉTODOS

quintuplete; h, hexaplete; dd, doblete de dobletes; dt, doblete de tripletes; sa, singlete ancho.

3.11.2. Espectroscopía de Infrarrojo

Para realizar los espectros de IR se prepararon las muestras disolviendo una pequeña cantidad en CH_2Cl_2 o en nujol, si no era soluble en el primero. En primer lugar, se midió un blanco en el espectrofotómetro *Nicolet IR100*, recogiendo un espectro del aire atmosférico para eliminar la banda producida por el CO_2 y vapor de agua. Posteriormente, se depositó una fina capa del compuesto sobre los cristales pulidos de NaCl y se dejaron secar. Para terminar, se registró el espectro de IR de la muestra, restándole el blanco y expresando las bandas obtenidas en cm^{-1} .

3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se muestran expresados como la media aritmética más menos el error estándar de la media (EEM). Para calcular la significación estadística de la comparación entre dos medias se empleó el test de la *t* de Student o el test de la *t* de Student de valores pareados, según el caso. Cuando la comparación era entre varios grupos se empleó el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Las correlaciones lineales entre dos variables se obtuvieron por el método de los mínimos cuadrados (coeficiente de Pearson, *r*).

CAPÍTULO I:

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA
UTILIDAD DE AGENTES
CITOSTÁTICOS VECTORIZADOS
EN EL TRATAMIENTO DEL
CÁNCER HEPÁTICO

Como ya se ha comentado en la Introducción, la limitada eficacia de los tratamientos farmacológicos que se emplean frente al HCC se debe, fundamentalmente, a la elevada refractariedad de este tipo de tumor mediada por complejos mecanismos de quimiorresistencia (MOC) (Marin et al., 2020).

El fármaco empleado en primera línea de tratamiento para este tipo de tumores durante las dos últimas décadas ha sido el TKI sorafenib. Además, actualmente, también se emplean otros fármacos con el mismo mecanismo de acción, como el erlotinib. El uso de TKIs ha supuesto un importante avance en el tratamiento de esta patología, sin embargo, los efectos adversos que presentan, así como la existencia de pacientes con elevada refractariedad a estos agentes antitumorales compromete su éxito en un porcentaje considerable de casos y hace que sea necesaria la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas (Tang et al., 2020; Sangro et al., 2021)

A lo largo de la trayectoria de nuestro grupo de investigación, se han sintetizado y evaluado algunos agentes citostáticos resultado de la vectorización con ABs. Un ejemplo de ello es el BAMET-UD2, un derivado del cisplatino combinado con UDCA con el que se obtuvieron buenos resultados en estudios preclínicos. El BAMET-UD2 presentaba un marcado hepatotropismo y una elevada actividad antitumoral y, además, menos efectos tóxicos que el cisplatino (90). En esta misma línea, durante el trabajo de Tesis Doctoral del Dr. Álvaro Gacho Temprano, se sintetizaron nuevos compuestos a los que se denominó BATKIs, del inglés *Bile Acid y Tyrosine Kinase Inhibitor*, mediante la unión de un fármaco citostático con actividad inhibidora de tirosina quinasa erlotinib (1) o sorafenib (2), a la cadena lateral de un AB, como el CA (C) o el GCA (G) sin alterar el esqueleto esteroideo, obteniéndose así los compuestos: BATKI-1C, BATKI-1G, BATKI-2C y BATKI-2G.

Con estos compuestos, se llevaron a cabo estudios *in vitro* preliminares de viabilidad celular en líneas derivadas de tumores hepáticos, ensayos de transporte para conocer cuáles son los transportadores implicados en su entrada a la célula y estudios de *docking* molecular para determinar la interacción de los BATKIs con las proteínas transportadoras. No obstante, era aún necesario profundizar en su estudio para una mejor comprensión de su actividad y potencialidad terapéutica.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos planteamos como objetivo global de este capítulo de la Tesis Doctoral evaluar el efecto citostático *in vitro* de los BATKIs, y el

papel de la proteína transportadora OATP1B3 como diana para la vectorización de estos compuestos hacia células tumorales hepáticas.

Para alcanzarlo se plantearon los siguientes objetivos parciales:

Objetivo 1. Establecer un modelo de estudio adecuado para la evaluación *in vitro* de las características hepatotrópicas y del efecto antiproliferativo y citostático que presentan los compuestos BATKIs.

Objetivo 2. Investigar *in vitro* el papel de la proteína transportadora OATP1B3 en la vectorización de los BATKIs mediante el estudio de la viabilidad celular y captación indirecta de los compuestos en líneas con sobreexpresión de este transportador.

En esta Tesis Doctoral, se han evaluado a nivel preclínico las propiedades antitumorales de una familia de derivados de TKIs, que han sido sintetizados en nuestro grupo de investigación con el fin de desarrollar compuestos que mejoren la respuesta al tratamiento frente al HCC. El fundamento era vectorizar éstos por medio de su unión a un AB, esperando aumentar los niveles intratumorales del fármaco y reducir los efectos adversos derivados de la terapia.

La línea derivada de HCC, Alexander-OATP1B3, no resultó ser un buen modelo para el estudio de la viabilidad celular y la eficacia de los BATKIs como agentes antitumorales. Sin embargo, este modelo sirvió para llevar a cabo estudios funcionales de transporte mediante citometría de flujo.

Por otro lado, de acuerdo con varias publicaciones recogidas en la literatura, encontramos que los niveles de expresión de la mayoría de transportadores hepáticos son muy bajos en la línea celular HuH7-WT si se comparan con los hepatocitos humanos, una característica que comparten con otras líneas derivadas de HCC, como las HepG2 (65). No obstante, se ha descrito que algunas modificaciones en las condiciones de cultivo pueden variar el perfil de expresión y la función de estas proteínas con un elevado interés para el estudio del metabolismo o la interacción de fármacos.

Así, los niveles de expresión de algunos transportadores, entre los que están OATP1B3, OATP2B1 o MRP2, se incrementan cuando se cultivan las células HuH7-WT a alta confluencia durante periodos de entre 1 y 4 semanas. Sin embargo, no se conoce como se ve afectada la expresión de otros transportadores como OATP1B1, NTCP o

BSEP (105). Algunos estudios afirman que la ausencia de NTCP y BSEP junto con la regulación a la baja de OATP1B1, probablemente, esté relacionada con un menor transporte de ABs y que esas diferencias en el perfil de expresión de transportadores en comparación con los hepatocitos primarios convierten a la línea HuH7-WT en un buen modelo para profundizar en el conocimiento de lo que sucede en situaciones colestáticas (166)

Otros estudios han mostrado que la suplementación con DMSO induce cambios en la expresión de algunos transportadores (67, 146), así como su capacidad para metabolizar fármacos ya que aumenta la expresión de enzimas UGT y CYP. No obstante, estos niveles son significativamente más bajos a los observados en los hepatocitos (Choi et al., 2009). En contra de lo anteriormente descrito, en nuestros estudios no se observó un incremento en los niveles de expresión de OATP1B3 cuando se analizaron los niveles de ARNm en condiciones de cultivo con suplementación de DMSO.

Respecto a los niveles de expresión de otros transportadores, como OCT1, que puede mediar la entrada del sorafenib en el hepatocito, tanto en la bibliografía como en nuestro grupo de investigación, se ha demostrado que son bajos en la línea HuH7-WT. No obstante, los efectos de las modificaciones de las condiciones de cultivo sobre las proteínas de la familia SLC22A no han sido estudiadas en este modelo celular. La viabilidad celular en los cultivos tratados con sorafenib es similar para las condiciones de baja y alta confluencia, por lo que es posible que no se produzcan modificaciones en los niveles de OCT1 por las diferentes condiciones de cultivo, sin embargo, esto no explicaría por qué el perfil antiproliferativo de los BATKIs es diferente. En la bibliografía se ha descrito que la formación de heterodímeros entre proteínas de transporte modifica la expresión de OATP1B3. Se ha observado que la coexpresión de OCT1 y OATP1B3 reduce los niveles de OATP1B3 mientras que la expresión simultánea de OATP1B1 y NCTP parece incrementar sus niveles en la membrana plasmática en estudios *in vitro* en células embrionarias de riñón HEK293T (184). Es por ello, que sería necesario seguir investigando los efectos del cultivo a diferentes densidades sobre la expresión y funcionalidad del transportoma en HuH-7 para caracterizar completamente este modelo celular.

Para profundizar en el estudio de la citotoxicidad de los BATKIs podría resultar interesante desarrollar un modelo *in vivo* de HCC en el que tras generar un tumor con

células de HCC (HuH7 o Alexander) se pudiera evaluar el tratamiento de los BATKIs comparado con el sorafenib. Ya hemos visto que la eficacia del sorafenib es mayor que la de los BATKIs en estudios *in vitro*, pero estos análisis resultan limitados al compararlos con la situación clínica, ya que sólo nos han demostrado que la unión de los TKI a través de la cadena lateral del AB permite que se conserve en parte la actividad TKI en estos compuestos, pero no se han podido llevar a cabo estudios para evaluar los efectos beneficiosos de la vectorización, como son la acumulación selectiva del agente citostático en el tumor y la reducción de la toxicidad periférica y los efectos secundarios del fármaco, para lo que se requiere llevar a cabo estudios adicionales en modelos *in vivo*.

CAPÍTULO II:

**EVALUACIÓN PRECLÍNICA
DE SONDAS FLUORESCENTES
(NIRBADs) PARA EL ESTUDIO
DE LA FUNCIÓN
HEPATOBILIAR**

En la práctica clínica actual, para la evaluación de la función hepática, se emplean diversas aproximaciones que utilizan sondas radiactivas combinadas con técnicas de imagen, como son la mebrofenina de tecnecio y el gadoxetato. Por otro lado, existen moléculas trazadoras entre las que se encuentran algunos derivados de ABs como la CGamF y otros marcados con isótopos radiactivos, tales como el ácido [¹⁸F]-fluorocólico (28). Sin embargo, existe un número reducido de estas moléculas que hayan alcanzado con éxito la práctica clínica, lo que añadido a la carencia de una estructura que les confiera vectorialidad que presentan estos radiofármacos, hacen patente la necesidad de desarrollar nuevos trazadores que mejoren su especificidad y sean menos invasivos para reducir los efectos adversos ocasionados a los pacientes.

Por otro lado, hasta la fecha, se ha investigado una gran variedad de sondas fluorescentes para estudios preclínicos y para mejorar el diagnóstico y el tratamiento de algunas patologías. No obstante, la mayor parte de las moléculas fluorescentes convencionales emiten en la zona visible del espectro y esto limita su aplicación. En este sentido, el empleo de la fluorescencia NIR (780-2500 nm) puede ofrecer algunas ventajas, como una mayor sensibilidad y resolución espacial, ya que su longitud de emisión les confiere una fluorescencia con mayor penetración en los tejidos y se puede visualizar desde el exterior corporal sin realizar procedimientos invasivos en el sujeto de estudio, o presentan utilidad en la detección multimodal y multiparamétrica al combinar diferentes técnicas de imagen y fluorocromos en otras longitudes de onda.

Por tanto, la disponibilidad de nuevas sondas con emisión en el rango del NIR podría resultar beneficiosa e interesante para su empleo en combinación con otras herramientas de imagen disponibles, dotando de una mayor versatilidad a las técnicas ya utilizadas en la práctica clínica mejorando la precisión en el diagnóstico y disminuyendo los riesgos durante los procesos quirúrgicos al permitir una adecuada visualización de los tejidos.

Por ello, nos planteamos la síntesis y evaluación *in vitro* e *in vivo* de derivados de ABs con emisión en el rango del NIR que pudieran emplearse en el estudio por imagen de patologías hepáticas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos planteamos como **objetivo global** de este capítulo la síntesis de una batería de compuestos vectorizados que sean capaces de emitir fluorescencia en el rango de NIR, a los que denominaremos **NIRBAD** (*Near InfraRed Bile Acid Derivative*). Para el diseño y síntesis de estos nuevos compuestos nos basamos

en la experiencia previa de nuestro grupo de investigación. Estos derivados han sido posteriormente evaluados en ensayos preclínicos mediante estudios de ensayos *in vitro* e *in vivo* con el fin de determinar sus propiedades como sonda vectorizada permeable a los tejidos.

Para lograr este objetivo global se plantearon los siguientes objetivos parciales:

Objetivo 1. Aplicar las estrategias desarrolladas previamente en nuestro laboratorio para la conjugación de esteroides con una molécula fluorescente de emisión en el espectro NIR, por combinación de la azida derivada del CA mediante el uso de la química *click*, para la obtención de un nuevo compuesto, el **NIRBAD 3** que ha sido caracterizado mediante el uso de técnicas espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C y HRMS, con el objetivo de establecer la estructura del compuesto.

Objetivo 2. Llevar a cabo estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo* para determinar las características de vectorialidad de los compuestos **NIRBAD 1** y **2** desarrollados previamente en el HEVEPHARM, así como del compuesto **NIRBAD 3** mediante ensayos de citometría de flujo en diferentes líneas celulares de origen enterohepático que sobreexpresan los transportadores específicos de ABs y en modelos animales tras la administración intravenosa del compuesto y su posterior visualización en un equipo de captura de imagen de alta resolución a longitudes de onda de emisión del NIR.

La molécula de ICG es empleada en clínica para la evaluación de la función hepática, pero presenta algunas limitaciones en su aplicación. En el perfil de fluorescencia determinado por nosotros observado durante su monitorización extracorpórea *in vivo* no se observó que se produjera una carga específica en el hígado. Por el contrario, la señal de fluorescencia era difusa por toda la región abdominal. De esta forma, no era posible discernir la evolución temporal de la fluorescencia debida a la región hepática.

Por ello, en esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo la síntesis de una familia de compuestos derivados de AB y con propiedades fluorescentes (NIRBAD) cuya longitud de onda pudiese atravesar los tejidos por situarse en el IR cercano, NIRBAD, con el fin de que pudieran emplearse como una nueva herramienta en el estudio de la función hepática.

En los estudios funcionales de transporte de estas nuevas sondas se han observado diferencias entre los distintos compuestos sintetizados. Estas peculiaridades también se encontraron en los ensayos de monitorización *in vivo*. Por su parte, el NIRBAD-3 presentó características compartidas con los compuestos 1 y 2 en su dinámica de aclaramiento hepático. Si bien el perfil de carga hepática en los primeros instantes tras su administración era más parecido al del NIRBAD-1, en lo que se refiere a la eliminación de la fluorescencia hepática presentó una mayor similitud con el NIRBAD-2. Además, igual que sucedía para el NIRBAD-2, después de la administración del NIRBAD-3 tampoco se alcanzó un vaciado hepático completo, ya que la fluorescencia remanente después de 3 h se correspondía todavía con el 25% del valor máximo de fluorescencia alcanzado en la fase de carga. Esta diferencia en la captación y posterior aclaramiento se podría deber, en gran medida, a las diferencias estructurales que poseen los compuestos.

Por un lado, los NIRBAD-1 y NIRBAD-3, han sido sintetizados mediante una modificación en la cadena lateral, lo que deja el núcleo esteroideo del AB libre para interaccionar con los transportadores, tanto los de captación como los de eflujo presentes en los hepatocitos. La diferencia notable entre estos dos compuestos se debe a la presencia de un enlace éster, en el NIRBAD-1, y un enlace amida, en el NIRBAD-3. Los resultados observados muestran que la diferencia entre tener un aceptor o un dador de enlaces de hidrógeno puede provocar un cambio sustancial notable en la captación, así como en su eliminación, observándose un aclaramiento a mayores tiempos para el NIRBAD-3.

Por otro lado, el NIRBAD-2 posee una estructura muy diferente, ya que la vectorización se produce en el carbono 3α del CA, dejando la cadena lateral libre. Este compuesto ya no sólo posee una diferencia estructural, sino que también posee una carga negativa debido al carboxilato. Estas diferencias estructurales podrían ser las responsables de que el aclaramiento hepático se produzca a tiempos muy elevados.

En base a estos datos, se podría concluir que la vectorización del compuesto alquinocianina 718 es efectiva al unirse a un AB y que pequeñas diferencias estructurales pueden suponer una variabilidad en el reconocimiento molecular de los transportadores que resulta crucial para el estudio del flujo biliar.

Para profundizar en el estudio del transporte hepático de los NIRBAD, sería interesante reproducir los mismos experimentos de ligadura del conducto biliar en ratones en estudios de microscopía intravital, ya que ayudaría a comprender mejor la dinámica

hepática de estos compuestos. Además, resulta necesario ampliar los estudios funcionales *in vitro* con modelos de carga-eflujo para investigar las implicaciones de las bombas exportadoras para conocer cuáles son las principales proteínas implicadas en la secreción canalicular de estos compuestos.

También se encontraron diferencias entre los NIRBAD en lo referente a su metabolismo. Si bien todos los NIRBAD, eran secretados a bilis, los resultados permitieron la detección de metabolitos únicamente en el caso del NIRBAD-1. Los registros obtenidos en el análisis de HPLC-MS/MS permitieron la identificación de los productos resultantes de la ruptura del enlace éster. Algunas señales minoritarias detectadas, que no hemos podido identificar con rotundidad, podrían corresponderse con otros componentes de la bilis como pigmentos biliares, porfirinas o ABs.

En base a los resultados obtenidos, se podría concluir que el compuesto NIRBAD-1 es el más interesante de la familia NIRBAD, por diferentes motivos: i) por una parte, el máximo de fluorescencia a nivel hepático se alcanza a un tiempo relativamente corto (2,4 min), ii) su eliminación al intestino comienza a detectarse en torno a los 7 minutos desde su inyección intravenosa, iii) a los 30 min se ha aclarado completamente del hígado, iv) no queda fluorescencia residual a las 24 h posteriores, v) se ha demostrado que su elevado hepatotropismo podría ser debido a su alta afinidad por las proteínas de captación presentes en las membranas de las células del circuito enterohepático. Además, el NIRBAD-1 permite distinguir diferentes perfiles en la dinámica de eliminación hepática de fluorescencia extracorpórea en los distintitos modelos de daño hepático. Su empleo en modelos de colestasis, ha dejado patente que existe un retardo en su aclaramiento cuando se produce este tipo de alteración, lo que está estrechamente relacionado con un cambio en el perfil de expresión de las proteínas de transporte durante los procesos colestáticos.

En resumen, en esta Tesis Doctoral se han desarrollado tres sondas derivadas de ABs con propiedades fluorescentes en el rango del NIR, que permiten la monitorización hepática no invasiva de la función hepatobiliar, así como su evaluación en distintos modelos animales de daño hepático.

6. CONCLUSIONES

Conclusión primera:

La evaluación *in vitro* de una familia de compuestos, que denominamos BATKIs, obtenidos por nuestro grupo de investigación mediante la unión por química *click*, basada en reacciones de cicloadición 1,3-dipolares de Huisgen entre una molécula similar a un ácido biliar (AB), como el ácido cólico o el glicocólico y otra similar a un inhibidor de tirosina quinasa (TKI), como el erlotinib o el sorafenib, revela que la modificación química de estos agentes antimorales no disminuye significativamente su actividad citotóxica sobre células derivadas de cáncer hepático.

Conclusión segunda:

Los estudios funcionales en sublíneas celulares derivadas de carcinoma hepatocelular (HCC) modificadas genéticamente para presentar una expresión forzada y estable del transportador de aniones orgánicos OATP1B3, demuestran que los BATKIs son sustratos de esta proteína y que la presencia de la región similar a un AB les confiere la capacidad de entrar con mayor eficacia en dichas células y de ejercer en ellas un efecto citostático mayor que el que causan los TKIs sin vectorizar de los que proceden.

Conclusión tercera:

Utilizando la misma estrategia de química *click*, se ha completado la síntesis, purificación y caracterización quimicofísica de otra familia de compuestos que denominamos NIRBADs, por estar formados por la conjugación de una molécula con capacidad de emitir fluorescencia en el rango del infrarrojo cercano (NIR) con otra similar a un ácido biliar (AB), utilizando diferentes tipos de enlace y distintas posiciones del núcleo esteroide y la cadena lateral.

Conclusión cuarta:

La investigación en modelos *in vitro* e *in vivo* de tres miembros de esta familia, concretamente NIRBAD-1, NIRBAD-2 y NIRBAD-3, revela la existencia de diferencias en sus características de biodisponibilidad hepática, ya que son captados por el hígado y secretados a bilis con diferente eficacia y metabolismo, sin que esto implique, en ningún caso, la aparición de alteraciones colestáticas ni de toxicidad hepática aguda cuando se

6. CONCLUSIONES

administran a ratas anestesiadas, según revela su falta de efecto sobre el flujo biliar y sobre los niveles de los marcadores séricos de daño hepático.

Conclusión quinta:

Los estudios funcionales de transporte en células con expresión estable de un transportador hepático humano revelaron que la captación de NIRBAD-1, NIRBAD-2 y NIRBAD-3 está mediada fundamentalmente por los transportadores OATP1B3 y NTCP, con una menor contribución de OATP1B1. Dicho transporte es específico como demuestra la inhibición competitiva del mismo por los sustratos naturales de dichos transportadores.

Conclusión sexta:

El compuesto NIRBAD-1 presenta las mejores características colefílicas para su uso como sonda en estudios de funcionalidad hepatobiliar por determinación de las dinámicas de carga y aclaramiento hepático del compuesto analizadas por fluorescencia extracorpórea en animales intactos anestesiados, como lo demuestra su utilización en modelos animales de colestasis hepatocelular inducida por intoxicación por faloidina en ratas, colestasis obstructiva provocada por ligadura del conducto biliar en ratones y colangitis crónica causada por déficit genético de la expresión del transportador Mdr2.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. **Abou-Alfa GK, Meyer T, Cheng A-L, El-Khoueiry AB, Rimassa L, Ryoo B-Y, Cicin I, Merle P, Chen Y, Park J-W, Blanc J-F, Bolondi L, Klumpen H-J, Chan SL, Zagonel V, Pressiani T, Ryu M-H, Venook AP, Hessel C, Borgman-Hagey AE, Schwab G, Kelley RK.** Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 379: 54–63, 2018.
2. **Aime S, Caravan P.** Biodistribution of gadolinium-based contrast agents, including gadolinium deposition. *J Magn Reson Imaging* 30: 1259–1267, 2009.
3. **Al-Abdulla R, Lozano E, Macias RIR, Monte MJ, Briz O, O'Rourke CJ, Serrano MA, Banales JM, Avila MA, Martinez-Chantar ML, Geier A, Andersen JB, Marin JJG.** Epigenetic events involved in organic cation transporter 1-dependent impaired response of hepatocellular carcinoma to sorafenib. *Br J Pharmacol* 176: 787–800, 2019.
4. **Amisaki M, Tsuchiya H, Sakabe T, Fujiwara Y, Shiota G.** Identification of genes involved in the regulation of TERT in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 110: 550–560, 2019.
5. **Banales JM, Marin JJG, Lamarca A, Rodrigues PM, Khan SA, Roberts LR, Cardinale V, Carpino G, Andersen JB, Braconi C, Calvisi DF, Perugorria MJ, Fabris L, Boulter L, Macias RIR, Gaudio E, Alvaro D, Gradilone SA, Strazzabosco M, Marzioni M, Coulouarn C, Fouassier L, Raggi C, Invernizzi P, Mertens JC, Moncsek A, Rizvi S, Heimbach J, Koerkamp BG, Bruix J, Forner A, Bridgewater J, Valle JW, Gores GJ.** Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17: 557–588, 2020.
6. **Benedetti A, Bassotti C, Rapino K, Marucci L, Jezequel A.** A morphometric study of the epithelium lining the rat intrahepatic biliary tree. *J Hepatol* 24: 335–342, 1996.
7. **Beretta GL, Cassinelli G, Pennati M, Zuco V, Gatti L.** Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: The dual role of tyrosine kinase inhibitors as multitargeting agents. *Eur J Med Chem* 142: 271–289, 2017.
8. **Bjorkhem I.** Mechanism of degradation of the steroid side chain in the formation of bile acids. *J Lipid Res* 33: 455–471, 1992.
9. **Blanchet M, Brunel JM.** Bile Acid Derivatives: From Old Molecules to a New Potent Therapeutic Use: An Overview. *Curr Med Chem* 25: 3613–3636, 2018.
10. **Boyer JL.** Bile formation and secretion. *Compr Physiol* 3: 1035–1078, 2013.
11. **Bruix J, Cheng AL, Meinhardt G, Nakajima K, De Sanctis Y, Llovet J.** Prognostic factors and predictors of sorafenib benefit in patients with hepatocellular carcinoma: Analysis of two phase III studies. *J Hepatol* 67: 999–1008, 2017.
12. **Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A, Huang YH, Bodoky G, Pracht M, Yokosuka O, Rosmorduc O, Breder V, Gerolami R, Masi G, Ross PJ, Song T, Bronowicki JP, Ollivier-**

- Hourmand I, Kudo M, Cheng AL, Llovet JM, Finn RS.** Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised , double-blind , placebo-controlled , phase 3 trial. *Lancet* 389: 56–66, 2016.
13. **Chen B, Solis-Villa C, Hakenberg J, Qiao W, Srinivasan RR, Yasuda M, Balwani M, Doheny D, Peter I, Chen R, Desnick RJ.** Acute Intermittent Porphyrria: Predicted Pathogenicity of HMBS Variants Indicates Extremely Low Penetrance of the Autosomal Dominant Disease. *Hum Mutat* 37: 1215–1222, 2016.
14. **Chen HL, Liu YJ, Chen HL, Wu SH, Ni YH, Ho MC, Lai HS, Hsu WM, Hsu HY, Tseng HC, Jeng YM, Chang MH.** Expression of hepatocyte transporters and nuclear receptors in children with early and late-stage biliary atresia. *Pediatr Res* 63: 667–673, 2008.
15. **Chen S, Li K, Jiang J, Wang X, Chai Y, Zhang C, Deng Q, Shuai L, Feng K, Ma K, Zhang L.** Low expression of organic anion-transporting polypeptide 1B3 predicts a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *World J Surg Oncol* 18: 1–13, 2020.
16. **Cheng FW, Shefer S, Dayal B, Tint GS, Setoguchi T, Salen G, Mosbach EH.** Cholic acid biosynthesis: conversion of 5 β cholestane 3 α ,7 α ,12 α ,25 tetrol into 5 β cholestane 3 α ,7 α ,12 α ,24 β ,25 pentol by human and rat liver microsomes. *J Lipid Res* 18: 6–13, 1977.
17. **Chiang J.** Regulation of bile acid synthesis. *Front Biosci* 3: d176–d193, 1998.
18. **Chiang JYL.** Bile acid regulation of gene expression: Roles of nuclear hormone receptors. *Endocr Rev* 23: 443–463, 2002.
19. **Chiang JYL.** Bile acids: Regulation of synthesis. *J Lipid Res* 50: 1955–1966, 2009.
20. **Choi JH, Ro JY.** Combined Hepatocellular-Cholangiocarcinoma: An Update on Pathology and Diagnostic Approach. *Biomedicines* 10: 1826, 2022.
21. **Choi S, Sainz B, Corcoran P, Uprichard S, Jeong H.** Characterization of increased drug metabolism activity in dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated Huh7 hepatoma cells. *Xenobiotica* 39: 205–217, 2009.
22. **Coleman R.** Bile salts and biliary lipids. *Biochem Soc Trans* 15 Suppl: 68S–80S, 1987.
23. **Criado JJ, Herrera MC, Palomero MF, Medarde M, Rodriguez E, Marin JJG.** Synthesis and characterization of a new bile acid and platinum(II) complex with cytostatic activity. *J Lipid Res* 38: 1022–1032, 1997.
24. **Czlonkowska A, Litwin T, Dusek P, Ferenci P, Lutsenko S, Medici V, Rybakowski JK, Weiss KH, Schilsky ML.** Wilson disease. *Nat Rev Dis Prim* 4: 1–20, 2018.
25. **Dalpiazz A, Paganetto G, Pavan B, Fogagnolo M, Medici A, Beggiato S, Perrone D.** Zidovudine and ursodeoxycholic acid conjugation: Design of a new prodrug potentially able to bypass the active efflux transport systems of the central nervous system. *Mol Pharm* 9: 957–968,

7. BIBLIOGRAFÍA

- 2012.
26. **Dawson PA, Lan T, Rao A.** Thematic review series: Bile acids. Bile acid transporters. *J Lipid Res* 50: 2340–2357, 2009.
 27. **De La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, Fabre M, Chelly J, Beldjord C, Kahn A, Perret C.** Somatic mutations of the β -catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8847–8851, 1998.
 28. **De Lombaerde S, Neyt S, Kersemans K, Verhoeven J, Devisscher L, Van Vlierberghe H, Vanhove C, De Vos F.** Synthesis, in vitro and in vivo evaluation of 3β -[18F]fluorocholeic acid for the detection of drug-induced cholestasis in mice. *PLoS One* 12: e0173529, 2017.
 29. **De Waart DR, Häusler S, Vlaming MLH, Kunne C, Hänggi E, Gruss HJ, Oude Elferink RPJ, Stieger B.** Hepatic transport mechanisms of cholyl-L-lysyl-fluorescein. *J Pharmacol Exp Ther* 334: 78–86, 2010.
 30. **El-Serag HB, Rudolph KL.** Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology* 132: 2557–2576, 2007.
 31. **Fan M, Wang X, Xu G, Yan Q, Huang W.** Bile acid signaling and liver regeneration. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 1849: 196–200, 2015.
 32. **Ferraioli G, Barr RG.** Ultrasound liver elastography beyond liver fibrosis assessment. *World J Gastroenterol* 26: 3413–3420, 2020.
 33. **Finn RS, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim T-Y, Kudo M, Breder V, Merle P, Kaseb AO, Li D, Verret W, Xu D-Z, Hernandez S, Liu J, Huang C, Mulla S, Wang Y, Lim HY, Zhu AX, Cheng A-L.** Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 382: 1894–1905, 2020.
 34. **Floerl S, Kuehne A, Geyer J, Brockmoeller J, Tzvetkov M V., Hagos Y.** Functional and Pharmacological Comparison of Human and Mouse Na^+ /Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP). *SLAS Discov* 26: 1055–1064, 2021.
 35. **Foley WD, Jochem RJ.** Computed tomography. Focal and diffuse liver disease. *Radiol Clin North Am* 29: 1213–1233, 1991.
 36. **Fukase K, Ohtsuka H, Onogawa T, Oshio H, Ii T, Mutoh M, Katayose Y, Rikiyama T, Oikawa M, Motoi F, Egawa S, Abe T, Unno M.** Bile acids repress E-cadherin through the induction of Snail and increase cancer invasiveness in human hepatobiliary carcinoma. *Cancer Sci* 99: 1785–1792, 2008.
 37. **Furster C, Wikvall K.** Identification of CYP3A4 as the major enzyme responsible for 25-hydroxylation of 5β -cholestane- 3α , 7α , 12α -triol in human liver microsomes. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1437: 46–52, 1999.

38. **Galle PR, Forner A, Llovet JM, Mazzaferro V, Piscaglia F, Raoul JL, Schirmacher P, Vilgrain V.** EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 69: 182–236, 2018.
39. **Geier A, Macias RI, Bettinger D, Weiss J, Bantel H, Jahn D, Al-Abdulla R, Marin JJ.** The lack of the organic cation transporter OCT1 at the plasma membrane of tumor cells precludes a positive response to sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 8: 15846–15857, 2017.
40. **Geier A, Wagner M, Dietrich CG, Trauner M.** Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1773: 283–308, 2007.
41. **Glaser S, Gaudio E, Rao A, Pierce L, Onori P, Franchitto A, Francis H, Dostal D, Venter J, Demorrow S, Mancinelli R, Carpino G, Alvaro D, Kopriva SE, Savage JM, Alpini GD.** Morphological and functional heterogeneity of the mouse intrahepatic biliary epithelium. *Lab Invest* 89: 456–469, 2009.
42. **Gomaa AI, Khan SA, Leen ELS, Waked I, Taylor-Robinson SD.** Diagnosis of Hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 15: 1301–1314, 2009.
43. **Hagenbuch B, Meier PJ.** Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J Clin Invest* 93: 1326–1331, 1994.
44. **Hagenbuch B, Stieger B, Foguet M, Lübbert H, Meier PJ.** Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10629–10633, 1991.
45. **Hall J, Guyton A.** *Tratado de Fisiología Médica*. 12^a. Barcelona: 2011.
46. **Hamblett KJ, Jacob AP, Gurgel JL, Tometsko ME, Rock BM, Patel SK, Milburn RR, Siu S, Ragan SP, Rock DA, Borths CJ, O'Neill JW, Chang WS, Weidner MF, Bio MM, Quon KC, Fanslow WC.** SLC46A3 is required to transport catabolites of noncleavable antibody maytansine conjugates from the lysosome to the cytoplasm. *Cancer Res* 75: 5329–5340, 2015.
47. **Hata S, Wang P, Eftychiou N, Ananthanarayanan M, Batta A, Salen G, Pang KS, Wolkoff AW.** Substrate specificities of rat oatp1 and ntcp: Implications for hepatic organic anion uptake. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 285: 829–839, 2003.
48. **He YX, Guo QY.** Clinical applications and advances of positron emission tomography with fluorine-18- fluorodeoxyglucose (18F-FDG) in the diagnosis of liver neoplasms. *Postgrad Med J* 84: 246–251, 2008.
49. **Hein CD, Liu XM, Wang D.** Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. *Pharm Res* 25: 2216–2230, 2008.
50. **Herraez E, Lozano E, Macias RIR, Vaquero J, Bujanda L, Banales JM, Marin JJG, Briz O.**

7. BIBLIOGRAFÍA

- Expression of SLC22A1 variants may affect the response of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma to sorafenib. *Hepatology* 58: 1065–1073, 2013.
51. **Ho RH, Tirona RG, Leake BF, Glaeser H, Lee W, Lemke CJ, Wang Y, Kim RB.** Drug and Bile Acid Transporters in Rosuvastatin Hepatic Uptake: Function, Expression, and Pharmacogenetics. *Gastroenterology* 130: 1793–1806, 2006.
 52. **Hofmann AF, Hagey LR, Krasowski MD.** Bile salts of vertebrates: Structural variation and possible evolutionary significance. *J Lipid Res* 51: 226–246, 2010.
 53. **Houten SM, Watanabe M, Auwerx J.** Endocrine functions of bile acids. *EMBO J* 25: 1419–1425, 2006.
 54. **Hu DG, Marri S, McKinnon RA, Mackenzie PI, Meech R.** Deregulation of the genes that are involved in drug absorption, distribution, metabolism, and excretion in hepatocellular carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther* 368: 363–381, 2019.
 55. **Huang W, Ma K, Zhang J, Qatanani M, Cuvillier J, Liu J, Dong B, Huang X, Moore DD.** Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science* (80-) 312: 233–236, 2006.
 56. **Huang WC, Hsieh YL, Hung CM, Chien PH, Chien YF, Chen LC, Tu CY, Chen CH, Hsu SC, Lin YM, Chen YJ.** BCRP/ABCG2 inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma cells to sorafenib. *PLoS One* 8: e83627, 2013.
 57. **Huang Y, Sadée W.** Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells. *Cancer Lett* 239: 168–182, 2006.
 58. **Hylemon PB, Zhou H, Pandak WM, Ren S, Gil G, Dent P.** Bile acids as regulatory molecules. *J Lipid Res* 50: 1509–1520, 2009.
 59. **Izukura M, Hashimoto T, Gomez G, Uchida T, Greeley GH, Thompson JC.** Intracolonic infusion of bile salt stimulates release of peptide YY and inhibits cholecystokinin-stimulated pancreatic exocrine secretion in conscious dogs. *Pancreas* 6: 427–432, 1991.
 60. **J.G. Marin J, I.R. Macias R, Briz O, M. Banales J, J. Monte M.** Bile Acids in Physiology, Pathology and Pharmacology. *Curr Drug Metab* 17: 4–29, 2015.
 61. **Jang ES, Yoon JH, Lee SH, Lee SM, Lee JH, Yu SJ, Kim YJ, Lee HS, Kim CY.** Sodium taurocholate cotransporting polypeptide mediates dual actions of deoxycholic acid in human hepatocellular carcinoma cells: Enhanced apoptosis versus growth stimulation. *J Cancer Res Clin Oncol* 140: 133–144, 2014.
 62. **Jedlitschky G, Hoffmann U, Kroemer HK.** Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2: 351–366, 2006.
 63. **Jia W, Xie G, Jia W.** Bile acid–microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and

- carcinogenesis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15: 111–128, 2018.
64. **Joseph J.** Serum Marker Panels for Predicting Liver Fibrosis – An Update. *Clin Biochem Rev* 41: 67–73, 2020.
65. **Jouan E, Vée M Le, Denizot C, Parmentier Y, Fardel O.** Drug transporter expression and activity in human hepatoma HuH-7 Cells. *Pharmaceutics* 9, 2017.
66. **Kalra A, Yetiskul E, Wehrle C, Tuma F.** *Physiology, Liver*. StatPeals Publishing, 2022.
67. **Kang HE, Malinen MM, Saran C, Honkakoski P, Brouwer KLR.** Optimization of canalicular abc transporter function in huh-7 cells by modification of culture conditions. *Drug Metab Dispos* 47: 1222–1230, 2019.
68. **Kanno N, LeSage G, Glaser S, Alvaro D, Alpini G.** Functional heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *Hepatology* 31: 555–561, 2000.
69. **Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, Fukusumi S, Habata Y, Itoh T, Shintani Y, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M.** A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem* 278: 9435–9440, 2003.
70. **Keeffe E, Lieberman D, Krishnamurthy S, Krishnamurthy G, Gilbert S.** Primary biliary cirrhosis: Tc-99m IDA planar and SPECT scanning. *Radiology* 166: 143–148, 1988.
71. **Kehayoglou AK, Williams HS, Whimster WF, Holdsworth CD.** Calcium absorption in the normal, bile-duct ligated, and cirrhotic rat, with observations on the effect of long- and medium-chain triglycerides. *Gut* 9: 597–603, 1968.
72. **Keitel V, Burdelski M, Warskulat U, Kühlkamp T, Keppler D, Häussinger D, Kubitz R.** Expression and localization of hepatobiliary transport proteins in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* 41: 1160–1172, 2005.
73. **Kim DW, Talati C, Kim R.** Hepatocellular carcinoma (HCC): Beyond sorafenib-chemotherapy. *J Gastrointest Oncol* 8: 256–265, 2017.
74. **Köhnlein T, Welte T.** Alpha-1 Antitrypsin Deficiency: Pathogenesis, Clinical Presentation, Diagnosis, and Treatment. *Am J Med* 121: 3–9, 2008.
75. **König J, Cui Y, Nies AT, Keppler D.** Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide. *J Biol Chem* 275: 23161–23168, 2000.
76. **Koop I, Schindler M, Boßhammer A, Scheibner J, Stange E, Koop H.** Physiological control of cholecystokinin release and pancreatic enzyme secretion by intraduodenal bile acids. *Gut* 39: 661–667, 1996.
77. **Korc P, Sherman S.** ERCP tissue sampling. *Gastrointest Endosc* 84: 557–571, 2016.
78. **Korita P V., Wakai T, Shirai Y, Matsuda Y, Sakata J, Takamura M, Yano M, Sanpei A,**

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aoyagi Y, Hatakeyama K, Ajioka Y.** Multidrug resistance-associated protein 2 determines the efficacy of cisplatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 23: 965–972, 2010.
79. **Kramer W.** Transporters, Trojan horses and therapeutics: Suitability of bile acid and peptide transporters for drug delivery. *Biol Chem* 392: 77–94, 2011.
80. **Kramer W, Girbig F, Glombik H, Corsiero D, Stengelin S, Weyland C.** Identification of a Ligand-binding Site in the Na⁺/Bile Acid Cotransporting Protein from Rabbit Ileum. *J Biol Chem* 276: 36020–36027, 2001.
81. **Kramer W, Wess G.** Bile acid transport systems as pharmaceutical targets. *Eur J Clin Invest* 26: 715–732, 1996.
82. **Krishna M.** Anatomía microscópica del hígado. *Clin Liver Dis* 2: 109–112, 2013.
83. **Kucharz K, Kristensen K, Johnsen KB, Lund MA, Lønstrup M, Moos T, Andresen TL, Lauritzen MJ.** Post-capillary venules are the key locus for transcytosis-mediated brain delivery of therapeutic nanoparticles. *Nat Commun* 12: 4121, 2021.
84. **Kudo M, Finn RS, Qin S, Han KH, Ikeda K, Piscaglia F, Baron A, Park JW, Han G, Jassem J, Blanc JF, Vogel A, Komov D, Evans TRJ, Lopez C, Dutcus C, Guo M, Saito K, Kraljevic S, Tamai T, Ren M, Cheng AL.** Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* 391: 1163–1173, 2018.
85. **Kullak-Ublick GA, Glasa J, Boker C, Oswald M, Grutzner U, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ, Beuers U, Kramer W, Wess G, Paumgartner G.** Chlorambucil-taurocholate is transported by bile acid carriers expressed in human hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology* 113: 1295–1305, 1997.
86. **Kumari A, Pathak DP, Asthana S.** Bile acids mediated potential functional interaction between FXR and FATP5 in the regulation of lipid metabolism. *Int J Biol Sci* 16: 2308–2322, 2020.
87. **Lacy S, Hsu B, Miles D, Aftab D, Wang R, Nguyen L.** Metabolism and disposition of cabozantinib in healthy male volunteers and pharmacologic characterization of its major metabolites. 2015.
88. **Lam P, Soroka CJ, Boyer JL.** The bile salt export pump: clinical and experimental aspects of genetic and acquired cholestatic liver disease. *Semin Liver Dis* 30: 125–133, 2010.
89. **Lambie H, Cook AM, Scarsbrook AF, Lodge JPA, Robinson PJ, Chowdhury FU.** Tc99m-hepatobiliary iminodiacetic acid (HIDA) scintigraphy in clinical practice. *Clin Radiol* 66: 1094–1105, 2011.
90. **Larena MG, Martinez-Diez MC, Monte MJ, Dominguez MF, Pascual MJ, Marin JJG.** Liver organotropism and biotransformation of a novel platinum-ursodeoxycholate derivative, Bamet-

- UD2, with enhanced antitumour activity. *J Drug Target* 9: 185–200, 2001.
91. **Lee SE, Chang SH, Kim WY, Lim SD, Kim WS, Hwang TS, Han HS.** Frequent somatic TERT promoter mutations and CTNNB1 mutations in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 7: 69267–69275, 2016.
 92. **Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B.** Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 89: 147–191, 2009.
 93. **Leonhardt M, Keiser M, Oswald S, Kühn J, Jia J, Grube M, Kroemer HK, Siegmund W, Weitschies W.** Hepatic uptake of the magnetic resonance imaging contrast agent Gd-EOB-DTPA: role of human organic anion transporters. *Drug Metab Dispos* 38: 1024–1028, 2010.
 94. **Li J, Yang Z, Tuo B.** Role of OCT1 in hepatocellular carcinoma. *Onco Targets Ther* 12: 6013–6022, 2019.
 95. **Lim SC, Choi JE, Kang HS, Si H.** Ursodeoxycholic acid switches oxaliplatin-induced necrosis to apoptosis by inhibiting reactive oxygen species production and activating p53-caspase 8 pathway in HepG2 hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 126: 1582–1595, 2010.
 96. **Liu C, Sun Y, Yang Y, Feng Y, Xie X, Qi L, Liu K, Wang X, Zhu Q, Zhao X.** Gadobenate dimeglumine-enhanced biliary imaging from the hepatobiliary phase can predict progression in patients with liver cirrhosis. *Eur Radiol* 31: 5840–5850, 2021.
 97. **Liu H, Qin CY, Han GQ, Xu HW, Meng M, Yang Z.** Mechanism of apoptotic effects induced selectively by ursodeoxycholic acid on human hepatoma cell lines. *World J Gastroenterol* 13: 1652–1658, 2007.
 98. **Liu Y, Liu L.** Changes in the Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma in Asia. *Cancers (Basel)* 14: 4473, 2022.
 99. **Llovet JM, Castet F, Heikenwalder M, Maini MK, Mazzaferro V, Pinato DJ, Pikarsky E, Zhu AX, Finn RS.** Immunotherapies for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol* 19: 151–172, 2022.
 100. **Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, Lencioni R, Koike K, Zucman-Rossi J, Finn RS.** Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Prim* 7: 6, 2021.
 101. **Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J-F, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul J-L, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz J-F, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J.** Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 359: 378–390, 2008.
 102. **Llovet JM, Villanueva A, Marrero JA, Schwartz M, Meyer T, Galle PR, Lencioni R, Greten TF, Kudo M, Mandrekar SJ, Zhu AX, Finn RS, Roberts LR, HCC AP of E on TD in.** Trial Design and Endpoints in Hepatocellular Carcinoma: AASLD Consensus Conference. *Hepatology* 73 Suppl 1: 158–191, 2021.

7. BIBLIOGRAFÍA

103. **Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, Sangro B, Schwartz M, Sherman M, Gores G.** Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Prim* 2: 16018, 2016.
104. **Ma N, Wang Y, Zhao BX, Ye WC, Jiang S.** The application of click chemistry in the synthesis of agents with anticancer activity. *Drug Des Devel Ther* 9: 1585–1599, 2015.
105. **Malinen MM, Ito K, Kang HE, Honkakoski P, Brouwer KLR.** Protein expression and function of organic anion transporters in short-term and long-term cultures of Huh7 human hepatoma cells. *Eur J Pharm Sci* 130: 186–195, 2019.
106. **Marin JJ, Macias RI, Criado JJ, Bueno A, Monte MJ, Serrano MA.** DNA interaction and cytostatic activity of the new liver organotropic complex of cisplatin with glycocholic acid: Bamet-R2. *Int J Cancer* 78: 346–352, 1998.
107. **Marin JJ, Macias RIR, Monte MJ, Romero MR, Asensio M, Sanchez-Martin A, Cives-Losada C, Temprano AG, Espinosa-Escudero, R, Reviejo M, Bohorquez LH, Briz O.** Molecular Bases of Drug Resistance in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)* 12: 1663, 2020.
108. **Marin JJG, Barbero ER, Herrera MC, Tabernero A, Monte MJ.** Bile acid-induced modifications in DNA synthesis by the regenerating perfused rat liver. *Hepatology* 18: 1182–1192, 1993.
109. **Marin JJG, Briz O, Herraes E, Lozano E, Asensio M, Di Giacomo S, Romero MR, Osorio-Padilla LM, Santos-Llamas AI, Serrano MA, Armengol C, Efferth T, Macias RIR.** Molecular bases of the poor response of liver cancer to chemotherapy. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 42: 182–192, 2018.
110. **Marrero JA, Kulik LM, Sirlin CB, Zhu AX, Finn RS, Abecassis MM, Roberts LR, Heimbach JK.** Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 68: 723–750, 2018.
111. **Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SJ.** A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul* 5: 69–84, 1995.
112. **Martínez-Ansó E, Castillo JE, Díez J, Medina JF, Prieto J.** Immunohistochemical detection of chloride/bicarbonate anion exchangers in human liver. *Hepatology* 19: 1400–1406, 1994.
113. **Marzioni M, Glaser S, Francis H, Phinizy J, LeSage G, Alpini G.** Functional heterogeneity of cholangiocytes. *Semin Liver Dis* 22: 227–240, 2002.
114. **McGlynn KA, Petrick JL, El-Serag HB.** Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 73: 4–13, 2021.
115. **Meier P.** Transport polarity of hepatocytes. *Semin Liver Dis* 8: 293–307, 1988.

116. **Meier PJ, Stieger B.** Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* 64: 635–661, 2002.
117. **Melloni E, Marchesi E, Preti L, Casciano F, Rimondi E, Romani A, Secchiero P, Navacchia ML, Perrone D.** Synthesis and Biological Investigation of Bile Acid-Paclitaxel Hybrids. *Molecules* 27: 471, 2022.
118. **Miyake JH, Wang SL, Davis RA.** Bile acid induction of cytokine expression by macrophages correlates with repression of hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase. *J Biol Chem* 275: 21805–21808, 2000.
119. **Monte MJ, Ballesterro MR, Briz O, Perez MJ, Marin JJ.** Proapoptotic effect on normal and tumor intestinal cells of cytostatic drugs with enterohepatic organotropism. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 24–35, 2005.
120. **Monte MJ, Marin JJG, Antelo A, Vazquez-Tato J.** Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol* 15: 804–816, 2009.
121. **Müller M, Jansen PLM.** Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 272, 1997.
122. **Nallagangula KS, Nagaraj SK, Venkataswamy L, Chandrappa M.** Liver fibrosis: A compilation on the biomarkers status and their significance during disease progression. *Futur Sci OA* 4, 2018.
123. **Navacchia ML, Marchesi E, Perrone D.** Bile Acid Conjugates with Anticancer Activity: Most Recent Research. *Molecules* 26: 25, 2021.
124. **Nguyen PT, Kanno K, Pham QT, Kikuchi Y, Kakimoto M, Kobayashi T, Otani Y, Kishikawa N, Miyauchi M, Arihiro K, Ito M, Tazuma S.** Senescent hepatic stellate cells caused by deoxycholic acid modulates malignant behavior of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 146: 3255–3268, 2020.
125. **Ohya H, Shibayama Y, Ogura J, Narumi K, Kobayashi M, Iseki K.** Regorafenib is transported by the organic anion transporter 1B1 and the multidrug resistance protein 2. *Biol Pharm Bull* 38: 582–586, 2015.
126. **Ørntoft NW, Munk OL, Frisch K, Ott P, Keiding S, Sørensen M.** Hepatobiliary transport kinetics of the conjugated bile acid tracer 11C-CSar quantified in healthy humans and patients by positron emission tomography. *J Hepatol* 67: 321–327, 2017.
127. **Ozturk A, Grajo JR, Dhyani M, Anthony BW, Samir AE.** Principles of ultrasound elastography. *Abdom Radiol* 43: 773–785, 2018.
128. **Pavlović N, Goločorbin-Kon S, Đanić M, Stanimirov B, Al-Salami H, Stankov K, Mikov M.** Bile Acids and Their Derivatives as Potential Modifiers of Drug Release and Pharmacokinetic Profiles. *Front Pharmacol* 9: 1283, 2018.

7. BIBLIOGRAFÍA

129. **Poudrier J, Lettre F, Scriver CR, Larochelle J, Tanguay RM.** Different clinical forms of hereditary tyrosinemia (Type I) in patients with identical genotypes. *Mol Genet Metab* 64: 119–125, 1998.
130. **Qi X, Li W.** Unlocking the secrets to human NTCP structure. *Innovation* 3: 100294, 2022.
131. **Rappaport AM, Wilson WD.** The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). *Anat Rec* 130: 673–689, 1958.
132. **Rashighi M, Harris JE.** A Substrate Pharmacophore for the Human Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide. *Physiol Behav* 176: 139–148, 2017.
133. **Reig M, Forner A, Rimola J, Ferrer-fàbrega J, Burrel M, Garcia-criado Á, Kelley RK, Galle PR, Mazzaferro V, Sangro B, Singal AG, Vogel A, Fuster J, Bruix J.** BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. *J Hepatol* 63: 681–693, 2022.
134. **Reinhart MB, Huntington CR, Blair LJ, Heniford BT, Augenstein VA.** Indocyanine Green :Historical Context, Current Applications, and Future Considerations. *Surg Innov* 23: 166–175, 2016.
135. **Režen T, Rozman D, Kovács T, Kovács P, Sipos A, Bai P, Mikó E.** The role of bile acids in carcinogenesis. Springer International Publishing.
136. **Roberts MS, Magnusson BM, Burczynski FJ, Weiss M.** Enterohepatic circulation: Physiological, pharmacokinetic and clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 41: 751–790, 2002.
137. **Roger L, St Pyrek J, Little JM, Adcock EW.** What is meant by the term “bile acid”? *Am J Physiol* 244: 7–10, 1983.
138. **Rohacova J, Marín ML, Martínez-Romero A, Diaz L, O’Connor JE, Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell J V., Miranda MA.** Fluorescent benzofurazan-cholic acid conjugates for in vitro assessment of bile acid uptake and its modulation by drugs. *ChemMedChem* 4: 466–472, 2009.
139. **Rostovtsev V V., Green LG, Fokin V V., Sharpless KB.** A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. *Angew Chemie - Int Ed* 41: 2596–2599, 2002.
140. **Roth M, Obaidat A, Hagenbuch B.** OATPs, OATs and OCTs: The organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol* 165: 1260–1287, 2012.
141. **Ruf A, Dirchwolf M, Freeman RB.** From Child-Pugh to MELD score and beyond: Taking a walk down memory lane. *Ann Hepatol* 27: 100535, 2022.
142. **Russell DW.** The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem* 72:

- 137–174, 2003.
143. **Russmann S, Jetter A, Kullak-Ublick GA.** Pharmacogenetics of drug-induced liver injury. *Hepatology* 52: 748–761, 2010.
144. **Sanchez de Blas B, Temprano AG, Marin JJG, Romero MR.** Monitoring the hepatobiliary function using image techniques and labeled cholephilic compounds. *Explor. Dig. Dis.* (2023). doi: 10.37349/edd.2023.00015.
145. **Sangro B, Sarobe P, Hervás-Stubbs S, Melero I.** Advances in immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18: 525–543, 2021.
146. **Saran C, Fu D, Ho H, Klein A, Fallon JK, Honkakoski P, Brouwer KLR.** A novel differentiated HuH-7 cell model to examine bile acid metabolism, transport and cholestatic hepatotoxicity. *Sci Rep* 12: 14333, 2022.
147. **Šarenac TM, Mikov M.** Bile acid synthesis: From nature to the chemical modification and synthesis and their applications as drugs and nutrients. *Front Pharmacol* 9: 1–22, 2018.
148. **Schwarz C, Plass I, Fitschek F, Punzengruber A, Mittlböck M, Kampf S, Asenbaum U, Starlinger P, Stremitzer S, Bodingbauer M, Kaczirek K.** The value of indocyanine green clearance assessment to predict postoperative liver dysfunction in patients undergoing liver resection. *Sci Rep* 9: 1–7, 2019.
149. **Scoazec JY, Bringuier AF, Medina JF, Martínez-Ansó E, Veissiere D, Feldmann G, Housset C.** The plasma membrane polarity of human biliary epithelial cells: In situ immunohistochemical analysis and functional implications. *J Hepatol* 26: 543–553, 1997.
150. **Seroka B, Lotowski Z, Hryniewicka A, Rárová L, Sicinski R, Tomkiel A, Morzycki J.** Synthesis of new cisplatin derivatives from bile acids. *Molecules* 25: 655, 2020.
151. **Shao T, Josephson L, Liang SH.** PET/SPECT Molecular Probes for the Diagnosis and Staging of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Mol Imaging* 18: 1–11, 2019.
152. **Sharma B, Martin A, Zerizer I.** Positron Emission Tomography-Computed Tomography in Liver Imaging. *Semin Ultrasound, CT MRI* 34: 66–80, 2013.
153. **Sharma D, Subbarao G, Saxena R.** Hepatoblastoma. *Semin Diagn Pathol* 34: 192–200, 2017.
154. **Shefer S, Cheng FW, Dayal B, Hauser S, Tint GS, Salen G, Mosbach EH.** A 25 hydroxylation pathway of cholic acid biosynthesis in man and rat. *J Clin Invest* 57: 897–903, 1976.
155. **Shen H, Lai Y, Rodrigues AD.** Organic anion transporter 2: An enigmatic human solute carrier. *Drug Metab Dispos* 45: 228–236, 2017.
156. **Singal AG, Lampertico P, Nahon P.** Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: New trends. *J Hepatol* 72: 250–261, 2020.

7. BIBLIOGRAFÍA

157. **Singal AK.** Porphyrin cutanea tarda: Recent update. *Mol Genet Metab* 128: 271–281, 2019.
158. **Smith AJ, De Vree JML, Ottenhoff R, Oude Elferink RPJ, Schinkel AH, Borst P.** Hepatocyte-specific expression of the human MDR3 P-glycoprotein gene restores the biliary phosphatidylcholine excretion absent in Mdr2 (-/-) mice. *Hepatology* 28: 530–536, 1998.
159. **Soe ZC, Poudel BK, Nguyen HT, Thapa RK, Ou W, Gautam M, Poudel K, Jin SG, Jeong JH, Ku SK, Choi HG, Yong CS, Kim JO.** Folate-targeted nanostructured chitosan/chondroitin sulfate complex carriers for enhanced delivery of bortezomib to colorectal cancer cells. *Asian J Pharm Sci* 14: 40–51, 2019.
160. **Stieger B.** The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation. *Handb Exp Pharmacol* 201: 205–259, 2011.
161. **Stieger B, Meier Y, Meier PJ.** The bile salt export pump. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 453: 611–620, 2007.
162. **Sun D, Liu J, Wang Y, Dong J.** Co-administration of MDR1 and BCRP or EGFR/PI3K inhibitors overcomes lenvatinib resistance in hepatocellular carcinoma. *Front Oncol* 12: 944537, 2022.
163. **Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F.** Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71: 209–249, 2021.
164. **Tabibian JH, Masyuk AI, Masyuk T V., O'Hara SP, LaRusso NF.** Physiology of cholangiocytes. *Compr Physiol* 3: 541–565, 2013.
165. **Tang W, Chen Z, Zhang W, Cheng Y, Zhang B, Wu F, Wang Q, Wang S, Rong D, Reiter FP, De Toni EN, Wang X.** The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects. *Signal Transduct Target Ther* 5: 87, 2020.
166. **Thakkar N, Slizgi JR, Brouwer KLR.** Effect of Liver Disease on Hepatic Transporter Expression and Function. *J Pharm Sci* 106: 2282–2294, 2017.
167. **Tomabechi R, Kishimoto H, Sato, T., Saito N, Kiyomiya K, Takada T, Higuchi K, Shirasaka Y, Inoue K.** SLC46A3 is a lysosomal proton-coupled steroid conjugate and bile acid transporter involved in transport of active catabolites of T-DM1. *PNAS nexus* 1, 2022.
168. **Trauner M, Boyer JL.** Bile salt transporters: Molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83: 633–671, 2003.
169. **Tsoris A, Marlar CA.** *Use Of The Child Pugh Score In Liver Disease.* StatPearls Publishing, 2023.
170. **Vallejo P, Martínez De Vega V, Recio M, Jiménez M, Carrascoso J.** Difusión en resonancia

- magnética en el estudio de lesiones hepáticas. *Cir Esp* 91: 9–16, 2013.
171. **Vartak N, Guenther G, Joly F, Damle-Vartak A, Wibbelt G, Fickel J, Jörs S, Begher-Tibbe B, Friebel A, Wansing K, Ghallab A, Rosselin M, Boissier N, Vignon-Clementel I, Hedberg C, Geisler F, Hofer H, Jansen P, Hoehme S, Drasdo D, Hengstler JG.** Intravital Dynamic and Correlative Imaging of Mouse Livers Reveals Diffusion-Dominated Canalicular and Flow-Augmented Ductular Bile Flux. *Hepatology* 73: 1531–1550, 2021.
 172. **Vezakis A, Davides D, Ammori BJ, Martin IG, Larvin M, McMahon MJ.** Intraoperative cholangiography during laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endosc* 14: 1118–1122, 2000.
 173. **Wands J.** Clinical implications of basic research hepatocellular carcinoma and sex. *N Engl J Med* 357: 1974–1976, 2007.
 174. **Wang H, Feng M, Frey K, Ten Haken R, Lawrence T, Cao Y.** Predictive models for regional hepatic function based on 99mTc-IDA SPECT and local radiation dose for physiologic adaptive radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 86: 1000–1006, 2013.
 175. **Watanabe M, Houten SM, Matakai C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, Messaddeq N, Harney JW, Ezaki O, Kodama T, Schoonjans K, Bianco AC, Auwerx J.** Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 439: 484–489, 2006.
 176. **Wilkens S.** Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep* 7: 1–9, 2015.
 177. **Willatts SM.** The liver. *Curr Anaesth Crit Care* 1: 195, 1990.
 178. **Wolf E, Rich NE, Marrero JA, Parikh ND, Singal AG.** Use of Hepatocellular Carcinoma Surveillance in Patients With Cirrhosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Hepatology* 73: 713–725, 2021.
 179. **Xia X, Francis H, Glaser S, Alpini G, LeSage G.** Bile acid interactions with cholangiocytes TOPIC HIGHLIGHT. *World J Gastroenterol* World J Gastroenterol ISSN 12: 3553–3563, 2006.
 180. **Xu Z, Huang G, Gong W, Zhou P, Zhao Y, Zhang Y, Zeng Y, Gao M, Pan Z, He F.** FXR ligands protect against hepatocellular inflammation via SOCS3 induction. *Cell Signal* 24: 1658–1664, 2012.
 181. **Xu Z, Zhao SJ, Liu Y.** 1,2,3-Triazole-containing hybrids as potential anticancer agents: Current developments, action mechanisms and structure-activity relationships. *Eur J Med Chem* 183: 111700, 2019.
 182. **Yang F, Huang X, Yi T, Yen Y, Moore DD, Huang W.** Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor. *Cancer Res* 67: 863–867, 2007.
 183. **Yin W, Xiang D, Wang T, Zhang Y, Pham C V., Zhou S, Jiang G, Hou Y, Zhu Y, Han Y,**

7. BIBLIOGRAFÍA

- Qiao L, Tran PH, Duan W.** The inhibition of ABCB1/MDR1 or ABCG2/BCRP enables doxorubicin to eliminate liver cancer stem cells. *Sci Rep* 11: 10791, 2021.
184. **Zhang Y, Ruggiero M, Hagenbuch B.** OATP1B3 expression and function is modulated by coexpression with OCT1, OATP1B1, and NTCP. *Drug Metab Dispos* 48: 622–630, 2020.
185. **Zhou T, Liu Y, Lei K, Liu J, Hu M, Guo L, Guo Y, Ye Q.** Synthesis and antimicrobial activity of β -lactam-bile acid conjugates linked via triazole. *Bioorganic Med Chem Lett* 18: 2043–2047, 2008.
186. **Zhou T, Liu Y, Lei K, Liu J, Hu M, Guo L, Guo Y, Ye Q.** A “Trojan Horse” Strategy: The Preparation of Bile Acid-Modifying Irinotecan Hydrochloride Nanoliposomes for Liver-Targeted Anticancer Drug Delivery System Study. *Molecules* 28: 1577, 2023.
187. **Zhu AX, Kang YK, Yen CJ, Finn RS, Galle PR, Llovet JM, Assenat E, Brandi G, Pracht M, Lim HY, Rau KM, Motomura K, Ohno I, Merle P, Daniele B, Shin DB, Gerken G, Borg C, Hiriart JB, Okusaka T, Morimoto M, Hsu Y, Abada PB, Kudo M.** Ramucirumab after sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma and increased α -fetoprotein concentrations (REACH-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 20: 282–296, 2019.
188. **Zhu L, Shan LJ, Liu YJ, Chen D, Xiao XG, Li Y.** Ursodeoxycholic acid induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells in vitro. *J Dig Dis* 15: 684–693, 2014.
189. **Zollner G, Fickert P, Zenz R, Fuchsbichler A, Stumptner C, Kenner L, Ferenci P, Stauber RE, Krejs GJ, Denk H, Zatloukal K, Trauner M.** Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases. *Hepatology* 33: 633–646, 2001.
190. **Zollner G, Fickert P, Silbert D, Fuchsbichler A, Marschall HU, Zatloukal K, Denk H, Trauner M.** Adaptive changes in hepatobiliary transporter expression in primary biliary cirrhosis. 38: 717–727, 2003.
191. **Zolnerciks JK, Andress EJ, Nicolaou M, Linton KJ.** Structure of ABC transporters. *Essays Biochem* 50: 43–61, 2011.