

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA**



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**DESARROLLO DE MODELOS EXPERIMENTALES  
DE COLANGIOCARCINOMA Y SU UTILIZACIÓN  
EN LA INVESTIGACIÓN DEL INTERÉS DE LOS  
TRANSPORTADORES ASBT Y OCT1 EN LA  
VECTORIZACIÓN DE FÁRMACOS  
ANTITUMORALES**

**TESIS DOCTORAL**

**ELISA LOZANO ESTEBAN**

**2013**





**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA**



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**DESARROLLO DE MODELOS EXPERIMENTALES  
DE COLANGIOCARCINOMA Y SU UTILIZACIÓN  
EN LA INVESTIGACIÓN DEL INTERÉS DE LOS  
TRANSPORTADORES ASBT Y OCT1 EN LA  
VECTORIZACIÓN DE FÁRMACOS  
ANTITUMORALES**

Memoria que presenta **Dña. Elisa Lozano Esteban** para optar  
al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca

Salamanca, 13 de junio de 2013



D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> JESÚS MONTE RÍO, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "Desarrollo de modelos experimentales de colangiocarcinoma y su utilización en la investigación del interés de los transportadores ASBT y OCT1 en la vectorización de fármacos antitumorales" presentada por D<sup>a</sup>. Elisa Lozano Esteban para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. D. José Juan García Marín, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología, y la Dra. Dña. Rocío I. Rodríguez Macías, Profesora Titular del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día 13 de junio de dos mil trece.

Fdo. M<sup>a</sup> Jesús Monte Río



D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA Y DÑA. ROCÍO I. RODRÍGUEZ MACÍAS, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada "DESARROLLO DE MODELOS EXPERIMENTALES DE COLANGIOCARCINOMA Y SU UTILIZACIÓN EN LA INVESTIGACIÓN DEL INTERÉS DE LOS TRANSPORTADORES ASBT Y OCT1 EN LA VECTORIZACIÓN DE FÁRMACOS ANTITUMORALES" presentada por D<sup>a</sup>. Elisa Lozano Esteban 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, expiden y firman la presente certificación en Salamanca a 13 de junio de dos mil trece.

Fdo. José Juan García Marín

Fdo. Rocío I. Rodríguez Macías



La doctoranda ha disfrutado durante la realización de esta Tesis Doctoral de un Contrato de Investigación para la formación de personal de reciente titulación, de la Junta de Castilla y León/ Fondo Social Europeo.

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:

Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León. Proyecto SAN673SA07/08. “Puesta a punto de un método diagnóstico para la detección precoz de colangiocarcinoma en grupos de riesgo”. Investigador Principal: RI Rodríguez Macías. Periodo: 2008.

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto GR75/2008. “Resistencia a la terapia farmacológica en el tratamiento del cáncer hepático y digestivo. Investigación de los mecanismos implicados y desarrollo de un método predictivo”. Investigador Principal: JJ García Marín. Periodo: 2008-2010.

Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña. VI Convocatoria. “Investigación de nuevas dianas moleculares para la detección y la quimioterapia del colangiocarcinoma”. Investigador principal: RI Rodríguez Macías. Periodo: 2009-2012.

Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León. Proyecto BIO39/SA27/10. “Investigación de terapias vectorizadas hacia nuevas dianas moleculares características del colangiocarcinoma”. Investigador Principal: RI Rodríguez Macías. Periodo: 2010.

Dirección General de Programas y Transferencia de Conocimiento del MICINN. Proyecto SAF2010-15517. “Relación entre FXR y riesgo de carcinogénesis en tejidos del circuito enterohepático. Implicaciones terapéuticas”. Investigador principal: JJ García Marín. Periodo: 2011-2013.

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto SA070A11-2. “Valor diagnóstico e interés como diana farmacológica en el tratamiento del colangiocarcinoma del gen SLC10A2”. Investigador Principal: RI Rodríguez Macías. Periodo: 2011-2012.

Conserjería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto SA023A11-2. "Evaluación de estrategias de supresión tumoral por inducción de diferenciación celular mediante la activación de la vía de señalización regida por el gen NR1H4". Investigador Principal: MJ Monte Río. Periodo: 2011-2013.

Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León. Proyecto BIO/03/SA23/11. "Bases moleculares de la respuesta SOS mediada por el receptor nuclear FXR y su papel en la hepatocarcinogénesis". Investigador Principal: JJ García Marín. Periodo: 2011-2012.



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

Martinez-Becerra P., Vaquero J., Romero M.R., **Lozano E.**, Anadon C., Macias R.I.R., Serrano M.A., Grañe-Boladeras N., Muñoz-Bellvis L., Alvarez L., Sangro B., Pastor-Anglada M., Marin J.J.G. No Correlation between the Expression of FXR and Genes Involved in Multidrug Resistance Phenotype of Primary Liver Tumors. *Molecular Pharmaceutics* 9(6) 1693-704.

Herraez E., **Lozano E.**, Macias R.I.R., Vaquero J., Bujanda L., Banales J.M., Marin J.J.G., Briz O. The expression of *SLC22A1* variants may affect the response of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma to sorafenib. *Hepatology. En prensa.*

**Lozano E.**, Herraez E., Briz O., Robledo V., Hernandez-Iglesias J., Gonzalez-Hernandez A., Marin J.J.G. Role of the plasma membrane transporter of organic cations OCT1 and its genetic variants in modern liver pharmacology. *BioMed Research International. En prensa.*

**Lozano E.**, Sanchez-Vicente L., Monte M.J., Herraez E., Briz O., Banales J.M., Marin J.J.G., Macias R.I.R. Role of bile acids as co-carcinogenic agents in the development of cholangiocarcinoma. *Liver International* (pendiente de evaluación).

- En forma de abstract en las siguientes revistas:

**E. Lozano**, R.I.R. Macías, M.J. Monte, A.G. Blázquez, R. Rosales, J. Vaquero, M. Fernández-Dolón, J.J.G. Marín. (2010). La acumulación de ácidos biliares actúa como factor promotor de colangiocarcinogénesis en ratas. *Gastroenterología y Hepatología*, **23**, 134-135.

**E. Lozano**, P. Martinez-Becerra, M.A. Serrano, M.R. Romero, N. Grañe, L. Trigueros-Motos, A. Del Rio, I. Monte, F.J. Casado, M. Molina-Arcas, L. Alvarez, L. Muñoz-Bellvis, M. Pastor-Anglada, J.J.G. Marin. (2010). Usefulness of microfluidic cards to predict resistance to anticancer chemotherapy in liver tumours. *Journal of Hepatology*, 52 (Suppl.) S225.

M.R. Romero, P. Martínez-Becerra, M.A. Serrano, R.I.R. Macías, **E. Lozano**, C. Anadón, N. Grañé, L. Trigueros-Motos, I. Monte, F.J. Casado, M. Molina-Arcas, L. Alvarez, B. Sangro, L. Muñoz-Bellvís, M. Pastor-Anglada, J.J.G. Marín. (2011). Análisis retrospectivo de la huella genética relativa a genes implicados en la resistencia a la quimioterapia antitumoral en colangiocarcinoma, hepatoblastoma y hepatocarcinoma. *Gastroenterología y Hepatología*, **24**, 133-134

**E. Lozano**, M.J. Monte, S. Jiménez, B. Castaño, F. Jiménez, F. González-San Martín, J.J.G. Marín, R.I.R. Macías. (2012). La proteína ASBT podría utilizarse en el tratamiento del colangiocarcinoma como diana para la vectorización de derivados citostáticos de ácidos biliares. *Gastroenterología y Hepatología*, **35**, 195-196

**E. Lozano**, O. Briz, E. Herráez, R.I.R. Macías, V.S. Robledo, H. Hernández-Iglesias, A. González-Hernández, L. Bujanda, J.M. Banales y J.J.G. Marín. (2013). Papel de la aparición de variantes genéticas del transportador de cationes orgánicos OCT1 en la falta de respuesta del carcinoma hepatocelular y del colangiocarcinoma al sorafenib. *Gastroenterología y Hepatología*, **36** (Espec Congr 1), 8.

E. Herraez, O. Briz, **E. Lozano**, R.I.R. Macías, V. Sánchez-Robledo, J. Hernández-Iglesias, A. González-Hernández, L. Bujanda, J.M. Banales, J.J.G. Marín. (2013). The magnitude of the response of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma to sorafenib is affected by the expression of inactivating variants in the *SLC22A1* gene. *Journal of Hepatology* (Suppl. N°1) **58**, S431-S432

- Han sido presentados en los siguientes congresos:

Congreso: Congreso Anual de la Fundación/Asociación Española para el estudio del Hígado. Madrid (2010).

Autores: **E. Lozano**, R.I.R. Macías, M.J. Monte, A.G. Blazquez, R. Rosales, J. Vaquero, M. Fernández-Dolón, J.J.G. Marín

Título: La acumulación de ácidos biliares actúa como factor promotor de colangiocarcinogénesis en ratas.

Tipo de comunicación: Póster

Congreso: 45<sup>th</sup> annual meeting of the European Association for the Study of the Liver. Viena (Austria) (2010).

Autores: **E. Lozano**, P. Martínez-Becerra, M.A. Serrano, M.R. Romero, N. Grañé, L. Trigueros-Motos, A. del Río, I. Monte, F.J. Casado, M. Molina-Arcas, L. Álvarez, L. Muñoz-Bellvís, M. Pastor-Anglada, J.J.G. Marín.

Título: Usefulness of microfluidic cards to predict resistance to anticancer chemotherapy in liver tumours.

Tipo de comunicación: Póster

Congreso: XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba (2010).

Autores: C. Anadón, **E. Lozano**, P. Martínez-Becerra, N. Grañé, L. Trigueros-Motos, F.J. Casado, M. Molina-Arcas, J. F. Medina, L. Muñoz-Bellvis, M. Pastor-Anglada, M.A. Serrano, J.J.G. Marín, R.I.R. Macías

Título: Utilización de "Taqman Low Density Arrays" (TLDA) para la determinación del nivel de expresión de proteínas transportadoras de fármacos en el colangiocarcinoma.

Tipo de comunicación: Póster

Congreso: IV Jornadas Científicas del CIBERhd. Barcelona (2010).

Autores: M.R. Romero, P. Martínez-Becerra, M.A. Serrano, R.I.R. Macías, **E. Lozano**, N. Grañé, L. Trigueros-Motos, I. Monte, F.J. Casado, M. Molina-Arcas, L. Alvarez, B. Sangro, L. Muñoz-Bellvis, M. Pastor-Anglada, J.J.G. Marín.

Título: Análisis mediante TLDA de la expresión de genes implicados en la resistencia a la quimioterapia antitumoral en carcinoma hepatocelular, hepatoblastoma y colangiocarcinoma.

Tipo de comunicación: Póster

Congreso: XXXVI Congreso anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid (2011).

Autores: M.R. Romero, P. Martínez-Becerra, M.A. Serrano, R.I.R. Macías, **E. Lozano**, C. Anadón, N. Grañé, L. Trigueros-Motos, F. J. Casado, M. Molina-Arcas, L. Alvarez, B. Sangro, L. Muñoz-Bellvis, M. Pastor-Anglada, J.J.G. Marín.

Título: Análisis retrospectivo de la huella genética relativa a genes implicados en la resistencia a la quimioterapia antitumoral en colangiocarcinoma, hepatoblastoma y hepatocarcinoma.

Tipo de comunicación: Oral

Congreso: XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Barcelona (2011).

Autores: **E. Lozano**, M.J. Monte, S. Jiménez, B. Castaño, F. Jiménez, F. González-San Martín, J.J.G. Marín, R.I.R. Macías.

Título: Evaluación in vitro de la utilidad de derivados de ácidos biliares en el tratamiento del colangiocarcinoma.

Tipo de comunicación: Oral

Congreso: V Jornadas Científicas del CIBERhd. Barcelona (2011).

Autores: **E. Lozano**, M.J. Monte, S. Jiménez, B. Castaño, F. Jiménez, F. González-San Martín, J.J.G. Marín, R.I.R. Macías.

Título: Evaluación in vitro de la utilidad de derivados de ácidos biliares en el tratamiento del colangiocarcinoma.

Tipo de comunicación: Póster

Congreso: XXXVII Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid (2012).

Autores: **E. Lozano**, M.J. Monte, S. Jiménez, B. Castaño, F. Jiménez, F. González-San Martín, J.J.G Marín, R.I.R Macías.

Título: La proteína ASBT podría utilizarse en el tratamiento del colangiocarcinoma como diana para la vectorización de derivados citostáticos de ácidos biliares.

Tipo de comunicación: Póster

Congreso: Falk Symposium 184. XXII International Bile Acid Meeting. Viena (Austria) (2012)

Autores: R.I.R Macías, **E. Lozano**, M.J. Monte, L. Sánchez-Vicente, E. Herráez, O. Briz, J.J.G Marín.

Título: Role of bile acids as cocarcinogenic agents in the development of cholangiocarcinoma.

Tipo de comunicación: Póster

Congreso: VI Jornadas Científicas del CIBERehd. Barcelona (2012).

Título: Role of bile acids as cocarcinogenic agents in the development of cholangiocarcinoma.

Autores: R.I.R Macías, **E. Lozano**, M.J. Monte, L. Sánchez-Vicente, E. Herráez, A.G. Blazquez, O. Briz, J. Banales, L. Bujanda, J.J.G Marín.

Título: Role of bile acids as cocarcinogenic agents in the development of cholangiocarcinoma.

Tipo de comunicación: Póster. (Premiado "Mejor comunicación tipo póster")

Congreso: XXXVIII Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid (2013).

Autores: **E. Lozano**, O. Briz, E. Herráez, R.I.R. Macías, V. Sánchez-Robledo, J. Hernández-Iglesias, A. González-Hernández, L. Bujanda, J.M. Banales, J.J.G. Marín.

Título: Papel de la aparición de variantes genéticas del transportador de cationes orgánicos OCT1 en la falta de respuesta del carcinoma hepatocelular y del colangiocarcinoma al sorafenib.

Tipo de comunicación: Oral

Congreso: 48<sup>th</sup> annual meeting of the European Association for the Study of the Liver. Amsterdam (Holanda) (2013).

Autores: E. Herraez, O. Briz, **E. Lozano**, R.I.R. Macías, V. Sánchez-Robledo, J. Hernández-Iglesias, A. González-Hernández, L. Bujanda, J.M. Banales, J.J.G. Marín.

Título: The magnitude of the response of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma to sorafenib is affected by the expression of inactivating variants in the *SLC22A1* gene.

Tipo de comunicación: Póster.

Congreso: XXXVI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid. (2013).

Autores: **E. Lozano**, E. Herráez, R.I.R. Macías, J. Vaquero, L. Bujanda, J.M. Banales, J.J.G. Marín, O. Briz.

Título: Papel de las mutaciones del gen *SLC22A1* que codifica el transportador humano de cationes orgánicos OCT1 en la falta de respuesta del cáncer hepático al sorafenib.

Tipo de comunicación: Oral (Ponencia invitada).

Congreso: Falk Symposium "Liver Diseases in 2013: Advances in Pathogenesis and Treatment". Londres. (2013).

Autores: R.I.R. Macías, Sanchez-Vicente L, E. Herráez, O. Briz, **E. Lozano**, J. Vaquero, A.G. Blazquez, M.A. Serrano, L. Bujanda, J.M. Banales, J.J.G. Marín.

Título: Role of *SLC22A1* gene in the response of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma to sorafenib.

Tipo de comunicación: Póster.



## AGRADECIMIENTOS:

Todos estos años de trabajo y dedicación no hubieran dado sus frutos sin la ayuda de muchas personas a las que quiero expresar mi agradecimiento.

A mis directores de Tesis:

Al Dr. José Juan García Marín, por permitirme formar parte de este magnífico equipo, por los conocimientos que me ha transmitido, por su ayuda y por su confianza en mí.

A la Dra. Rocío I. Rodríguez Macías, por sus consejos, su paciencia, por ofrecerme su tiempo en todo momento y por su organización y entusiasmo por el trabajo bien hecho.

Al resto de miembros del grupo:

A la Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Serrano por su interés, su amabilidad y sus consejos siempre sabios.

A la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Monte, por todos los consejos que me ha dado a lo largo de estos años, por sus ideas y por su gran ayuda en la realización de experimentos *in vivo* y con algunas de las determinaciones analíticas.

Al Dr. Óscar Briz, por su gran apoyo, por ampliarme el mundo de la Biología Molecular, por prestarme amablemente su tiempo y su ayuda, sus consejos, y su optimismo que hace que parezcan fáciles las cosas que no lo son tanto.

A la Dra. M<sup>a</sup> José Pérez García, por tener siempre tiempo para ayudar, por su buen humor, y por ser un ejemplo del “buen hacer” en el laboratorio.

A la Dra. Marta Rodríguez Romero, por su simpatía y buen humor, por su ayuda con el mantenimiento del banco de células, y por su paciencia con la organización de los incontables viales de clones celulares generados.

A la Dra. Alba M. García Blázquez, por su compañerismo, por sus buenos consejos, por su ayuda desinteresada, los momentos compartidos en el laboratorio y su cariño.

A la Dra. Elisa Herráez, mi tocaya, por las comidas y “las sobremesas” en el Departamental, por su buen humor, por el tiempo compartido y por todo lo que me ha transmitido en estos años.

Al Dr. Javier Vaquero, por su simpatía, sus ideas, por su disposición para echar una mano cuando hace falta, y por su ayuda técnica en el “tuneado” de la Tesis.

A la Dra. Ester González, por todo este tiempo que hemos compartido, por los buenos momentos en los “cafés” de media tarde, por su gran amabilidad y compañerismo dentro y fuera del laboratorio, por su ayuda con los trámites de finalización de la Tesis y otras tantas cosas más...

A Laura Sánchez, por su simpatía, por los buenos ratos compartidos y por contagiar su risa y su buen humor a pesar de ser la “heredera del gafe” con los experimentos. ¡Cumpliré mi deuda de unas fiestas en “Viti”!

Al resto de compañeros del grupo con los que he tenido la suerte de coincidir: Emma, Carlos, Pablo, Rubén, Olivia, Carmen... por todos los buenos momentos compartidos.

A las nuevas incorporaciones, “mi teginanda” Alex J, Lara, Alex P., Alicia, Alex M., Laura Gómez, Lawrence, Andrés... por su simpatía, por sus ganas de aprender, por todos los buenos ratos pasados dentro y fuera del laboratorio, y por transmitir el entusiasmo y las energías con las que empezar.

Al departamento de Bioquímica y Biología Molecular por permitirme el uso de sus instalaciones.

A M<sup>a</sup> Isabel Hernández por su excelente trabajo en la secretaría. A los técnicos y auxiliares de laboratorio que han facilitado el trabajo día a día, en especial a Narci por contagiar su alegría y su sentido del humor. Al personal del Servicio de Experimentación Animal por el cuidado de los animales y su amabilidad.

Y a todas las personas que fuera de este laboratorio han contribuido de una u otra manera a que este trabajo se complete.

A mis amigos de la Facultad, por el tiempo y los buenos momentos compartidos que hacen tan memorables los años de la carrera.



A todos mis amigos, por haber estado siempre a mi lado, en especial a “mis chicas de Monforra” con las que he compartido momentos inolvidables, por sobrarle ideas con las que evadirme del trabajo en tantas ocasiones.

A Germán, por su paciencia, comprensión y apoyo diario, que han hecho que fueran más llevaderos los días de estrés y duro trabajo de estos últimos años.

Y en especial, a mi pequeña pero gran familia, mis padres, mi hermano y mi abuela, por su cariño, por su apoyo y su confianza incondicionales, que me han ayudado a llegar hasta aquí.

A todos, ¡Muchas gracias!



## *DEDICADA A:*

*Mi abuelo Isidoro, y a mi tío Helio, que  
siempre estarán en mi corazón.*





## ABREVIATURAS

**$\alpha$ -SMA:** Actina  $\alpha$  de músculo liso  
**aa:** Aminoácido  
**ABC:** "ATP Binding Cassette"  
**ADN:** Ácido desoxirribonucleico  
**ADNc:** ADN complementario  
**AFP:**  $\alpha$ -fetoproteína  
**ALT:** Alanina-aminotransferasa  
**AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico  
**ASBT:** "Apical Sodium-dependent Bile acid Transporter"  
**AST:** Aspartato-aminotransferasa  
**AP:** Fosfatasa alcalina  
**ARN:** Ácido ribonucleico  
**ARNm:** ARN mensajero  
**ATC:** Ácido taurocólico  
**BCRP:** "Breast Cancer Resistance Protein"  
**BDL:** Ligadura del conducto biliar común  
**CDCA:** Ácido quenodesoxicólico  
**CGC:** Colangiocarcinoma  
**CK-7:** Citokeratina-7  
**Ct:** Ciclo umbral  
**CYP:** Enzimas citocromo P450  
**DAPI:** 4,6-diamino-2-fenilindol  
**DCA:** Ácido desoxicólico  
**DMSO:** Dimetilsulfóxido  
**dNTPs:** Desoxirribonucleótidos trifosfato  
**ECL:** "Enhanced ChemiLuminiscence"  
**EEM:** Error estándar de la media  
**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico  
**EGFR:** Receptor para el factor de crecimiento epidérmico  
**FBS:** Suero bovino fetal  
**FITC-GC:** Colil-glicil-isotiocianato de fluoresceína  
**fs:** "Frameshift mutation"  
**FXR:** "Farnesoid X receptor"  
**GAPDH:** Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa  
**GCDCA:** Ácido glicoquenodesoxicólico  
**GGT:** gamma-glutamil transferasa  
**GST:** Glutati3n-S-transferasa  
**GUDCA:** Ácido glicoursodesoxicólico  
**HB:** Hepatoblastoma  
**HBV:** Virus de la hepatitis B  
**HCC:** Carcinoma hepatocelular  
**HCV:** Virus de la hepatitis C  
**HNF:** Factor hepatocitario nuclear  
**IL-6:** Interleucina-6  
**IP:** Ioduro de propidio  
**kb:** Kilobase

**KDa:** Kilodalton  
**LCA:** Ácido litocólico  
**MAF:** Frecuencia alélica menor  
**MAPK:** "Mitogen-activated proteinkinases"  
**MC:** Medio de captación  
**MDR:** Resistencia a múltiples drogas  
**MOC:** Mecanismos de quimiorresistencia  
**MP:** Medio de preincubación  
**MPP<sup>+</sup>:** 1-Metil-4-fenilpiridinium  
**MRP:** Proteína asociada a resistencia a múltiples drogas  
**OATP:** Polipéptido transportador de aniones orgánicos  
**OCT:** Transportador de cationes orgánicos  
**ORF:** "Open reading frame"  
**PAGE:** Electroforesis en gel de agarosa  
**pb:** Pares de bases  
**PBS:** Tampón fosfato salino  
**p.c.:** Peso corporal  
**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa  
**PDGFR:** Receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas  
**Pm:** Peso molecular  
**RT:** Transcripción reversa  
**RTKs:** Receptores de tirosina kinasa  
**SDS:** Dodecil sulfato sódico  
**SHP:** "Small heterodimer partner"  
**SNP:** "Single nucleotide polymorphisms"  
**TAA:** Tioacetamida  
**TAE:** Tampón Tris-Ácido acético-EDTA  
**TASO:** Tioacetamida-sulfóxido  
**TASO<sub>2</sub>:** Tioacetamida-S,S-dióxido  
**TEA:** Tetraetilamonio  
**TEMED:** N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina  
**TKIs:** Inhibidores de tirosina kinasa  
**TLDAs:** ("Taqman Low Density Arrays") o tarjetas microfluídicas  
**TMD:** Dominio transmembrana  
**Tris:** Trishidroximetilaminometano  
**UAF:** Unidades arbitrarias de fluorescencia  
**UDCA:** Ácido ursodesoxicólico  
**UTR:** "Untranslated region"  
**VEGF:** Factor de crecimiento vasculo-endotelial  
**VEGFR:** Receptor para el factor de crecimiento vasculo-endotelial  
**WT:** "wild type"

## DEFINICIONES DE TÉRMINOS ESPECÍFICOS UTILIZADOS:

<b>Término</b>	<b>Definición</b>
<i>Frecuencia alélica</i>	Número de copias de un alelo concreto dividido entre el número de copias de todos los alelos del locus en una población
<i>Frecuencia alélica menor (MAF)</i>	Frecuencia de aparición del alelo menos común en una población.
<i>“Frameshift mutation” (fs)</i>	Mutación que altera el marco de lectura, por una inserción o delección de nucleótidos que altera la secuencia de los tripletes del ADN.
<i>Heterocigosidad</i>	Presencia de dos alelos diferentes para un mismo gen
<i>Homocigosidad</i>	Presencia de un único alelo del gen
<i>“Missense mutation”</i>	Mutación puntual en la cual el cambio en un solo nucleótido provoca la traducción de un aminoácido diferente
<i>Mutación silenciosa</i>	Mutación que no cambia el aminoácido de la secuencia proteica.
<i>Mutación neutra o conservativa</i>	Mutación que causa la traducción de un aminoácido diferente pero químicamente similar.
<i>“Nonsense mutation”</i>	Mutación puntual en la secuencia del ADN que resulta en la formación de un codón de STOP prematuro.
<i>Polimorfismo o variante genética</i>	Cada uno de los múltiples alelos de un gen en la población, que normalmente expresan fenotipos diferentes.
<i>“Single nucleotide polymorphism” (SNP)</i>	Variación en la secuencia del ADN causada normalmente por el cambio de un solo nucleótido
<i>“Splicing” alternativo</i>	Proceso de edición post-transcripcional tras la síntesis del ARNm que puede dar lugar a varias formas de ARNm maduro.





# ÍNDICE

<b>1. OBJETIVOS</b> .....	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1. SISTEMA HEPATOBILIAR</b> .....	<b>7</b>
2.1.1. Generalidades .....	7
2.1.2. Hepatocitos .....	7
2.1.3. Colangiocitos .....	8
2.1.4. Otros tipos celulares hepáticos .....	10
<b>2.2. FUNCIONES DEL SISTEMA HEPATOBILIAR</b> .....	<b>10</b>
2.2.1. Funciones del hígado .....	10
2.2.2. Funciones del sistema colangiolar .....	11
2.2.3. Conductos biliares y producción de bilis .....	12
2.2.4. Circulación enterohepática de los ácidos biliares .....	13
2.2.5. Funciones de los ácidos biliares .....	14
2.2.6. Papel de los transportadores de ácidos biliares en la circulación enterohepática .....	15
<b>2.3. CÁNCER HEPÁTICO</b> .....	<b>16</b>
2.3.1. Hepatocarcinoma .....	17
2.3.2. Colangiocarcinoma .....	18
<b>2.4. PAPEL DEL TRANSPORTOMA EN LA RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL EN CÁNCER HEPÁTICO</b> .....	<b>26</b>
2.4.1. Transportadores implicados en la captación de fármacos (MOC-1a) .....	28

2.4.1.1. El transportador de ácidos biliares ASBT.....	30
2.4.1.2. El transportador de cationes orgánicos OCT1.....	33
<b>2.5. PAPEL DE LOS INHIBIDORES TIROSINA-KINASA EN LA TERAPIA ANTITUMORAL EN CÁNCER HEPÁTICO .....</b>	<b>40</b>
2.5.1. Ruta RAF/MEK/ERK .....	40
2.5.2. Antitumorales inhibidores de tirosina kinasas; Sorafenib .....	41
2.5.2. Otros fármacos inhibidores de la actividad tirosina kinasa .....	44
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1. MATERIAL BIOLÓGICO .....</b>	<b>49</b>
3.1.1. Muestras humanas.....	49
3.1.2. Animales.....	49
3.1.3. Líneas celulares.....	50
3.1.4. Bacterias .....	50
<b>3.2. PRODUCTOS .....</b>	<b>51</b>
<b>3.3. MEDIOS INSTRUMENTALES .....</b>	<b>54</b>
<b>3.4. EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> .....</b>	<b>58</b>
3.4.1. Grupos experimentales utilizados en el modelo de CGC .....	58
3.4.2. Experimentos <i>in vivo</i> de captación de FITC-GC en ratas con CGC .....	59
3.4.3. Estudios <i>in vivo</i> de captación de derivados de platino en CGC de rata ..	60
3.4.4. Estudios de capacidad tumorigénica en ratones nude.....	61
<b>3.5. CULTIVOS CELULARES .....</b>	<b>61</b>
3.5.1. Cultivo de células para estudios de expresión génica .....	62

3.5.2. Cultivo de células para estudios de funcionalidad de proteínas transportadoras .....	63
3.5.3. Estudios de viabilidad celular .....	63
3.5.4. Transfección con lípidos catiónicos .....	63
3.5.4.1. Transfección transitoria para estudios de captación .....	64
3.5.4.2. Transfección transitoria para estudios de viabilidad celular .....	64
3.5.4.3. Transfección transitoria para estudios de localización subcelular de variantes de OCT1 por inmunofluorescencia .....	64
<b>3.6. AISLAMIENTO DE CÉLULAS HEPÁTICAS DE RATA .....</b>	<b>65</b>
<b>3.7. EXPERIMENTOS DE CAPTACIÓN EN LÍNEAS CELULARES .....</b>	<b>67</b>
3.7.1. Experimentos de captación de [ <sup>3</sup> H]-TCA .....	67
3.7.2. Experimentos de captación de [ <sup>14</sup> C]-TEA .....	68
3.7.3. Experimentos de captación de derivados de platino en células Alexander .....	69
<b>3.8. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ARNm POR RT-PCR CUANTITATIVA .....</b>	<b>69</b>
3.8.1. Extracción del ARN total .....	69
3.8.2. Transcripción reversa (RT) .....	70
3.8.3. Diseño de cebadores .....	70
3.8.4. Realización de la PCR cuantitativa .....	71
3.8.5. Cuantificación relativa .....	72
3.8.6. Tarjetas microfluídicas .....	72
<b>3.9. MÉTODOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR .....</b>	<b>73</b>
3.9.1. PCR de alta fidelidad .....	73
3.9.2. Electroforesis en gel de agarosa .....	73

3.9.2.1. Geles de agarosa desnaturalizantes .....	73
3.9.2.1. Geles de agarosa no desnaturalizantes .....	73
3.9.3. Métodos de clonación .....	74
3.9.3.1. Clonación por recombinación Gateway .....	74
3.9.4. Obtención de las variantes de OCT1 por mutagénesis dirigida .....	77
3.9.5. Síntesis <i>in vitro</i> del ARNm de las variantes de OCT1 .....	78
<b>3.10. EXPERIMENTOS EN OOCITOS DE XENOPUS LAEVIS .....</b>	<b>79</b>
3.10.1. Extracción y selección de los oocitos .....	79
3.10.2. Microinyección del ARNm en los oocitos .....	80
3.10.3. Experimentos de captación en oocitos .....	80
3.10.3.1. Captación de [ <sup>14</sup> C]-TEA en oocitos .....	80
3.10.3.2. Captación de sorafenib en oocitos .....	81
<b>3.11. BÚSQUEDA DE VARIANTES GENÉTICAS DE OCT1 POR SECUENCIACIÓN .....</b>	<b>81</b>
<b>3.12. BÚSQUEDA SELECTIVA DE VARIANTES INACTIVANTES DE OCT1 POR PCR-Q .....</b>	<b>82</b>
<b>3.13. DETECCIÓN DE VARIANTES DE OCT1 GENERADAS POR “SPLICING” ALTERNATIVO .....</b>	<b>84</b>
<b>3.14. ESTUDIOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO .....</b>	<b>85</b>
<b>3.15. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT .....</b>	<b>87</b>
3.15.1. Obtención de las muestras .....	87
3.15.2. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida .....	87
3.15.3. Inmunodetección .....	88
<b>3.16. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA .....</b>	<b>89</b>

3.16.1. Preparación de muestras .....	89
3.16.2. Inmunodetección .....	89
<b>3.17. ESTUDIO HISTOLÓGICO. MICROSCOPIA ÓPTICA .....</b>	<b>90</b>
<b>3.18. DETERMINACIONES ANALÍTICAS .....</b>	<b>90</b>
3.18.1. Parámetros bioquímicos en suero .....	90
3.18.2. Determinación de ácidos biliares en suero por fluorescencia .....	90
3.18.3. Valoración del ARN por el método del RiboGreen .....	90
3.18.4. Determinación de proteínas totales .....	90
3.18.5. Determinación de la viabilidad celular .....	91
3.18.6. Determinación de radiactividad .....	91
3.18.7. Medida de sorafenib por HPLC-MS-MS .....	91
3.18.8. Determinación de la actividad luciferasa .....	92
3.18.9. Determinación de la actividad caspasa 3 y 8 .....	92
3.18.10. Determinación de platino por absorción atómica .....	93
<b>3.19. PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA TERCIARIA DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>93</b>
<b>3.20. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO .....</b>	<b>94</b>
<b>Tabla Anexo Material y Métodos .....</b>	<b>95</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>97</b>
<b>4.1. MODELOS EXPERIMENTALES DE COLANGIOCARCINOGENESIS EN RATAS .....</b>	<b>99</b>
4.1.1. Modelo de colangiocarcinogénesis por administración de TAA en ratas .....	100

4.1.2. Efecto de la colestasis sobre la progresión del CGC .....	110
4.1.2.1. Análisis de la proliferación colangiolar mediante la evaluación de marcadores de CGC (CK-7 y Claudina-4) .....	114
4.1.2.2. Expresión de GSTpi y GST $\alpha$ en el desarrollo de tumores colangiulares .....	116
4.1.2.2. Evaluación de la especificidad del modelo de administración de TAA en la formación de CGCs .....	117
4.1.3. Expresión de Neu en el desarrollo de tumores colangiulares .....	119
4.1.4. Análisis de la apoptosis/proliferación en el desarrollo de tumores colangiulares .....	121
4.1.5. Evaluación del papel de la inflamación mediado por IL-6 en el desarrollo de tumores colangiulares .....	123
4.1.3. Expresión del receptor de ácidos biliares TGR5 en el desarrollo de tumores colangiulares .....	124
<b>4.2. EVALUACIÓN DE LA POTENCIAL UTILIDAD DE DERIVADOS CITOSTÁTICOS DE ÁCIDOS BILIARES EN EL TRATAMIENTO DEL CGC .....</b>	<b>129</b>
4.2.1. Expresión de ASBT en CGC y captación de ácidos biliares .....	131
4.2.2. Captación de Bamet-UD2 en tumores de CGC de rata .....	134
4.2.3. Obtención y caracterización de líneas celulares de CGC de rata .....	137
4.2.4. Efecto citostático del Bamet-UD2 en el CGC .....	142
4.2.5. Actividad de bombas de eflujo en líneas de CGC de rata y humano .....	147
4.2.6. Efecto de inhibidores de bombas de eflujo sobre el potencial citostático del Bamet-UD2 en líneas celulares de CGC de rata y humano .....	151
4.2.7. Captación de [ $^3$ H]-TCA en líneas celulares de CGC de rata y humano .....	153
4.2.8. Papel de ASBT en la captación celular de Bamet-UD2 .....	154

4.2.9. Expresión de sistemas transportadores con potencial para la captación de Bamet-UD2 por el colangiocito .....	156
4.2.10. Papel del OCT1 en la captación celular de Bamet-UD2 .....	157
4.2.11. Incorporación de platino en células transfectadas con OCT1 o con Asbt .....	159
4.2.12. Expresión de Oct1 en tumores de CGC de rata .....	160
<b>4.3. PAPEL DE OCT1 EN LA RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL EN EL CÁNCER HEPÁTICO .....</b>	<b>163</b>
4.3.1. Papel del transportador OCT1 en la captación de sorafenib .....	165
4.3.2. Detección de variantes del transportador OCT1 en tumores hepáticos .....	169
4.3.3. Nuevas variantes genéticas del OCT1 detectadas en biopsias de pacientes de HCC y CGC .....	173
4.3.4. Búsqueda de variantes de OCT1 generadas por un “splicing” alternativo .....	175
4.3.5. Capacidad transportadora de las variantes de OCT1 .....	180
4.3.6. Consecuencias estructurales de las nuevas variantes genéticas de OCT1 .....	183
4.3.7. Localización subcelular de las variantes genéticas de OCT1 .....	184
4.3.8. Relación entre la capacidad transportadora de OCT1 y la sensibilidad al sorafenib .....	188
4.3.9. Screening de SNPs inactivantes, y variantes de “splicing” alternativo de OCT1 en un mayor número de HCCs y CGCs .....	195
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>199</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>203</b>



# 1. OBJETIVOS



Los tumores hepáticos constituyen el quinto tipo de cáncer más frecuente y son la tercera causa de muerte por esta enfermedad. El carcinoma hepatocelular (HCC), derivado de los hepatocitos, y el colangiocarcinoma (CGC), derivado de los colangiocitos, son los tumores hepáticos primarios malignos más frecuentes.

Aunque el número de casos de CGC es menor que el de HCC, el CGC presenta una incidencia creciente y una alta tasa de mortalidad, debido en parte a la dificultad de diagnosticarlo, y a que las opciones terapéuticas son muy limitadas.

El sorafenib es un fármaco citostático con actividad inhibidora de tirosina kinasa, que ha mostrado una potente actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* frente al HCC y al CGC. Sin embargo, el éxito de este agente antitumoral, como sucede con otros fármacos quimioterapéuticos, se ve reducido por la falta de respuesta de algunos pacientes por la pre-existencia o la aparición de quimiorresistencia durante el tratamiento, lo que supone junto a los efectos secundarios en otros tejidos, uno de los principales problemas en la lucha farmacológica contra el cáncer.

Puesto que la mayoría de los fármacos tienen carácter de iones orgánicos y por lo tanto poseen propiedades hidrofílicas, se requiere la participación de proteínas transportadoras localizadas en la membrana plasmática para que sean incorporados al interior celular. Una reducción en la expresión o actividad de los transportadores implicados en la captación de fármacos citostáticos por las células tumorales, puede suponer una disminución de su efecto terapéutico. Las proteínas de la familia SLC ("Solute Carriers"), que se encuentran expresadas en las células tumorales derivadas de tejido hepático, pueden determinar las concentraciones intracelulares de determinados compuestos y, por tanto, son claves para su actividad antitumoral.

En nuestro grupo de investigación se han desarrollado derivados citostáticos, denominados Bamets, sintetizados por la unión del platino con una o varias moléculas de ácidos biliares, para dotarles de carácter organotrópico y reducir la toxicidad inespecífica. Con algunos compuestos de esta familia se han obtenido buenos resultados en ensayos preclínicos realizados en modelos *in vitro* e *in vivo* de HCC.

Basándonos en estos antecedentes nos planteamos como **objetivo global de esta Tesis Doctoral** desarrollar modelos experimentales que permitan profundizar en la investigación del CGC, así como evaluar el papel de las proteínas transportadoras ASBT y OCT1 en la vectorización de fármacos antitumorales como los Bamets hacia células colangiolares, y la implicación de OCT1 en la falta de respuesta al sorafenib en HCC y CGC.

Para alcanzar este objetivo general diseñamos los siguientes objetivos parciales:

**Objetivo 1º:** Obtener un modelo experimental de colangiocarcinogénesis en ratas, para su utilización en la investigación de nuevos marcadores tumorales y fármacos más eficaces frente al CGC.

**Objetivo 2º:** Profundizar en la investigación de la etiopatogénesis del CGC, evaluando el papel de los ácidos biliares acumulados en situaciones de colestasis en la progresión de la colangiocarcinogénesis en ratas.

**Objetivo 3º:** Establecer y caracterizar líneas de CGC con utilidad como modelo *in vitro* para la investigación del uso de estrategias de vectorización de fármacos hacia células tumorales de origen colangiolar.

**Objetivo 4º:** Evaluar el efecto citostático *in vitro* de fármacos antitumorales derivados de ácidos biliares, como el Bamet-UD2, y el papel de los transportadores ASBT y OCT1 como dianas para la vectorización de dichos fármacos hacia células tumorales de origen colangiolar.

**Objetivo 5º:** Investigar el papel de la reducción en la expresión y la presencia de mutaciones inactivantes en el gen *SLC22A1*, que codifica el transportador de cationes orgánicos OCT1, en la quimiorresistencia del CGC y el HCC al sorafenib.

## **2. INTRODUCCIÓN**



## 2.1. SISTEMA HEPATOBILIAR

### 2.1.1. Generalidades

El hígado es la víscera más voluminosa del organismo (representa un 2,5% del peso de un adulto sano) y una de las más importantes en cuanto a actividad metabólica. Está localizado en la región del hipocondrio derecho del abdomen. Macroscópicamente está dividido en tres lóbulos. Normalmente, es de consistencia blanda y depresible, y está recubierto por una cápsula fibrosa.

El sistema biliar incluye las unidades secretoras del hígado, el canalículo biliar, ductos biliares (canales de Hering), ductos biliares intrahepáticos, ductos biliares extrahepáticos, el conducto hepático común, el conducto cístico, la vesícula biliar y el conducto biliar común. Todos los vertebrados poseen un tracto biliar, pero no todos poseen vesícula biliar, cuya función como órgano accesorio del sistema digestivo es participar en la circulación enterohepática de la bilis, mediante el almacenamiento y concentración de compuestos biliares a través de la eliminación de agua e intercambio de electrolitos (Diamond, 1962) (Dietschy *et al.*, 1964).

Las células mayoritarias en el hígado son los hepatocitos, células epiteliales parenquimáticas, que se disponen dejando entre sí espacios vasculares heterogéneos llamados sinusoides. Además, encontramos otros espacios intercelulares, los canalículos biliares, formados por invaginaciones de la membrana de los hepatocitos. Los canalículos biliares convergen en conductillos y éstos en conductos biliares contenidos en los espacios porta, que contienen también vasos linfáticos y paquetes nerviosos (Feldmann, 1986).

### 2.1.2. Hepatocitos

Los hepatocitos son las células mayoritarias del hígado y llevan a cabo la mayoría de las funciones metabólicas de este órgano. En número representan un 60% de los tipos celulares hepáticos mientras que ocupan aproximadamente el 80% del volumen del órgano (Figura I-1). Estas células poseen una polaridad muy marcada, distinguiéndose tres regiones de distinta especificidad morfológica y funcional en la membrana plasmática (Evans, 1980) (Meier, 1988):

- Membrana sinusoidal: orientada hacia el polo sanguíneo (espacio de Disse). Esta membrana está formada por microvellosidades que crean una elevada superficie de intercambio.

- Membrana lateral: es la membrana situada entre hepatocitos colindantes. Contiene estructuras celulares cuya función es mantener la conexión mecánica y funcional entre los hepatocitos adyacentes como las “tight junctions”, desmosomas y “gap junctions” (Meier, 1988).
- Membrana canalicular: es una invaginación de la superficie de la membrana plasmática del hepatocito, que al unirse a la del hepatocito adyacente, forma el canalículo biliar. Esta membrana también presenta numerosas microvellosidades hacia la luz canalicular.

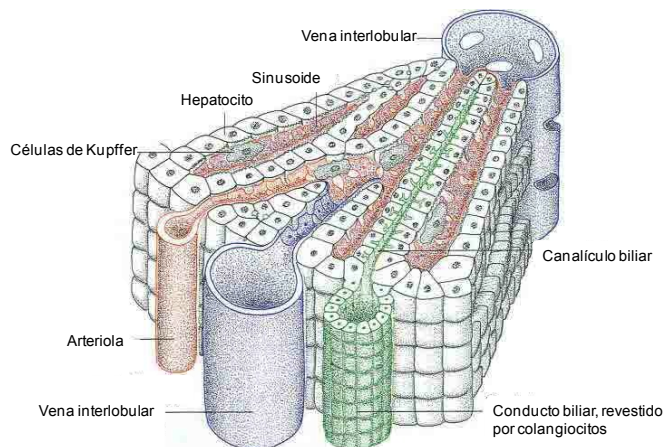


Figura I-1: Estructura tridimensional de un lóbulo hepático (Adaptación de Adams *et al.*, 2006).

### 2.1.3. Colangiocitos

Además de los hepatocitos, en el hígado existe otro tipo de célula epitelial, los colangiocitos (Figura I-1), que aunque representan una pequeña proporción del total de células que forman el hígado (entre un 3 y un 5%) juegan un papel fisiológico importante en la funcionalidad de este órgano.

Los colangiocitos forman el sistema biliar ductal. Este sistema se ha dividido en conductos biliares extrahepáticos e intrahepáticos; aunque existe otra clasificación que los divide en conductos biliares grandes y pequeños (Kanno *et al.*, 2000).

En el hígado humano se ha clasificado el epitelio biliar intrahepático en base al diámetro de los conductos (Ludwig, 1987) en pequeños dúctulos biliares (o colangiololes terminales) (< 15  $\mu\text{m}$ ), ductos interlobulares (15-100  $\mu\text{m}$ ), ductos septales (100-300  $\mu\text{m}$ ), ductos de área (300-400  $\mu\text{m}$ ), ductos segmentados (400-800  $\mu\text{m}$ ) y ductos hepáticos (>800  $\mu\text{m}$ ) (Ludwig, 1987). Este complejo entramado forma progresivamente estructuras mayores hasta que convergen en los ductos biliares extrahepáticos, los cuales finalmente vierten la bilis a la vesícula biliar y, posteriormente, al intestino.



Los colangiocitos que forman el sistema biliar ductal, que consiste en la porción del canalículo (0,5-2  $\mu\text{m}$ ), forman una red tridimensional que se continúa con los ductos biliares o canales de Hering, recubiertos por 3-4 colangiocitos que a la vez presentan uniones con los hepatocitos (uniones ductal-canaliculares) (Gaudio *et al.*, 2009) (Gaudio *et al.*, 1980) (Carpino *et al.*, 1981).

En ratas, estudios morfológicos en cortes de hígado y con unidades de conductos biliares intrahepáticos aislados (Alpini *et al.*, 1996; Kanno *et al.*, 2000) han mostrado que el epitelio biliar está formado por conductos y colangiocitos de diversos tamaños. Además, se ha encontrado una relación directa entre el área del colangiocito y el diámetro externo del conducto biliar, demostrándose que los pequeños conductos (<15  $\mu\text{m}$  de diámetro externo) están rodeados por colangiocitos pequeños (8  $\mu\text{m}$  de diámetro) (Alpini *et al.*, 1996; Alpini *et al.*, 1997), mientras que los conductos mayores (>15  $\mu\text{m}$  de diámetro) están rodeados por colangiocitos grandes (15  $\mu\text{m}$  de diámetro) (Alpini *et al.*, 1996; Alpini *et al.*, 1997; Benedetti *et al.*, 1996).

Atendiendo a esta heterogénea distribución morfológica del epitelio biliar, la estructura del sistema biliar se puede asemejar a la forma de un árbol, donde los conductos común y hepático corresponderían al tronco, los conductos biliares intrahepáticos corresponderían a las ramas más grandes, y los pequeños ductos se corresponderían con las hojas del árbol (Masyuk *et al.*, 2001).

El canal de Hering es un canal localizado en la unión ductulo-hepatocelular, rodeado en parte por hepatocitos y en parte por colangiocitos, que representa la unión fisiológica del árbol biliar con el sistema canalicular hepatocitario. Los canales de Hering tienen continuidad directa con los colangiolos terminales, los cuales representan la primera estructura tubular completamente rodeada de colangiocitos. Estos pequeños ductos están rodeados por 4 ó 5 colangiocitos que se caracterizan por tener una morfología cuboidal, con una membrana basal, "tight junctions" entre células adyacentes y microvellosidades que protegen el lumen biliar (Benedetti *et al.*, 1996).

Los colangiocitos pequeños y grandes comparten características estructurales, como la presencia de núcleo multilobulado, numerosas vesículas en la región subapical, "tight junctions", alta densidad de microvellosidades y lisosomas, y pocas mitocondrias (Benedetti *et al.*, 1996). Se ha descrito que los colangiocitos también poseen un cilio primario (Larusso *et al.*, 2011) (Ishii *et al.*, 1989) en su membrana apical, que desempeña funciones sensoriales y tiene un importante papel regulando

las actividades biológicas de los colangiocitos, incluyendo la diferenciación celular, la proliferación y la secreción (Masyuk *et al.*, 2003; Vroman *et al.*, 1996).

Además, los colangiocitos presentan diferencias fenotípicas según si se localizan rodeando los pequeños o grandes ductos. En cuanto a la morfología, los colangiocitos de mayor tamaño tienen una forma más columnar mientras que los pequeños son cuboidales. Los colangiocitos pequeños muestran un alto ratio núcleo/citoplasma, en contraste con los colangiocitos de los grandes ductos que poseen un núcleo relativamente pequeño y un abundante citoplasma. Un rico aparato de Golgi es detectable entre el polo apical y el núcleo, sin embargo, el retículo endoplasmático rugoso es escaso en los ductos más pequeños, y aumenta un poco en los ductos más grandes (Benedetti *et al.*, 1996).

En los colangiocitos podemos distinguir una membrana apical y una membrana basolateral, y entre células adyacentes podemos observar “tight junctions” que se localizan en la proximidad del dominio apical (Vroman *et al.*, 1996).

Anatómicamente, los conductos biliares están dispuestos paralelos con una rama de la vena porta y con una o dos ramas de la arteria hepática, dando sentido anatómico a la asociación representada en la microarquitectura hepática como la triada portal.

#### **2.1.4. Otros tipos celulares hepáticos**

Además de los hepatocitos y colangiocitos, en el hígado existen células endoteliales fenestradas (que recubren los sinusoides hepáticos y permiten un intercambio directo entre la sangre y los hepatocitos), células de Ito (o células estrelladas, que almacenan vitamina A, sintetizan diferentes proteínas del tejido conectivo y secretan factores de crecimiento) y células de Kupffer, responsables de la fagocitosis de bacterias y sustancias extrañas que puedan acceder al sinusoide (Guyton, 2000) (Michalopoulos *et al.*, 1997).

## **2.2. FUNCIONES DEL SISTEMA HEPATOBILIAR**

### **2.2.1. Funciones del hígado**

El hígado desempeña múltiples funciones en el organismo, entre las que destacan:

- Metabolismo de hidratos de carbono: homeostasis de la glucosa sérica, catabolismo de hexosas, gluconeogénesis, glucogenolisis y glucogenogénesis.

- Metabolismo de lípidos: síntesis y catabolismo de colesterol, producción de triglicéridos y ácidos grasos, síntesis y metabolismo de lipoproteínas plasmáticas,  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, producción de cuerpos cetónicos durante el ayuno.
- Metabolismo de proteínas: síntesis de proteínas plasmáticas, transformación del amonio en urea, catabolismo de bases púricas y pirimidínicas, interconversión de aminoácidos no esenciales.
- Producción de bilis: el hígado excreta la bilis al duodeno, donde desempeña un papel fundamental en la digestión de los alimentos y absorción de nutrientes.
- Síntesis de factores de coagulación como el fibrinógeno, factores III, V, VII, IX y XI. También sintetiza el grupo hemo.
- Almacén de múltiples sustancias como glucosa en forma de glucógeno, vitamina B12, hierro y cobre.
- Destoxificación y otras reacciones de biotransformación: en mamíferos adultos el hígado es el responsable de la eliminación a bilis de un gran número de compuestos con estructuras químicas diferentes denominados compuestos colefílicos. Algunos de ellos son endógenos, como los ácidos biliares y pigmentos biliares hemoderivados; mientras que otros muchos son xenobióticos.

### 2.2.2. Funciones del sistema colangiolar

A pesar de que representan una pequeña proporción de las células del hígado, los colangiocitos juegan un importante papel fisiológico, modificando la composición de la bilis durante el tránsito de la misma a través de los conductos biliares. Así, los colangiocitos pueden llevar a cabo procesos de secreción y absorción de agua, electrolitos y otros solutos orgánicos de la bilis (Alpini *et al.*, 2001a).

La heterogeneidad morfológica del sistema biliar está estrictamente asociada con la gran variedad de diferentes funciones que pueden llevar a cabo los colangiocitos de los distintos niveles del árbol biliar. Además de conducir la bilis hasta el intestino, los colangiocitos están activamente implicados en la producción de bilis mediante procesos de absorción y secreción. En humanos, alrededor del 40% de la producción de bilis total es de origen ductal. Las funciones secretoras están principalmente realizadas por los colangiocitos que rodean los ductos interlobulares, septales y ductos de gran tamaño, que presentan sistemas de transporte iónico apropiados, así como receptores hormonales en determinados dominios de la membrana plasmática.

Otras funciones biológicas se asocian a los colangiocitos que rodean las ramas de los ductos biliares de menor tamaño, como la plasticidad (capacidad de adquirir limitados cambios fenotípicos), la reactividad (habilidad para participar en procesos inflamatorios), y su capacidad para actuar como células hepáticas progenitoras tras un daño hepático (Sell, 2001).

### **2.2.3. Conductos biliares y producción de bilis**

La producción de bilis es un proceso biológico complejo, en el cual la función de los colangiocitos está finamente ligada a la de los hepatocitos. Los hepatocitos producen la bilis canalicular primaria que es modificada por los colangiocitos a través de una secuencia de procesos secretores y absortivos que ajustan el flujo biliar y lo alcalinizan según las necesidades fisiológicas. Estos procesos están regulados por hormonas. Así, la cantidad de fluido y la secreción de  $\text{HCO}_3^-$  están determinados por la integración de actividades prosecretoras inducidas por secretina (Strazzabosco, 1997), glucagón (Lenzen *et al.*, 1997), péptido intestinal vasoactivo (Cho *et al.*, 1999b), acetilcolina (Alvaro *et al.*, 1997), bombesina (Cho *et al.*, 1999a), y con señales antisecretoras mediadas por somatostatina (Gong *et al.*, 2003), insulina (Lesage *et al.*, 2002), gastrina (Glaser *et al.*, 2003), y endotelina-1 (Caligiuri *et al.*, 1998). Estas diferentes señales interactúan a nivel de la adenilatociclasa, la enzima transmembrana reguladora de la concentración intracelular de AMPc por conversión del ATP.

Cuando llega un estímulo para la secreción (por ejemplo, secretina), hay un incremento en los niveles intracelulares de AMPc/PKA, lo cual lleva a la fosforilación del CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), que estimula el eflujo de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$ , y por otro lado inhibe la absorción de  $\text{H}^+$  por el NHE-3 (isoforma 3 del intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) mediada por  $\text{Na}^+$  (Mennone *et al.*, 2001). El  $\text{Cl}^-$  que efluye al lumen ductal actúa como fuerza conductora para el intercambiador de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  que exporta  $\text{HCO}_3^-$  al lumen del conducto biliar.

Una vez que la secreción iónica ha sido estimulada y hay un gradiente osmótico establecido, el agua sigue el gradiente, ya sea por comunicaciones paracelulares, o a través de canales de agua específicos, denominados aquaporinas (Marinelli *et al.*, 1999).

Las funciones secretoras del epitelio biliar están también reguladas por mecanismos paracrinós a través de moléculas secretadas por los hepatocitos y contenidas en la bilis canalicular (como sales biliares, glutatión, y nucleótidos

purinérgicos), los cuales actúan a través de receptores de membrana expresados en los colangiocitos.

Además, el epitelio biliar está implicado en la reabsorción de algunos constituyentes biliares, como la glucosa y el glutatión, y en el funcionamiento de la circulación enterohepática, en la cual los colangiocitos son capaces de captar ácidos biliares desde la bilis por su cara apical, mediante un transportador dependiente de  $\text{Na}^+$  (ASBT), y luego secretan los ácidos biliares al plexo vascular peribiliar, que está adyacente a los ductos biliares, principalmente mediante dos transportadores; el t-ASBT, una isoforma truncada de ASBT, y la proteína MRP3.

#### 2.2.4. Circulación enterohepática de los ácidos biliares

La síntesis de los ácidos biliares tiene lugar en el retículo endoplásmico liso de los hepatocitos. Son secretados a bilis, alcanzan el intestino, donde desempeñan su función de emulsión, digestión y absorción de grasas de la dieta, son reabsorbidos en el íleon para pasar a sangre portal y finalmente son recaptados por los hepatocitos, completándose así la llamada circulación enterohepática, que comprende el circuito hepatocito - bilis - intestino - sangre portal - hepatocito. En este ciclo se intercala la vesícula biliar, donde se almacenan y concentran los ácidos biliares por reabsorción de  $\text{H}_2\text{O}$  y electrolitos. Allí permanecen a la espera de un estímulo adecuado como la ingesta de alimentos, especialmente si son ricos en grasas, lo que hace que se libere la colecistoquinina, hormona que estimula el vaciamiento. Al alcanzar el íleon, la mayoría de los ácidos biliares son reabsorbidos activamente, pero un porcentaje de ellos se recaptan pasivamente en el yeyuno (ácidos biliares dihidroxilados conjugados con glicina) (Angelin *et al.*, 1976) y otra fracción se reabsorbe pasivamente en el colon (ácidos biliares libres desconjugados por las bacterias intestinales) (Mekhjian *et al.*, 1979). Esta eficaz recaptación hepática consigue que sólo se pierdan diariamente en heces entre 50 y 500 mg de estas moléculas, lo que constituye menos del 5% del total, que suele ser de 3 a 5 g.

Hace unos años, se describió un circuito intrahepático que se denominó **circuito colehepático**, en el que los ácidos biliares pueden también ser reabsorbidos por los colangiocitos del árbol biliar facilitando la eliminación de los mismos. Así, los ácidos biliares pueden pasar del canalículo del hepatocito al interior del colangiocito, son secretados por su dominio basolateral y de aquí entran en los plexos capilares periductales que están en contacto con el sinusoides hepatocitario, para ser de nuevo reabsorbidos por el hepatocito donde pueden ser resecretados a bilis, promoviendo una secreción biliar adicional (Yoon *et al.*, 1986). Se ha propuesto que esta ruta puede

ser importante en condiciones de colestasis, sirviendo de mecanismo para atenuar los elevados niveles intracelulares de ácidos biliares, o mejorar el flujo biliar desde el hígado (Kosters *et al.*, 2010).

### **2.2.5. Funciones de los ácidos biliares**

En el intestino:

- Los ácidos biliares juegan un importante papel en la digestión y la absorción intestinal de las grasas de la dieta y de las vitaminas liposolubles (A, E, D y K), formando micelas que permiten su emulsión.
- Activan las lipasas intestinales.
- Aceleran el transporte de lípidos.
- Modulan la motilidad intestinal y la secreción de hormonas gastrointestinales como la colecistoquinina (Combettes *et al.*, 1992).
- Inducen además la secreción de agua y electrolitos.

En el hígado:

- Generan la fracción del flujo biliar dependiente de ácidos biliares, que es el resultado del efecto osmótico de estas moléculas en la luz canalicular, como consecuencia del transporte de dichas moléculas a través del hepatocito y su secreción desde el interior del mismo a la bilis.
- Estimulan la contracción canalicular, que colabora en el bombeo de la bilis hacia los conductos colectores del sistema biliar.
- Inducen la secreción biliar de lípidos, principalmente fosfolípidos y colesterol.
- Modulan, al menos en parte, la biosíntesis de colesterol, ya que cuando aumenta la síntesis de estas moléculas origina un aumento también en la síntesis o en la utilización de colesterol como molécula precursora.
- Regulan el número de receptores de membrana para las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que determinan a la larga los niveles de estas moléculas en el plasma.

En la bilis:

- Forman micelas para transportar sustancias hidrofóbicas como el colesterol, las protoporfirinas, etc.
- Actúan como soluciones amortiguadoras para el  $\text{Ca}^{2+}$  (Hofmann, 1988).

Otras funciones: Algunos estudios han descrito que los ácidos biliares pueden funcionar como moléculas señalizadoras en gran variedad de células, y que pueden alterar funciones celulares como la proliferación, diferenciación, secreción o la apoptosis (Ahrendt *et al.*, 2000; Boberg *et al.*, 2000; Furubo *et al.*, 1999; Isa *et al.*, 2002; Tannapfel *et al.*, 2000). Se ha demostrado que la captación celular de los ácidos biliares es necesaria para los procesos de señalización celular. Tras su entrada al interior celular, los ácidos biliares, a concentraciones menores a 1  $\mu\text{mol/L}$ , alteran el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y las rutas de PKC, MEK, ERK y PI3K tanto en hepatocitos como en colangiocitos (Kang *et al.*, 1999; Levi *et al.*, 1991; Tada *et al.*, 1992). Además, los ácidos biliares inducen la activación (mediante fosforilación) del receptor EGF en los hepatocitos (Levi *et al.*, 1991) y en colangiocitos (Hodge *et al.*, 2005).

#### **2.2.6. Papel de los transportadores de ácidos biliares en la circulación enterohepática**

A pH fisiológico los ácidos biliares conjugados con taurina o glicina están en forma aniónica y son incapaces de cruzar las membranas por difusión, por lo que son totalmente dependientes de un sistema de proteínas de membrana transportadoras para la entrada y salida de las células hepáticas (Hofmann, 2007). Además, la secreción de los ácidos biliares a la bilis se realiza en contra de gradiente de concentración, lo cual requiere un sistema de transporte activo. La reabsorción de ácidos biliares en el intestino y en el hígado también se realiza a través de transportadores de membrana que regulan la homeostasis de los mismos, y son los principales encargados de mantener el flujo de la circulación enterohepática. Los transportadores más relevantes son las proteínas NTCP (Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide), BSEP (Bile Salt Export Pump), ASBT (Apical Sodium Bile salt Transporter) y el heterodímero OST $\alpha/\beta$  (Organic Solute Transporter  $\alpha$  y  $\beta$ ).

Los ácidos biliares conjugados presentes en la circulación enterohepática son captados por el hepatocito desde la sangre portal (sinusoide) por un transporte de alta afinidad y dependiente de sodio que realiza el transportador NTCP (gen *SLC10A1*), y también pueden ser incorporados al hepatocito por transportadores independientes de sodio denominados OATPs (Organic Anion Transporters Polypeptides) que captan compuestos orgánicos anfipáticos, incluidos los ácidos biliares conjugados y no conjugados (Kullak-Ublick *et al.*, 2004).

Los ácidos biliares conjugados de la circulación enterohepática, junto con los ácidos biliares nuevamente sintetizados en el hepatocito, son liberados al canalículo para su secreción en la bilis. Esta secreción ocurre en contra de gradiente, ya que la concentración de los ácidos biliares en el lumen del canalículo es de 100 a 1000 veces mayor a la presente en el citoplasma del hepatocito (Meier *et al.*, 2002). Esta secreción está mediada principalmente por la bomba dependiente de ATP BSEP (gen *ABCB11*).

Una vez que los ácidos biliares llegan al intestino son reabsorbidos en el íleon terminal por un transportador dependiente de sodio localizado en la membrana apical de los ileocitos, el ASBT (gen *SLC10A2*) (Wong *et al.*, 1994). Los ácidos biliares serán de nuevo liberados del epitelio intestinal hacia la sangre portal cerrando así el ciclo mediante el transportador heterodimérico OST $\alpha/\beta$ . OST $\alpha$  y OST $\beta$  sólo funcionan como heterodímeros, y están localizados en la membrana basolateral de los ileocitos, colangiocitos y hepatocitos (Ballatori *et al.*, 2005). Su papel es devolver los ácidos biliares a la circulación, tanto en el intestino, como en el hígado. Su importancia en la localización intestinal es muy relevante en condiciones fisiológicas puesto que envía a los ácidos biliares de nuevo hacia la circulación enterohepática, mientras que su importancia a nivel hepático es de más interés en situaciones de colestasis, ya que sirve para proteger al hepatocito de una elevada acumulación intracelular de ácidos biliares que podrían resultar tóxicos.

En los colangiocitos también encontramos transportadores de ácidos biliares que intervienen fundamentalmente en la circulación colehepática. Así, el transportador ASBT está implicado en la reabsorción de ácidos biliares desde la bilis, y el heterodímero OST $\alpha/\beta$  se encarga de liberar los ácidos biliares hacia la sangre sinusoidal.

### **2.3. CÁNCER HEPÁTICO**

Los tumores hepáticos constituyen el quinto tipo de cáncer más frecuente y son la tercera causa de muerte por cáncer (9,2% del total), por detrás del cáncer de pulmón (18,2%) y el cáncer de estómago (9,7%) (Ferlay *et al.*, 2010). Se pueden clasificar según su origen en: primarios, derivados de células hepáticas; y secundarios, debidos a metástasis de tumores originados en otros tejidos, frecuentemente tumores colorrectales (Benson, 2007). Atendiendo a la gravedad del pronóstico, se pueden clasificar en: benignos (como el hemangioma, adenoma colangiocelular, cistadenoma biliar, adenoma hepatocelular y hemangioendotelioma infantil, entre otros); y malignos, como el carcinoma hepatocelular (HCC), hepatoblastoma (HB) y colangiocarcinoma



(CGC). Además, aunque su frecuencia es muy baja (entre un 1 y un 4% de los tumores hepáticos primarios), en algunas ocasiones aparecen tumores mixtos HCC-CGC, que combinan características de ambos tipos (Aoki *et al.*, 1993) (Maeda *et al.*, 1995).

La existencia de varios tipos de tumores hepáticos primarios y el amplio rango de tejidos desde los cuales pueden liberarse células metastatizadas que alcanzan el hígado, son la causa de que la biología de los tumores que afectan al hígado sea muy diversa. Además la situación se complica por la presencia de una alta variabilidad inter-individual y el hecho de que la sensibilidad/resistencia a los fármacos antitumorales pueda cambiar durante la evolución del tumor (Marin, 2008).

### 2.3.1. Hepatocarcinoma

El HCC, o tumor maligno derivado de los hepatocitos, es el tipo más común de cáncer hepático primario. Más de 700.000 casos de esta enfermedad fueron diagnosticados en el año 2008, con una incidencia mundial de unos 16 casos por cada 100.000 habitantes (Ferlay *et al.*, 2010). De modo general, la mayoría de los pacientes con HCC, presentan en su historial alguna enfermedad hepática crónica con diversas causas. El mayor factor de riesgo para desarrollar HCC es la cirrosis hepática, así el 70-90% de los HCCs se desarrollan en hígados con cirrosis macronodular (Sherman, 2010).

#### Epidemiología y etiología

La mayoría de los casos de HCC (80%) se presentan en Asia oriental y en África sub-sahariana, donde el mayor factor de riesgo es la infección crónica con el virus de la hepatitis B (HBV), que se asocia con el 50% del total de casos de HCC (Sherman, 2010), junto con la exposición a la aflatoxina B1. Por el contrario, en América del Norte, Europa y Japón, la infección con el virus de la hepatitis C (HCV) es el principal factor de riesgo, junto con el consumo de alcohol (El-Serag, 2011).

#### Patogenia

La hepatocarcinogénesis es un proceso complejo de múltiples pasos en el cual muchas rutas de señalización celular pueden estar alteradas, lo que hace que esta enfermedad tenga a un perfil molecular heterogéneo.

Las principales mutaciones afectan al gen *TP53* (presentes entre un 25-40% de los cánceres, dependiendo del estadio), y al gen para la  $\beta$ -catenina (sobre el 25% de los tumores, sobretodo los HCC relacionados con la infección por HCV).

También se han descrito mutaciones en oncogenes, y en genes supresores de tumores, alteraciones epigenéticas, y modulación de la transcripción de oncogenes por miARNs (Ji *et al.*, 2009) (Farazi *et al.*, 2006). El resultado de estas alteraciones es la activación de cascadas de señalización relacionadas con la supervivencia celular y la proliferación. Una de las cascadas más frecuentemente alteradas es la ruta de proliferación iniciada por el EGFR (receptor del factor de crecimiento epitelial) mediada por Ras, que está activada en más del 50% de los HCCs (Villanueva *et al.*, 2007).

### **Diagnóstico**

La aparición de los síntomas clínicos del HCC (malestar o dolor abdominal, hepatomegalia, ictericia, pérdida de peso y fiebre) se asocian con una fase avanzada del tumor, con lo que las posibilidades de curación se ven reducidas.

Los métodos más empleados para su detección incluyen la determinación de los niveles séricos del marcador tumoral  $\alpha$ -fetoproteína (AFP), y técnicas de imagen como la ultrasonografía.

### **Tratamiento**

Hasta la fecha, no hay estudios robustos realizados para evaluar la efectividad de los tratamientos utilizados en los estadios iniciales de la enfermedad, y tampoco se ha comparado el potencial curativo de estos métodos con el desarrollo de la enfermedad en ausencia de tratamientos. Sin embargo, algunas opciones como la resección quirúrgica, el trasplante hepático, radiofrecuencia, y el tratamiento sistémico con sorafenib, han mostrado un beneficio en la supervivencia de los pacientes con HCC (Forner *et al.*, 2012).

Salvo en algunos casos de supervivencia prolongada de pacientes con HCC no tratado, por lo general el pronóstico de esta enfermedad es funesto. La muerte de los pacientes con este tipo de tumor sobreviene entre 1 y 4 años en función del tipo de HCC y de su historia natural, sin embargo, como el diagnóstico de la enfermedad suele detectarse tarde, muchos pacientes fallecen semanas o meses tras la detección clínica.

### **2.3.2. Colangiocarcinoma**

#### **Generalidades**

El CGC es un cáncer maligno que se origina en los colangiocitos que recubren las vías biliares (Olmes *et al.*, 2004). Representa aproximadamente el 2% de todos los

cánceres descritos (Jarnagin *et al.*, 2001), y alrededor del 3% de los tumores gastrointestinales (Patt *et al.*, 2001). Es el segundo tipo de cáncer hepático más frecuente, después del HCC, y los estudios epidemiológicos indican que su incidencia está aumentando en todo el mundo en los últimos años (Shaib *et al.*, 2004b) (Cardinale *et al.*, 2010).

Esta forma de cáncer tiene una prevalencia ligeramente superior en hombres que en mujeres, y afecta principalmente a pacientes entorno a los 70 años de vida, aunque puede desarrollarse antes en personas que se encuentran en los grupos de mayor riesgo: pacientes con hepatopatías como colangitis esclerosante primaria, hepatolitiasis, fibrosis hepática congénita, enfermedad de Caroli, infecciones víricas y parasitarias por trematodos de los géneros *Clonorchis* u *Opisthorchis*, o que han estado expuestos a carcinógenos (Lazaridis *et al.*, 2005) (Khan *et al.*, 2005) (Patel, 2006) (Shaib *et al.*, 2005).

La mayoría de los CGCs (60-70%) se localizan en la zona de la bifurcación de la vía biliar y se les denomina tumores de Klatskin (Klatskin, 1965). La mayor parte de estos tumores (80%) se infiltran en el parénquima hepático de forma directa o longitudinalmente siguiendo el recorrido de los conductos biliares. El conducto biliar extrahepático es el sitio de localización del 20-30% de los casos, mientras que los CGCs localizados en el parénquima hepático representan el 5-10% de estos tumores (Bismuth *et al.*, 1975). Tanto los CGCs como los tumores de la vesícula biliar son afecciones del tracto biliar, pero actualmente se consideran tipos de tumores distintos. Un hecho común en estos pacientes es el desarrollo de una colestasis crónica asociada con una obstrucción progresiva de las vías biliares que es responsable de la ictericia, el signo más frecuente (84% de los casos) en el momento del diagnóstico (Aljiffry *et al.*, 2009).

Los CGCs son generalmente tumores de crecimiento lento que se diseminan localmente a través del sistema linfático. Las manifestaciones clínicas dependen de la localización del tumor y no son específicas, generalmente aparece dolor abdominal, pérdida de peso y debilidad, además de ictericia, prurito y coluria relacionadas con la obstrucción biliar (Shimoda *et al.*, 2007).

El tratamiento y el pronóstico a largo plazo también dependen en gran medida de la localización de las masas tumorales; así, las lesiones con un peor pronóstico son aquellas que se localizan próximas a los conductos extrahepáticos. Las opciones de tratamiento para la mayoría de los pacientes con CGC son limitadas a pesar de los

importantes avances que se han conseguido en los últimos años en la terapia frente al cáncer (Khan *et al.*, 2005; Lazaridis *et al.*, 2005; Patel, 2006; Shaib *et al.*, 2005). La terapia de elección, y la única que ofrece una cura potencial, es la extirpación quirúrgica, sin embargo, no siempre es posible. Cuando la localización del tumor impide la extirpación, o cuando los pacientes presentan avanzados estados de desarrollo tumoral o están superpuestas otras patologías que desaconsejan la resección (que es en la mayoría de los casos dada la avanzada edad de la mayoría de ellos), las opciones son: recurrir a un trasplante cuando es posible, o utilizar quimioterapia, radiaciones o una terapia combinada, que son en general poco efectivas (Shimoda *et al.*, 2007).

La evolución silenciosa de este tipo de tumores, que no se suelen diagnosticar en las primeras etapas de desarrollo, y su agresividad, son responsables de que en la actualidad la mortalidad por CGC sea muy alta, así en el momento del diagnóstico la mayoría de los pacientes presentan la enfermedad muy avanzada lo que hace que su supervivencia sea menor de 12 meses, e incluso cuando el tumor es operable, el riesgo de recurrencia es muy alto, siendo el ratio de supervivencia libre de enfermedad a 5 años menor del 40% (Sirica, 2005) (Thongprasert, 2005).

### **Epidemiología**

A pesar de su baja incidencia, el CGC es responsable del 13% de los cánceres hepáticos primarios y representan del 1,3 al 2,6% de los 7,6 millones de muertes anuales relacionadas con el cáncer en todo el mundo (Shaib *et al.*, 2004a) (Cardinale *et al.*, 2010). La prevalencia del CGC presenta una amplia variabilidad geográfica, siendo Asia la región donde se encuentran los valores más altos (96/100.000) y en Australia los más bajos (Shaib *et al.*, 2004b). La incidencia en países occidentales es 100 veces menor que la observada en países asiáticos, de hecho, se ha descrito una incidencia de 1-2/100.000 en países occidentales. Su prevalencia en los diferentes grupos raciales es heterogénea, con la mayor prevalencia (comparada por edad) en latinoamericanos (1,22/100.000) y la menor en afroamericanos (0,17-0,5/100.000) (McLean *et al.*, 2006).

En las últimas 4 décadas la tasa de incidencia del CGC intrahepático en Estados Unidos se ha incrementado un 165%, mientras que la del CGC extrahepático ha permanecido estable (Patel, 2001; Shaib *et al.*, 2004b). El aumento de la incidencia del CGC intrahepático también se ha observado en Europa occidental y Japón (Mouzas *et al.*, 2002; Okuda *et al.*, 2002), aunque no se ha identificado su causa.

## Etiología

La etiología del CGC no está bien definida, pero sí se conoce su relación con los siguientes factores de riesgo:

- La colangitis esclerosante primaria. Es el mayor factor predisponente de CGC. La prevalencia de CGC asociada a esta enfermedad es hasta del 40% y la tasa de incidencia anual del 0,6-1,5% (Burak *et al.*, 2004) (Bergquist *et al.*, 2002).
- Enfermedades asociadas a inflamación y colestasis.
- Las infecciones parasitarias por trematodos hepatobiliares, sobre todo las especies *Opisthorchis viverrini* y *Clonorchis sinensis* endémicas en regiones del este de Asia, donde es común la ingesta de pescado poco cocinado, suponen un importante factor de riesgo (Watanapa *et al.*, 2002).
- Presencia de cálculos biliares. La hepatolitiasis, de nuevo más común en Asia que en países occidentales, muestra una incidencia del 10% en los CGC (Kubo *et al.*, 1995) (Lesurtel *et al.*, 2002) (Su *et al.*, 1997).
- Malformaciones biliares, como la enfermedad de Caroli o la enfermedad policística congénita, presentan un 10-15% de riesgo de desarrollo de CGC (Chapman, 1999).
- Hepatitis B, C y cirrosis (Shaib *et al.*, 2007). Algunos estudios han demostrado un incremento de anticuerpos frente al virus de la hepatitis B en pacientes de CGC, mientras que el 30% de los pacientes de CGC tenían anticuerpos frente al virus de la hepatitis C (Kobayashi *et al.*, 2000; Shaib *et al.*, 2005).
- Procedimientos de drenaje entérico-biliares. Se asocian con CGC en presencia de colangitis recurrente (Bettschart *et al.*, 2002; Tocchi *et al.*, 2001).
- Agentes químicos. El thorostrast, un dióxido de torio empleado como medio de contraste en el diagnóstico por rayos X durante 1920-1950 se ha asociado con un incremento del riesgo de CGC de 300 veces respecto a la población general (Khan *et al.*, 2005) (Sahani *et al.*, 2003). También las dioxinas se han asociado con un incremento del riesgo de padecer CGC (Walker *et al.*, 2005). Otros estudios han mostrado la asociación entre CGC y otros agentes químicos como asbestos (Szendroi *et al.*, 1983), cloruro de vinilo (Wong *et al.*, 1991) y nitrosaminas (Mitacek *et al.*, 1999). Medicamentos como la isoniazida (Lowenfels *et al.*, 1978) y los contraceptivos orales de primera generación (Yen *et al.*, 1987) se sospecha que también incrementan el riesgo de padecer CGC.
- Finalmente, aunque varios estudios han sugerido que el exceso de peso corporal y la obesidad incrementan el riesgo general de cáncer, la relación entre el incremento del índice de masa corporal y el CGC no ha sido analizada todavía a fondo (Farhat

*et al.*, 2008). También se ha sugerido que el consumo de alcohol puede estar asociado a una mayor prevalencia de CGC (Hardell *et al.*, 1984).

Cabe destacar que, aunque la mayoría de los pacientes no tienen factores de riesgo para CGC claramente identificables, es probable que las inflamaciones subclínicas del tracto biliar estén en el origen de la patogénesis de la mayoría de los CGC (Blechacz *et al.*, 2008).

## **Patogenia**

No se conoce con exactitud el origen del CGC; lo más probable es que su origen sea por un proceso de malignización de los colangiocitos, aunque la transformación de las células epiteliales de las glándulas peribiliares y/o de células madre biliares también podría ser su causa. Además, existen evidencias de que ciertos subgrupos de CGC así como los carcinomas mixtos HCC/CGC se originan a partir de células progenitoras o células madre hepáticas (Nomoto *et al.*, 2006) (Sell *et al.*, 1989) y recientemente también se ha demostrado que pueden desarrollarse CGCs a través de la trans-diferenciación y conversión neoplásica de hepatocitos normales en colangiocitos malignizados (Sekiya *et al.*, 2012).

Hay evidencias que relacionan la patogénesis del CGC con los siguientes procesos:

- 1) Mutación de oncogenes y genes supresores de tumores: la inflamación y la colestasis son factores importantes involucrados en la patogénesis del CGC. Ambos factores contribuyen a la aparición de esta enfermedad mediante la creación de un ambiente que promueve la mutación de genes de los sistemas de reparación del ADN, así como de proto-oncogenes y genes supresores de tumores (Jaiswal *et al.*, 2001). Las citocinas inflamatorias estimulan la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en células epiteliales, y la sobre-expresión de iNOS está presente en colangiopatías inflamatorias y CGC (Jaiswal *et al.*, 2000). Un aumento de la actividad de iNOS da lugar a la generación de óxido nítrico y de especies reactivas del nitrógeno (RNOS) que interaccionan con el ADN y proteínas. Aunque la desregulación del proto-oncogén k-ras y del gen supresor de tumores p53 se encuentran en las muestras de la mayoría de tumores humanos, solamente se han descrito mutaciones en k-ras en un 20-54% de CGC intrahepáticos.

La acumulación nuclear de p53, y la sobre-expresión de las proteínas relacionadas, mdm-2 y p21<sup>WAF-1/CIP-1</sup>, se han descrito en un 22-76% de los CGCs, respectivamente (Boberg *et al.*, 2000) (Furubo *et al.*, 1999) (Tannapfel *et al.*, 2000) (Ahrendt *et al.*, 2000) (Isa *et al.*, 2002) (Watanabe *et al.*, 1994) (Tada *et al.*, 1992) (Levi *et al.*, 1991). Otros genes supresores de tumores frecuentemente inactivados en CGCs son DPC4/Smad4, APC y los factores implicados en la regulación del ciclo celular ciclina D1, p16<sup>INK4a</sup>, p27<sup>kip1</sup> y pRB (Kang *et al.*, 1999) (Hahn *et al.*, 1998) (Taniai *et al.*, 2002). La mayoría de estos cambios genéticos han sido descritos en el CGC intrahepático.

Relacionados con los procesos de angiogénesis e invasión-metástasis, se han encontrado mutaciones con bastante frecuencia en los genes del factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF, E-cadherina,  $\alpha\beta$ -cadherina, aspartil (asparraginil)  $\beta$ -hidroxilasa y diversos genes de metaloproteasas de matriz, entre otros (Blechacz *et al.*, 2008).

- 2) Papel de la interleuquina-6 (IL-6) en CGC: La IL-6 es una molécula de señalización crítica en la carcinogénesis (Hodge *et al.*, 2005), y también es una citokina importante en la patogénesis del CGC, donde se ha confirmado que tiene un efecto mitógeno (Okada *et al.*, 1994). Las células de CGC producen altos niveles de IL-6 reflejados en las elevadas concentraciones séricas detectadas en los pacientes con CGC (Goydos *et al.*, 1998; Yokomuro *et al.*, 2000).
- 3) Papel de los receptores tirosina kinasa: En el CGC cabe destacar el papel del EGFR, cuya inhibición consigue una supresión significativa del crecimiento celular (Yoon *et al.*, 2004). La activación constitutiva del EGFR en CGC se debe también a defectos en los procesos de internalización del complejo receptor-ligando, un mecanismo homeostático esencial para la inactivación del receptor (Yoon *et al.*, 2004). En consecuencia, la fosforilación de EGFR tiene como resultado la activación de las MAPK p42/44 y p38, las cuales a su vez incrementan la expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) (Yoon *et al.*, 2002). Por su parte, la COX-2 juega un importante papel en la carcinogénesis del CGC mediante la inhibición de la apoptosis y la estimulación del crecimiento celular (Endo *et al.*, 2002) (Han *et al.*, 2004) (Nzeako *et al.*, 2002) (Ishimura *et al.*, 2004) (Han *et al.*, 2005) (Wu *et al.*, 2002).

Además, la tirosina-kinasa ErbB2 (Neu), miembro de la superfamilia EGF, también está sobreexpresada en CGC, y está implicada en carcinogénesis y en la progresión de este tumor (Aishima *et al.*, 2002; Lai *et al.*, 2005). ErbB2 es un homólogo de EGFR capaz de formar homo y heterodímeros con otros

miembros de la superfamilia de EGF provocando la activación de la vía Raf/MAPK.

También el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y su receptor c-met están frecuentemente sobre-expresados en CGC (Yokomuro *et al.*, 2000) (Aishima *et al.*, 2002) (Terada *et al.*, 1998) y, mediante un mecanismo de activación autocrino, tienen un efecto mitogénico que estimula el crecimiento de las células del CGC (Lai *et al.*, 2000).

## **Diagnóstico**

### **Signos y síntomas**

Las manifestaciones clínicas aparecen en etapas muy avanzadas de la enfermedad, no son específicas y dependen de la localización del tumor.

Los síntomas más comunes son dolor abdominal, pérdida de peso y debilidad, ictericia, orina oscura, prurito y fiebre (Farhat *et al.*, 2008). La obstrucción y subsecuente colestasis ocurre en los primeros estadios del CGC si éste se localiza en el conducto biliar común o en el conducto hepático, y se detecta en estadios más tardíos si presenta una localización perihiliar o intrahepática. El 90% de pacientes con CGC ductal extrahepático presentan ictericia indolora, y el 10% presentan colangitis (Olmes *et al.*, 2004) (Khan *et al.*, 2002). La obstrucción biliar unilobular con encapsulamiento vascular ipsilateral produce atrofia del lóbulo afectado e hipertrofia del no afectado (Hann *et al.*, 1996). En el examen físico, este fenómeno, llamado “complejo atrofia-hipertrofia”, se presenta como una prominencia palpable de un lóbulo hepático.

El subtipo de CGC intrahepático que aparece formando masas se manifiesta con síntomas típicos de masas hepáticas, incluyendo dolor abdominal, malestar general, sudores durante la noche, y caquexia (Blechacz *et al.*, 2008).

### **Marcadores tumorales**

El marcador tumoral más utilizado en el CGC es el CA 19-9 (antígeno carbohidrato 19-9) (Nehls *et al.*, 2004). Para detectar el CGC en la colangitis esclerosante primaria, este marcador tiene un 79% de sensibilidad y un 98% de especificidad cuando se aplica un valor umbral >129 U/mL. Este marcador puede aparecer elevado en colangitis bacterianas y en otras neoplasias gastrointestinales y ginecológicas, y hay que mencionar que los pacientes que carecen del antígeno Lewis



sanguíneo (10% de individuos) no producen este marcador tumoral (Narimatsu *et al.*, 1998) (Vestergaard *et al.*, 1999) (Akdogan *et al.*, 2001) (Albert *et al.*, 1988).

En el CGC, el CA-125 (antígeno carbohidrato 125) y el CEA (antígeno carcinoembrionario) pueden estar elevados, aunque no son específicos y también aumentan en otras enfermedades gastrointestinales, ginecológicas y en colangiopatías (Chen *et al.*, 2002).

### **Técnicas de diagnóstico por imagen**

La modalidad diagnóstica más importante para evaluar la localización del tumor y la extensión intraductal es la colangiografía, especialmente en el caso del CGC extrahepático (Gores, 2000). También pueden utilizarse con este mismo propósito la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica, la colangiopancreatografía resonancia magnética (MRCP), o la colangiografía transhepática percutánea (PTC) (Khan *et al.*, 2002).

### **Tratamiento**

La resección quirúrgica es la única terapia curativa para el CGC y, por tanto, es el tratamiento de elección siempre que sea posible realizarlo (Blechacz *et al.*, 2008), siendo el CGC extrahepático más fácilmente resecable que el intrahepático (Farhat *et al.*, 2008).

El trasplante hepático no es recomendable en estos pacientes. Actualmente, esta técnica sólo es considerada para casos de CGC hiliar, ya que en CGCs intrahepático y extrahepático se han encontrado tasas de alta recurrencia por la rápida formación de metástasis del tumor (diseminación peritoneal, o metástasis distantes), por esta razón se ha abandonado el trasplante hepático para estos pacientes (Meyer *et al.*, 2000).

Como se ha comentado anteriormente, el CGC causa una significativa morbilidad asociada a la colestasis y sus complicaciones, por lo que, las terapias paliativas son bastante importantes en el manejo de esta enfermedad (Blechacz *et al.*, 2008). La colocación de cánulas endoscópicas se utiliza para restaurar el drenaje biliar y atenuar los problemas derivados de la colestasis (Shepherd *et al.*, 1988) (Andersen *et al.*, 1989) (Smith *et al.*, 1994).

La terapia fotodinámica y la radioterapia también han sido evaluadas como terapias paliativas, pero esta última no se recomienda habitualmente por los problemas asociados (Czito *et al.*, 2006) (Foo *et al.*, 1997) (Pitt *et al.*, 1995) (Grove *et al.*, 1991).

Los fármacos antitumorales mejor estudiados son el 5-FU y la gemcitabina (Alberts *et al.*, 2007). El tratamiento con gemcitabina ha sido sugerido como una alternativa para los pacientes con CGC irresecable. Estos antitumorales han sido testados en combinación con otros fármacos, incluyendo cisplatino, oxaliplatino, docetaxel, paclitaxel, mitomicina-C, doxorubicina, epirubicina, lomustina, e interferón- $\alpha$  (Falkson *et al.*, 1984) (Takada *et al.*, 1994) (Choi *et al.*, 2000) (Patt *et al.*, 1996) (Patt *et al.*, 2001) (Ducreux *et al.*, 1998) (Lee *et al.*, 2004) (Taieb *et al.*, 2002) (Raderer *et al.*, 1999) (Jones *et al.*, 1996) (Kiba *et al.*, 2006) (Scheithauer, 2002). Respecto al valor de TKIs (inhibidores de la actividad tirosina kinasa) como el sorafenib, que ha dado buenos resultados en HCC (Llovet *et al.*, 2008), se han realizado algunos ensayos clínicos con pacientes con CGC que hasta la fecha han sido poco concluyentes (Bengala *et al.*, 2010) (El-Khoueiry *et al.*, 2012).

Actualmente no hay estudios randomizados que muestren claros beneficios de supervivencia para un régimen quimioterápico específico.

#### **2.4. PAPEL DEL TRANSPORTOMA EN LA RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL EN CÁNCER HEPÁTICO**

Como se ha comentado en los apartados anteriores los tumores primarios del hígado constituyen un importante problema de salud mundial. A pesar de la larga lista de fármacos que han sido utilizados en el tratamiento de los tumores primarios de hígado, como derivados de platino, análogos de bases nitrogenadas, anti-estrógenos, anticuerpos monoclonales, antraciclinas e TKIs entre otros, la marcada refractariedad junto con la aparición de resistencia durante el tratamiento, suponen uno de los principales problemas en la clínica contra el cáncer (Marin *et al.*, 2009).

Los mecanismos que pueden contribuir a la quimiorresistencia y refractariedad a los fármacos antitumorales se pueden clasificar en 5 grupos, o "MOC", de mecanismos de quimiorresistencia (Figura I-2) (Marin *et al.*, 2010):

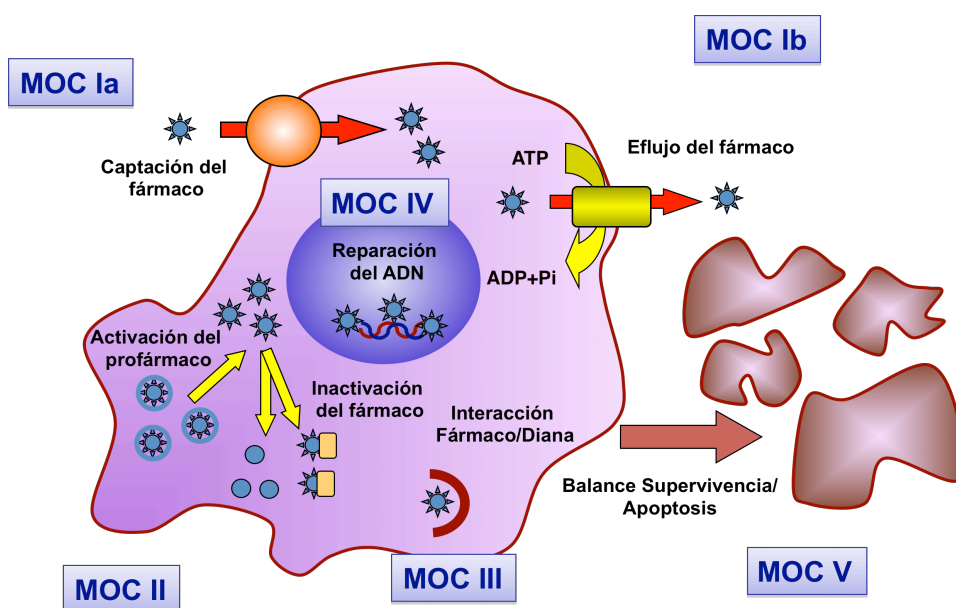


Figura I-2: Mecanismos de resistencia a la quimioterapia antitumoral.

- **MOC-1:** Incluye los mecanismos que llevan a una reducción de la concentración del fármaco dentro de las células tumorales. En este grupo podemos distinguir dos tipos de mecanismos diferentes que llevan al mismo resultado. Por un lado, la reducción del contenido celular de fármacos puede producirse por una disminución de la captación de estos compuestos (MOC-1a), o por una mayor activación de los procesos de eflujo (MOC-1b).
- **MOC-2:** Engloba los mecanismos responsables de la inactivación del fármaco en el interior de la célula tumoral, y aquellos que llevan a una reducción en la tasa de activación de profármacos. En este mecanismo están altamente implicadas las enzimas responsables de procesos de detoxificación de fase I y II.
- **MOC-3:** Incluye los mecanismos que llevan a cambios de expresión, o mutaciones en las moléculas diana, sobre las que actúa el fármaco en cuestión.
- **MOC-4:** Mecanismos que inducen un aumento de actividad en los procesos de reparación del ADN. Muchos fármacos antitumorales basan su actividad en la capacidad de atacar el ADN produciendo lesiones que llevan a la muerte de las células cancerosas, por lo que un aumento de los procesos de reparación puede dar como resultado un aumento de la resistencia a este tipo de fármacos.
- **MOC-5:** Engloba a los procesos que llevan a una desregulación del balance apoptosis/supervivencia. Pueden deberse a la potenciación de procesos de supervivencia por activación del ciclo celular y la invasividad de las células tumorales (MOC-5a) o a una reducción de la apoptosis (MOC-5b).

#### 2.4.1. Transportadores implicados en la captación de fármacos (MOC-1a)

Los sistemas de transporte son los responsables de los mecanismos de resistencia a la quimioterapia englobados en el MOC-1. Así, se ha creado el concepto de transportoma o conjunto de genes relacionados con el transporte de fármacos cuyo perfil de expresión puede predecir la respuesta a un tratamiento antitumoral (Huang *et al.*, 2004).

En los últimos años se ha descrito un papel muy importante en la resistencia a fármacos para muchos miembros de las familias de transportadores SLC y ABC. La familia SLC (“Solute Carriers”) engloba un conjunto de proteínas que median el transporte de sustratos muy diversos, desde moléculas orgánicas hasta iones inorgánicos. Además de transportar sus sustratos naturales, muchos de estos transportadores también son capaces de mediar la captación de fármacos derivados de dichos sustratos naturales. La familia de proteínas ABC está formada por bombas de eflujo, y se caracteriza porque muchos de sus miembros están implicados en la resistencia a fármacos. En esta Tesis Doctoral, nos hemos centrado en el estudio de proteínas transportadoras englobadas en el MOC-1a, relacionadas con la entrada del fármaco a la célula.

La gran mayoría de fármacos, por su bajo carácter lipofílico, tienen una capacidad muy limitada de difundir a través de la membrana plasmática. Por ello, el tráfico transcelular de estos compuestos requiere, en la mayoría de los casos, de la participación de transportadores expresados en la membrana plasmática (Hunter *et al.*, 1991), y una reducción en la expresión o actividad de los transportadores implicados en la captación de fármacos citostáticos se traduciría en una disminución del efecto terapéutico.

Las proteínas de la familia SLC, que se encuentran expresadas en las células tumorales derivadas de tejido hepático, pueden determinar las concentraciones intracelulares de algunos compuestos y por tanto su actividad antitumoral (Okabe *et al.*, 2008). Además, hay que tener en cuenta, que aparte de las diferencias de expresión, la existencia de polimorfismos (Kerb *et al.*, 2001) (Suzuki *et al.*, 2002) también determina grandes diferencias interindividuales en la captación de fármacos (Chan *et al.*, 2004), y que la expresión de estas proteínas en los tejidos neoplásicos puede cambiar durante el desarrollo tumoral y particularmente tras el tratamiento con quimioterapia. Algunos de los transportadores más relevantes en la captación de fármacos por las células hepáticas son:

El transportador NTCP (codificado por el gen *SLC10A1*), el principal sistema de captación de ácidos biliares en el hígado, presente en la membrana basolateral de hepatocitos, parece estar involucrado en la captación de derivados de platino, como los sintetizados en nuestro laboratorio, por unión de este compuesto a ácidos biliares, y que denominamos Bamets (Briz *et al.*, 2002).

ASBT (*SLC10A2*), el transportador apical de sales biliares dependiente de sodio, que como se comentó anteriormente está presente en la membrana apical del colangiocito y transporta ácidos biliares conjugados y no conjugados. Es el homólogo de NTCP en los colangiocitos, y lleva a cabo un transporte dependiente de sodio y electrogénico similar al del NTCP (Weinman *et al.*, 1998). Este transportador será más ampliamente descrito en el apartado 2.4.1.1, por la importancia dedicada al mismo en esta Tesis Doctoral.

La familia de transportadores de solutos *SLC22A* engloba a los principales transportadores de cationes orgánicos. Dentro de esta familia se han caracterizado hasta el momento 13 proteínas, de las que 3 son transportadores de cationes orgánicos (OCTs), 3 son cotransportadores de Na<sup>+</sup> y zwitteriones/cationes (OCTNs), y el resto son transportadores de aniones orgánicos (OATs) y de urato (URAT) (Koepsell, 2013). Ya que en esta Tesis Doctoral nos hemos centrado en el papel del OCT1, le dedicaremos un apartado único para este transportador (apartado 2.4.1.2). Dentro de los transportadores de aniones orgánicos, OAT1 (*SLC22A6*) se asocia a la pérdida de sensibilidad a adefovir y metotrexato, mientras que OAT3 (*SLC22A8*) y OAT4 (*SLC22A11*) se han asociado al desarrollo de resistencia a metotrexato (Sai *et al.*, 2004).

Las familias *SLC28* y *SLC29* incluyen los transportadores concentrativos de nucleósidos de alta afinidad (CNTs) y los de baja afinidad o también llamados equilibrativos (ENTs) (Baldwin *et al.*, 2004) (Gray *et al.*, 2004). Ambos tienen un papel clave en la captación de agentes antitumorales con estructura nucleosídica como la gemcitabina, citarabina, o el profármaco capecitabina que da lugar al 5-fluorouracilo. El transportador CNT2 (*SLC28A2*) puede determinar la sensibilidad de distintos tipos de tumores al derivado de pirimidina floxuridina (Ritzel *et al.*, 2001). El CNT3 (*SLC28A3*) es capaz de transportar una gran variedad de fármacos antitumorales, como la gemcitabina, floxuridina y zebularina (Errasti-Murugarren *et al.*, 2007). Se ha propuesto que ENT1 (*SLC29A1*) y ENT2 (*SLC29A2*) pueden estar involucrados en el desarrollo de resistencia a gemcitabina y citarabina (Baldwin *et al.*, 2004).

El transportador CTR1 (*SLC31A1*) constituye el principal mecanismo de captación de cobre. Se ha demostrado que este transportador participa, además, en la captación de cisplatino, por esta razón se han realizado estudios en lo que se relaciona la expresión de esta proteína con la aparición de resistencia a dicho fármaco citostático (Ishida *et al.*, 2002).

La familia *SLCO* está formada por polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATPs) (Hagenbuch *et al.*, 2004), que debido a su multiespecificidad pueden transportar gran cantidad de sustratos (Sai *et al.*, 2004). Así, OATP1B1 es capaz de transportar fármacos antineoplásicos como el irinotecán (Nozawa *et al.*, 2005), y Bamets (Briz *et al.*, 2002). Otro transportador de la familia OATP como el OATP1B3, también expresado en la membrana basolateral de los hepatocitos se ha relacionado con la aparición de resistencia al metotrexato (Abe *et al.*, 2001).

#### **2.4.1.1. El transportador de ácidos biliares ASBT**

El transportador de ácidos biliares dependiente de sodio ASBT (también llamado ISBT e IBAT) está codificado por el gen *SLC10A2*, que se localiza en el cromosoma 13q33.

##### *Estructura del ASBT*

El ASBT es una proteína formada por 348 aminoácidos (aa), con un peso molecular teórico de 38 kDa, que difiere del peso molecular observado de 43 kDa debido a glicosilación (Wong *et al.*, 1995). Consta de entre 7 y 9 dominios transmembrana (TMD) teóricos (según los modelos de predicción) y contiene el dominio N-terminal extracelular y el C-terminal citoplasmático (Zhang *et al.*, 2004). En humanos, el ASBT funciona como monómero, aunque algunas evidencias sugieren la posibilidad de que también pueda formar dímeros (Weinman *et al.*, 1998). No hay datos concluyentes sobre los dominios de unión al sustrato para este transportador, algunos autores han propuesto que el dominio de unión al sustrato de ASBT está localizado entre el séptimo dominio transmembrana (TMD) y el extremo C-terminal (Banerjee *et al.*, 2006), mientras que otros han sugerido la existencia de cuatro sitios de unión distintos (Zhang *et al.*, 2004). ASBT tiene un 35% de identidad y un 63% de similitud en la secuencia de aa con su homólogo NTCP (Dawson *et al.*, 1995).

##### *Expresión del ASBT en el organismo*

Además de expresarse en los colangiocitos, el ASBT presenta una alta expresión en el íleon terminal y en los túbulos proximales renales (Craddock *et al.*, 1998) (Lazaridis *et al.*, 1997).

#### *Propiedades funcionales y especificidad de sustrato*

El ASBT, que como hemos mencionado se localiza en la membrana apical, lleva a cabo un transporte electrogénico y dependiente de sodio (similar al llevado a cabo por NTCP) con una estequiometría de 2:1, es decir dos moléculas de sodio transportadas por cada molécula de ácido biliar (Weinman *et al.*, 1998). Tanto las sales biliares conjugadas (primarias y secundarias), como las no conjugadas, son sustratos de ASBT. La mayor afinidad ha sido descrita para las sales biliares conjugadas dihidroxiladas (Oelkers *et al.*, 1997), y también muestra mayor preferencia para los ácidos biliares conjugados con taurina y glicina (Craddock *et al.*, 1998). En contraste con NTCP, que puede transportar algunos sustratos diferentes a sales biliares, la especificidad de sustrato para ASBT parece estar más limitada a las sales biliares.

#### *Papel fisiológico de ASBT*

Como se ha mencionado en el apartado 2.2.4, el ASBT juega un papel crucial en la circulación enterohepática de los ácidos biliares y en la ruta colehepática.

A nivel intestinal, la inhibición de este transportador causa un defecto en la circulación enterohepática al no poder ser captados los ácidos biliares en el intestino con la consiguiente pérdida de los mismos en heces, lo que provoca un mecanismo compensatorio de síntesis hepática de ácidos biliares a partir del colesterol, reduciendo así los niveles de colesterol plasmáticos (Buchwald *et al.*, 1990). De hecho, los fármacos que bloquean el ASBT a nivel intestinal, se utilizan como estrategia terapéutica específica frente a la hipercolesterolemia y enfermedades cardiovasculares relacionadas (Takashima *et al.*, 1994) (Vicens *et al.*, 2007b) (Vicens *et al.*, 2007a). Mutaciones hereditarias en este transportador causan el síndrome de malabsorción primaria de ácidos biliares, lo que demuestra que ASBT es el primer mecanismo para la reabsorción intestinal de ácidos biliares (Wong *et al.*, 1995).

En estudios realizados en ratas, se ha demostrado que la expresión de *Asbt* en los colangiocitos es siete veces menor que la encontrada en los ileocitos (Alpini *et al.*,

1997), por lo que se ha propuesto que la función fisiológica podría ser diferente y estar relacionada con señalización mediada por sales biliares.

De hecho, se detectaron bajos niveles de esta proteína en homogenados de hígado, probablemente porque la población celular mayoritaria en este tejido son los hepatocitos, que carecen de este transportador, y los colangiocitos son menos abundantes. Sin embargo, cuando se induce colestasis por ligadura del conducto biliar, se ha visto a las dos semanas un incremento de Asbt a nivel de proteína en homogenados hepáticos, ya que este procedimiento produce una proliferación colangiolar pronunciada (Lee *et al.*, 2001).

En el epitelio biliar el ASBT presenta una distribución regional. Como se ha comprobado en ratas, los colangiocitos grandes expresan este transportador, mientras que los colangiocitos pequeños no tienen niveles detectables del mismo. Sin embargo, durante la obstrucción del conducto biliar, la expresión de Asbt está también inducida en la membrana apical de los colangiocitos pequeños, por estímulo de los ácidos biliares (Alpini *et al.*, 1999) (LeSage *et al.*, 2001).

El aumento de expresión de ASBT en los colangiocitos en situaciones de colestasis crónica lleva a un incremento efectivo en la absorción de ácidos biliares de la bilis, lo que proporciona una ruta alternativa excretora en presencia de obstrucción biliar para evitar la acumulación hepatocelular de ácidos biliares tóxicos (Alpini *et al.*, 2002b).

#### *Mecanismos de regulación del ASBT en colangiocitos*

La actividad transportadora del ASBT aumenta de modo agudo (tanto en colangiocitos como en ileocitos) por mecanismos dependientes de AMPc (Alpini *et al.*, 2005) (Reymann *et al.*, 1989). En colangiocitos, el aumento de AMPc inducido por la hormona secretina duplica la captación de ácidos biliares dependiente de sodio. Este efecto se debe a una translocación de la proteína ASBT, almacenada en vesículas intracelulares, a la membrana apical. Una vez que el estímulo ha finalizado, el ASBT se recicla volviendo a un almacenamiento intracelular latente. La inducción aguda del ASBT en colangiocitos ha sido propuesta como un mecanismo de acentuación de la ruta colehepática de los ácidos biliares en el periodo postprandial, para aumentar el flujo biliar y la secreción biliar de lípidos (Alpini *et al.*, 2005).



Varios estudios en ratas (Alpini *et al.*, 2001b) (Alpini *et al.*, 2002a) (Alpini *et al.*, 2002b) demostraron que la expresión de Asbt en colangiocitos está regulada por la concentración de ácidos biliares en bilis.

Se ha sugerido que los ácidos biliares modulan la expresión de Asbt a través de la activación de PPAR $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor alpha) (Jung *et al.*, 2002) y la proteína activadora 1 (AP1), elemento que regula la transcripción del gen que codifica para Asbt en ratas (Chen *et al.*, 2001).

También se ha descrito que la alteración de la expresión de ASBT debida a la inflamación y a los ácidos biliares es consecuencia de la trans-activación del promotor de ASBT por c-Jun / c-Fos y el homólogo-1 del receptor hepático (LRH-1), respectivamente (LeSage *et al.*, 2001) (Reymann *et al.*, 1989), y que el factor hepatocitario nuclear-1 alfa (HNF-1 $\alpha$ ) es crítico para la expresión basal de ASBT.

#### **2.4.1.2. El transportador de cationes orgánicos OCT1**

##### *Estructura del OCT1*

El gen *SLC22A1* humano, que codifica el OCT1, contiene 11 exones y 10 intrones (Hayer *et al.*, 1999) y se localiza en el locus cromosómico 6q26 (Koehler *et al.*, 1997). El OCT1 consta de 554 aa que se disponen en 12 TMD de hélices  $\alpha$ , según los modelos de predicción de la estructura de proteínas, tiene 50 kDa y la forma glicosilada 70 kDa. Estos modelos también predicen que los dominios N- y C-terminales son intracelulares, además de la presencia de un lazo extracelular grande entre TMD 1 y 2, que contiene sitios de glicosilación, y de un lazo intracelular grande entre TMD 6 y 7, que contiene sitios de fosforilación (Zhang *et al.*, 1997).

##### *Expresión del OCT1 en el organismo*

Aunque el OCT1 humano se encuentra ampliamente distribuido en el organismo, se expresa mayoritariamente en el hígado (Gorboulev *et al.*, 1997), donde se localiza en la membrana sinusoidal de los hepatocitos (Meyer-Wentrup *et al.*, 1998) y también en los colangiocitos (Nies *et al.*, 2009) (Lautem *et al.*, 2013). Con unos niveles de expresión menores, el OCT1 humano se expresa en el riñón, concretamente, en la membrana apical de las células epiteliales del túbulo proximal y distal de la nefrona (Koepsell *et al.*, 2007). También se expresa en la membrana basolateral de los enterocitos, donde participa, junto con otros transportadores localizados en la

membrana apical de estas células, en la secreción de cationes orgánicos hacia el lumen intestinal (Koepsell *et al.*, 2007). La distribución del OCT1 es diferente a la de otros OCTs, ya que el OCT2 humano está expresado mayoritariamente en el riñón, pero no en el hígado (Gorboulev *et al.*, 1997), y el OCT3, que aunque presenta una distribución tisular más amplia, es más abundante en la placenta y en el hígado (Verhaagh *et al.*, 1999).

#### *Propiedades funcionales y especificidad de sustrato*

Los OCTs llevan a cabo el transporte de cationes orgánicos de manera electrogénica e independiente de  $\text{Na}^+$  y de gradiente de protones. El transporte del sustrato puede ocurrir en ambas direcciones a través de la membrana plasmática (Koepsell *et al.*, 2007). La mayoría de sustratos de los OCTs son cationes orgánicos, que son compuestos de origen endógeno o xenobiótico, mayoritariamente aminas terciarias o cuaternarias, que tienen carga neta positiva a pH fisiológico. Las aminas cuaternarias están cargadas permanentemente, con independencia del pH, mientras que las aminas terciarias pueden protonarse dependiendo de su valor de  $\text{pK}_a$  y el pH del medio. Según sus características estructurales, los sustratos de los OCTs se han clasificado en cationes de tipo I y tipo II (Meijer *et al.*, 1990). Los cationes de tipo I son moléculas con una masa molecular menor de 500 Da, aunque también pueden ser moléculas grandes en las que el grupo catiónico está alejado del anillo aromático. Suelen ser sales de amonio cuaternario como el bromuro de tetraetilamonio (TEA) y el 1-metil-4-fenilpiridinio ( $\text{MPP}^+$ ), que son considerados los sustratos modelo de este grupo. Los cationes de tipo II son más hidrofóbicos, voluminosos y con frecuencia polivalentes, siendo la *d*-tubocurarina y la quinina algunos de los compuestos típicos (van Montfoort *et al.*, 2001).

Debido a la localización del OCT1 y a su especificidad de sustrato, el papel fisiológico principal de este transportador es la detoxificación de compuestos catiónicos endógenos y xenobióticos, mediante su captación desde la sangre portal a través de la membrana sinusoidal de los hepatocitos. El OCT1 puede mediar no sólo la captación, sino también el eflujo de sustratos, así que este transportador puede llevar a cabo la liberación de cationes orgánicos desde los hepatocitos hacia la sangre (Koepsell *et al.*, 2007).

Los sustratos típicos del OCT1 son cationes de tipo I, como los compuestos de tetraalquilamonio, derivados de procainamida, la  $N^1$ -metilnicotinamida y el MPP (Gorboulev *et al.*, 1997) (van Montfoort *et al.*, 2001). Entre los sustratos endógenos del

OCT1 humano (Tabla I-1) se encuentran monoaminas como la colina, la creatinina, la L-carnitina, la guanidina y el metabolito de L-arginina agmatina (Koepsell *et al.*, 2007), poliaminas como la putrescina y la espermidina (Winter *et al.*, 2011), y vitaminas como la tiamina (Lemos *et al.*, 2012). El OCT1 lleva a cabo la recaptación por las neuronas presinápticas desde el espacio sináptico de neurotransmisores como catecolaminas (dopamina, adrenalina y noradrenalina), serotonina e histamina (Koepsell, 2004) (Jonker *et al.*, 2004). En un estudio se ha sugerido que el OCT1 también puede transportar prostaglandinas E2 and F2 $\alpha$  (Kimura *et al.*, 2002), aunque otros autores ponen en duda estos resultados, debido a que las prostaglandinas son aniones a pH fisiológico, y sus características estructurales difieren considerablemente de otros sustratos de este transportador (Harlfinger *et al.*, 2005).

**Tabla I-1.** Sustratos del OCT1 humano.

Compuestos endógenos	Xenobióticos y toxinas	Fármacos
Acetilcolina	Ácido guanidinosuccínico	Aciclovir
Adrenalina	Ácido guanidinovalérico	Amantadina
Agmatina	Aflatoxina B1	Bamet-UD2
Colina	APD-ajmalinio	Bleomicina
Creatinina	ASP	Cimetidina
Dopamina	Berberina	Ciprofloxacino
Espermidina	Compuestos de tetraalquilamonio	Furamidina
Guanidina	DAPI	Ganciclovir
Histamina	Derivados de procainamida	Imatinib
L-carnitina	Etidio	Irinotecán
N <sup>1</sup> -Metilnicotinamida	Metilguanidina	Lamotrigina
Noradrenalina	MPP	Levodopa
Prostaglandina E2	MPTP	Metformina
Prostaglandina F2 $\alpha$	Nicotina	Mitoxantrona
Putrescina	N-metilquinina	m-Yodobencilguanidina
Serotonina	Paraquat	O-Desmetiltramadol
Tiamina		Ondansetrón
		Oxaliplatino
		Paclitaxel
		Pancuronio
		Pentamidina
		Pramipexol
		Quinidina
		Rocuronio
		Sorafenib
		Sulpiride
		Tropisetron
		YM 155
		Zalcitabina

ASP, 4-[4-(dimetilamino)-estiril]-N-metilpiridinio; DAPI, 4',6-diamidino-2-fenilindol; MPP, 1-metil-4-fenilpiridinio; MPTP, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina; YM 155, bromuro de sepantronio.

Se ha demostrado que algunos colorantes fluorescentes utilizados habitualmente en el laboratorio como el bromuro de etidio (Lee *et al.*, 2009) y el DAPI (Yasujima *et al.*, 2011) son transportados por el OCT1 humano.

Algunas toxinas endógenas y xenobióticas son sustratos del OCT1 (Tabla I-1). Por ejemplo, hay estudios que sugieren que el OCT1 humano es responsable de la detoxificación hepática de la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Yang *et al.*, 2001), una neurotoxina que aparece como contaminante de algunas drogas opiáceas y es capaz de destruir las neuronas de la sustancia negra, produciendo síntomas similares a la enfermedad de Parkinson (Langston *et al.*, 1983). El OCT1 está implicado en el aclaramiento renal de toxinas urémicas como la metilguanidina y los ácidos guanidinosuccínico y guanidinovalérico (Kimura *et al.*, 2009), que son derivados de la guanidina, y cuyos niveles se encuentran elevados en pacientes con insuficiencia renal. Otras toxinas transportadas por el OCT1 humano son la nicotina (Kim *et al.*, 2006) o herbicidas como el paraquat (Chen *et al.*, 2007).

La mayoría de los cationes de tipo II no son transportados por OCT1, sin embargo, algunos de ellos inhiben la captación de los cationes de tipo I mediada por el OCT1 (van Montfoort *et al.*, 2001). Entre estos inhibidores se incluyen el tetrapentilamonio, el decinio 22 y hormonas como la progesterona, el  $\beta$ -estradiol y la corticosterona (Koepsell *et al.*, 2007). Entre los inhibidores más potentes del OCT1 se encuentran la atropina y la prazosina (Koepsell *et al.*, 2007).

#### *Transporte de fármacos por el OCT1*

El OCT1 tiene un papel determinante de la farmacocinética y la biodisponibilidad de muchos fármacos de naturaleza catiónica (Tabla I-1) (Jonker *et al.*, 2004). Entre sus funciones relacionadas con el transporte de fármacos se incluyen:

1. Captación hepática de fármacos cuya diana son los hepatocitos

El OCT1 es el principal responsable de la captación del antidiabético metformina por el hígado (Shikata *et al.*, 2007), donde ejerce su principal acción farmacológica disminuyendo la gluconeogénesis, reduciendo así el nivel de glucosa en sangre. Otro ejemplo es la lamivudina, un análogo de citidina que es eficazmente captado a través del OCT1 por los hepatocitos, donde sus metabolitos activos previenen la replicación del HBV (Jung *et al.*, 2008).

2. Liberación de fármacos desde los hepatocitos a la sangre

El aciclovir y el ganciclovir son dos sustratos del OCT1 con actividad antiviral (Takeda *et al.*, 2002), que suelen ser administrados en forma de profármacos inactivos. Debido a que la absorción intestinal del aciclovir y ganciclovir es muy baja, se administran en forma de L-valil ésteres; es decir, valaciclovir y valganciclovir, respectivamente. Estos profármacos sufren un efecto de primer paso hepático y son convertidos en sus formas activas por las esterasas hepáticas. El OCT1 puede llevar a cabo la liberación del aciclovir y el ganciclovir desde los hepatocitos a la sangre, desde donde los fármacos pueden alcanzar sus dianas. El O-desmetiltramadol es un analgésico opioide y el principal metabolito activo del tramadol producido en el hígado por desmetilación mediante la enzima CYP2D6. El O-desmetiltramadol, pero no el tramadol, es un sustrato del OCT1 (Tzvetkov *et al.*, 2011).

### 3. Destoxificación hepática de fármacos catiónicos

El primer paso de los procesos de destoxificación hepática de fármacos es la captación a través de la membrana sinusoidal de los hepatocitos. El OCT1 es responsable de la captación hepática de la mayoría de los fármacos catiónicos desde la sangre portal en el proceso de destoxificación de estos compuestos (Koepsell *et al.*, 2007). El aclaramiento renal y la reducción de la absorción intestinal de los fármacos mediados por el OCT1 también pueden contribuir a la disminución de su biodisponibilidad (Koepsell *et al.*, 2007).

La principal vía de destoxificación de los antagonistas serotoninérgicos ondansetrón y tropisetron, utilizados para evitar las náuseas y los vómitos que producen algunos tratamientos de quimioterapia antitumoral, consiste en la captación hepática mediada por el OCT1 y la posterior inactivación por la CYP2D6 (Tzvetkov *et al.*, 2012). De la misma forma, el efecto de primer paso a través del hígado puede reducir la biodisponibilidad de otros fármacos catiónicos que son sustratos del OCT1 como la amantadina, la levodopa y el pramipexol (Becker *et al.*, 2011), la cimetidina (Umehara *et al.*, 2007), los antibióticos fluoroquinolonas (Mulgaonkar *et al.*, 2013), la lamotrigina (Dickens *et al.*, 2012), el sulpiride (Watanabe *et al.*, 2002) y la zalcitabina (Jung *et al.*, 2008). Algunos cationes orgánicos de tipo II que son sustratos del OCT1 son los fármacos quinidina, pancuronio y rocuronio (van Montfoort *et al.*, 2001).

### 4. Captación de fármacos antitumorales por el OCT1

Actualmente, se puede considerar que el OCT1 es un transportador necesario para que se alcancen concentraciones terapéuticas en los tumores de ciertos fármacos citostáticos de naturaleza catiónica. Por ejemplo, hay evidencias de que el

OCT1 es capaz de transportar mitoxantrona (Koepsell *et al.*, 2007) y m-yodobencilguanidina marcada con los isótopos [<sup>123</sup>I] (agente de contraste) o [<sup>131</sup>I] (agente terapéutico) (Bayer *et al.*, 2009). También es captado por las células tumorales a través del OCT1 el bromuro de sepantronio o YM 155, un nuevo fármaco con actividad supresora de la survivina (Minematsu *et al.*, 2009). La bleomicina es un antibiótico con actividad antitumoral transportado en levaduras por un sistema de transporte de poliaminas (Aouida *et al.*, 2004), cuyo ortólogo en humanos es probablemente el OCT1 (Koepsell, 1998). Un reciente estudio sugiere que el OCT1 puede contribuir a la captación de irinotecán y paclitaxel por células tumorales (Gupta *et al.*, 2012). Varios estudios han demostrado que la acumulación celular, y por tanto la toxicidad de los derivados del platino oxaliplatino y picoplatino, pero no la del cisplatino o del carboplatino, se incrementa notablemente en células transfectadas con el OCT1, lo que sugiere que el oxaliplatino (Zhang *et al.*, 2006) y el picoplatino (More *et al.*, 2010) podrían ser sustratos de este transportador.

Los TKIs son el resultado de una nueva estrategia diseñada con el objetivo de interaccionar con dianas implicadas en vías de apoptosis/supervivencia de las células tumorales. Por la importancia actual de este grupo de antitumorales, se comentarán con más profundidad en el apartado 2.5. Estos fármacos son eficaces en el tratamiento de varios tipos de cáncer (Hartmann *et al.*, 2009). Se ha sugerido que la captación del imatinib depende de la expresión del OCT1 en células primarias de leucemia mieloide crónica y en líneas celulares (Thomas *et al.*, 2004). Experimentos realizados en células transfectadas con el OCT1 apoyan esta hipótesis (Minematsu *et al.*, 2011).

Se ha descrito la posible interacción entre sustratos del OCT1 y algunos fármacos catiónicos; así ciertas sustancias endógenas y compuestos presentes en la dieta podrían interaccionar con el OCT1, y por tanto afectar a la biodisponibilidad de fármacos catiónicos. Las interacciones entre fármacos sustratos del OCT1 podrían también ser responsables de la variabilidad interindividual en la acción farmacológica de algunos fármacos. Un ejemplo de este tipo de interacción podría ocurrir con los antieméticos ondansetrón y tropisetron, que son administrados junto con algunos fármacos antitumorales para evitar las náuseas y vómitos que producen. En los pacientes tratados con antieméticos y con sustratos del OCT1 con efecto antineoplásico cabría esperar una reducción en la captación del agente citostático por los tumores y, por tanto, un descenso en la eficacia del tratamiento antitumoral (Tzvetkov *et al.*, 2012).

### *Cambios de la expresión y función del OCT1*

Los mecanismos de regulación de la expresión y funcionalidad del OCT1 humano modulan los niveles del ARNm y de la proteína y, por tanto, pueden modificar la biodisponibilidad de compuestos endógenos y fármacos sustratos del transportador.

El promotor del OCT1 humano contiene dos elementos de respuesta adyacentes para el factor de transcripción HNF-4 $\alpha$  (Saborowski *et al.*, 2006). La unión del HNF-4 $\alpha$  a estos elementos de respuesta activa la transcripción del OCT1 humano, pero puede ser inhibida por el SHP (*small heterodimer partner*), un correpresor transcripcional cuya expresión puede ser inducida por los ácidos biliares (Saborowski *et al.*, 2006). Por esta razón, en situaciones de colestasis la elevada concentración de ácidos biliares podría inhibir la activación transcripcional del OCT1 mediada por el HNF-4 $\alpha$ , reduciendo la expresión del transportador (Nies *et al.*, 2009).

Además de la regulación de la expresión, existen sistemas de regulación postraduccional, que pueden modular la actividad transportadora del OCT1 de manera rápida por procesos de fosforilación y desfosforilación, induciendo cambios conformacionales en el sitio de unión del sustrato y modificando así la afinidad por el mismo (Ciarimboli *et al.*, 2005). La proteína quinasa II dependiente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (CaMKII) (Martel *et al.*, 2001) y la tirosina quinasa Src-like p56<sup>lck</sup> (Ciarimboli *et al.*, 2004) estimulan la actividad del OCT1 humano. Sin embargo, la activación de la proteína quinasa A (PKA) disminuye la afinidad del OCT1 por sustratos típicos (Ciarimboli *et al.*, 2005).

### *Variantes genéticas del SLC22A1*

Se conocen más de 1000 mutaciones en el gen *SLC22A1*, registradas en las diferentes bases de datos de variaciones genéticas, ya sea en la región promotora, en la secuencia codificante, en las regiones 5'-UTR y 3'-UTR o en las secuencias intrónicas. Sin embargo, todavía no se conoce bien el efecto biológico de la mayoría de los polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs (del inglés *single-nucleotide polymorphisms*) que aparecen en las regiones no codificantes (Kerb *et al.*, 2002) (Itoda *et al.*, 2004).

## 2.5. PAPEL DE LOS INHIBIDORES TIROSINA-KINASA EN LA TERAPIA ANTITUMORAL EN CÁNCER HEPÁTICO

### 2.5.1. Ruta RAF/MEK/ERK

Las tirosina kinasas (TKs) pertenecen a una gran familia de proteínas homólogas que funcionan como componentes de rutas de transducción de señales que están implicadas en el control del crecimiento celular, metabolismo, diferenciación y apoptosis, lo que les hace importantes dianas en la farmacología antitumoral.

Estas rutas de señalización se inician por la activación de receptores tirosina kinasa (RTKs) (Zwick *et al.*, 2002). Tras la activación de diferentes RTKs, interviene la proteína RAS, cuya ruta de señalización es un importante mecanismo para la proliferación celular y tumorigénesis (Herrera *et al.*, 2002). La activación constitutiva de la ruta de RAS ocurre por mutaciones en el oncogén RAS, en sus efectores (Marshall, 1994), o bien por una sobreexpresión de los RTKs, como el EGFR (receptor para el factor de crecimiento epidérmico), PDGFR (receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas) o VEGFR (receptor para el factor de crecimiento vasculo-endotelial) (Schlessinger, 2000) (Magne *et al.*, 2002) (Barnes *et al.*, 2003) (Lokker *et al.*, 2002) (Doanes *et al.*, 1999) (Meadows *et al.*, 2001).

RAS regula muchas rutas que inducen la transformación celular, incluyendo la cascada RAF/MEK/ERK (también conocida como ruta MAPK). Las RAF kinasas son proteínas serina/treonina kinasas que funcionan como moléculas efectoras de RAS; de modo que cuando RAS activa a RAF ésta se dirige a la membrana plasmática, donde inicia la cascada de mitogénica activando a MEK1/2, que a su vez activa a ERK1/2 y finalmente acaba modulando la expresión génica a través de la fosforilación de factores de transcripción como Ets-1, c-Jun, y c-Myc (Kolch, 2000) (Chang *et al.*, 2003) (Marshall, 1994), resultando en un incremento de la proliferación celular, progresión del ciclo celular e inhibición de la apoptosis (Huether *et al.*, 2006).

La activación constitutiva de la ruta de señalización RAS-ERK es común en numerosos cánceres. Aproximadamente el 15% de los cánceres humanos tienen mutaciones activadoras de RAS (Malumbres *et al.*, 2003).

La familia de las RAF kinasas está compuesta por 3 miembros: A-RAF, B-RAF y C-RAF (también llamado Raf-1). Se han identificado mutaciones en B-RAF en numerosos cánceres (Davies *et al.*, 2002), que han sido directamente relacionadas con la oncogénesis. La mayoría de las mutaciones de B-RAF afectan al dominio



kinasa de la proteína. En el 90% de los casos de cánceres humanos que presentan mutaciones en esta proteína, aparece una sustitución de ácido glutámico por una valina en la posición 600 (V600E), que hace que esta proteína tenga una actividad kinasa muy elevada y que mantenga estimulado de modo constitutivo la actividad de ERK (Davies *et al.*, 2002). Otras mutaciones frecuentes afectan a residuos que intervienen en el mantenimiento de una conformación inactiva de B-RAF, de manera que se promueve el estado activado, y finalmente su actividad kinasa.

C-RAF y B-RAF también participan en la regulación de la apoptosis endotelial y la angiogénesis (Alavi *et al.*, 2003) (Hood *et al.*, 2002). La invasión tumoral y la metástasis son procesos directamente relacionados con la angiogénesis, ya que las células vasculo-endoteliales secretan proteinasas capaces de degradar la matriz (Mignatti *et al.*, 1993) facilitando la salida de las células tumorales al torrente circulatorio, para así ser capaces de viajar por el mismo, y alcanzar un tejido lejano al lugar donde se originaron (Aznavorian *et al.*, 1993).

En el HCC, la ruta de las MAPK suele estar constitutivamente activada, lo cual lleva a la sobre-expresión de genes que promueven la proliferación celular. Además, la apoptosis suele estar impedida por la sobreproducción del factor de supervivencia Mcl-1, miembro de la familia Bcl-2. En el CGC también se ha observado que el RTK EGFR participa en la génesis y en la progresión del CGC (Yoon *et al.*, 2004) y las alteraciones en la ruta de las MAPK se asocian con una mayor proliferación tumoral (Huether *et al.*, 2007).

### **2.5.2. Antitumorales inhibidores de tirosina kinasas; Sorafenib**

En las últimas décadas, se ha diseñado un nuevo grupo de fármacos antitumorales denominados globalmente TKIs, que tienen como dianas específicas las kinasas implicadas activamente en las rutas que promueven el desarrollo tumoral (Hartmann *et al.*, 2009). La mayoría de los TKIs son moléculas de bajo peso molecular, que se administran de modo oral, con un buen perfil de seguridad, y que pueden combinarse con otros fármacos quimioterapéuticos o con terapias de radiación (Arora *et al.*, 2005).

Los TKIs surgieron a finales de 1980, en Ciba Geigy (actual Novartis, Basilea, Suiza) donde se llevó a cabo una búsqueda selectiva de compuestos químicos con actividad inhibidora de TKs (Zimmermann *et al.*, 1996); en base a la relación entre la estructura y la actividad inhibidora, los compuestos activos fueron optimizados para actuar sobre una gran variedad de dianas (Druker *et al.*, 2000). El derivado activo

inicial, la 2-fenil-amino-pirimidina, fue modificado por introducción de grupos metilo y benzamida para incrementar sus propiedades, del cual surgió el imatinib. Los primeros ensayos *in vitro* demostraron su capacidad para inhibir tanto el PDGFR como el receptor KIT (Druker, 2002), siendo así el imatinib el primer compuesto de la familia a partir del cual aumentó el interés de estos fármacos en la clínica antitumoral.

El sorafenib, *N*-(3-trifluorometil-4-clorofenil)-*N'*-(4-[2-metilcarbamoil piridina-4-yl]oxifenil) urea, (también conocido como BAY43-9006, o Nexavar<sup>®</sup>), es una bi-aril urea, que se utiliza como tosilato de sorafenib, con actividad inhibitoria de multikinastas, que tiene como dianas varias proteínas de la ruta RAS-ERK como C-RAF, la forma silvestre de B-RAF y la B-RAF mutada V600E, MEK y ERK (Liu *et al.*, 2006), todas ellas implicadas como se comentó anteriormente en mecanismos de proliferación celular (Figura I-3) (Wilhelm *et al.*, 2004). Es capaz de inducir la apoptosis por la inhibición de la proteína Mcl-1 (Liu *et al.*, 2006). Además, el sorafenib presenta una potente inhibición de ciertos RTKs implicados en la angiogénesis como VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- $\beta$ , c-KIT, FLT-3 y el receptor RET (Wilhelm *et al.*, 2004).

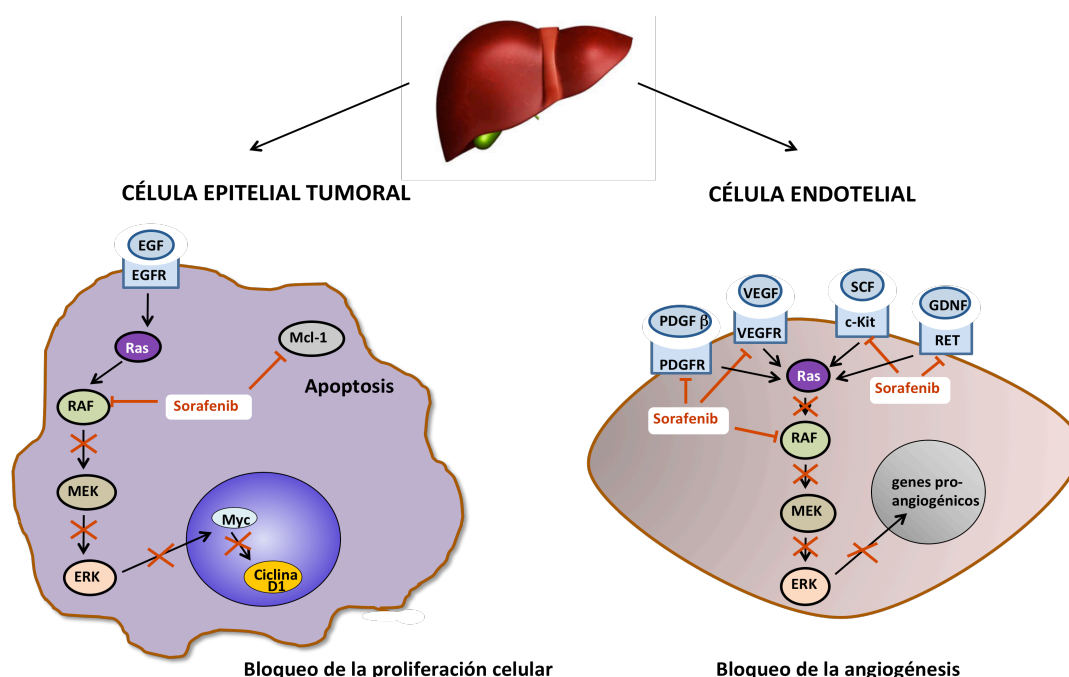
El mecanismo de acción del sorafenib es una inhibición competitiva del dominio catalítico de unión al ATP de sus respectivas kinasas, ya que el anillo piridil distal del sorafenib interacciona de forma directa con 3 aminoácidos del bolsillo de unión al ATP de estas proteínas, impidiendo así su fosforilación y con ello la activación de las mismas (Wan *et al.*, 2004) (Wilhelm *et al.*, 2004).

El sorafenib ha mostrado una potente actividad antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo* frente al HCC o a los carcinomas de células renales, mama, colon, páncreas y ovario (Wilhelm *et al.*, 2008) (Strumberg, 2005). Actualmente, el sorafenib está aprobado para el tratamiento de pacientes con HCC irresecable (Llovet *et al.*, 2008) y para pacientes con carcinoma renal avanzado (Escudier *et al.*, 2007).

#### Papel del sorafenib en el tratamiento de tumores hepáticos:

Los primeros ensayos realizados *in vitro* demostraron que el sorafenib inhibía la proliferación e inducía la apoptosis en líneas celulares de HCC, actuando sobre la ruta de señalización RAF/MEK/ERK. Los ensayos *in vivo* con xenoinjertos mostraron que el sorafenib inhibía el crecimiento tumoral, y la angiogénesis por su acción sobre las TKs VEGFR-2/3, PDGFR  $\beta$  (Liu *et al.*, 2006), FLT-3, RET y c-kit (Abou-Alfa, 2006) (Abou-Alfa *et al.*, 2006).

Uno de los ensayos clínicos más relevantes que demostró el potencial del sorafenib en el tratamiento del HCC fue el ensayo SHARP (Sorafenib Hepatocellular carcinoma Assessment Randomized Protocol), el cual indicó que este fármaco prolongaba la supervivencia media (10,7 meses vs 7,9 meses en el grupo de pacientes que recibieron el placebo) y el tiempo de progresión en pacientes con HCC avanzado (Llovet *et al.*, 2008). Los resultados del ensayo SHARP representaron un progreso en el manejo clínico del HCC, considerando al sorafenib como la primera terapia sistémica para prolongar la supervivencia de estos pacientes.



**Figura I-3:** Dibujo esquemático de los mecanismos moleculares del sorafenib sobre una célula epitelial tumoral hepática y sobre una célula endotelial. El sorafenib bloquea la proliferación celular inhibiendo a las Raf kinasas (B-Raf y Raf-1) implicadas en la ruta de las MAK kinasas que estimulan la proliferación (ya que al final de la ruta Erk activa a Myc un factor de transcripción que estimula la transcripción del gen de la ciclina-D1 que promueve la división celular). Además, el sorafenib favorece la apoptosis al impedir la traducción de la proteína antiapoptótica Mcl-1. Sobre la célula endotelial, además del bloqueo de RAF, el sorafenib inhibe los RTKs PDGFR-β, VEGFR-2, VEGFR-3, c-Kit y RET, así estos receptores no logran activar a Ras, bloqueando doblemente la ruta, e impidiendo así la transcripción de los genes que promueven la angiogénesis. (EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico, PDGFR, receptor del factor de crecimiento plaquetario, VEGFR, receptor del factor de crecimiento vasculo-endotelial, GDNF, factor neurotrófico derivado de células gliales, SCF, factor de células madre).

A pesar de que el tratamiento con sorafenib supone un “hito” en la terapia del HCC, el efecto del sorafenib sobre los tumores colangiulares no está muy claro. Por un lado, en ensayos *in vitro* con líneas celulares de CGC humano, el sorafenib mostró una potente actividad antitumoral, por la inhibición de la ruta de las MAPK y por el

arresto del ciclo celular (Huether *et al.*, 2007). Ensayos realizados con células de CGC humano tanto *in vitro* como *in vivo* (utilizando modelos animales), remarcaron la actividad antitumoral de este TKI, ya que el sorafenib actuaba induciendo un efecto pro-apoptótico y un pronunciado efecto anti-vascular (Sugiyama *et al.*, 2011). Además, este fármaco mostró un efecto antitumoral claro en un modelo de CGC ortotópico en roedores, en el que se observó una inhibición de la señalización JAK/STAT3 asociada con un descenso de Mcl-1 estimulando la apoptosis (Blechacz *et al.*, 2009). Un hecho mencionable es que el CGC es un tumor que comúnmente no muestra una gran vascularidad (lo que sí ocurre en otros tumores), lo que sugiere que las rutas angiogénicas juegan un papel menor en la patogénesis y la progresión de este tumor (Kawahara *et al.*, 1998).

Por otro lado, los ensayos clínicos llevados a cabo hasta la fecha con pacientes con CGC tratados con sorafenib han sido poco concluyentes. Los ensayos de Bengala *et al.* y El-Khoueiry *et al.* mostraron que el sorafenib presentaba una baja o nula actividad antitumoral en estos pacientes (Bengala *et al.*, 2010) (El-Khoueiry *et al.*, 2012), mientras que en otro estudio observaron un efecto antitumoral moderado (LaRocca *et al.*, 2007) y en un caso descrito para un paciente con CGC, el sorafenib tuvo una potente actividad, mejorando los síntomas, la funcionalidad hepática, y observándose un aumento de la supervivencia hasta al menos 24 meses tras el tratamiento con sorafenib (Pinter *et al.*, 2011).

A pesar de que el sorafenib es el agente quimioterapéutico empleado para el tratamiento del HCC, y su potencial efecto antitumoral también en tumores colangiulares, el tratamiento con sorafenib tiene ciertas limitaciones, ya que la mejora de los pacientes es modesta, los beneficios pueden ser transitorios por una pérdida de la eficacia debida a mecanismos de resistencia a la quimioterapia, y en ocasiones aparición de toxicidad al fármaco (afectaciones dérmicas como el “síndrome mano-pie”, hipertensión, fatiga, proteinuria, diarrea y riesgo de tromboembolismo o sangrados) (Almhanna *et al.*, 2009) (Roodhart *et al.*, 2008).

### **2.5.3. Otros fármacos inhibidores de la actividad tirosina kinasa**

Como se describió para el sorafenib, el mecanismo de acción de los TKIs es una inhibición competitiva del dominio catalítico de unión al ATP de las respectivas kinasas. Los estudios de cristalización sugieren que los TKIs interactúan uniéndose tanto a residuos conservados como no conservados en el bolsillo de unión al ATP de la proteína TK en cuestión (Toledo *et al.*, 1999). Los residuos no conservados están

localizados en regiones del bolsillo que no se unen directamente al ATP, y son probablemente únicos de ciertas TKs (Toledo *et al.*, 1999).

Algunos de los TKIs más utilizados en la terapia antitumoral actual son:

El **imatinib**, que fue el primero de esta familia de fármacos que se sintetizó, es un potente inhibidor, entre otras, de la tirosina quinasa BCR-ABL, que es el resultado del cromosoma Filadelfia. Por esta razón, el imatinib se utiliza en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica, donde este fármaco aumenta la supervivencia y mejora la calidad de vida de los pacientes con esta enfermedad (Hartmann *et al.*, 2009). También se usa en tumores gastrointestinales estromales y se ha utilizado en otros tumores (Duffaud *et al.*, 2009). Estructuralmente el imatinib recuerda al ATP, lo cual evidencia su mecanismo de acción. El imatinib impide la activación del PDGFR, la proteína ABL (proteína homóloga del oncogen viral de la leuceima murina Abelson) y KIT (Heinrich *et al.*, 2003).

El **erlotinib** es una quinazolinamina que ha resultado útil en el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas, de páncreas y se ha evaluado para otros tipos de tumores (Sharma *et al.*, 2009) (Philip *et al.*, 2005). La diana de este TKI es el EGFR.

El **gefitinib** es un inhibidor selectivo del EGFR y actúa de manera similar al erlotinib (Sordella *et al.*, 2004). Este fármaco está indicado para el tratamiento continuado de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado o metastático, tras el fallo de la quimioterapia con derivados de platino o docetaxel (Pao *et al.*, 2004).

El **sunitinib** inhibe múltiples TKs, como PDGFR $\alpha$  y PDGFR $\beta$ , VEGFR-1, VEGFR-2, y VEGFR-3, KIT, FLT-3, el receptor del factor estimulador de colonias (CSF-1R) y el receptor RET (Patyna *et al.*, 2006) (Mendel *et al.*, 2003).



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**





### 3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

#### 3.1.1. Muestras humanas

Las muestras de tejido hepático de pacientes con CGC (n=15) y HCC (n=23) se obtuvieron a través del Servicio de Cirugía Hepatobiliar y Pancreática del Hospital Universitario de Salamanca, del Hospital Clínico Universitario de Navarra y del Biobanco de tumores del Hospital Universitario de San Sebastián, con el consentimiento escrito de los pacientes, según determina la legislación vigente. Los datos personales fueron tratados con confidencialidad y seguridad, de acuerdo con la normativa basada en la Ley 15/99 (R.D. 994/99) y los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del área de Salud de los distintos hospitales de procedencia. La información de los pacientes y los tumores se resume en la tabla del anexo MM-1 (página 95).

#### 3.1.2. Animales

Para los modelos de colangiocarcinogénesis se utilizaron ratas macho de la raza Wistar, entre 280-300 g, procedentes del animalario del Edificio Departamental de la Universidad de Salamanca.

Para la realización de pruebas de tumorigénesis *in vivo* se utilizaron ratones nude atímicos (Ico:Swiss-nu/nu) (Harlan Laboratories, Barcelona), que se mantuvieron en salas con condiciones controladas y con aisladores para garantizar un ambiente estéril.

Los animales tenían libre acceso tanto a la bebida como al pienso granulado comercial y se mantuvieron en habitaciones a temperatura (20°C) y humedad relativa controladas, dotadas de un sistema de iluminación regulable que establecía un ciclo de luz/oscuridad (12 h/12 h) constante.

Para la obtención de oocitos se utilizaron ranas hembra *Xenopus laevis* (Regine Olig, Hamburgo, Alemania). Se mantuvieron en tanques con agua con condiciones controladas de pH, dureza, contenido en nitratos, nitritos y cloro, y se alimentaron con pienso Xenopus XE40 (Mucedola, Milán, Italia) e hígado de rata.

Los animales fueron manipulados según las especificaciones de la Comunidad Europea (86/609/EEC y 2003/65/EC) y la normativa española vigente para el uso y cuidado de animales utilizados en experimentación (RD 1201/2005, BOE 252/34367-

91, 2005). Todos los protocolos experimentales empleados durante la realización de este trabajo fueron aprobados por el comité de Bioética para el uso de animales de laboratorio de la Universidad de Salamanca.

### 3.1.3. Líneas celulares

En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- Proporcionadas por la American Type Culture Collection (ATCC, LGC Standards, Barcelona): de HCC humano: Alexander o PCL/PRF/5 (CRL 8024) y SK-Hep-1 (HTB-52); de adenocarcinoma colorrectal: Caco-2 (HTB-37) y LS174T (CL-188); de coriocarcinoma humano: BeWo (CCL-98) y JAR (HTB-144); y embrionarias de riñón humano: HEK-293 (CRL-1573).
- De la casa comercial German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Alemania): de CGC humano: TFK1 (ACC 344) (extrahepático) y EGI-1 (ACC 385); y CGC de rata: NT-92 (ACC 639).
- Obtenidas de la European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, Reino Unido): la línea celular humana de carcinoma de pulmón de células grandes COR-L23 (92031919) y la sublínea resistente a múltiples fármacos COR-L23/R (96042339).

También se utilizaron las sublíneas resistentes a cisplatino LS174T/R, WIF-B9/R (línea híbrida obtenida de células Fao de hepatoma de rata y fibroblastos humanos WI-38), y Hepa 1-6/R (de hepatoma de ratón). Todas ellas fueron seleccionadas en nuestro laboratorio (Briz *et al.*, 2000) (Briz *et al.*, 2003).

Además, se utilizaron las líneas celulares de CGC de rata REUSAL-C44 y REUSAL-C49, que fueron obtenidas y caracterizadas como parte de este trabajo de Tesis Doctoral.

### 3.1.4. Bacterias

- Se utilizaron las cepas DH5 $\alpha$ , y BL21 (DE3), de *Escherichia coli* proporcionadas por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

- Las bacterias *E. coli* “One Shot ccdB Survival-T1R” competentes, de elevada eficacia de transformación, que se utilizaron para amplificar los vectores donadores y de destino para la clonación Gateway, fueron compradas a Invitrogen (Barcelona).

### 3.2. PRODUCTOS

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

- Abbot Laboratorios (Madrid): isofluorano (Forane®) y pentobarbital sódico (Nembutal N.R.).
- Air Liquide (Valladolid): carbógeno, CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> líquido.
- American Radiolabeled Chemicals (Itisa, Madrid): [<sup>3</sup>H]-ácido taurocólico ([<sup>3</sup>H]-TCA) con una actividad específica de 10 Ci/mmol.
- AppliChem (Madrid): ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico (HEPES), ácido morfolino propansulfónico (MOPS), agar, extracto de levaduras, fenol, galactosa, glicerol 80% estéril, leche descremada liofilizada y triptona.
- B. Braun (Melsungen, Alemania): sutura de seda.
- BD Biosciences (Madrid): cámaras multipocillo (Lab-tek) y fluido envolvente FACS Flow para citometría de flujo.
- Biomers.net (Ulm, Alemania): algunos cebadores (“primers”).
- Bio-Rad (Madrid): acrilamida, marcadores de pesos moleculares de proteínas (“Low range” y “Kaleidoscope”), membranas de nitrocelulosa, persulfato de amonio, rojo ponceau, tampón Tris 0,5 M pH 6,8, tampón Tris 1,5 M pH 8,8 y tetrametiletilendiamina (TEMED).
- Dako Diagnósticos (Barcelona): medio de montaje para fluorescencia.
- Enzo Life Sciences (Lausen, Suiza): sustratos específicos para determinación de la actividad caspasa 3, Ac-DEVD-AMC y caspasa 8, Ac-IETD-AFC.
- Fermentas (Quimigranel, Madrid): T4 polinucleótido quinasa.
- GE Healthcare (Barcelona): Reactivos de detección ECL (“Enhanced ChemioLuminiscence”) que incluyen los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa y los reactivos de detección 1 y 2, kit “GFX PCR DNA & Gel Band Purification”, kit “PlasmidPrep Mini Spin”, kit “illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit” y algunas enzimas de restricción.
- Isogen (De Meern, Holanda): algunos cebadores o “primers”.
- Life Technologies (Madrid): acetato de amonio, aminoácidos no esenciales 100x, anticuerpos secundarios fluorescentes anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo marcados con AlexaFluor® 594 ó AlexaFluor® 488, BODIPY® FL-prazosina, calceína

acetoximetil éster (calceína-AM), mezcla de antibióticos penicilina/estreptomicina, 4,6-diamidino-2-fenilindol (Dapi), inhibidor de tripsina de soja, kanamicina, kit comercial para la cuantificación de ARN “Ribo-Green RNA-Quantitation Kit”, kit comercial para la transcripción reversa (RT) “SuperScript<sup>®</sup> VILO™ cDNA Synthesis Kit”, kit para la transcripción *in vitro* “mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra”, “Lipofectamine™ LTX Reagent” y “Plus™ Reagent”, líquido estabilizador “RNA/later”, marcadores de peso molecular de ADN (25, 100 y 500 pb y 1 kb plus) y de ARN (0,24-9,5 kb y 0,5-10 kb), medios de cultivo Opti-MEM, DMEM F-12 con glutamax, Advanced MEM, medio RPMI 1640 con Glutamax™-I, medio SOC, mezclas enzimáticas “Gateway BP Clonase II” y “Gateway LR Clonase II”, oligonucleótidos para secuenciación M13 Forward y M13 Reverse, plásmido donador pDONOR 221, y de destino pcDNA6.2-V5-DEST, pcDNA6.2/V5/GW/CAT, Accuprime<sup>®</sup> Pfx ADN polimerasa de alta fidelidad, Platinum<sup>®</sup> PCR Supermix High Fidelity, proteinasa K, solución de vitaminas MEM, solución de carga para electroforesis en gel desnaturizante, suero bovino fetal (FBS), SYBR Green I para teñir ADN en geles de agarosa (“SYBR Safe”), “SYBR Green I PCR Master Mix”, “Taqman<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix”, y las tarjetas microfluídicas o TLDA.

- Leo Laboratorios S.A. (Madrid): heparina.
- Lonza (Basilea, Suiza): aminoácidos no esenciales MEM, marcador de pesos moleculares para proteínas “ProSieve™ QuadColor™ Protein Marker, 4,6-300 kDa”.
- Menarini Diagnostics (Barcelona): portaobjetos Optiplus™.
- Merck (Barcelona): acetato sódico anhidro, ácido fórmico, ácido fosfomolibdico, β-mercaptoetanol, cloruro sódico, etanol, formaldehído, glicerol, hidróxido sódico, isopropanol, metanol, reactivo de Folin Ciocalteau y tartrato disódico.
- Millipore (Waters Corporation, Madrid): cartuchos de octadecilsilano (Sep-Pak C18).
- MP Biomedicals LLC (Santa Ana, EE.UU.): líquido de centelleo UniverSol™ ES.
- Parke-Davis (Barcelona): anestésico ketamina (Ketolar).
- Perkin Elmer Life Sciences (Boston, EE.UU.): [<sup>14</sup>C]-bromuro de tetraetilamonio (TEA), con una actividad específica de 2,4 mCi/mmol.
- Promega Corporation (Madison, Wisconsin, EE.UU.): algunas enzimas de restricción, T4 ADN ligasa, kit “CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay”, kit Steady-Glo Luciferase Assay System y plásmidos pGEM<sup>®</sup>-T Easy y pGL4.10-[Luc2].
- Pronadisa (Hispalab S.A., Madrid): agarosa de baja electroendósmosis, agarosa de alta resolución MS-8 y agarosa de bajo punto de fusión.
- Qiagen (Izasa, Barcelona): “MiniElute Gel Extraction Kit”.

- Roche (Barcelona): ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetansulfónico (HEPES), DNAsa I y algunas enzimas de restricción.
- Sartorius (Goettingen, Alemania): filtros de nitrato de celulosa de 0,2 µm de tamaño de poro.
- Sigma-Aldrich (Madrid): ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), ácido linoleico, albúmina sérica bovina (fracción V), ampicilina, apotransferrina, azul de bromofenol, azul de Tripán, bicarbonato sódico, cis-diaminodichloroplatino II (cisplatino), clorhidrato de quinina, cloruro de colina, colagenasa, D-glucosa, dexametasona, dietilpirocarbonato (DEPC), dimetilsulfóxido (DMSO), ditioneitol (DTT), dodecil sulfato sódico (SDS), doxorubicina, Factor de Crecimiento Epitelial (Epidermal Growth Factor, EGF), fumitremorgina C (FTC), glutamina, hialuronidasa III, insulina, isotiocianato de fluoresceína (FITC), yoduro de propidio (IP), medios de cultivo “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM)”, “Minimum Essential Medium Eagle (MEM) “F-12 Coon’s modification”, “HAT”, “RPMI-1640” y “Williams” mezcla de antibióticos y antimicótico (penicilina, estreptomina y anfotericina B), mezcla de inhibidores de proteasas (4-(2-aminoethyl) bencenosulfonilfluoruro 104 mM, pepstatina A 1,5 mM, E-64 1,64 mM, bestatina 4 mM, leupeptina 2 mM y aprotinina 80 µM), nicotinamida, nitrato de calcio, Nonidet P40, ornitina, paraformaldehído, piruvato sódico, probenecid, rodamina 123, sal sódica de los ácidos desoxicólico (DCA), glicocólico (GCA), glicodesoxicólico (GDCA), glicoquenodesoxicólico (GCDCA), glicoursodesoxicólico (GUDCA), litocólico (LCA), taurocólico (TCA) y ursodesoxicólico (UDCA), sulfato de gentamicina, tioacetamida (TAA), tripsina de páncreas porcino, Tris (trihidroximetil aminometano) base (Trizma) o clorhidrato (Tris HCl), Triton X-100, verapamilo y xileno cianol.
- Sigma-Genosys (Cambridge, Reino Unido) algunos cebadores o “primers”.
- Takara (Laboratorios Conda, Madrid): algunas enzimas de restricción y solución de carga para electroforesis en gel.
- VWR Internacional (Barcelona): ácido acético glacial, ácido clorhídrico, bromuro de etidio, carbonato sódico, cloroformo, cloruro cálcico, cloruro magnésico, cloruro potásico, dihidrógeno fosfato potásico, fosfato ácido potásico, fosfato disódico, indicador universal de pH, medio de montaje Entellan<sup>®</sup>, mezcla de glicoles y resinas para realizar cortes en el criostato Tissue-Tek<sup>®</sup> O.C.T. (“Optimum Cutting Temperature”), sulfato magnésico y Tween<sup>®</sup> 20.
- Whatman (Madrid): papel Whatman para la transferencia en Western blot.

El tosilato de sorafenib (Nexavar<sup>®</sup>) fue proporcionado por el Servicio de Farmacia del Hospital Universitario de Salamanca, y el derivado citostático de cisplatino y ácido ursodesoxicólico, Bamet-UD2, fue sintetizado en nuestro laboratorio como se ha descrito previamente (Criado *et al.*, 2000).

El plásmido CMV5-rAsbt, fue sintetizado en nuestro laboratorio previamente (Vicens *et al.*, 2007a).

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

### **3.3. MEDIOS INSTRUMENTALES**

- Las pesadas se realizaron en balanzas electrónicas digitales Precisa 125 A y Sartorius BL 150S (Grupo Taper, Madrid). Para pesar los animales se utilizó también una balanza electrónica digital Precisa, modelo 600 C (Grupo Taper).
- Para las determinaciones de pH se utilizó un electrodo Crison PH BASIC 20 (Crison Instruments, Barcelona).
- El agua destilada y el agua ultrapura se obtuvieron con equipos de purificación de agua por ósmosis inversa Milli-Ro 10 Plus y Milli-Q 185 Plus, respectivamente (Millipore, Madrid).
- Las incubaciones se llevaron a cabo en un baño termostatzado LAUDA Ecoline StarEdition RE 106 y en un bloque térmico QBA2 Grant (Thermo Fisher, Madrid).
- Las centrifugaciones se realizaron en centrifugas refrigeradas 5417R y 5810R marca Eppendorf (Hamburgo, Alemania), Beckam Avanti J-20, y L8-M Ultracentrifuge, rotor 70.1 Ti (Beckman). También se utilizaron picofugas Stratagene (VWR International Eurolab, Barcelona).
- Las medidas espectrofotométricas se hicieron con un espectrofotómetro Hitachi U-2000 (Grupo Taper) y para la determinación de la viabilidad celular se utilizó un lector de ELISA modelo ELx808 (BioTek). Las determinaciones espectrofotométricas de la concentración de ADN y ARN se realizaron con un NanoDrop 1000 (Thermo Fisher) y se analizaron con el programa informático correspondiente. Para la cuantificación

fluorimétrica se utilizó un fluorímetro Hitachi F-4010 (Grupo Taper) y cubetas de cuarzo de la marca Hellma (Duerolab, Salamanca).

- Para hacer filtraciones a vacío se empleó una bomba Millipore modelo XX5522050 (Millipore Ibérica). Para la esterilización de materiales sólidos y líquidos, y material de cultivos celulares se empleó un autoclave modelo Tuttnaver 2340 M (Duerolab).
- 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 Sugical GMBH, Melsungen, Alemania). Para canular el conducto biliar se usaron cánulas de polietileno PE-10 (Biotrol Pharma, París, Francia).
- Las bombas peristálticas utilizadas fueron del tipo Microperpex 2132, de LKB Instruments (Farmacia España, Madrid).
- Para la PCR analítica y para la RT se utilizó un termociclador Eppendorf Mastercycle ep gradient (Thermo Fisher). Los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real en tubos de 0,2 ml se realizaron en un aparato ABI PRISM<sup>®</sup> 7300 Sequence Detection System, de Applied Biosystems. Para las tarjetas microfluídicas se utilizó el modelo ABI PRISM<sup>®</sup> 7900HT Sequence Detection System de la misma compañía. Para la visualización de las secuencias y diseño de estudios de restricción de los plásmidos se usó el programa Gene Construction kit 2.5.13 para MacOS X (Textco, New Hampshire, EE.UU.).
- El transiluminador empleado para la visualización de los ácidos nucleicos fue el modelo GelDoc 2000 (BioRad) perteneciente al Instituto de Microbiología-Bioquímica.
- La secuenciación de los fragmentos de ADN se realizó en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca.
- La electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa se realizó en un sistema de geles horizontales sumergidos modelo MT-1001 de la casa Ecogen (Madrid), acoplado a una fuente Bio-Rad Power Pac 3000 (Bio-Rad, Madrid).
- La electroforesis de proteínas se llevó a cabo en un sistema de electroforesis modelo Mini-Protean II Cell con fuente de alimentación modelo PowerPac 300. La transferencia electroforética a membranas de nitrocelulosa se realizó en un sistema Trans-Blot Cell II utilizando para ello la misma fuente de alimentación, todo procedente de la casa comercial Bio-Rad.

- Para la visualización de la fluorescencia de los geles de ácidos nucleicos y la luminiscencia de las membranas de western blot se empleó un equipo de análisis de imagen Fujifilm LAS-4000 (TDI, Madrid). La captura de imágenes se llevó a cabo con una cámara refrigerada del equipo, sin filtros y con una apertura del diafragma del objetivo de f 0,8 cuando se trataba de quimioluminiscencia, y con filtro Y515 y diafragma del objetivo f1,5 para SYBR Green, con luz azul como fuente de excitación. Las imágenes se analizaron con el programa informático MultiGauge v3.0 (Fujifilm).
- Para la evaporación de pequeños volúmenes de solventes se utilizó un “speed-vacuum” marca Savant modelo SPD121P acoplado a una bomba de vacío modelo UVS400A (Hucoa-Erlöss, Madrid).
- Las homogeneizaciones se realizaron con un homogeneizador Polytron Typ PT 10/35 Kinemática GMBH (Lucerna, Suiza) o un sonicador tipo baño Ultrasonic Cleaner 400 W, 30 kHz (Fungilab S.A., Barcelona).
- Para la realización de trabajos con cultivos celulares se utilizó una campana de flujo laminar modelo AV-30/70 (Telstar, Barcelona); las células se mantenían a 37°C en un incubador termostatzado con atmósfera de CO<sub>2</sub> humidificada de la marca Thermo, modelo Hepa Class 100 (Thermo Fisher), y se observaban a través de un microscopio Leitz Fluovert FS (Leitz). Los viales de almacenamiento de las distintas líneas celulares se conservaban en un contenedor de N<sub>2</sub> líquido (Thermo Fisher). Se utilizaron placas de cultivo y frascos Roux de cuello inclinado de la marca TPP (Biotech S.L., Madrid) para el cultivo de las líneas celulares. Para algunas líneas celulares se utilizaron frascos de cultivo con colágeno a la concentración de 0,5 mg/ml. La esterilización de las soluciones se hizo mediante filtros Sterivex de 0,2 µm (Millipore Ibérica). Para contar las células se utilizaron cámaras Thoma.
- Los cortes histológicos se realizaron con un criostato (Leica Microsystems, modelo 1900UV, Barcelona). Para visualizar la fluorescencia se utilizó un microscopio Nikon Eclipse TE 2000-S (Nikon, Duerolab) o un microscopio confocal modelo TCS SP2 (Leica) perteneciente al Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca.
- Para el crecimiento de bacterias se utilizó una estufa termostatzada a 37°C modelo S-20 (Selecta, Barcelona).
- Los oocitos se incubaron en una estufa Selecta (Pacisa). La selección de los oocitos se realizó con la ayuda de una lupa ZOOM 2000 (Leica, Buffalo, EE.UU.) y una



fuentes de luz fría KL750 (Schott, Wiesbaden, Alemania). Para la micro-inyección de los oocitos se utilizó un equipo Nanoliter 2000 (WPI, Hertfordshire, Reino Unido).

- La radiactividad de los isótopos  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$  se midió en un contador de centelleo líquido Beckman LS-6500 (Beckman Instruments, Madrid).
- El análisis por citometría de flujo de la captación o eflujo de compuestos fluorescentes se realizó en un citómetro FACScalibur, de la casa BD Biosciences (Madrid). El programa informático utilizado para la adquisición y análisis de datos fue el CellQuestPro, de la misma casa comercial.
- También se utilizó un sistema cromatográfico acoplado a un detector de masas, HPLC-MS-MS, de la casa Agilent Technologies (Santa Clara, EE.UU.). Este sistema se compone de un equipo de HPLC serie 1200 formado por: una bomba cuaternaria con degasificador de vacío (modelo G12354A); un inyector de 20  $\mu\text{l}$  de capacidad (modelo G1328B); un detector ultravioleta/visible (modelo G1314B) de longitud de onda variable y programable y una columna de fase reversa Zorbax C18 column 30 mm x 2,1 mm, 3,5  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro termostalizada a 35°C (Agilent Technologies). El Detector de Masas Triple Cuadrupolo (modelo G6410A) está acoplado a una fuente de ionización a presión atmosférica (API) serie 6000 (modelo G1948B). Todo el sistema se controló desde un ordenador Pentium IV (modelo HP LP2065) utilizando el software Q-TOF, QQQ, TOF (Agilent Technologies) que permite tanto el control del HPLC como del detector de masas.
- Los análisis de Pt se llevaron a cabo en un espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito (Z-8100 Polarized Zeeman) de la casa Hitachi utilizando cubetas tipo tubo pirolíticas, también de Hitachi (Pacisa). La lámpara de Pt de cátodo hueco era de la casa Photron (Victoria, Australia). Para la mineralización de las muestras se utilizó un termostato de bloque metálico Tembloc (Selecta, Barcelona).
- Las muestras se conservaron en congeladores a -20°C y -80°C marca Revco (Pacisa).
- Además se contó con un pequeño equipamiento como agitadores magnéticos Selecta (DureoLab), agitadores Vortex de Ika Works (Wilmington, EE.UU.) y micropipetas Gilson (Prosisa, Salamanca).

- Todo el material de vidrio utilizado para las síntesis químicas procedía de Afora (Madrid). Cuando era utilizado en biología molecular se trataba mediante calor seco, durante un mínimo de 4 h, en una estufa termostaticada a 180°C, modelo S-20 (Selecta).

#### **Soluciones comunes utilizadas**

- Medio Luria-Broth (LB): Triptona 10 g/l, extracto de levaduras 5 g/l, NaCl 10 g/l, NaOH 80 mg/l, pH 7,0. El medio LB para las placas contenía, además, 15 g/l de agar.
- Solución salina: La solución salina se preparaba disolviendo NaCl en agua destilada hasta conseguir una concentración final de 150 mM.
- Pentobarbital: El pentobarbital sódico se disolvía en solución salina (5 mg/ml).
- Tampón MOPS 10x: MOPS 0,2 M, acetato sódico anhidro 80 mM, EDTA 10 mM, pH 7,0.
- Tampón RIPA: PBS, Nonidet P40 1%, desoxicolato sódico 0.5%, SDS 0.1%.
- Tampón TAE: trizma base 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 1 mM de pH 8,0.
- Tampón TE 1x: Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0.
- Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, pH 7,4.
- PBS con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>: PBS 1x, CaCl<sub>2</sub> 0,9 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,49 mM, pH 7,4.

### **3.4. EXPERIMENTOS *IN VIVO***

#### **3.4.1. Grupos experimentales utilizados en el modelo de CGC**

Se utilizaron ratas Wistar macho que se sometieron a diferentes protocolos experimentales:

**Grupo de tioacetamida (TAA)**: La TAA se administró disuelta en el agua de bebida a la dosis de 0,05% (p/v) durante todo el tiempo experimental.

**Grupo de colestasis (BDL):** La colestasis obstructiva se indujo quirúrgicamente en animales anestesiados con isoflurano (Forane®). Tras afeitar el campo operatorio, se desinfectó con tintura de yodo y se practicó una laparotomía media de 4-5 cm desde el cartílago xifoides. Seguidamente se disecó el conducto biliar común, se realizó una ligadura doble por encima de la desembocadura de los conductos pancreáticos y se cortó el conducto entre las dos ligaduras. A continuación, se cerró la cavidad abdominal por planos con sutura continua en el peritoneo y músculo, y con puntos individuales en “U”, en el caso del plano cutáneo. La región abdominal se impregnó exteriormente con un antiséptico para evitar posibles infecciones y los animales se colocaron bajo una lámpara calefactora hasta que se recuperaron de la anestesia.

**Grupo de TAA y colestasis (TAA+BDL):** A los animales de este grupo experimental se les indujo una colestasis obstructiva como se detalla en el apartado anterior, y después de un día de recuperación tras la operación, el agua de bebida convencional fue sustituida por agua con TAA disuelta a la dosis de 0,05%.

**Grupo control:** Como animales control se usaron ratas del mismo sexo, edad y peso, que recibían agua de bebida convencional.

**Grupo “sham”:** Las ratas “sham” para el grupo BDL se obtuvieron tras localizar y disecar el conducto biliar, y cerrar de igual forma la cavidad torácica.

En todos los casos, al final del periodo experimental los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (i.p., 50 mg/Kg p.c.) y se recogió de cada uno:

- sangre de la vena cava, para realizar determinaciones analíticas en suero.
- el hígado, que tras lavarse con solución salina, y secar ligeramente, se pesaba y se separaban muestras para colocar inmediatamente en RNA/ater® (para conservar y posteriormente extraer ARN total), o congelar en nitrógeno líquido (para procesarlas para Western blot, para inmunofluorescencia, o para realizar estudios histológicos). Las muestras de tejidos se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

### 3.4.2. Experimentos *in vivo* de captación de FITC-GC en ratas con CGC

Para evaluar la capacidad de las células colangiolares tumorales de captar derivados de ácidos biliares se utilizó un ácido biliar fluorescente exógeno, el FITC-GC, que se sintetizó en nuestro laboratorio por conjugación de ácido glicocólico con

isotiocianato de fluoresceína (FITC) siguiendo el método descrito por Sherman y Fisher (Sherman *et al.*, 1986).

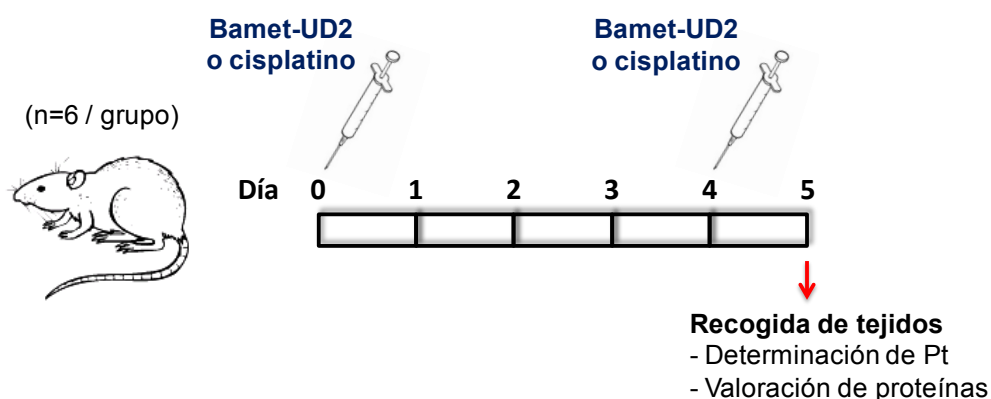
Tras anestesiar al animal con pentobarbital (i.p., 50 mg/kg p.c.), se iniciaba el procedimiento quirúrgico con la inserción de un catéter en la vena yugular izquierda.

Al finalizar la infusión de FITC-GC, se realizaba una laparotomía ventral media y se procedía a recoger muestras de tejido hepático que se congelaron inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

### 3.4.3. Estudios *in vivo* de captación de derivados de platino en CGC de rata

Para evaluar la capacidad de las células colangiomales tumorales de captar el derivado citostático Bamet-UD2 se utilizaron ratas Wistar que habían desarrollado tumores tras una administración de TAA al 0,05% durante 36-40 semanas (como se describe en el apartado 3.4.1).

Los animales recibieron dos dosis de 10 nmol/g p.c. de Bamet-UD2 o de cisplatino, por vía intraperitoneal los días 0 y 4 como se muestra esquemáticamente en la figura MM-1. Un día después de la segunda dosis de Bamet-UD2 o cisplatino, los animales fueron sacrificados, y se recogieron muestras de tejido tumoral y no tumoral, que se procesaron para determinar la cantidad de Pt incorporada mediante espectrometría de absorción atómica (apartado 3.18.10), o para valorar proteínas (apartado 3.18.4).



**Figura MM-1:** Esquema temporal de la administración de Bamet-UD2 o cisplatino a ratas con desarrollo de CGC, para estudios de incorporación de Pt en tejidos.

#### 3.4.4. Estudios de capacidad tumorigénica en ratones nude

Para comprobar la capacidad tumorigénica de las líneas celulares obtenidas como parte de esta Tesis Doctoral (apartado 4.2.3) se utilizaron ratones nude atómicos, que recibieron una inyección subcutánea en el dorso de  $5 \times 10^6$  células en 250  $\mu$ l de solución salina estéril. Diariamente se hizo un seguimiento del estado general de los animales y de la evolución del volumen tumoral.

### 3.5. CULTIVOS CELULARES

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

- LS174T, Alexander, SK-Hep-1, Caco-2, HEK293, y NT-92: MEM suplementado con 2,2 g/l de bicarbonato sódico y 110 mg/l de piruvato sódico. La sublínea resistente al cisplatino LS174T/R se creció en presencia de 10  $\mu$ M de este fármaco.
- REUSAL-C44 y REUSAL-C49: Williams suplementado con 2,2 g/l de bicarbonato sódico, 2,38 g/l de Hepes, 17,3  $\mu$ g/l de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , 0,117 mg/l de dexametasona, 0,6 mg/l de insulina, 0,061 mg/l de etanolamina, 0,03 mg/l de EGF, 5 mg/l de transferrina, 5 g/l de ácido linoleico y 0,5 g/l de albúmina, 1,2 g/l de nicotinamida, 2 g/l de galactosa, y 100 mg/l de ornitina.
- TFK1: RPMI 1640 con GlutaMAX<sup>TM</sup>-I.
- EGI-1: DMEM suplementado con 2,2 g/l de bicarbonato sódico, 2,38 g/l de Hepes, y un 1% del cocktail comercial de aminoácidos no esenciales.
- BeWo: F-12K suplementado con 293 mg/l de L-glutamina y 2,2 g/l de bicarbonato sódico.
- JAr: RPMI 1640 suplementado con 293 mg/l de L-glutamina, 2,2 g/l de bicarbonato sódico, 4,5 g/l de glucosa, 2,38 g/l de Hepes y 110 mg/l de piruvato sódico.
- WIF-B9/R (sublínea celular resistente al cisplatino): F12 Coon's Modification suplementado con 2,2 g/l bicarbonato sódico y medio HAT (hipoxantina 10  $\mu$ M,

aminopterina 0,037  $\mu\text{M}$ , timidina 16  $\mu\text{M}$ ); además las células se crecían en presencia de una concentración 10  $\mu\text{M}$  de cisplatino.

- COR-L23: RPMI 1640 con GlutaMAX<sup>TM</sup>-I suplementado con 2,2 g/l de bicarbonato sódico. La sublínea resistente COR-L23/R se creció en presencia de 0,2  $\mu\text{g/ml}$  doxorubicina.

A todos los medios se les añadió FBS inactivado al 10% (v/v), salvo a las células WIF-B9/R que llevaban FBS no inactivado al 5% (v/v). La inactivación del suero se realizó a 56°C durante 30 min.

También se añadió una mezcla de antibióticos y antimicóticos al 1% que contenía: penicilina (20 U/ml), estreptomina (0,02 mg/ml) y anfotericina B (0,05  $\mu\text{g/ml}$ ); excepto a las líneas de CGC tanto humanas (TFK1, EGI-1) como de rata (NT92, REUSAL-C44 y REUSAL-C49) a las que se le añadía una mezcla de penicilina y estreptomina (sin el antimicótico).

Tanto al recibir las células como al recuperarlas del N<sub>2</sub> líquido en el que se almacenaban la descongelación de los criotubos se hizo en condiciones de esterilidad en baño maría a 37°C. Una vez descongeladas, se centrifugaron a 250 xg durante 10 min. El precipitado se resuspendió en el medio de cultivo correspondiente y se pasó a frascos Roux que se introdujeron en la estufa a 37°C, en atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> en aire y humedad relativa del 80%.

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

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

Para determinar la expresión de diversos genes en las distintas líneas celulares empleadas durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, las células se sembraron en placas de 6 pocillos en un volumen final de 2 ml/pocillo a una densidad celular adecuada en función de la línea celular. A las 48 h de la siembra, las células se recogían y se procesaban para la obtención del ARN total (apartado 3.8.1) o proteínas totales (apartado 3.18.4).

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

Para determinar la funcionalidad de las bombas exportadoras ABC mediante citometría de flujo, las células se sembraron en frascos Roux de 25 cm<sup>2</sup> en un volumen de 5 ml de medio y a una densidad variable en función del tipo celular. Tras 48 h en cultivo se recogieron y se procesaron según el protocolo recogido en el apartado 3.14.

### 3.5.3. Estudios de viabilidad celular

Para evaluar el efecto de agentes citostáticos en las distintas líneas celulares empleadas en esta Tesis Doctoral, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a la densidad adecuada en función de la línea celular. A las 24 h se añadían los agentes citostáticos, que se incubaban con las células un tiempo variable dependiendo del tipo de experimento, y tras 72 h se realizaba el test de formazán (apartado 3.18.5).

### 3.5.4. Transfección con lípidos catiónicos

La adquisición del transgén de interés por parte de una célula puede ser transitoria o estable. En el primer caso, el plásmido recombinante es extracromosómico y se pierde durante la división, mientras que en el segundo caso se integra en el genoma de la célula y se replica en cada división celular. El modelo experimental utilizado en este trabajo fue el de transfección transitoria de líneas celulares con “Lipofectamine™ LTX Reagent” y “Plus™ Reagent”.

**Tabla MM-1.** Cantidades de los reactivos requeridas para la transfección de las distintas líneas celulares.

Línea celular	Placa (N° pocillos)	ADN (ng)	OptiMEM (μl)	R. Plus (μl)	Lipofectamina (μl)	Medio (μl)	Lípidos/ADN (μl/μg)
Alexander	96	100	20	0,1	0,4	100	4
	24	500	100	0,5	2	500	4
SK-Hep1	96	100	20	0,1	0,2	100	2
	24	500	100	0,5	1	500	2
TFK1	96	100	20	0,1	0,3	100	3
	24	500	100	0,5	1,5	500	3
REUSAL-C49	96	100	20	0,1	0,4	100	4
	24	500	100	0,5	2	500	4

Previamente, en nuestro laboratorio se determinaron las condiciones óptimas para realizar la transfección de las células utilizadas en esta Tesis Doctoral con el

lípidos catiónicos Lipofectamina LTX y un plásmido que contenía el gen de luciferasa de luciérnaga pGL4.10-[Luc2], siendo las mezclas lípidos/ADN con las que se conseguía la mayor eficacia de transfección y menor toxicidad sobre las células, las que se indican en la tabla MM-1.

#### **3.5.4.1. Transfección transitoria para estudios de captación**

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 75.000 células Alexander/pocillo, 100.000 células SK-Hep-1/pocillo y 125.000 células TFK1/pocillo en un volumen de 500  $\mu$ l, y se transfectaron 24 h después, tiempo suficiente para que el cultivo alcanzase la subconfluencia. Como se indica en la tabla MM-1, la mezcla con la que se conseguía mayor eficacia de transfección y menor toxicidad celular en todos los casos contenía 500 ng de plásmido, diluido con 100  $\mu$ l medio Opti-MEM, y 0,5  $\mu$ l de reactivo Plus, que se une a las moléculas de ADN favoreciendo la posterior formación de liposomas. Para ello se dejaban 5 min en incubación a temperatura ambiente, y tras ese tiempo se añadía la cantidad óptima de lipofectamina LTX para cada línea celular.

#### **3.5.4.2. Transfección transitoria para estudios de viabilidad celular**

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos, a una densidad de 5.500 células Alexander/pocillo, 7.500 células SK-Hep-1/pocillo, 8.500 células REUSAL-C49/pocillo, o 10.000 células TFK-1/pocillo, en un volumen de 100  $\mu$ l y se transfectaban 24 h después, cuando habían alcanzado la subconfluencia. Para cada pocillo se realizaba la siguiente mezcla para la transfección: 100 ng de plásmido diluido en 20  $\mu$ l de medio Opti-MEM y 0,1  $\mu$ l de reactivo Plus, la mezcla se dejaba 5 min en incubación y a continuación se añadía la cantidad adecuada de lipofectamina LTX (Tabla MM-1).

En ambos casos, tras añadir la lipofectamina correspondiente a la mezcla para la transfección, se incubaba la mezcla de todos los reactivos a temperatura ambiente durante 30 min para que se formaran los liposomas, antes de añadirlos al cultivo. Al día siguiente tras la transfección se sustituía el medio con los complejos lípido-ADN por medio de cultivo fresco.

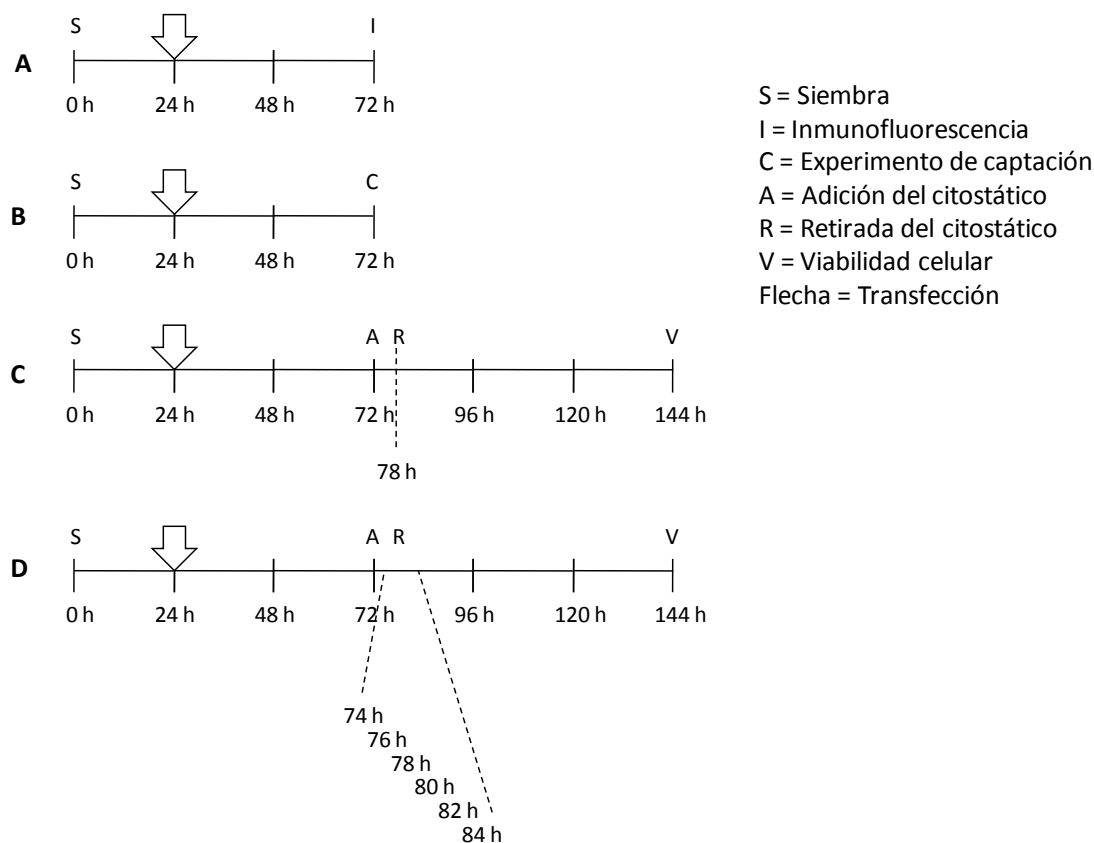
#### **3.5.4.3. Transfección transitoria para estudios de localización subcelular de variantes de OCT1 por inmunofluorescencia**

Para los estudios de localización subcelular de variantes de OCT1 se utilizaron células Alexander que se sembraron sobre cubres estériles en placas de 24 pocillos, a



la misma densidad y con las mismas condiciones para la transfección que las detalladas en el apartado 3.5.4.1 para llevar a cabo los ensayos de captación. La inmunofluorescencia se llevaba a cabo dos días tras la transfección.

Los protocolos experimentales realizados tras la transfección se resumen esquemáticamente en la Figura MM-2.



**Figura MM-2:** Esquema temporal de los experimentos con células transfectadas transitoriamente. **A.** Estudio de la localización subcelular de variantes de OCT1 por inmunofluorescencia. **B.** Estudios de actividad transportadora de las variantes de OCT1 mediante ensayo de captación de [<sup>14</sup>C]-TEA, o captación de derivados de platino en células transfectadas con OCT1 o Asbt. **C.** Experimentos de sensibilidad al sorafenib con las distintas variantes de OCT1. **D.** Experimentos de sensibilidad a distintos compuestos según el tiempo de exposición.

### 3.6. AISLAMIENTO DE CÉLULAS HEPÁTICAS DE RATA

Para el aislamiento de hepatocitos se utilizaron ratas macho control, con un peso aproximado de 200 g, y para el aislamiento de colangiocitos tumorales se utilizaron ratas que habían desarrollado CGC tras haber recibido tratamiento con TAA a la dosis de 0,05% (p/v) durante 40 semanas. Todos los animales se mantuvieron en ayunas desde la noche anterior.

En ambos casos se realizó una adaptación del método de Berry (Berry *et al.*, 1969) con algunas modificaciones (Monte *et al.*, 1999).

El procedimiento quirúrgico fue común para el aislamiento de ambos tipos celulares y se iniciaba anestesiando al animal con pentobarbital (i.p., 50 mg/kg p.c.). Tras afeitar y desinfectar el campo operatorio con alcohol al 70%, se practicaba una laparotomía ventral media. A continuación, se colocaban varios hilos para realizar ligaduras en la vena gastroduodenal y la arteria hepática, así como en la vena porta y la vena cava inferior justo por encima de los pedículos renales. Se procedía entonces a la canulación de la vena porta, a través de la cual se iniciaba una pre-perfusión con PBS sin calcio (previamente gaseado con carbógeno y atemperado a 37°C). Rápidamente, se daba un corte a la vena cava inferior a nivel abdominal y se cerraban todas las vías de salida excepto la vena cava inferior, en la que se insertaba una cánula a través de la aurícula derecha. Esta primera perfusión se mantenía, de manera no recirculante, durante 10 min, a una velocidad aproximada de 40 ml/min.

El siguiente paso era la perfusión del hígado con la solución de colagenasa (0,5 mg/ml) de manera recirculante durante 5-8 minutos (hasta que se observaba un cambio claro en la consistencia del hígado).

A continuación, se extraía el hígado y se colocaba en un crisol con 10 ml de la solución de colagenasa (para el aislamiento de hepatocitos), o con una solución que además de colagenasa contenía hialuronidasa III (1 mg/ml), DNAsa (0,1 mg/ml) e inhibidor de tripsina de soja (0,1 mg/ml) (para el aislamiento de colangiocitos).

En ambos casos, seguidamente se procedía a disgregar el tejido mecánicamente, y en el caso de los colangiocitos con agitación durante unos minutos. Seguidamente, se diluía con PBS con calcio hasta aproximadamente 200 ml y la suspensión resultante se pasaba por 2 mallas de diferente tamaño para retirar el tejido no disgregado.

Para eliminar las células no parenquimales y las células muertas o dañadas se realizaban cuatro centrifugaciones a 43 xg durante 2 min a 4°C. El precipitado resultante se resuspendía en PBS con calcio, excepto en la tercera centrifugación en la que se resuspendía en PBS con calcio y albúmina. La última centrifugación se hacía en las mismas condiciones durante 4 min y finalmente se resuspendía en medio de anclaje.

Para el recuento de las células se utilizó una cámara de Thoma y se diluyeron con azul de tripán para determinar el porcentaje de células vivas (no teñidas) y muertas (de color azul intenso) y conocer la viabilidad de la preparación.

A continuación, se sembraron las células en placas recubiertas de colágeno tipo I con medio de anclaje y se incubaron a 37°C, durante 90 min, para permitir la adhesión de las células a las placas. Transcurrido ese tiempo se retiraba el medio de anclaje (junto con las células no viables que no se hubiesen pegado) y se sustituía por medio de cultivo (con una composición igual al medio de anclaje pero enriquecido con EGF, etanolamina, transferrina, ácido linoleico, albúmina, nicotinamida, ornitina y FBS).

En el caso del aislamiento de hepatocitos los experimentos se iniciaban inmediatamente tras el anclaje de las células y finalizaban transcurridas 24 h del cultivo, para evitar la dediferenciación hepatocitaria.

En el caso del aislamiento de colangiocitos, las células obtenidas fueron sometidas a una doble selección clonal (mediante dilución límite) para generar un cultivo monoclonal. La obtención y caracterización de estas líneas celulares se llevó a cabo como parte del trabajo de esta Tesis Doctoral, y se describe en el apartado 4.2.3 de Resultados/Discusión.

### 3.7. EXPERIMENTOS DE CAPTACIÓN EN LÍNEAS CELULARES

#### Soluciones utilizadas:

- Medios de preincubación (MP) y de captación (MC), pH 7,4: NaCl 96 mM, KCl 5,3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,1 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,8 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, D-glucosa 11 mM, y HEPES 50 mM.
- Medio Lowry: NaOH 100 mM y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 189 mM.

#### 3.7.1. Experimentos de captación de [<sup>3</sup>H]-TCA

Los experimentos de captación de [<sup>3</sup>H]-TCA se realizaron siguiendo un protocolo puesto a punto previamente en nuestro grupo de investigación (Marin *et al.*, 2003). Las células se sembraron en placas de 3,5 cm de diámetro, a una densidad de 8x10<sup>5</sup> células/placa y el experimento se iniciaba las 24 h del cultivo, tiempo necesario para

que se alcanzara la semiconfluencia. En el caso de células transfectadas con Asbt, el experimento tenía lugar a los 2 días de la transfección.

Las células se preincubaron a 37°C durante 30 min con MP, tras ese tiempo se añadió 1 ml de MC, con [<sup>3</sup>H]-TCA a una concentración final de 5 µM y cada placa se dejó en incubación a 37°C durante 60 min. En algunos experimentos se estudió la evolución temporal de la captación, incubando las placas un tiempo variable entre 1 y 60 min.

Terminado el tiempo de incubación las placas se colocaron sobre hielo, se aspiró el medio y se realizaron 4 lavados con 1 ml de MC frío para parar la captación. Finalmente, se añadió 1 ml de medio Lowry y se dejó durante al menos 2 h a temperatura ambiente para despegar y digerir las células. Las placas se raspaban con una espátula para obtener el lisado celular y se tomaba una alícuota para determinar proteínas (apartado 3.18.4), y otra para determinar la radioactividad (apartado 3.18.6).

En todos los experimentos se determinó además, la captación celular a 4°C y tiempo 0, para lo cual las placas con las células en cultivo se mantuvieron sobre hielo e inmediatamente después de añadir el [<sup>3</sup>H]-TCA se realizaban los lavados con MC frío y se añadía Lowry. Como “blancos” se utilizaron lisados de células procesadas del mismo modo, pero a las que no se les añadió el ácido biliar radiactivo.

### **3.7.2. Experimentos de captación de [<sup>14</sup>C]-TEA**

Para estos estudios se utilizaron células Alexander, SK-Hep-1 y TFK1 transfectadas con OCT1 silvestre o con las distintas SNPs como se detalla en el apartado 3.5.4.1.

El experimento de captación se iniciaba 24 h tras la transfección de las células. Tras 30 min de preincubación con MP se añadían 250 µl de MC con [<sup>14</sup>C]-TEA a una concentración de 50 µM para las células Alexander, o 150 µM en el caso de las células Sk-Hep-1 y TFK1, en presencia o no de 250 µM de quinina (un inhibidor de OCT1), las placas se dejaban en incubación a 37°C durante 1 h.

Además, algunos pocillos con células se incubaron sin el compuesto radioactivo, las cuales se utilizaron como blanco de captación.

La captación se paraba con MP frío y los lavados se repitieron 4 veces. Igual que en el caso anterior las células se lisaban con Lowry y se dejaban en incubación a temperatura ambiente. Tras raspar cada pocillo con una espátula el lisado celular se recogía y se utilizaba para determinar proteínas (apartado 3.18.4) y para determinar la radioactividad (apartado 3.18.6).

### 3.7.3. Experimentos de captación de derivados de platino en células Alexander

Al igual que en los casos anteriores el experimento se iniciaba 24 h después de la transfección de las células con OCT1 o Asbt, según el caso. Tras 30 min de preincubación con MP se añadían 250  $\mu$ l de MC con 50  $\mu$ M de Bamet-UD2 o cisplatino que se incubaron a 37°C durante 1 h. Además, algunos pocillos se incubaron en ausencia de Bamet-UD2 y cisplatino, para utilizarlos como blancos de captación.

La captación se paraba con MC frío y los lavados se repetían 4 veces. Para finalizar las células se lisaban con SDS al 1%, se dejaban en incubación a temperatura ambiente y se raspaba cada pocillo con una espátula. El lisado resultante se utilizaba para determinar contenido de Pt por espectrometría de absorción atómica (apartado 3.18.10) y para valorar proteínas (apartado 3.18.4).

## 3.8. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ARNm POR RT-PCR CUANTITATIVA

Para determinar los niveles de expresión de genes se utilizó una variante de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis et al., 1986), la PCR cuantitativa a tiempo real. La PCR cuantitativa se llevó a cabo utilizando como sistema de detección SYBR Green I (componente de la mezcla de reacción “SYBR Green PCR Master Mix”) o sondas Taqman<sup>®</sup> según el caso.

### 3.8.1 Extracción del ARN total

Para extraer el ARN total a partir de homogeneizados de tejido o de extractos celulares, se utilizó el kit comercial “illustrNAspin Mini RNA Isolation Kit” (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del proveedor. Se utilizaron aproximadamente 30 mg de tejido ó 5x10<sup>6</sup> células. El ARN total purificado se cuantificaba fluorimétricamente utilizando el método de RiboGreen (apartado 3.18.3).

La integridad del ARN extraído se comprobó mediante la visualización de las bandas del ARNr 18S y 28S, tras ser sometido a electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante al 1% (apartado 3.9.2.1). Se consideró que el ARN extraído no se había degradado si eran visibles, de forma nítida y localizada, las bandas correspondientes al ARNr 18S y 28S.

### 3.8.2. Transcripción reversa (RT)

Para sintetizar el ADNc para utilizar como molde en la PCR se realizó una RT de 2 µg de ARN total, utilizando la mezcla de reactivos “SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit” (Invitrogen).

### 3.8.3. Diseño de cebadores

**Tabla MM-2.** Cebadores utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes de rata por RT-PCR cuantitativa.

Proteína	Gen	“Primer” Forward (5'→3')	“Primer” Reverse (5'→3')	Amplificó n (pb)	Número de acceso
β-actina	<i>Actb</i>	TCTGTGTGGATTGGTGGCTCTA	CTGCTTGCTGATCCACATCTG	68	NM_031144
Albúmina	<i>Alb</i>	ACAGCATTTCAAAGGCCTAGTCTCTGA T	CTCCGAAGAGAGTGTGAATGGAC T	171	NM_134326
Asbt	<i>Slc10a 2</i>	TCAGTTTGAATCATGCCTCTCA	ACAGGAATAACAAGCGCAACCA	306	NM_017222
Bax-α	<i>Bax-α</i>	ATGGAGCTGCAGAGGATGATT	TGAAGTTGCCATCAGCAAACA	97	NM_017059
Bcl2	<i>Bcl2</i>	TGGGATGCCTTTGTGGAECT	TCTTCAGAGACTGCCAGGAGAAA	73	U34964
Bcrp	<i>Abcg2</i>	TTATGTGGTTCAAGATGACGTTGTG	TTCCAACCTTGGAACTGCTACTT T	173	NM_181381
CD163	<i>Cd163</i>	GTGCTGGGTCTCCCGGTT	TTCCTTCCTCAGGAGCCTGAGT	109	NM_00110788 7
CK-7	<i>CK7</i>	CTCAAGACCCTTCACGAGACAGAGTT A	CTGGGCTTTGACGTGAGCAATGAT	129	NM_00104787 0
Claudin-4	<i>Claudin 4</i>	CTGGGAAGGCCTGTGGATGAA	GAGCACCCACGATGATGCTGAT	140	NM_00101202 2
Fxr	<i>Nr1h4</i>	TGTTGGCTGAATGTTTGTAACTGA	CATAGCTTGGTCGTGGAGGTC	142	NM_021745
Gst α	<i>Gst α</i>	GCCACGATTCTCGCTAGACAGTGA	ACTTCTCATCAAACCTCCACTCCTG CT	139	NM_017013
Gst pi	<i>Gstp1</i>	GCAGCAGCTATGCCACCGTA	TGCCCATACAGACAAGTGGACTTG A	164	NM_012577
IL-6	<i>Il6</i>	AGACTTCCAGCCAGTTGCCT	GGCAGTGGCTGTCAACAACA	52	NM_012589
Mdr1	<i>Abcb1b</i>	ATGGGCTCCTGGGACACAAT	ACCCCATGGCTGGAACA	100	NM_012623
Mrp1	<i>Abcc1</i>	ATCCGCTCTGGGATTGGAAT	AGAGGTAGAAACAAGGCACCCA	102	NM_022281
Mrp2	<i>Abcc2</i>	TTCTACCTTGCCAAGCAGGTGTT	AGCCATGTGCACAGGTAGAGGAT T	146	NM_012833
Mrp3	<i>Abcc3</i>	AAGGAGTCTTGCAACATGCAAAAT	CAAGGAGCTCATCTCTCTCATGAA	134	NM_080581
Neu	<i>c-erbB2</i>	TGTCAGATCTTGACTGGCACCATCT	GCAGGCCAGGCAGTCAGAA	132	AY116182
Ntcp	<i>Slc10a 1</i>	CGTTGCCGGAATGTTTGTCT	TGCCCTTCTGTCTCAGTTCATG	75	NM_017047
Oatp1	<i>Slco1a 1</i>	CTACTGCCCTGTTCAAGGCC	ATTGTATCTCTCAGATTCCGAGG	69	L19031
Oatp2	<i>Slco1a 2</i>	TGCGGAGATGAAGCTTACC	TCCTCCGTCACCTTCGACCTT	69	U88036
Oatp4	<i>Slco1b 2</i>	AGACGTTCCCATCACAACCAC	GCCTCTGCAGCTTTCCTTGA	68	AJ271682
Oct1	<i>Slc22a 1</i>	CATTGCAGACAGTTTGGCCGTAA	GCAGGCGAAAGAGCAACATGG	119	NM_012697
Ost-α	<i>Osta</i>	GCTGCCACCCTCATACTT	GATGCCATCAGGAATGAGAAACA	122	XM_221376
Ost-β	<i>Ostb</i>	AGAAACCAGGGCCGCTCTA	TCCTTCTGCACTGTGGTCCAT	104	XM_238546
Tgr5	<i>Gpbar 1</i>	CACCTGCTGGCTGCTTCTTT	GACCAGTACCCTGATGGCTC	109	NM_177936

Los cebadores o “primers” específicos para el ADNc de cada una de las proteínas a estudiar se diseñaron con el programa OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/Oligoanalyzer>) (Integrated DNA Technologies, Coralville, EE.UU.). Su especificidad se chequeó con el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los cebadores se diseñaron, siempre que fue posible, a caballo entre dos exones codificantes utilizando como secuencia de referencia la secuencia del ARNm publicada en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) específica para cada gen. Una vez diseñados, los cebadores fueron suministrados liofilizados por las casas comerciales. Antes de su uso, se reconstituyeron en agua bidestilada y se valoraron por espectrofotometría UV a una longitud de onda de 260 nm.

En las Tablas MM-2 y MM-3 se recogen las secuencias de nucleótidos de los cebadores utilizados para la cuantificación relativa de la abundancia del ARNm de las diferentes proteínas estudiadas en este trabajo de Tesis Doctoral.

**Tabla MM-3.** Cebadores utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes humanos por RT-PCR cuantitativa.

Proteína	Gen	Cebador Forward (5'→3')	Cebador Reverse (5'→3')	Amplicón (pb)	Número de acceso
ASBT	<i>SLC10A2</i>	GGAATCATGCCCTCACAGGATTCAT	GCTGACGCTCAGGTCCATGT	156	NM_000452
BCRP	<i>ABCG2</i>	CCCAGGCCTCTATAGCTCAGATCATT	CACGGCTGAAACACTGCTGAAACA	83	NM_004827
GAPDH	<i>GAPDH</i>	TGAGCCCGCAGCCTCC	TACGACCAAATCCGTTGACTCC	138	NM_002046
MDR1	<i>ABCB1B</i>	GCGCGAGGTGGAATGGAT	CCATGGATGATGGCAGCCAAAGTT	198	NM_000927
MRP1	<i>ABCC1</i>	CCGCTCTGGGACTGGAATGT	GTGTCATCTGAATGTAGCCTCGGT	166	NM_004996
MRP2	<i>ABCC2</i>	TGAAGAGGAAGCCACAGTCCATGA	TTCAGATGCCTGCCATTGGACCTA	171	NM_000392
MRP3	<i>ABCC3</i>	CCAAGTTCTGGGACTCCAACCTG	ATGATGTAGCCACGACAATGGTGC	160	NM_003786
OCT1	<i>SLC22A1</i>	TGCAGACAGGTTTGGCCGT	GCCCCAGCCAACAATTCTGTGAT	187	NM_003057
OST $\alpha$	<i>OSTA</i>	TTCCAGGTTCTCCTCATCCTGAC	CAATTCATCACTTGAGACCTGGTTTT	122	NM_152672
OST $\beta$	<i>OSTB</i>	TGGCAGCTGTGGTGGTCATT	TGGTGGCTGCATCGTTTCTT	83	NM_178859

### 3.8.4. Realización de la PCR cuantitativa

Las condiciones de temperatura para la PCR fueron las mismas en todos los casos. Las muestras se incubaron primero 2 min a 50°C, seguidos de 10 min a 95°C, y por último, se sometieron a 40 ciclos de 15 s a 95°C y de 1 min a 60°C.

La abundancia del ADN problema se corrigió por la del normalizador, GAPDH o  $\beta$ -actina, determinado paralelamente en cada muestra. Las determinaciones se

realizaron siempre por duplicado y se incluyeron blancos de reacción, es decir, tubos en los que se sustituyó el ADNc por agua ultrapura.

### 3.8.5. Cuantificación relativa

La cuantificación relativa se basa en el método de comparación de Ct. Se utiliza un control endógeno como elemento normalizador, de forma que, la relación entre el Ct del gen diana y el Ct del gen control endógeno, resulta un valor de Ct normalizado del gen diana. Este valor sirve para normalizar la cantidad de ADN añadido a la reacción y corregir variaciones en la cantidad de ARN de partida en la muestra. Para poder llevar a cabo este método y comparar los resultados, es necesario designar una muestra como calibrador, que es una muestra que sirve como base para comparar los resultados, es decir, a la que se le otorga el valor 1 de expresión. La cantidad de diana, normalizada frente al control endógeno, y relativa al calibrador/muestra control, viene dada por:

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

Para conseguir este valor es necesario realizar los siguientes cálculos:

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

### 3.8.6. Tarjetas microfluídicas

Las tarjetas microfluídicas (“Microfluidic Cards” o “TaqMan Low Density Arrays”, TLDA) son placas de 384 pocillos, que permiten realizar 384 reacciones de PCR al mismo tiempo, ya que cada pocillo de la placa contiene liofilizada la sonda Taqman para el gen de interés. Existen varios formatos de TLDA, que permiten analizar la expresión de entre 12 y 384 genes diferentes. Las TLDA utilizadas fueron del formato de 96, así en cada TLDA se cargaban dos muestras por duplicado, de manera que para cada muestra se analizaban 93 genes de interés más los controles endógenos ARNr 18S, GAPDH, y  $\beta$ -actina.

Las TLDA se pueden diseñar a medida en función de las necesidades que requiera el estudio que se pretenda realizar. Su uso presenta varias ventajas, ya que



el volumen de ADNc que se utiliza para cada reacción de PCR es mucho menor que el necesario para la PCR convencional en tubos, además es un método sensible, fiable, más barato que si se compran todas las sondas por separado y, sobre todo, muy rápido.

Para cargar la TLDA se mezclaba cada uno de los ADNc obtenidos en la reacción de RT (100 ng/puerto) con la Taqman Master Mix, y se cargaba la muestra en cada uno de los 8 puertos de la TLDA, después se centrifugaba la placa dos veces a 300 xg durante 1 min cada vez, finalmente se sellaba y se desencadenaba la reacción de PCR en el aparato ABI Prism 7900HT Sequence Detection System.

Para analizar los resultados, se llevó a cabo una cuantificación relativa como se describe en el apartado 3.8.5. Para normalizar los valores de Ct de los genes diana se utilizaron los genes GAPDH,  $\beta$ -actina y ARNr 18S como controles endógenos (la media de sus valores de  $\Delta$ Ct). Para el análisis estadístico se usó el algoritmo SAM (Significance Analysis of Microarray).

### **3.9. MÉTODOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

#### **3.9.1. PCR de alta fidelidad**

La PCR de alta fidelidad se llevó a cabo con el kit "AccuPrime *Pfx* SuperMix", que contenía la ADN polimerasa *Pfx* de alta fidelidad,  $MgCl_2$  y desoxinucleótidos trifosfato, disueltos en una solución tampón, más los "primers" a una concentración final de 200 nM y el ADN molde. Una vez preparada la mezcla de reacción, los tubos se incubaron a 95°C durante 5 min; más 40 ciclos de 95°C 15 s, 58°C 30 s y 68°C durante un tiempo variable (1 min por cada kb del amplicón); y un ciclo final de extensión a 68°C durante 10 min. En algunos casos se utilizó un gradiente de temperatura de anillamiento.

#### **3.9.2. Electroforesis en gel de agarosa**

##### **3.9.2.1. Geles de agarosa desnaturalizantes**

Para la preparación del gel se utilizó agarosa al 1% (p/v) con tampón MOPS 10x (10% v/v) y el formaldehído al 37% (18% v/v). La electroforesis se llevó a cabo en presencia de tampón MOPS 1x. Las muestras y el marcador de tamaños moleculares de ARN (0,5-10 kb) se mezclaron con un volumen de solución de carga desnaturalizante (formamida 95% (p/v), azul de bromofenol 0,025% (p/v), xileno cianol

0,025% (p/v), AEDT 18 mM y SDS 0,025% (p/v)) que contenía bromuro de etidio al 0,008% y se calentaron a 75°C durante 10 min.

### 3.9.2.2. Geles de agarosa no desnaturalizantes

Para la preparación del gel se utilizó agarosa disuelta en TAE 1x al 1 ó 2,5% (p/v), en función de los tamaños moleculares de las muestras a analizar. Se añadía reactivo SYBR Safe hasta conseguir una concentración 1/10.000 (v/v). El gel se colocaba en la cubeta de electroforesis con tampón TAE. Las muestras se mezclaron con 0,1 volúmenes de solución de carga (sacarosa 40% (p/v), azul de bromofenol 0,25 % (p/v) y xileno cianol 0,25 % (p/v)) antes de depositarlas en el gel. Como patrón de tamaños moleculares de ADN se emplearon los estándares de 25 pb, 100 pb, 500 pb ó 1 kb plus, según los casos. El gel se visualizaba en el equipo de análisis de imagen LAS-4000.

### 3.9.3. Métodos de clonación

#### 3.9.3.1. Clonación por recombinación Gateway

##### A. Fundamento

Es una tecnología de clonación altamente eficaz para clonar de manera direccional fragmentos de ADN (Hartley *et al.*, 2000). Está basada en el sistema de recombinación del fago lambda y permite la transferencia de fragmentos de ADN entre diferentes vectores manteniendo la orientación y la secuencia de lectura con respecto a los tripletes. Las reacciones de recombinación Gateway son versiones *in vitro* de las reacciones de integración y escisión del fago lambda. Es un método de clonación más rápido y eficaz que los procedimientos tradicionales que requieren reacciones de ligación o tratamiento con enzimas de restricción.

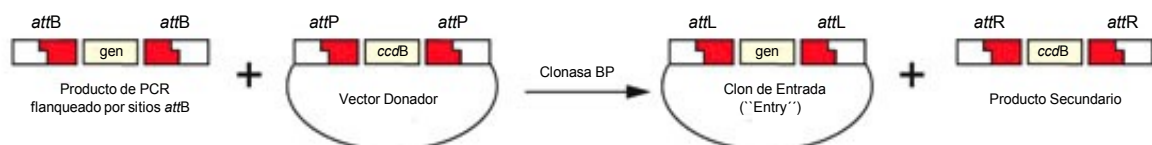
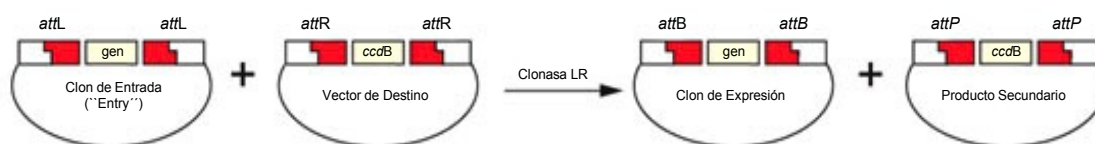


Figura MM-3. Esquema de la reacción de recombinación BP.

La reacción BP (Figura MM-3) es aquella en la que un fragmento de ADN, flanqueado por sitios *attB*, reacciona con un vector donador (pDONR), con sitios *attP*, para dar lugar a un vector denominado “Entry”, con sitios *attL*, y un producto secundario con sitios *attR*. Los sitios *att* confieren direccionalidad y especificidad a la reacción (Hartley *et al.*, 2000).

La reacción LR (Figura MM-4) es aquella en la que un vector “Entry”, con el ADN de interés flanqueado por sitios *attL*, reacciona con un vector de destino, con sitios *attR*, para dar lugar a un vector útil para ser empleado en el sistema de expresión correspondiente (Hartley *et al.*, 2000), y un producto secundario.



**Figura MM-4.** Esquema de la reacción de recombinación LR.

El gen *ccdB*, que contiene algunos productos intermedios, impide el crecimiento de las bacterias que posean un vector donador o de destino no recombinado, o un producto secundario. El producto del gen *ccdB* interfiere con la girasa bacteriana, impidiendo la proliferación de las colonias que contienen estos vectores, que se desean eliminar del proceso de selección. La propagación y amplificación de los vectores que contienen el gen *ccdB* se llevaron a cabo en la cepa de bacterias “One Shot *ccdB* Survival T1-R”, resistente a la acción tóxica del producto de este gen.

## B. Adición de adaptadores *attB* al ADNc de interés por PCR de alta fidelidad

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar la ORF (del inglés “Open Reading Frame”) del OCT1 silvestre (gen *SLC22A1*) (Tabla MM-4) y para añadir los adaptadores *attB* en los extremos se diseñaron en base a la secuencia NM\_003057 de la base de datos GenBank. La secuencia de los adaptadores *attB* se muestra en la Tabla MM-5.

**Tabla MM-4.** “Primers” y condiciones de PCR para amplificar la ORF del gen *SLC22A1*.

“Primers”	Posición (pb)	Condiciones para la PCR
Primer FA1 (Fw) (5'→3') ATGCCACCGTGGAT	106	5 min, 95°C
		15 seg, 95°C
Primer RA1 (Rv) (5'→3') GGTGCCCGAGGGTTCTGA	1767	30 seg, 58°C
		2 min 68°C
		10 min, 68°C

x 40

Tabla MM-5. Secuencia de los adaptadores *attB1* y *attB2*.

Adaptador	Secuencia (5' → 3')
<i>attB1</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGC
<i>attB2</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTG

La PCR se llevó a cabo con la enzima AccuPrime *Pfx* ADN polimerasa de alta fidelidad. Como ADN molde se utilizó ADNc extraído de hígado humano. Los productos obtenidos tras la PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa y las bandas de los tamaños adecuados se purificaron por extracción del ADN el gel de agarosa. El ADNc correspondiente a la ORF de OCT1 se clonó en un plásmido pGEMT (Promega), con la enzima T4-ADN ligasa.

### C. Obtención del vector Entry mediante recombinación BP

Partimos de los plásmidos pGEM-T que contenían la ORF de las variantes del OCT1 que habíamos obtenido por mutagénesis dirigida a partir del OCT1 silvestre (apartado 3.9.4). Cada plásmido contenía sitios *attB1* y *attB2* flanqueando la secuencia codificante del OCT1, que se subclonó en el vector pDONR221, con sitios *attP1* y *attP2*, generándose en la reacción de recombinación un vector Entry. La reacción de recombinación se llevó a cabo con la enzima clonasa BP II.

Se transformaron bacterias con el producto de reacción por choque térmico. Se sembraron en placas de medio LB con agar, suplementado con el antibiótico de selección correspondiente. Se crecieron algunas de las colonias en medio LB líquido suplementado con el antibiótico, de las que se extrajo el ADN plasmídico. La identidad de los clones seleccionados se confirmó con un estudio de restricción y mediante secuenciación.

#### D. Obtención del vector de expresión mediante recombinación LR

Los vectores Entry que contenían la ORF de las variantes del OCT1 se utilizaron para obtener los vectores de expresión al recombinarlos con los correspondientes vectores de destino pDEST para:

- el etiquetado con el epítipo antigénico V5 en el extremo C-terminal del OCT1 (plásmido pcDNA6.2-V5-DEST) o en el extremo N-terminal (plásmido pcDNA3.1-V5-DEST) en el caso de los vectores que contenían la ORF del OCT1 con un SNP que daba lugar a un codón de parada prematuro
- para la síntesis de ARNm (plásmido pcDNA3.1-Stop-DEST)
- para su expresión en células de mamífero (plásmido pcDNA3.1-Stop-DEST)

La reacción se llevó a cabo con la enzima clonasa LR II. Se transformaron bacterias con el producto de reacción por choque térmico y se siguió el protocolo que se ha explicado en el apartado anterior.

Los vectores de destino pcDNA3.1-Stop-DEST y pcDNA3.1-V5-DEST no están disponibles comercialmente y fueron obtenidos en nuestro laboratorio en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. El plásmido pcDNA3.1-Stop-DEST fue obtenido por clonación de la región del pcDNA6.2-V5-DEST que contenía el gen *ccdB* y el gen de resistencia a cloranfenicol, flanqueada por los adaptadores *attR1* y *attR2*, entre los sitios *Acc65I* y *BglII* del plásmido pcDNA3.1/Hygro(+). Este plásmido fue modificado para obtener el pcDNA3.1-V5-DEST por mutagénesis dirigida, siguiendo una estrategia similar a la detallada para la obtención de los plásmidos con las distintas variantes de OCT1, utilizando “primers” específicos que introducían la secuencia V5.

#### 3.9.4. Obtención de las variantes de OCT1 por mutagénesis dirigida

Para la obtención de las distintas SNPs de OCT1 se siguió un método de mutagénesis dirigida por amplificación del plásmido completo (Laible *et al.*, 2009) utilizando como molde el vector de expresión para el OCT1 silvestre. Los “primers” específicos para la mutagénesis se muestran en la Tabla MM-5.

Los plásmidos que contenían la ORF de las variantes del OCT1 S14F, R61C, C88R, L160F, S189L, G220V, R287G, G401S y G465R, que se han utilizado en este trabajo de Tesis Doctoral, fueron obtenidos por este mismo método de mutagénesis dirigida, como parte de varios Trabajos de Grado realizados en nuestro laboratorio.

**Tabla MM-6.** Oligonucleótidos utilizados para la obtención de los plásmidos que contenían las variantes del OCT1 por mutagénesis dirigida.

Nombre	Secuencia (5'→3')
OCT1-262delT-Fw	GCAGGCGCTATGAAGTGGACT
OCT1-262delT-Rv	CTGGCCAAGGAAGGCCTCG
OCT1-181insCGdelT-Fw	TCTGTGGCTGGAGCCCTG
OCT1-181insCGdelT-Rv	CTGGCTCAGCTCAGCCAC
OCT1-589CT-Fw	TCCAACACTACATGTCCATGCTGCTC
OCT1-589CT-Rv	CGAGAAGGCCATGAGCACG

Fw, forward; Rv, reverse.

### 3.9.5. Síntesis *in vitro* del ARNm de las variantes de OCT1

Para la síntesis *in vitro* del ARNm del OCT1 silvestre y de algunas de sus variantes se empleó el kit comercial “mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra”, siguiendo las especificaciones del proveedor. Los plásmidos utilizados contenían la ORF del OCT1 (silvestre o mutado) orientada correctamente para la transcripción *in vitro* a partir del promotor T7.

El primer paso para la síntesis *in vitro* del ARNm a partir de ADN plasmídico fue la linealización del plásmido recombinante en el extremo 3' de la secuencia codificante. De este modo se evitaba generar transcritos heterogéneos y extremadamente largos debido a la alta procesividad de la polimerasa del fago T7. La enzima de restricción utilizada para la linealización en todos los casos fue *EcoRV*.

Tras purificar el material, se usó el ADN plasmídico linealizado para la síntesis *in vitro* del mensajero con caperuza de metil-GTP en 5'. Al finalizar la transcripción, se eliminó el ADN molde por tratamiento con ADNasa I. Para hacer más estable a los mensajeros y mejorar su tasa de traducción, el kit incorpora un último paso para la adición de la cola de poli(A) utilizando una polimerasa poli(A) de *E. coli* y ATP.

Para finalizar, el ARNm sintetizado se purificó y se cuantificó por el método del RiboGreen (apartado 3.18.3). Por último, el tamaño molecular de los productos de la transcripción *in vitro* se confirmó por electroforesis en un gel desnaturante al 1% (p/v) (apartado 3.9.2.1).

Todo el material utilizado para la síntesis de ARNm estuvo libre de ARNasas.

### 3.10. EXPERIMENTOS EN OOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS*

Para los estudios de funcionalidad del transportador humano OCT1 silvestre o mutado se utilizó el modelo de expresión heteróloga de proteínas en oocitos de rana *Xenopus laevis*. Previo a la realización de los experimentos, los oocitos se extrajeron y se seleccionaron para la microinyección del ARNm sintetizado *in vitro* de las isoformas de OCT1 objeto de estudio.

#### 3.10.1. Extracción y selección de los oocitos

Las ranas se anestesiaron por inyección intramuscular de 0,1 ml de ketamina. El animal se colocó sobre hielo, y se abrió una pequeña incisión de aproximadamente 1 cm en un lateral en la parte inferior del abdomen. Se extrajeron los racimos de oocitos con unas pinzas delgadas, se cortaron y se introdujeron en medio OR-2 (NaCl 82,5 mM, HEPES 5 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 mM, pH 7,8). Una vez finalizada la extracción, se cerró la incisión del abdomen con sutura continua en la capa muscular y con dos puntos individuales en “U” en la piel.

Tras disgregar los oocitos y eliminar la gelatina folicular, se seleccionaron los que se encontraron en el estadio 6 de maduración con ausencia de deformaciones. Los oocitos sanos seleccionados se incubaron a 18°C en medio Barth (NaCl 88 mM, HEPES 15 mM, NaHCO<sub>3</sub> 2,4 mM, KCl 1 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0,3 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,41 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,82 mM, gentamicina 50 mg/l, pH 7,6) hasta que se realizó la inyección del ARN. En la figura MM-5 se muestra una imagen de oocitos de *X. laevis* en distintos estadios de maduración.

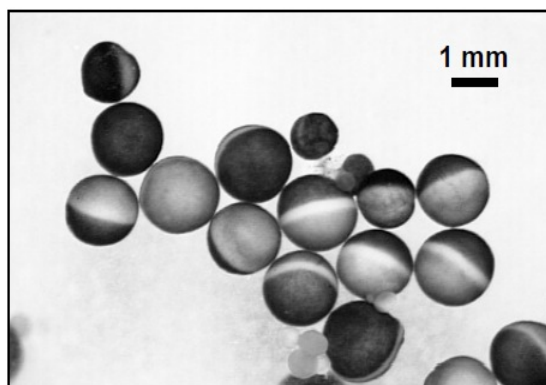


Figura MM-5: Imagen de oocitos de *X. laevis* extraídos y disgregados.

### 3.10.2. Microinyección del ARNm en los oocitos

Los oocitos se inyectaron uno a uno utilizando microcapilares con el volumen necesario para conseguir en el interior del oocito la cantidad deseada de ARN cargado en el microinyector. El volumen de inyección se mantuvo constante entre los distintos grupos de oocitos y se ajustaron las diferencias de volumen con TE libre de ARNasas. Cada oocito fue inyectado con 9 ng de ARNm sintetizado *in vitro*. Tras la inyección los oocitos se incubaron en medio Barth durante 2 días, tiempo en el que según experimentos previos la expresión de las proteínas transportadoras fue óptima.

### 3.10.3. Experimentos de captación en oocitos

Antes de comenzar los experimentos, los oocitos se lavaron 3 veces con solución de captación sin sustrato y se separaron en grupos de 15 oocitos por condición experimental. A continuación, se retiraba la solución de captación con una micropipeta y se incubaba cada tubo con la solución que contenía el sustrato de estudio.

#### 3.10.3.1. Captación de [<sup>14</sup>C]-TEA en oocitos

Una vez que se habían separado y lavado los oocitos, se incubaron con 100  $\mu$ l de una solución con 500  $\mu$ M del sustrato [<sup>14</sup>C]-TEA, cuya captación se quería determinar, con o sin 250  $\mu$ M del inhibidor quinina, a 25°C durante 1 h. La reacción se paraba lavando 4 veces con 4 ml de medio de captación (NaCl 100 mM, KCl 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 10 mM, pH 7,5) previamente enfriado en hielo. Para finalizar se separaban los oocitos y se colocaban individualmente en tubos de centelleo, añadiendo 200  $\mu$ l de SDS al 10% a cada tubo para solubilizar los oocitos. A continuación se procedía a medir la radiactividad.

En todos los casos un grupo de oocitos no inyectados con el ARNm del transportador se incubaron en paralelo y se utilizaron para determinar el transporte inespecífico.

La captación neta se calculó como la diferencia del contenido celular de los oocitos que expresaban el transportador (OCT1 silvestre o mutado) menos el contenido encontrado en los oocitos sin inyectar (captación inespecífica) al final del periodo experimental.



### 3.10.3.2. Captación de sorafenib en oocitos

Los oocitos se incubaron con una solución de 50  $\mu$ M de sorafenib  $\pm$  250  $\mu$ M de quinina, a 25°C durante 1 h. Se paraba la reacción lavando 4 veces con 4 ml de medio de captación frío. Para finalizar se separaban los oocitos y se colocaban individualmente en tubos de plástico, retirando cuidadosamente todo el volumen del medio de lavado, y se congelaban a -20°C hasta que fueron procesados para el análisis de la captación por HPLC-MS-MS.

### Procesamiento de los oocitos para medida de sorafenib por HPLC-MS-MS

A cada oocito se le añadían 100  $\mu$ l de una solución de dexametasona 10  $\mu$ M disuelta en metanol absoluto (que servía como control interno), después se sonicaban en un baño a 4°C durante 2 min a máxima potencia y se centrifugaban 5 min a 4°C a 20.000 *xg*. Se recogían 90  $\mu$ l del sobrenadante que se preparaban para el análisis en el HPLC-MS-MS (apartado 3.18.7).

## 3.11. BÚSQUEDA DE VARIANTES GENÉTICAS DE OCT1 POR SECUENCIACIÓN

Para analizar la presencia de mutaciones en la secuencia codificante del gen *SLC22A1* en biopsias hepáticas se realizaron los pasos que se detallan en los apartados siguientes:

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

El ARN total extraído (apartado 3.8.1.) de las biopsias de HCC y CGC a analizar fue utilizado como molde para la RT (apartado 3.8.2.), tras la retro-transcripción se amplificó la ORF del gen *SLC22A1* por PCR de alta fidelidad utilizando el kit "AccuPrime Pfx SuperMix" y "primers" específicos (hOCT1-FA1 y hOCT1-RA1) que se diseñaron en base a la secuencia NM\_003057 de la base de datos GenBank. La secuencia de los "primers" y las condiciones específicas de la PCR se mostraron en la tabla MM-4.

Se llevaron a cabo dos reacciones de PCR de alta fidelidad consecutivas para la obtención de material suficiente para una correcta secuenciación. Para ello, se utilizaron 2,5  $\mu$ l de ADNc como molde para la primera PCR, en un volumen de

reacción de 25 µl, y como molde para la segunda PCR se usaron 5 µl del producto de la primera, y en este caso el volumen de reacción fue de 50 µl. Los productos obtenidos tras la PCR de alta fidelidad se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa no desnaturalizante.

### B. Purificación en gel de agarosa

El producto visualizado en gel de agarosa no desnaturalizante fue purificado con el kit “GFX PCR DNA & Gel Band Purification” y se valoró la concentración en el Nanodrop. Para descartar la presencia de mutaciones artificiales generadas en la PCR se secuenciaron productos de al menos dos PCR independientes.

### C. Secuenciación del producto obtenido

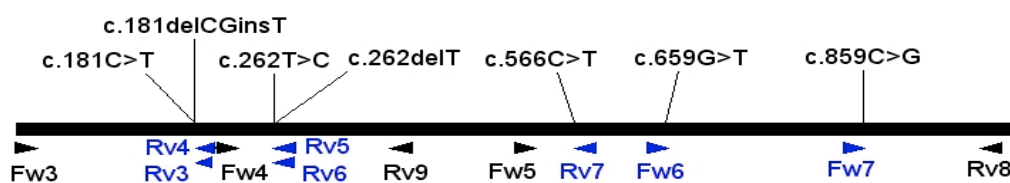
La secuenciación de la ORF del OCT1 se realizó en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca con un secuenciador automático capilar ABI PRISM3100-Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para la secuenciación se utilizaron los “primers” específicos mostrados en la tabla MM-7. El análisis de los cromatogramas tras la electroforesis capilar se llevó a cabo con el programa informático FinchTV 1.4 (Geospiza, PerkinElmer, Seattle, EE.UU.).

**Tabla MM-7.** “Primers” utilizados para la secuenciación de la ORF de OCT1.

Secuencia (5'→3')	Posición (pb)	Tipo de primer
CATGAGCACGCCCGACA	684	Reverse
GGTGGCTGTTATCACAAAAAGAAACTGAA	965	Forward
GAAGGGCTCAGCTTTTCGGTGA	1103	Reverse
GGAAGCGCACCTTCATCCTGAT	1136	Forward
GAGTGATGGTGTGTTCCCTCCCTG	1499	Forward
CAGGTGCCCGAGGGTTCT	1769	Reverse

### 3.12. BÚSQUEDA SELECTIVA DE VARIANTES INACTIVANTES DE OCT1 POR PCR-Q

En una primera etapa de nuestro estudio, la secuenciación de la ORF del OCT1 obtenida a partir de muestras de HCC y CGC puso de manifiesto la presencia en dichos tumores de diferentes SNPs en el gen *SLC22A1*. La búsqueda selectiva de SNPs inactivantes en la secuencia del OCT1 en un grupo mayor de tumores se llevó a cabo por RT-PCR cuantitativa.



**Figura MM-6.** Esquema representativo de la posición de anillamiento de los “primers” utilizados para la detección de las mutaciones inactivantes del OCT1 en un fragmento de su secuencia codificante. En azul se representan los “primers” que reconocen la secuencia mutada.

La PCR cuantitativa se llevó a cabo utilizando “primers” específicos a una concentración entre 50 nM y 500 nM. La secuencia y posición de los “primers” utilizados en la detección de cada SNP se muestran en la tabla MM-8 y en la figura MM-6, mientras que las combinaciones utilizadas de los mismos se muestran en la tabla MM-9. Los resultados fueron normalizados según la expresión del OCT1 determinada con la combinación de “primers” Fw3/Rv9.

**Tabla MM-8.** “Primers” utilizados para la determinación por RT-PCR cuantitativa de la expresión de las variantes del OCT1. La posición de los “primers” se refiere a la secuencia NM\_003057. Fw, “forward”; Rv, “reverse”.

Secuencia del primer (5'→3')	Posición (pb)	Tipo	Secuencia de reconocimiento
ATGCCACCGTGGATGACATT	106	Fw3	Silvestre
GGCTCCAGCCACAG	301	Rv3	Mutada
GGGCTCCAGCCACAGCA	302	Rv4	Mutada
GGAGGAGCTGAACTATACAGTGCCA	306	Fw4	Silvestre
TCCACTTCATAGCGCCTGCAC	386	Rv5	Mutada
CACTTCATAGCGCCTGCGC	384	Rv6	Mutada
GCAGACAGGTTTGGCCGTAA	613	Fw5	Silvestre
GCCATGAGCACGCCCA	686	Rv7	Mutada
GGGCAACTGGATGGCTGTC	747	Fw6	Mutada
TGTGCCGGAGTCCCCTG	948	Fw7	Mutada
GAAGGGCTCAGCTTTTCGGTGA	1103	Rv8	Silvestre
GAAGAGCCGGCGTGTGTCATA	503	Rv9	Silvestre

Previamente, fue necesario poner a punto la concentración óptima de cada pareja de “primers” y las temperaturas de anillamiento/extensión durante la PCR para conseguir una diferencia entre la señal producida por la secuencia mutada y la silvestre de al menos 5 Ct (Tabla MM-9). En esta etapa de puesta a punto del método experimental se utilizó como ADN molde en la PCR 1 pg de los plásmidos pGEM-T que contenían la ORF de la variante del OCT1 a analizar. Las condiciones estándar de

estos parámetros fueron una concentración de cada “primer” de 100 nM y una temperatura de anillamiento/extensión de 60°C. Si la diferencia entre la señal producida por la secuencia mutada y la silvestre era menor a 5 Ct, se procedió a aumentar la temperatura, así como la concentración del “primer” que reconocía la secuencia silvestre, mientras que se redujo la del “primer” que reconocía la secuencia mutada.

**Tabla MM-9.** “Primers” utilizados para la determinación por RT-PCR cuantitativa de la expresión de las variantes del OCT1. Fw, “forward”; Rv, “reverse”. T, temperatura de anillamiento y extensión en la PCR.  $\Delta$ Ct representa la diferencia entre el ciclo umbral (Ct) obtenido para la secuencia mutada y la silvestre.

Mutación	Combinación de primers	Concentración (nM)	T (°C)	$\Delta$ Ct
c.181C>T	Fw3/Rv4	500/50	63,0	7,5
c.181delCGinsT	Fw3/Rv3	100/100	60,0	11,3
c.262T>C	Fw4/Rv6	500/50	63,5	5,0
c.262delT	Fw3/Rv5	100/100	60,0	7,0
c.566C>T	Fw5/Rv7	500/50	63,0	9,0
c.659G>T	Fw6/Rv8	50/500	62,0	5,5
c.859C>G	Fw7/Rv8	100/100	60,0	8,5
Normalizador	Fw3/Rv9	100/100	60,0	

### 3.13. DETECCIÓN DE VARIANTES DE OCT1 GENERADAS POR “SPLICING” ALTERNATIVO

La expresión de variantes generadas por “splicing” alternativo del ARNm inmaduro del OCT1 en las biopsias de HCC y CGC se detectó en la secuenciación de la ORF del OCT1, como se comentó en el apartado 3.11. Además, para confirmar los resultados obtenidos se diseñaron oligonucleótidos que anillaban en regiones específicas situadas entre los exones 6 y 11 (Tabla MM-10). Se utilizaron combinaciones de estos oligonucleótidos para la detección selectiva por PCR analítica de las variantes generadas por un “splicing” alternativo. Los “primers” Fw1 y Rv1 son comunes a todas las isoformas del OCT1 descritas. Además, para confirmar los resultados de la expresión de la isoforma del OCT1 por escisión del exón 10 se utilizaron los oligonucleótidos Fw1 y Rv2, usando como “primer” específico para esta isoforma el Rv2, que anillaba a caballo de los exones 9 y 11. Para la detección de las variantes que contenían una inserción de 8 pb del intrón 7 entre los exones 7 y 8 (c.1276+1insGTAAGTTG), se utilizaron los oligonucleótidos Fw2, cuya secuencia

anillaba específicamente con el final del exón 7, la secuencia GTAAGTTG del intrón 7 y el comienzo del exón 8, y el Rv1.

La PCR analítica se llevó a cabo con el kit Platinum® PCR Supermix High Fidelity (Invitrogen), y usando los “primers” específicos en cada caso. Al finalizar la PCR se comprobó la presencia y el tamaño de los amplicones correspondientes a las diferentes variantes del OCT1 mediante geles de agarosa al 2% tras electroforesis, como se describe en el apartado 3.9.2.

**Tabla MM-10.** “Primers” utilizados para la detección por PCR de variantes del OCT1 generadas por un “splicing” alternativo.

Secuencia (5'→3')	Posición	Tipo de primer
GGAAGCGCACCTTCATCCTGAT	Exón 6	Fw1
CAGGTGCCCGAGGGTTCT	Exón 11	Rv1
TCACCTGGTAAGTTGACCTGCACT	Exón 7–Intrón 7	Fw2
GTGTTTTCTTTGGGCTTTGCTTTTCAAACAAAAT	Exón 9–Exón 11	Rv2

### 3.14. ESTUDIOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

#### Estudios de funcionalidad de proteínas transportadoras

##### Fundamento

El uso de fluorocromos en citometría de flujo permite evaluar la funcionalidad de proteínas transportadoras, entre las que se incluyen los distintos miembros de la familia ABC. Para ello, se utilizaron sustratos fluorescentes específicos para cada uno de los transportadores estudiados (tabla MM-11). Estos sustratos se acumulan en el interior de la célula dependiendo de la actividad de estas proteínas. Para realizar estos estudios, las células se incubaron en presencia de los sustratos y los inhibidores específicos de la actividad de estas proteínas transportadoras.

**Tabla MM-11.** Sustratos e inhibidores específicos de transportadores ABC utilizados en los análisis de actividad transportadora por citometría de flujo.

Proteína	Sustrato (1 $\mu$ M)	$\lambda$ emisión (nm)	Inhibidor	Concentración ( $\mu$ M)
BCRP	BODIPY-prazosina	530	Fumitremorgina C	5
MDR1	Rodamina 123	553	Verapamilo	5-10
MRPs	Calceína	517	Probenecid	100-500

### Procedimiento

Las células a procesar se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se centrifugaron durante 5 min. El precipitado de células se resuspendió en 100  $\mu$ l de medio de captación (NaCl 96 mM, KCl 5,3 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,1 mM,  $\text{MgSO}_4$  0,8 mM,  $\text{CaCl}_2$  1,8 mM, D-glucosa 11 mM, y Hepes 50 mM; pH 7,4) que contenía 1  $\mu$ M de sustrato y 50  $\mu$ g/ml de yoduro de propidio (IP) para marcar las células muertas, que se excluyeron del análisis. Para evaluar la actividad de las MRPs en las células, estas se incubaron con 1  $\mu$ M de calceína-AM, que una vez dentro de las células es hidrolizada por esterasas generando calceína, que es el sustrato de las MRPs. La suspensión celular se incubó durante 30 min a 37°C en oscuridad.

Para determinar la captación tras los 30 min, se añadieron 900  $\mu$ l de medio de captación a 4°C, para parar los procesos de transporte, y la fluorescencia intracelular se midió en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences), utilizando como luz de excitación la proporcionada por el láser de 488 nm. Como filtro de emisión se utilizó FL1 para los sustratos y FL2 para medir la fluorescencia del IP. Se determinó el valor de la fluorescencia media de cada una de las muestras analizadas en el citómetro de flujo.

En algunas muestras, tras incubar las células durante 30 min a 37°C para conseguir una carga adecuada con los sustratos, se añadió a la suspensión celular un volumen de 900  $\mu$ l de medio de captación, que contenía o no el inhibidor específico para cada transportador a la concentración que se indica en la tabla MM-11. Las células se incubaron en esta solución durante 30 min a 37°C, tiempo tras el cual se midió el contenido intracelular del compuesto fluorescente.

### 3.15. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

#### 3.15.1. Obtención de las muestras

##### Homogeneizados tisulares

Se procesaron fragmentos de tejidos (entre 50 y 250 mg) almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  que se sumergieron en tampón RIPA (3 ml/g de tejido) suplementado con cóctel de inhibidores de proteasas al 1% (v/v), y se dejó descongelar sobre hielo. A continuación, se homogeneizó con un politrón durante 1 min a mínima potencia y a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, el homogeneizado se incubó sobre hielo durante 30 minutos y a continuación, se centrifugó dos veces durante 10 min a  $500\times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, el sobrenadante (homogeneizado tisular) se alícuotó y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

##### Lisados de líneas celulares

Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos como se describe en el apartado 3.5.1. Cuando se llegó al punto del cultivo en el que las células debían ser recogidas, se despegaron de la placa mediante tripsinización y se incubaron con tampón RIPA suplementado con 1% (v/v) de un cóctel de inhibidores de proteasas. El lisado se centrifugó durante 20 min a máxima velocidad a  $4^{\circ}\text{C}$  y las alícuotas de sobrenadante se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

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

##### Preparación de los geles

La electroforesis vertical se llevó a cabo en geles de poliacrilamida del 5-12 % (p/v) (en función del peso molecular de la proteína de interés), en Tris-HCl utilizando el soporte del sistema "Mini-Protean II Cell".

##### Preparación de las muestras

La concentración de proteínas de los lisados celulares se determinó por el método de Markwell (Markwell MA, 1978) (apartado 3.18.4). Posteriormente, se desnaturalizaron durante 5 min en un baño de agua hirviendo.

### Condiciones de la electroforesis y de la transferencia

La electroforesis se realizó en una cubeta con tampón de migración, a una corriente constante de 80 V para el gel concentrador, incrementándose a 100 V para el gel separador o de resolución.

La transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se realizó en una cubeta con tampón de transferencia, a una corriente de 250 mA durante 1 h y 30 min y en agitación constante.

Se utilizó “rojo ponceau” para comprobar que las proteínas se encontraban en la membrana tras la transferencia. Esta tinción también permite valorar la carga de proteínas en cada calle.

#### 3.15.3. Inmunodetección

La membrana se sometió al siguiente procedimiento a temperatura ambiente: se realizaba el bloqueo durante 1 h con leche descremada al 5% (p/v) en PBS-T (PBS 1x con Tween 20) en agitación. Acto seguido se incubó durante 1 h con el anticuerpo primario correspondiente, también en agitación. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios diluidos en leche al 1% (p/v) en PBS-T (Tabla MM-12).

**Tabla MM-12.** Anticuerpos primarios utilizados en la detección de proteínas por Western blot.

Antígeno	Referencia	Especie de origen	Dilución	Casa comercial
Citokeratina-7	sc-23876	ratón	1:300	Santa Cruz Biotechnology
Claudina-4	329400	ratón	1:200	Invitrogen
Gstpi	ALX-804-510	ratón	1:100	Enzo Life Sciences AG
Gst $\alpha$	ab53940	cabra	1:3000	Abcam
GAPDH	sc-32233	ratón	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
AFP	sc-8108	cabra	1:500	Santa Cruz Biotechnology

Como anticuerpo secundario se utilizó el anticuerpo adecuado en cada caso, marcado con peroxidasa. Para la detección se utilizó un método quimioluminiscente (ECL) y un equipo de análisis de imagen LAS-4000.



### 3.16. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA

#### 3.16.1. Preparación de muestras

##### Cortes de tejidos

A partir de los fragmentos de tejido almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  se obtuvieron cortes de  $5\ \mu\text{m}$  en un criostato a una temperatura entre  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-15^{\circ}\text{C}$  que se colocaron en portas, y se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

##### Células en cultivo

Para el marcaje por inmunofluorescencia las células se sembraron en cámaras multipocillo (Lab-tek), a la densidad óptima según la línea celular, con  $500\ \mu\text{l}$  de medio de cultivo en cada pocillo, y se mantuvieron en cultivo hasta que alcanzaban entre el 60 y el 80% de confluencia.

#### 3.16.2. Inmunodetección

Las muestras se fijaron con metanol frío durante 1 min y, tras 3 lavados rápidos con PBS, se realizó un bloqueo con suero bovino fetal al 5% en PBS durante 30 min. La incubación con los anticuerpos primarios diluidos en PBS con 5% de suero bovino fetal se realizó a temperatura ambiente durante 1 h. La tabla MM-13 muestra las diluciones de los anticuerpos primarios utilizados en este estudio.

**Tabla MM-13.** Anticuerpos primarios utilizados en la detección de proteínas por inmunofluorescencia.

Antígeno	Referencia	Especie de origen	Dilución	Casa comercial
$\alpha$ -SMA	M0851	ratón	1:100	Dako
Citokeratina-7	sc-23876	ratón	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Claudina-4	329400	ratón	1:100	Invitrogen
Gstpi	ALX-804-510	ratón	1:50	Enzo Life Sciences AG
Neu	Sc-284	conejo	1:100	Santa Cruz Biotechnology
OV-6	Sc-101863	ratón	1:100	Santa Cruz Biotechnology
V5	R96025	ratón	1:800	Invitrogen

A continuación, se realizaron tres lavados de 10 min con PBS y se llevó a cabo la incubación, durante 1 h en oscuridad, con el anticuerpo secundario apropiado: anti-IgG de ratón o conejo conjugado con Alexa Fluor-488<sup>®</sup> o Alexa Fluor-594<sup>®</sup> (dilución 1:1000) y con DAPI para teñir los núcleos (dilución 1:5000). Después de tres lavados de 10 min con PBS, se añadió medio de montaje, se colocó el cubreobjetos y se selló

con esmalte de uñas. La visualización del marcaje se realizó en un microscopio confocal.

### **3.17. ESTUDIO HISTOLÓGICO. MICROSCOPIA ÓPTICA**

Los cortes de tejido de 5 µm de espesor realizados en criostato se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 20 min, se tiñeron por los métodos de hematoxilina-eosina o tricrómico de Masson, se deshidrataron por inmersión en soluciones crecientes de alcohol y por último en xilol, y se realizó el montaje con entellán para su estudio al microscopio óptico.

### **3.18. DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

#### **3.18.1. Parámetros bioquímicos en suero**

Se determinaron marcadores de daño hepático y renal en muestras de suero en un Vitros 5,1 FS Chemistry System (Ortho-Clinical Diagnostics, Barcelona) y un Analizador Modular DPP (Roche Diagnostics, Barcelona).

#### **3.18.2. Determinación de ácidos biliares en suero por fluorescencia**

La extracción de los ácidos biliares del suero, para su posterior determinación por fluorescencia, requería la separación por cromatografía en cartuchos Sep-Pak con relleno C18. Los ácidos biliares totales en suero se determinaron fluorimétricamente siguiendo el método de Talalay (Talalay, 1960) modificado por Mashige (Mashige *et al.*, 1976).

#### **3.18.3. Valoración del ARN por el método del RiboGreen**

El ARN total se valoró por fluorimetría utilizando el método comercial “RiboGreen RNA Quantitation Kit”. La técnica se basa en la unión específica de un fluorógeno (RiboGreen) al ARN, el cual emite fluorescencia de forma proporcional a la cantidad de ARN presente en la muestra.

#### **3.18.4. Determinación de proteínas totales**

Para medir la concentración total de proteínas se utilizó una modificación del método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) realizada por Markwell (Markwell MA, 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.

### 3.18.5. Determinación de la viabilidad celular

El test de formazán es un método colorimétrico utilizado para cuantificar el número de células vivas en ensayos de proliferación o quimiosensibilidad celular. El formazán, soluble en medios acuosos, se forma a partir de sales de tetrazolio por la acción de deshidrogenasas presentes en las células metabólicamente activas (Marshall *et al.*, 1995). En este estudio se utilizó el kit comercial “CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay” que contiene metasulfato de fenazina (PMS) y sal de tetrazolio (MTS).

### 3.18.6. Determinación de radiactividad

La radiactividad de los isótopos <sup>3</sup>H y <sup>14</sup>C se midió en un contador de centelleo líquido, utilizando en cada medida 4 ml de líquido de centelleo.

### 3.18.7. Medida de sorafenib por HPLC-MS-MS

Una vez se procesaron los oocitos como se describió en el apartado 3.10.3.2. se siguió una modificación del método descrito por Sparidans (Sparidans RW, 2008) para la medida de sorafenib por HPLC-MS-MS.

La separación cromatográfica se realizó empleando una columna Zorbax C18 (30 mm x 2,1 mm; 3,5 µm) termostalizada a 35°C, y como fase móvil una mezcla de metanol:agua (70:30), conteniendo ambos constituyentes 5 mM de acetato amónico y 0,1% de ácido fórmico, pH 4,6. El flujo de trabajo fue de 0,3 ml/min y el volumen de inyección fue de 1 µl, en todos los casos.

Las condiciones de trabajo para la fuente iónica fueron: temperatura del gas (N<sub>2</sub>) 350 °C, flujo del gas 10 ml/min, presión del nebulizador 20 psi, voltaje 2500 V.

La presencia de sorafenib en el lisado del oocito se confirmó empleando el modo de trabajo MRM siguiendo la transición específica del ion precursor (ion molecular - H<sup>+</sup>) 465,1 *m/z* a los iones producto 270 y 252 *m/z*.

Se construyó una recta patrón mediante inyección de soluciones metanólicas con concentraciones de 0,3 a 40 µM de sorafenib. El tiempo de retención para el sorafenib fue de 1,15 min.

Se corrigió la concentración de sorafenib a partir de su recta patrón por la recuperación obtenida del estándar interno dexametasona (10  $\mu\text{M}$ ), que se detectó siguiendo la transición específica de sus iones producto 373,2  $m/z$  y 355  $m/z$ . El tiempo de retención de la dexametasona fue de 0,6 min.

### 3.18.8. Determinación de la actividad luciferasa

Para generar luz, la luciferasa de luciérnaga (Luc2) requiere luciferina, ATP,  $\text{Mg}^{2+}$  (contenidos en la mezcla de reactivos “Steady-Glo<sup>®</sup>”) y oxígeno molecular.

Para medir la actividad luciferasa generada por el biosensor microbiano prRecA-Luc2se mezclaban 50  $\mu\text{l}$  de bacterias con 50  $\mu\text{l}$  del reactivo de luciferasa “Steady-Glo<sup>®</sup>” en los pocillos de una placa de 96 pocillos de base de color negro. Para determinar la actividad luciferasa de células transfectadas en placas de 96 pocillos con el plásmido pGL4.10-[Luc2], que contenía el gen “reporter” Luc2, se añadían 50  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo sin suero con 50  $\mu\text{l}$  del reactivo “Steady-Glo<sup>®</sup>”. En ambos casos, tras un tiempo de incubación de 5 min, se captaban imágenes de la luz emitida por la reacción catalizada por la luciferasa durante 15 minutos en un equipo de análisis de imagen LAS-4000, seleccionando 1 minuto de exposición para cada fotografía.

### 3.18.9. Determinación de actividad caspasa 3 y 8

La actividad de las caspasas 3 y 8 se determinó en homogeneizados hepáticos (obtenidos como se describe en el apartado 3.15.1) siguiendo una modificación del método de Hasegawa (Hasegawa J, 1996), que se basa en la detección de la liberación de los compuestos fluorescentes 7-amido-4-metilcumarina (AMC) y 7-amido-4-trifluorometil-cumarina (AFC) a partir de los sustratos, Ac-DEVD-AMC y Ac-IETD-AFC, específicos de las caspasas 3 y 8, respectivamente. Para ello se usaron los siguientes reactivos:

- Buffer de ensayo para homogenados tisulares: Tris-HCl 100 mM, EDTA 2 mM y EGTA 20 mM, pH 7,5.
- Ditiotreitól (DTT) 10 mM.
- Sustratos fluorogénicos Ac-DEVD-AMC 10 mM (para la caspasa-3) y Ac-IETD-AFC 10 mM (para la caspasa-8) en DMSO.

Para iniciar el ensayo se añadió a cada tubo 250  $\mu\text{l}$  del sobrenadante de estudio, 197,5  $\mu\text{l}$  de buffer de ensayo, 50  $\mu\text{l}$  de DTT 10 mM (concentración final 1 mM) y 2,5  $\mu\text{l}$  de sustrato fluorogénico (concentración final 50  $\mu\text{M}$ ).

Los tubos se centrifugaron a 13.000 rpm, 1 minuto a 4°C. El sobrenadante de cada tubo se recogía y se realizaban 4 medidas en el fluorímetro (una cada 30 minutos) a la longitud de onda ( $\lambda$ ) adecuada. En el caso de la caspasa 3 a una  $\lambda$  de excitación de 380 nm y una  $\lambda$  de emisión de 460 nm; mientras que la actividad de la caspasa 8 se midió a una  $\lambda$  de excitación de 400 nm y una  $\lambda$  de emisión de 505 nm.

Se calcularon los incrementos de fluorescencia a los dos intervalos de tiempo ensayados, comprobándose que los ensayos eran lineales. El resultado se expresó como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) por minuto y mg de proteína.

### **3.18.10. Determinación de platino por absorción atómica**

El platino (Pt) se determinó por espectrometría de absorción atómica en horno de grafito en un aparato Z-8100 Polarized Zeeman (Hitachi), utilizando una longitud de onda de 265,9 nm. Las cubetas utilizadas fueron del tipo tubo pirolíticas (Hitachi), y la lámpara de platino de cátodo hueco fue de Photron (Victoria, Australia).

Las muestras se mineralizaron con HNO<sub>3</sub> en un termostato de bloque metálico, dentro de una campana extractora debido a los vapores nitrosos que se formaban. Primero se añadió 1 ml de HNO<sub>3</sub> al 60% en cada tubo de vidrio que contenía la muestra y se dejó 24 h a temperatura ambiente. A continuación se calentó el tubo a 80°C durante 2 h, tras las cuales la temperatura se elevó a 150°C hasta conseguir la sequedad de la muestra y se solubilizó en HCl 0,02 N calentando 4 h a 60°C.

Se inyectaron 20  $\mu$ l de muestra en la cubeta, y se calentó siguiendo un orden previamente establecido, desde 90°C a 3000°C. El cálculo de la concentración de platino se realizó a partir de una curva patrón preparada por dilución de una solución estándar de PtCl<sub>2</sub> en HCl 0,02 N.

### **3.19. PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA TERCIARIA DE PROTEÍNAS**

La estructura terciaria del OCT1 silvestre y de las proteínas generadas por los SNPs de OCT1 fue evaluada utilizando el modelado teórico mediante el programa "Phyre2" (Kelley 2009).

### **3.20. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO**

Para la expresión de los resultados se ha calculado la media y el error estándar de la media (EEM).

Para calcular la significación estadística de las diferencias al comparar dos medias se utilizó el test de la  $t$  de Student de valores apareados o no apareados, según el caso. Para las comparaciones entre varios grupos se utilizó el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

**Tabla anexo MM-1.** Información de los pacientes y características de los tumores.

	Carcinoma hepatocelular		Colangiocarcinoma	
Número de pacientes	23		15	
Edad (media±SD)	70,5±9,1		64,0±11,7	
Rango de edad	49-82		48-83	
Hombres	20	(87,0%)	8	(53,3%)
Mujeres	3	(13,0%)	7	(46,7%)
Quimioterapia	0	(0%)	0	(0%)
Localización del tumor				
Intrahepático			8	(53,3%)
Extrahepático			1	(6,7%)
Perihilar			2	(13,3%)
Difuso			1	(6,7%)
No disponible			3	(20,0%)
Estadío pT				
TX	2	(8,6%)	3	(20,0%)
T1	1	(4,3%)	1	(6,7%)
T2	20	(87,0%)	10	(66,7%)
T3	0	(0%)	0	(0%)
T4	0	(0%)	1	(6,7%)
Ganglios linfáticos regionales				
NX	9	(39,1%)	9	(60,0%)
N0	14	(60,9%)	5	(33,3%)
N1	0	(0%)	1	(6,7%)
Metástasis distante				
MX	0	(0%)	0	(0%)
M0	23	(100%)	15	(100%)
M1	0	(0%)	0	(0%)
Clasificación tumoral				
Avanzado	11	(47,8%)	7	(46,7%)
Moderado	5	(21,7%)	5	(33,3%)
Pobre	2	(8,7%)	1	(6,7%)
No disponible	5	(21,7%)	2	(13,3%)
Margen en la resección quirúrgica				
Libre	8	(34,8%)	3	(20,0%)
No libre	0	(0%)	4	(26,7%)
Trasplante	0	(0%)	1	(6,7%)
No disponible	15	(65,2%)	7	(46,6%)

(X: no se pudo determinar; 0: sin aparición)





## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



#### 4.1. MODELOS EXPERIMENTALES DE COLANGIOCARCINOGENESIS EN RATAS

El hecho de que la incidencia del CGC esté aumentando en todo el mundo en los últimos años (Lazaridis *et al.*, 2005) (Patel, 2006), unido a que la detección se produzca generalmente tarde, cuando la resección quirúrgica está desaconsejada, y que estos tumores presenten una muy pobre respuesta a la quimioterapia, ha llevado a muchos investigadores a desarrollar modelos experimentales de CGC para ampliar los conocimientos sobre la biología de estos tumores, identificar nuevos marcadores que puedan ser útiles para llevar a cabo un diagnóstico precoz o desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y fármacos más potentes que permitan aumentar la supervivencia de los pacientes.

Entre los modelos animales más utilizados podemos citar el modelo de CGC inducido en hámster por tratamiento con dimetilnitrosamina junto con infección con *Clonorchis sinensis* (Lee *et al.*, 1993) o *Opisthorchis viverrini* (Thamavit *et al.*, 1978), los modelos en rata de administración de furano (Elmore *et al.*, 1993) (Sirica, 1996) o tioacetamida (TAA) (Praet *et al.*, 1984), o la inoculación de células tumorales derivadas de colangiocitos a través del conducto biliar de ratas (Sirica *et al.*, 2008).

La TAA es un compuesto que se utilizó inicialmente como conservante de cítricos, pero que se dejó de usar cuando se descubrió que era un potente agente hepatotóxico y carcinógeno (Fitzhugh *et al.*, 1948) (Gupta, 1956). Su hepatotoxicidad se produce tras la activación metabólica mediada por la enzima hepática CYP2E1 (Wang *et al.*, 2000), y en menor medida por la enzima flavin monooxigenasa (Dashti *et al.*, 1997), que genera un producto activo tras dos pasos sucesivos. El primer paso convierte la TAA en TAA-sulfóxido (TASO) y el siguiente en TAA-S,S-dióxido (TASO<sub>2</sub>) (Hunter *et al.*, 1977). Este último es un metabolito reactivo muy inestable que se une de forma covalente a macromoléculas (Hunter *et al.*, 1977) (Porter *et al.*, 1978) (Porter *et al.*, 1979), generando aductos en las proteínas (Dyroff *et al.*, 1981). También se ha descrito que el TASO<sub>2</sub> dificulta la movilidad del ARN del núcleo al citoplasma e interfiere con la actividad ribosomal, impidiendo la síntesis de proteínas (Barker *et al.*, 1972) y afectando, por tanto, a la estructura y función de las células (Chen *et al.*, 2006).

Una ventaja del uso de la TAA como hepatotóxico en los modelos animales es su alta especificidad por el hígado como órgano diana, aunque a dosis muy elevadas también puede causar daño renal (Barker *et al.*, 1974) e incluso la muerte del animal,

por fallo hepático fulminante en pocos días (Chanda *et al.*, 1995) (Mangipudy *et al.*, 1995).

Para el desarrollo de CGCs se han administrado dosis bajas o moderadas de TAA durante un periodo de tiempo prolongado, aunque en la bibliografía existen importantes discrepancias en cuanto al tiempo necesario para la aparición de los tumores. Así, Al-Bader *et al.* (Al-Bader *et al.*, 2000) describieron que la administración de 0,05% de TAA a ratas durante 12 semanas inducía cirrosis y que a partir de 14 semanas se observaban CGCs, mientras que Yeh *et al.* (Yeh *et al.*, 2004) observaron proliferación ductular con atipia en el 50% de los animales tratados con una dosis menor (0,03%) de TAA durante 9 semanas, y CGC invasivo de “tipo intestinal” en todos los animales desde las 22 semanas. Otro estudio encontró que con esta última dosis en los animales se inducía sólo cirrosis tras 12 semanas (Cruz *et al.*, 2005) y Praet *et al.* (Praet *et al.*, 1984) describieron que eran necesarios 12 meses de administración de TAA para que se desarrollaran CGCs en hígados cirróticos, junto con tumores benignos, como colangiomas y cistadenomas.

Como **primer objetivo** de esta Tesis Doctoral nos planteamos desarrollar y caracterizar un modelo experimental de CGC en ratas para utilizarlo en la investigación de terapias vectorizadas y en la búsqueda de nuevos marcadores tumorales en los primeros estadios del desarrollo del CGC.

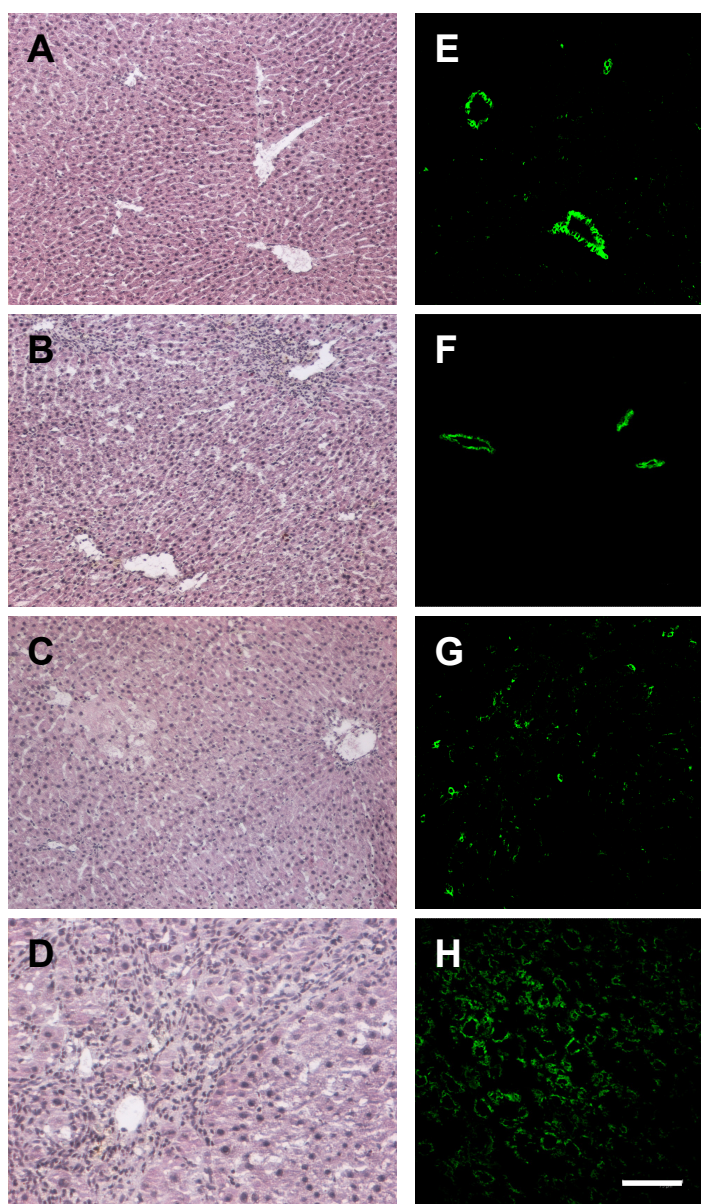
#### **4.1.1. Modelo de colangiocarcinogénesis por administración de TAA en ratas**

Para generar CGCs, se eligió la administración prolongada de TAA disuelta en el agua de bebida de ratas Wistar macho, con un peso inicial próximo a los 300 g. La dosis de TAA utilizada fue de 0,05% (p/v), que se eligió en base a los datos bibliográficos que indicaban que dosis más altas (0,1-0,15%) se asociaban con una elevada mortalidad tras pocas semanas (Al-Bader *et al.*, 2000), y con dosis menores no se desarrollaban tumores colangiolares. Elegimos un periodo entre 12-20 semanas de tratamiento, en base a la bibliografía y a estudios preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio en los que no observamos aparición de tumores con tiempos más cortos.

Los animales se monitorizaron diariamente desde el comienzo de la administración; se determinó el peso corporal cada semana y se sacrificaron algunos animales a partir de la semana 12, para realizar determinaciones analíticas en suero y análisis histológicos del tejido hepático para seguir las lesiones.

A pesar de que la administración de TAA indujo un descenso significativo en la capacidad de ganar peso desde las primeras semanas de tratamiento, la supervivencia fue superior al 95% tras 20 semanas.

No se encontraron tumores colangiomales visibles en los animales sacrificados entre las semanas 12 y 20 de administración de TAA, pero sí se observó una importante heterogeneidad en lo que se refiere al aspecto macroscópico del hígado, histología, y perfil bioquímico hepático. La mayoría de los hígados presentaban un aspecto normal, y sólo en un 30% de los animales el aspecto era cirrótico o con nódulos de regeneración.



**Figura 1:** Imágenes de microscopía óptica tras tinción con hematoxilina-eosina (A-D) y de inmunofluorescencia frente a CK-7 (E-H) en cortes de hígado de rata tratadas durante 16 semanas con TAA. Control: A,E; TAA: B-D, F-H. A-C: Objetivo 10x, D: 20x. Barra: 75  $\mu$ m.

El análisis histológico confirmó que el daño hepático era muy variable (Figura 1). Como se observa en las figuras 1B-1D, que corresponden a cortes de tejido hepático obtenidos de distintos animales tras 16 semanas de tratamiento y teñidos con hematoxilina-eosina.

En los cortes de tejido hepático también se evaluó la proliferación de conductos biliares mediante inmunofluorescencia asociada a microscopía confocal, utilizando un anticuerpo frente a la citokeratina 7 (CK-7), como marcador de las células colangiulares. Las CKs son proteínas del citoesqueleto celular que forman parte de los filamentos intermedios. Se han descrito más de 20 proteínas de esta familia que están presentes, tanto en las células epiteliales, como en los tumores derivados de ellas (Moll *et al.*, 1982). Entre todas las CKs, las CK-7, 19 y 20 se han utilizado como marcadores para el diagnóstico de tumores biliares (Porcell *et al.*, 2000) (Lau *et al.*, 2002).

En nuestro estudio, el análisis de la CK-7 por inmunofluorescencia también reflejó la gran heterogeneidad en la presencia y el grado de la proliferación ductular. En la figura 1E, correspondiente a un hígado control, se observa únicamente marcaje intenso en los conductos de gran tamaño. Tras 16 semanas de tratamiento con TAA, se observaban hígados sin signos de proliferación ductular (Figura 1F), hígados con proliferación ductular moderada (Figura 1G) e hígados con proliferación ductular muy marcada (Figura 1H).

**Tabla 1.** Efecto de la administración de tioacetamida (TAA) al 0,05% durante 12-20 semanas sobre los parámetros séricos indicadores de funcionalidad hepática y renal.

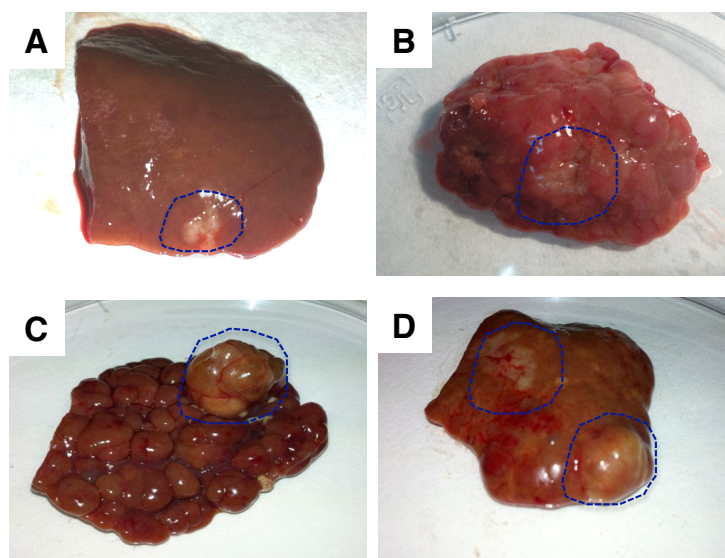
<b>Parámetros bioquímicos</b>	<b>Control</b>	<b>TAA 12 sem</b>	<b>TAA 20 sem</b>
Glucosa (m/dL)	70±5	82±3	79±4
AST (U/L)	92±9	108±29	102±10
ALT (U/L)	50±2	50±4	51±3
GGT (U/L)	4,8±0,7	19±1	24±2 <sup>a</sup>
AP (U/L)	102±9	90±2,6	102±6
Ácidos biliares (µM)	11±3	62±5 <sup>a</sup>	68±5 <sup>a</sup>
Bilirrubina total (mg/dL)	0,2±0,1	0,3±0,1	0,2±0,1
Urea (mg/dL)	39±4	42±3	43±5
Creatinina (mg/dL)	0,5±0,05	0,4±0,01	0,4±0,02

Los valores son media ± EEM de n ≥ 5 animales por grupo. <sup>a</sup>, p<0,05 comparando con el grupo control mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. AST, aspartato-aminotransferasa; ALT, alanina-aminotransferasa; GGT, gamma-glutamilttransferasa; AP, fosfatasa alcalina.

Respecto a la analítica sérica (Tabla 1) de los animales sacrificados entre las 12 y 20 semanas de tratamiento, lo más destacable fue un aumento de cuatro veces en los niveles de la actividad gamma-glutamilttransferasa (GGT) respecto a los niveles detectados en el suero de los animales control. Además, la colanemia en estos animales también estaba aumentada (x6 respecto a los valores en animales control).

Puesto que tras 20 semanas de tratamiento con la TAA no encontramos desarrollo de CGC en ninguno de los animales, y sólo una importante heterogeneidad en las lesiones biliares, decidimos prolongar el tiempo de administración de este compuesto. De nuevo, los animales se monitorizaron cada semana para detectar signos de deterioro que aconsejaran su sacrificio, pero el tratamiento más prolongado no afectó a la supervivencia, los animales tenían buen aspecto y sólo se mantuvo un peso corporal reducido comparado con los animales control.

A partir de las 32 semanas, ya era posible detectar tumores visibles en un 50% de los animales y la incidencia aumentó progresivamente con el tiempo de tratamiento, hasta casi el 100% tras 40 semanas de administración con TAA, que fue el máximo tiempo estudiado. La figura 2 muestra el aspecto del hígado de distintos animales sacrificados a las 36 semanas de tratamiento.



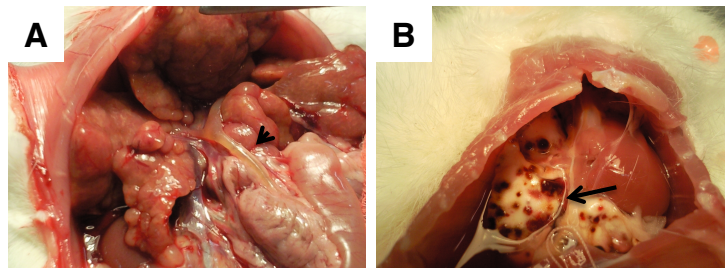
**Figura 2:** Imágenes representativas de tumores hepáticos observados en ratas tratadas con TAA durante 36 semanas; las líneas discontinuas rodean los tumores.

En algunos casos aparecían tumores aislados de color blanquecino y aspecto irregular en un hígado con aspecto macroscópico normal (Figura 2A), aunque la mayoría de los animales presentaban hepatomegalia con nódulos de regeneración y



tumores que aparecían como masas de tamaño muy variado (Figuras 2B y 2C) o los tumores estaban extendidos por todo el órgano (Figura 2D).

En estos animales también llamaba la atención que presentaban una hiperplasia del conducto biliar común muy marcada, como se muestra en la figura 3A, y además, en un 5% de los tratados durante más de 36 semanas se observó metástasis pulmonar (Figura 3B), pero no se encontró metástasis en ningún otro tejido.



**Figura 3:** Imágenes representativas de hiperplasia del conducto biliar, punta de flecha (A) y metástasis pulmonar, flecha (B) observadas en ratas tratadas con TAA durante 36 semanas.

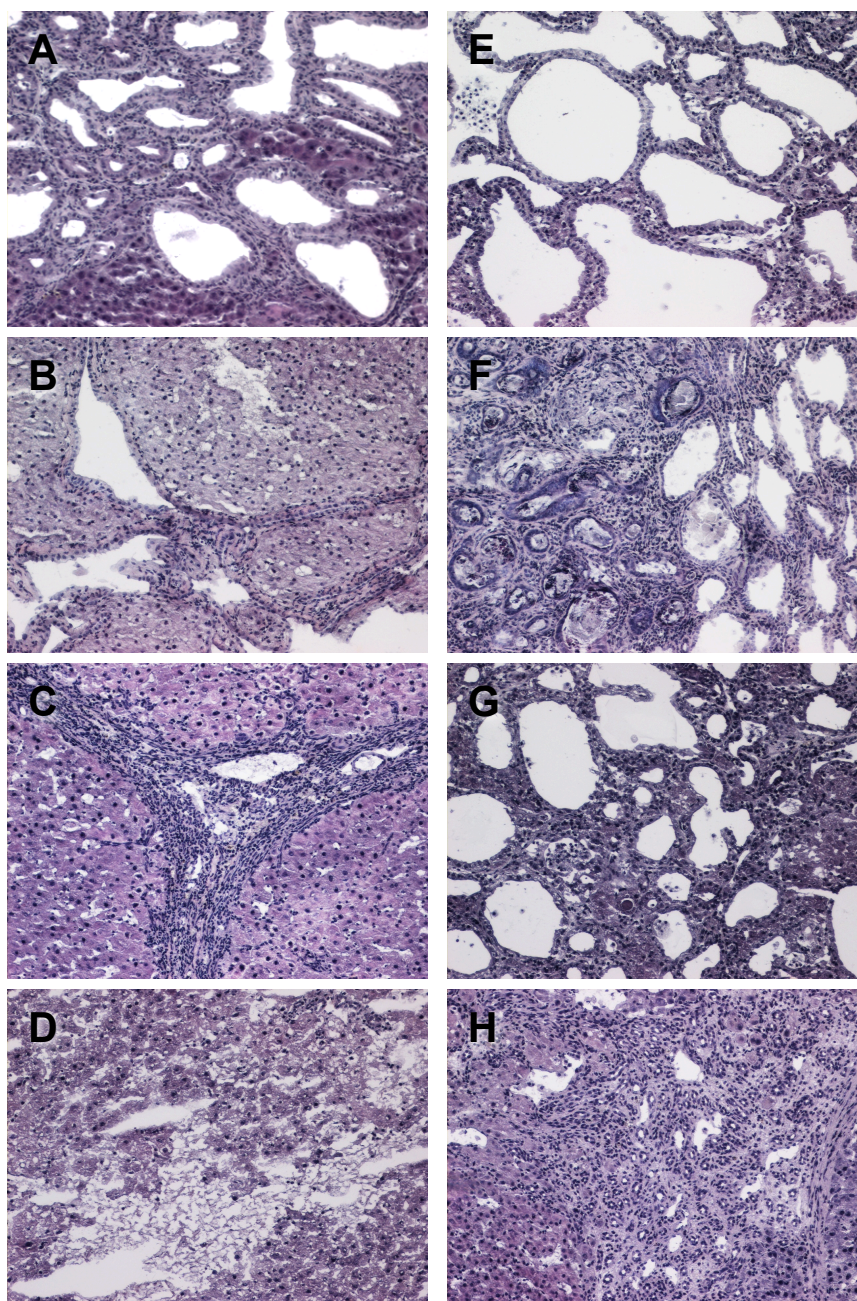
De estos animales se recogió tejido tumoral y tejido adyacente no tumoral, que fue procesado para llevar a cabo un estudio histológico tras tinción con hematoxilina-eosina. La figura 4 muestra imágenes representativas de cortes de tumores encapsulados (Figuras 4E-4H) y de tejido pareado no tumoral, que rodeaba a los tumores (Figuras 4A-4D), observándose una gran diversidad histológica.

La clasificación de los CGCs ha variado en los últimos años intentando tener en cuenta diversos fenómenos clínicos, genotipos y el comportamiento biológico de los tumores (Nakanuma *et al.*, 2010) y, recientemente, también el linaje celular (Cardinale *et al.*, 2012), es decir, las células de origen de los tumores, entre las que se incluyen las células progenitoras hepáticas, las glándulas peribiliares, y los colangiocitos (Nomoto *et al.*, 2006) (Sell *et al.*, 1989). Dos estudios independientes muy recientes han demostrado en modelos de ratón que también se pueden desarrollar CGCs a través de la trans-diferenciación y conversión neoplásica de hepatocitos normales en colangiocitos malignizados (Fan *et al.*, 2012) (Sekiya *et al.*, 2012).

En nuestro modelo, en algunos casos era posible observar la presencia de CGCs bien diferenciados con estructura tubular (Figura 4E), que recientemente algunos autores han denominado, por el aspecto, de “tipo tiroideo” (Chable-Montero *et al.*, 2012). Este tejido tumoral podía aparecer solo o combinado con áreas de CGCs de “tipo intestinal” (Figura 4F), con presencia de células globulares, glándulas neoplásicas



con prominente necrosis intraluminal (comedonecrosis), indicativa de un alto recambio celular, y secreción de productos como mucinas a la luz del conducto. El CGC de “tipo intestinal” ha sido descrito frecuentemente en otros modelos de CGC en roedores (Elmore *et al.*, 1993). También era posible detectar tumores de “tipo colangioloelular” (Figura 4H), que se encuentran dentro de los menos frecuentes y también son muy característicos.



**Figura 4:** Imágenes representativas de cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina de hígados de distintas ratas tratadas con TAA durante 36 semanas. Las imágenes E-H corresponden al tejido tumoral y A-D muestran el tejido adyacente a los tumores.

En algunos casos los márgenes estaban libres de tumor (Figuras 4B-4D) y se observaban áreas con fibrosis (Figura 4B, 4C) y áreas de degeneración (Figura 4D), mientras que en otros casos, los márgenes presentaban tejido tumoral (Figura 4A).

La analítica de los parámetros bioquímicos analizados en el suero de estos animales (Tabla 2) reveló un marcado aumento de los marcadores de daño hepático GGT y bilirrubina total. Además, también se observó un marcado aumento de la colanemia en estas ratas.

**Tabla 2.** Efecto de la administración de tioacetamida (TAA) al 0,05% durante 36 semanas sobre los parámetros séricos indicadores de funcionalidad hepática y renal.

Parámetros bioquímicos	Control	TAA 36 sem
Glucosa (m/dL)	69±9	101±5
AST (U/L)	92±11	131±18
ALT (U/L)	54±8	49±12
GGT (U/L)	5±0,5	62±12 <sup>a</sup>
AP (U/L)	99±8	105±5
Ácidos biliares (µM)	10,6±5	94±12 <sup>a</sup>
Bilirrubina total (mg/dL)	0,2±0,1	0,9±0,3 <sup>a</sup>
Urea (mg/dL)	39±3	45±2
Creatinina (mg/dL)	0,5±0,05	0,4±0,05

Los valores son media ± EEM de n ≥ 10 animales. <sup>a</sup>, p<0,05 comparando con el grupo control mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. AST, aspartato-aminotransferasa; ALT, alanina-aminotransferasa; GGT, gamma-glutamyltransferasa; AP, fosfatasa alcalina.

A pesar de que los datos histológicos permitían confirmar la presencia de CGCs por el aspecto típico, decidimos determinar la expresión de marcadores que nos permitieran caracterizar los tumores desarrollados por western blot e inmunofluorescencia, ya que podrían resultarnos útiles para detectar etapas tempranas de desarrollo de los tumores.

Además de la CK-7, que ya hemos comentado que se utiliza en la actualidad para llevar a cabo la identificación por inmunofluorescencia o por inmunohistoquímica de tumores biliares, decidimos determinar varios marcadores más.

Las claudinas son proteínas implicadas en las uniones “tight junctions” que juegan un papel esencial en el mantenimiento de la polaridad y la permeabilidad en células epiteliales (Johnson, 2005). Se ha descrito que la claudina-4 se encuentra

sobre-expresada en carcinoma de colon y en cáncer de páncreas (Soini, 2005) y también que está expresada en colangiocitos sanos y se sobre-expresa en CGC, pero no en HCC (Lodi *et al.*, 2006), por lo que se ha propuesto como un marcador diferencial entre tumores biliares y tumores de origen hepatocelular. Por esta razón, incluimos este marcador para la caracterización de los tumores.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico 2, ErbB2 (también llamado HER2) pertenece a la subclase I de los receptores de tirosina kinasas de la familia ErbB; su proteína homóloga en ratas se denomina Neu. Nos pareció interesante analizar la expresión de este factor, ya que se ha relacionado con un aumento de la capacidad de invasión celular, progresión y diferenciación de los CGCs (Endo *et al.*, 2002) (Treekitkarnmongkol *et al.*, 2010).

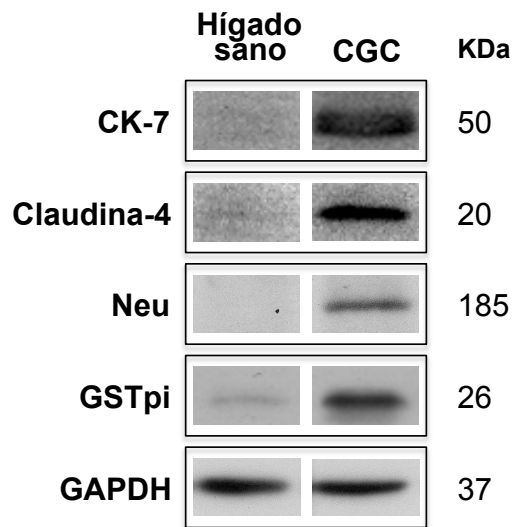
La isoforma pi de la glutatión S transferasa (GSTpi) se ha considerado un buen marcador diferencial de CGC y HCC en humanos (Hayes *et al.*, 1991). En modelos experimentales en rata, esta isoenzima se ha utilizado como un marcador estable de células pre-neoplásicas y neoplásicas durante la hepatocarcinogénesis (Monte *et al.*, 1999), ya que los hepatocitos de rata desdiferenciados sobre-expresan de forma consistente GSTpi (Hiley *et al.*, 1988). A pesar de que en roedores se considera un marcador de preneoplasia, más que un marcador diferencial de CGC/HCC, decidimos incluir también la GSTpi en nuestro estudio por si podía ser útil como marcador de las etapas tempranas de desarrollo de los tumores.

También incluimos en el análisis la  $\alpha$ -fetoproteína (AFP), que es un marcador típico de HCC. La AFP es una glicoproteína que se encuentra presente en el tejido hepático fetal con niveles variables a lo largo del desarrollo, y sólo se detectan trazas en los hepatocitos adultos. Sin embargo, en pacientes con HCC se encuentran concentraciones muy elevadas en el tejido tumoral, en plasma y en líquido ascítico, debido a la sobre-expresión en los hepatocitos desdiferenciados (Gupta *et al.*, 2003).

La figura 5 muestra imágenes representativas de los resultados obtenidos por western blot para estos marcadores en hígado sano y en tumores inducidos por tratamiento con TAA durante 36 semanas (CGC).

Se observa una marcada abundancia de proteínas correspondientes a los marcadores de células colangiolares, CK-7 y Claudina-4 en el CGC, que apenas se detectaron en el hígado sano, y también encontramos sobre-expresión de GSTpi, que daba una señal muy débil en el hígado control, probablemente debida a la señal de los colangiocitos sanos. Respecto al marcador Neu, se observa una señal clara en el

CGC, pero hay que apuntar que encontramos una importante variabilidad entre los distintos tumores; en algunos apenas se detectaba, mientras que en otros la señal era muy marcada (la figura 5 muestra un marcaje intermedio). En cuanto a la AFP, no encontramos señal de este marcador en ninguno de los tumores analizados (datos no mostrados).



**Figura 5:** Análisis por western blot de la expresión de CK-7, Claudina-4, Neu y GSTpi en hígado de rata control y en tumores inducidos por tratamiento con TAA durante 36 semanas (CGC). La proteína GAPDH se determinó en las mismas muestras como control de carga (50 µg de proteína/calle).

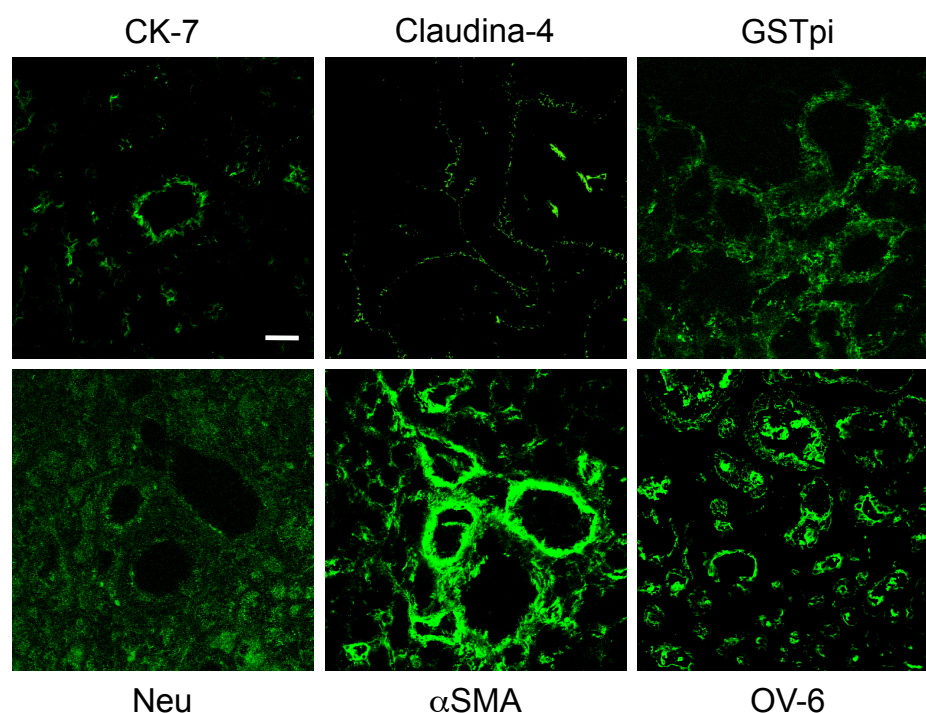
A pesar de que existía cierta controversia sobre si además de CGCs la administración de TAA inducía el desarrollo de HCCs (Newell *et al.*, 2008) (Heindryckx *et al.*, 2009) nuestros resultados indican que, en estas condiciones experimentales, la TAA sólo induce en el hígado de rata el desarrollo de CGCs, ya que la histología y el conjunto de marcadores analizados confirmaron que todos los tumores eran derivados de células colangiolares.

Por otro lado, en este bloque de experimentos, también pusimos a punto la detección de distintos marcadores por inmunofluorescencia. Como se muestra en la figura 6, se observó un marcaje citoplasmático de CK-7 y GSTpi en los tumores, y la típica señal de uniones intercelulares con el anticuerpo anti-Claudina 4. En el caso de Neu, la intensidad de señal fue variable entre distintos tumores, pero en la mayoría se detectaba una marcada inmunoreactividad.

En el estudio de inmunofluorescencia incluimos dos marcadores más (Figura 6); uno para la actina  $\alpha$  de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) y otro para las células ovas (el OV-6). Con el anticuerpo frente a la  $\alpha$ -SMA confirmamos la observación mencionada en el estudio histológico de que las células tumorales crecían rodeadas de una capa de tejido fibrótico, y con el anticuerpo OV-6 también encontramos una señal intensa, lo



que apoya los estudios que sugieren que los tumores pueden derivar de células progenitoras hepáticas.



**Figura 6:** Imágenes representativas de localización por inmunofluorescencia de CK-7, Claudina-4, GSTpi, Neu,  $\alpha$ SMA y OV-6 en tumores inducidos en ratas por tratamiento con TAA durante 36 semanas. Barra: 20  $\mu$ m.

Nuestros resultados utilizando el modelo experimental de administración crónica de TAA en el agua de bebida en ratas nos permiten proponer que se requieren entre 30 y 40 semanas para el desarrollo de tumores visibles de origen colangiolar, pero que no se desarrollan tumores de origen hepatocelular. La importante heterogeneidad encontrada en el tiempo de desarrollo y en el aspecto macroscópico y microscópico, podría justificar las discrepancias en los resultados obtenidos por otros investigadores (Nomoto *et al.*, 2006) (Praet *et al.*, 1984).

Por otra parte, la heterogeneidad y el tiempo tan prolongado necesario para que se desarrollen los tumores hacen que este modelo no parezca muy adecuado para la investigación de nuevos marcadores útiles para una detección precoz, por lo que nos planteamos buscar un modelo que acelerara la formación de los tumores.

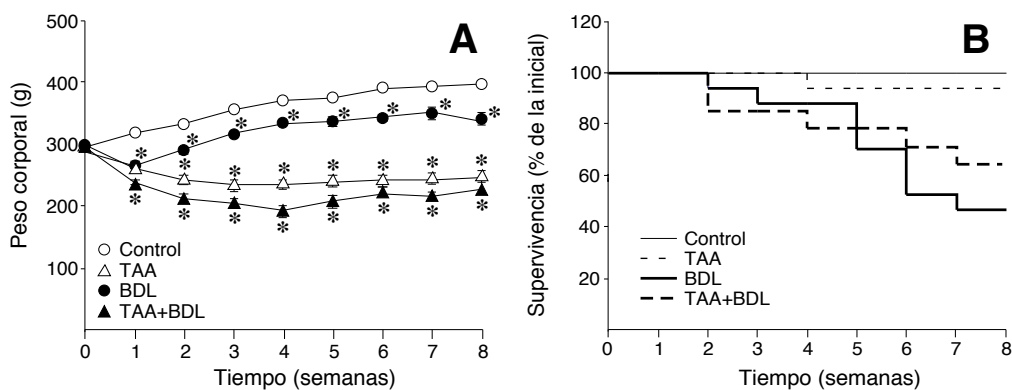
Como se ha comentado en la introducción de esta Tesis, se ha observado que la mayoría de las hepatopatías que se consideran factores de riesgo del CGC (colangitis esclerosante, cirrosis, litiasis biliar) se caracterizan por estar asociadas a un cierto

grado de colestasis y se ha descrito que la acumulación de ácidos biliares estimula la proliferación colangiolar (Meerman *et al.*, 1999) (Macias *et al.*, 2011) y que la inflamación crónica induce cambios permanentes en las células en proliferación (Alison *et al.*, 2005). En base a esto, nos planteamos como **segundo objetivo** de esta Tesis Doctoral investigar si los niveles elevados de ácidos biliares, provocados por una situación de colestasis, podrían tener un efecto promotor, acelerando la formación de tumores colangiulares en combinación con la TAA.

#### 4.1.2. Efecto de la colestasis sobre la progresión del CGC

Para evaluar el efecto de la acumulación de ácidos biliares, un grupo de animales recibió tratamiento con TAA y además, se les indujo una colestasis obstructiva realizada por una doble ligadura y sección del conducto biliar, un modelo que se suele denominar con las siglas BDL, del inglés “bile duct ligation” (Macias *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos en los animales de este grupo, que designamos como TAA+BDL, se compararon con los que recibieron sólo TAA, los que fueron sometidos sólo a BDL, los que presentaban tumores tras tratamiento prolongado con TAA (CGC) y con los grupos control y de operación simulada o “sham”.

Puesto que no encontramos diferencias en ninguno de los marcadores analizados entre los animales control y los “sham”, en los resultados se han agrupado todos como “control”.



**Figura 7:** Evolución del peso corporal (A) y curvas Kaplan-Meier de supervivencia expresada como porcentaje del número inicial de animales por grupo (B), incluyendo ratas control, ratas tratadas con TAA al 0,05% en el agua de bebida (TAA), ratas con ligadura del conducto biliar (BDL), o animales con la combinación de TAA+BDL. Los valores son media  $\pm$ EEM de  $n \geq 6$  animales en cada grupo experimental. \*,  $p < 0,05$  comparado con las ratas control por el test *t* de Student.

Los protocolos experimentales utilizados en este trabajo causaron un deterioro significativo en la salud de los animales, que se reflejó en una reducción importante del peso comparado con los animales control (Figura 7A). El peso corporal se redujo un 18% tras la primera semana de administración de TAA, mientras que a las 8 semanas la diferencia de peso con los controles fue del 43% pero, a pesar de ello, la mortalidad en este grupo experimental fue muy baja (Figura 7B).

Al igual que habíamos observado en un estudio previo (Macias *et al.*, 2011), la colestasis crónica indujo una alta mortalidad ( $\approx 50\%$ ) a partir de la quinta semana y una reducción del peso corporal de alrededor del 15% a las 8 semanas en las ratas supervivientes. En los animales del grupo TAA+BDL la ganancia de peso fue aún menor que en los animales del grupo TAA, sin embargo, la mortalidad no fue tan alta como en los animales de BDL. La elevada mortalidad tras varias semanas de colestasis, nos llevó a limitar el periodo de estudio a 8 semanas.

El efecto hepatotóxico de la TAA se confirmó al determinar diversos parámetros séricos marcadores de funcionalidad hepática (Tabla 3). Tras 4 semanas de administración de TAA los animales presentaron niveles elevados de transaminasas, GGT y ácidos biliares, y a las 8 semanas sólo la GGT y los ácidos biliares seguían elevados. Después de 40 semanas de tratamiento con TAA, momento en el que el tejido hepático presentaba nódulos colangiulares de 2-10 mm de diámetro, los niveles de transaminasas, fosfatasa alcalina y glucosa estaban en el rango normal, mientras que la GGT y los ácidos biliares estaban muy elevados, y en menor medida también los niveles séricos de bilirrubina.

**Tabla 3.** Efecto de la administración de tioacetamida (TAA), de la colestasis por ligadura del conducto biliar (BDL), la combinación de TAA+BDL, o el desarrollo de CGC (tras 40 semanas de administración con TAA) en parámetros séricos marcadores de funcionalidad hepática y renal.

Parámetros bioquímicos	Control	TAA		BDL		TAA+BDL		CGC
		4 sem	8 sem	4 sem	8 sem	4 sem	8 sem	
Glucosa (m/dL)	67±7	80±4	94±6	82±6	84±10	75±9	87±10	107±4
AST (U/L)	93±14	283±98 <sup>a</sup>	85±17	173±79	233±22 <sup>a</sup>	195±36 <sup>a</sup>	132±32	137±19
ALT (U/L)	55±8	167±59 <sup>a</sup>	49±5	66±16	54±5	45±7	44±1	42±12
GGT (U/L)	5±0,5	10±1 <sup>a</sup>	14±6 <sup>a</sup>	12±7 <sup>a</sup>	41±7 <sup>a</sup>	203±25 <sup>a</sup>	91±68 <sup>a</sup>	62±12 <sup>a</sup>
AP (U/L)	104±9	122±11	168±45	201±44 <sup>a</sup>	299±55 <sup>a</sup>	199±38 <sup>a</sup>	232±10 <sup>a</sup>	104±7
Ácidos biliares (µM)	11±3	87±17 <sup>a</sup>	57±17 <sup>a</sup>	367±32 <sup>a</sup>	94±21 <sup>a</sup>	310±100 <sup>a</sup>	153±40 <sup>a</sup>	94±12 <sup>a</sup>
Bilirrubina total (mg/dL)	0,2±0,1	0,4±0,2	0,3±0,1	2,1±2 <sup>a</sup>	5±0,2 <sup>a</sup>	5,6±2,2 <sup>a</sup>	5±2,5 <sup>a</sup>	0,9±0,3 <sup>a</sup>
Urea (mg/dL)	38±2	48±2	43±4	35±5	103±33 <sup>a</sup>	53±8	40±3	46±2
Creatinina (mg/dL)	0,5±0,05	0,4±0,02	0,3±0,02	0,6±0,1	0,8±0,2	0,6±0,1	0,3±0,03	0,3±0,05

Los valores son media  $\pm$  EEM de  $n \geq 6$  animales por grupo. <sup>a</sup>,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. AST, aspartato-aminotransferasa; ALT, alanina-aminotransferasa; GGT, gamma-glutamilttransferasa; AP, fosfatasa alcalina.

Como cabía esperar, los marcadores séricos típicos de colestasis estaban elevados en ambos grupos de BDL, con y sin tratamiento con TAA. La colanemia aumentó 30 veces a las 4 semanas y entre 10-15 veces después de 8 semanas. Sólo la enzima GGT estaba más elevada en el grupo de TAA+BDL que en el de BDL.

La caída de la colanemia entre las semanas 4 y 8 probablemente se debió que a ese tiempo es esperable que estén inducidos los mecanismos que facilitan la eliminación de ácidos biliares y otros compuestos colefilicos por el riñón, para reducir los efectos tóxicos debidos a la acumulación de estas moléculas (Lee *et al.*, 2001). También hay que considerar que la síntesis *de novo* de ácidos biliares estará inhibida por el feed-back negativo que ejercen los ácidos biliares sobre la actividad Cyp7a1, la enzima clave en la síntesis de ácidos biliares a partir de colesterol (Chiang, 2009).

Además, a las 8 semanas tras la BDL, la funcionalidad renal también se vio afectada, como lo demuestra el aumento significativo de la concentración sérica de urea y el ligero incremento de la creatinina (Tabla 3) pero, curiosamente, esta alteración no se observó en el grupo TAA+BDL.

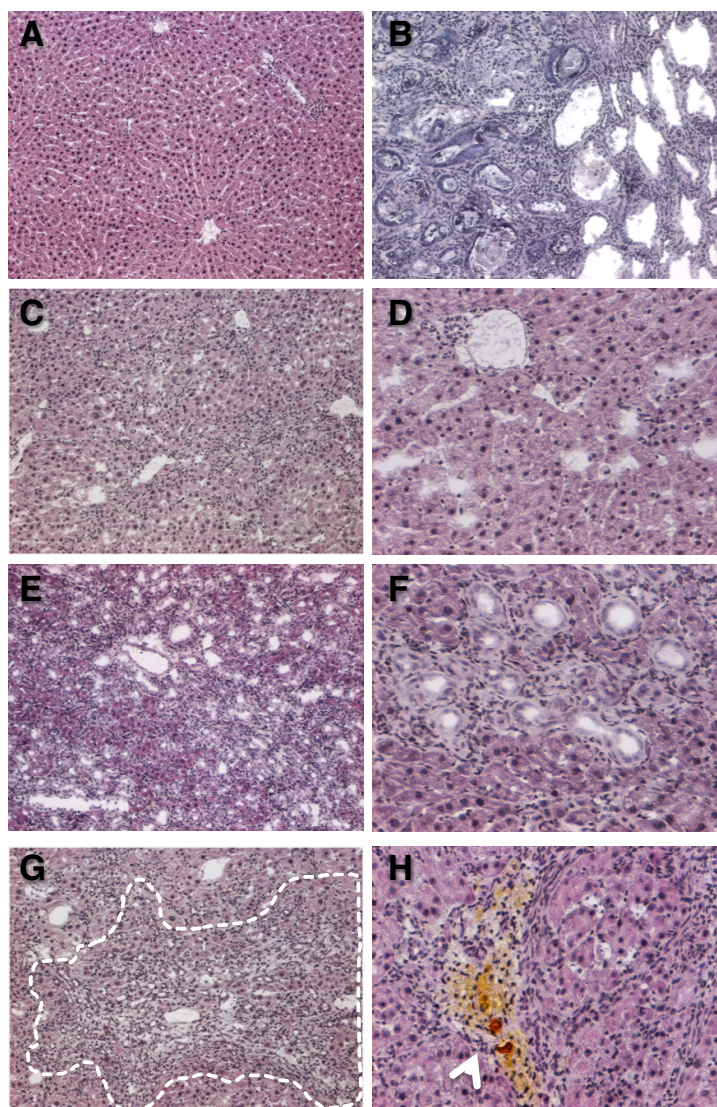
Tras 8 semanas el hígado de las ratas del grupo TAA mostraba una apariencia macroscópica normal, aunque el análisis histológico llevado a cabo tras la tinción con hematoxilina/eosina puso de manifiesto que el tejido estaba alterado. Se encontró una marcada infiltración leucocitaria, y áreas puntuales de proliferación de conductos biliares (Figuras 8C, 8D), junto con zonas menos dañadas.

Como se ha descrito en estudios anteriores, (Macias *et al.*, 2011) (Sirica *et al.*, 1994), la colestasis durante 8 semanas indujo hepatomegalia y el aspecto de los hígados era fibrótico. A nivel histológico lo más destacado fue la severa desorganización del parénquima hepático y la marcada proliferación de células ductulares (Figuras 8E, 8F), con aproximadamente un 25% del parénquima hepático remplazado por estructuras ductulares rodeadas por un estroma fibrótico. La infiltración leucocitaria y los nódulos de tejido degenerado con abundantes células inflamatorias se podían observar desde las 4 semanas de BDL.

Sólo en el grupo de TAA+BDL de 8 semanas se observó siempre colangiofibrosis (Figura 8G, 8H), una lesión que se considera el paso que precede al desarrollo del CGC, y que generalmente progresa hacia la formación del tumor, aunque se interrumpa la administración del agente hepatotóxico (Maronpot *et al.*, 1991). En algunos animales era posible observar áreas con acúmulo de bilis, de distintos tamaños, que se apreciaban en el estudio histológico (Figura 8H).

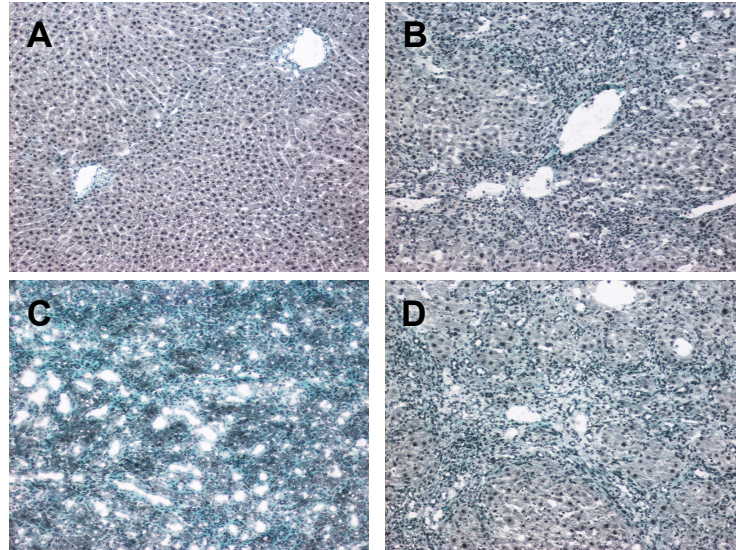


Es interesante destacar que la extensión de la masa de proliferación ductular fue mayor en el grupo de BDL, que en el de TAA+BDL. Este hecho se ha descrito en un estudio que combinaba colestasis con administración de tetracloruro de carbono (Marzioni *et al.*, 2009), mientras que otras investigaciones con administración de furano con colestasis (Sirica *et al.*, 1994) o dietilnitrosamina con colestasis parcial (Yang *et al.*, 2011) encontraron un aumento de la proliferación, aunque el resultado en todos los casos fue una progresión acelerada en los animales con BDL tratados con la toxina. Para comparar con las situaciones externas negativas y positivas se ha incluido una imagen representativa de un hígado sano (Figura 8A) y de un CGC (Figura 8B).



**Figura 8:** Imágenes representativas de cortes histológicos de hígados de ratas de los grupos TAA (C,D), BDL (E,F) y TAA+BDL (G,H) sacrificadas a las 8 semanas del periodo experimental. Para comparar se incluyen imágenes de tejido control (A) y de CGC inducido tras 40 semanas de tratamiento con TAA (B). Las muestras fueron teñidas con hematoxilina-eosina y observadas al microscopio óptico. A, B, C, E, G: objetivo 10x; D, F, H: objetivo 20x. La línea discontinua rodea un área de colangiofibrosis y la punta de flecha muestra una zona de acumulación de bilis.

La figura 9 muestra el aspecto del parénquima hepático de los distintos grupos experimentales tras una tinción con tricrómico de Masson, que permite observar las fibras de colágeno teñidas de verde. Esta tinción hizo más patente que los colangiocitos proliferan rodeados de una capa de tejido fibrótico, y que la proliferación fue mayor en el grupo de BDL > TAA+BDL > TAA.



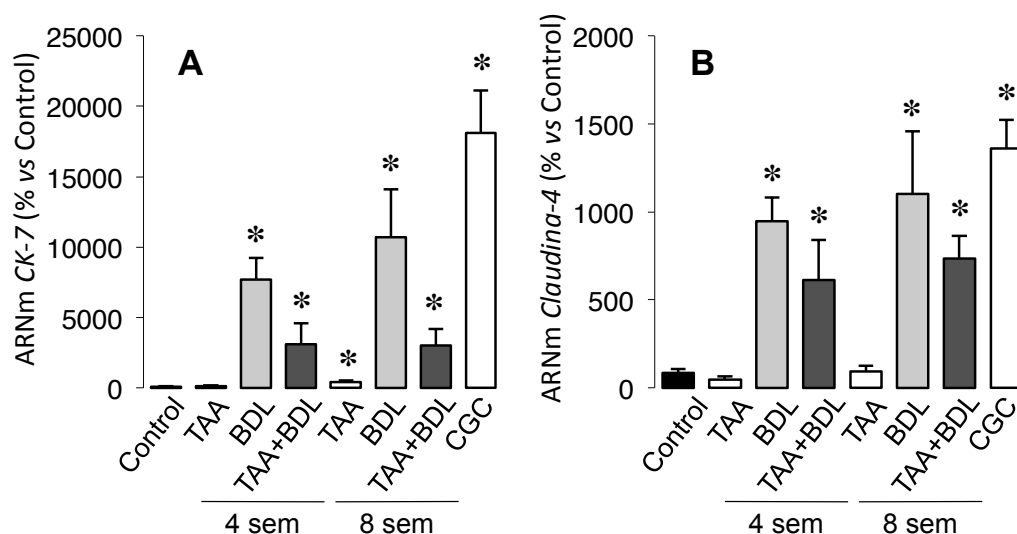
**Figura 9:** Imágenes representativas de cortes histológicos de hígados de rata de los grupos Control (A), TAA (B), BDL (C) y TAA+BDL (D) sacrificadas a las 8 semanas del periodo experimental. Las muestras fueron teñidas con tricrómico de Masson y observadas al microscopio óptico. Objetivo 10x.

Para analizar la proliferación colangiolar y evolución hacia el desarrollo de tumores biliares, se evaluó la expresión por RT-PCR-Q y western blot de varios indicadores de proliferación de colangiocitos. Como marcadores específicos de tumores colangiolares utilizamos la CK-7, y la claudina-4 (Shimonishi *et al.*, 2000) (Lodi *et al.*, 2006).

#### **4.1.2.1. Análisis de la proliferación colangiolar mediante la evaluación de marcadores de CGC (CK-7 y Claudina-4)**

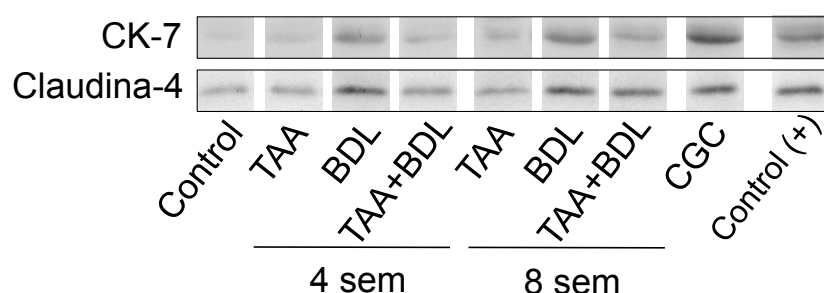
Los niveles de ARNm de CK-7 (Figura 10A) y de Claudina-4 (Figura 10B) cambiaron de forma similar en todos los grupos experimentales, aunque la magnitud de los cambios fue mayor para el ARNm de CK-7. Un aumento significativo y progresivo de ambos marcadores se observó en el grupo BDL y fue menor en el grupo TAA+BDL. En concordancia con el estudio histológico, la administración de

TAA durante 8 semanas indujo una ligera subida de estos marcadores, mientras que en los CGCs ambos marcadores estaban muy elevados.



**Figura 10:** Niveles de expresión del ARNm de *Citokeratina-7* (CK-7) (A) y *Claudina-4* (B) determinados por RT-PCR-Q. Los valores son media±EEM de  $n \geq 6$  muestras analizadas por triplicado para cada grupo experimental, expresados como abundancia relativa respecto al calibrador (hígado control de rata) y normalizados por los valores de ARNm de  $\beta$ -actina. \*,  $p < 0,05$ , comparado con el grupo control.

Los cambios observados en la expresión del ARNm fueron consistentes con los observados a nivel de la proteína (Figura 11) mediante western blot, aunque las diferencias fueron menos marcadas.



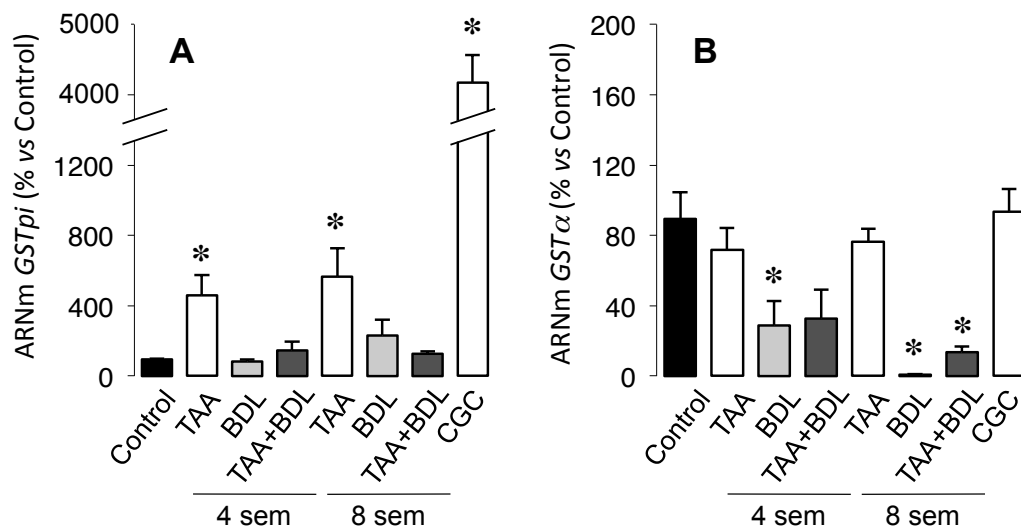
**Figura 11:** Western blot representativo de CK-7 y Claudina-4 en homogenados hepáticos de cada grupo experimental a las 4 y 8 semanas. Como control positivo (+) se utilizó placenta para CK-7 y lisado de células LS-174T para Claudina-4. Se cargaron 50  $\mu$ g de proteína/calle. (CK-7, 50 KDa, Claudina-4, 21 KDa).

Como control positivo para CK-7 se utilizó homogenado de placenta de rata y para claudina-4 lisado de células LS-174T, de adenocarcinoma de colon humano. La carga de proteínas se normalizó utilizando un anticuerpo frente a la GAPDH (datos no mostrados), y no se observaron diferencias importantes.

#### 4.1.2.2. Expresión de GSTpi y GSTα en el desarrollo de tumores colangiulares

Las enzimas detoxificantes de la superfamilia GST (glutatión-S-transferasa) representan un grupo muy importante de enzimas que participan en la detoxificación en la mayoría de los tejidos del organismo. En condiciones fisiológicas, la GSTα es muy abundante en los hepatocitos sanos, mientras que la isoforma GSTpi es la predominante en las células de los ductos biliares (Campbell *et al.*, 1991).

En nuestro estudio, los niveles de ARNm de GSTpi aumentaron progresivamente desde la semana 4 de administración de TAA (Figura 12A), y en CGC encontramos una marcada sobre-expresión de esta isoenzima. La colestais indujo un aumento moderado de GSTpi a las 8 semanas, y apenas cambió en el grupo de BDL con tratamiento con TAA.



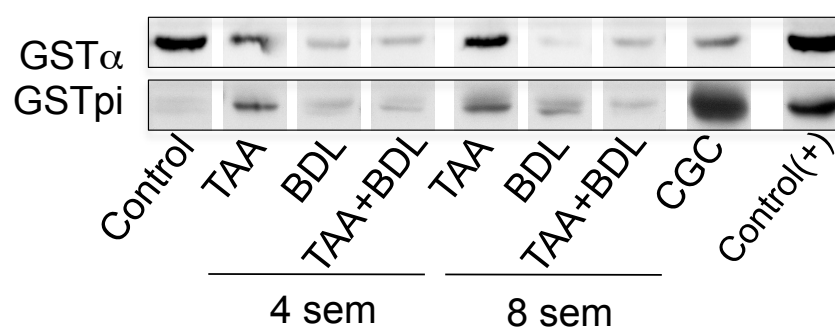
**Figura 12:** Niveles de expresión del ARNm de GSTpi (A) y GSTα (B) determinados por RT-PCR-Q. Los valores son media±EEM de n≥6 muestras analizadas por triplicado para cada grupo experimental, expresados como abundancia relativa respecto al calibrador (hígado control de rata) y normalizados por los valores de ARNm de *β-actina*. \*, p<0,05, comparando con el grupo control.

Los resultados de GSTpi a nivel de proteína (Figura 13) fueron similares a los descritos para el ARNm, pero llamó la atención que los niveles de esta enzima en las muestras de CGC fueron mayores que en las de HCC inducido por el clásico método de Solt y Farber (Solt D, 1976), que utilizamos como control positivo.



Se ha descrito que la GSTpi se induce en respuesta a daños químicos, y aquí hemos observado un aumento de esta isoenzima desde las primeras semanas de administración de TAA.

Respecto a la isoforma GST $\alpha$ , se observó una reducción progresiva de los niveles de expresión tanto a nivel de ARNm como de proteína en el grupo BDL (Figuras 12B y 13, respectivamente), hasta casi desaparecer a las 8 semanas, y también se redujo significativamente en el grupo TAA+BDL. Los animales tratados con TAA presentaban un ligero descenso en los niveles de expresión de esta enzima, mientras que los CGCs tenían niveles de ARNm similares a los detectados en el hígado control (Figura 12B), y menores a nivel de proteína (Figura 13). El descenso de GST $\alpha$  en los grupos de BDL probablemente refleja la sustitución de parte del parénquima hepático por áreas con colangiocitos en proliferación y tejido fibrótico; y la moderada expresión encontrada en el CGC está en concordancia con la débil señal detectada para esta isoforma en biopsias humanas (Hayes *et al.*, 1991).

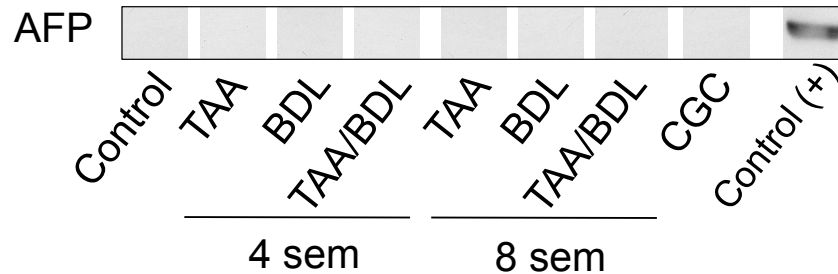


**Figura 13:** Western blot representativo de GST $\alpha$  y GSTpi en homogenados hepáticos de cada grupo experimental a las 4 y 8 semanas. Como control positivo se utilizó hígado control de rata para GST $\alpha$  y homogenado de HCC de rata para GSTpi. Se cargaron 50  $\mu$ g de proteína/calle. (GST $\alpha$ , 30 KDa, GSTpi, 26 KDa)

#### 4.1.2.3. Evaluación de la especificidad del modelo de administración de TAA en la formación de CGCs

Como hemos comentado existe cierta controversia sobre si además de CGC la TAA induce también HCC (Newell *et al.*, 2008) (Heindryckx *et al.*, 2009) en roedores. Como se observa en la Figura 14, la AFP, que es un marcador típico de HCC, sólo se detectó en hígado fetal de rata, que se utilizó como control positivo, pero no se

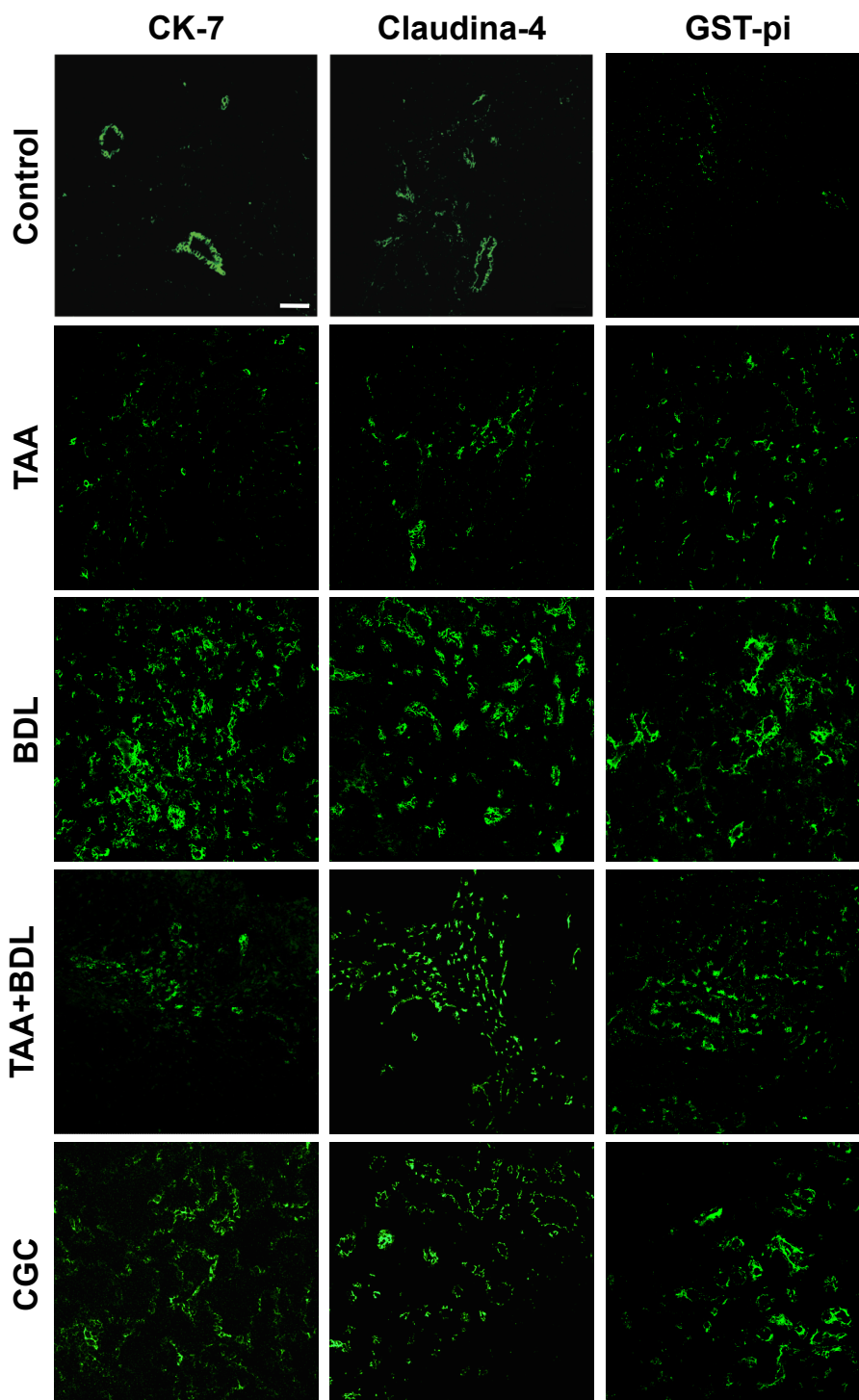
detectó en ninguna muestra de los distintos grupos experimentales, lo que indica que no se produce carcinogénesis de origen hepatocelular en este modelo experimental.



**Figura 14:** Western blot representativo de  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) en homogenados hepáticos de cada grupo experimental a las 4 y 8 semanas. Como control positivo se utilizó hígado fetal de rata. Se cargaron 50  $\mu$ g de proteína/calle. (AFP, 68 KDa).

Los resultados se confirmaron por inmunolocalización de CK-7, claudina-4 y GSTpi (Figura 15) en cortes de hígado de cada grupo experimental a las 8 semanas y en CGC.

En los hígados control, se detectó marcaje de CK-7 (citoplasmático) y claudina-4 (de membrana) en los colangiocitos. En el grupo BDL se encontraron amplias zonas inmuno-positivas para CK-7, Claudina-4 y GSTpi (marcaje citoplasmático), lo que coincidía con las áreas de proliferación celular. Estas regiones fueron de menor extensión en el grupo TAA+BDL. En el grupo de TAA a las 8 semanas se observaban pequeñas áreas de proliferación. En los tumores inducidos por TAA (CGC) el marcaje era muy claro en las zonas de tumores tubulares y menor en los tumores de “tipo intestinal”.

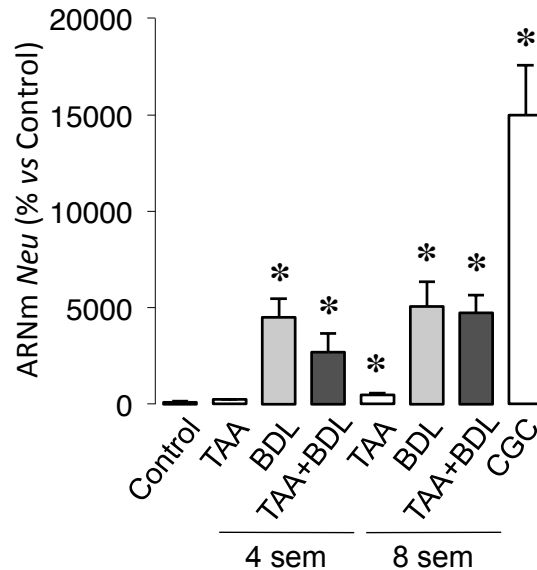


**Figura 15:** Inmunofluorescencia en cortes de tejido hepático de las ratas de los grupos control, TAA, BDL y TAA+BDL, para CK-7, claudina-4 y GSTpi. Se incluyó el grupo de CGC bien establecido con propósitos comparativos. Barra 50  $\mu$ m.

#### 4.1.3. Expresión de Neu en el desarrollo de tumores colangiulares

También nos pareció interesante evaluar los niveles de Neu (ErbB2), ya que la sobre-expresión de este factor se ha relacionado con un aumento de la invasividad

celular, progresión y diferenciación del CGC (Endo *et al.*, 2002) (Treekitkarnmongkol *et al.*, 2010). Como se observa en la figura 16, la administración de TAA aumentó los niveles del ARNm de *Neu* respecto al control; al doble a las 4 semanas y 5 veces a las 8 semanas. Sin embargo, los niveles de este proto-oncogén estaban aumentados más de 100 veces en las muestras de tumores colangiolas. La colestasis también indujo una marcada sobre-expresión de este gen, pero la combinación de TAA+BDL, no potenció el efecto estimulador de la colestasis por sí sola.



**Figura 16.** Niveles de expresión del ARNm de *Neu* determinados por RT-PCR-Q. Los valores son media±EEM de n≥6 muestras analizadas por triplicado para cada grupo experimental, expresados como abundancia relativa respecto al calibrador (hígado control de rata) y normalizados por los valores de ARNm de  $\beta$ -actina. \*, p<0,05, comparando con el grupo control.

Se ha descrito que existe una correlación directa entre la inmunoreactividad de ErbB2 y la diferenciación de los CGCs en humanos (Endo *et al.*, 2002), y es interesante destacar que los mismos autores encontraron un aumento de la expresión de ErbB2 en los pequeños ductos biliares hiperplásicos en algunos casos de patologías pre-tumorales que preceden al desarrollo del CGC, como la hepatolitiasis y en colangitis esclerosante primaria.

El hecho de que en nuestros resultados la colestasis muestre un aumento en los niveles de expresión de este gen, revela que esta condición es capaz de potenciar la progresión a la formación de CGC, de modo más marcado que el inducido por el tratamiento con el hepatotóxico TAA. Por lo que estos datos apuntan



a que el acumulo de ácidos biliares se vincula con un efecto sobre la proliferación, y también sobre la malignización de células colangiolares.

#### 4.1.4. Análisis de la apoptosis/proliferación en el desarrollo de tumores colangiolares

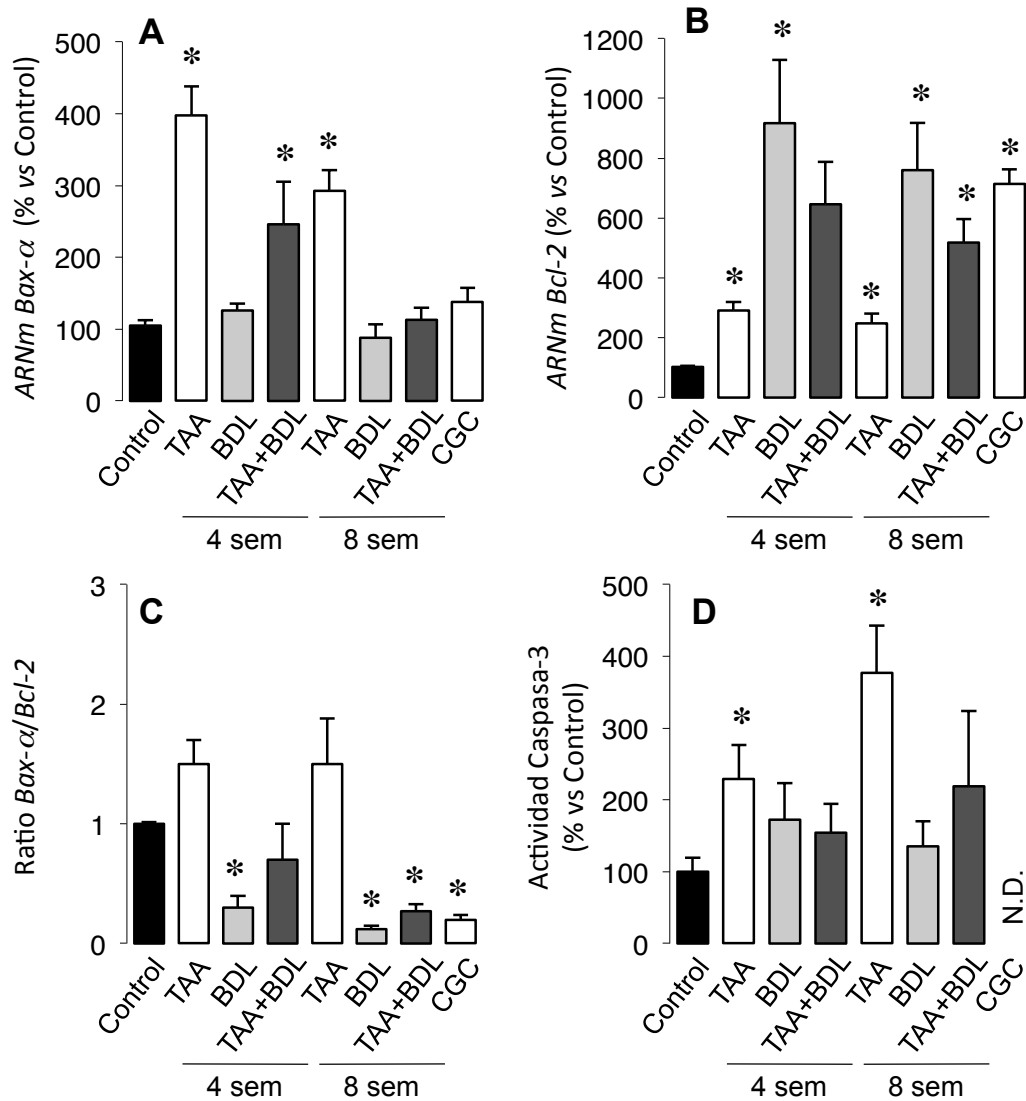
Es bien conocido que la regulación de la apoptosis puede jugar un papel clave en el desarrollo tumoral en situaciones de estrés químico. La apoptosis se puede producir por la vía extrínseca, que se desencadena en la membrana plasmática por activación de receptores específicos de muerte celular, o por la vía intrínseca, que se desencadena por estímulos que causan una alteración mitocondrial (Guicciardi *et al.*, 2005), y en algunos casos la vía de activación de receptores de muerte requiere la contribución mitocondrial para amplificar o transmitir de forma efectiva la señal apoptótica. Cuando la maquinaria apoptótica se activa, Bax migra desde el citosol a la mitocondria, donde produce permeabilización de la membrana y como consecuencia, el citocromo C se libera desde la mitocondria al citosol, donde activa proteasas mediadoras y efectoras de la muerte celular programada, siendo la caspasa-3 una caspasa efectora importante.

En primer lugar, medimos los niveles de expresión del gen pro-apoptótico *Bax- $\alpha$*  (Figura 17A) y del gen anti-apoptótico *Bcl-2* (Figura 17B) en las muestras de tejido hepático de todos los grupos experimentales.

En las muestras del grupo de TAA, tanto a las 4 como a las 8 semanas de administración, se produjo una inducción similar de *Bax- $\alpha$*  y *Bcl-2*, por lo que el ratio *Bax- $\alpha$ /Bcl-2* no cambió significativamente respecto al grupo control (Figura 17C), aunque sí había una tendencia a favor de la apoptosis. La colestasis indujo una marcada sobre-expresión del gen anti-apoptótico *Bcl-2* desde las 4 semanas de BDL, mientras que la abundancia de *Bax- $\alpha$*  fue similar a la encontrada en el hígado control, lo que resultó en un descenso significativo del ratio *Bax- $\alpha$ /Bcl-2*, que indica una tendencia a procesos de supervivencia celular.

En los animales del grupo TAA+BDL se observó un incremento de los niveles de expresión de *Bax- $\alpha$*  (x 2,5 veces) comparado con el hígado control, y un aumento de *Bcl-2* (x 6 veces) a las 4 semanas tratamiento, mientras que a las 8 semanas los niveles de ambos genes fueron similares a los observados en el grupo CGC, es decir, la abundancia de *Bax- $\alpha$*  era similar al hígado control, mientras que los niveles

de *Bcl-2* estaban marcadamente elevados. En ambos casos, el resultado era una reducción del ratio *Bax-α/Bcl-2*, lo que sugiere una situación de prevalencia de procesos que estimulan la supervivencia frente a los procesos que favorecen la apoptosis.



**Figura 17:** Niveles de expresión del ARNm de *Bax-α* (A), *Bcl-2* (B), y ratio *Bax-α/Bcl-2* (C) determinados por RT-PCR-Q. Los valores se expresan como abundancia relativa respecto al calibrador (hígado control de rata) y normalizados por los valores de ARNm de *β-actina*. La actividad caspasa-3 (D) fue determinada mediante fluorimetría. Los valores son media±EEM de n≥6 muestras analizadas por triplicado para cada grupo experimental. \*, p<0,05, comparando con el grupo control. ND: no determinado.

Estos datos estaban de acuerdo con los que obtuvimos al realizar la determinación de las actividades caspasa-3 y caspasa-8. Como se observa en la figura 17D, sólo los animales del grupo TAA mostraron un incremento significativo de la actividad caspasa-3 desde las primeras semanas, mientras que no se observaron

cambios en la actividad caspasa-8 en ninguno de los grupos (datos no mostrados). En concordancia con estos resultados algunos trabajos previos han indicado que la administración de TAA en roedores causa muerte celular vía apoptosis y necrosis (Diez-Fernandez *et al.*, 1993) (Mangipudy *et al.*, 1995b) (Mangipudy *et al.*, 1995a) y aunque no se conocen totalmente los mecanismos por los que la TAA induce daño hepático, se han observado algunos cambios tras la administración de TAA, en relación a procesos apoptóticos (Diez-Fernandez *et al.*, 1993) relacionados con la actividad de la caspasa-3 (Sun *et al.*, 2000).

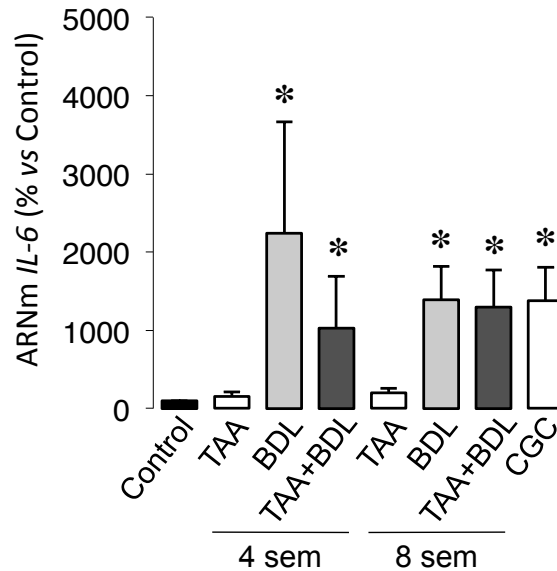
#### **4.1.5. Evaluación del papel de la inflamación mediado por IL-6 en el desarrollo de tumores colangiulares**

Como se ha comentado anteriormente, los CGCs suelen desarrollarse ligados a patologías que tienen asociadas una inflamación crónica del tracto biliar. Algunos estudios han descrito un incremento de la citokina inflamatoria interleucina-6 (IL-6) en el tracto biliar y en la circulación sistémica de pacientes con CGC (Cheon *et al.*, 2007) (Sugawara *et al.*, 1998).

La IL-6 es una citokina multifuncional producida por una amplia variedad de células que median reacciones inflamatorias y procesos inmunes (Tabibzadeh *et al.*, 1989). Además, funciona como un factor regulador del crecimiento en algunos tumores humanos, como melanomas, cáncer renal o cáncer gástrico (Gallo *et al.*, 1992) (Okada *et al.*, 1994), pudiendo estimular o inhibir la proliferación celular de algunos tipos de células neoplásicas (Tatsuno *et al.*, 1994). Se ha descrito que las células de CGC expresan IL-6, y que esta interleucina puede promover el crecimiento de los colangiocitos tumorales *in vitro* (Braconi *et al.*, 2010).

En las muestras de tejido hepático recogidas de cada grupo experimental, se determinaron los niveles de expresión de ARNm de *IL-6*, para evaluar si el efecto promotor de la colangiocarcinogénesis mediada por ácidos biliares pudiera estar relacionado con el aumento de los niveles de *IL-6*. En la figura 18 se muestran los niveles de expresión de ARNm de *IL-6* en las muestras hepáticas de cada grupo experimental. La administración de TAA (durante 4 y 8 semanas) como era esperable no indujo cambios en la expresión de la *IL-6*, ya que como comentamos en el apartado anterior, estos animales presentaron una baja proliferación colangiolar.

Sin embargo, los grupos experimentales que mostraron una mayor proliferación colangiolar, BDL y TAA+BDL, así como en el grupo de CGC bien establecido, presentaron un aumento significativo en los niveles de ARNm de esta citocina. Por lo que se puede deducir que el efecto promotor del CGC causado por la colestasis en estos animales podría estar vinculado a procesos inflamatorios mediados por la IL-6.



**Figura 18:** Niveles de expresión del ARNm de *interleucina-6* (IL-6) determinados por RT-PCR-Q. Los valores son media±EEM de n≥6 muestras analizadas por triplicado para cada grupo experimental, expresados como abundancia relativa respecto al calibrador (hígado control de rata) y normalizados por los valores de ARNm de  $\beta$ -actina. \*, p<0,05, comparando con el grupo control.

#### 4.1.6. Expresión del receptor de ácidos biliares TGR5 en el desarrollo de tumores colangiulares

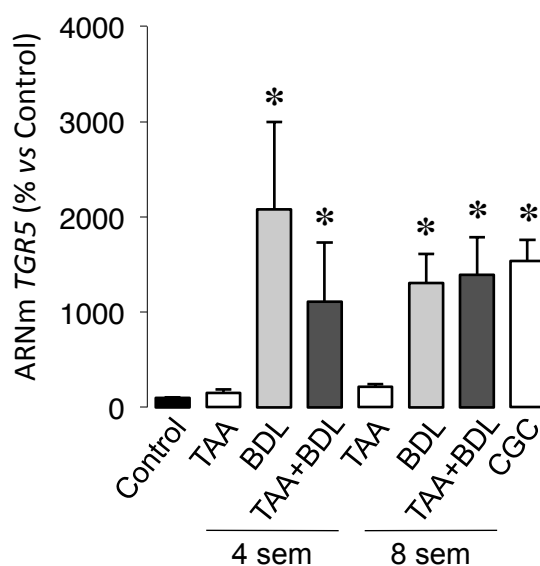
Recientemente, se ha descrito un receptor de ácidos biliares acoplado a proteína G, localizado en la membrana plasmática de los colangiocitos, concretamente en el cilio primario y en el dominio apical de estas células, denominado TGR5 (M-BAR o BG37) (Hylemon *et al.*, 2009) (Keitel *et al.*, 2009) (Keitel *et al.*, 2012) (Keitel *et al.*, 2011) (Pols *et al.*, 2011).

En contraste, TGR5 no se expresa en hepatocitos (Maruyama *et al.*, 2002), por lo que es el principal receptor de ácidos biliares en el epitelio biliar.

Funcionalmente, TGR5 está ligado a una ruta de señalización mediada por AMPc, y su activación por ácidos biliares libres o conjugados con taurina o glicina induce un incremento del AMPc intracelular que desencadena una respuesta

dependiente del tipo celular (Kawamata *et al.*, 2003) (Keitel *et al.*, 2012) (Keitel *et al.*, 2011).

La presencia de TGR5 en el cilio de los colangiocitos, que se ha asociado con funciones mecanosensoras, quimiosensoras y osmosensoras (Keitel *et al.*, 2012), sugiere la existencia de una potencial vía de señalización mediada por ácidos biliares y TGR5, la cual es de gran importancia fisiológica dado que el cilio de los colangiocitos está constantemente expuesto a cantidades variables y a distintos tipos de ácidos biliares que fluyen a través de los conductos biliares.



**Figura 19:** Niveles de expresión del ARNm de *TGR5* determinados por RT-PCR-Q. Los valores son media±EEM de  $n \geq 6$  muestras analizadas por triplicado para cada grupo experimental, expresados como abundancia relativa respecto al calibrador (hígado control de rata) y normalizados por los valores de ARNm de  $\beta$ -actina. \*,  $p < 0,05$ , comparando con el grupo control.

Cuando evaluamos los niveles de expresión de *TGR5* en el hígado de las ratas de cada grupo experimental (Figura 19), observamos un incremento significativo de los niveles de expresión de este receptor en los grupos BDL y TAA+BDL, tanto a las 4 como a las 8 semanas, así como en el grupo de CGC bien establecido. El hecho de que la expresión de *TGR5* se encuentre elevada en el hígado de los animales con BDL, que como hemos descrito muestran una marcada proliferación colangiolar previa al desarrollo del CGC, indica que *TGR5* puede jugar un papel importante en las vías de señalización dependientes de ácidos biliares que median la proliferación de las células colangiolares.

Hay que destacar que el perfil de las gráficas obtenidas para el ARNm de *IL-6* (Figura 18) y *TGR5* (Figura 19) fue prácticamente el mismo, ya que ambos se sobreexpresaban en los grupos de proliferación colangiolar estimulada (BDL y TAA+BDL) y en el CGC bien establecido, por lo que podrían ser marcadores interesantes para investigar en el futuro sobre su uso en la detección de estadios pre-tumorales.

Para comprobar si los ácidos biliares, además de estar implicados en los procesos anteriormente descritos, tanto en posibles vías inflamatorias mediadas por IL-6, como mediar la respuesta celular desencadenando las señales intracelulares mediadas por el sensor de membrana TGR5, quisimos evaluar si los niveles crónicamente elevados de los ácidos biliares podrían tener un efecto genotóxico directo sobre las células colangiolares.

Para determinar si el efecto de la acumulación de los ácidos biliares sobre la progresión del CGC era debido a que estas moléculas actúan como carcinógenos o co-carcinógenos, empleamos una estrategia basada en el sistema de respuesta bacteriano SOS desencadenado por daños al ADN (Walker, 1984) (Martin *et al.*, 1992). El método para la detección de la genotoxicidad utilizado en esta Tesis Doctoral fue desarrollado por la Lda. Laura Sánchez Vicente (Sanchez-Vicente, 2012) y consiste en la medida de la actividad luciferasa generada por el biosensor microbiano prRecA-Luc2, en el que el gen de la luciferasa (Luc2) que funciona como reportero, está bajo el control del promotor del gen de respuesta a genotoxicidad RecA (prRecA), que forma parte de la respuesta SOS bacteriana.

Nuestros resultados, utilizando varias especies moleculares de ácidos biliares (ácido desoxicólico (DCA), quenodesoxicólico (CDCA), glicoquenodesoxicólico (GCDCA), glicoursodexoxicólico (GUDCA) y litocólico (LCA)) a dosis sub-tóxicas (50  $\mu$ M) o moderadamente tóxicas (1000  $\mu$ M) revelaron que un efecto mutagénico directo de los ácidos biliares al ADN es poco probable, como se ha descrito en algunos trabajos (Nair *et al.*, 2000).

Utilizando este modelo comprobamos que la TAA sí inducía un daño genotóxico, cuando el biosensor microbiano se incubaba con los metabolitos reactivos de la TAA (como el TASO<sub>2</sub>) formados por conversión enzimática tras la exposición con un cultivo de hepatocitos de rata.

Los resultados obtenidos demuestran que existe una relación entre la colestasis crónica y el crecimiento y proliferación del CGC. Esto sugiere que la

acumulación de ácidos biliares en el tejido hepático puede estimular el desarrollo del CGC por un papel co-carcinogénico más que actuando como agentes carcinogénicos, ya que no se observó un daño directo de los ácidos biliares al ADN en los ensayos de genotoxicidad.





## 4.2. EVALUACIÓN DE LA POTENCIAL UTILIDAD DE DERIVADOS CITOSTÁTICOS DE ÁCIDOS BILIARES EN EL TRATAMIENTO DEL CGC

Como se ha comentado anteriormente, el CGC presenta una elevada mortalidad debido: i) a que se detecta cuando se encuentra en un estado de desarrollo muy avanzado, que desaconseja su extirpación quirúrgica, y ii) a que es muy poco sensible a la quimioterapia disponible. Esto ha llevado a que se esté invirtiendo un gran esfuerzo en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

En los últimos años ha aumentado el interés por las terapias vectorizadas; un ejemplo es el uso de TKIs y anticuerpos monoclonales, cuyas dianas selectivas son RTK de la familia ErbB. Como hemos descrito en el apartado anterior, Neu (el homólogo de ErbB2 en ratas) se encuentra sobre-expresado en el CGC. Se ha descrito que tanto ErbB2 como ErbB1 (también conocido como EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico) se encuentran sobre-expresados en CGC (Altimari *et al.*, 2003). Estos RTK están involucrados en las respuestas celulares a factores de crecimiento, por lo que la sobre-expresión de estas proteínas en la membrana plasmática, se relaciona con un aumento de la proliferación celular y, por tanto, de la capacidad del tumor para crecer y expandirse. La sobre-expresión de estos genes puede hacer que un tumor sea más agresivo, pero también puede hacer que el cáncer sea más sensible a algunos agentes quimioterapéuticos (Shafizadeh *et al.*, 2010). Por esta razón, ésta es una de las vías actuales de investigación de nuevos tratamientos del CGC.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral hemos querido explorar otra manera de llevar a cabo terapias vectorizadas aprovechando la expresión de una proteína más específica del tejido colangiolar, como es el transportador de ácidos biliares ASBT, y la experiencia de nuestro grupo de investigación en el desarrollo de fármacos derivados de ácidos biliares.

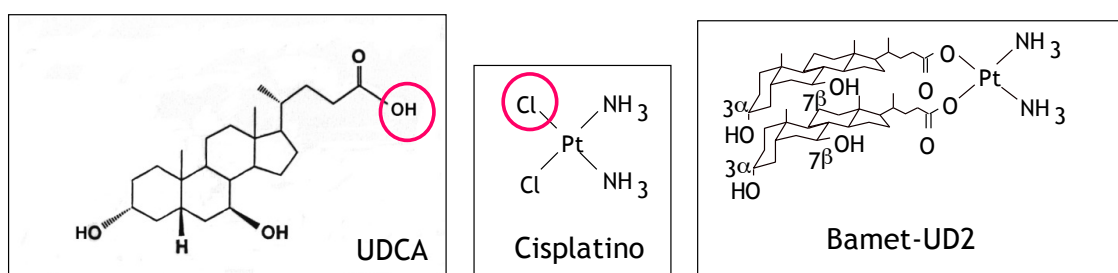
En los últimos años se ha llevado a cabo la síntesis de varias familias de compuestos caracterizados por poseer un grupo similar a un ácido biliar conjugado con un agente citostático capaz de interaccionar con el ADN y/o la maquinaria replicativa (Marin *et al.*, 1998b). El objetivo era utilizarlos como agentes citostáticos frente a tumores localizados en tejidos del circuito enterohepático, ya que son capaces de captar eficazmente ácidos biliares y sus derivados.

Una de estas familias se denominó “Bamet” (de las siglas en inglés “bile acid” y “metal”), y algunos de los compuestos de esta familia han dado resultados

interesantes en los estudios realizados en modelos de HCC, (Dominguez *et al.*, 2001) (Macias *et al.*, 1998) (Macias *et al.*, 1999) y de cáncer de colon (Monte *et al.*, 2005), ya que los compuestos mantienen las características organotrópicas de los ácidos biliares, y los efectos citostáticos *in vitro* y antitumorales *in vivo* propios del cisplatino, pero prácticamente se eliminan sus efectos secundarios (nefrotoxicidad y mielotoxicidad), ya que se disminuye la exposición de los tejidos no comprendidos en la circulación enterohepática. Otra ventaja que tienen los Bamets frente al cisplatino es que no se necesita realizar una administración intravenosa, ya que la presencia de ASBT en el intestino favorece la absorción intestinal cuando se administran por vía oral.

Uno de los compuestos que ha presentado mejores resultados en los estudios preclínicos ha sido el cis-diamino-bisursodesoxicolato-platino (II) o Bamet-UD2, formado por unión, mediante enlaces de coordinación, de cisplatino y dos moléculas de ácido ursodesoxicólico (UDCA). Este compuesto presentó gran organotropismo hepático, fuerte actividad citostática *in vitro* y efecto antitumoral *in vivo* frente a tumores derivados de HCC implantados en el hígado de ratones inmunodeprimidos (Marin *et al.*, 1998a) (Dominguez *et al.*, 2001).

La estructura química del Bamet-UD2 se muestra en la figura 20, y también la de los compuestos relacionados, el UDCA y el cisplatino. La unión de los ácidos biliares al cisplatino se produce a través del grupo carboxilo de la cadena lateral.



**Figura 20:** Estructura del Bamet-UD2 y de sus componentes nativos, el cisplatino y el ácido ursodesoxicólico (UDCA). Los círculos muestran los lugares de unión de las moléculas.

Como **objetivo global** de este segundo bloque de resultados nos planteamos investigar si la utilización de derivados citostáticos de ácidos biliares podría ser una buena estrategia para el tratamiento del CGC.

La proteína ASBT, codificada por el gen *SLC10A2*, es el transportador de ácidos biliares más relevante en el colangiocito (Xia *et al.*, 2006) y también está presente en

el íleon, donde en condiciones fisiológicas lleva a cabo la absorción de estas moléculas, una vez que han participado en la emulsión de las grasas de la dieta. En estudios previos, se ha sugerido que ASBT y otros sistemas de transporte de aniones orgánicos podrían ser los responsables de la captación de Bimet-UD2 en el intestino (Ballestero *et al.*, 2006).

Varios estudios han descrito que los niveles de las proteínas transportadoras de ácidos biliares disminuyen en los tumores hepáticos e intestinales, en comparación con el tejido sano (Kullak-Ublick *et al.*, 1996) (Ballestero *et al.*, 2006) pero, a pesar de ello, se ha demostrado que los ácidos biliares son útiles para vectorizar fármacos hacia estos tumores (Monte *et al.*, 1999) (Dominguez *et al.*, 2001) (Monte *et al.*, 2005).

En base a estos datos, en primer lugar, decidimos analizar los niveles de ASBT en muestras de CGC de rata inducido con el modelo de administración de TAA, en biopsias humanas de CGC, y en tejido pareado no tumoral y, posteriormente, determinar la capacidad de las células tumorales colangiulares de captar ácidos biliares.

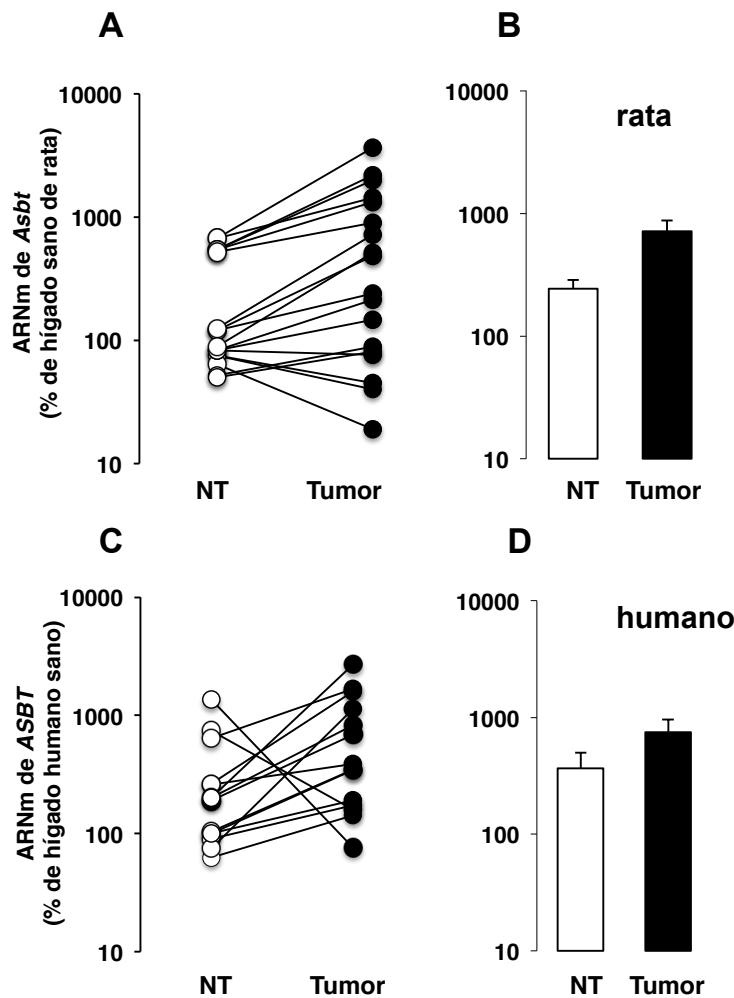
#### 4.2.1. Expresión de ASBT en CGC y captación de ácidos biliares

La expresión del ARNm de *ASBT/Asbt* se determinó por RT-PCR-Q utilizando hígado humano o de rata sano como calibrador. Como se observa en la figura 21 existía una importante variabilidad en los niveles de expresión en los tumores y en el tejido pareado no tumoral, tanto en el tejido de rata (Figura 21A) como en el tejido humano (Figura 21C). En la mayoría de los tumores había un aumento de expresión comparado con el tejido no tumoral, pero también aparecían tumores con niveles muy bajos. En los tumores de rata encontramos valores diferentes entre tumores de un mismo animal, lo que probablemente esté relacionado con los distintos tipos de tumores con características histológicas muy diferentes que era posible encontrar en un mismo animal.

Cuando se representó la media de todos los tumores (Figuras 21B y 21D), encontramos una tendencia a aumentar la expresión en el tejido tumoral frente al no tumoral, aunque las diferencias no fueron significativas ni en el tejido de rata, ni en el humano.

El hecho de que los niveles de *ASBT/Asbt* se mantengan o aumenten en la mayoría de los casos permite sugerir que los derivados de ácidos biliares podrían

alcanzar el interior de las células colangiolares tumorales, que es un paso clave para que puedan tener efecto.

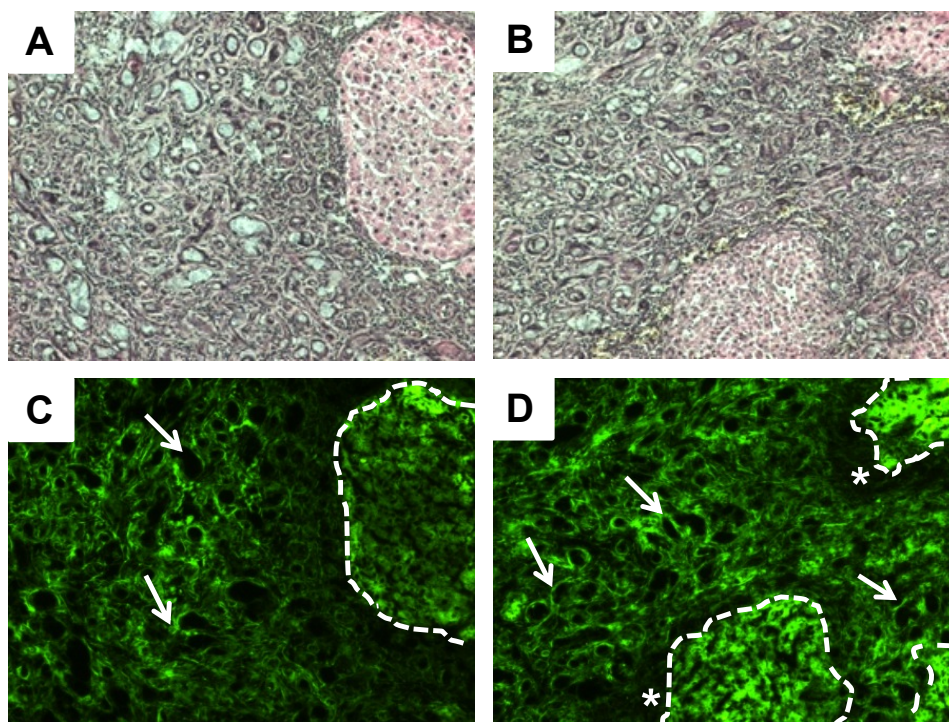


Para confirmarlo, decidimos realizar un experimento *in vivo*, administrando a ratas tratadas con TAA durante 36 semanas un ácido biliar fluorescente sintetizado en nuestro laboratorio por unión del ácido biliar glicocólico a isotiocianato de fluoresceína (el colil-glicil-isotiocianato de fluoresceína o FITC-GC). Tras la administración de una infusión de FITC-GC (100 nmol/min, 30 min) por vía intravenosa, se recogieron

muestras de tejido que contenían tumores y tejido no tumoral para determinar la localización del compuesto por inmunofluorescencia.

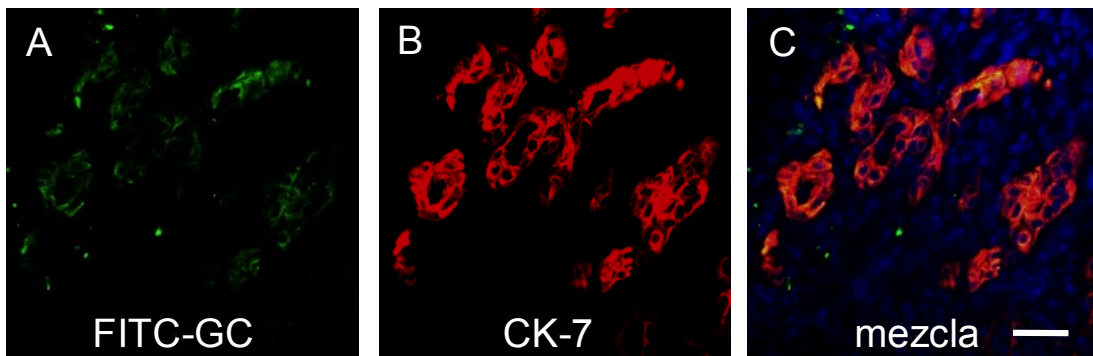
Se realizaron cortes del tejido en un criostato y se visualizó la señal del FITC-GC en un microscopio de fluorescencia. En algunas secciones, se realizó una tinción con hematoxilina-eosina para diferenciar más fácilmente el tejido tumoral del no tumoral por el aspecto histológico.

La figura 22 se corresponde con dos muestras representativas de tejido hepático analizadas mediante microscopía óptica (Figuras 22A y 22B) o de fluorescencia (Figuras 22C y 22D). En el primer caso, se aprecian zonas de CGC de “tipo intestinal” al lado de áreas aisladas de hepatocitos. Como se observa en las figuras 22C y 22D, tanto los hepatocitos (rodeados por líneas discontinuas), como las zonas de CGC, presentaban una buena señal de fluorescencia correspondiente a la captación de FITC-GC. Sólo en las zonas de tejido fibrótico que separaban las áreas de hepatocitos del tejido tumoral, la señal de fluorescencia era más débil, lo que sugiere la menor incorporación del derivado del ácido biliar en esas células.



**Figura 22:** Captación de FITC-GC en cortes de tejido hepático de ratas tratadas con TAA durante 36 semanas. Tinción con hematoxilina-eosina (A y B). Fluorescencia resultante a la incorporación de FITC-GC (C y D). Las fotos de hematoxilina-eosina se corresponden con la misma sección tisular que las fotos de fluorescencia colocadas debajo. Objetivo: 10x. Las flechas indican células colangiulares fluorescentes en las áreas de CGC. Los asteriscos marcan las zonas de tejido fibroso. Las líneas discontinuas rodean las áreas hepatocitarias.

Para dilucidar de manera más precisa si la señal fluorescente observada en las zonas tumorales se debía a captación por las células de CGC, llevamos a cabo el inmunomarcaje de estas células con el anticuerpo anti-CK-7 asociado a fluorescencia roja y analizamos los cortes en un microscopio confocal. Como se observa en la figura 23, la señal citoplasmática intensa que correspondía al marcador de colangiocitos, en rojo (Figura 23B), coincidía con la señal intracelular más débil del FITC-GC, en verde (Figura 23A), lo que se aprecia más claramente en la figura 23C que muestra la co-localización de las dos señales fluorescentes. En esta última imagen se muestran también los núcleos teñidos con Dapi para apreciar la distribución de los colangiocitos en el tejido.



**Figura 23:** Co-localización por inmunofluorescencia en cortes de tumores inducidos en ratas por administración de TAA, de la fluorescencia del FITC-GC (A), en verde, y células colangiolares marcadas con el anticuerpo frente a CK-7 (B), marcado en rojo. C, muestra la mezcla del marcaje de FITC-GC y CK-7. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

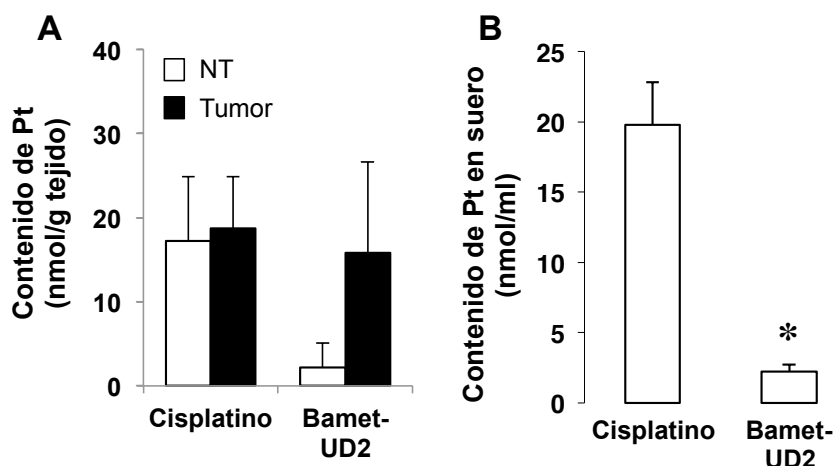
#### 4.2.2. Captación de Bامت-UD2 en tumores de CGC de rata

El siguiente objetivo fue investigar si las células de CGC también podían captar el derivado citostático Bامت-UD2. Para ello, llevamos a cabo experimentos *in vivo*, en los que administramos dos dosis de Bامت-UD2 o de cisplatino (10 nmol/g p.c.) por vía intraperitoneal (los días 0 y 4) a ratas que recibieron tratamiento con TAA durante 36 semanas para inducir el desarrollo de CGCs (como se describió en el apartado 3.4.3). Un día después de la segunda dosis de Bامت-UD2 o cisplatino, los animales se sacrificaron para obtener muestras de tejido tumoral y no tumoral y llevar a cabo la determinación de Pt por espectrofotometría de absorción atómica.

Para normalizar las comparaciones entre distintos animales y grupos experimentales, también se recogieron muestras de sangre para medir la concentración de Pt en suero, lo que es un índice de los niveles a los que están expuestos el hígado y el resto de los tejidos extrahepáticos.



La figura 24A recoge la cantidad de Pt expresada por gramo de tejido en tumores y en tejido no tumoral en los animales que recibieron cisplatino o Bamet-UD2. No se encontraron diferencias en la cantidad de Pt en el tejido tumoral y no tumoral de los animales que recibieron cisplatino, mientras que en los tratados con Bamet-UD2, la cantidad de platino incorporada en los tumores fue mayor que en el tejido no tumoral.



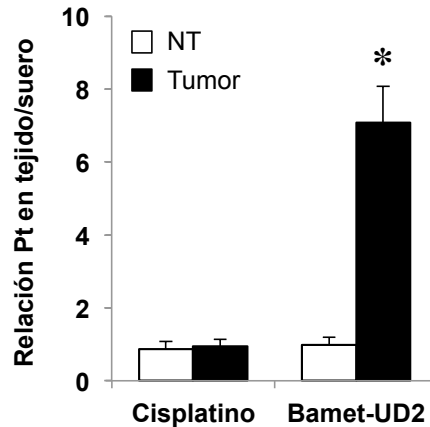
**Figura 24.** Contenido en platino determinado por espectrometría de absorción atómica en muestras de tumores y tejido pareado no tumoral (NT) (A) y en suero (B) obtenidos de ratas tratadas con TAA durante 36 semanas y que recibieron dos dosis de 10 nmol/g p.c de Bamet-UD2 o cisplatino por vía intraperitoneal. Los valores son media±EEM de n=6 muestras por grupo. \*, p<0,05 comparado con el grupo de cisplatino.

En estudios previos de biodistribución de Bamet-UD2 en animales sanos encontramos que los niveles de este compuesto en el tejido hepático eran mayores que cuando se administraba cisplatino (Dominguez *et al.*, 2001). En este estudio, sin embargo, hemos encontrado que los animales que recibieron cisplatino presentaron una acumulación de Pt en el tejido no tumoral mayor que la cantidad presentada por el tejido no tumoral de los animales que fueron tratados con Bamet-UD2.

La concentración de Pt en suero (Figura 24B) fue 9 veces mayor en los animales tratados con cisplatino que en los que recibieron Bamet-UD2, probablemente, porque este último es retirado de la circulación sanguínea por los transportadores hepáticos (Macias *et al.*, 1999). La concentración tan elevada de cisplatino que se detectaba en suero a las 24 h de administrar la segunda dosis puede tener consecuencias adversas en los tejidos más sensibles.

Cuando calculamos la relación entre los niveles de Pt en el tejido y los niveles en suero (Figura 25) encontramos que los niveles en los tumores y el tejido no tumoral eran un reflejo de los niveles en suero en los animales tratados con cisplatino. Esta

misma relación se mantenía en el tejido no tumoral de los animales que recibieron Bamet-UD2, sin embargo, encontramos que el tejido tumoral acumulaba este compuesto de forma significativa, lo que apoya nuestra estrategia de vectorización.



**Figura 25.** Relación entre los niveles de platino en muestras de tumores y tejido pareado no tumoral (NT) y en suero obtenidos de ratas tratadas con TAA durante 36 semanas y que recibieron dos dosis de 10 nmol/g p.c de Bamet-UD2 o cisplatino por vía intraperitoneal. Los valores son media±EEM de de n=6 muestras por grupo. \*, p<0,05 comparado con el grupo de cisplatino.

Hay que tener en cuenta que los Bamets son eliminados principalmente por vía biliar (Macias *et al.*, 1999), mientras que el cisplatino se elimina vía renal, produciendo efectos tóxicos importantes en este tejido que pueden llegar a condicionar que el tratamiento pueda seguir adelante por los graves efectos adversos. El hecho de que los animales tratados con TAA durante 36 semanas presenten una funcionalidad hepática reducida (Tabla 3), que puede estar sobrecargando al riñón durante mucho tiempo, puede justificar que la administración de un nefrotóxico, como el cisplatino, potencie el daño renal y sea responsable de que el cisplatino sea eliminado del organismo más lentamente.

Cuando determinamos los niveles de marcadores de funcionalidad renal en el suero de los animales tratados con cisplatino encontramos valores medios de creatinina de 4,19±0,3 mg/dL comparados con <0,5±0,1 mg/dL en los que recibieron Bamet-UD2. Algo similar ocurrió al determinar urea, para la cual los valores medios fueron de 214±17 mg/dL en el grupo de cisplatino y de 36,4±4,0 en el grupo que recibió Bamet-UD2. Lo que indicaba que el tratamiento con cisplatino inducía de un importante daño renal, que no se producía en animales tratados con Bamet-UD2.

A continuación, nos planteamos investigar la actividad citostática del Bamet-UD2 en líneas celulares de CGC. Puesto que existe una “variabilidad” histológica

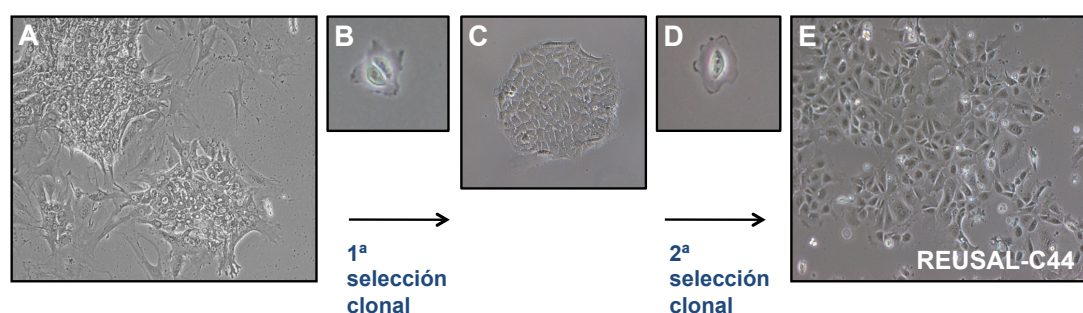


importante en los CGCs desarrollados tanto en humanos (Komuta *et al.*, 2012) como en los animales, decidimos plantear como objetivo parcial de esta Tesis Doctoral obtener líneas celulares a partir de los tumores colangiomaes desarrollados en las ratas con el modelo de administración de TAA en el agua de bebida para unir las a las dos líneas comerciales de CGC, una de rata y una humana, que ya disponíamos en el laboratorio.

#### 4.2.3. Obtención y caracterización de líneas celulares de CGC de rata

Para la obtención de líneas celulares de CGC utilizamos ratas que habían desarrollado tumores colangiomaes tras la administración crónica de TAA durante 40 semanas. Para el aislamiento de las células tumorales, seguimos una modificación de un protocolo habitual utilizado en nuestro laboratorio para el aislamiento de hepatocitos (apartado 3.6 de Material y Métodos).

A partir de las células aisladas se realizó un cultivo primario, que como se observa en la figura 26A, era heterogéneo y además de colangiocitos, se observaban hepatocitos y fibroblastos, mayoritariamente. Tras realizar una doble selección clonal por dilución límite, tal y como se resume de manera esquemática en las figuras 26B-26E, conseguimos una línea celular de CGC de rata homogénea y estable que denominamos REUSAL-C44.

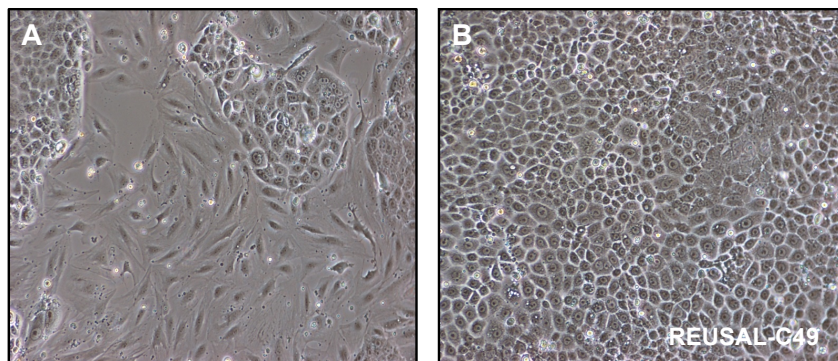


**Figura 26.** Imágenes de microscopía de contraste de fases que resumen los pasos seguidos para la obtención de la línea celular REUSAL-C44. (A) Cultivo primario una semana después del aislamiento a partir de CGC inducido en una rata por administración de TAA durante 40 semanas. (B) Primera selección clonal por dilución límite a partir de una única célula y (C) posterior crecimiento de la colonia. (D) Segunda selección clonal por dilución límite y (E) aspecto de la línea celular REUSAL-C44. Objetivo: 10x.

Siguiendo el mismo protocolo, obtuvimos una segunda línea celular, que denominamos REUSAL-C49, procedente de otra rata con desarrollo de CGC. Una vez

comprobado que los cultivos estaban libres de contaminación bacteriana y micoplasmas, se expandieron y se llevó a cabo su caracterización.

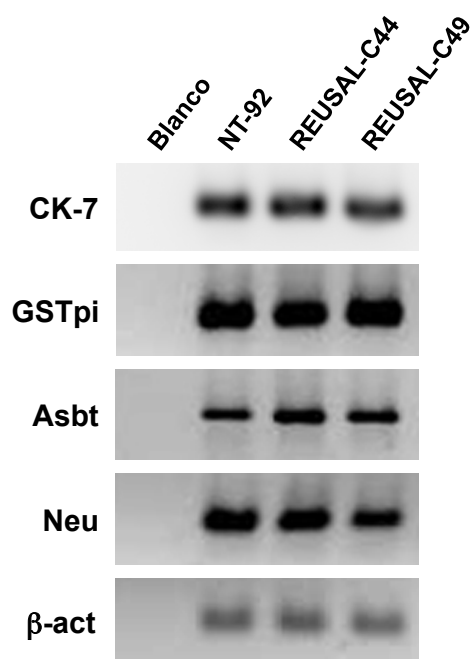
En cuanto al aspecto morfológico, observado con el microscopio de contraste de fases, era ligeramente diferente entre las dos líneas. Así, las REUSAL-C44 (Figura 26E) tenían forma poligonal/alargada, mientras que las REUSAL-C49 (Figura 27B) eran menos alargadas, más redondeadas y con un tamaño ligeramente inferior. Como característica común, ambas líneas celulares presentaban un núcleo grande, con un solo nucléolo, y un citoplasma claro y poco granuloso. La figura 27A muestra el aspecto de las células REUSAL-C49 antes de llevar a cabo la doble selección clonal, donde se aprecia contaminación por células fibroblásticas, principalmente.



**Figura 27:** Morfología de la línea celular REUSAL-C49. Aspecto del cultivo de las células policlonales, una semana después del aislamiento (A) y después del establecimiento de la línea celular tras la doble selección clonal (B). Objetivo 10x.

Para caracterizar las células evaluamos la expresión de distintos marcadores, entre ellos: CK-7, que como hemos comentado anteriormente se expresa en las células colangiolares; Neu, que se asocia con la progresión y malignización de tumores colangiolares y GSTpi como marcador de preneoplasia hepática. Con propósitos comparativos se incluyó en el estudio la línea celular de CGC de rata comercial NT-92.

Comenzamos evaluando la expresión de estos marcadores a nivel de ARNm, mediante RT-PCR-Q. La figura 28 muestra el resultado de la electroforesis en geles de agarosa de los productos de PCR amplificados con “primers” específicos para algunos de los genes en las tres líneas celulares. La especificidad de todos los “primers” utilizados se confirmó por la aparición de una única banda del tamaño esperado.



**Figura 28:** Análisis de expresión, a nivel de ARNm, de los genes *CK-7*, *GSTpi*, *Asbt* y *Neu* en las líneas celulares de CGC de rata REUSAL-C44 (calle 3) y REUSAL-C49 (calle 4), y en la línea comercial NT-92 (calle 2). En la calle 1 se cargó el blanco de reacción (sin ADNc) para mostrar la ausencia de amplificación de productos inespecíficos. Se incluye el gen *β-actina* (*β-act*) que se utilizó como normalizador.

Los resultados obtenidos de la RT-PCR-Q se expresaron respecto al tejido hepático sano que utilizamos como calibrador y se normalizaron con los niveles de *β-act* en cada muestra. La tabla 4 recoge los resultados para todos los genes analizados para la caracterización de las líneas celulares.

**Tabla 4:** Expresión de genes para caracterizar las líneas celulares de CGC obtenidas a partir de tumores inducidos en ratas por tratamiento con TAA (REUSAL-C44 y REUSAL-C49). Para comparar se ha incluido la línea comercial NT-92.

	REUSAL-C44	REUSAL-C49	NT-92
<i>CK-7</i>	+++	+++	+++
<i>Neu</i>	+++	+++	+++
<i>GSTpi</i>	+++	++	+++
<i>TGR5</i>	+	+	+
<i>Asbt</i>	-	--	+++
<i>Fxr</i>	---	---	---
<i>Oatp1</i>	---	---	---
<i>Oatp2</i>	---	---	---
<i>Oatp4</i>	---	---	---
<i>Ntcp</i>	---	---	---
<i>Albúmina</i>	---	---	---
<i>CD163</i>	---	---	---

Los valores de expresión se representaron normalizados con el control endógeno *β-actina*, y expresados en % respecto al hígado control que se utilizó como calibrador. (+, expresión 100-500%; ++, 500-1000%; +++, >1000%; -, expresión 50-99%, --, 20-50%, ---, <20%).

Encontramos una marcada sobre-expresión de los genes *CK-7* y *Neu* en las tres líneas celulares, mientras que para *GSTpi* los niveles en las células REUSAL-C44  $\approx$  NT-92 > REUSAL-C49. Los niveles de *TGR5* estaban moderadamente elevados en las tres líneas celulares, mientras que el patrón de expresión de *Asbt* fue diferente en cada línea: NT-92 >> REUSAL-C44 > REUSAL-C49. De hecho, los niveles de expresión de *Asbt* en las dos nuevas líneas fueron menores que los encontrados en el hígado control utilizado como calibrador.

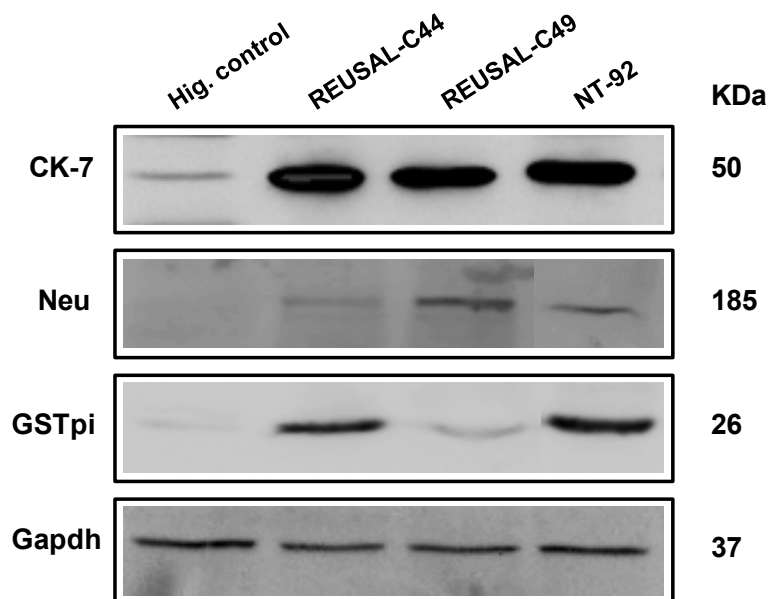
También incluimos la determinación de genes típicos de otras células hepáticas: los transportadores de aniones orgánicos *Oatp1*, *Oatp2* y *Oatp4*; el transportador de ácidos biliares dependiente de sodio *Ntcp*; el receptor nuclear de ácidos biliares *Fxr*; y la *albúmina*, como marcadores de hepatocitos, y la glicoproteína *CD163*, como marcador de células de Kupffer. Como se observa en la tabla 4, no se detectó ninguno de estos genes en ninguna de las líneas celulares analizadas.

Estos resultados apoyaban que las líneas celulares obtenidas eran de origen colangiolar, y el hecho de que existieran diferencias en la expresión de *Asbt* nos pareció interesante para ver si existía relación entre los niveles de este transportador y la respuesta al derivado citostático de ácidos biliares.

Para completar el estudio se realizaron análisis a nivel de la proteína por western blot e inmunofluorescencia. La figura 29 muestra western blots representativos de la detección de las proteínas CK-7, Neu, y GSTpi. La GAPDH se utilizó como control de carga de los geles.

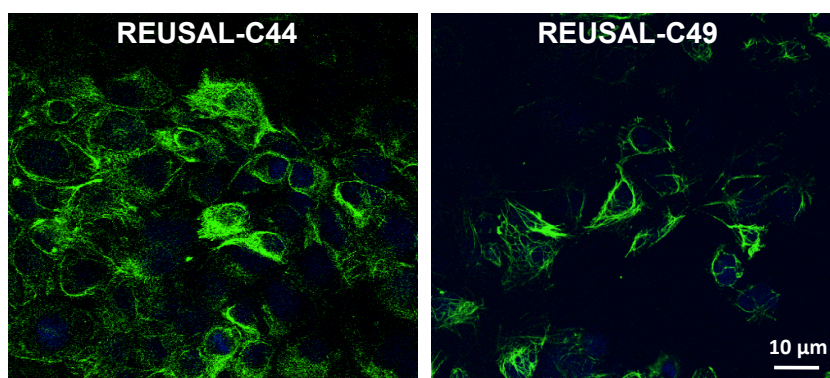
Como podemos observar las dos nuevas líneas celulares presentaron niveles elevados de CK-7, y de una magnitud similar a la encontrada en la línea comercial NT-92. El oncogén Neu se detectó en las 3 líneas celulares, aunque la señal en las células REUSAL-C49 fue ligeramente superior y en la REUSAL-C44 ligeramente inferior que la encontrada en las células NT-92.

Respecto a la proteína GSTpi, sí encontramos diferencias de expresión entre las tres líneas celulares, de forma similar a lo que observamos a nivel de ARNm: REUSAL-C44  $\approx$  NT-92 > REUSAL-C49. En esta última línea se detectó una señal menor, similar a la encontrada en el tejido hepático control.



**Figura 29:** Imagen representativa de la detección por western blot CK-7 (A), Neu (B) y GSTpi (C) en homogenados de rata obtenidos de hígado control de rata (calle 1), de las líneas celulares de CGC de rata REUSAL-C44 (calle 2), REUSAL-C49 (calle 3) y NT-92 (calle 4). Se cargaron 50  $\mu$ g de proteína en cada calle. Los tamaños de cada banda se muestran junto al inserto. Como control de carga se utilizó la GAPDH.

Puesto que el marcador CK-7 es uno de los más específicos, también analizamos por inmunofluorescencia su presencia en las dos líneas celulares generadas. Como se observa en la figura 30, ambas líneas mostraron una señal citoplasmática intensa característica de una proteína asociada al citoesqueleto.



**Figura 30:** Inmunolocalización de CK-7 como marcador de células colangiolares en las líneas celulares REUSAL-C44 y REUSAL-C49 obtenidas a partir de tumores inducidos por tratamiento con TAA en ratas. Los núcleos, de color azul, se tiñeron con Dapi.

Para determinar si las nuevas líneas celulares mantenían la capacidad tumorigénica de los CGCs de partida se utilizaron ratones nude, que se caracterizan por estar inmunodeprimidos debido a la carencia congénita de timo. Esto hace necesario su alojamiento en jaulas especiales, que se mantienen en el interior de un sistema de filtración de aire y termostización, y trabajar en las mayores condiciones de esterilidad posibles.

A los animales se les inyectó una suspensión de  $5 \times 10^6$  células REUSAL-C44 o REUSAL-C49 de forma subcutánea en el dorso. Tras un periodo de latencia inicial de 2-4 semanas, observamos que se desarrollaban masas tumorales que alcanzaron dimensiones de  $\approx 4 \text{ cm}^2$  a las 12 semanas (datos no mostrados), momento en el que los animales fueron sacrificados. A pesar de que a nivel de proteína encontramos niveles distintos de *Neu* entre las dos líneas (REUSAL-C49 > REUSAL-C44), y que se ha propuesto que existe una relación entre los niveles de esta onco-proteína y la capacidad tumorigénica, no encontramos diferencias en el crecimiento de los tumores desarrollados entre las dos líneas celulares.

En resumen, disponemos de dos nuevas líneas celulares, REUSAL-C44 y REUSAL-C49, que muestran las características típicas de las líneas celulares colangiulares, así como propiedades de invasividad y capacidad tumorigénica que pueden ser de utilidad para estudios *in vitro* de la biología tumoral, patogénesis molecular y respuesta a fármacos citostáticos frente al CGC.

Nuestro siguiente paso fue investigar la capacidad citostática del Bamet-UD2 en las líneas celulares de CGC, utilizando cisplatino como control positivo.

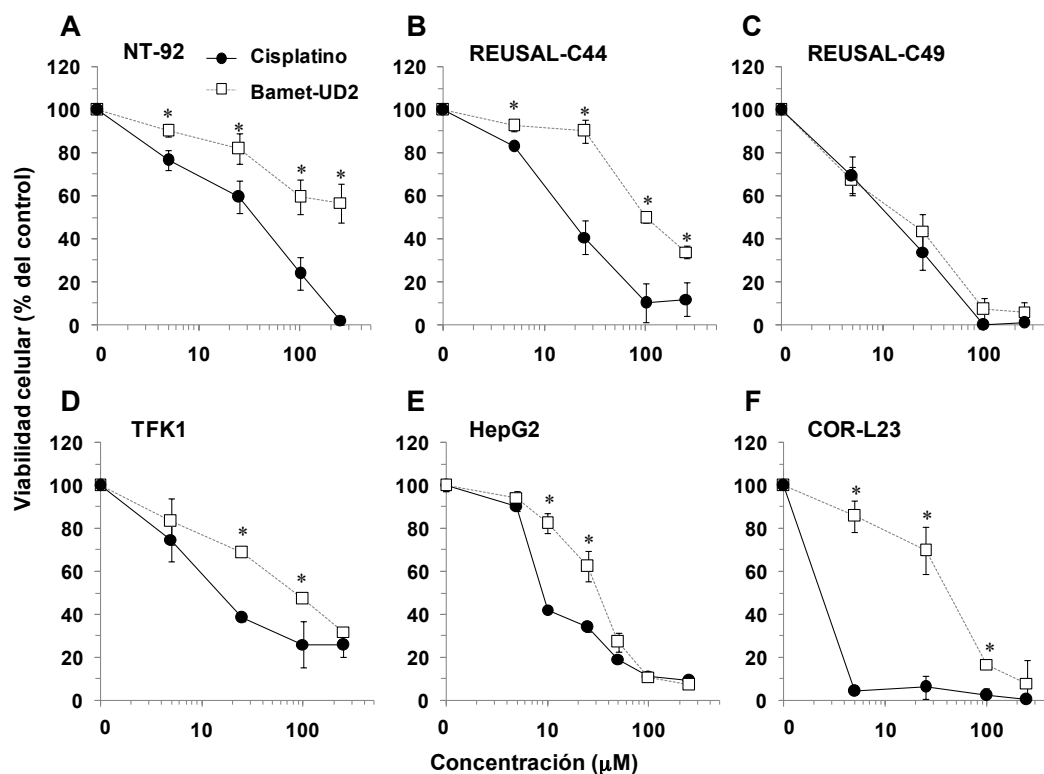
#### **4.2.4. Efecto citostático del Bamet-UD2 en el CGC**

La determinación de la capacidad del Bamet-UD2 para inhibir la proliferación *in vitro* se llevó a cabo en las líneas celulares de CGC de rata NT-92, REUSAL-C44 y REUSAL-C49 y humana TFK1. Además, se incluyó la línea celular HepG2, de hepatoblastoma humano, por ser de origen hepatocitario y presentar transportadores de ácidos biliares, y la línea celular COR-L23, de carcinoma de pulmón humano, que carece de proteínas transportadoras específicas para los ácidos biliares, por estar fuera del circuito enterohepático.

Los experimentos se realizaron tras la exposición a distintas concentraciones de Bamet-UD2, cisplatino o UDCA (0-250  $\mu\text{M}$ ) durante 72 h, y la viabilidad celular se



determinó mediante el test de formazán, que mide la capacidad de las mitocondrias de las células vivas de transformar las sales de tetrazolio en formazán. El UDCA no afectó al crecimiento del cultivo a las concentraciones utilizadas, por lo que para simplificar las gráficas de la figura 31, no se han incluido los datos.

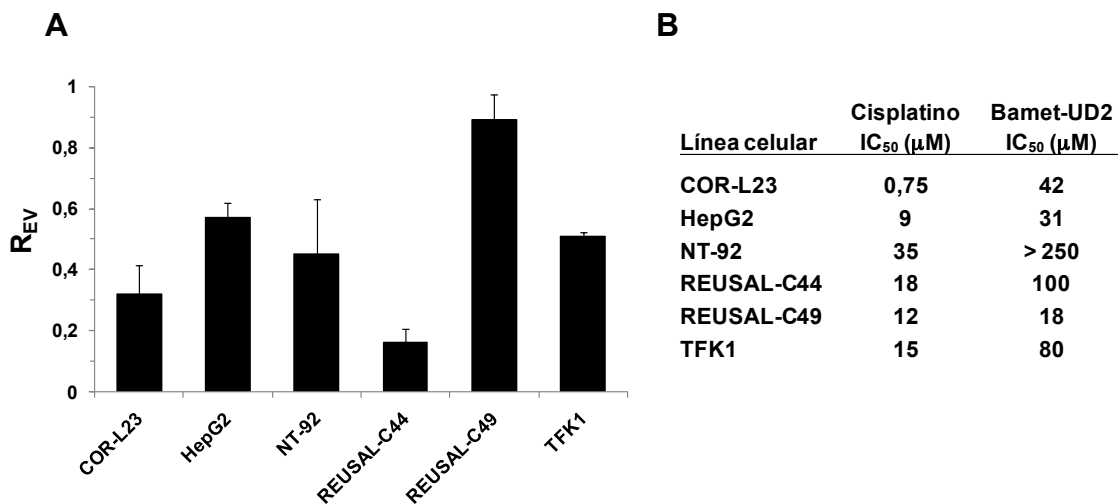


**Figura 31:** Efecto del cisplatino y el Bamet-UD2 sobre la viabilidad celular en las líneas de CGC de rata NT-92 (A), REUSAL-C44 (B) y REUSAL-C49 (C) o humano TFK1 (D), y en las líneas de hepatoblastoma humano HepG2 (E) o de carcinoma de pulmón COR-L23 (F). Los valores son media±EEM de cuatro experimentos realizados por triplicado. \*,  $p < 0,05$  comparado con el cisplatino.

Como se observa en la figura 31, el efecto citostático del Bamet-UD2 fue diferente en cada línea celular de CGC ensayada. En el caso de las células REUSAL-C44 el Bamet-UD2 tuvo un efecto citostático marcadamente menor que el del cisplatino, como se refleja también al analizar el valor del coeficiente de efectividad por vectorización ( $R_{EV}$  = inhibición inducida por el agente vectorizado, i.e., Bamet-UD2 / inhibición inducida por el agente no vectorizado, i.e., cisplatino) (Figura 32A) calculado a la concentración de 25 μM, que para esta línea celular fue de 0,16. Cuando observamos los datos de la concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) para cada fármaco en estas células apreciamos una potencia claramente superior para el cisplatino (IC<sub>50</sub> ≈ 18 μM) en comparación con el Bamet-UD2 (IC<sub>50</sub> ≈ 100 μM) (Figura 32B). La diferencia entre el efecto de ambos compuestos en esta línea celular fue comparable a la observada para las células COR-L23 en las que el derivado citostático Bamet-UD2

mostró un menor efecto inhibitorio de la proliferación comparado con el cisplatino ( $IC_{50} \approx 42$  vs  $IC_{50} \approx 0,75 \mu\text{M}$ , respectivamente) y el valor de  $R_{EV}$  fue 0,32, ya que como esperábamos, en este caso el ácido biliar no confiere ventaja de vectorización al agente farmacológicamente activo (cisplatino) sin el ácido biliar.

Sin embargo, el efecto citostático del Bamet-UD2 en las células TFK1 y REUSAL-C49 fue más parecido al del cisplatino. Así, el valor de  $R_{EV}$  fue de 0,51 en las TFK1 y de 0,89 en las REUSAL-C49, mientras que en las células HepG2 usadas como control positivo  $R_{EV}$  fue de 0,57 (figura 32A).



**Figura 32:** Coeficiente de efectividad por vectorización ( $R_{EV}$ ) (A) calculado como relación de la disminución de la viabilidad celular inducida por Bamet-UD2 vs cisplatino a la concentración de  $25 \mu\text{M}$ . Los valores son media $\pm$ EEM de cuatro experimentos realizados por triplicado. (B) Concentraciones de cisplatino o Bamet-UD2 requeridas para reducir la viabilidad celular al 50% ( $IC_{50}$ ) en líneas celulares de CGC de rata NT-92, REUSAL-C44 y REUSAL-C49 y humano TFK1, y en las líneas de hepatoblastoma humano HepG2 y carcinoma de pulmón humano COR-L23.

Estos datos reflejan que la potencia del efecto citostático del Bamet-UD2 vs cisplatino no se ve marcadamente favorecida por la presencia de proteínas transportadoras de ácidos biliares cuando las células en cultivo permanecen expuestas a los compuestos durante un tiempo relativamente largo (72 h), lo que no se espera que pase en un tratamiento *in vivo*.

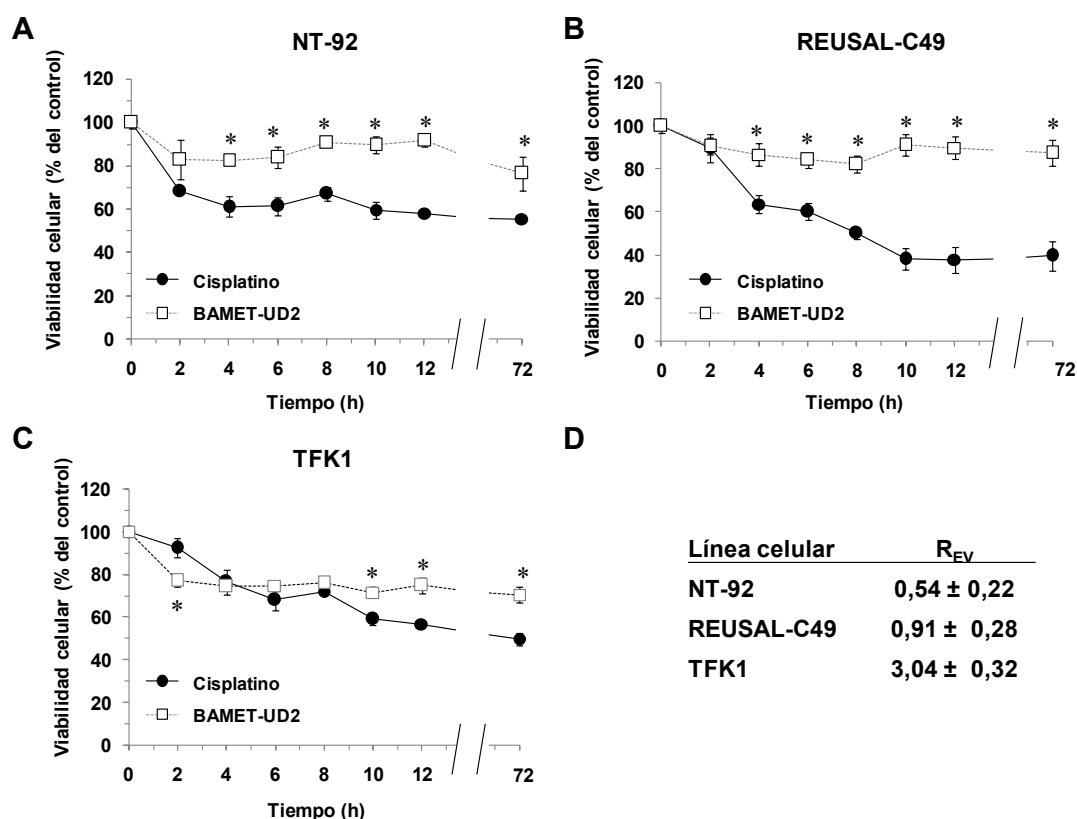
Para mimetizar de forma más apropiada las condiciones de exposición en clínica, donde tras la administración de un agente quimioterapéutico, éste no está en contacto continuo con la célula tumoral, sino que normalmente viaja en la circulación sanguínea y permanece durante un cierto tiempo a una concentración elevada hasta que es eliminado, decidimos evaluar el efecto del Bamet-UD2 y del cisplatino tras tiempos de exposición cortos. Para ello, llevamos a cabo experimentos en los que se



incubaban las células durante 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 72 h, con el fármaco, y se evaluaba el efecto citostático tras las 72 h del comienzo del experimento (como se detalla en el apartado 3.5.3 de material y métodos).

En la figura 33 se muestra la viabilidad tras la exposición durante distintos tiempos a una concentración de 25  $\mu$ M de Bamet-UD2 o de cisplatino. Para estos experimentos se utilizaron las células de CGC humanas TFK1, y de rata REUSAL-C49 y NT-92. No se incluyeron las células REUSAL-C44 ya que mostraron una sensibilidad muy baja al Bamet-UD2 en los experimentos de 72 h de incubación.

Cuando determinamos el efecto citostático de ambos fármacos con esta nueva aproximación experimental encontramos que la reducción en la viabilidad celular tenía lugar mayoritariamente cuando las células se exponían durante 2 h al fármaco.



**Figura 33:** Efecto citostático del cisplatino o del Bamet-UD2, a la concentración de 25  $\mu$ M, en líneas celulares de CGC de rata NT-92 (A) y REUSAL-C49 (B) o humanas, TFK1 (C), expuestas a los fármacos durante distintos tiempos. Los valores son media $\pm$ EEM de cuatro experimentos realizados por triplicado. (D) Valores de  $R_{EV}$  en las tres líneas celulares utilizadas, calculado como reducción de la viabilidad celular del Bamet-UD2 respecto a la del cisplatino determinada 72 h tras la incubación con 25  $\mu$ M del fármaco durante 2 h. \*,  $p < 0,05$  comparado con el cisplatino.

Analizando por separado las curvas de viabilidad celular del Bamet-UD2 y del cisplatino, apreciamos que tras las 2 h de exposición al Bamet-UD2 se alcanzaba prácticamente la máxima reducción en la viabilidad celular obtenida con este compuesto a lo largo del barrido de tiempos de incubación para las tres líneas celulares estudiadas. Sin embargo, cuando analizamos el efecto del cisplatino, encontramos que con 2 h de exposición hay una reducción en la viabilidad celular, pero el efecto citostático de este fármaco se incrementa a medida que aumenta el tiempo de exposición.

Estos datos indican que a un tiempo de exposición corto (2 h) se marca más el efecto citostático mediado por la captación del fármaco vectorizado frente al efecto mostrado por el agente citostático nativo.

Con este modelo experimental de incubación con los agentes citostáticos durante un barrido temporal observamos que tras una breve exposición de 2 h la potencia del efecto citostático de ambos fármacos era similar, como se demuestra en las curvas de viabilidad y en los valores de  $R_{EV}$  calculados (figura 33). Cuando comparamos los valores de  $R_{EV}$  obtenidos después de la exposición a la concentración de 25  $\mu$ M de los fármacos durante 72 h ó 2 h observamos que este valor pasó de 0,45 a 0,54 en las células NT-92, de 0,89 a 0,91 en las células REUSAL-C49 y de 0,51 a 3 en las células TFK1, lo que indica que, en estas condiciones, el efecto del Bamet-UD2 en relación al del cisplatino fue mayor que cuando el análisis se llevaba a cabo tras una exposición a los fármacos durante 72 h.

Estos datos apoyan que el mejor modelo experimental para evaluar el papel de un agente citostático vectorizado, que requiere de sistemas transportadores, es un periodo de exposición corta (2 h), ya que a tiempos de incubación mayores se anula la ventaja que proporciona el agente vectorizado (Bamet-UD2) respecto al compuesto no vectorizado (en este caso el cisplatino).

Los resultados observados en las figuras 31 y 33 indican que el Bamet-UD2 ejerce un efecto citostático en líneas celulares de CGC. Sin embargo, el efecto en algunos casos fue menor del esperado cuando se comparaba con la potencia del cisplatino. Este hecho nos llevó a plantearnos si la menor potencia del Bamet-UD2 podría ser debida a una mayor expulsión celular del fármaco por bombas de eflujo de la superfamilia ABC, ya que se ha descrito que estas bombas participan en el eflujo de una gran variedad de sustancias y determinan una reducción del contenido intracelular de muchos fármacos citostáticos (Chan *et al.*, 2004).

#### 4.2.5. Actividad de bombas de eflujo en líneas de CGC de rata y humano

Para determinar la actividad de bombas de eflujo en las líneas celulares de CGC, llevamos a cabo ensayos de citometría de flujo en los que utilizamos sustratos fluorescentes específicos para los distintos transportadores a estudiar, e inhibidores específicos de su actividad, tal como se detalla en el apartado 3.14 de Material y Métodos. Además, evaluamos la expresión a nivel de ARNm de las bombas de exportación MDR1 (*ABCB1B*), MRP1 (*ABCC1*), MRP3 (*ABCC3*) y BCRP (*ABCG2*). La expresión de estos genes se muestra en las tablas 5 y 6 (en el estudio de expresión también se incluyeron las células REUSAL-C44, ya que como comentamos mostraron un bajo efecto al Bamet-UD2 tras 72 h de exposición).

Comenzamos investigando la actividad de proteínas de la familia MRP (del inglés “multidrug resistance associated protein”), ya que es bien conocido que estas bombas de exportación confieren resistencia a las células tumorales frente a fármacos por expulsión activa de éstos desde el interior celular (Muller *et al.*, 1997). Se sabe que la MRP2 puede transportar ácidos biliares divalentes conjugados sulfatados o glucuronidados (Akita *et al.*, 2001), y otros miembros de esta familia como las proteínas MRP1, MRP3 y MRP4 son capaces de transportar ácidos biliares mono y dianiónicos mediante mecanismos en los que puede estar implicado el GSH (Ballatori *et al.*, 2005). Algunos trabajos han descrito que las MRPs más expresadas en líneas celulares de CGC son la MRP1 y la MRP3 (Tepsiri *et al.*, 2005). Como se observa en la tabla 5, tanto MRP1 y MRP3 se sobre-expresaban en las líneas de CGC de rata, y en la humana (tabla 6) aunque con un nivel variable.

**Tabla 5:** Expresión de bombas de exportación en líneas de CGC de rata evaluados por RT-PCR-Q. Se muestra el Ct para el hígado control de rata (usado como calibrador). En las líneas celulares se muestra la expresión de cada gen en % respecto a la expresión del calibrador. Entre paréntesis se muestra el valor del  $\Delta$ Ct de cada gen respecto al gen normalizador  *$\beta$ -actina*.

	Ct calibrador	NT-92	REUSAL-C49	REUSAL-C44
<b><i>Abcb1b</i></b>	22 (4,48)	25.1±5.6 (6,47)	104,2±43.1 (4,42)	160±29.3 (3,82)
<b><i>Abcc1</i></b>	29 (11,48)	7727±590 (5,30)	689±75 (8,62)	5163±181 (5,74)
<b><i>Abcc3</i></b>	26 (8,98)	2961±442 (4,31)	268±7 (5,57)	808±175 (6,05)
<b><i>Abcg2</i></b>	26 (9,15)	0.03±0.01 (20,98)	271±18 (7,75)	349±40 (7,23)

Para evaluar la actividad de las MRPs en nuestras líneas de CGC llevamos a cabo experimentos en los que incubábamos las células con un sustrato específico de todas las MRPs, la calceína, a una dosis de 1  $\mu$ M. Como inhibidor utilizamos el probenecid a dos dosis, 100 y 500  $\mu$ M. Las concentraciones de ambos compuestos y

el tiempo de incubación (30 min) se eligieron a partir de experimentos preliminares de puesta a punto (datos no mostrados).

La figura 34 muestra el resultado expresado como eflujo de calceína respecto al porcentaje de la carga. Se observa que la exportación de este sustrato fue diferente en las líneas de CGC de rata y humano, ya que en las células TFK1, el eflujo de calceína fue próximo al 30%, mientras que en las células NT-92 y REUSAL-C49 la exportación fue menor del 10 ó 5%. Además, cuando se añadía el inhibidor de MRPs, el probenecid, a la suspensión de células TFK1, el eflujo se reducía de manera dosis dependiente (Figura 34C) al 18% y 10% con las dosis de 100  $\mu$ M ó 500  $\mu$ M, respectivamente.

**Tabla 6:** Expresión de bombas de exportación en las células de CGC humano TFK1 evaluada por RT-PCR-Q. Se muestra el Ct para el hígado control humano (usado como calibrador). Se muestra la expresión de cada gen en % respecto a la expresión del calibrador. Entre paréntesis se muestra el valor del  $\Delta$ Ct de cada gen respecto al gen normalizador *GAPDH*.

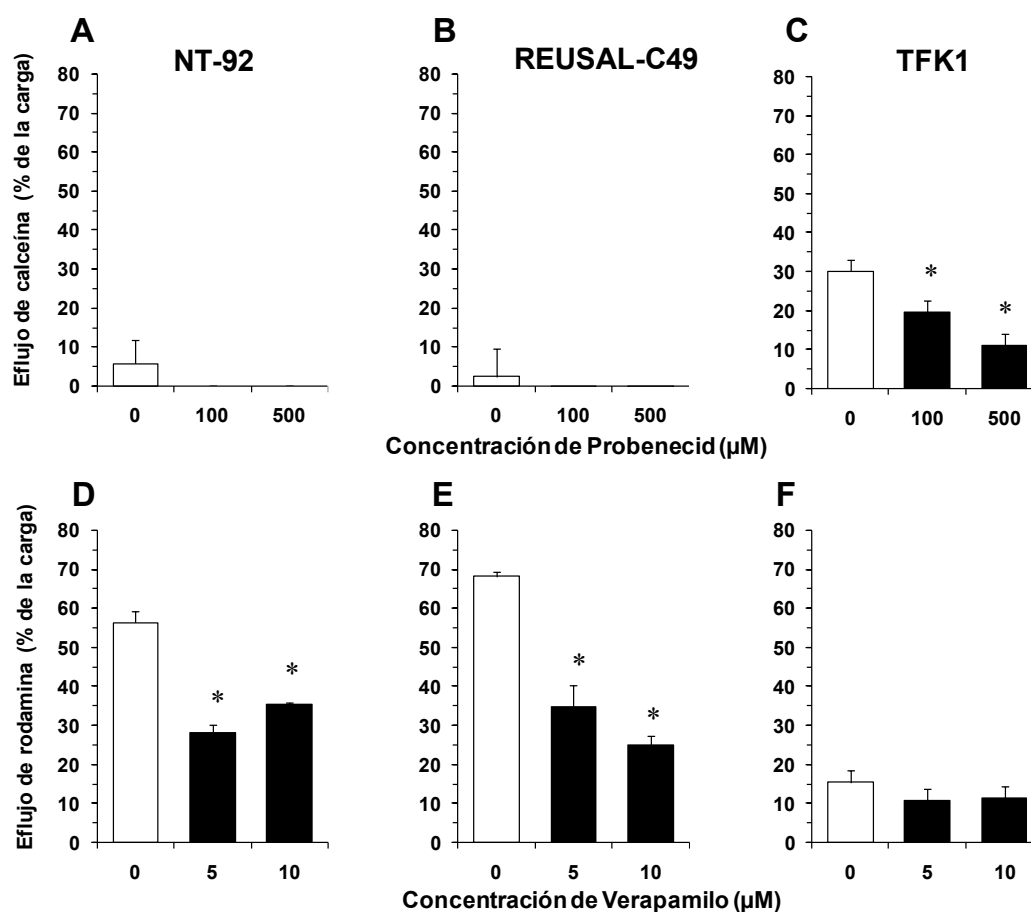
	Ct calibrador	TFK1
<b><i>ABCB1B</i></b>	28 (4,45)	1.05±0.01 (11,03)
<b><i>ABCC1</i></b>	26 (4,46)	4972±155 (-1,17)
<b><i>ABCC3</i></b>	23 (1,11)	1766±1079 (-2,69)
<b><i>ABCG2</i></b>	24 (1,55)	41,6±9 (2,85)

Puesto que en las líneas de CGC de rata NT-92 y REUSAL-C49 apenas se modificaba la exportación de calceína, podemos deducir que en estas células la actividad de las MRPs en el eflujo de fármacos sería poco relevante. Sin embargo, las MRPs sí podrían tener un papel importante en la expulsión de fármacos en la línea celular TFK1.

Otra bomba de exportación importante de la superfamilia ABC, es la MDR1 (del inglés “multidrug resistance protein 1”), gen *ABCB1B*, también conocida como glicoproteína P. Esta bomba es capaz de mediar el eflujo de una gran cantidad de compuestos con actividad antitumoral y también de antibióticos y antivirales (Evans, 2000) (Hunter *et al.*, 1991). Algunos trabajos publicados han descrito que las líneas celulares de CGC tienen una abundante expresión de este transportador (Tepsiri *et al.*, 2005). En nuestras líneas celulares encontramos una expresión variable para esta bomba, así en las REUSAL-C44 y REUSAL-C49 la expresión fue similar al hígado

control, mientras que en las NT-92 y en las TFK1 había una reducción de la expresión (Tablas 5 y 6).

Para evaluar el papel de MDR1 en líneas de CGC utilizamos como sustrato la rodamina 123 a una concentración de 1  $\mu\text{M}$ , y como inhibidor el verapamilo a las dosis de 5 y 10  $\mu\text{M}$ , y el tiempo de incubación con la suspensión celular fue de 30 min. En este caso, el eflujo mediado por MDR1 fue mucho más importante en las células de rata (Figura 34D y 34E) que en la línea humana (Figura 34F).



**Figura 34.** Eflujo de calceína (mediado por MRPs) (A-C) o rodamina 123 (por MDR1) (D-F) tras 30 min, expresado como porcentaje de la carga, en las células de CGC de rata NT-92 (A y D), REUSAL-C49 (B y E) o humanas TFK1 (C y F). Como inhibidor específico de MRPs se utilizó el probenecid (A-C), y como inhibidor de la MDR1 el verapamilo (D-F). Los valores son media  $\pm$  EEM de cuatro experimentos realizados por triplicado. \*,  $p < 0,05$  comparado con el eflujo en ausencia de inhibidor.

En las células TFK1 la exportación mediada por MDR1 fue de un 15%, y éste se reducía al 10% en presencia de su inhibidor, el verapamilo, a las dos concentraciones ensayadas (Figura 34F). En las células NT-92 el eflujo de rodamina fue próximo al

55% de la carga, y el eflujo de este sustrato se reducía a la mitad cuando la suspensión celular se incubaba en presencia de 5 ó 10  $\mu\text{M}$  de verapamilo (Figura 34D). Encontramos algo similar en las células REUSAL-C49, en las que la exportación de rodamina mediada por MDR1 fue próxima al 67%, y se reducía a la mitad en presencia del inhibidor (Figura 34E). Estos datos sugieren que la actividad de MDR1 en las líneas celulares de CGC rata podría jugar un papel importante reduciendo la concentración intracelular de agentes citostáticos.

Por último, también se evaluó la actividad de la proteína BCRP (del inglés “breast cancer resistance protein”), gen *ABCG2*, otro miembro de la superfamilia ABC. Se ha descrito que la expresión de BCRP en tumores constituye un problema importante en la resistencia a la quimioterapia, debido a su capacidad para exportar una gran variedad de fármacos antitumorales (Kusuhara *et al.*, 2007). Entre los compuestos endógenos que son sustratos de BCRP se encuentran los ácidos biliares (Blazquez *et al.*, 2012), con mayor eficacia para los derivados sulfatados (Imai *et al.*, 2003) (Janvilisri *et al.*, 2005). En el análisis de expresión encontramos que BCRP se sobre-expresaba ligeramente en las células REUSAL-C44 y C49, mientras que en las NT-92 y TFK1 mostraba una menor expresión que la presentada por el hígado control (Tablas 5 y 6).

Al igual que para los casos anteriores, evaluamos la actividad de BCRP mediante estudios de citometría de flujo, en los que utilizamos como sustrato BODIPY-prazosina a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  y como inhibidor la fumitremorgina C a una dosis 5 veces superior, y la incubación con la suspensión celular fue también de 30 min.

No observamos eflujo de BODIPY-prazosina en ninguna de las líneas celulares ensayadas (datos no mostrados) y, en consecuencia, tampoco se observó inhibición al incubar las células con fumiremorganina C. Estos datos reflejan que la BCRP no parece tener un papel cuantitativamente importante en estas células de CGC.

Puesto que los experimentos realizados por citometría de flujo indicaban que algunas bombas de exportación de la familia ABC son activas en las líneas celulares de CGC, principalmente las MRPs y la MDR1, evaluamos si el efecto citostático del Bamet-UD2 observado *in vitro* podría verse reducido por la actividad de estas bombas que actuarían expulsando el fármaco y reduciendo así la concentración intracelular del mismo.

#### 4.2.6. Efecto de inhibidores de bombas de eflujo sobre el potencial citostático del Bamet-UD2 en líneas celulares de CGC de rata y humano

Para investigar este punto, llevamos a cabo estudios de viabilidad celular en las líneas celulares de CGC utilizando el Bamet-UD2 y el cisplatino en combinación con los inhibidores específicos probenecid (para las MRPs) y verapamilo (para la MDR1) a las dosis de 100  $\mu$ M y 10  $\mu$ M, respectivamente. Las dosis fueron elegidas en base a los datos previos obtenidos en los experimentos de citometría de flujo. También en base a estos experimentos descartamos utilizar el inhibidor de BCRP.

Puesto que habíamos comprobado que el mejor modelo experimental para llevar a cabo estudios *in vitro* de efecto citostático de un agente vectorizado era una exposición corta, decidimos evaluar el efecto del Bamet-UD2 y del cisplatino en combinación o no con probenecid, verapamilo o ambos, tras una incubación de 2 h, y realizando el test de formazán a las 72 h de la adicción de los compuestos. La tabla 7 recoge los resultados obtenidos expresados como porcentaje de disminución de la viabilidad celular al añadir al cultivo el inhibidor de MRPs probenecid, o el de MDR1 verapamilo, o ambos, respecto a la viabilidad celular mostrada por el agente citostático (cisplatino o Bamet-UD2) en ausencia de inhibidores de bombas de eflujo.

**Tabla 7:** Efecto de los inhibidores de bombas de exportación, probenecid (inhibidor de MRPs) o verapamilo (inhibidor de MDR1) o ambos, en líneas celulares de CGC de rata, NT-92 y REUSAL-C49, y humanas TFK1.

		Cisplatino	Bamet-UD2
<b>TFK1</b>	+Probenecid	0,2 $\pm$ 13,5	1,1 $\pm$ 9,4
	+Verapamilo	10,8 $\pm$ 12,3	2,8 $\pm$ 3,8
	+ Pro + Ver	8,0 $\pm$ 3,0	7,6 $\pm$ 3,0
<b>NT-92</b>	+Probenecid	0,9 $\pm$ 11,8	0 $\pm$ 8,4
	+Verapamilo	0 $\pm$ 4,2	4,3 $\pm$ 2,9
	+ Pro + Ver	6,3 $\pm$ 8,0	5,7 $\pm$ 4,7
<b>REUSAL-C49</b>	+Probenecid	5,8 $\pm$ 12,9	0 $\pm$ 11,4
	+Verapamilo	13,1 $\pm$ 5,5	12,43 $\pm$ 3,7
	+ Pro + Ver	25,25 $\pm$ 8,8	16,58 $\pm$ 1,3

Las células se incubaron con 25  $\mu$ M de cisplatino o Bamet-UD2 en presencia o ausencia de inhibidores de eflujo. El resultado se representa como porcentaje de disminución de la viabilidad celular al añadir el inhibidor específico comparado con la del compuesto citostático en ausencia de inhibidor. Los valores son media $\pm$ EEM de cuatro experimentos realizados por triplicado. Pro, probenecid; Ver, verapamilo.

Puesto que habíamos observado que las células de CGC de rata presentaban una marcada actividad de la MDR1 (Figuras 34 D y 34E), esperábamos que al añadir al cultivo verapamilo se redujese el eflujo de los compuestos citostáticos, lo que se reflejaría en un mayor efecto de los mismos. Como se muestra en la tabla 7, las células de CGC de rata expuestas al Bamet-UD2 redujeron la viabilidad celular en presencia de verapamilo (un 4,3% en las células NT-92 y un 12,4% en las REUSAL-C49). Cuando se añadía probenecid no se observó modificación del efecto del Bamet-UD2, lo cual era esperable ya que estas líneas celulares no presentaron actividad de bombas MRPs. En el caso en el que ambos inhibidores se añadían conjuntamente al cultivo, observamos que el efecto era similar al detectado cuando las células se incubaban sólo con el verapamilo.

Cuando evaluamos los resultados en las mismas líneas cuando se incubaron con cisplatino, encontramos una alta variabilidad, pero se puede observar cierta tendencia a la reducción del eflujo cuando el probenecid y el verapamilo se añadían de modo conjunto, dato que resultó significativo en la línea REUSAL-C49.

Por otro lado, en las células TFK1, que mostraban una baja actividad para la MDR1 pero que tenían activo la exportación mediada por MRPs, la adición de los inhibidores específicos de estas bombas al cultivo potenció ligeramente el efecto citostático del Bamet-UD2, y la mejor condición observada fue la incubación de las células con ambos compuestos a la vez, ya que en este caso la viabilidad celular mostrada para Bamet-UD2 se redujo un 7,6%. Sin embargo, un efecto similar se observó cuando el agente citostático empleado era el cisplatino; pero en ninguno de los casos el efecto fue significativo.

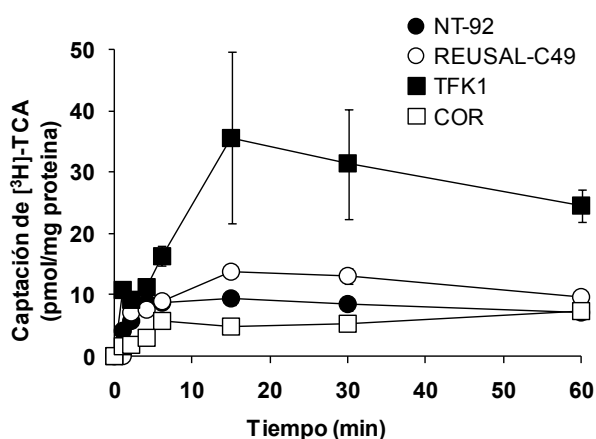
Los resultados observados indicaban que, aunque los sistemas de exportación permanecían activos y el bloqueo específico de bombas ABC con inhibidores favorecía el efecto citostático del derivado de ácido biliar, la contribución de estas bombas a la expulsión de Bamet-UD2 y al menor efecto del mismo no era determinante, ni justificaba la menor potencia del Bamet-UD2 frente al cisplatino.

A continuación, quisimos profundizar en los mecanismos de entrada que podrían influir en una mayor o menor captación del derivado citostático y, en consecuencia, también en el efecto final observado. Por ello, el siguiente paso fue evaluar si el menor efecto del Bamet-UD2 era debido a una baja capacidad de captación de ácidos biliares por las líneas celulares de CGC.



#### 4.2.7. Captación de [<sup>3</sup>H]-TCA en líneas celulares de CGC de rata y humano

Realizamos estudios de la capacidad de captación de un ácido biliar marcado radiactivamente, el TCA, en las líneas celulares de CGC, y además incluimos como control negativo las células COR-L23. En la figura 35, se muestra la captación en función del tiempo del [<sup>3</sup>H]-TCA en las líneas celulares ensayadas. Como se puede observar todas las líneas de CGC captaban TCA de modo similar, alcanzándose el máximo de captación a los 15 min de incubación, que se mantenía hasta el tiempo final del experimento (1 h). Las células COR-L23, que carecen de sistemas de transporte específicos, mostraron una menor captación del ácido biliar, pero las diferencias en los niveles de captación no fueron muy diferentes a la de las líneas NT-92 y REUSAL-C49.



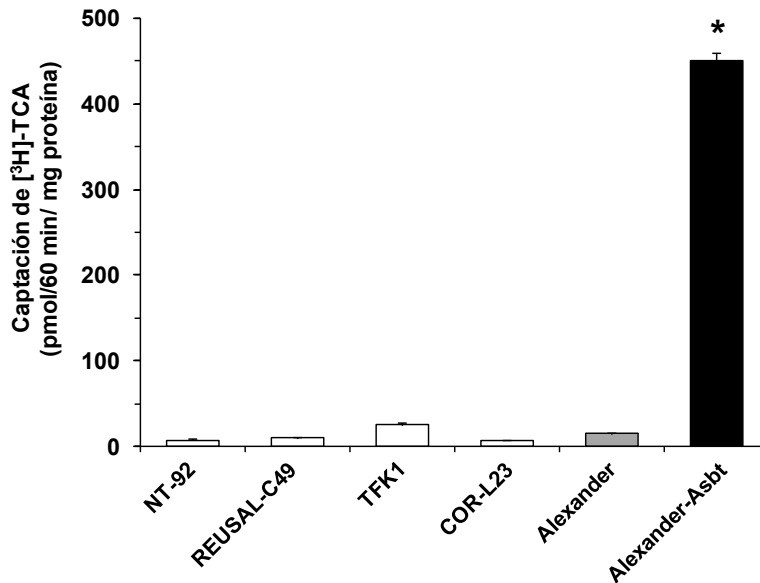
**Figura 35** Evolución temporal de la captación de [<sup>3</sup>H]-TCA en líneas celulares de CGC de rata NT-92 y REUSAL-C49 y humano TFK1, o en la línea de carcinoma de pulmón humano COR-L23. Los valores son media±EEM de cuatro experimentos realizados por triplicado.

En la figura 36 se representa la captación de [<sup>3</sup>H]-TCA determinada tras 1 h de incubación en las mismas líneas celulares, pero también se incluyeron como control positivo las células Alexander silvestres y células Alexander transfectadas con Asbt.

A pesar de que se sabe que las células Alexander mantienen la capacidad de captar ácidos biliares, no encontramos diferencias entre la captación de la línea derivada de hepatocitos y las de CGC.

Para investigar si la presencia de ASBT dotaba a las células de capacidad de incorporar ácidos biliares, utilizamos las células Alexander, que por su origen hepatocitario carecen de la expresión de ASBT, para realizar una transfección

transitoria con este transportador. A los dos días tras la transfección (cuando la expresión de la proteína era máxima), las células fueron incubadas durante 1 h en presencia de 5  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-TCA. Como se observa en la figura 36, la capacidad de captación de [ $^3\text{H}$ ]-TCA en las células transfectadas con Asbt de rata aumentó entre 15-20 veces respecto a las células sin transfectar.

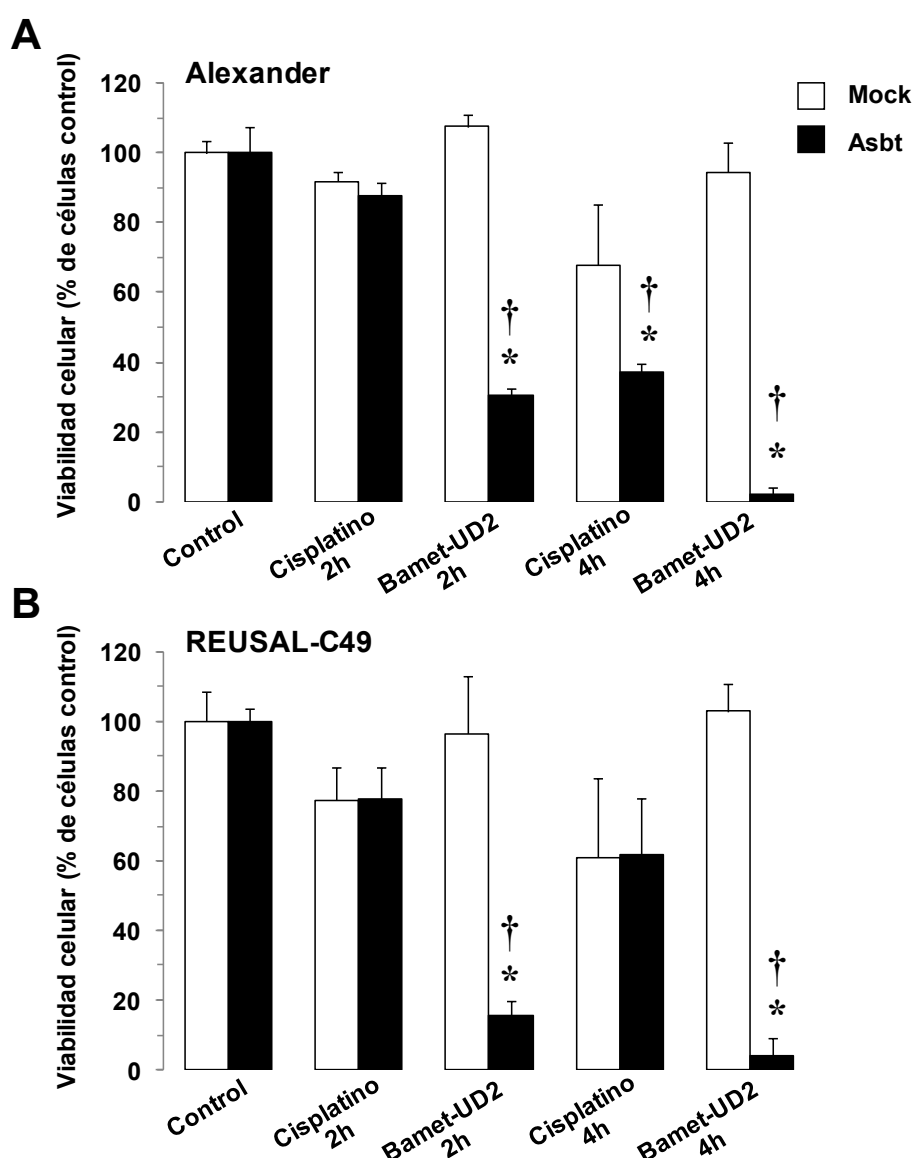


**Figura 36:** Captación de 5  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-TCA en líneas celulares de CGC de rata NT-92 y REUSAL-C49 y humano TFK1 o en la línea de carcinoma de pulmón humano COR-L23 o de hepatocarcinoma humano Alexander silvestres o transfectadas con Asbt 2 días antes del experimento de captación. Los valores representan la media $\pm$ EEM de 4 experimentos realizados por triplicado. \*,  $p < 0,05$ , comparado con las células Alexander sin transfectar.

#### 4.2.8. Papel del ASBT en la captación celular de Bamet-ÚD2

Para evaluar de manera más específica el papel de ASBT como diana para la vectorización de estos compuestos, utilizamos células Alexander y REUSAL-C49 para realizar una transfección transitoria y a los dos días de la transfección llevar a cabo experimentos para determinar la viabilidad del cultivo tras la exposición a una concentración de 25  $\mu\text{M}$  de Bamet-UD2 o de cisplatino. Basándonos en los datos obtenidos anteriormente respecto al tiempo de incubación con los fármacos, decidimos realizar los experimentos exponiendo las células a los agentes citostáticos durante 2 ó 4 h.

Como se observa en la figura 37, la presencia de Asbt en las células confería sensibilidad al Bamet-UD2, así tras 2 h de exposición a este fármaco tanto las células Alexander (Figura 37A), como las REUSAL-C49 (Figura 37B) transfectadas con Asbt mostraron una marcada reducción de la viabilidad celular comparado con las células transfectadas con el vector vacío (Mock), que presentaban una viabilidad celular próxima al 100%. Además, en estas mismas condiciones el cisplatino tuvo un efecto pequeño y similar en las células transfectadas con Asbt y en las mock. La viabilidad se mantuvo próxima al 90% en el caso de las células Alexander, o del 80% en el caso de las REUSAL-C49.



**Figura 37:** Sensibilidad al cisplatino o al Bamet-UD2 en células transfectadas con Asbt, o con el vector vacío 3.1 (Mock), determinada 72 h tras la incubación con 25  $\mu$ M del fármaco durante 2 ó 4 h. Los valores son media $\pm$ EEM de 4 experimentos llevados a cabo por triplicado. \*,  $p < 0,05$ , comparado con las células Mock. †,  $p < 0,05$ , comparado con las células incubadas con DMSO (Control).

Cuando las células se incubaron con los fármacos durante 4 h observamos una reducción de la viabilidad aún mayor en las células transfectadas con Asbt expuestas al Bamet-UD2.

Estos resultados confirmaron que la presencia de Asbt sensibilizaba a las células al efecto del Bamet-UD2, y que este transportador es una buena diana para vectorizar fármacos citostáticos derivados de ácidos biliares hacia células colangiomales tumorales.

#### 4.2.9. Expresión de sistemas transportadores con potencial para la captación de Bamet-UD2 por el colangioma

Finalmente, quisimos evaluar otros sistemas de transporte presentes en los CGCs que pudieran participar en la captación de Bamets al interior celular. En trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, se comprobó que los Bamets son compuestos neutros que son sustratos de varios miembros de las familias de transportadores *SLC10A* y *OATP* (Briz *et al.*, 2002). Las tablas 8 y 9 recogen los niveles de expresión de distintos transportadores determinados por RT-PCR-Q en las distintas líneas celulares de CGC de rata, y en las líneas humanas TFK1 o COR-L23 (como control negativo) respectivamente.

**Tabla 8.** Expresión de sistemas transportadores en líneas de CGC de rata evaluados por RT-PCR-Q. Se muestra el Ct para el hígado control de rata (usado como calibrador). En las líneas celulares se muestra la expresión de cada gen en % respecto a la expresión del calibrador. Entre paréntesis se muestra el valor del  $\Delta$ Ct de cada gen respecto al gen normalizador  $\beta$ -actina.

	Ct calibrador	NT-92	REUSAL-C49	REUSAL-C44
<b><i>Slc10a2</i></b>	27 (10,12)	4564±437 (4,47)	27±10 (12,95)	45±27 (12,04)
<b><i>Osta</i></b>	35 (20,68)	285450±54239 (9,22)	1724682±163876 (6,61)	2076758±494168 (6,38)
<b><i>Ostb</i></b>	37-40 (22,01)	316±160 (20,44)	10.6±3.7 (25,29)	15±9 (24,9)
<b><i>Slc22a1</i></b>	19,5 (3,49)	<0,1 (14,52)	<0,1 (13,87)	<0,1 (13,75)

**Tabla 9.** Expresión de sistemas transportadores las líneas TFK1 y COR-L23 evaluados por RT-PCR-Q. Se muestra el Ct para el hígado control humano (usado como calibrador). En las líneas celulares se muestra la expresión de cada gen en % respecto a la expresión del calibrador. Entre paréntesis se muestra el valor del  $\Delta$ Ct de cada gen respecto al gen normalizador GAPDH.

	Ct calibrador	TFK1	COR-L23
<b><i>SLC10A2</i></b>	39,6 (16,37)	558±26 (13,89)	48,97±15 (17,29)
<b><i>OSTa</i></b>	22 (-0,44)	3.3±0.1 (4,51)	1.5±0.4 (5,51)
<b><i>OSTb</i></b>	31 (9,13)	123±50 (8,95)	7.8±3 (12,91)
<b><i>SLC22A1</i></b>	18 (1,64)	<0,1 (19,78)	<0,1 (11,43)

Como comentamos anteriormente la expresión de Asbt en las líneas de CGC de rata fue variable, mostrándose una sobre-expresión en las células NT-92, mientras que los niveles de expresión en las células REUSAL-C44 y REUSAL-C49 fueron inferiores a los detectados en hígado sano. Por otro lado en las células TFK1 se detectó una expresión de ASBT 5 veces mayor que la expresión presentada por el hígado control humano.

Evaluamos la expresión de OST $\alpha$  y OST $\beta$ , que como se describió en la introducción de esta Tesis Doctoral se localizan en la membrana basolateral del colangiocito y que para su funcionalidad requieren actuar como dímeros. Aunque su función fisiológica es liberar los ácidos biliares del colangiocito a la sangre sinusoidal, algunos trabajos han propuesto un papel bidireccional para OST $\alpha/\beta$  (Camargo *et al.*, 2009), por lo que decidimos evaluar su expresión. Como se indica en la tabla 9, las células TFK1 apenas mostraban expresión de OST $\alpha/\beta$ , mientras que en las células de rata Ost $\alpha$  se sobre-expresaba, Ost $\beta$  no modificó su expresión en el mismo sentido, por lo que en ambos casos el heterodímero no sería funcional y por tanto descartamos su posible implicación en la entrada de derivados de ácidos biliares en estas líneas.

Aunque en el hígado humano los transportadores de la familia SLCO (OATPs) están presentes mayoritariamente en los hepatocitos, algunos trabajos describen que la proteína transportadora de aniones orgánicos OATP1A2 está exclusivamente expresada en los colangiocitos (Lee *et al.*, 2005). Sin embargo, los niveles de ARNm de OATP1A2 en la línea de CGC humano TFK1 fueron muy bajos (datos no mostrados). En el mismo sentido, y como habíamos comprobado anteriormente las células de CGC de rata carecían de expresión de otros miembros de esta familia como Oatp1, Oatp2, y Oatp4 (tabla 4). Por lo que descartamos la posible implicación de transportadores de la familia OATPs en vectorización de derivados citostáticos hacia células colangiolares.

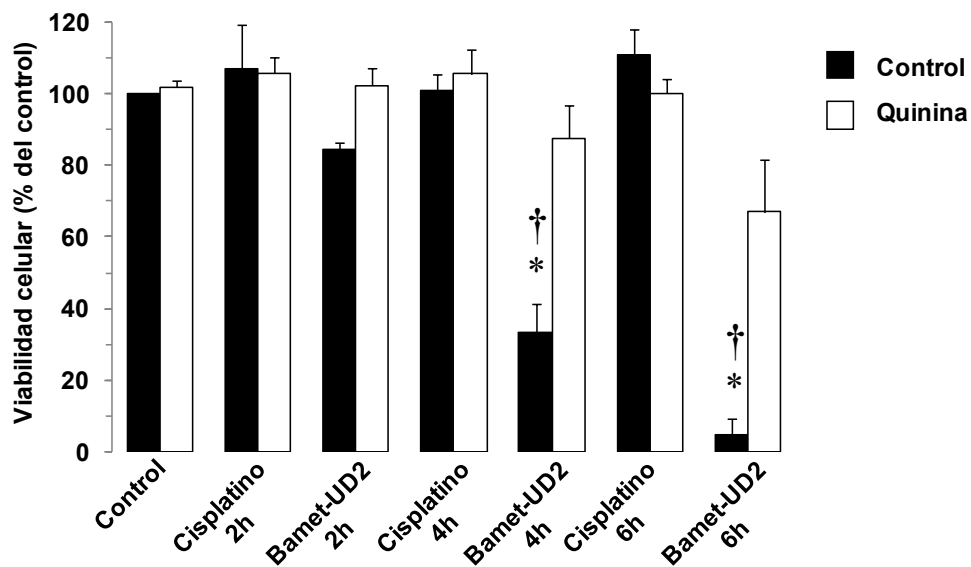
#### 4.2.10. Papel del OCT1 en la captación celular de Bamet-UD2

Por otro lado trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio determinaron que en solución acuosa los Bamets sufren la sustitución de ligandos del platino (II) por agua, formándose derivados catiónicos que pueden ser sustratos de transportadores de cationes como el OCT1 (*gen SLC22A1*) (Briz *et al.*, 2002). La expresión de este transportador en todas las líneas celulares de CGC fue <0,1 % del hígado sano, tejido en el que OCT1 se expresa de manera muy abundante.

A pesar de que OCT1 tenía una expresión disminuida en las líneas celulares, decidimos profundizar en su posible papel como transportador para vehicular Bamet-UD2, ya que podría otorgar un transporte efectivo aún con un número de copias menor que en el tejido sano.

Para comprobar el papel del OCT1 como transportador de Bamet-UD2, llevamos a cabo experimentos *in vitro* en células Alexander transfectadas de modo transitorio con OCT1 humano. Dos días tras la transfección las células fueron expuestas al Bamet-UD2 o al cisplatino durante 2, 4 ó 6 h y se realizó el test de formazán para evaluar la viabilidad celular 72 h tras la adición de los fármacos al cultivo.

Como se puede observar en la figura 38, la presencia del transportador OCT1 marcaba una diferencia en cuanto a la sensibilidad al Bamet-UD2, de modo similar al observado cuando el transportador presente en las células era el Asbt. Sin embargo, cuando las células expresaban Asbt el efecto del Bamet-UD2 sobre la viabilidad celular ya era patente con 2 h de incubación con este fármaco, mientras que cuando el Bamet-UD2 entraba en las células utilizando el transportador OCT1, se requería de un tiempo de incubación mayor (4 ó 6 h) para ver un efecto significativo en la reducción de la viabilidad celular (Figura 38).

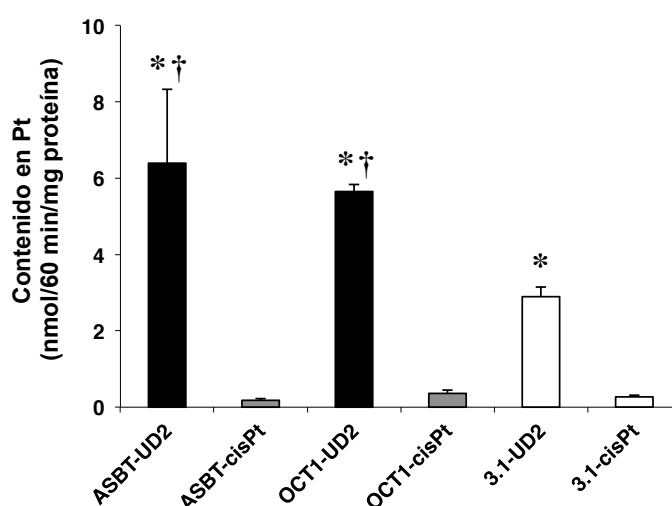


**Figura 38:** Sensibilidad al cisplatino o al Bamet-UD2 en células transfectadas con OCT1, determinada 72 h tras la incubación con 25  $\mu$ M del fármaco en cada caso durante 2, 4 ó 6 h. Los valores son media $\pm$ EEM de 4 experimentos llevados a cabo por triplicado. \*,  $p < 0,05$ , comparado con la viabilidad de las células en presencia de quinina. †,  $p < 0,05$ , comparado con la viabilidad de las células control (las células control fueron células transfectadas con el vector vacío (3.1) e incubadas con DMSO).

Para comprobar que el efecto observado era debido al transporte de OCT1, utilizamos la quinina como inhibidor de este transportador, a una concentración de 250  $\mu\text{M}$  (que elegimos en base a datos previos sobre inhibición de transporte de OCT1 mediado por este compuesto). Como se observa en la figura 38, en las situaciones en las que la presencia de OCT1 otorgaba sensibilidad al Bامت-UD2, al añadir la quinina se perdía la sensibilidad celular a este fármaco y por tanto la viabilidad del cultivo era mayor.

#### 4.2.11. Incorporación de platino en células transfectadas con OCT1 o con Asbt

A continuación quisimos determinar la captación de Bامت-UD2 o cisplatino en células transfectadas con Asbt o con OCT1 comparadas con las transfectadas con el vector vacío. Dos días tras la transfección las células se incubaron durante 1 h con el cisplatino o el Bامت-UD2 y a continuación, se procesó una alícuota para determinar Pt por espectrofotometría de absorción atómica y otra para cuantificar la concentración de proteínas. La figura 39 muestra el contenido en Pt corregido por cantidad de proteínas. Observamos que las células Alexander transfectadas con el vector vacío captaban más Bامت-UD2 que cisplatino, probablemente debido a que por su origen hepatocitario presenten algún transportador de ácidos biliares activo. La transfección de las células con Asbt o con OCT1 no afectó a la captación de cisplatino, sin embargo, en ambos casos se produjo un aumento significativo en la captación de Bامت-UD2.



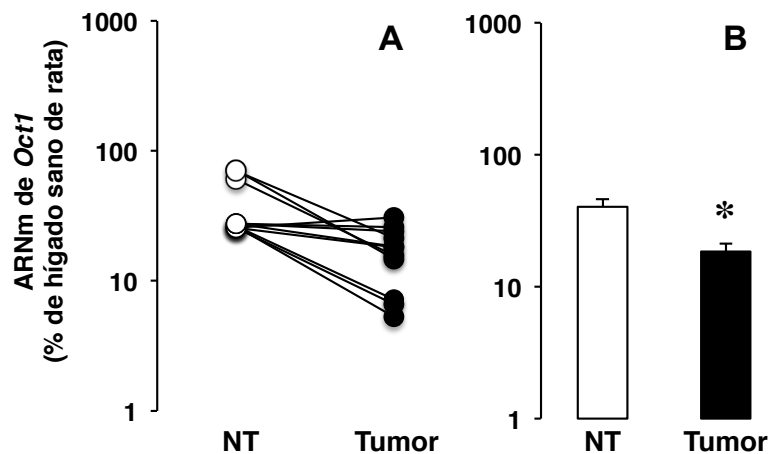
**Figura 39:** Contenido en platino determinado por espectrometría de absorción atómica en células transfectadas con Asbt, OCT1 o el vector vacío (3.1) e incubadas durante 60 min con 50  $\mu\text{M}$  de Bامت-UD2 o cisplatino. Los valores son media $\pm$ EEM de 3 experimentos realizados por triplicado. \*,  $p < 0,05$  comparado con el grupo de cisplatino. †,  $p < 0,05$  comparado con las células transfectadas con el vector vacío.

Estos resultados demuestran que los Bamets podrían entrar en las células colangiulares utilizando al menos dos tipos de proteínas transportadoras presentes en estas células.

En estudios recientes hemos encontrado que la expresión de OCT1 en biopsias de tumores hepáticos, tanto en CGC como en HCC, suele estar disminuida en comparación con la expresión presentada por el hígado sano (Martinez-Becerra *et al.*, 2012), lo que se ha asociado con la resistencia a la quimioterapia en estos tumores. Aunque de modo general se detectó una reducción de la expresión de OCT1, se apreció una gran variabilidad interindividual en cuanto a la expresión de este transportador.

#### 4.2.12. Expresión de Oct1 en tumores de CGC de rata

Finalmente quisimos comprobar si esta misma tendencia en cuanto a la expresión de OCT1 también se mostraba en los CGCs de rata, determinamos los niveles de Oct1 por RT-PCR-Q en las muestras de tejido tumoral y no tumoral obtenido de las ratas tratadas con TAA durante 36 semanas. Como se observa en la figura 40A, los niveles de expresión de Oct1 en el tejido adyacente al tumor estaban disminuidos respecto al hígado sano, quizá porque ya comienza a ser un tejido dañado, mientras que la expresión en el tumor se reducía aún más. La figura 40B muestra que la expresión del gen *Slc22a1* disminuye en los tumores de manera significativa cuando se compara con el tejido no tumoral.



**Figura 40:** Niveles de expresión del ARNm de *Oct1* determinados por RT-PCR-Q en CGC de rata (n=18) y tejido adyacente no tumoral (n=8) representados como niveles de expresión en cada muestra (A) o como media de la expresión en el tejido tumoral y en tejido no tumoral (B). Los valores se expresan como media±EEM de la abundancia relativa respecto al calibrador (hígado control) y normalizados por los valores de ARNm de  $\beta$ -actina. NT: tejido pareado no tumoral. \*, p<0,05 comparado con el NT.



Por todo ello podemos decir que la presencia del transportador Asbt (que muestra una tendencia a aumentar su expresión en tumores colangiomaes) y del transportador OCT1 (aunque presenta unos niveles bajos/moderados) en las células colangiomaes tumorales, permite favorecer la entrada de derivados citostáticos de ácidos biliares frente a otros fármacos como el cisplatino. El hecho de que los Bamets puedan alcanzar el interior celular utilizando más de una proteína transportadora apoya con más fuerza la estrategia de vectorización a estos tumores tan poco sensibles a la quimioterapia disponible.



#### 4.3. PAPEL DE OCT1 EN LA RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL EN EL CÁNCER HEPÁTICO

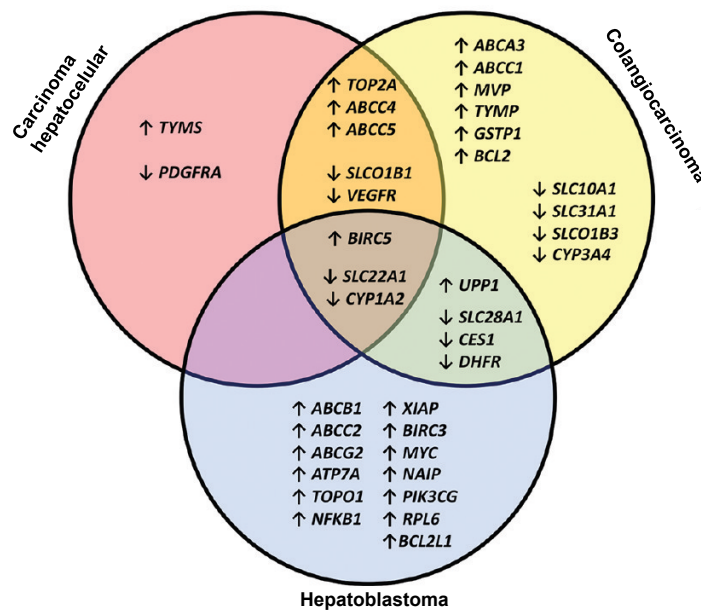
Como se ha comentado anteriormente, uno de los principales problemas actuales en la lucha contra el cáncer, incluido el cáncer hepático, es la aparición de resistencia al tratamiento farmacológico. En algunos casos, los tumores desarrollan resistencia a lo largo del proceso terapéutico, pero en muchas ocasiones el paciente no responde a la quimioterapia desde el comienzo del tratamiento. Esto se debe a que, generalmente, se aplican regímenes estándar por falta de conocimiento y/o de herramientas que permitan llevar a cabo una elección del tratamiento de forma individualizada para cada paciente. Por ello, es de gran importancia en la medicina actual identificar los mecanismos que determinan la falta de respuesta a cada tipo de fármaco, así como analizar el perfil genético de cada paciente en lo que se refiere a los mecanismos que pueden dar lugar a resistencia antes de iniciar el tratamiento, para seleccionar la terapia más adecuada en cada caso. Como se ha comentado en la Introducción de esta Tesis Doctoral los genes implicados en los mecanismos de quimiorresistencia (MOCs) en tumores hepáticos y gastrointestinales se han clasificado en cinco grupos (Marin *et al.*, 2010). Conocer los niveles de expresión de los genes implicados en cada uno de estos MOCs puede utilizarse para predecir la falta de respuesta a la quimioterapia antitumoral, y así, poder prevenir tanto el fracaso de los tratamientos con agentes antitumorales y sus efectos adversos, como evitar que se lleve a cabo la selección de células tumorales más quimiorresistentes.

En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio, se evaluó mediante tarjetas microfluídicas (TLDA) la expresión de los genes relacionados con la quimiorresistencia en tumores hepáticos (Martinez-Becerra *et al.*, 2012). Concretamente, se analizó la expresión de 93 genes (más 3 genes que se utilizaron como controles endógenos) en tumores de pacientes con HCC, CGC y HB que no habían recibido quimioterapia previamente, así como en muestras pareadas del tejido adyacente no tumoral.

En ese estudio se apreció una considerable heterogeneidad en la firma genética de cada tumor en cada paciente pero, analizando de modo conjunto los resultados obtenidos, se observó la existencia de tendencias comunes en cada tipo de tumor y entre los tres tipos de tumores (HCC, CGC y HB) en cuanto a la sobre-expresión o

represión de ciertos genes en comparación con los niveles del tejido pareado no tumoral.

El análisis conjunto de la expresión de los MOCs en los pacientes de HCC demostró cambios comunes en los niveles de expresión de 10 genes, y para los pacientes de CGC y HB se encontraron cambios en un mayor número de genes pertenecientes a los MOCs 1, 2, 3 y 5, todos ellos asociados con un incremento de la quimiorresistencia. La figura 41 muestra un esquema que resume los resultados obtenidos.



**Figura 41:** Esquema del perfil de expresión de los distintos genes implicados en los mecanismos de resistencia a la quimioterapia, en HCC, CGC y HB.

Como patrón común en los tres tipos de tumores se encontró un descenso en la expresión de los genes *SLC22A1* y *CYP1A2* (que codifican para el transportador de cationes orgánicos OCT1, y para la enzima CYP1A2, respectivamente), y la sobreexpresión del gen *BIRC5* (que codifica para la proteína anti-apoptótica survivina) (Figura 41).

En este trabajo de Tesis Doctoral decidimos centrarnos en el papel del gen *SLC22A1*, ya que el OCT1 es el principal transportador de cationes expresado en el hígado, y la caída de su expresión en tumores hepáticos puede ser un factor limitante en la respuesta a fármacos antitumorales de naturaleza catiónica.

Como se ha comentado en el apartado de Introducción, una de las estrategias más prometedoras en el tratamiento de los tumores hepáticos primarios es el uso de fármacos con actividad TKI, entre los que se encuentra el sorafenib (Nexavar®). Este

fármaco ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes con HCC, ya que es el único que parece aportar un beneficio neto aunque moderado para estos pacientes (Llovet *et al.*, 2008). Recientemente, varios ensayos han sugerido que también puede ser efectivo frente al CGC (Sugiyama *et al.*, 2011) (Huether *et al.*, 2007).

Por su naturaleza catiónica, los fármacos TKIs no pueden difundir a través de la membrana plasmática y deben ser transportados al interior celular por transportadores como el OCT1. De hecho, se ha descrito que la captación de imatinib depende de la expresión de OCT1 (Thomas *et al.*, 2004) (Minematsu *et al.*, 2011) y se ha propuesto que el grado de expresión de este transportador podría ser un marcador útil de la resistencia a la terapia basada en imatinib en pacientes con leucemia, ya que los pacientes con mayor nivel de expresión de OCT1 responden mejor a este fármaco (Wang *et al.*, 2008) (Nardinelli *et al.*, 2012).

Un estudio reciente propone que el OCT1 también podría ser responsable de la captación hepática del sorafenib (Swift B, 2010), sin embargo, mientras se estaba desarrollando esta Tesis Doctoral no existían datos concluyentes a este respecto, por lo que nos planteamos como **objetivo** de este tercer bloque determinar si el OCT1 podía estar implicado en la captación del sorafenib.

El modelo experimental elegido para responder a esta pregunta fue el de expresión heteróloga de proteínas transportadoras de membrana en oocitos de rana *Xenopus laevis*, que ha sido ampliamente utilizado por nuestro grupo para expresar proteínas implicadas en la captación de diversos compuestos endógenos y xenobióticos (Briz *et al.*, 2002).

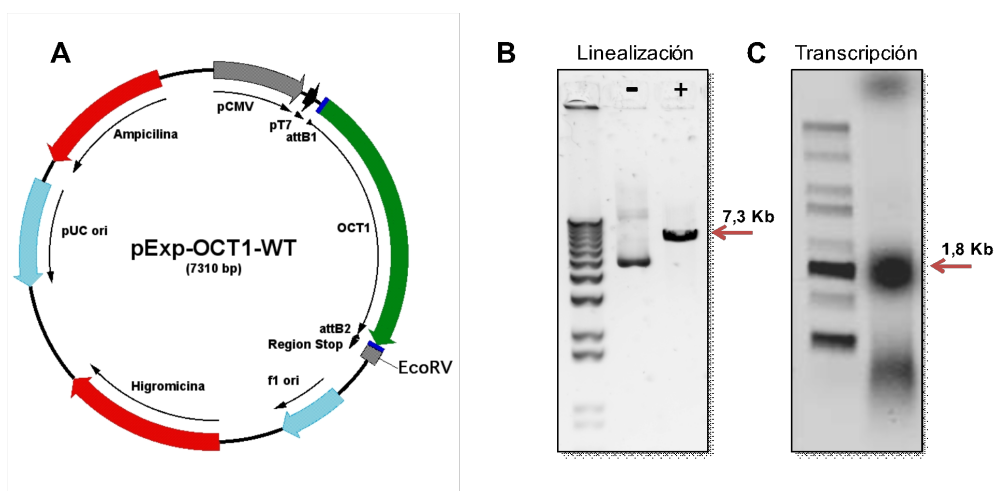
#### **4.3.1. Papel del transportador OCT1 en la captación de sorafenib**

Este modelo permite estudiar los requerimientos del transporte y la especificidad de sustrato del transportador objeto de estudio cuyo ARNm se inyecta en el oocito, así como el efecto inhibitor o estimulador de diferentes moléculas sobre el transporte. Una de las ventajas que presenta es que permite medir la cantidad de sustrato captado por un solo oocito y, debido a la disponibilidad de gran número de oocitos por animal, es posible realizar experimentos con un número elevado de éstos para cada punto experimental, lo que reduce la dispersión de los valores calculados y aumenta la fiabilidad de los resultados. Por todo ello, esta herramienta ha sido muy utilizada para investigar la funcionalidad de diferentes proteínas transportadoras (Schroeder *et al.*, 1998).

Para la síntesis *in vitro* del ARNm se partió de bacterias transformadas con el plásmido pExp-OCT1 (Figura 42A), que contenía la secuencia que codificaba la variante silvestre de la proteína transportadora OCT1 (OCT1-WT) humana (secuencia NM\_003057 de la base de datos GenBank).

Después de aislar suficiente cantidad de plásmido recombinante se realizó un estudio de restricción y se llevó a cabo la secuenciación del plásmido en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca, lo que permitió dar por válida la identificación de la secuencia insertada (datos no mostrados).

Para sintetizar el ARNm de OCT1 se requirió la linealización del plásmido con la enzima de restricción *EcoRV*. Como se observa en la figura 42B, la linealización fue completa, puesto que en el gel, que muestra los fragmentos obtenidos después de la linealización (calle 3) tras la separación electroforética apareció una única banda intensa del tamaño esperado correspondiente al plásmido cortado por la enzima.



**Figura 42.** (A) Esquema del plásmido pExp-OCT1-WT que contiene la secuencia silvestre del OCT1 orientada correctamente tras el promotor T7. Se indica el sitio de corte para la enzima de restricción *EcoRV*. (B) Electroforesis en gel de agarosa al 1% tras tinción con SYBR Safe de los productos del plásmido sin linealizar (-) y linealizado (+) con la enzima *EcoRV*. La primera calle del gel muestra el patrón de tamaños moleculares de ADN. (C) Electroforesis en gel de agarosa desnaturizante al 1% del ARN sintetizado para el OCT1-WT teñido con bromuro de etidio. La primera calle del gel muestra un patrón de tamaños moleculares de ARN.

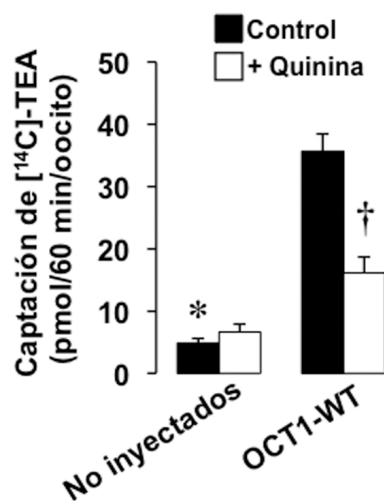
A continuación, para eliminar la endonucleasa de restricción del ADN molde, se realizó una extracción con una mezcla de fenol/cloroformo y, seguidamente, el material fue purificado mediante precipitación con etanol y acetato de amonio. Con el plásmido linealizado se realizó la transcripción *in vitro*. Los productos de la reacción de la

transcripción se separaron por electroforesis en un gel desnaturalizante de agarosa (figura 42C), y en todos los casos se apreció una banda intensa y definida del tamaño esperado: 1,8 Kb.

Para confirmar la funcionalidad de la proteína se realizaron experimentos de captación tras la inyección del ARNm de OCT1 en los oocitos.

Como se ha comentado anteriormente, los sustratos típicos del OCT1 son cationes de tipo I, entre los que se encuentran las sales de tetraalquilamonio como el tetraetilamonio, derivados de procainamida, la  $N^1$ -metilnicotinamida y el  $MPP^+$  (Gorboulev *et al.*, 1997) (van Montfoort *et al.*, 2001). Además, los cationes de tipo II inhiben la captación mediada por el OCT1, aunque la mayoría no son transportados (van Montfoort *et al.*, 2001).

Para validar que el sistema de expresión del OCT1 en oocitos era correcto, se eligió como sustrato para estos experimentos el tetraetilamonio (TEA) y como inhibidor la quinina. Además, para establecer cuál era el tiempo necesario tras la microinyección del ARNm para lograr la máxima expresión de la proteína en la membrana de los oocitos, se realizaron experimentos previos de captación a distintos tiempos (datos no mostrados), tras los cuales se eligió un tiempo post-inyección de 48 h para realizar los ensayos de captación ya que, en ese tiempo, se obtenía la máxima expresión de la proteína.

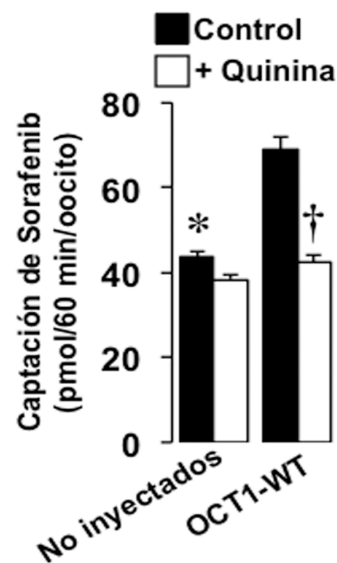


**Figura 43:** Captación de  $[^{14}C]$ -TEA en oocitos inyectados con el ARNm del OCT1-WT, o en oocitos no inyectados. Los oocitos se incubaron durante 1 h con  $500\mu M$  de  $[^{14}C]$ -TEA en presencia o ausencia de  $250\mu M$  de quinina. Los valores son media $\pm$ SD de 4 experimentos llevados a cabo por triplicado. \*,  $p<0,05$  comparado con el OCT1-WT. †,  $p<0,05$ , comparado con la captación en ausencia de quinina.

Como se observa en la figura 43, tras 1 h de incubación, la captación de [ $^{14}$ C]-TEA (500 $\mu$ M) por los oocitos inyectados con el ARNm de OCT1 fue 7 veces mayor que la de los oocitos no inyectados (utilizados como control negativo del experimento). Además, se comprobó que la captación mediada por OCT1 se reducía significativamente cuando se añadía quinina al medio de captación.

Estos datos indicaron que 48 h después de la inyección del ARNm de OCT1 en los oocitos, éstos expresaban la proteína en la membrana plasmática y ésta presentaba una funcionalidad adecuada para transportar sus sustratos.

Tras comprobar que el sistema de expresión heteróloga del OCT1 humano en oocitos de rana era funcional, utilizamos el modelo para estudiar la captación de sorafenib mediada por este transportador. Puesto que no disponíamos de sorafenib marcado radiactivamente, la detección de este compuesto se realizó por HPLC-MS-MS, siguiendo el procedimiento que se detalla en el apartado 3.18.7 de Material y Métodos.



**Figura 44:** Captación de sorafenib por oocitos inyectados con el ARNm del OCT1-WT, o en oocitos no inyectados. Los oocitos se incubaron durante 1 h con 50 $\mu$ M de sorafenib en presencia o ausencia de 250  $\mu$ M de quinina. Los valores son media $\pm$ SD de 4 experimentos llevados a cabo por triplicado. \*,  $p < 0,05$  comparado con el OCT1-WT. †,  $p < 0,05$ , comparado con la captación en ausencia de quinina.

Como se observa en la figura 44, tras 1 h de incubación, la captación de sorafenib (50  $\mu$ M) por los oocitos inyectados con el ARNm del OCT1-WT fue significativamente mayor que la de los no inyectados, que se utilizaron como control negativo. Además, se comprobó que la captación de sorafenib mediada por OCT1 se



inhibía por completo cuando se añadía al medio de captación una cantidad 5 veces superior de quinina.

Estos resultados confirman que el sorafenib es transportado por OCT1 y apoyan la hipótesis de que la bajada en los niveles de expresión de este transportador en los tumores hepáticos puede ser una razón que justifique la diferencia de las respuestas observadas en distintos pacientes tratados con este fármaco (Martinez-Becerra *et al.*, 2012).

Por otro lado, varios trabajos han descrito la existencia de variantes genéticas o SNPs (del inglés “single nucleotide polymorphisms”) (Leabman *et al.*, 2003) en el gen *SLC22A1*, y se ha sugerido que la existencia de variantes en genes codificantes de proteínas SLC podría contribuir, tanto a la considerable variabilidad interindividual existente en la captación de fármacos, como a la falta de sensibilidad a los sustratos transportados.

Con estos antecedentes nos planteamos como siguiente **objetivo** de esta Tesis Doctoral, investigar si la existencia de variantes en el gen *SLC22A1* podría contribuir a la quimiorresistencia del HCC y del CGC al sorafenib.

#### 4.3.2. Detección de variantes del transportador OCT1 en tumores hepáticos

El primer paso de este estudio fue buscar variantes genéticas del transportador OCT1 en biopsias de tumores hepáticos. Para ello, se llevó a cabo la secuenciación completa del ORF del gen *SLC22A1* en un grupo de biopsias, entre las que se incluían 12 procedentes de pacientes con HCC y 9 de pacientes con CGC con diferentes estadios de desarrollo tumoral, aunque la mayoría fueron incluidas en la categoría pT2 (tamaño/extensión medios del tumor primario) (ver Tabla MM-1 Anexo de Material y Métodos, página 95). También se analizó el tejido adyacente no tumoral, en los casos en los que se disponía de dicho material. Es importante señalar que todas las muestras analizadas procedían de pacientes que no habían recibido tratamiento quimioterapéutico previo.

De cada biopsia se obtuvo el ADNc del gen *SLC22A1*, se purificó el producto obtenido en un gel de agarosa y se secuenció el material obtenido, como se detalla en el apartado 3.11 de Material y Métodos.

Los electroferogramas se compararon con la secuencia descrita para el ORF del OCT1-WT (NM\_003057), lo que permitió detectar que en estos tumores estaban presentes algunas variantes genéticas previamente descritas en la literatura (Hayer *et al.*, 1999) (Sakata *et al.*, 2004) (Kerb *et al.*, 2002) (Shu *et al.*, 2003). Basándonos en los datos ya publicados clasificamos los SNPs como variantes sin efecto (o con poco efecto) cuando la mutación no altera, o altera mínimamente la funcionalidad del transportador, o variantes con efecto, donde se incluyen las mutaciones que alteran gravemente al transportador, imposibilitando su funcionalidad. Las Tablas 10 y 11 recogen las variantes detectadas en las muestras de HCC y CGC, respectivamente.

En las biopsias de este estudio encontramos:

- Variantes genéticas de OCT1 sin efecto o con poco efecto: Se detectaron las siguientes mutaciones “missense” y silenciosas: c.41C>T (S14F), c.156T>C (S52S), c.480G>C (L160F), c.1222A>G (M408V) y c.1258\_1260delATG (M420del) en biopsias de CGC y HCC (Tablas 10 y 11) y, además, en biopsias de HCC se encontró la mutación c.1380C>T (F460F). Todas ellas se caracterizan por introducir un cambio en la secuencia proteica (dos de ellas, S52S y F460F, son mutaciones silenciosas, en las que el cambio de base en la secuencia del gen no altera el aa resultante) que permite el funcionamiento normal del transportador, tal como se ha descrito en algunos trabajos en los que se evaluó *in vitro* la capacidad transportadora de cada una de estas variantes para el sustrato típico MPP<sup>+</sup>, o para el fármaco antidiabético metformina (Kerb *et al.*, 2002) (Shu *et al.*, 2003) (Shu *et al.*, 2008).

- Variantes genéticas de OCT1 con repercusión funcional: En las biopsias evaluadas también se detectaron algunos SNPs que, aunque son debidos al cambio en un sólo nucleótido de la secuencia, generan una modificación importante a nivel proteico e introducen un cambio elevado en la funcionalidad del transportador. En las biopsias de CGC (Tabla 11) se detectaron las variantes c.262T>C (C88R), c.566C>T (S189L), c.659G>T (G220V) y c.859C>G (R287G), y en los HCCs (Tabla 10) se detectaron las variantes c.181C>T (R61C) y c.262T>C (C88R). Estas mutaciones generan proteínas incapaces de transportar sustratos catiónicos típicos como el MPP<sup>+</sup>, TEA o metformina (Kerb *et al.*, 2002) (Shu *et al.*, 2003) (Shu *et al.*, 2008).

Se ha descrito que la pérdida de funcionalidad del transportador puede deberse a una alteración de la proteína que impida su correcta localización en la membrana plasmática, como es el caso de la mutación R61C (Shu *et al.*, 2008). Además se ha otorgado un papel particularmente importante a algunos residuos de glicina que están

evolutivamente conservados, y cuya mutación puede afectar seriamente a la funcionalidad del transportador, como es el caso de la sustitución de glicina por valina en la posición 220 de la secuencia proteica (Shu *et al.*, 2003), que puede ser responsable de la disminución de funcionalidad resultante para esta variante.

**Tabla 10.** Variantes genéticas presentes en la secuencia codificante del OCT1 en biopsias de carcinoma hepatocelular (HCC).

		ADN	Secuencia peptídica	HCC 1	HCC 2	HCC 3	HCC 4	HCC 5	HCC 6	HCC 7	HCC 8	HCC 9	HCC 10	HCC 11	HCC 12
Variantes previamente descritas	Con poco efecto	c.41C>T	p.Ser14Phe (S14F)										C/T		
		c.156T>C	p.Ser52Ser (S52S)		T/C	T/C	T/C	T/C	C/C		T/C	T/C	T/C	T/C	T/C
		c.480G>C	p.Leu160Phe (L160F)	C/C	G/C	G/C	G/C	G/C	C/C	C/C	G/C	G/C	G/C	G/C	G/C
		c.1222A>G	p.Met408Val (M408V)	G/G	A/G	A/G	A/G	A/G	G/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G
		c.1380C>T	p.Phe460Phe (F460F)			C/T									
	c.1258_1260delATG	p.Met420del (M420del)	W/M		W/M	W/M									W/M
	Con efecto	c.181C>T	p.Arg61Cys (R61C)		C/T			C/T					C/T		C/‡
		c.262T>C	p.Cys88Arg (C88R)		T/C	T/‡	T/‡								
	Nuevas variantes	c.181delCGinsT	p.Arg61Ser fs*10 (R61S fs*10)												W/M
		c.262delT	p.Cys88Ala fs*16 (C88A fs*16)			W/M	W/M								
c.589C>T		p.Pro197Ser (P197S)									C/T		C/T	C/T	

Las variantes genéticas fueron clasificadas según las consecuencias funcionales sobre la capacidad transportadora del OCT1. W, secuencia wild-type, M, secuencia mutada; ‡, presencia de diferentes variantes que afectan a la misma posición de la secuencia nucleotídica. Se han marcado sombreadas en gris las mutaciones inactivantes.

**Tabla 11.** Variantes genéticas presentes en la secuencia codificante del OCT1 en biopsias de colangiocarcinoma (CGC).

		ADN	Secuencia peptídica	CGC 1	CGC 2	CGC 3	CGC 4	CGC 5	CGC 6	CGC 7	CGC 8	CGC 9	
Variantes previamente descritas	Con poco efecto	c.41C>T	p.Ser14Phe (S14F)								C/T	C/T	C/T
		c.156T>C	p.Ser52Ser (S52S)		T/C		T/C					T/C	
		c.480G>C	p.Leu160Phe (L160F)	C/C			C/C	G/C	C/C	C/C		G/C	G/C
		c.1222A>G	p.Met408Val (M408V)	G/G	A/G	A/G						A/G	
		c.1258_1260delATG	p.Met420del (M420del)	M/M				W/M	M/M	M/M			W/M
	Con efecto	c.262T>C	p.Cys88Arg (C88R)									T/C	
		c.566C>T	p.Ser189Leu (S189L)									T/C	
		c.659G>T	p.Gly220Val (G220V)					G/T					
		c.859C>G	p.Arg287Gly (R287G)									C/G	
	Nuevas variantes	c.181delCGinsT	p.Arg61Ser fs*10 (R61S fs*10)			M/M		W/M					
c.589C>T		p.Pro197Ser (P197S)								C/T	C/T	C/T	

Las variantes genéticas fueron clasificadas según las consecuencias funcionales sobre la capacidad transportadora del OCT1. W, secuencia wild-type, M, secuencia mutada. Se han marcado sombreadas en gris las mutaciones inactivantes.

En este bloque de resultados hay que destacar que se detectaron por primera vez tres nuevas mutaciones que no habían sido previamente descritas. Así, en las biopsias de HCC se detectaron 3 nuevas mutaciones (Tabla 10): c.181delCGinsT (R61S fs\*10), c.262delT (C88A fs\*16) y c.589C>T (P197S), dos de las cuales

(c.181delCGinsT y c.589C>T) también estaban presentes en algunas biopsias de CGC (Tabla 11). Estas mutaciones se describirán detalladamente un poco más adelante.

La presencia de variantes de OCT1 también fue analizada en las muestras disponibles de tejido pareado no tumoral (5 muestras de tejido pareado de biopsias de HCC, y 6 pareadas de CGC). La frecuencia de aparición de SNPs en estas muestras fue mucho menor que la observada en el tejido tumoral (Tabla 12), y la mayoría de los SNPs detectados eran mutaciones sin efecto o con poco efecto. Ninguna de las nuevas variantes de OCT1 detectadas en los tumores estaba presente en el tejido pareado no tumoral.

**Tabla 12.** Variantes genéticas presentes en la secuencia codificante del OCT1 en muestras no tumorales de tejido pareado adyacente a muestras de carcinoma hepatocelular (HCC) y colangiocarcinoma (CGC).

		ADN	Secuencia peptídica	Par. HCC 1	Par. HCC 2	Par. HCC 3	Par. HCC 4	Par. HCC 5	Par. CGC 1	Par. CGC 2	Par. CGC 3	Par. CGC 4	Par. CGC 5	Par. CGC 6	
Variantes previamente descritas	Con poco efecto	c.41C>T	p.Ser14Phe (S14F)										C/T		
		c.156T>C	p.Ser52Ser (S52S)			T/C	T/C	T/C	T/C	T/C	T/C	T/C	T/C		
		c.480G>C	p.Leu160Phe (L160F)	C/C	C/C	G/C	G/C	G/C	C/C	G/C	C/C	C/C	G/C	C/C	
		c.1222A>G	p.Met408Val (M408V)	A/A	A/G	A/G	A/G	A/G	G/G	A/G	A/G	A/G	G/G	A/G	
		c.1380C>T	p.Phe460Phe (F460F)												
		c.1258_1260delATG	p.Met420del (M420del)	W/M		W/M				M/M			W/M		W/M
	Con efecto	c.181C>T	p.Arg61Cys (R61C)							C/T			C/T		
		c.262T>C	p.Cys88Arg (C88R)		T/C										
		c.566C>T	p.Ser189Leu (S189L)												
		c.659G>T	p.Gly220Val (G220V)												
		c.859C>G	p.Arg287Gly (R287G)												
	Nuevas variantes	c.181delCGinsT	p.Arg61Ser fs*10 (R61S fs*10)												
		c.262delT	p.Cys88Ala fs*16 (C88A fs*16)												
		c.589C>T	p.Pro197Ser (P197S)												

Las variantes genéticas fueron clasificadas según las consecuencias funcionales sobre la capacidad transportadora del OCT1. W, secuencia wild-type, M, secuencia mutada. Par. HCC, tejido no tumoral pareado adyacente a muestras de carcinoma hepatocelular (HCC). Par. CGC, tejido no tumoral pareado adyacente a muestras de colangiocarcinoma (CGC). Se han marcado sombreadas en gris las mutaciones inactivantes.

En algunas muestras, en las posiciones donde aparecían los SNPs encontramos sólo la secuencia para la mutación (Tablas 10 y 11), lo que sugiere homocigosidad y homogeneidad tisular con respecto a las células que expresan OCT1. Sin embargo, en otros casos en la misma posición se detectaba tanto la secuencia con la mutación como la secuencia silvestre (Tablas 10 y 11), lo que puede reflejar heterocigosidad y/o presencia en la muestra de una población celular heterogénea en cuanto a la expresión de OCT1.

En la tabla 13 se resume la información de los SNPs encontrados en las biopsias analizadas y se detalla en qué exón se encuentra la mutación, la posición o dominio de la proteína que ocupa el residuo afectado en cada caso, así como la frecuencia alélica menor (MAF) que representa la frecuencia de aparición del alelo menos común.

**Tabla 13.** Definición, nomenclatura y frecuencia alélica de las variantes genéticas del gen *SLC22A1*.

Variación de aminoácido	Dominio de la proteína	Localización en el gen	Variación de nucleótido	Referencia del SNP	Frecuencia del alelo menor (MAF)	
Ser14Phe	S14F	Extremo N-terminal	Exón 1	c.41C>T	rs34447885	T = 0,5% <sup>a</sup>
Ser52Ser	S52S	Lazo extracelular grande	Exón 1	c.156T>C	rs1867351	C = 28,5% <sup>a</sup>
Arg61Cys	R61C	Lazo extracelular grande	Exón 1	c.181C>T	rs12208357	T = 2,7% <sup>a</sup>
Arg61Ser fs*10	<u>R61S fs*10</u>	Lazo extracelular grande	Exón 1	c.181delCGinsT	Nueva mutación	Desconocida
Cys88Arg	C88R	Lazo extracelular grande	Exón 1	c.262T>C	rs55918055	C = 0,1% <sup>a</sup>
Cys88Ala fs*16	<u>C88A fs*16</u>	Lazo extracelular grande	Exón 1	c.262delT	Nueva mutación	Desconocida
Leu160Phe	L160F	Dominio transmembrana 2	Exón 2	c.480G>C	rs683369	G = 12,9% <sup>a</sup>
Ser189Leu	S189L	Dominio transmembrana 3	Exón 3	c.566C>T	rs34104736	T = 0,1% <sup>a</sup>
Pro197Ser	<u>P197S</u>	Dominio transmembrana 3	Exón 3	c.589C>T	Nueva mutación	Desconocida
Gly220Val	G220V	Dominio transmembrana 4	Exón 3	c.659G>T	rs36103319	T = 0,1% <sup>a</sup>
Arg287Gly	R287G	Lazo citosólico grande	Exón 5	c.859C>G	rs4646278	G < 0,1% <sup>b</sup>
Gly401Ser	G401S	Lazo citosólico 4	Exón 7	c.1201G>A	rs34130495	A = 0,9% <sup>a</sup>
Met408Val	M408V	Dominio transmembrana 9	Exón 7	c.1222A>G	rs628031	A = 30,2% <sup>a</sup>
Met420del	M420del	Dominio transmembrana 9	Exón 7	c.1258_1260delATG	rs202220802	del = 12,1% <sup>a</sup>
Phe460Phe	F460F	Lazo citosólico 5	Exón 8	c.1380C>T	rs141274044	T < 0,1% <sup>b</sup>
Gly465Arg	G465R	Dominio transmembrana 11	Exón 9	c.1393G>C	rs34059508	C < 0,1% <sup>b</sup>

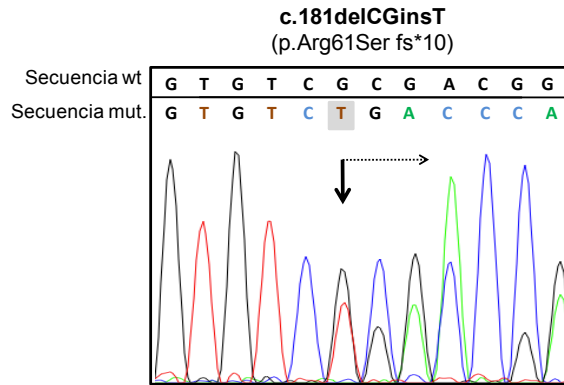
MAF representa la frecuencia de aparición del alelo menos común en una determinada población. Los datos de MAF se obtuvieron de las bases de datos NCBI SNP <sup>(a)</sup> (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) y Ensembl <sup>(b)</sup> ([www.ensembl.org/](http://www.ensembl.org/)). La posición de los nucleótidos se refiere al ORF del OCT1 silvestre (NM\_003057). La posición de los aminoácidos se refiere a la secuencia de referencia NP\_003048.

#### 4.3.3. Nuevas variantes genéticas del OCT1 detectadas en biopsias de pacientes de HCC y CGC

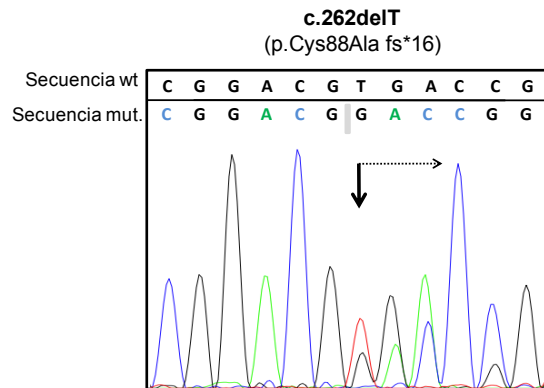
En cuanto a los 3 nuevos SNPs que no se habían descrito con anterioridad, el primero de ellos se localizaba en la posición 181 y se trataba de una delección de una citosina y una guanina acompañada de la inserción de una timina (c.181delCGinsT). Esta mutación “non sense” fue detectada en biopsias de HCC y CGC. La figura 45 muestra un electroferograma representativo de esta mutación detectada en una de las biopsias que portaba, tanto la secuencia mutada, como la silvestre. La delección de dos bases (CG) y la inserción de otra (T) provoca un desplazamiento en el marco de lectura. Este desfase en la secuencia originaba la generación de un codón STOP prematuro localizado 30 nucleótidos más abajo del codón mutado en dirección 5'-3'.

La presencia de este codón STOP prematuro hace que la proteína codificada por esta secuencia sea una proteína truncada, con una longitud mucho menor de la que tiene la proteína silvestre (71 aa frente a 554 aa), de hecho esta variante de OCT1 genera la secuencia peptídica R61S fs\*10, ya que además de la sustitución de la arginina de la posición 61 por una serina, la proteína acaba 10 aa después.

Otra de las nuevas variantes encontradas fue la mutación “nonsense” c.262delT, que fue detectada sólo en algunas biopsias de HCC.



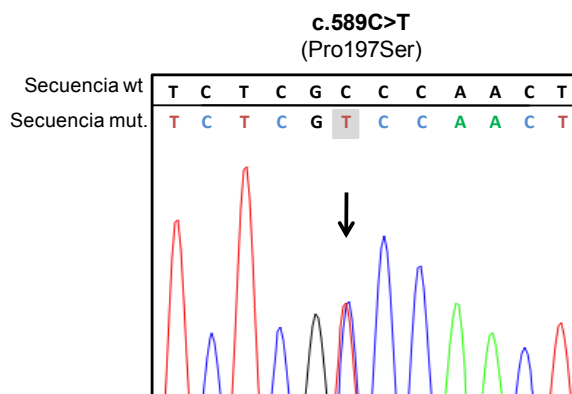
**Figura 45:** Electroferograma representativo del SNP c.181delCGinsT. En la parte superior se indica el cambio en la secuencia nucleotídica, y entre paréntesis el cambio ocasionado en la secuencia proteica. Secuencia silvestre (wt); secuencia mutada (mut).



**Figura 46:** Electroferograma representativo del SNP c.262delT. En la parte superior se indica el cambio en la secuencia nucleotídica, y entre paréntesis el cambio ocasionado en la secuencia proteica. Secuencia silvestre (wt); secuencia mutada (mut).

Como se aprecia en el electroferograma de la figura 46, la delección de la timina generaba un desplazamiento en el marco de lectura que, al igual que sucedía para la mutación c.181delCGinsT, ocasionaba la aparición de un codón STOP prematuro, formándose una proteína truncada, c.Cys88Ala fs\*16, de menor longitud que la silvestre (104 aa frente 554 aa).

La tercera de las nuevas mutaciones fue la c.589C>T, que se detectó tanto en biopsias de HCC como de CGC. En el electroferograma representativo que se muestra en la figura 47 se ilustra el cambio de base en una biopsia que portaba tanto la secuencia con la mutación, como la secuencia silvestre. A nivel proteico, esta mutación neutra o conservativa originaba una proteína de longitud correcta, pero con el cambio del aa prolina por una serina en la posición 197.



**Figura 47:** Electroferograma representativo del SNP c.589C>T. En la parte superior se indica el cambio en la secuencia nucleotídica, y entre paréntesis el cambio ocasionado en la secuencia proteica. Secuencia silvestre (wt); secuencia mutada (mut).

Como se comentó anteriormente ninguna de las nuevas mutaciones fue detectada en las muestras de tejido pareado no tumoral (Tabla 12).

Con objeto de simplificar la presentación de los resultados, de ahora en adelante, nos referiremos a las mutaciones haciendo referencia al cambio de aa que producen y utilizando la nomenclatura de una sola letra, en lugar de utilizar la nomenclatura que hace referencia al cambio de nucleótido en la posición del gen afectada por el SNP. Además, los 3 nuevos SNPs detectados en nuestro estudio aparecerán subrayados.

Además de la presencia de mutaciones puntuales o SNPs, en el análisis de los electroferogramas se detectó la presencia de otras variantes del gen *SLC22A1*, que podían ser debidas a un procesamiento o “splicing” alternativo.

#### 4.3.4. Búsqueda de variantes de OCT1 generadas por un “splicing” alternativo

El proceso de edición o “splicing” post-transcripcional que se produce tras la síntesis del ARNm primario puede generar varias formas de ARNm maduro. En varios trabajos se ha descrito la presencia de isoformas del OCT1 humano generadas por un “splicing” alternativo debido a la escisión de exones o a la retención de secuencias intrónicas del transcrito primario, como son las variantes del OCT1 con escisión del exón 9, con escisión conjunta de los exones 9 y 10, o de los exones 7 y 10 (Hayer *et al.*, 1999), y la variante c.1276+1insGTAAGTTG, en la que un fragmento de 8 pb del intrón 7 se inserta entre los exones 7 y 8 (Tarasova *et al.*, 2012) (Figuras 48A y 48B). También se ha descrito la expresión en riñón de rata de una isoforma del Oct1 que,

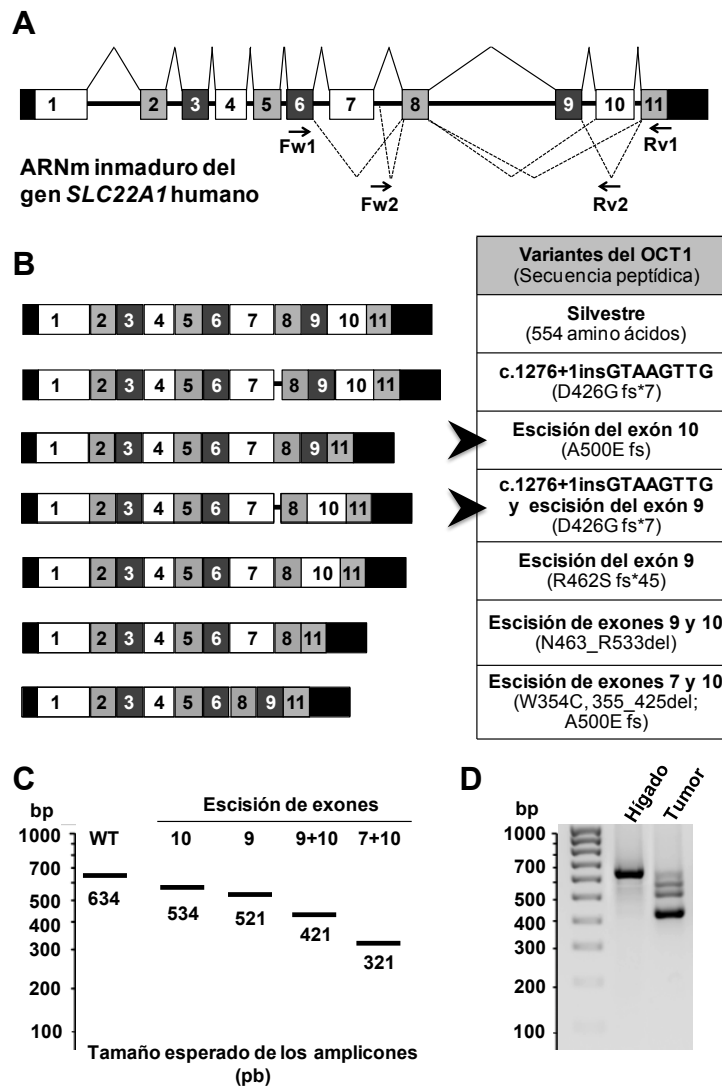
debido a un “splicing” alternativo, ha perdido el exón 2, y como consecuencia genera una proteína truncada que carece de los dos primeros segmentos transmembrana y el lazo extracelular grande (Zhang *et al.*, 1997).

Las variantes descritas del OCT1 humano producen proteínas truncadas que carecen de dos o más TMD y que no son funcionales cuando se han expresado en la línea celular embrionaria de riñón humano HEK293 (Hayer *et al.*, 1999). Todas estas isoformas se han detectado en células tumorales de glioma (Hayer *et al.*, 1999), pero sólo la variante WT y la producida por escisión del exón 9 se expresan en hígado humano sano (Hayer *et al.*, 1999) (Tarasova *et al.*, 2012).

En la primera etapa del estudio en la que se llevó a cabo la secuenciación del ORF del OCT1 en muestras de HCC y CGC, el análisis de los datos mostró la presencia en algunos tumores de variantes generadas por “splicing” alternativo. Se detectaron las variantes con pérdida del exón 9, con pérdida conjunta de los exones 9 y 10, y la variante c.1276+1insGTAAGTTG, que se representan en la figura 48B. Además, encontramos otras variantes que no habían sido descritas hasta el momento, como la generada por la escisión del exón 10 y la variante c.1276+1insGTAAGTTG combinada con la pérdida del exón 9 (Figura 48B). El hecho de que en un mismo tejido se expresaran varias isoformas de OCT1 generadas por “splicing” alternativo, así como la presencia de otras mutaciones en la secuencia del OCT1, dificultaba el análisis de los electroferogramas procedentes de la secuenciación, ya que en la mayoría de los casos había un solapamiento de los picos de fluorescencia. Por ello, desarrollamos una estrategia diferente para analizar la presencia de variantes de OCT1 debidas a “splicing” alternativo del ARNm, que denominamos variantes cortas del OCT1.

El siguiente paso fue poner a punto un método de PCR analítica para detectar la expresión de estas variantes cortas del OCT1 de manera más apropiada y rápida, que nos permitiera llevar a cabo el estudio de un mayor número de muestras en un solo análisis. Se diseñaron los oligonucleótidos Fw1 y Rv1, que anillaban en regiones específicas situadas en los exones 6 y 11, que son compartidas por todas las variantes (Figura 48A). La presencia y el tamaño de los amplicones producidos por la PCR correspondientes a las diferentes variantes del OCT1 se determinaron en geles de agarosa tras electroforesis.





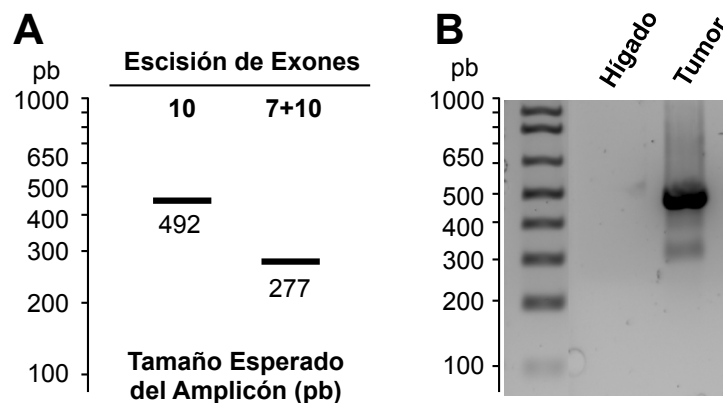
**Figura 48.** (A) Estructura del ARNm inmaduro del gen *SLC22A1* en la que se representan los exones (recuadros), los intrones (líneas horizontales) y las regiones 5' y 3' UTR (extremos en recuadro negro). Las líneas que unen los exones situadas en la parte superior indican el procesamiento normal del ARNm y las líneas punteadas indican los posibles mecanismos de "splicing" alternativo que generan una pérdida de exones o la retención de secuencias intrónicas. Se representa también la posición de anillamiento de los "primers" utilizados para la detección de las variantes del OCT1. (B) Esquema de las variantes encontradas en HCC y CGC. (C) Tamaño de los amplicones de las variantes con escisión de exones tras la PCR realizada con los "primers" Fw1 y Rv1. (D) Gel de agarosa tras la PCR realizada con ADNc de muestras representativas de hígado sano y de CGC.

En la figura 48C se muestra el tamaño de las bandas que se deben observar tras la electroforesis en gel de agarosa según el amplicón generado tras la PCR y la figura 48D muestra un gel representativo tras la electroforesis del producto de PCR utilizando como molde ADNc de una muestra de tejido hepático sano y otra de CGC. El amplicón de mayor tamaño que aparece en ambas muestras correspondió al de la isoforma OCT1-WT. En el tejido tumoral también se observó la expresión de las variantes que

habían perdido el exón 9, el exón 10 o ambos, mientras que en esta muestra representativa no se encontró la expresión de la isoforma generada por la escisión de los exones 7 y 10.

Además de las variantes ya caracterizadas, detectamos en varias muestras de HCC y CGC la expresión de una nueva variante del OCT1 generada por la escisión del exón 10, que hasta ahora no había sido descrita. Para confirmar de un modo más selectivo la presencia de esta variante corta, se diseñó un oligonucleótido específico para su detección por PCR. El “primer” Rv2 anillaba a caballo de los exones 9 y 11 (Figura 48A), de manera que sólo habría unión específica de este “primer” cuando estuvieran presentes las isoformas con pérdida del exón 10, pero no del 9 o de ambos. En la figura 49 se representan los tamaños de los amplicones tras una PCR con los oligonucleótidos Fw1 y Rv2 y los fragmentos en un gel tras una PCR realizada con ADNc molde de una muestra representativa de HCC y otra de tejido sano. El amplicón de mayor tamaño que aparece en la muestra tumoral correspondió al de la isoforma con escisión del exón 10. También se observó, aunque más débil, la expresión de la variante con pérdida conjunta de los exones 7 y 10.

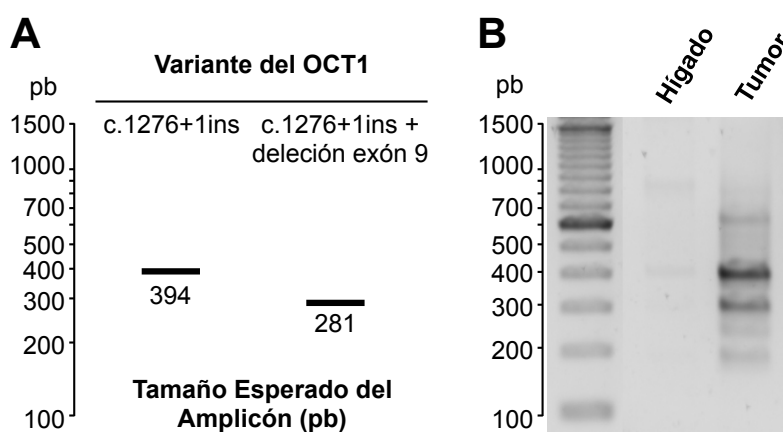
Por tanto, este método de PCR específico para la detección de la delección del exón 10 que hemos puesto a punto, sirvió para confirmar los resultados obtenidos de la expresión de las diferentes isoformas con la PCR llevada a cabo con los oligonucleótidos Fw1 y Rv1.



**Figura 49.** (A) Tamaño esperado de los amplicones tras la PCR realizada utilizando los “primers” Fw1 y Rv2. (B) Gel de agarosa representativo tras la PCR realizada con los “primers” Fw1 y Rv2 y el ADNc molde de una muestra de hígado sano y de HCC.

La variante c.1276+1insGTAAGTTG se genera por un error de “splicing” del ARNm que retiene un fragmento de 8 pb del intrón 7 entre los exones 7 y 8. Debido al

pequeño tamaño del inserto, no era posible distinguir el tamaño del amplicón correspondiente a esta variante y el de la silvestre. Lo mismo ocurrió en el caso de los amplicones de la nueva variante c.1276+1insGTAAGTTG combinada con pérdida del exón 9 comparado con el de la variante que solo había perdido ese exón. Para detectar la expresión de estas variantes se diseñó el oligonucleótido Fw2, cuya secuencia anillaba específicamente entre el exón 7, el fragmento GTAAGTTG del intrón 7 y el exón 8.



**Figura 50.** (A) Tamaño esperado de los amplicones tras la PCR realizada utilizando los “primers” Fw2 y Rv1. (B) Gel de agarosa representativo tras PCR realizada con los “primers” Fw2 y Rv1 y el ADNc molde de una muestra de hígado sano y de HCC.

Se realizó una PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos Fw2 y Rv1. El tamaño esperado de los amplicones generados con esta combinación de “primers” se ilustra en la figura 50A, y como se puede observar en la figura 50B la muestra tumoral, pero no el tejido sano, expresaba ambas variantes del OCT1.

Utilizando los métodos de PCR analítica puestos a punto, y de forma complementaria a la secuenciación que habíamos realizado previamente, encontramos que de las variantes de “splicing” descritas, las más frecuentes fueron la delección del exón 9 y la delección de los exones 9 y 10, tanto en CGCs como en HCCs. Respecto a las nuevas variantes, encontramos que la delección 10 estaba presente en aproximadamente un 40% de las muestras tumorales analizadas.

Generalmente, se considera que las variantes de “splicing” generan proteínas truncadas que no son funcionales (Hayer *et al.*, 1999). Esto se apoya en trabajos que han demostrado la importancia del mantenimiento estructural de los 12 TMDs en proteínas transportadoras, ya que los cambios en la región carboxilo-terminal, con

pérdida de dos o más TMD, alteran la función transportadora debido al fallo en la localización de membrana plasmática (Burton *et al.*, 1998) (Porzgen *et al.*, 1998). Además, se ha descrito que la variante con la inserción intrónica c.1276+1insGTAAGTTG forma una proteína truncada, que se ha relacionado con una peor respuesta en pacientes tratados con metformina, probablemente por una reducción en la captación hepática del fármaco (Tarasova *et al.*, 2012).

Tras considerar por tanto las variantes cortas de OCT1 no funcionales, el siguiente **objetivo** de este bloque de resultados fue caracterizar la capacidad transportadora de las mutaciones debidas a SNPs en el ORF del OCT1.

#### **4.3.5. Capacidad transportadora de las variantes de OCT1**

Para determinar la capacidad de transporte de las diferentes variantes de OCT1 detectadas en tumores de HCC y CGC, utilizamos el modelo de transfección transitoria en líneas celulares.

En primer lugar, clonamos la secuencia del OCT1-WT y, a continuación, llevamos a cabo las manipulaciones necesarias sobre el vector de expresión que contenía la secuencia codificante del OCT1-WT (Figura 42A) para generar el ORF mutado de interés por mutagénesis dirigida. Seguidamente, se transfectaron transitoriamente líneas celulares de HCC (Alexander y Sk-Hep-1) y CGC (TKF1) humano, que tenían una expresión muy baja del OCT1 endógeno, menor del 0,1% respecto a hígado sano, con los plásmidos que contenían algunas de las variantes detectadas en los tumores. De los SNPs encontrados en HCC y CGC excluimos las mutaciones silenciosas y aquellas que según trabajos ya publicados no afectaban a la función del transportador como la M408V (Shikata *et al.*, 2007) y la M420del (Shu *et al.*, 2003) (Kerb *et al.*, 2002).

La variante L160F también fue incluida en el estudio, ya que existían datos interesantes sobre su capacidad de transporte. Por un lado, un estudio había descrito que es capaz de transportar metformina ya que los pacientes con esta variante respondían al tratamiento (Shikata *et al.*, 2007). Además, otro estudio relacionó la presencia de esta variante con la sensibilidad al imatinib, puesto que los pacientes con leucemia mieloide crónica que presentaban el aa correspondiente a la forma silvestre para esta posición tenían peor respuesta al imatinib que los que portaban dicho SNP (Kim *et al.*, 2009). También incluimos la variante S14F porque existía cierta controversia sobre su capacidad de transporte, ya que se ha encontrado un aumento y

una disminución de la función transportadora de este SNP en función del sustrato a transportar (Shu *et al.*, 2003) (Shu *et al.*, 2008).

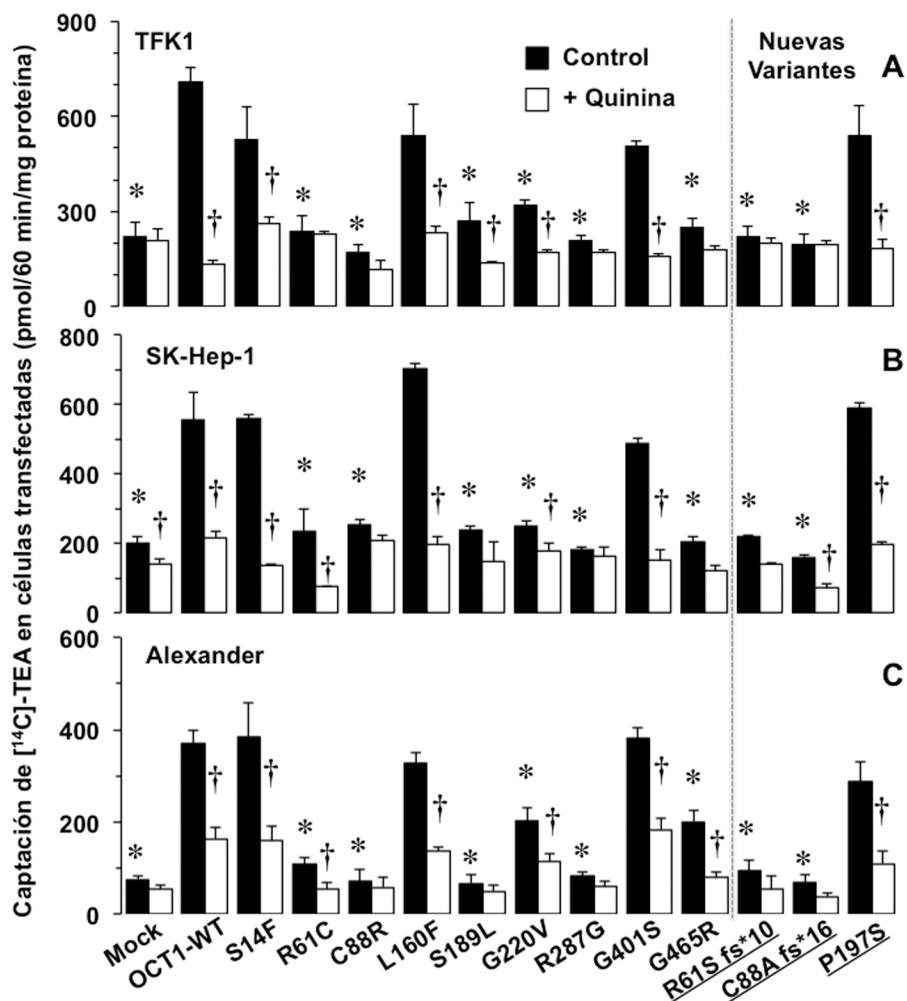
Además, incluimos en este estudio otros dos SNPs (G401S y G465R) que aunque no fueron detectados en las biopsias analizadas, nos pareció interesante evaluar ya que varios trabajos las relacionan con una menor captación de MPP<sup>+</sup> (Shu *et al.*, 2003) y de metformina (Shu *et al.*, 2008).

Para empezar, realizamos experimentos previos de puesta a punto de las condiciones experimentales, determinando la captación en células transfectadas a distintos tiempos (datos no mostrados). En base a ellos, decidimos realizar los experimentos dos días después de la transfección, ya que a este tiempo se obtenía la máxima captación. De nuevo, utilizamos como sustrato TEA y como inhibidor quinina. La concentración de TEA en las células Alexander fue 50  $\mu$ M y en el caso de las células TFK1 y SK-Hep1 se aumentó a 150  $\mu$ M, ya que la eficacia de la transfección en estas dos líneas celulares fue menor a la que se conseguía con las células Alexander. En todos los casos la concentración de quinina utilizada fue de 250  $\mu$ M, y el tiempo de incubación en presencia del sustrato fue de 1 h.

Como cabía esperar, las células transfectadas con el OCT1-WT mostraron una elevada captación de TEA (Figura 51) comparada con los niveles observados para el control negativo de células transfectadas con el vector vacío (Mock) y además, la captación fue inhibida por la presencia de quinina. Las figuras 51A, 51B y 51C muestran la captación observada en las líneas celulares TFK1, SK-Hep-1 y Alexander, respectivamente, transfectadas con cada variante del OCT1 y comparadas con OCT1-WT y las células Mock.

En cuanto a la funcionalidad de las mutaciones previamente descritas, los SNPs S14F, L160F y G401S mostraron unos niveles de captación de TEA similares a los observados para el OCT1-WT, que se veían inhibidos en presencia de quinina. Las otras variantes mostraron un descenso parcial o una pérdida total de la captación. Las variantes C88R, S189L y R287G mostraron una abolición total de la capacidad de captación de TEA en las dos líneas de HCC ensayadas, mientras que en las células TFK1 derivadas de CGC el SNP S189L mostró una reducida pero no totalmente impedida captación de TEA. Un resultado similar se encontró para el SNP G465R, que mostró en células Alexander unos niveles de captación de TEA reducidos mientras que presentaba una pérdida total de la capacidad de captación en las células TFK1 y SK-Hep-1. Estas pequeñas discrepancias pueden ser debidas a que el procesamiento

y “targeting” a la membrana plasmática en cada línea celular puede ser diferente. Otros trabajos han descrito que las variantes G401S y G465R son SNPs que otorgan una pérdida de funcionalidad cuando son transfectadas en células MDCK (Shu *et al.*, 2004). Sin embargo, en nuestros experimentos la variante G401S no afectó a la captación de TEA, y la variante G465R redujo o anuló el transporte de TEA dependiendo de la línea celular.



**Figura 51.** Captación de tetraetilamonio (TEA) en células TFK1 (A), SK-Hep-1 (B) y Alexander (C). Dos días después de la transfección las células fueron incubadas con 150  $\mu$ M (A y B) o 50  $\mu$ M (C) de [ $^{14}$ C]-TEA en presencia o ausencia de 250  $\mu$ M de quinina durante 1 h a 37°C. Los valores corresponden a la media $\pm$ SD de 4 experimentos realizados por triplicado. \*,  $p < 0,05$ , comparado con el OCT1-WT. †,  $p < 0,05$ , comparado con la captación en ausencia de quinina.

Respecto a la funcionalidad de las nuevas variantes descritas, observamos que los SNP R61S fs\*10 y C88A fs\*16 anulaban el transporte de TEA en las 3 líneas celulares ensayadas. Aunque en las células SK-Hep-1 el SNP C88A fs\*16 mostró una inhibición significativa del transporte de TEA en presencia de quinina del mismo modo

que ocurría en el grupo control (Mock). Ese efecto se achacó a la posible presencia de otro transportador de cationes endógeno que pudiese captar (aunque en menor medida) TEA de manera inhibible por quinina. Sin embargo, el SNP P197S mantenía la capacidad transportadora de la variante silvestre, y en las 3 líneas celulares se observó una elevada captación de TEA, de magnitud similar a la observada para el OCT1-WT, que fue inhibible por quinina en todos los casos. Estos datos apoyaban la hipótesis inicial que sugería que las variantes R61S fs\*10 y C88A fs\*16, que daban lugar a proteínas truncadas no eran funcionales. Mientras que el SNP P197S podría mantener una funcionalidad similar a la mostrada por el OCT1-WT, al menos en base a la captación de un catión típico como el TEA, probablemente porque la mutación introduce una sustitución conservativa entre dos aa neutros.

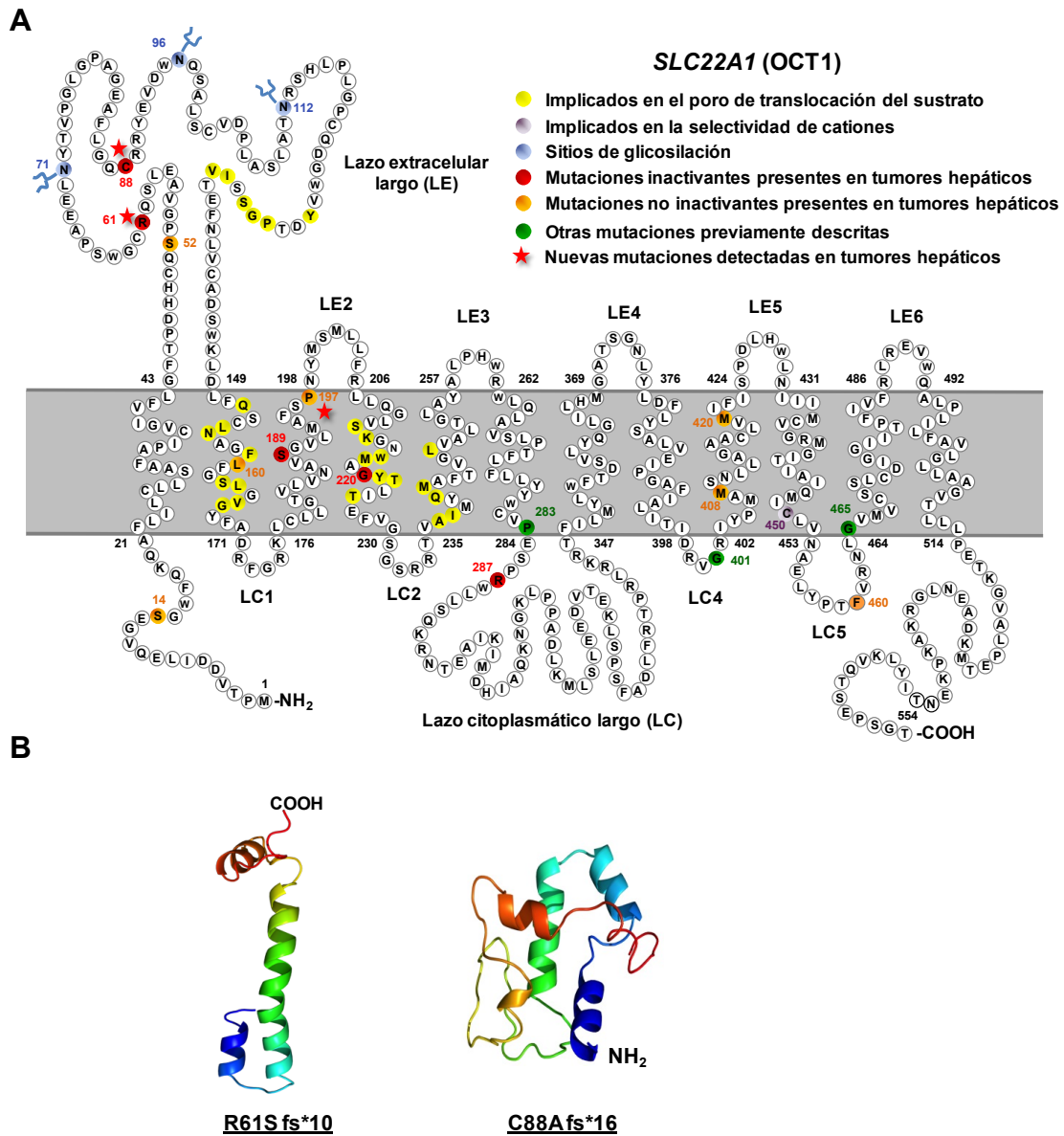
#### 4.3.6. Consecuencias estructurales de las nuevas variantes genéticas de OCT1

El siguiente paso de nuestro estudio fue investigar las consecuencias estructurales de las nuevas variantes detectadas en tumores de HCC y CGC. La figura 52<sup>a</sup> muestra la estructura secundaria del transportador según un modelo informático de predicción de la estructura de proteínas, en la que se detalla la localización de los residuos afectados en cada mutación.

Como se puede observar, para las nuevas mutaciones detectadas, las variantes R61S fs\*10 y C88A fs\*16 se localizaban en el lazo extracelular largo y, debido a que introducen un codón de parada prematuro, darían lugar a la formación de un segmento pequeño con un único TMD. En la figura 52B se muestra la estructura terciaria teórica obtenida para estas dos variantes R61S fs\*10 y C88A fs\*16, ambas generan proteínas truncadas de una longitud mucho menor a la que presenta la forma silvestre.

La mutación P197S sólo afectaba al aa de la posición 197, localizado al final del tercer TMD, por lo que el modelo tridimensional que se puede predecir para este SNP es muy similar al obtenido para la proteína silvestre.

A continuación, decidimos investigar si la falta de funcionalidad observada para algunos de los SNPs se debía a un fallo en la inserción de la proteína en la membrana plasmática.



**Figura 52:** Consecuencias estructurales de las variantes genéticas del OCT1. (A) Modelo bidimensional de la secuencia de aminoácidos de la proteína, en la que se marcan los residuos de interés para la proteína silvestre, y los aminoácidos afectados por distintas variantes. (B) Estructura terciaria de la proteína basada en modelos de predicción, para las mutaciones R61S fs\*10 y C88A fs\*16.

#### 4.3.7. Localización subcelular de las variantes genéticas de OCT1

Para conocer la localización subcelular de las nuevas variantes de OCT1 detectadas en esta Tesis Doctoral, utilizamos células Alexander que se transfectaron transitoriamente con los plásmidos generados que contenían las secuencias de las distintas variantes a estudiar y que además se etiquetaron con el epítipo V5. La

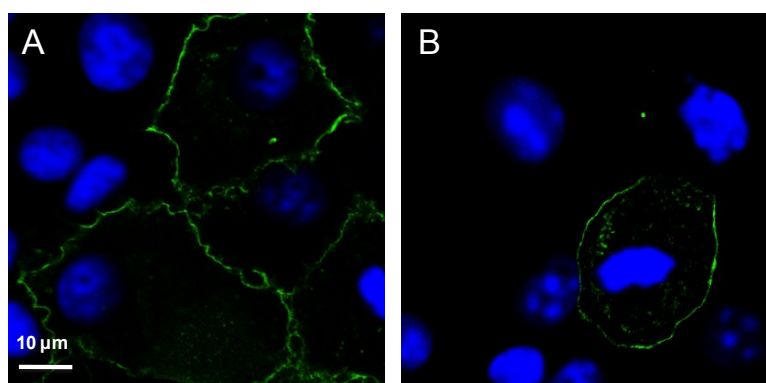


detección de la proteína se llevó a cabo por inmunofluorescencia-microscopía confocal utilizando un anticuerpo anti-V5.

En este estudio se incluyeron algunas variantes previamente descritas cuya localización se desconocía, como los SNPs inactivantes C88R y S189L. Además quisimos comprobar la localización del SNP G465R que había sido descrito como una variante no funcional, con una reducida localización en la membrana plasmática en células MDCK transfectadas (Shu *et al.*, 2003), pero que en nuestro estudio presentaba cierta capacidad de transportar TEA en las células Alexander.

Como control positivo utilizamos células transfectadas con el OCT1-WT, y como control negativo las células fueron transfectadas con el ORF de la proteína bacteriana CAT (cloranfenicol acetil transferasa) de localización citoplasmática. La inmunofluorescencia se llevó a cabo dos días después de la transfección, que también resultó el tiempo óptimo, según experimentos preliminares, para detectar la máxima señal de la proteína (datos no mostrados).

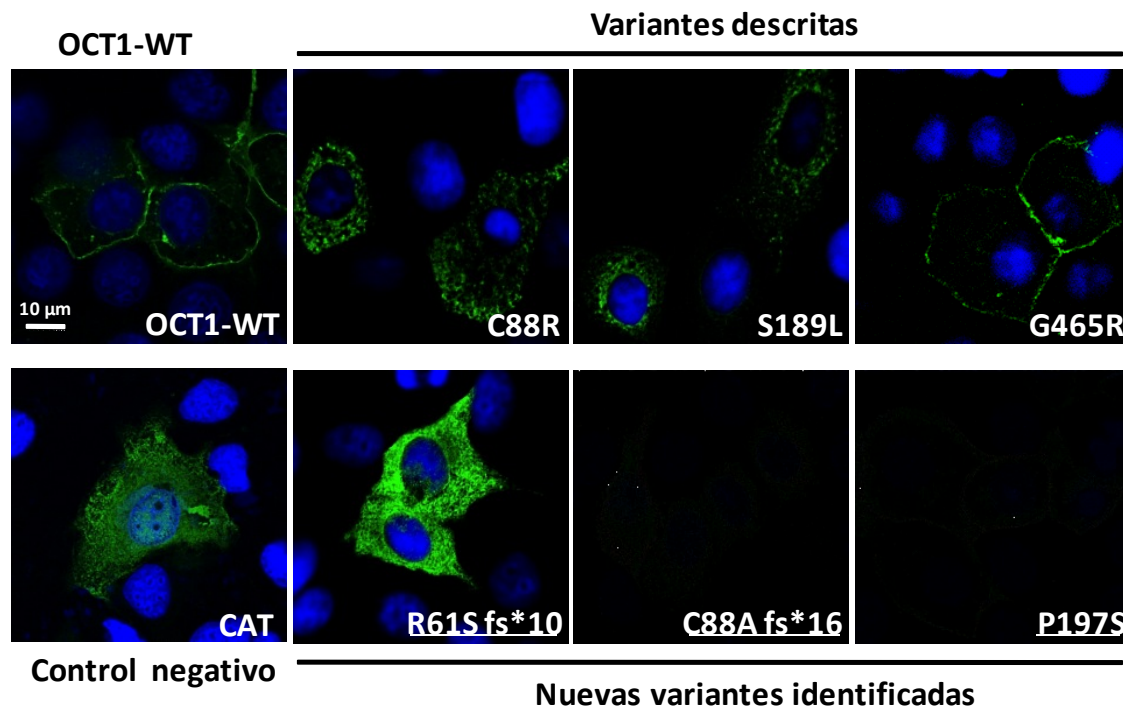
Los plásmidos para las formas OCT1-WT, C88R, S189L, G465R y P197S se construyeron con el epítipo V5 en el extremo carboxilo terminal de la proteína. Sin embargo, para las mutaciones R61S fs\*10 y C88A fs\*16 esta estrategia no era válida, ya que, al ser variantes truncadas la proteína formada, acababa mucho antes del extremo carboxilo donde comenzaba la secuencia del V5. Para solucionar este problema se construyeron plásmidos que contenían la etiqueta V5 en el extremo amino terminal de la secuencia.



**Figura 53:** Inmunolocalización del OCT1-WT (en verde) en células Alexander dos días después de la transfección con el plásmido que porta OCT1-WT con el epítipo V5 colocado en el extremo carboxilo terminal (A) o en el extremo amino terminal (B). Los núcleos se tiñeron con Dapi.

En experimentos previos, comprobamos por inmunofluorescencia que la diferente posición de la etiqueta no interfería con el “targeting” de la proteína a la membrana. Como se observa en la figura 53, tanto las células Alexander transfectadas con el plásmido OCT1-WT con V5 en el extremo carboxilo terminal (Figura 53A), como las transfectadas con el plásmido OCT1-WT con V5 en el extremo amino terminal (Figura 53B) presentaban el marcaje en la membrana plasmática reflejo de una correcta localización.

Como se observa en la figura 54, la localización subcelular de las nuevas variantes descritas R61S fs\*10 y C88A fs\*16 fue citoplasmática, un hecho que era esperable atendiendo a la corta longitud de la proteína (Figura 52B) que es insuficiente para el adecuado direccionamiento a la membrana plasmática. Mientras que la variante P197S mostró una inserción correcta en la membrana plasmática.



**Figura 54.** Localización subcelular de variantes de OCT1, marcadas con el epítipo V5 (en verde). Como control positivo se muestra la localización de membrana plasmática del OCT1-WT, como control negativo se utilizó el ORF de la proteína bacteriana CAT (cloranfenicol acetil transferasa). Los núcleos se tiñeron con Dapi.

En el caso de las mutaciones previamente descritas pero cuya localización se desconocía o cuyos efectos funcionales eran contradictorios, encontramos que la variante C88R presentaba un marcaje mayoritariamente intracelular (Figura 54), lo cual podría explicar los resultados obtenidos en los experimentos de captación de TEA

(donde no fue capaz de transportar este catión), y que también concuerda con los datos de la bibliografía, que indican que esta variante muestra una marcada reducción de la captación del catión  $MPP^+$  (Kerb *et al.*, 2002).

En el mismo sentido, el SNP S189L presentó una localización predominantemente intracelular, lo que concuerda con la falta de transporte mostrada por esta variante en los experimentos de captación de TEA, así como los datos previos que señalan que este SNP presenta una menor captación de metformina (Shu *et al.*, 2008). Sin embargo, otro trabajo mantiene que esta variante transporta  $MPP^+$  con un nivel de captación similar al del OCT1-WT (Shu *et al.*, 2003). La contradicción entre estos resultados puede deberse a diferencias en el procesamiento o en el “targeting” en los sistemas utilizados para el diseño de los experimentos. También, se ha mostrado que los polimorfismos en proteínas transportadoras pueden interactuar de modo diferente con distintos sustratos (Urban *et al.*, 2006), lo que podría ser otra causa que explicara las diferencias en cuanto a la captación para sustratos diferentes.

El SNP G465R ha sido previamente descrito como una variante que ha perdido la funcionalidad, ya que no transporta  $MPP^+$  (Shu *et al.*, 2003), ni metformina (Shu *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos en nuestros experimentos de captación de TEA, mostraron una reducción del transporte en células Alexander y una abolición del mismo en las líneas TFK1 y SK-Hep-1. En los estudios de inmunofluorescencia esta variante presentó una localización correcta en la membrana plasmática, lo que sugiere que la pérdida de funcionalidad de esta mutación no es debida a un defecto en el “targeting”. Pueden ser varias las razones por las que esta variante presente una impedida o reducida funcionalidad; la primera puede ser la interacción espacial (debida a la proximidad) con el residuo 450 que está implicado en la afinidad y selectividad de los cationes transportados (Figura 52A); por otro lado, como ya hemos comentado hay trabajos que describen un papel crucial para ciertos residuos de glicina altamente conservados en la estructura del OCT1, por lo que la sustitución de éstos puede afectar a la funcionalidad del transportador (Shu *et al.*, 2008), de hecho otras mutaciones con cambios en el aa glicina, como la G220V y G401S, han mostrado una reducida capacidad transportadora del OCT1.

#### 4.3.8. Relación entre la capacidad transportadora de OCT1 y la sensibilidad al sorafenib

Como hemos comentado anteriormente, los sistemas de transporte hepáticos de cationes orgánicos desempeñan un papel clave en la farmacocinética de fármacos de naturaleza catiónica. Debido a la elevada expresión del OCT1 en la membrana sinusoidal de los hepatocitos, este transportador tiene un papel predominante en el manejo de los fármacos catiónicos por el hígado.

El sorafenib es un nuevo fármaco antineoplásico que ha mostrado una alta actividad antitumoral *in vitro* en varias líneas celulares tumorales, entre las que se incluyen líneas derivadas de HCC y de CGC (Sugiyama *et al.*, 2011) (Huether *et al.*, 2007) (Liu *et al.*, 2006). Desafortunadamente, la eficacia de este fármaco en el tratamiento de los pacientes no es tan eficaz como cabría esperar de su actividad *in vitro*, ya que a pesar de que el sorafenib ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes con HCC avanzado, los beneficios que se han obtenido son modestos (Llovet *et al.*, 2008), y en los ensayos en fase II realizados hasta la fecha en pacientes de CGC el sorafenib ha mostrado una actividad muy baja (Bengala *et al.*, 2010).

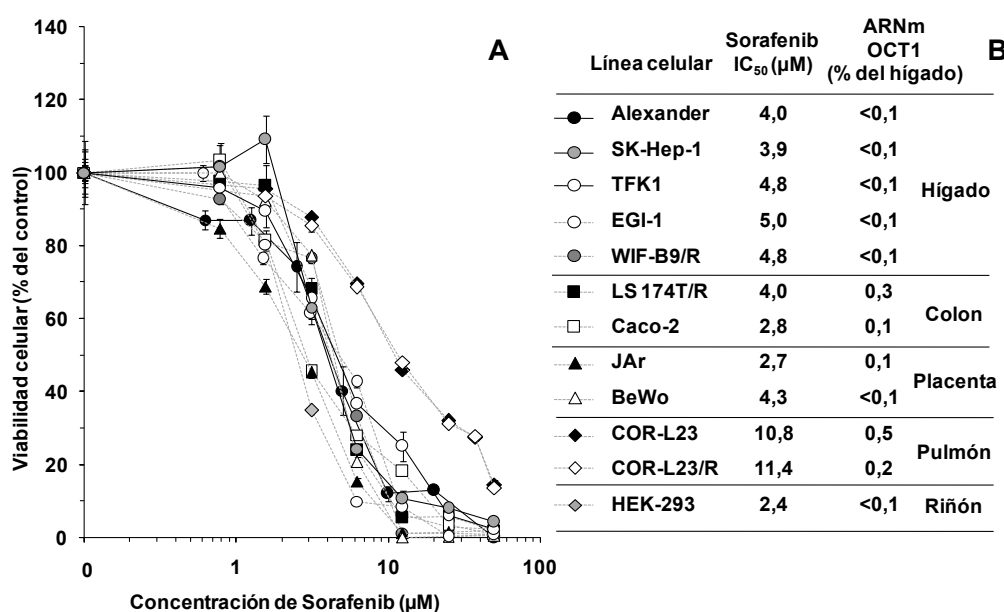
Una de las principales razones de la baja eficacia es una marcada refractariedad hacia este agente antitumoral, por distintos mecanismos de quimiorresistencia (MOCs), que en muchas ocasiones están presentes antes de que se inicie el tratamiento. Además, las células tumorales pueden desarrollar resistencia durante el tratamiento (Villanueva *et al.*, 2007).

En cuanto a la refractariedad al sorafenib, se han descrito alteraciones en varios MOCs para explicar la resistencia hacia este fármaco (Rosenzweig, 2012) (Marin *et al.*, 2010): i) aumento de la expresión de bombas de eflujo de la familia ABC, como MDR1 y ABCG2, que llevan a una reducción del contenido intracelular del fármaco, por un mayor eflujo del mismo (MOC-1b), ii) cambios de expresión en enzimas implicadas en una mayor inactivación del fármaco. Las enzimas que metabolizan el sorafenib son principalmente la uridina glucuronosil transferasa 1A9, y en menor medida la CYP3A4 (MOC-2), y iii) presencia de variantes genéticas en las dianas moleculares del sorafenib (MOC-3).

Dado que la entrada del sorafenib en la célula tumoral es un requerimiento esencial para su efectividad, los cambios en la expresión y/o actividad de los transportadores implicados en la captación del sorafenib también pueden suponer un importante mecanismo de quimiorresistencia (MOC-1a).

Puesto que hemos demostrado que el OCT1, que está abundantemente expresado en hepatocitos, participa en la captación de sorafenib, nos planteamos como siguiente objetivo analizar si las variantes genéticas de OCT1, encontradas en biopsias de HCC y CGC, podrían estar implicadas en la quimiorresistencia al sorafenib.

En primer lugar, llevamos a cabo una serie de experimentos para comprobar el efecto del sorafenib sobre la viabilidad de líneas celulares humanas de distinto origen tisular, y así calcular las  $IC_{50}$ . Se utilizaron líneas celulares hepáticas (Alexander, SK-Hep-1, TFK1, EGI-1 y WIF-B9/R), de colon (LS 174T/R, y Caco-2), de placenta (JAr y BeWo), de pulmón (COR-L23 y COR-23/R) y renales (HEK-293). Se utilizó el test de formazán para medir la viabilidad celular, y determinar el efecto citostático del sorafenib tras 72 h de incubación con las células, utilizando un rango de concentraciones desde  $0,5 \mu\text{M}$  a  $50 \mu\text{M}$ . La figura 55A muestra las curvas de viabilidad para cada línea celular.



**Figura 55:** Efecto dosis-dependiente del sorafenib sobre la viabilidad celular. (A) Distintas líneas celulares fueron incubadas con concentraciones crecientes (de  $0,5 \mu\text{M}$  a  $50 \mu\text{M}$ ) de sorafenib durante 72 h. (B) Concentraciones de sorafenib requeridas para reducir la viabilidad al 50% ( $IC_{50}$ ) y expresión relativa del ARNm de OCT1 medida en cada línea celular por RT-PCR-Q y expresada como porcentaje de abundancia respecto a hígado sano. Los valores son media  $\pm$  SD de cuatro experimentos realizados por triplicado.

Como se puede apreciar, las curvas de viabilidad celular en presencia de sorafenib fueron similares para casi todas las líneas celulares, reflejo de una actividad anti-proliferativa muy potente para este fármaco. Además, la mayoría de las líneas

celulares hepáticas e intestinales presentaron una  $IC_{50}$  entre 2,5  $\mu M$  y 5,0  $\mu M$  de sorafenib (Figura 55B). Estos valores de  $IC_{50}$  son similares a los descritos previamente por otros autores en otras células (Huether *et al.*, 2006) (Liu *et al.*, 2006). Las líneas celulares menos sensibles, fueron las dos derivadas de pulmón, que mostraron una  $IC_{50}$  cercana a 11  $\mu M$ .

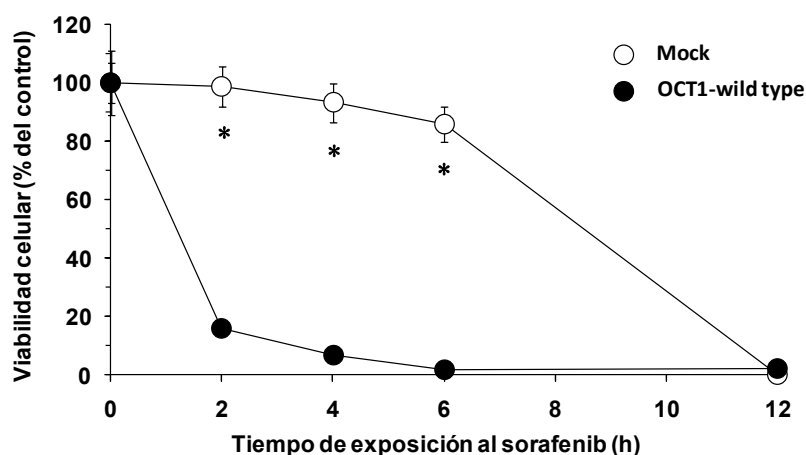
En estas células también se evaluó la expresión de OCT1 por RT-PCR-Q. La figura 55B muestra el resultado referido a la expresión que presenta el hígado humano sano, y normalizado con el control endógeno GAPDH. Todas las líneas celulares estudiadas presentaron unos niveles de expresión de OCT1 muy bajos, lo que concuerda con datos recientemente publicados sobre la expresión de OCT1 en biopsias de HCC y CGC (Martinez-Becerra *et al.*, 2012) (Heise *et al.*, 2012) (Lautem *et al.*, 2013); en las líneas celulares hepáticas observamos una caída significativa en la expresión del transportador, que fue menor del 0,1 % de la expresión observada para el hígado sano.

En experimentos preliminares de la sensibilidad del sorafenib, realizados con células transfectadas con el OCT1-WT o con el vector vacío, no encontramos diferencias entre ambas condiciones, cuando se exponían al fármaco durante 72 h. Un aspecto a tener en cuenta es que *in vivo* las células tumorales pueden estar menos tiempo expuestas al fármaco que en nuestras condiciones *in vitro* de 72 h de exposición.

Por ello, realizamos ensayos *in vitro* para evaluar el efecto citostático del sorafenib en función del tiempo. Utilizamos células Alexander transfectadas de forma transitoria con el OCT1-WT o con el vector vacío (Mock) y evaluamos el efecto de la incubación con una dosis de sorafenib próxima a la  $IC_{50}$  (5  $\mu M$ ) durante 2, 4, 6 ó 12 h de exposición (Figura 56). Transcurrido el tiempo indicado, se retiraba el fármaco, se añadía medio de cultivo fresco y la viabilidad celular se evaluó 72 h después de la adición del sorafenib al cultivo.

Nos pareció interesante observar que cuando el cultivo estaba expuesto al sorafenib durante un tiempo corto (2-6 h), la presencia del transportador OCT1 marcaba la diferencia de sensibilidad a este agente, apareciendo un descenso marcado en la viabilidad celular, mientras que las células que no portaban el transportador (Mock) eran resistentes al efecto anti-proliferativo del sorafenib. Por el contrario, cuando aumentaba el tiempo de exposición al sorafenib (12 h), el efecto citostático observado en las células transfectadas con el OCT1 y en las Mock era muy

similar (Figura 56), lo que parece indicar que la entrada del fármaco a la célula a tiempos cortos es altamente dependiente del transportador OCT1, mientras que a tiempos de incubación más largos la entrada del sorafenib a la célula por otros mecanismos anularía la ventaja que proporciona la presencia de OCT1.



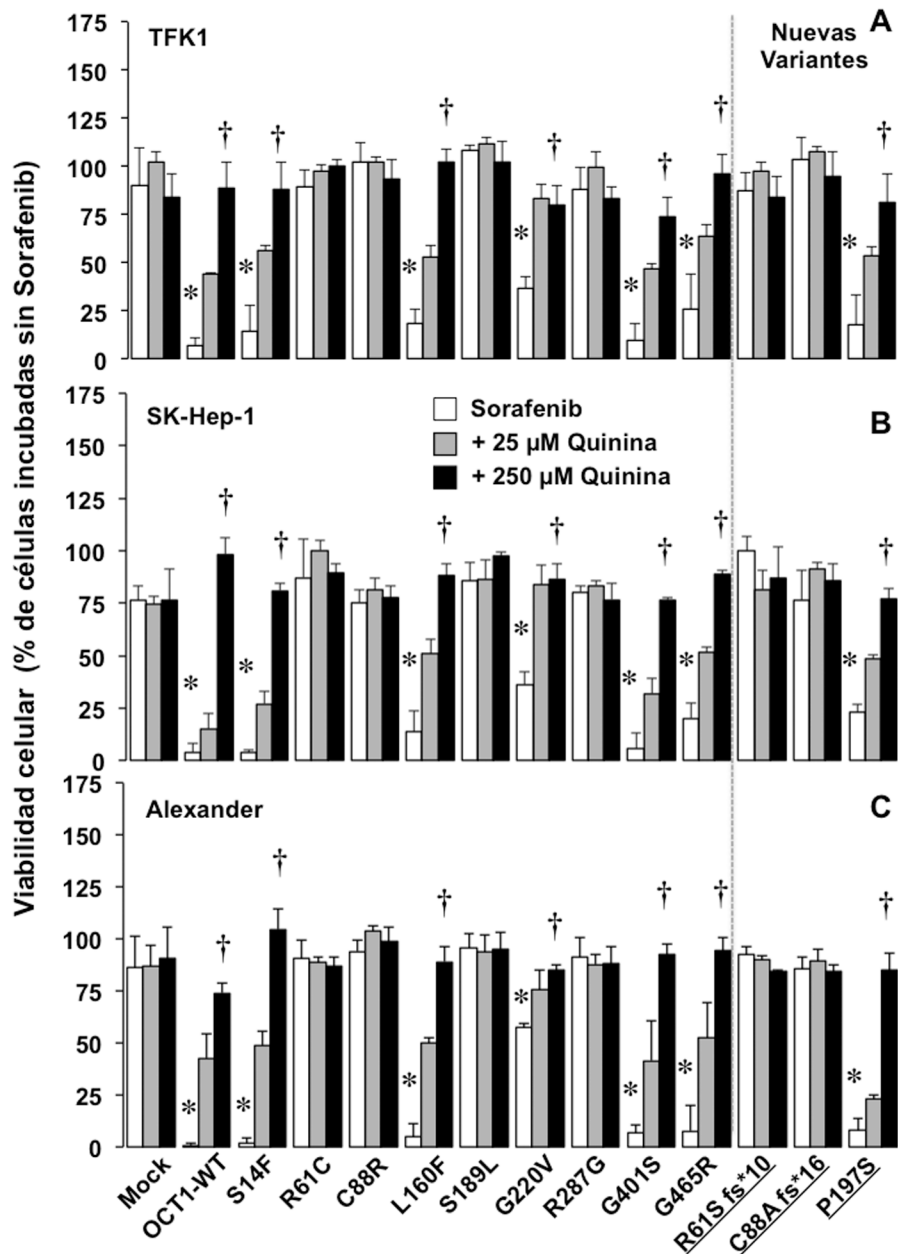
**Figura 56:** Efecto del sorafenib en función del tiempo. Dos días después de la transfección de células Alexander con el OCT1-WT o con el vector vacío (Mock), las células fueron expuestas a 5  $\mu$ M de sorafenib durante el tiempo indicado. La viabilidad celular fue determinada 72 h después de añadir el sorafenib al medio de cultivo. Los valores son media $\pm$ SD de cuatro experimentos realizados por triplicado. \*,  $p < 0,05$ , comparado con el OCT1-WT.

En base a estos datos, decidimos evaluar el efecto de los distintos SNPs de OCT1 sobre la sensibilidad al sorafenib, en las líneas celulares TFK1, SK-Hep-1 y Alexander (Figuras 57A, 57B y 57C, respectivamente). Los estudios se llevaron a cabo a los 2 días de la transfección, y las células se expusieron durante 6 h a una dosis de 5  $\mu$ M del fármaco.

Bajo estas condiciones seleccionadas, sólo las variantes de OCT1 S14F, L160F y G401S, que mantenían la capacidad transportadora (evaluada previamente en los experimentos de captación de TEA, figura 51), fueron capaces de inducir sensibilidad al sorafenib en las tres líneas células ensayadas (Figura 57). Respecto a las nuevas variantes de OCT1 descritas en esta Tesis Doctoral, la variante P197S otorgaba sensibilidad al sorafenib, sin embargo, las mutaciones R61S fs\*10 y C88A fs\*16 no inducían sensibilidad al fármaco, lo que concordaba con los datos previos, ya que eran proteínas truncadas, de corta longitud, con un “targeting” incorrecto que no las dirigía a la membrana plasmática, y que eran incapaces de transportar TEA (figura 51).



La variante G465R que, en las células Alexander reducía y en las Sk-Hep-1 y TFK1 anulaba el transporte de TEA, confería sensibilidad al sorafenib en las tres líneas celulares ensayadas (Figura 57). Esto podría deberse a una diferente interacción del transportador con el sorafenib y con el TEA, de hecho, trabajos recientes han descrito que los polimorfismos en proteínas transportadoras pueden interactuar de modo diferente con distintos sustratos (Urban *et al.*, 2006).

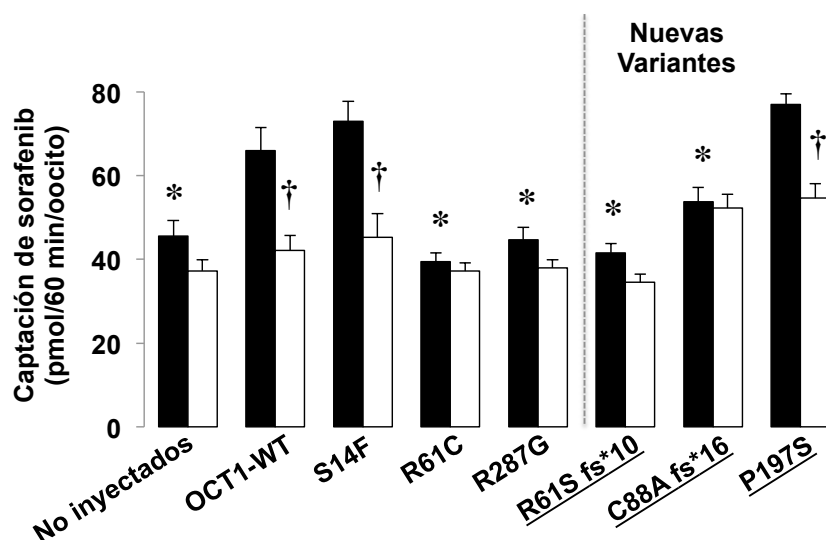


**Figura 57:** Sensibilidad al sorafenib inducida por el OCT1. Efecto de la expresión del OCT1-WT o de las variantes genéticas en la viabilidad de las células transfectadas TFK1 (A), SK-Hep-1 (B) y Alexander (C) determinada 72 h tras la incubación con 5 μM de sorafenib, con o sin adición de 25 μM ó 250 μM de quinina durante 6 h. Los valores son media±SD de 4 experimentos llevados a cabo por triplicado. \*, p<0,05 cuando se compara con las células Mock. †, p<0,05, comparando la concentración más alta de quinina con las células tratadas solo con sorafenib.



Además, para investigar de forma más específica que el efecto sobre la sensibilidad al sorafenib estaba mediado por el transporte a través del OCT1, la incubación con el fármaco se combinó con el inhibidor específico de OCT1 quinina. Se utilizaron dos concentraciones de este inhibidor, una de 25  $\mu\text{M}$  que inhibía parcialmente y otra de 250  $\mu\text{M}$ , que bloqueaba totalmente el transporte mediado por OCT1 (Figura 57). Así, para las variantes de OCT1 que mantenían la capacidad transportadora y que, por tanto, conferían sensibilidad al sorafenib, cuando se incubaban simultáneamente con sorafenib y quinina a la dosis de 25  $\mu\text{M}$  la viabilidad celular se reducía menos que sin el inhibidor, y cuando se utilizaba la dosis de 250  $\mu\text{M}$  se bloqueaba casi totalmente el transporte de sorafenib por el OCT1 y, por lo tanto, la viabilidad celular se mantenía próxima al 100% (Figura 57).

Para confirmar estos resultados y evaluar si se trataba de un fenómeno dependiente del modelo celular empleado decidimos utilizar de nuevo el modelo de oocitos de *Xenopus laevis*. Los oocitos se microinyectaron con el ARNm del OCT1-WT o de algunas variantes genéticas de este transportador (que se sintetizaron del mismo modo descrito para el OCT1 silvestre, utilizando plásmidos de expresión que contenían el OCT1 con la SNP deseada) y se midió la captación de sorafenib por HPLC-MS-MS.



**Figura 58:** Captación mediada por OCT1 en oocitos de *Xenopus laevis* dos días después de la microinyección con el ARNm del OCT1-WT o de distintas variantes. Incubación durante 1 h con 50  $\mu\text{M}$  de sorafenib en presencia o ausencia de 250  $\mu\text{M}$  de quinina. Como control negativo se utilizaron oocitos que no habían sido microinyectados y que se mantuvieron en las mismas condiciones que el grupo de oocitos microinyectados con el ARNm del OCT1-WT. Los valores son media  $\pm$  SD de 4 experimentos llevados a cabo por triplicado. \*,  $p < 0,05$  cuando se compara con el OCT1-WT. †,  $p < 0,05$ , comparando con la captación en ausencia de quinina.

Como se observa en la figura 58, los oocitos silvestres sin inyectar presentaron cierta captación endógena de sorafenib (aproximadamente 45 pmol/60 min/oocito), posiblemente mediada por algún sistema de transporte de cationes orgánicos presente en la membrana de los oocitos; sin embargo, la captación de sorafenib en los oocitos que expresaban OCT1 fue significativamente mayor (aproximadamente 66 pmol/60 min/oocito) y además esta captación era inhibible por quinina, lo que demostraba la selectividad del transporte mediado por OCT1. Además de utilizar el OCT1-WT, como segundo control positivo incluimos el SNP S14F, que como se comentó anteriormente es una variante funcional de OCT1. Los resultados mostraron que esta variante también captaba eficazmente sorafenib (aproximadamente 73 pmol/60 min/oocito). Como controles negativos se incluyeron los SNPs R61C y R287G, ambas descritas como variantes que reducen o inactivan la funcionalidad de OCT1. Los oocitos inyectados con estas variantes presentaron una captación de sorafenib significativamente menor a la observada para los oocitos que portaban el OCT1-WT (Figura 58).

En cuanto a las nuevas variantes descritas, como se esperaba, las mutaciones R61S fs\*10 y C88A fs\*16 presentaban una incorporación de sorafenib significativamente menor a la observada en los oocitos que expresaban la forma OCT1-WT, que era de una magnitud similar a la presentada por los oocitos que no habían sido inyectados. Por otro lado, el SNP P197S era capaz de captar sorafenib de modo similar al OCT1-WT ( $\approx 77$  pmol/60 min/oocito) cuando era expresado en los oocitos, y esta captación se inhibía significativamente tras la adición del quinina, lo que concuerda con las observaciones previas comentadas para esta variante.

Los datos observados en este sistema de expresión heteróloga de las variantes de OCT1 en oocitos, apoyan los resultados observados para estas mutaciones en cuanto al efecto citostático del sorafenib en las líneas celulares transfectadas (figura 58).

#### 4.3.9. Screening de SNPs inactivantes, y variantes de “splicing” alternativo de OCT1 en un mayor número de HCCs y CGCs

Nuestros resultados han indicado que los SNPs inactivantes del OCT1 están implicados en la pérdida de sensibilidad al sorafenib, por lo que el análisis y la detección de las variantes del OCT1 puede tener una gran repercusión para predecir la respuesta al tratamiento clínico con sorafenib en pacientes con HCC y CGC.

Por ello, una vez identificados los SNPs relacionados con una pérdida de funcionalidad, nos planteamos como último objetivo de este bloque experimental el llevar a cabo una búsqueda selectiva sólo de las variantes inactivantes en un número mayor de muestras.

En este nuevo grupo se incluyeron 11 muestras de pacientes con HCC, y 6 de pacientes con CGC, que se acompañaban de tejido adyacente no tumoral, y que al igual que las muestras procesadas en la primera parte del estudio, procedían de pacientes que no habían recibido tratamiento quimioterapéutico previo. Los datos relativos a las características del tumor se incluyeron en la tabla suplementaria MM-1 (página 95).

El análisis de la presencia de SNPs en estas muestras se realizó mediante RT-PCR-Q, utilizando “primers” diseñados selectivamente para las mutaciones inactivantes R61C, C88R, S189L, G220V, R287G, R61S fs\*10 y C88A fs\*16. Las condiciones para la PCR fueron puestas a punto previamente para conseguir una diferencia entre la señal producida por la secuencia mutada y la silvestre de al menos 5 Ct (como se describe en el apartado 3.12 de Material y Métodos). La abundancia de cada variante fue normalizada por la abundancia de ARNm para el OCT1 total.

Los resultados obtenidos en las nuevas muestras confirmaron los datos previos sobre la reducción de la expresión de OCT1 en tumores hepáticos en comparación con los niveles de expresión presentes en el tejido adyacente no tumoral (Tabla 14).

La tabla 14 recoge el conjunto de los resultados obtenidos para el número total de biopsias analizadas (23 HCCs y 15 CGCs). En cuanto a la frecuencia de aparición de las dos nuevas mutaciones inactivantes, se observó que la R61S fs\*10 fue detectada en el 17% y 13% de los HCCs y CGCs respectivamente, mientras que la variante C88A fs\*16 sólo fue detectada en muestras de HCC (17%).

Los SNPs inactivantes previamente descritos, cuya MAF se muestra en la tabla 13, tenían una frecuencia de aparición diferente en las muestras de HCC y CGC, así

estos SNPs aparecieron en los HCCs con una frecuencia de 17% (R61C), 12% (C88R), 9% (S189L), 9% (G220V) y 4% (R287G) respectivamente, mientras que en el tejido pareado no tumoral sólo se detectaron los SNPs C88R y G220V, y con una frecuencia menor que en los tumores. De modo similar en los CGCs se observó una frecuencia de aparición del 7% (R61C), 13% (C88R), 13% (S189L), 13% (G220V) y 7% (R287G), y en el tejido adyacente no tumoral sólo se detectó la mutación R61C.

La presencia de variantes cortas, no funcionales, de OCT1 generadas por "splicing" alternativo fue investigada en esta segunda tanda de biopsias, por el mismo método de PCR analítica utilizado en el primer grupo de muestras.

**Tabla 14.** Variantes inactivantes del OCT1 presentes en biopsias de carcinoma hepatocelular (HCC), y colangiocarcinoma (CGC), y en su respectivo tejido no tumoral adyacente.

	Tejido adyacente	HCC	Tejido adyacente	CGC
<b>ARNm OCT1 (% del hígado)</b>	81,5±15,3	48,3±12,2 <sup>a</sup>	89,7±18,3	10,8±5,5 <sup>a</sup>
<b>Variantes de "splicing" descritas</b>				
Delección del exón 9	19%	35%	58%	33%
Delección de exones 9 y 10	25%	35%	83%	40%
Delección de exones 7 y 10	0%	4%	0%	7%
c.1276+1insGTAAGTTG	6%	22%	0%	7%
<b>Nuevas variantes de "splicing"</b>				
c.1276+1insGTAAGTTG y del.exón 9	19%	30%	16%	27%
Delección del exón 10	38%	48%	25%	67%
<b>SNPs inactivantes descritos</b>				
R61C	0%	17%	16%	7%
C88R	4%	12%	0%	13%
S189L	0%	9%	0%	13%
G220V	6%	9%	0%	13%
R287G	0%	4%	0%	7%
<b>Nuevos SNPs inactivantes</b>				
<u>R61S fs*10</u>	6%	17%	0%	13%
<u>C88A fs*16</u>	0%	17%	0%	0%
<b>Al menos un SNP inactivante</b>	12%	48%	16%	40%

Porcentaje de aparición de variantes inactivantes del OCT1 en las muestras de cada grupo: tejido pareado no tumoral adyacente a las muestras de HCC (carcinoma hepatocelular), biopsias de HCC, tejido pareado no tumoral adyacente a las muestras de CGC (colangiocarcinoma), o biopsias de CGC. <sup>a</sup>, p<0,05%, comparado los niveles de expresión del ARNm del OCT1 en HCC (n=23) o en CGC (n=15) con la expresión del tejido hepático adyacente.

Poniendo en conjunto los datos recogidos en el total de muestras analizadas, observamos que las nuevas variantes de “splicing” alternativo detectadas en esta Tesis Doctoral, c.1276+1insGTAAGTTG combinada con la escisión del exón 9, y la variante con escisión del exón 10, aparecían con una frecuencia muy elevada en los tumores de HCC y CGC. Al considerar todas las variantes de OCT1 generadas por un procesamiento del ARNm inmaduro, podemos deducir que los procesos de “splicing” alternativo del OCT1 son muy frecuentes en los tumores hepáticos.

Además, cuando todas las variantes de OCT1 fueron consideradas de manera conjunta, el resultado fue que al menos un SNP inactivante estaba presente en el 48% de los HCCs y en el 40% de los CGCs.

En resumen, los resultados de esta parte de nuestro estudio sugieren que la caída en los niveles de expresión de OCT1, junto con la presencia de variantes no funcionales de este transportador en tumores hepáticos, determina la reducida entrada de sorafenib en las células tumorales, un menor acceso a sus dianas moleculares localizadas intracelularmente, y en consecuencia una peor respuesta al tratamiento. Esto sugiere que el análisis de los niveles de expresión de este transportador, así como la detección de variantes genéticas, pueden ser de gran utilidad para llevar a cabo una apropiada selección de los pacientes con HCC o CGC candidatos a tener una respuesta positiva al tratamiento con sorafenib.



## **5. CONCLUSIONES**





**CONCLUSIÓN PRIMERA:**

Se ha puesto a punto un modelo animal de colangiocarcinogénesis en ratas, que puede ser de utilidad para profundizar en el conocimiento de la patogénesis y el desarrollo del colangiocarcinoma. Así, se ha constatado que la acumulación crónica de ácidos biliares, como la que se produce en diversas patologías asociadas a la colangiocarcinogénesis, estimula la proliferación y favorece el desarrollo de estos tumores, por lo que se concluye que los ácidos biliares pueden actuar como moléculas promotoras o co-carcinogénicas.

**CONCLUSIÓN SEGUNDA:**

Se han obtenido y caracterizado dos líneas celulares monoclonales derivadas de colangiocarcinoma inducido químicamente en ratas, que hemos denominado REUSAL-C44 y REUSAL-C49. Ambas líneas son un buen modelo *in vitro* para el estudio de la biología tumoral y patogénesis molecular del colangiocarcinoma, así como para la evaluación del efecto citostático de nuevos fármacos frente a este tipo de tumor.

**CONCLUSIÓN TERCERA:**

El transportador de ácidos biliares ASBT, que se expresa en el hígado solamente en colangiocitos, mantiene su expresión y funcionalidad en tumores colangiolares, por lo que puede ser utilizado como diana en la vectorización de derivados citostáticos de ácidos biliares, como los Bamets, con el objetivo de elevar los niveles intracelulares del principio activo en las células tumorales.

**CONCLUSIÓN CUARTA:**

La expresión del transportador de cationes orgánicos OCT1 en las células colangiolares tumorales puede facilitar la entrada de los Bamets en el interior celular, y por tanto favorecer que ejerzan su efecto citostático.

#### **CONCLUSION QUINTA:**

El derivado de ácidos biliares y cisplatino Bamet-UD2 muestra un efecto citostático *in vitro* frente a líneas celulares de colangiocarcinoma; este dato junto con su baja toxicidad *in vivo*, hacen que este fármaco pueda ser eficaz en el tratamiento de este tipo de tumores.

#### **CONCLUSION SEXTA:**

El desarrollo de tumores hepáticos, como el carcinoma hepatocelular y el colangiocarcinoma, se acompaña muy frecuentemente de una caída en los niveles de expresión del OCT1, junto con la aparición de variantes genéticas aberrantes de este transportador. Puesto que el OCT1 está implicado en la captación celular del sorafenib, una reducida expresión y/o actividad de este transportador pueden afectar de manera significativa a la capacidad de las células tumorales de captar y por lo tanto responder al tratamiento con sorafenib, y probablemente a otros fármacos antitumorales que son sustratos del OCT1 como los Bamets.

#### **CONCLUSION SÉPTIMA:**

La evaluación de la expresión y funcionalidad del OCT1 en los pacientes con carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma podría ser una estrategia útil para la identificación de los pacientes que tienen menor probabilidad de responder al tratamiento con estos fármacos, lo que permitiría ajustar la quimioterapia de forma personalizada.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**



- Abe T, Unno M, Onogawa T, Tokui T, Kondo TN, Nakagomi R, Adachi H, Fujiwara K, Okabe M, Suzuki T, Nunoki K, Sato E, Kakyō M, Nishio T, Sugita J, Asano N, Tanemoto M, Seki M, Date F, Ono K, Kondo Y, Shiiba K, Suzuki M, Ohtani H, Shimosegawa T, Inuma K, Nagura H, Ito S, Matsuno S (2001) LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology*. **120**: 1689-1699.
- Abou-Alfa GK (2006) Hepatocellular carcinoma: molecular biology and therapy. *Semin Oncol*. **33**: S79-83.
- Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, Amadori D, Santoro A, Figer A, De Greve J, Douillard JY, Lathia C, Schwartz B, Taylor I, Moscovici M, Saltz LB (2006) Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*. **24**: 4293-4300.
- Adams DH, Eksteen B (2006) Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. **6**: 244-251.
- Ahrendt SA, Rashid A, Chow JT, Eisenberger CF, Pitt HA, Sidransky D (2000) p53 overexpression and K-ras gene mutations in primary sclerosing cholangitis-associated biliary tract cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. **7**: 426-431.
- Aishima SI, Taguchi KI, Sugimachi K, Shimada M, Sugimachi K, Tsuneyoshi M (2002) c-erbB-2 and c-Met expression relates to cholangiocarcinogenesis and progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Histopathology*. **40**: 269-278.
- Akdogan M, Sasmaz N, Kayhan B, Biyikoglu I, Disibeyaz S, Sahin B (2001) Extraordinarily elevated CA19-9 in benign conditions: a case report and review of the literature. *Tumori*. **87**: 337-339.
- Akita H, Suzuki H, Ito K, Kinoshita S, Sato N, Takikawa H, Sugiyama Y (2001) Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim Biophys Acta*. **1511**: 7-16.
- Alavi A, Hood JD, Frausto R, Stupack DG, Cheresch DA (2003) Role of Raf in vascular protection from distinct apoptotic stimuli. *Science*. **301**: 94-96.
- Al-Bader A, Mathew TC, Abul H, Al-Sayer H, Singal PK, Dashti HM (2000) Cholangiocarcinoma and liver cirrhosis in relation to changes due to thioacetamide. *Mol Cell Biochem*. **208**: 1-10.
- Albert MB, Steinberg WM, Henry JP (1988) Elevated serum levels of tumor marker CA19-9 in acute cholangitis. *Dig Dis Sci*. **33**: 1223-1225.
- Alberts SR, Gores GJ, Kim GP, Roberts LR, Kendrick ML, Rosen CB, Chari ST, Martenson JA (2007) Treatment options for hepatobiliary and pancreatic cancer. *Mayo Clin Proc*. **82**: 628-637.
- Alison MR, Lovell MJ (2005) Liver cancer: the role of stem cells. *Cell Prolif*. **38**: 407-421.
- Aljiffry M, Walsh MJ, Molinari M (2009) Advances in diagnosis, treatment and palliation of cholangiocarcinoma: 1990-2009. *World J Gastroenterol*. **15**: 4240-4262.
- Almhanna K, Philip PA (2009) Safety and efficacy of sorafenib in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncol Targets Ther*. **2**: 261-267.

- Alpini G, Baiocchi L, Glaser S, Ueno Y, Marzioni M, Francis H, Phinizz JL, Angelico M, Lesage G (2002a) Ursodeoxycholate and tauroursodeoxycholate inhibit cholangiocyte growth and secretion of BDL rats through activation of PKC alpha. *Hepatology*. **35**: 1041-1052.
- Alpini G, Glaser S, Alvaro D, Ueno Y, Marzioni M, Francis H, Baiocchi L, Stati T, Barbaro B, Phinizz JL, Mauldin J, Lesage G (2002b) Bile acid depletion and repletion regulate cholangiocyte growth and secretion by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway in rats. *Gastroenterology*. **123**: 1226-1237.
- Alpini G, Glaser S, Baiocchi L, Francis H, Xia X, Lesage G (2005) Secretin activation of the apical Na<sup>+</sup>-dependent bile acid transporter is associated with cholehepatic shunting in rats. *Hepatology*. **41**: 1037-1045.
- Alpini G, Glaser SS, Ueno Y, Rodgers R, Phinizz JL, Francis H, Baiocchi L, Holcomb LA, Caligiuri A, LeSage GD (1999) Bile acid feeding induces cholangiocyte proliferation and secretion: evidence for bile acid-regulated ductal secretion. *Gastroenterology*. **116**: 179-186.
- Alpini G, Prall R, LaRusso NF (2001a). The liver; biology & photobiology; 4th edition Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Alpini G, Roberts S, Kuntz SM, Ueno Y, Gubba S, Podila PV, LeSage G, LaRusso NF (1996) Morphological, molecular, and functional heterogeneity of cholangiocytes from normal rat liver. *Gastroenterology*. **110**: 1636-1643.
- Alpini G, Ueno Y, Glaser SS, Marzioni M, Phinizz JL, Francis H, Lesage G (2001b) Bile acid feeding increased proliferative activity and apical bile acid transporter expression in both small and large rat cholangiocytes. *Hepatology*. **34**: 868-876.
- Alpini G, Ulrich C, Roberts S, Phillips JO, Ueno Y, Podila PV, Colegio O, LeSage GD, Miller LJ, LaRusso NF (1997) Molecular and functional heterogeneity of cholangiocytes from rat liver after bile duct ligation. *Am J Physiol*. **272**: G289-297.
- Altamari A, Fiorentino M, Gabusi E, Gruppioni E, Corti B, D'Errico A, Grigioni WF (2003) Investigation of ErbB1 and ErbB2 expression for therapeutic targeting in primary liver tumours. *Dig Liver Dis*. **35**: 332-338.
- Alvaro D, Alpini G, Jezequel AM, Bassotti C, Francia C, Fraioli F, Romeo R, Marucci L, Le Sage G, Glaser SS, Benedetti A (1997) Role and mechanisms of action of acetylcholine in the regulation of rat cholangiocyte secretory functions. *J Clin Invest*. **100**: 1349-1362.
- Andersen JR, Sorensen SM, Kruse A, Rokkjaer M, Matzen P (1989) Randomised trial of endoscopic endoprosthesis versus operative bypass in malignant obstructive jaundice. *Gut*. **30**: 1132-1135.
- Angelin B, Einarsson K, Hellstrom K (1976) Evidence for the absorption of bile acids in the proximal small intestine of normo- and hyperlipidaemic subjects. *Gut*. **17**: 420-425.
- Aoki K, Takayasu K, Kawano T, Muramatsu Y, Moriyama N, Wakao F, Yamamoto J, Shimada K, Takayama T, Kosuge T, et al. (1993) Combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma: clinical features and computed tomographic findings. *Hepatology*. **18**: 1090-1095.
- Aouida M, Leduc A, Wang H, Ramotar D (2004) Characterization of a transport and detoxification pathway for the antitumour drug bleomycin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*. **384**: 47-58.

- Arora A, Scholar EM (2005) Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther.* **315**: 971-979.
- Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA (1993) Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer.* **71**: 1368-1383.
- Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD (2004) The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch.* **447**: 735-743.
- Ballatori N, Christian WV, Lee JY, Dawson PA, Soroka CJ, Boyer JL, Madejczyk MS, Li N (2005) OSTalpha-OSTbeta: a major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia. *Hepatology.* **42**: 1270-1279.
- Ballesterro MR, Monte MJ, Briz O, Jimenez F, Gonzalez-San Martin F, Marin JJ (2006) Expression of transporters potentially involved in the targeting of cytostatic bile acid derivatives to colon cancer and polyps. *Biochem Pharmacol.* **72**: 729-738.
- Banerjee A, Swaan PW (2006) Membrane topology of human ASBT (SLC10A2) determined by dual label epitope insertion scanning mutagenesis. New evidence for seven transmembrane domains. *Biochemistry.* **45**: 943-953.
- Barker EA, Smuckler EA (1972) Altered microsome function during acute thioacetamide poisoning. *Mol Pharmacol.* **8**: 318-326.
- Barker EA, Smuckler EA (1974) Nonhepatic thioacetamide injury. II. The morphologic features of proximal renal tubular injury. *Am J Pathol.* **74**: 575-590.
- Barnes CJ, Bagheri-Yarmand R, Mandal M, Yang Z, Clayman GL, Hong WK, Kumar R (2003) Suppression of epidermal growth factor receptor, mitogen-activated protein kinase, and Pak1 pathways and invasiveness of human cutaneous squamous cancer cells by the tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa). *Mol Cancer Ther.* **2**: 345-351.
- Bayer M, Kuci Z, Schomig E, Grundemann D, Dittmann H, Handgretinger R, Bruchelt G (2009) Uptake of mIBG and catecholamines in noradrenaline- and organic cation transporter-expressing cells: potential use of corticosterone for a preferred uptake in neuroblastoma- and pheochromocytoma cells. *Nucl Med Biol.* **36**: 287-294.
- Becker ML, Visser LE, van Schaik RH, Hofman A, Uitterlinden AG, Stricker BH (2011) OCT1 polymorphism is associated with response and survival time in anti-Parkinsonian drug users. *Neurogenetics.* **12**: 79-82.
- Benedetti A, Bassotti C, Rapino K, Marucci L, Jezequel AM (1996) A morphometric study of the epithelium lining the rat intrahepatic biliary tree. *J Hepatol.* **24**: 335-342.
- Bengala C, Bertolini F, Malavasi N, Boni C, Aitini E, Dealis C, Zironi S, Depenni R, Fontana A, Del Giovane C, Luppi G, Conte P (2010) Sorafenib in patients with advanced biliary tract carcinoma: a phase II trial. *Br J Cancer.* **102**: 68-72.
- Benson AB, 3rd (2007) Epidemiology, disease progression, and economic burden of colorectal cancer. *J Manag Care Pharm.* **13**: S5-18.
- Bergquist A, Ekblom A, Olsson R, Kornfeldt D, Loof L, Danielsson A, Hultcrantz R, Lindgren S, Prytz H, Sandberg-Gertzen H, Almer S, Granath F, Broome U (2002) Hepatic and extrahepatic malignancies in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol.* **36**: 321-327.

- Berry MN, Friend DS (1969) High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol.* **43**: 506-520.
- Bettschart V, Clayton RA, Parks RW, Garden OJ, Bellamy CO (2002) Cholangiocarcinoma arising after biliary-enteric drainage procedures for benign disease. *Gut.* **51**: 128-129.
- Bismuth H, Corlette MB (1975) Intrahepatic cholangioenteric anastomosis in carcinoma of the hilus of the liver. *Surg Gynecol Obstet.* **140**: 170-178.
- Blazquez AG, Briz O, Romero MR, Rosales R, Monte MJ, Vaquero J, Macias RI, Cassio D, Marin JJ (2012) Characterization of the role of ABCG2 as a bile acid transporter in liver and placenta. *Mol Pharmacol.* **81**: 273-283.
- Blechacz B, Gores GJ (2008) Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Hepatology.* **48**: 308-321.
- Blechacz BR, Smoot RL, Bronk SF, Werneburg NW, Sirica AE, Gores GJ (2009) Sorafenib inhibits signal transducer and activator of transcription-3 signaling in cholangiocarcinoma cells by activating the phosphatase shatterproof 2. *Hepatology.* **50**: 1861-1870.
- Boberg KM, Schrupf E, Bergquist A, Broome U, Pares A, Remotti H, Schjolberg A, Spurkland A, Clausen OP (2000) Cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis: K-ras mutations and Tp53 dysfunction are implicated in the neoplastic development. *J Hepatol.* **32**: 374-380.
- Braconi C, Swenson E, Kogure T, Huang N, Patel T (2010) Targeting the IL-6 dependent phenotype can identify novel therapies for cholangiocarcinoma. *PLoS One.* **5**: e15195.
- Briz O, Macias RI, Vallejo M, Silva A, Serrano MA, Marin JJ (2003) Usefulness of liposomes loaded with cytostatic bile acid derivatives to circumvent chemotherapy resistance of enterohepatic tumors. *Mol Pharmacol.* **63**: 742-750.
- Briz O, Serrano MA, Macias RI, Marin JJ (2000) Overcoming cisplatin resistance in vitro by a free and liposome-encapsulated bile acid derivative: BAMET-R2. *Int J Cancer.* **88**: 287-292.
- Briz O, Serrano MA, Rebollo N, Hagenbuch B, Meier PJ, Koepsell H, Marin JJ (2002) Carriers involved in targeting the cytostatic bile acid-cisplatin derivatives cis-diammine-chloro-cholylglycinate-platinum(II) and cis-diammine-bisursodeoxycholate-platinum(II) toward liver cells. *Mol Pharmacol.* **61**: 853-860.
- Buchwald H, Varco RL, Matts JP, Long JM, Fitch LL, Campbell GS, Pearce MB, Yellin AE, Edmiston WA, Smink RD, Jr., et al. (1990) Effect of partial ileal bypass surgery on mortality and morbidity from coronary heart disease in patients with hypercholesterolemia. Report of the Program on the Surgical Control of the Hyperlipidemias (POSCH). *N Engl J Med.* **323**: 946-955.
- Burak K, Angulo P, Pasha TM, Egan K, Petz J, Lindor KD (2004) Incidence and risk factors for cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol.* **99**: 523-526.
- Burton LD, Kippenberger AG, Lingen B, Bruss M, Bonisch H, Christie DL (1998) A variant of the bovine noradrenaline transporter reveals the importance of the C-terminal region for correct targeting to the membrane and functional expression. *Biochem J.* **330 ( Pt 2)**: 909-914.



- Caligiuri A, Glaser S, Rodgers RE, Phinizy JL, Robertson W, Papa E, Pinzani M, Alpini G (1998) Endothelin-1 inhibits secretin-stimulated ductal secretion by interacting with ETA receptors on large cholangiocytes. *Am J Physiol.* **275**: G835-846.
- Camargo SM, Singer D, Makrides V, Huggel K, Pos KM, Wagner CA, Kuba K, Danilczyk U, Skovby F, Kleta R, Penninger JM, Verrey F (2009) Tissue-specific amino acid transporter partners ACE2 and collectrin differentially interact with hartnup mutations. *Gastroenterology.* **136**: 872-882.
- Campbell JA, Corrigan AV, Guy A, Kirsch RE (1991) Immunohistologic localization of alpha, mu, and pi class glutathione S-transferases in human tissues. *Cancer.* **67**: 1608-1613.
- Cardinale V, Semeraro R, Torrice A, Gatto M, Napoli C, Bragazzi MC, Gentile R, Alvaro D (2010) Intra-hepatic and extra-hepatic cholangiocarcinoma: New insight into epidemiology and risk factors. *World J Gastrointest Oncol.* **2**: 407-416.
- Cardinale V, Wang Y, Carpino G, Reid LM, Gaudio E, Alvaro D (2012) Mucin-producing cholangiocarcinoma might derive from biliary tree stem/progenitor cells located in peribiliary glands. *Hepatology.* **55**: 2041-2042.
- Carpino F, Gaudio E, Marinozzi G, Melis M, Motta PM (1981) A scanning and transmission electron microscopic study of experimental extrahepatic cholestasis in the rat. *J Submicrosc Cytol.* **13**: 581-598.
- Chable-Montero F, Shah BSA, Montante-Montes de Oca D, Angeles-Angeles A, Henson DE, Albores-Saavedra J (2012) Thyroid-like cholangiocarcinoma of the liver: an unusual morphologic variant with follicular, trabecular and insular patterns. *Ann Hepatol.* **11**: 961-965.
- Chan LM, Lowes S, Hirst BH (2004) The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci.* **21**: 25-51.
- Chanda S, Mehendale HM (1995) Nutritional impact on the final outcome of liver injury inflicted by model hepatotoxicants: effect of glucose loading. *Faseb J.* **9**: 240-245.
- Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA (2003) Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia.* **17**: 1263-1293.
- Chapman RW (1999) Risk factors for biliary tract carcinogenesis. *Ann Oncol.* **10 Suppl 4**: 308-311.
- Chen CY, Shiesh SC, Tsao HC, Lin XZ (2002) The assessment of biliary CA 125, CA 19-9 and CEA in diagnosing cholangiocarcinoma--the influence of sampling time and hepatolithiasis. *Hepatogastroenterology.* **49**: 616-620.
- Chen F, Ma L, Al-Ansari N, Shneider B (2001) The role of AP-1 in the transcriptional regulation of the rat apical sodium-dependent bile acid transporter. *J Biol Chem.* **276**: 38703-38714.
- Chen LH, Hsu CY, Weng CF (2006) Involvement of P53 and Bax/Bad triggering apoptosis in thioacetamide-induced hepatic epithelial cells. *World J Gastroenterol.* **12**: 5175-5181.

- Chen Y, Zhang S, Sorani M, Giacomini KM (2007) Transport of paraquat by human organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion family. *J Pharmacol Exp Ther.* **322**: 695-700.
- Cheon YK, Cho YD, Moon JH, Jang JY, Kim YS, Kim YS, Lee MS, Lee JS, Shim CS (2007) Diagnostic utility of interleukin-6 (IL-6) for primary bile duct cancer and changes in serum IL-6 levels following photodynamic therapy. *Am J Gastroenterol.* **102**: 2164-2170.
- Chiang JY (2009) Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res.* **50**: 1955-1966.
- Cho WK, Boyer JL (1999a) Characterization of ion transport mechanisms involved in bombesin-stimulated biliary secretion in rat cholangiocytes. *J Hepatol.* **30**: 1045-1051.
- Cho WK, Boyer JL (1999b) Vasoactive intestinal polypeptide is a potent regulator of bile secretion from rat cholangiocytes. *Gastroenterology.* **117**: 420-428.
- Choi CW, Choi IK, Seo JH, Kim BS, Kim JS, Kim CD, Um SH, Kim JS, Kim YH (2000) Effects of 5-fluorouracil and leucovorin in the treatment of pancreatic-biliary tract adenocarcinomas. *Am J Clin Oncol.* **23**: 425-428.
- Ciarimboli G, Schlatter E (2005) Regulation of organic cation transport. *Pflugers Arch.* **449**: 423-441.
- Ciarimboli G, Struwe K, Arndt P, Gorboulev V, Koepsell H, Schlatter E, Hirsch JR (2004) Regulation of the human organic cation transporter hOCT1. *J Cell Physiol.* **201**: 420-428.
- Combettes L, Berthon B, Claret M (1992) Tauroolithocholate-induced Ca<sup>2+</sup> release is inhibited by phorbol esters in isolated hepatocytes. *Biochem J.* **287 ( Pt 3)**: 891-896.
- Craddock AL, Love MW, Daniel RW, Kirby LC, Walters HC, Wong MH, Dawson PA (1998) Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am J Physiol.* **274**: G157-169.
- Criado JJ, Dominguez MF, Medarde M, Fernandez ER, Macias RI, Marin JJ (2000) Structural characterization, kinetic studies, and in vitro biological activity of new cis-diamminebis-cholyglycinate(O,O') Pt(II) and cis-diamminebis-ursodeoxycholate(O,O') Pt(II) complexes. *Bioconjug Chem.* **11**: 167-174.
- Cruz A, Padillo FJ, Torres E, Navarrete CM, Munoz-Castaneda JR, Caballero FJ, Briceno J, Marchal T, Tunez I, Montilla P, Pera C, Muntane J (2005) Melatonin prevents experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in rats. *J Pineal Res.* **39**: 143-150.
- Czito BG, Anscher MS, Willett CG (2006) Radiation therapy in the treatment of cholangiocarcinoma. *Oncology (Williston Park).* **20**: 873-884; discussion 886-878, 893-875.
- Dashti HM, Mathew TC, Jadaon MM, Ashkanani E (1997) Zinc and liver cirrhosis: biochemical and histopathologic assessment. *Nutrition.* **13**: 206-212.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A,

- Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. **417**: 949-954.
- Dawson PA, Oelkers P (1995) Bile acid transporters. *Curr Opin Lipidol*. **6**: 109-114.
- Diamond JM (1962) The reabsorptive function of the gall-bladder. *J Physiol*. **161**: 442-473.
- Dickens D, Owen A, Alfirevic A, Giannoudis A, Davies A, Weksler B, Romero IA, Couraud PO, Pirmohamed M (2012) Lamotrigine is a substrate for OCT1 in brain endothelial cells. *Biochem Pharmacol*. **83**: 805-814.
- Dietschy JM, Moore EW (1964) Diffusion Potentials and Potassium Distribution across the Gallbladder Wall. *J Clin Invest*. **43**: 1551-1560.
- Diez-Fernandez C, Bosca L, Fernandez-Simon L, Alvarez A, Cascales M (1993) Relationship between genomic DNA ploidy and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *Hepatology*. **18**: 912-918.
- Doanes AM, Hegland DD, Sethi R, Kovesdi I, Bruder JT, Finkel T (1999) VEGF stimulates MAPK through a pathway that is unique for receptor tyrosine kinases. *Biochem Biophys Res Commun*. **255**: 545-548.
- Dominguez MF, Macias RI, Izco-Basurko I, de La Fuente A, Pascual MJ, Criado JM, Monte MJ, Yajeya J, Marin JJ (2001) Low in vivo toxicity of a novel cisplatin-ursodeoxycholic derivative (Bamet-UD2) with enhanced cytostatic activity versus liver tumors. *J Pharmacol Exp Ther*. **297**: 1106-1112.
- Druker BJ (2002) STI571 (Gleevec) as a paradigm for cancer therapy. *Trends Mol Med*. **8**: S14-18.
- Druker BJ, Lydon NB (2000) Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest*. **105**: 3-7.
- Ducreux M, Rougier P, Fandi A, Clavero-Fabri MC, Villing AL, Fassone F, Fandi L, Zarba J, Armand JP (1998) Effective treatment of advanced biliary tract carcinoma using 5-fluorouracil continuous infusion with cisplatin. *Ann Oncol*. **9**: 653-656.
- Duffaud F, Le Cesne A (2009) Imatinib in the treatment of solid tumours. *Target Oncol*. **4**: 45-56.
- Dyroff MC, Neal RA (1981) Identification of the major protein adduct formed in rat liver after thioacetamide administration. *Cancer Res*. **41**: 3430-3435.
- El-Khoueiry AB, Rankin CJ, Ben-Josef E, Lenz HJ, Gold PJ, Hamilton RD, Govindarajan R, Eng C, Blanke CD (2012) SWOG 0514: a phase II study of sorafenib in patients with unresectable or metastatic gallbladder carcinoma and cholangiocarcinoma. *Invest New Drugs*. **30**: 1646-1651.
- Elmore LW, Sirica AE (1993) "Intestinal-type" of adenocarcinoma preferentially induced in right/caudate liver lobes of rats treated with furan. *Cancer Res*. **53**: 254-259.
- El-Serag HB (2011) Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. **365**: 1118-1127.

- Endo K, Yoon BI, Pairojkul C, Demetris AJ, Sirica AE (2002) ERBB-2 overexpression and cyclooxygenase-2 up-regulation in human cholangiocarcinoma and risk conditions. *Hepatology*. **36**: 439-450.
- Errasti-Murugarren E, Pastor-Anglada M, Casado FJ (2007) Role of CNT3 in the transepithelial flux of nucleosides and nucleoside-derived drugs. *J Physiol*. **582**: 1249-1260.
- Escudier B, Lassau N, Angevin E, Soria JC, Chami L, Lamuraglia M, Zafarana E, Landreau V, Schwartz B, Brendel E, Armand JP, Robert C (2007) Phase I trial of sorafenib in combination with IFN alpha-2a in patients with unresectable and/or metastatic renal cell carcinoma or malignant melanoma. *Clin Cancer Res*. **13**: 1801-1809.
- Evans AM (2000) Influence of dietary components on the gastrointestinal metabolism and transport of drugs. *Ther Drug Monit*. **22**: 131-136.
- Evans WH (1980) A biochemical dissection of the functional polarity of the plasma membrane of the hepatocyte. *Biochim Biophys Acta*. **604**: 27-64.
- Falkson G, MacIntyre JM, Moertel CG (1984) Eastern Cooperative Oncology Group experience with chemotherapy for inoperable gallbladder and bile duct cancer. *Cancer*. **54**: 965-969.
- Fan B, Malato Y, Calvisi DF, Naqvi S, Razumilava N, Ribback S, Gores GJ, Dombrowski F, Evert M, Chen X, Willenbring H (2012) Cholangiocarcinomas can originate from hepatocytes in mice. *J Clin Invest*. **122**: 2911-2915.
- Farazi PA, DePinho RA (2006) Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer*. **6**: 674-687.
- Farhat MH, Shamseddine AI, Tawil AN, Berjawi G, Sidani C, Shamseddeen W, Barada KA (2008) Prognostic factors in patients with advanced cholangiocarcinoma: role of surgery, chemotherapy and body mass index. *World J Gastroenterol*. **14**: 3224-3230.
- Feldmann G (1986). El hígado. Histología y citología. Madrid.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. **127**: 2893-2917.
- Fitzhugh OG, Nelson AA (1948) Liver Tumors in Rats Fed Thiourea or Thioacetamide. *Science*. **108**: 626-628.
- Foo ML, Gunderson LL, Bender CE, Buskirk SJ (1997) External radiation therapy and transcatheter iridium in the treatment of extrahepatic bile duct carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. **39**: 929-935.
- Forner A, Llovet JM, Bruix J (2012) Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. **379**: 1245-1255.
- Furubo S, Harada K, Shimonishi T, Katayanagi K, Tsui W, Nakanuma Y (1999) Protein expression and genetic alterations of p53 and ras in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Histopathology*. **35**: 230-240.
- Gallo O, Bani D, Toccafondi G, Almerigogna F, Storchi OF (1992) Characterization of a novel cell line from pleomorphic adenoma of the parotid gland with myoepithelial phenotype and producing interleukin-6 as an autocrine growth factor. *Cancer*. **70**: 559-568.

- Gaudio E, Carpino G, Cardinale V, Franchitto A, Onori P, Alvaro D (2009) New insights into liver stem cells. *Dig Liver Dis.* **41**: 455-462.
- Gaudio E, Marinozzi G, Carpino F, al. E (1980) Scanning electron microscopic stereo views of rat liver following bile duct ligation. *Ultramicroscopy.* **5**: 420.
- Glaser S, Alvaro D, Ueno Y, Francis H, Marzioni M, Phinzy JL, Baumann B, Mancino MG, Venter J, LeSage G, Alpini G (2003) Gastrin reverses established cholangiocyte proliferation and enhanced secretin-stimulated ductal secretion of BDL rats by activation of apoptosis through increased expression of Ca<sup>2+</sup>- dependent PKC isoforms. *Liver Int.* **23**: 78-88.
- Gong AY, Tietz PS, Muff MA, Splinter PL, Huebert RC, Strowski MZ, Chen XM, LaRusso NF (2003) Somatostatin stimulates ductal bile absorption and inhibits ductal bile secretion in mice via SSTR2 on cholangiocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* **284**: C1205-1214.
- Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbach U, Quester S, Baumann C, Lang F, Busch AE, Koepsell H (1997) Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol.* **16**: 871-881.
- Gores GJ (2000) Early detection and treatment of cholangiocarcinoma. *Liver Transpl.* **6**: S30-34.
- Goydos JS, Brumfield AM, Frezza E, Booth A, Lotze MT, Carty SE (1998) Marked elevation of serum interleukin-6 in patients with cholangiocarcinoma: validation of utility as a clinical marker. *Ann Surg.* **227**: 398-404.
- Gray JH, Owen RP, Giacomini KM (2004) The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch.* **447**: 728-734.
- Grove MK, Hermann RE, Vogt DP, Broughan TA (1991) Role of radiation after operative palliation in cancer of the proximal bile ducts. *Am J Surg.* **161**: 454-458.
- Guicciardi ME, Gores GJ (2005) Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut.* **54**: 1024-1033.
- Gupta DN (1956) Acute changes in the liver after administration of thioacetamide. *J Pathol Bacteriol.* **72**: 183-192.
- Gupta S, Bent S, Kohlwes J (2003) Test characteristics of alpha-fetoprotein for detecting hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C. A systematic review and critical analysis. *Ann Intern Med.* **139**: 46-50.
- Gupta S, Wulf G, Henjakovic M, Koepsell H, Burckhardt G, Hagos Y (2012) Human organic cation transporter 1 is expressed in lymphoma cells and increases susceptibility to irinotecan and paclitaxel. *J Pharmacol Exp Ther.* **341**: 16-23.
- Guyton A (2000). Textbook of medical physiology.
- Hagenbuch B, Meier PJ (2004) Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch.* **447**: 653-665.
- Hahn SA, Bartsch D, Schroers A, Galehdari H, Becker M, Ramaswamy A, Schwarte-Waldhoff I, Maschek H, Schmiegel W (1998) Mutations of the DPC4/Smad4 gene in biliary tract carcinoma. *Cancer Res.* **58**: 1124-1126.

- Han C, Leng J, Demetris AJ, Wu T (2004) Cyclooxygenase-2 promotes human cholangiocarcinoma growth: evidence for cyclooxygenase-2-independent mechanism in celecoxib-mediated induction of p21waf1/cip1 and p27kip1 and cell cycle arrest. *Cancer Res.* **64**: 1369-1376.
- Han C, Wu T (2005) Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 promotes human cholangiocarcinoma cell growth and invasion through EP1 receptor-mediated activation of the epidermal growth factor receptor and Akt. *J Biol Chem.* **280**: 24053-24063.
- Hann LE, Getrajdman GI, Brown KT, Bach AM, Teitcher JB, Fong Y, Blumgart LH (1996) Hepatic lobar atrophy: association with ipsilateral portal vein obstruction. *AJR Am J Roentgenol.* **167**: 1017-1021.
- Hardell L, Bengtsson NO, Jonsson U, Eriksson S, Larsson LG (1984) Aetiological aspects on primary liver cancer with special regard to alcohol, organic solvents and acute intermittent porphyria--an epidemiological investigation. *Br J Cancer.* **50**: 389-397.
- Harlfinger S, Fork C, Lazar A, Schomig E, Grundemann D (2005) Are organic cation transporters capable of transporting prostaglandins? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **372**: 125-130.
- Hartley JL, Temple GF, Brasch MA (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res.* **10**: 1788-1795.
- Hartmann JT, Haap M, Kopp HG, Lipp HP (2009) Tyrosine kinase inhibitors - a review on pharmacology, metabolism and side effects. *Curr Drug Metab.* **10**: 470-481.
- Hasegawa J KS, Kamiike W, Shimizu S, Imazu T, Matsuda H, Tsujimoto Y. (1996) Involvement of CPP32/Yama(-like) proteases in Fas-mediated apoptosis. *Cancer Res.* **56(8)**: 1713-1718.
- Hayer M, Bonisch H, Bruss M (1999) Molecular cloning, functional characterization and genomic organization of four alternatively spliced isoforms of the human organic cation transporter 1 (hOCT1/SLC22A1). *Ann Hum Genet.* **63**: 473-482.
- Hayes PC, May L, Hayes JD, Harrison DJ (1991) Glutathione S-transferases in human liver cancer. *Gut.* **32**: 1546-1549.
- Heindryckx F, Colle I, Van Vlierberghe H (2009) Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *Int J Exp Pathol.* **90**: 367-386.
- Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H, McGreevey LS, Chen CJ, Van den Abbeele AD, Druker BJ, Kiese B, Eisenberg B, Roberts PJ, Singer S, Fletcher CD, Silberman S, Dimitrijevic S, Fletcher JA (2003) Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol.* **21**: 4342-4349.
- Heise M, Lautem A, Knapstein J, Schattenberg JM, Hoppe-Lotichius M, Foltys D, Weiler N, Zimmermann A, Schad A, Grundemann D, Otto G, Galle PR, Schuchmann M, Zimmermann T (2012) Downregulation of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) in human hepatocellular carcinoma and their prognostic significance. *BMC Cancer.* **12**: 109.

- Herrera R, Sebolt-Leopold JS (2002) Unraveling the complexities of the Raf/MAP kinase pathway for pharmacological intervention. *Trends Mol Med.* **8**: S27-31.
- Hiley C, Fryer A, Bell J, Hume R, Strange RC (1988) The human glutathione S-transferases. Immunohistochemical studies of the developmental expression of Alpha- and Pi-class isoenzymes in liver. *Biochem J.* **254**: 255-259.
- Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL (2005) The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer.* **41**: 2502-2512.
- Hofmann AF (1988). The liver: Biology and Pathobiology. New York, Raven Press.
- Hofmann AF (2007) Biliary secretion and excretion in health and disease: current concepts. *Ann Hepatol.* **6**: 15-27.
- Hood JD, Bednarski M, Frausto R, Guccione S, Reisfeld RA, Xiang R, Cheresch DA (2002) Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science.* **296**: 2404-2407.
- Huang Y, Anderle P, Bussey KJ, Barbacioru C, Shankavaram U, Dai Z, Reinhold WC, Papp A, Weinstein JN, Sadee W (2004) Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res.* **64**: 4294-4301.
- Huether A, Hopfner M, Baradari V, Schuppan D, Scherubl H (2007) Sorafenib alone or as combination therapy for growth control of cholangiocarcinoma. *Biochem Pharmacol.* **73**: 1308-1317.
- Huether A, Hopfner M, Sutter AP, Baradari V, Schuppan D, Scherubl H (2006) Signaling pathways involved in the inhibition of epidermal growth factor receptor by erlotinib in hepatocellular cancer. *World J Gastroenterol.* **12**: 5160-5167.
- Hunter AL, Holscher MA, Neal RA (1977) Thioacetamide-induced hepatic necrosis. I. Involvement of the mixed-function oxidase enzyme system. *J Pharmacol Exp Ther.* **200**: 439-448.
- Hunter J, Hirst BH, Simmons NL (1991) Epithelial secretion of vinblastine by human intestinal adenocarcinoma cell (HCT-8 and T84) layers expressing P-glycoprotein. *Br J Cancer.* **64**: 437-444.
- Hylemon PB, Zhou H, Pandak WM, Ren S, Gil G, Dent P (2009) Bile acids as regulatory molecules. *J Lipid Res.* **50**: 1509-1520.
- Imai Y, Asada S, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, Sugimoto Y (2003) Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens. *Mol Pharmacol.* **64**: 610-618.
- Isa T, Tomita S, Nakachi A, Miyazato H, Shimoji H, Kusano T, Muto Y, Furukawa M (2002) Analysis of microsatellite instability, K-ras gene mutation and p53 protein overexpression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatogastroenterology.* **49**: 604-608.
- Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I (2002) Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**: 14298-14302.

- Ishii M, Vroman B, LaRusso NF (1989) Isolation and morphologic characterization of bile duct epithelial cells from normal rat liver. *Gastroenterology*. **97**: 1236-1247.
- Ishimura N, Bronk SF, Gores GJ (2004) Inducible nitric oxide synthase upregulates cyclooxygenase-2 in mouse cholangiocytes promoting cell growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **287**: G88-95.
- Itoda M, Saito Y, Maekawa K, Hichiya H, Komamura K, Kamakura S, Kitakaze M, Tomoike H, Ueno K, Ozawa S, Sawada J (2004) Seven novel single nucleotide polymorphisms in the human SLC22A1 gene encoding organic cation transporter 1 (OCT1). *Drug Metab Pharmacokinet*. **19**: 308-312.
- Jaiswal M, LaRusso NF, Burgart LJ, Gores GJ (2000) Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res*. **60**: 184-190.
- Jaiswal M, LaRusso NF, Gores GJ (2001) Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **281**: G626-634.
- Janvilisri T, Shahi S, Venter H, Balakrishnan L, van Veen HW (2005) Arginine-482 is not essential for transport of antibiotics, primary bile acids and unconjugated sterols by the human breast cancer resistance protein (ABCG2). *Biochem J*. **385**: 419-426.
- Jarnagin WR, Fong Y, DeMatteo RP, Gonen M, Burke EC, Bodniewicz BJ, Youssef BM, Klimstra D, Blumgart LH (2001) Staging, resectability, and outcome in 225 patients with hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg*. **234**: 507-517; discussion 517-509.
- Ji J, Shi J, Budhu A, Yu Z, Forgues M, Roessler S, Ambis S, Chen Y, Meltzer PS, Croce CM, Qin LX, Man K, Lo CM, Lee J, Ng IO, Fan J, Tang ZY, Sun HC, Wang XW (2009) MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer. *N Engl J Med*. **361**: 1437-1447.
- Johnson LG (2005) Applications of imaging techniques to studies of epithelial tight junctions. *Adv Drug Deliv Rev*. **57**: 111-121.
- Jones DV, Jr., Lozano R, Hoque A, Markowitz A, Patt YZ (1996) Phase II study of paclitaxel therapy for unresectable biliary tree carcinomas. *J Clin Oncol*. **14**: 2306-2310.
- Jonker JW, Schinkel AH (2004) Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J Pharmacol Exp Ther*. **308**: 2-9.
- Jung D, Fried M, Kullak-Ublick GA (2002) Human apical sodium-dependent bile salt transporter gene (SLC10A2) is regulated by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem*. **277**: 30559-30566.
- Jung N, Lehmann C, Rubbert A, Knispel M, Hartmann P, van Lunzen J, Stellbrink HJ, Faetkenheuer G, Taubert D (2008) Relevance of the organic cation transporters 1 and 2 for antiretroviral drug therapy in human immunodeficiency virus infection. *Drug Metab Dispos*. **36**: 1616-1623.
- Kang YK, Kim WH, Lee HW, Lee HK, Kim YI (1999) Mutation of p53 and K-ras, and loss of heterozygosity of APC in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Lab Invest*. **79**: 477-483.



- Kanno N, LeSage G, Glaser S, Alvaro D, Alpini G (2000) Functional heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *Hepatology*. **31**: 555-561.
- Kawahara N, Ono M, Taguchi K, Okamoto M, Shimada M, Takenaka K, Hayashi K, Mosher DF, Sugimachi K, Tsuneyoshi M, Kuwano M (1998) Enhanced expression of thrombospondin-1 and hypovascularity in human cholangiocarcinoma. *Hepatology*. **28**: 1512-1517.
- Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, Fukusumi S, Habata Y, Itoh T, Shintani Y, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M (2003) A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem*. **278**: 9435-9440.
- Keitel V, Cupisti K, Ullmer C, Knoefel WT, Kubitz R, Haussinger D (2009) The membrane-bound bile acid receptor TGR5 is localized in the epithelium of human gallbladders. *Hepatology*. **50**: 861-870.
- Keitel V, Haussinger D (2011) TGR5 in the biliary tree. *Dig Dis*. **29**: 45-47.
- Keitel V, Haussinger D (2012) Perspective: TGR5 (Gpbar-1) in liver physiology and disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. **36**: 412-419.
- Kelley S (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc*. **4(3)**: 363-371.
- Kerb R, Brinkmann U, Chatskaia N, Gorbunov D, Gorboulev V, Mornhinweg E, Keil A, Eichelbaum M, Koepsell H (2002) Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences. *Pharmacogenetics*. **12**: 591-595.
- Kerb R, Hoffmeyer S, Brinkmann U (2001) ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2. *Pharmacogenomics*. **2**: 51-64.
- Khan SA, Davidson BR, Goldin R, Pereira SP, Rosenberg WM, Taylor-Robinson SD, Thillainayagam AV, Thomas HC, Thursz MR, Wasan H (2002) Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: consensus document. *Gut*. **51 Suppl 6**: VI1-9.
- Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD (2005) Cholangiocarcinoma. *Lancet*. **366**: 1303-1314.
- Kiba T, Nishimura T, Matsumoto S, Hatano E, Mori A, Yasumi S, Doi R, Ikai I, Kitano T, Nishimura T, Yoshikawa K, Ishiguro H, Yanagihara K, Doi E, Teramukai S, Fukushima M (2006) Single-agent gemcitabine for biliary tract cancers. Study outcomes and systematic review of the literature. *Oncology*. **70**: 358-365.
- Kim DH, Sriharsha L, Xu W, Kamel-Reid S, Liu X, Siminovitch K, Messner HA, Lipton JH (2009) Clinical relevance of a pharmacogenetic approach using multiple candidate genes to predict response and resistance to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. **15**: 4750-4758.
- Kim MK, Shim CK (2006) The transport of organic cations in the small intestine: current knowledge and emerging concepts. *Arch Pharm Res*. **29**: 605-616.

- Kimura H, Takeda M, Narikawa S, Enomoto A, Ichida K, Endou H (2002) Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal transport of prostaglandins. *J Pharmacol Exp Ther.* **301**: 293-298.
- Kimura N, Masuda S, Katsura T, Inui K (2009) Transport of guanidine compounds by human organic cation transporters, hOCT1 and hOCT2. *Biochem Pharmacol.* **77**: 1429-1436.
- Klatskin G (1965) Adenocarcinoma of the Hepatic Duct at Its Bifurcation within the Porta Hepatis. an Unusual Tumor with Distinctive Clinical and Pathological Features. *Am J Med.* **38**: 241-256.
- Kobayashi M, Ikeda K, Saitoh S, Suzuki F, Tsubota A, Suzuki Y, Arase Y, Murashima N, Chayama K, Kumada H (2000) Incidence of primary cholangiocellular carcinoma of the liver in Japanese patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. *Cancer.* **88**: 2471-2477.
- Koehler MR, Wissinger B, Gorboulev V, Koepsell H, Schmid M (1997) The two human organic cation transporter genes SLC22A1 and SLC22A2 are located on chromosome 6q26. *Cytogenet Cell Genet.* **79**: 198-200.
- Koepsell H (1998) Organic cation transporters in intestine, kidney, liver, and brain. *Annu Rev Physiol.* **60**: 243-266.
- Koepsell H (2004) Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs. *Trends Pharmacol Sci.* **25**: 375-381.
- Koepsell H (2013) The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Mol Aspects Med.* **34**: 413-435.
- Koepsell H, Lips K, Volk C (2007) Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res.* **24**: 1227-1251.
- Kolch W (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.* **351 Pt 2**: 289-305.
- Komuta M, Govaere O, Vandecaveye V, Akiba J, Van Steenberg W, Verslype C, Laleman W, Pirenne J, Aerts R, Yano H, Nevens F, Topal B, Roskams T (2012) Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes. *Hepatology.* **55**: 1876-1888.
- Kosters A, Karpen SJ (2010) The role of inflammation in cholestasis: clinical and basic aspects. *Semin Liver Dis.* **30**: 186-194.
- Kubo S, Kinoshita H, Hirohashi K, Hamba H (1995) Hepatolithiasis associated with cholangiocarcinoma. *World J Surg.* **19**: 637-641.
- Kullak-Ublick GA, Beuers U, Paumgartner G (1996) Molecular and functional characterization of bile acid transport in human hepatoblastoma HepG2 cells. *Hepatology.* **23**: 1053-1060.
- Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ (2004) Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology.* **126**: 322-342.
- Kusuhara H, Sugiyama Y (2007) ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflugers Arch.* **453**: 735-744.
- Lai GH, Radaeva S, Nakamura T, Sirica AE (2000) Unique epithelial cell production of hepatocyte growth factor/scatter factor by putative precancerous intestinal

- metaplasias and associated "intestinal-type" biliary cancer chemically induced in rat liver. *Hepatology*. **31**: 1257-1265.
- Lai GH, Zhang Z, Shen XN, Ward DJ, Dewitt JL, Holt SE, Rozich RA, Hixson DC, Sirica AE (2005) erbB-2/neu transformed rat cholangiocytes recapitulate key cellular and molecular features of human bile duct cancer. *Gastroenterology*. **129**: 2047-2057.
- Laible M, Boonrod K (2009) Homemade site directed mutagenesis of whole plasmids. *J Vis Exp*.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. **219**: 979-980.
- LaRocca RV, Hicks MD, Mull L, Foreman B (2007) Effective palliation of advanced cholangiocarcinoma with sorafenib: a two-patient case report. *J Gastrointest Cancer*. **38**: 154-156.
- Larusso NF, Masyuk TV (2011) The role of cilia in the regulation of bile flow. *Dig Dis*. **29**: 6-12.
- Lau SK, Prakash S, Geller SA, Alsabeh R (2002) Comparative immunohistochemical profile of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and metastatic adenocarcinoma. *Hum Pathol*. **33**: 1175-1181.
- Lautem A, Heise M, Grasel A, Hoppe-Lotichius M, Weiler N, Foltys D, Knapstein J, Schattenberg JM, Schad A, Zimmermann A, Otto G, Lang H, Galle PR, Schuchmann M, Zimmermann T (2013) Downregulation of organic cation transporter 1 (SLC22A1) is associated with tumor progression and reduced patient survival in human cholangiocellular carcinoma. *Int J Oncol*. **42**: 1297-1304.
- Lazaridis KN, Gores GJ (2005) Cholangiocarcinoma. *Gastroenterology*. **128**: 1655-1667.
- Lazaridis KN, Pham L, Tietz P, Marinelli RA, deGroen PC, Levine S, Dawson PA, LaRusso NF (1997) Rat cholangiocytes absorb bile acids at their apical domain via the ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Clin Invest*. **100**: 2714-2721.
- Leabman MK, Huang CC, DeYoung J, Carlson EJ, Taylor TR, de la Cruz M, Johns SJ, Stryke D, Kawamoto M, Urban TJ, Kroetz DL, Ferrin TE, Clark AG, Risch N, Herskowitz I, Giacomini KM (2003) Natural variation in human membrane transporter genes reveals evolutionary and functional constraints. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**: 5896-5901.
- Lee J, Azzaroli F, Wang L, Soroka CJ, Gigliozzi A, Setchell KD, Kramer W, Boyer JL (2001) Adaptive regulation of bile salt transporters in kidney and liver in obstructive cholestasis in the rat. *Gastroenterology*. **121**: 1473-1484.
- Lee JH, Rim HJ, Bak UB (1993) Effect of Clonorchis sinensis infection and dimethylnitrosamine administration on the induction of cholangiocarcinoma in Syrian golden hamsters. *Korean J Parasitol*. **31**: 21-30.
- Lee MA, Woo IS, Kang JH, Hong YS, Lee KS (2004) Epirubicin, cisplatin, and protracted infusion of 5-FU (ECF) in advanced intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. **130**: 346-350.
- Lee W, Glaeser H, Smith LH, Roberts RL, Moeckel GW, Gervasini G, Leake BF, Kim RB (2005) Polymorphisms in human organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2): implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry. *J Biol Chem*. **280**: 9610-9617.

- Lee WK, Wolff NA, Thevenod F (2009) Organic cation transporters: physiology, toxicology and special focus on ethidium as a novel substrate. *Curr Drug Metab.* **10**: 617-631.
- Lemos C, Faria A, Meireles M, Martel F, Monteiro R, Calhau C (2012) Thiamine is a substrate of organic cation transporters in Caco-2 cells. *Eur J Pharmacol.* **682**: 37-42.
- Lenzen R, Elster J, Behrend C, Hampel KE, Bechstein WO, Neuhaus P (1997) Bile acid-independent bile flow is differently regulated by glucagon and secretin in humans after orthotopic liver transplantation. *Hepatology.* **26**: 1272-1281.
- LeSage G, Glaser S, Alpini G (2001) Regulation of cholangiocyte proliferation. *Liver.* **21**: 73-80.
- Lesage GD, Marucci L, Alvaro D, Glaser SS, Benedetti A, Marzioni M, Patel T, Francis H, Phinizy JL, Alpini G (2002) Insulin inhibits secretin-induced ductal secretion by activation of PKC alpha and inhibition of PKA activity. *Hepatology.* **36**: 641-651.
- Lesurtel M, Regimbeau JM, Farges O, Colombat M, Sauvanet A, Belghiti J (2002) Intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatolithiasis: an unusual association in Western countries. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* **14**: 1025-1027.
- Levi S, Urbano-Ispizua A, Gill R, Thomas DM, Gilbertson J, Foster C, Marshall CJ (1991) Multiple K-ras codon 12 mutations in cholangiocarcinomas demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique. *Cancer Res.* **51**: 3497-3502.
- Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, Wilhelm S, Lynch M, Carter C (2006) Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res.* **66**: 11851-11858.
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Haussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J (2008) Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* **359**: 378-390.
- Lodi C, Szabo E, Holczbauer A, Batmunkh E, Szijarto A, Kupcsulik P, Kovalszky I, Paku S, Illyes G, Kiss A, Schaff Z (2006) Claudin-4 differentiates biliary tract cancers from hepatocellular carcinomas. *Mod Pathol.* **19**: 460-469.
- Lokker NA, Sullivan CM, Hollenbach SJ, Israel MA, Giese NA (2002) Platelet-derived growth factor (PDGF) autocrine signaling regulates survival and mitogenic pathways in glioblastoma cells: evidence that the novel PDGF-C and PDGF-D ligands may play a role in the development of brain tumors. *Cancer Res.* **62**: 3729-3735.
- Lowenfels AB, Norman J (1978) Isoniazid and bile duct cancer. *Jama.* **240**: 434-435.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**: 265-275.
- Ludwig J (1987) New concepts in biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis.* **7**: 293-301.
- Macias RI, El-Mir MY, Monte MJ, Serrano MA, Garcia MJ, Marin JJ (1999) Cholephilic characteristics of a new cytostatic complex of cisplatin with glycocholate (Bamet-R2). *J Control Release.* **57**: 161-169.

- Macias RI, Hierro C, de Juan SC, Jimenez F, Gonzalez-San Martin F, Marin JJ (2011) Hepatic expression of sodium-dependent vitamin C transporters: ontogeny, subtissular distribution and effect of chronic liver diseases. *Br J Nutr.* **106**: 1814-1825.
- Macias RI, Monte MJ, El-Mir MY, Villanueva GR, Marin JJ (1998) Transport and biotransformation of the new cytostatic complex cis-diammineplatinum(II)-chlorocholyglycinate (Bamet-R2) by the rat liver. *J Lipid Res.* **39**: 1792-1798.
- Macias RI, Pascual MJ, Bravo A, Alcalde MP, Larena MG, St-Pierre MV, Serrano MA, Marin JJ (2000) Effect of maternal cholestasis on bile acid transfer across the rat placenta-maternal liver tandem. *Hepatology.* **31**: 975-983.
- Maeda T, Adachi E, Kajiyama K, Sugimachi K, Tsuneyoshi M (1995) Combined hepatocellular and cholangiocarcinoma: proposed criteria according to cytokeratin expression and analysis of clinicopathologic features. *Hum Pathol.* **26**: 956-964.
- Magne N, Fischel JL, Dubreuil A, Formento P, Poupon MF, Laurent-Puig P, Milano G (2002) Influence of epidermal growth factor receptor (EGFR), p53 and intrinsic MAP kinase pathway status of tumour cells on the antiproliferative effect of ZD1839 ("Iressa"). *Br J Cancer.* **86**: 1518-1523.
- Malumbres M, Barbacid M (2003) RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer.* **3**: 459-465.
- Mangipudy RS, Chanda S, Mehendale HM (1995) Tissue repair response as a function of dose in thioacetamide hepatotoxicity. *Environ Health Perspect.* **103**: 260-267.
- Mangipudy RS, Chanda S, Mehendale HM (1995a) Hepatocellular regeneration: key to thioacetamide autoprotection. *Pharmacol Toxicol.* **77**: 182-188.
- Marin JJ, Briz O, Perez MJ, Romero MR, Monte MJ (2009) Hepatobiliary transporters in the pharmacology and toxicology of anticancer drugs. *Front Biosci.* **14**: 4257-4280.
- Marin JJ, Castaño B., Martinez-Becerra P., Rosales R., Monte M.J. (2008) Chemotherapy in the treatment of primary liver tumours. *Cancer Therapy.* **6**: 711-728.
- Marin JJ, Herrera MC, Palomero MF, Macias RI, Monte MJ, El-Mir MY, Villanueva GR (1998a) Rat liver transport and biotransformation of a cytostatic complex of bis-cholyglycinate and platinum (II). *J Hepatol.* **28**: 417-425.
- Marin JJ, Macias RI, Criado JJ, Bueno A, Monte MJ, Serrano MA (1998b) DNA interaction and cytostatic activity of the new liver organotropic complex of cisplatin with glycocholic acid: Bamet-R2. *Int J Cancer.* **78**: 346-352.
- Marin JJ, Mangas D, Martinez-Diez MC, El-Mir MY, Briz O, Serrano MA (2003) Sensitivity of bile acid transport by organic anion-transporting polypeptides to intracellular pH. *Biochim Biophys Acta.* **1611**: 249-257.
- Marin JJ, Romero MR, Briz O (2010) Molecular bases of liver cancer refractoriness to pharmacological treatment. *Curr Med Chem.* **17**: 709-740.
- Marinelli RA, Tietz PS, Pham LD, Rueckert L, Agre P, LaRusso NF (1999) Secretin induces the apical insertion of aquaporin-1 water channels in rat cholangiocytes. *Am J Physiol.* **276**: G280-286.

- Markwell MA HS, Bieber LL, Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem.* **87**: 206-210.
- Maronpot RR, Giles HD, Dykes DJ, Irwin RD (1991) Furan-induced hepatic cholangiocarcinomas in Fischer 344 rats. *Toxicol Pathol.* **19**: 561-570.
- Marshall CJ (1994) MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev.* **4**: 82-89.
- Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SJ (1995) A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul.* **5**: 69-84.
- Martel F, Keating E, Calhau C, Grundemann D, Schomig E, Azevedo I (2001) Regulation of human extraneuronal monoamine transporter (hEMT) expressed in HEK293 cells by intracellular second messenger systems. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **364**: 487-495.
- Martin B, Ruellan JM, Angulo JF, Devoret R, Claverys JP (1992) Identification of the recA gene of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* **20**: 6412.
- Martinez-Becerra P, Vaquero J, Romero MR, Lozano E, Anadon C, Macias RI, Serrano MA, Grane-Boladeras N, Munoz-Bellvis L, Alvarez L, Sangro B, Pastor-Anglada M, Marin JJ (2012) No Correlation between the Expression of FXR and Genes Involved in Multidrug Resistance Phenotype of Primary Liver Tumors. *Mol Pharm.* **9**: 1693-1704.
- Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, Tamai Y, Okada H, Sugiyama E, Nakamura T, Itadani H, Tanaka K (2002) Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun.* **298**: 714-719.
- Marzioni M, Alpini G, Saccomanno S, Candelaresi C, Venter J, Rychlicki C, Fava G, Francis H, Trozzi L, Benedetti A (2009) Exendin-4, a glucagon-like peptide 1 receptor agonist, protects cholangiocytes from apoptosis. *Gut.* **58**: 990-997.
- Mashige F, Imai K, Osuga T (1976) A simple and sensitive assay of total serum bile acids. *Clin Chim Acta.* **70**: 79-86.
- Masyuk TV, Huang BQ, Ward CJ, Masyuk AI, Yuan D, Splinter PL, Punyashtithi R, Ritman EL, Torres VE, Harris PC, LaRusso NF (2003) Defects in cholangiocyte fibrocystin expression and ciliary structure in the PCK rat. *Gastroenterology.* **125**: 1303-1310.
- Masyuk TV, Ritman EL, LaRusso NF (2001) Quantitative assessment of the rat intrahepatic biliary system by three-dimensional reconstruction. *Am J Pathol.* **158**: 2079-2088.
- McLean L, Patel T (2006) Racial and ethnic variations in the epidemiology of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Liver Int.* **26**: 1047-1053.
- Meadows KN, Bryant P, Pumiglia K (2001) Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation. *J Biol Chem.* **276**: 49289-49298.
- Meerman L, Koopen NR, Bloks V, Van Goor H, Havinga R, Wolthers BG, Kramer W, Stengelin S, Muller M, Kuipers F, Jansen PL (1999) Biliary fibrosis associated with altered bile composition in a mouse model of erythropoietic protoporphyria. *Gastroenterology.* **117**: 696-705.

- Meier PJ (1988) Transport polarity of hepatocytes. *Semin Liver Dis.* **8**: 293-307.
- Meier PJ, Stieger B (2002) Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol.* **64**: 635-661.
- Meijer DK, Mol WE, Muller M, Kurz G (1990) Carrier-mediated transport in the hepatic distribution and elimination of drugs, with special reference to the category of organic cations. *J Pharmacokinet Biopharm.* **18**: 35-70.
- Mekhjjan HS, Phillips SF, Hofmann AF (1979) Colonic absorption of unconjugated bile acids: perfusion studies in man. *Dig Dis Sci.* **24**: 545-550.
- Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, Schreck RE, Abrams TJ, Ngai TJ, Lee LB, Murray LJ, Carver J, Chan E, Moss KG, Haznedar JO, Sukbuntherng J, Blake RA, Sun L, Tang C, Miller T, Shirazian S, McMahon G, Cherrington JM (2003) In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res.* **9**: 327-337.
- Mennone A, Biemesderfer D, Negoianu D, Yang CL, Abbiati T, Schultheis PJ, Shull GE, Aronson PS, Boyer JL (2001) Role of sodium/hydrogen exchanger isoform NHE3 in fluid secretion and absorption in mouse and rat cholangiocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **280**: G247-254.
- Meyer CG, Penn I, James L (2000) Liver transplantation for cholangiocarcinoma: results in 207 patients. *Transplantation.* **69**: 1633-1637.
- Meyer-Wentrup F, Karbach U, Gorboulev V, Arndt P, Koepsell H (1998) Membrane localization of the electrogenic cation transporter rOCT1 in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* **248**: 673-678.
- Michalopoulos GK, DeFrances MC (1997) Liver regeneration. *Science.* **276**: 60-66.
- Mignatti P, Rifkin DB (1993) Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev.* **73**: 161-195.
- Minematsu T, Giacomini KM (2011) Interactions of tyrosine kinase inhibitors with organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion proteins. *Mol Cancer Ther.* **10**: 531-539.
- Minematsu T, Iwai M, Sugimoto K, Shirai N, Nakahara T, Usui T, Kamimura H (2009) Carrier-mediated uptake of 1-(2-methoxyethyl)-2-methyl-4,9-dioxo-3-(pyrazin-2-ylmethyl)-4,9-dihydro-1H-naphtho[2,3-d]imidazolium bromide (YM155 monobromide), a novel small-molecule survivin suppressant, into human solid tumor and lymphoma cells. *Drug Metab Dispos.* **37**: 619-628.
- Mitacek EJ, Brunnemann KD, Hoffmann D, Limsila T, Suttajit M, Martin N, Caplan LS (1999) Volatile nitrosamines and tobacco-specific nitrosamines in the smoke of Thai cigarettes: a risk factor for lung cancer and a suspected risk factor for liver cancer in Thailand. *Carcinogenesis.* **20**: 133-137.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* **31**: 11-24.

- Monte MJ, Ballester MR, Briz O, Perez MJ, Marin JJ (2005) Proapoptotic effect on normal and tumor intestinal cells of cytostatic drugs with enterohepatic organotropism. *J Pharmacol Exp Ther.* **315**: 24-35.
- Monte MJ, Dominguez S, Palomero MF, Macias RI, Marin JJ (1999) Further evidence of the usefulness of bile acids as molecules for shuttling cytostatic drugs toward liver tumors. *J Hepatol.* **31**: 521-528.
- More SS, Li S, Yee SW, Chen L, Xu Z, Jablons DM, Giacomini KM (2010) Organic cation transporters modulate the uptake and cytotoxicity of picoplatin, a third-generation platinum analogue. *Mol Cancer Ther.* **9**: 1058-1069.
- Mouzas IA, Dimoulios P, Vlachonikolis IG, Skordilis P, Zoras O, Kouroumalis E (2002) Increasing incidence of cholangiocarcinoma in Crete 1992-2000. *Anticancer Res.* **22**: 3637-3641.
- Mulgaonkar A, Venitz J, Grundemann D, Sweet DH (2013) Human Organic Cation Transporters 1 (SLC22A1), 2 (SLC22A2), and 3 (SLC22A3) as Disposition Pathways for Fluoroquinolone Antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother.* **57**: 2705-2711.
- Muller M, Jansen PL (1997) Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am J Physiol.* **272**: G1285-1303.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **51 Pt 1**: 263-273.
- Nair PP, Davis KE, Shami S, Lagerholm S (2000) The induction of SOS function in Escherichia coli K-12/PQ37 by 4-nitroquinoline oxide (4-NQO) and fecapentaenes-12 and -14 is bile salt sensitive: implications for colon carcinogenesis. *Mutat Res.* **447**: 179-185.
- Nakanuma Y, Sato Y, Harada K, Sasaki M, Xu J, Ikeda H (2010) Pathological classification of intrahepatic cholangiocarcinoma based on a new concept. *World J Hepatol.* **2**: 419-427.
- Nardinelli L, Sanabani SS, Didone A, Ferreira Pde B, Serpa M, Novaes MM, Marchiani M, Ruiz AL, Lima IS, Chamone Dde A, Bendit I (2012) Pretherapeutic expression of the hOCT1 gene predicts a complete molecular response to imatinib mesylate in chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol.* **127**: 228-234.
- Narimatsu H, Iwasaki H, Nakayama F, Ikehara Y, Kudo T, Nishihara S, Sugano K, Okura H, Fujita S, Hirohashi S (1998) Lewis and secretor gene dosages affect CA19-9 and DU-PAN-2 serum levels in normal individuals and colorectal cancer patients. *Cancer Res.* **58**: 512-518.
- Nehls O, Gregor M, Klump B (2004) Serum and bile markers for cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis.* **24**: 139-154.
- Newell P, Villanueva A, Friedman SL, Koike K, Llovet JM (2008) Experimental models of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* **48**: 858-879.
- Nies AT, Koepsell H, Winter S, Burk O, Klein K, Kerb R, Zanger UM, Keppler D, Schwab M, Schaeffeler E (2009) Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology.* **50**: 1227-1240.



- Nomoto K, Tsuneyama K, Cheng C, Takahashi H, Hori R, Murai Y, Takano Y (2006) Intrahepatic cholangiocarcinoma arising in cirrhotic liver frequently expressed p63-positive basal/stem-cell phenotype. *Pathol Res Pract.* **202**: 71-76.
- Nozawa T, Minami H, Sugiura S, Tsuji A, Tamai I (2005) Role of organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: in vitro evidence and effect of single nucleotide polymorphisms. *Drug Metab Dispos.* **33**: 434-439.
- Nzeako UC, Guicciardi ME, Yoon JH, Bronk SF, Gores GJ (2002) COX-2 inhibits Fas-mediated apoptosis in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology.* **35**: 552-559.
- Oelkers P, Kirby LC, Heubi JE, Dawson PA (1997) Primary bile acid malabsorption caused by mutations in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene (SLC10A2). *J Clin Invest.* **99**: 1880-1887.
- Okabe M, Szakacs G, Reimers MA, Suzuki T, Hall MD, Abe T, Weinstein JN, Gottesman MM (2008) Profiling SLCO and SLC22 genes in the NCI-60 cancer cell lines to identify drug uptake transporters. *Mol Cancer Ther.* **7**: 3081-3091.
- Okada K, Shimizu Y, Nambu S, Higuchi K, Watanabe A (1994) Interleukin-6 functions as an autocrine growth factor in a cholangiocarcinoma cell line. *J Gastroenterol Hepatol.* **9**: 462-467.
- Okuda K, Nakanuma Y, Miyazaki M (2002) Cholangiocarcinoma: recent progress. Part 2: molecular pathology and treatment. *J Gastroenterol Hepatol.* **17**: 1056-1063.
- Olnes MJ, Erlich R (2004) A review and update on cholangiocarcinoma. *Oncology.* **66**: 167-179.
- Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H (2004) EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**: 13306-13311.
- Patel T (2001) Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Hepatology.* **33**: 1353-1357.
- Patel T (2006) Cholangiocarcinoma. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* **3**: 33-42.
- Patt YZ, Hassan MM, Lozano RD, Waugh KA, Hoque AM, Frome AI, Lahoti S, Ellis L, Vauthey JN, Curley SA, Schnirer, II, Raijman I (2001) Phase II trial of cisplatin, interferon alpha-2b, doxorubicin, and 5-fluorouracil for biliary tract cancer. *Clin Cancer Res.* **7**: 3375-3380.
- Patt YZ, Jones DV, Jr., Hoque A, Lozano R, Markowitz A, Raijman I, Lynch P, Charnsangavej C (1996) Phase II trial of intravenous fluorouracil and subcutaneous interferon alfa-2b for biliary tract cancer. *J Clin Oncol.* **14**: 2311-2315.
- Patyna S, Laird AD, Mendel DB, O'Farrell A M, Liang C, Guan H, Vojtkovsky T, Vasile S, Wang X, Chen J, Grazzini M, Yang CY, Haznedar JO, Sukbuntherng J, Zhong WZ, Cherrington JM, Hu-Lowe D (2006) SU14813: a novel multiple receptor tyrosine kinase inhibitor with potent antiangiogenic and antitumor activity. *Mol Cancer Ther.* **5**: 1774-1782.
- Philip PA, Mahoney MR, Allmer C, Thomas J, Pitot HC, Kim G, Donehower RC, Fitch T, Picus J, Erlichman C (2005) Phase II study of Erlotinib (OSI-774) in patients with advanced hepatocellular cancer. *J Clin Oncol.* **23**: 6657-6663.

- Pinter M, Sieghart W, Reisinger M, Wrba F, Peck-Radosavljevic M (2011) Sorafenib in unresectable intrahepatic cholangiocellular carcinoma: a case report. *Wien Klin Wochenschr.* **123**: 61-64.
- Pitt HA, Nakeeb A, Abrams RA, Coleman J, Piantadosi S, Yeo CJ, Lillemore KD, Cameron JL (1995) Perihilar cholangiocarcinoma. Postoperative radiotherapy does not improve survival. *Ann Surg.* **221**: 788-797; discussion 797-788.
- Pols TW, Noriega LG, Nomura M, Auwerx J, Schoonjans K (2011) The bile acid membrane receptor TGR5 as an emerging target in metabolism and inflammation. *J Hepatol.* **54**: 1263-1272.
- Porcell AI, De Young BR, Proca DM, Frankel WL (2000) Immunohistochemical analysis of hepatocellular and adenocarcinoma in the liver: MOC31 compares favorably with other putative markers. *Mod Pathol.* **13**: 773-778.
- Porter WR, Gudzinowicz MJ, Neal RA (1979) Thioacetamide-induced hepatic necrosis. II. Pharmacokinetics of thioacetamide and thioacetamide-S-oxide in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* **208**: 386-391.
- Porter WR, Neal RA (1978) Metabolism of thioacetamide and thioacetamide S-oxide by rat liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* **6**: 379-388.
- Porzgen P, Bonisch H, Hammermann R, Bruss M (1998) The human noradrenaline transporter gene contains multiple polyadenylation sites and two alternatively spliced C-terminal exons. *Biochim Biophys Acta.* **1398**: 365-370.
- Praet MM, Roels HJ (1984) Histogenesis of cholangiomas and cholangiocarcinomas in thioacetamide fed rats. *Exp Pathol.* **26**: 3-14.
- Raderer M, Hejna MH, Valencak JB, Kornek GV, Weinlander GS, Bareck E, Lenauer J, Brodowicz T, Lang F, Scheithauer W (1999) Two consecutive phase II studies of 5-fluorouracil/leucovorin/mitomycin C and of gemcitabine in patients with advanced biliary cancer. *Oncology.* **56**: 177-180.
- Reymann A, Braun W, Drobik C, Woermann C (1989) Stimulation of bile acid active transport related to increased mucosal cyclic AMP content in rat ileum in vitro. *Biochim Biophys Acta.* **1011**: 158-164.
- Ritzel MW, Ng AM, Yao SY, Graham K, Loewen SK, Smith KM, Hyde RJ, Karpinski E, Cass CE, Baldwin SA, Young JD (2001) Recent molecular advances in studies of the concentrative Na<sup>+</sup>-dependent nucleoside transporter (CNT) family: identification and characterization of novel human and mouse proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *Mol Membr Biol.* **18**: 65-72.
- Roodhart JM, Langenberg MH, Witteveen E, Voest EE (2008) The molecular basis of class side effects due to treatment with inhibitors of the VEGF/VEGFR pathway. *Curr Clin Pharmacol.* **3**: 132-143.
- Rosenzweig SA (2012) Acquired resistance to drugs targeting receptor tyrosine kinases. *Biochem Pharmacol.* **83**: 1041-1048.

- Saborowski M, Kullak-Ublick GA, Eloranta JJ (2006) The human organic cation transporter-1 gene is transactivated by hepatocyte nuclear factor-4alpha. *J Pharmacol Exp Ther.* **317**: 778-785.
- Sahani D, Prasad SR, Tannabe KK, Hahn PF, Mueller PR, Saini S (2003) Thorotrast-induced cholangiocarcinoma: case report. *Abdom Imaging.* **28**: 72-74.
- Sai Y, Tsuji A (2004) Transporter-mediated drug delivery: recent progress and experimental approaches. *Drug Discov Today.* **9**: 712-720.
- Sakata T, Anzai N, Shin HJ, Noshiro R, Hirata T, Yokoyama H, Kanai Y, Endou H (2004) Novel single nucleotide polymorphisms of organic cation transporter 1 (SLC22A1) affecting transport functions. *Biochem Biophys Res Commun.* **313**: 789-793.
- Sanchez-Vicente L (2012) Importancia de la integridad del gen recA en el desarrollo de biosensores en modelos bacterianos basados en la activación del sistema SOS. *Trabajo Fin de Máster. Universidad de Salamanca.*
- Scheithauer W (2002) Review of gemcitabine in biliary tract carcinoma. *Semin Oncol.* **29**: 40-45.
- Schlessinger J (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* **103**: 211-225.
- Schroeder A, Eckhardt U, Stieger B, Tynes R, Schteingart CD, Hofmann AF, Meier PJ, Hagenbuch B (1998) Substrate specificity of the rat liver Na(+)-bile salt cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes and in CHO cells. *Am J Physiol.* **274**: G370-375.
- Sekiya S, Suzuki A (2012) Intrahepatic cholangiocarcinoma can arise from Notch-mediated conversion of hepatocytes. *J Clin Invest.* **122**: 3914-3918.
- Sell S (2001) Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology.* **33**: 738-750.
- Sell S, Dunsford HA (1989) Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Am J Pathol.* **134**: 1347-1363.
- Sell S, Dunsford HA (1989) Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Am J Pathol.* **134**: 1347-1363.
- Shafizadeh N, Grenert JP, Sahai V, Kakar S (2010) Epidermal growth factor receptor and HER-2/neu status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization in adenocarcinomas of the biliary tree and gallbladder. *Hum Pathol.* **41**: 485-492.
- Shaib Y, El-Serag HB (2004a) The epidemiology of cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis.* **24**: 115-125.
- Shaib YH, Davila JA, McGlynn K, El-Serag HB (2004b) Rising incidence of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a true increase? *J Hepatol.* **40**: 472-477.
- Shaib YH, El-Serag HB, Davila JA, Morgan R, McGlynn KA (2005) Risk factors of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a case-control study. *Gastroenterology.* **128**: 620-626.
- Shaib YH, El-Serag HB, Nooka AK, Thomas M, Brown TD, Patt YZ, Hassan MM (2007) Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma: a hospital-based case-control study. *Am J Gastroenterol.* **102**: 1016-1021.

- Sharma PS, Sharma R, Tyagi T (2009) Receptor tyrosine kinase inhibitors as potent weapons in war against cancers. *Curr Pharm Des.* **15**: 758-776.
- Shepherd HA, Royle G, Ross AP, Diba A, Arthur M, Colin-Jones D (1988) Endoscopic biliary endoprosthesis in the palliation of malignant obstruction of the distal common bile duct: a randomized trial. *Br J Surg.* **75**: 1166-1168.
- Sherman IA, Fisher MM (1986) Hepatic transport of fluorescent molecules: in vivo studies using intravital TV microscopy. *Hepatology.* **6**: 444-449.
- Sherman M (2010) Hepatocellular carcinoma: epidemiology, surveillance, and diagnosis. *Semin Liver Dis.* **30**: 3-16.
- Shikata E, Yamamoto R, Takane H, Shigemasa C, Ikeda T, Otsubo K, Ieiri I (2007) Human organic cation transporter (OCT1 and OCT2) gene polymorphisms and therapeutic effects of metformin. *J Hum Genet.* **52**: 117-122.
- Shimoda M, Kubota K (2007) Multi-disciplinary treatment for cholangiocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* **13**: 1500-1504.
- Shimonishi T, Miyazaki K, Nakanuma Y (2000) Cytokeratin profile relates to histological subtypes and intrahepatic location of intrahepatic cholangiocarcinoma and primary sites of metastatic adenocarcinoma of liver. *Histopathology.* **37**: 55-63.
- Shu Y, Brown C, Castro RA, Shi RJ, Lin ET, Owen RP, Sheardown SA, Yue L, Burchard EG, Brett CM, Giacomini KM (2008) Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1, OCT1, on metformin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther.* **83**: 273-280.
- Shu Y, Leabman MK, Feng B, Mangravite LM, Huang CC, Stryke D, Kawamoto M, Johns SJ, DeYoung J, Carlson E, Ferrin TE, Herskowitz I, Giacomini KM (2003) Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter, OCT1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 5902-5907.
- Shu Y, Leabman MK, Feng B, Mangravite LM, Huang CC, Stryke D, Kawamoto M, Johns SJ, DeYoung J, Carlson E, Ferrin TE, Herskowitz I, Giacomini KM (2004) PharmGKB update: III. Genetic variants of SLC22A1, solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1. *Pharmacol Rev.* **56**: 161.
- Sirica AE (1996) Biliary proliferation and adaptation in furan-induced rat liver injury and carcinogenesis. *Toxicol Pathol.* **24**: 90-99.
- Sirica AE (2005) Cholangiocarcinoma: molecular targeting strategies for chemoprevention and therapy. *Hepatology.* **41**: 5-15.
- Sirica AE, Cole SL, Williams T (1994) A unique rat model of bile ductular hyperplasia in which liver is almost totally replaced with well-differentiated bile ductules. *Am J Pathol.* **144**: 1257-1268.
- Sirica AE, Zhang Z, Lai GH, Asano T, Shen XN, Ward DJ, Mahatme A, Dewitt JL (2008) A novel "patient-like" model of cholangiocarcinoma progression based on bile duct inoculation of tumorigenic rat cholangiocyte cell lines. *Hepatology.* **47**: 1178-1190.
- Smith AC, Dowsett JF, Russell RC, Hatfield AR, Cotton PB (1994) Randomised trial of endoscopic stenting versus surgical bypass in malignant low bileduct obstruction. *Lancet.* **344**: 1655-1660.

- Soini Y (2005) Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. *Histopathology*. **46**: 551-560.
- Solt D FE (1976) New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*. **263**: 701-703.
- Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J (2004) Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science*. **305**: 1163-1167.
- Sparidans RW VM, Lagas JS, Schinkel AH, Schellens JH, Beijnen JH. (2008) Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for sorafenib and sorafenib-glucuronide in mouse plasma and liver homogenate and identification of the glucuronide metabolite. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. **877(3)**: 269-276.
- Strazzabosco M (1997) New insights into cholangiocyte physiology. *J Hepatol*. **27**: 945-952.
- Strumberg D (2005) Preclinical and clinical development of the oral multikinase inhibitor sorafenib in cancer treatment. *Drugs Today (Barc)*. **41**: 773-784.
- Su CH, Shyr YM, Lui WY, P'Eng FK (1997) Hepatolithiasis associated with cholangiocarcinoma. *Br J Surg*. **84**: 969-973.
- Sugawara H, Yasoshima M, Katayanagi K, Kono N, Watanabe Y, Harada K, Nakanuma Y (1998) Relationship between interleukin-6 and proliferation and differentiation in cholangiocarcinoma. *Histopathology*. **33**: 145-153.
- Sugiyama H, Onuki K, Ishige K, Baba N, Ueda T, Matsuda S, Takeuchi K, Onodera M, Nakanuma Y, Yamato M, Yamamoto M, Hyodo I, Shoda J (2011) Potent in vitro and in vivo antitumor activity of sorafenib against human intrahepatic cholangiocarcinoma cells. *J Gastroenterol*. **46**: 779-789.
- Sun F, Hayami S, Ogiri Y, Haruna S, Tanaka K, Yamada Y, Tokumaru S, Kojo S (2000) Evaluation of oxidative stress based on lipid hydroperoxide, vitamin C and vitamin E during apoptosis and necrosis caused by thioacetamide in rat liver. *Biochim Biophys Acta*. **1500**: 181-185.
- Suzuki H, Sugiyama Y (2002) Single nucleotide polymorphisms in multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2): its impact on drug disposition. *Adv Drug Deliv Rev*. **54**: 1311-1331.
- Swift B NN, Proctor W, Thakker D, Lang D, Radtke M, Gnoth MJ, et al. (2010) Hepatic uptake and excretion of sorafenib and its metabolites. *The AAPS Journal 2010*. **12 (S2)**.
- Szendroi M, Nemeth L, Vajta G (1983) Asbestos bodies in a bile duct cancer after occupational exposure. *Environ Res*. **30**: 270-280.
- Tabibzadeh SS, Poubouridis D, May LT, Sehgal PB (1989) Interleukin-6 immunoreactivity in human tumors. *Am J Pathol*. **135**: 427-433.
- Tada M, Omata M, Ohto M (1992) High incidence of ras gene mutation in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer*. **69**: 1115-1118.
- Taieb J, Mity E, Boige V, Artru P, Ezenfis J, Lecomte T, Clavero-Fabri MC, Vaillant JN, Rougier P, Ducreux M (2002) Optimization of 5-fluorouracil (5-FU)/cisplatin combination

- chemotherapy with a new schedule of leucovorin, 5-FU and cisplatin (LV5FU2-P regimen) in patients with biliary tract carcinoma. *Ann Oncol.* **13**: 1192-1196.
- Takada T, Kato H, Matsushiro T, Nimura Y, Nagakawa T, Nakayama T (1994) Comparison of 5-fluorouracil, doxorubicin and mitomycin C with 5-fluorouracil alone in the treatment of pancreatic-biliary carcinomas. *Oncology.* **51**: 396-400.
- Takashima K, Kohno T, Mori T, Ohtani A, Hirakoso K, Takeyama S (1994) The hypocholesterolemic action of TA-7552 and its effects on cholesterol metabolism in the rat. *Atherosclerosis.* **107**: 247-257.
- Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, Kimura H, Kobayashi Y, Yamamoto T, Cha SH, Sekine T, Endou H (2002) Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport. *J Pharmacol Exp Ther.* **300**: 918-924.
- Talalay P (1960) Enzymic analysis of steroid hormones. *Methods Biochem Anal.* **8**: 119-143.
- Taniai M, Higuchi H, Burgart LJ, Gores GJ (2002) p16INK4a promoter mutations are frequent in primary sclerosing cholangitis (PSC) and PSC-associated cholangiocarcinoma. *Gastroenterology.* **123**: 1090-1098.
- Tannapfel A, Benicke M, Katalinic A, Uhlmann D, Kockerling F, Hauss J, Wittekind C (2000) Frequency of p16(INK4A) alterations and K-ras mutations in intrahepatic cholangiocarcinoma of the liver. *Gut.* **47**: 721-727.
- Tarasova L, Kalnina I, Geldnere K, Bumbure A, Ritenberga R, Nikitina-Zake L, Fridmanis D, Vaivade I, Pirags V, Klovins J (2012) Association of genetic variation in the organic cation transporters OCT1, OCT2 and multidrug and toxin extrusion 1 transporter protein genes with the gastrointestinal side effects and lower BMI in metformin-treated type 2 diabetes patients. *Pharmacogenet Genomics.* **22**: 659-666.
- Tatsuno I, Nishikawa T, Sasano H, Shizawa S, Iwase H, Satoh S (1994) Interleukin 6-producing gastric carcinoma with fever, hypergammaglobulinemia, and plasmacytosis in bone marrow. *Gastroenterology.* **107**: 543-547.
- Tepsiri N, Chaturat L, Sripa B, Namwat W, Wongkham S, Bhudhisawasdi V, Tassaneeyakul W (2005) Drug sensitivity and drug resistance profiles of human intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines. *World J Gastroenterol.* **11**: 2748-2753.
- Terada T, Nakanuma Y, Sirica AE (1998) Immunohistochemical demonstration of MET overexpression in human intrahepatic cholangiocarcinoma and in hepatolithiasis. *Hum Pathol.* **29**: 175-180.
- Thamavit W, Bhamarapavati N, Sahaphong S, Vajrasthira S, Angsubhakorn S (1978) Effects of dimethylnitrosamine on induction of cholangiocarcinoma in *Opisthorchis viverrini*-infected Syrian golden hamsters. *Cancer Res.* **38**: 4634-4639.
- Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M (2004) Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood.* **104**: 3739-3745.
- Thongprasert S (2005) The role of chemotherapy in cholangiocarcinoma. *Ann Oncol.* **16 Suppl 2**: ii93-96.

- Tocchi A, Mazzoni G, Liotta G, Lepre L, Cassini D, Miccini M (2001) Late development of bile duct cancer in patients who had biliary-enteric drainage for benign disease: a follow-up study of more than 1,000 patients. *Ann Surg.* **234**: 210-214.
- Toledo LM, Lydon NB, Elbaum D (1999) The structure-based design of ATP-site directed protein kinase inhibitors. *Curr Med Chem.* **6**: 775-805.
- Treekitkarnmongkol W, Suthiphongchai T (2010) High expression of ErbB2 contributes to cholangiocarcinoma cell invasion and proliferation through AKT/p70S6K. *World J Gastroenterol.* **16**: 4047-4054.
- Tzvetkov MV, Saadatmand AR, Bokelmann K, Meineke I, Kaiser R, Brockmoller J (2012) Effects of OCT1 polymorphisms on the cellular uptake, plasma concentrations and efficacy of the 5-HT(3) antagonists tropisetron and ondansetron. *Pharmacogenomics J.* **12**: 22-29.
- Tzvetkov MV, Saadatmand AR, Lotsch J, Tegeder I, Stingl JC, Brockmoller J (2011) Genetically polymorphic OCT1: another piece in the puzzle of the variable pharmacokinetics and pharmacodynamics of the opioidergic drug tramadol. *Clin Pharmacol Ther.* **90**: 143-150.
- Umehara KI, Iwatsubo T, Noguchi K, Kamimura H (2007) Functional involvement of organic cation transporter1 (OCT1/Oct1) in the hepatic uptake of organic cations in humans and rats. *Xenobiotica.* **37**: 818-831.
- Urban TJ, Sebro R, Hurowitz EH, Leabman MK, Badagnani I, Lagpacan LL, Risch N, Giacomini KM (2006) Functional genomics of membrane transporters in human populations. *Genome Res.* **16**: 223-230.
- van Montfoort JE, Muller M, Groothuis GM, Meijer DK, Koepsell H, Meier PJ (2001) Comparison of "type I" and "type II" organic cation transport by organic cation transporters and organic anion-transporting polypeptides. *J Pharmacol Exp Ther.* **298**: 110-115.
- Verhaagh S, Schweifer N, Barlow DP, Zwart R (1999) Cloning of the mouse and human solute carrier 22a3 (Slc22a3/SLC22A3) identifies a conserved cluster of three organic cation transporters on mouse chromosome 17 and human 6q26-q27. *Genomics.* **55**: 209-218.
- Vestergaard EM, Hein HO, Meyer H, Grunnet N, Jorgensen J, Wolf H, Orntoft TF (1999) Reference values and biological variation for tumor marker CA 19-9 in serum for different Lewis and secretor genotypes and evaluation of secretor and Lewis genotyping in a Caucasian population. *Clin Chem.* **45**: 54-61.
- Vicens M, Macias RI, Briz O, Rodriguez A, El-Mir MY, Medarde M, Marin JJ (2007a) Inhibition of the intestinal absorption of bile acids using cationic derivatives: mechanism and repercussions. *Biochem Pharmacol.* **73**: 394-404.
- Vicens M, Medarde M, Macias RI, Larena MG, Villafaina A, Serrano MA, Marin JJ (2007b) Novel cationic and neutral glycocholic acid and polyamine conjugates able to inhibit transporters involved in hepatic and intestinal bile acid uptake. *Bioorg Med Chem.* **15**: 2359-2367.
- Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM (2007) Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis.* **27**: 55-76.

- Vroman B, LaRusso NF (1996) Development and characterization of polarized primary cultures of rat intrahepatic bile duct epithelial cells. *Lab Invest.* **74**: 303-313.
- Walker GC (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* **48**: 60-93.
- Walker NJ, Crockett PW, Nyska A, Brix AE, Jokinen MP, Sells DM, Hailey JR, Easterling M, Haseman JK, Yin M, Wyde ME, Bucher JR, Portier CJ (2005) Dose-additive carcinogenicity of a defined mixture of "dioxin-like compounds". *Environ Health Perspect.* **113**: 43-48.
- Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R (2004) Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell.* **116**: 855-867.
- Wang L, Giannoudis A, Lane S, Williamson P, Pirmohamed M, Clark RE (2008) Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther.* **83**: 258-264.
- Wang T, Shankar K, Ronis MJ, Mehendale HM (2000) Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced CYP2E1. *J Pharmacol Exp Ther.* **294**: 473-479.
- Watanabe K, Sawano T, Endo T, Sakata M, Sato J (2002) Studies on intestinal absorption of sulpiride (2): transepithelial transport of sulpiride across the human intestinal cell line Caco-2. *Biol Pharm Bull.* **25**: 1345-1350.
- Watanabe M, Asaka M, Tanaka J, Kurosawa M, Kasai M, Miyazaki T (1994) Point mutation of K-ras gene codon 12 in biliary tract tumors. *Gastroenterology.* **107**: 1147-1153.
- Watanapa P, Watanapa WB (2002) Liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Br J Surg.* **89**: 962-970.
- Weinman SA, Carruth MW, Dawson PA (1998) Bile acid uptake via the human apical sodium-bile acid cotransporter is electrogenic. *J Biol Chem.* **273**: 34691-34695.
- Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M (2008) Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther.* **7**: 3129-3140.
- Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA (2004) BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* **64**: 7099-7109.
- Winter TN, Elmquist WF, Fairbanks CA (2011) OCT2 and MATE1 provide bidirectional agmatine transport. *Mol Pharm.* **8**: 133-142.
- Wong MH, Oelkers P, Craddock AL, Dawson PA (1994) Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Biol Chem.* **269**: 1340-1347.



- Wong MH, Oelkers P, Dawson PA (1995) Identification of a mutation in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene that abolishes transport activity. *J Biol Chem.* **270**: 27228-27234.
- Wong O, Whorton MD, Foliart DE, Ragland D (1991) An industry-wide epidemiologic study of vinyl chloride workers, 1942-1982. *Am J Ind Med.* **20**: 317-334.
- Wu T, Han C, Lunz JG, 3rd, Michalopoulos G, Shelhamer JH, Demetris AJ (2002) Involvement of 85-kd cytosolic phospholipase A(2) and cyclooxygenase-2 in the proliferation of human cholangiocarcinoma cells. *Hepatology.* **36**: 363-373.
- Xia X, Francis H, Glaser S, Alpini G, LeSage G (2006) Bile acid interactions with cholangiocytes. *World J Gastroenterol.* **12**: 3553-3563.
- Yang H, Li TW, Peng J, Tang X, Ko KS, Xia M, Aller MA (2011) A mouse model of cholestasis-associated cholangiocarcinoma and transcription factors involved in progression. *Gastroenterology.* **141**: 378-388, 388 e371-374.
- Yang MC, McLean AJ, Le Couteur DG (2001) Cell membrane transport of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the liver and systemic bioavailability. *Biochem Biophys Res Commun.* **289**: 130-136.
- Yasujima T, Ohta K, Inoue K, Yuasa H (2011) Characterization of human OCT1-mediated transport of DAPI as a fluorescent probe substrate. *J Pharm Sci.* **100**: 4006-4012.
- Yeh CN, Maitra A, Lee KF, Jan YY, Chen MF (2004) Thioacetamide-induced intestinal-type cholangiocarcinoma in rat: an animal model recapitulating the multi-stage progression of human cholangiocarcinoma. *Carcinogenesis.* **25**: 631-636.
- Yen S, Hsieh CC, MacMahon B (1987) Extrahepatic bile duct cancer and smoking, beverage consumption, past medical history, and oral-contraceptive use. *Cancer.* **59**: 2112-2116.
- Yokomuro S, Tsuji H, Lunz JG, 3rd, Sakamoto T, Ezure T, Murase N, Demetris AJ (2000) Growth control of human biliary epithelial cells by interleukin 6, hepatocyte growth factor, transforming growth factor beta1, and activin A: comparison of a cholangiocarcinoma cell line with primary cultures of non-neoplastic biliary epithelial cells. *Hepatology.* **32**: 26-35.
- Yoon JH, Gwak GY, Lee HS, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ (2004) Enhanced epidermal growth factor receptor activation in human cholangiocarcinoma cells. *J Hepatol.* **41**: 808-814.
- Yoon JH, Higuchi H, Werneburg NW, Kaufmann SH, Gores GJ (2002) Bile acids induce cyclooxygenase-2 expression via the epidermal growth factor receptor in a human cholangiocarcinoma cell line. *Gastroenterology.* **122**: 985-993.
- Yoon YB, Hagey LR, Hofmann AF, Gurantz D, Michelotti EL, Steinbach JH (1986) Effect of side-chain shortening on the physiologic properties of bile acids: hepatic transport and effect on biliary secretion of 23-nor-ursodeoxycholate in rodents. *Gastroenterology.* **90**: 837-852.
- Zhang EY, Phelps MA, Banerjee A, Khantwal CM, Chang C, Helsper F, Swaan PW (2004) Topology scanning and putative three-dimensional structure of the extracellular binding domains of the apical sodium-dependent bile acid transporter (SLC10A2). *Biochemistry.* **43**: 11380-11392.

- Zhang L, Dresser MJ, Gray AT, Yost SC, Terashita S, Giacomini KM (1997) Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter. *Mol Pharmacol*. **51**: 913-921.
- Zhang S, Lovejoy KS, Shima JE, Lagpacan LL, Shu Y, Lapuk A, Chen Y, Komori T, Gray JW, Chen X, Lippard SJ, Giacomini KM (2006) Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity. *Cancer Res*. **66**: 8847-8857.
- Zimmermann J, Caravatti G, Mett H, Meyer T, Muller M, Lydon NB, Fabbro D (1996) Phenylamino-pyrimidine (PAP) derivatives: a new class of potent and selective inhibitors of protein kinase C (PKC). *Arch Pharm (Weinheim)*. **329**: 371-376.
- Zwick E, Bange J, Ullrich A (2002) Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. *Trends Mol Med*. **8**: 17-23.