

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**PAPEL DEL GEN *SLC22A1* EN LA
REFRACTARIEDAD DE LOS TUMORES HEPÁTICOS
AL SORAFENIB**

Memoria que presenta **Dña. Ruba Al Abdulla** para optar al Título de Doctor por la
Universidad de Salamanca

Salamanca 16 de Julio de 2018

D^a. M^a JESÚS MONTE RÍO, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada “Papel del gen *SLC22A1* en la refractariedad de los tumores hepáticos al sorafenib”, presentada por D^a. Ruba Al Abdulla para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección conjunta del Dr. D. José Juan García Marín, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología, la Dra. Dña. Rocío I. Rodríguez Macías, Profesora Titular del Departamento de Fisiología y Farmacología, y la Dra. Dña. Elisa Lozano Esteban, Investigadora Contratada del CIBERehd (Centro de Investigación Biomédica En Red, área de enfermedades hepáticas y digestivas) 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 16 de julio de dos mil dieciocho.

Fdo. M^a Jesús Monte Río

D^a. ROCÍO I. RODRÍGUEZ MACÍAS, COORDINADORA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOPATOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "Papel del gen *SLC22A1* en la refractariedad de los tumores hepáticos al sorafenib", presentada por D^a. Ruba Al Abdulla para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección conjunta del Dr. D. José Juan García Marín, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología, la Dra. Dña. Rocío I. Rodríguez Macías, Profesora Titular del Departamento de Fisiología y Farmacología, y la Dra. Dña. Elisa Lozano Esteban, Investigadora del CIBERehd 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 16 de julio de dos mil dieciocho.

Fdo. Rocío I. Rodríguez Macías

Dr. D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA, Dra. Dña. ROCÍO I. RODRÍGUEZ MACÍAS, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA, Y Dra. Dña. ELISA LOZANO ESTEBAN, INVESTIGADORA CONTRATADA CIBERehd DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada “Papel del gen *SLC22A1* en la refractariedad de los tumores hepáticos al sorafenib”, presentada por D^a. Ruba Al Abdulla 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 16 de Julio de dos mil dieciocho.

Fdo. José Juan García Marín

Fdo. Rocio I. Rodríguez Macías

Fdo. Elisa Lozano Esteban

La doctoranda ha disfrutado durante la realización de esta Tesis Doctoral de un Contrato predoctoral para la formación de personal investigador de la Junta de Castilla y León/ Fondo Social Europeo orden EDU/1083/2013 y resolución orden EDU/828/2014, de 29 de septiembre.

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 Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto SA015U13 “Papel de las mutaciones de la proteína de captación de fármacos OCT1 en la refractariedad del carcinoma hepatocelular y el colangiocarcinoma al tratamiento”. Investigación Principal: José Juan García Marín. Periodo: 2014-2016.
- Fundación Mutua Madrileña. XII Convocatoria de Ayudas a la Investigación. “Papel de los sistemas de transporte y biotransformación de fármacos en la falta de respuesta a la quimioterapia en pacientes con leucemia mieloide aguda” Investigador Principal: Oscar Briz Sánchez. Periodo: 2015-2018.
- Acciones Estratégicas CIBERehd. Proyecto EHD15PI05. “Búsqueda de nuevos marcadores en colangiocarcinoma. Investigador Principal: Rocío I. Rodríguez Macías. Periodo: 2016-2017.
- Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III. Proyectos de investigación en salud (AES 2016). Modalidad proyectos en salud. Proyecto PI16/00598 “Quimiorresistencia del adenocarcinoma gástrico: Caracterización de su huella genética y superación mediante edición genómica programada basada en CRISPR/Cas9”. Investigador Principal: José Juan García Marín. Periodo: 2017-2019.
- Ministerio de Economía y Competitividad. Proyecto SAF2016-75197-R. “Desarrollo de un modelo predictivo de la falta de respuesta a la quimioterapia en pacientes con hepatoblastoma”. Investigador Principal: Rocío I. Rodríguez Macías. Periodo: 2017-2019.
- Fundación AECC Investigación contra el cáncer. Proyectos cáncer infantil y cáncer poco frecuente 2017. "Estudio multidisciplinar del colangiocarcinoma: diagnóstico, patogenia y nuevas terapias. Investigador principal: Jesús María Bañales Asurmendi. Investigador principal Universidad de Salamanca: José Juan García Marín. Periodo: 2018-2020.

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

-Geier A, Macias R.I.R, Bettinger D, Weiss J, Bantel H, Jahn D, **Al-Abdulla R**, Marin JJ. The lack of the organic cation transporter OCT1 at the plasma membrane of tumour cells precludes a positive response to sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2017 8(9):15846-15857.

-Marin JJ, Lozano E, Briz O, **Al-Abdulla R**, Serrano MA, Macias RI. Molecular Bases of Chemoresistance In Cholangiocarcinoma. *Journal of Current Drug Targets*, 2017;18(8):889-900.

o se han enviado para su evaluación y están en revisión:

-**Al-Abdulla R**, Lozano E, Macias RIR, Monte MJ, Briz O, O'Rourke CJ, Serrano MA, Banales JM, Avila MA, Martinez-Chantar ML, Geier A, Andersen JB, Marin JJG. Epigenetic events involved in OCT1-dependent impaired response of hepatocellular carcinoma to sorafenib (enviado a British Journal of Pharmacology).

-Lozano E, Macias RIR, Monte MJ, Asensio M, Del Carmen S, Sanchez-Vicente L, Alonso-Peña M, **Al-Abdulla R**, Munoz-Garrido P, Satriano L, O'Rourke CJ, Banales JM, Avila MA, Martinez-Chantar ML, Andersen JB, Briz O, Marin JJG. Causes of hOCT1-dependent cholangiocarcinoma resistance to sorafenib and sensitization by tumor-selective gene therapy (enviado a Hepatology).

Los resultados de esta Tesis Doctoral se han publicado en forma de abstract en las siguientes revistas o libros de abstracts tras su presentación en congresos:

-R Al-Abdulla, E Lozano, RIR Macias, CJ O'Rourke, MJ Perez, MA Serrano, MR Romero, MJ Monte, E Herraéz, O Briz, JM Banales, L Bujanda, A Geier, JB Andersen, JJG Marin. (2017) Genetic and epigenetic bases of the relationship between reduced OCT1 expression and poor response to sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 2017, 66 (1), S462-S463. European Association for the Study of the Liver Meeting (EASL). 19-23 abril 2017, Amsterdam, Holanda. Tipo de comunicación: póster.

-A Geier, **R Al-Abdulla**, RIR Macias, D Bettinger, J Weiss, H Bantel, D Jahn, M Asensio, M Alonso-Pena, F Al-Aqil, JJG Marin. The absence of OCT1 at the plasma membrane of tumor cells is associated with a worse response of hepatocellular carcinoma to sorafenib. *EASL, Journal of Hepatology*, 2017, 66(1), S230. The international liver congress, EASL, 19 – 23 abril 2017, Amsterdam, Holanda. Tipo de comunicación: póster.

-R Al-Abdulla, A Geier, RIR Macías, F Jiménez, D Bettinger, J Weiss, H Bantel, D Jahn, JJG. Marín. La ausencia de OCT1 en la membrana plasmática de las células tumorales se asocia con una peor respuesta del carcinoma hepatocelular al sorafenib. *Gastroenterología y Hepatología*, 2017 (42), 51. Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH), 15-17 de febrero de 2017, Madrid. Tipo de comunicación: póster.

-E Lozano, **R Al-Abdulla**, RIR Macías, MJ Pérez, MA Serrano, MJ Monte, E Herráez, O Briz, JM Bañales, L Bujanda, A Geier, JJG Marín. Bases Genéticas y epigenéticas de la relación entre la pérdida de expresión de OCT1 y la falta de respuesta al tratamiento con sorafenib en carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma. *Gastroenterología y Hepatología*, 2017 (42), 51. 42º Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH) 15-17 de febrero de 2017, Madrid. Tipo de comunicación: comunicación oral.

AGRADECIMIENTOS

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

Primero quiero agradecer a mis directores de Tesis por tener mucha paciencia conmigo, su dedicación de tiempo y esfuerzo en enseñarme a diseñar, planificar y realizar los experimentos y la corrección del manuscrito de esta Tesis Doctoral, tanto en la parte científica como en la escritura en español, que ha supuesto para mí una dificultad adicional.

En primer lugar, agradezco al Dr. José Juan García Marín su confianza en mí y darme la oportunidad de formar parte del equipo fantástico que dirige, además de su tiempo y amabilidad, sus consejos siempre sabios y su gran ayuda tanto científica como personal.

A la Dra. Rocío I. Rodríguez Macías, estar a mi lado en los momentos difíciles y ser un ejemplo de una persona muy organizada de la que he aprendido con sus consejos a mejorar mi trabajo.

A la Dra. Elisa Lozano Esteban, que me enseñó a adaptarme en el grupo en las difíciles etapas iniciales en el laboratorio, por ser un ejemplo del trabajo bien hecho, de la que he aprendido a encontrar el equilibrio entre la paciencia y el entusiasmo.

Al resto de miembros del grupo de investigación HEVEFARM:

A la Dra. M^a Ángeles Serrano García por su tiempo, su interés y ser un ejemplo del trabajo serio con amabilidad.

A la Dra. M^a Jesús Monte Río, por su ayuda en la realización de los experimentos con animales y su consejos y enseñanzas durante el camino recorrido estos años.

Al Dr. Óscar Briz Sánchez, por su apoyo y ánimo en el diseño y puesta a punto de los métodos nuevos y su experiencia en las técnicas de clonación.

A la Dra. M^a José Pérez García, por su ayuda, amabilidad, buen humor e interés.

A la Dra. Marta Rodríguez Romero, por su amabilidad y trasmitirme su buen humor en el laboratorio.

A la Dra. Elisa Herráez Aguilar, por su amistad, sus consejos e interés para mejorar mi español y su gran ayuda en el laboratorio, además de hacer más agradable mi estancia en el grupo y compartir los buenos momentos.

A Maitane Asensio y Marta Alonso, con las que he compartido buenos momentos como los cafés de la tarde con conversaciones divertidas y han convertido en risas los momentos más difíciles que nos hacen estar, como decimos nosotras, “enfadadas con el mundo”.

También quiero acordarme de otros miembros del equipo como Laura P. Silva, Ana Peleteiro, Lorena, Ricardo, Candela y Meraris, por su amabilidad y los momentos buenos compartidos durante el rato del café.

A los departamentos de Fisiología y Farmacología y Bioquímica y Biología Molecular por permitirme el uso de sus instalaciones.

A M^a 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 y Emilia por contagiar su alegría y su sentido del humor. Al personal del Servicio de Experimentación Animal, especialmente a José Fernando y Juan, por el cuidado y ayuda en el manejo de los animales.

Y a todas las personas que fuera de este laboratorio han contribuido a que este trabajo se complete, en especial a mis amigos María y Ruslan.

Quiero agradecer al Dr. Jesper B. Andersen, por permitirme realizar una estancia en su laboratorio de Copenhague durante la Tesis. A la Dra. Monika Lewinska y el Dr. Colm O' Rourke, por su ayuda y amistad durante dicha estancia.

Quiero acordarme en especial a mi familia por su cariño, su apoyo y su confianza incondicionales, que me han ayudado a llegar hasta aquí.

A todos, ¡Muchas gracias!

Dedicada

A la persona que siempre quedará en mi corazón.

Mi padre

ABREVIATURAS

AAF: 2-Acetamidofluoreno

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ARE: Elementos ricos en AU "AU rich elements"

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

AUBPs: Proteínas que se unen a ARE "ARE binding proteins"

BCLC: "Barcelona clinic liver cancer"

CCA: Colangiocarcinoma

CP: Child-Pugh

CpG: Citosinas seguidas por guaninas

CRT: Radioterapia conformada tridimensional

DAC: Decitabina

DAPI: 4,6-Diamino-2-fenilindol

dCCA: Colangiocarcinoma distal

DEN: N-dietilnitrosamina

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNMTs: ADN metil transferasas

DNMTIs: Inhibidores de DNMTs

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGFP: Proteína verde fluorescente de alta intensidad

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epitelial

F-But: Fenil butirato

FXR: "Farnesoid X receptor"

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

HATs: Histona acetil transferasas

HB: Hepatoblastoma

HCC: Carcinoma hepatocelular

HDACs: Desacetilasas de histonas

HDACIs: Inhibidores de desacetilasas de histonas

HEPES: ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetansulfónico

HNF: Factor hepatocitario nuclear

iCCA: Colangiocarcinoma intrahepático

KDa: Kilodalton

MC: Medio de captación

MOC: Mecanismos de quimiorresistencia

MOI: Multiplicidad de infección

MPP: 1-Metil-4-fenilpiridino

Na-But: Butirato sódico

OCT: Transportador de cationes orgánicos

ORF: "Open reading frame"

pb: Pares de bases

p.c.: Peso corporal

pCCA: Colangiocarcinoma perihiliar

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PET: Tomografía por emisión de positrones

Pm: Peso molecular

pre-ARNm: Precursor del ARNm

RFA: Ablación por radiofrecuencia

RM: Resonancia magnética

RPKM: "Reads per kilobase mapped"

RPMMM: "Reads per million miRNA mapped"

RT: Transcripción reversa

SNPs: Mutaciones de nucleótido único

SDS: Dodecil sulfato sódico

TAA: Tioacetamida

TACE: Quimioembolización transarterial

TC: Tomografía computarizada

TCGA: "The cancer genome atlas"

TEA: Tetraetilamonio

TEMED: Tetrametiletilendiamina

TKIs: Inhibidores de tirosina quinasa

TMDs: Dominios trans-membrana

TRANSFER: "TRANsporter SoraFEnib Response"

TSA: Tricostatina A

TSS: Sitio de inicio de transcripción

TTP: Tristetraprolina

UAF: Unidades arbitrarias de fluorescencia

UTR: "Untranslated region"

VHC: Hepatitis C

WT: "Wild type"

ÍNDICE

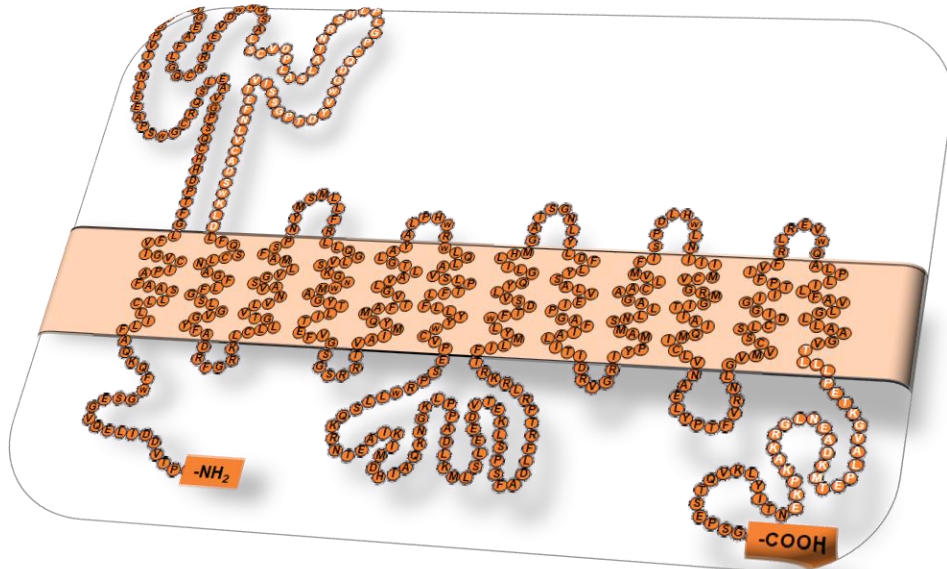
1. OBJETIVOS	1
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1. SISTEMA HEPATOBILIAR	7
2.1.1. Generalidades	7
2.1.2. Hepatocitos	7
2.1.3. Colangiocitos	8
2.1.4. Otros tipos celulares hepáticos	8
2.2. FUNCIONES DEL SISTEMA HEPATOBILIAR	9
2.3. CÁNCER HEPÁTICO	9
2.3.1. Carcinoma hepatocelular	10
2.3.2. Colangiocarcinoma	14
2.4. INHIBIDORES DE TIROSINA QUINASA EN CÁNCER HEPÁTICO	18
2.4.1. Ruta RAF/MEK/ERK	18
2.4.2. Ruta de VEGF	19
2.4.3. Antitumorales inhibidores de tirosina quinasas	19
2.4.3.1. Sorafenib	19
2.4.3.2. Otros fármacos inhibidores de la actividad tirosina quinasa	21
2.5. RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL EN CÁNCER HEPÁTICO	22
2.5.1. Papel de los transportadores implicados en la disminución de la concentración intracelular hepática de fármacos (MOC-1)	23
2.6. EL TRANSPORTADOR DE CATIONES ORGÁNICOS OCT1 (GEN <i>SLC22A1</i>)	24
2.6.1. Estructura del OCT1	24
2.6.2. Expresión de OCT1	24
2.6.3. Función de OCT1	25
2.6.4. Regulación de la expresión de OCT1	27
2.6.5. Variantes de OCT1	28
2.7. EPIGÉNÉTICA EN EL CÁNCER	29
2.7.1. Metilación de ADN	30
2.7.2. Acetilación de histonas	32
2.7.3. Papel de los microARNs en la regulación de la expresión génica	33

2.8. REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN CÁNCER	34
2.8.1. Estabilidad/degradación de ARNm mediante las “ARE binding proteins”	35
2.8.2. “Splicing” alternativo	36
3. MATERIAL Y MÉTODOS	39
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	41
3.1.1. Muestras humanas	41
3.1.2. Animales	41
3.1.3. Líneas celulares	42
3.1.4. Bacterias	42
3.2. PRODUCTOS	42
3.3. MEDIOS INSTRUMENTALES	44
3.4. ESTUDIO CLÍNICO RETROSPECTIVO PARA EVALUAR EL PAPEL DEL OCT1 SOBRE LA RESPUESTA AL SORAFENIB	47
3.5. EXPERIMENTOS “IN VIVO”	47
3.5.1. Modelo experimental de HCC en ratas	47
3.5.2. Modelo experimental de HCC en ratones	48
3.5.3. Modelo experimental de CCA en ratas	48
3.5.4. Captación de sorafenib en los modelos experimentales de HCC y CCA	48
3.5.5. Ensayo <i>in vivo</i> de respuesta antitumoral al sorafenib en tumores con o sin sobre-expresión de OCT1	49
3.6. CULTIVOS CELULARES	49
3.6.1. Cultivo de células para estudios de expresión génica	50
3.6.2. Estudios de viabilidad celular	50
3.7. EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> DE MODULACIÓN EPIGÉNÉTICA DE LA EXPRESIÓN DE OCT1	50
3.8. EXPERIMENTOS DE CAPTACIÓN EN LÍNEAS CELULARES	51
3.8.1. Experimentos de captación de compuestos fluorescentes	51
3.8.2. Experimentos de captación de tetraetilamonio [¹⁴ C]-TEA	51
3.8.3. Experimentos de captación de sorafenib en células	52

3.9. ESTUDIOS “IN SILICO”	52
3.9.1. Determinación del papel de la metilación en la expresión del gen <i>SLC22A1</i> en datos del TCGA “The Cancer Genome Atlas”	52
3.10. MÉTODOS DE CLONACIÓN CLÁSICA	53
3.10.1. Clonación de la secuencia codificante de OCT3 en el plásmido lentiviral pWPI	53
3.10.1.1. Obtención del ADNc del gen <i>SLC22A3</i> con los extremos adecuados	53
3.10.1.2. Preparación del plásmido pWPI y el inserto (OCT3) para la ligación	54
3.10.1.3. Ligación del ADNc de OCT3 y el plásmido pWPI	54
3.10.2. Generación de plásmidos pLVTHM portadores de pre-microARNs y sh-ARNs	55
3.10.2.1. Obtención del ADNc de los microARNs con los extremos adecuados	55
3.10.2.3. Ligación de los pre- microARNs o sh-ARN con el plásmido pLVTHM	56
3.11. CULTIVO DE BACTERIAS	58
3.11.1. Transformación de bacterias por choque térmico	58
3.11.2. Purificación de ADN plasmídico de cultivos de bacterias	59
3.12. PRODUCCIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES	59
3.12.1. Fundamento	59
3.12.2. Producción de las partículas virales	59
3.12.3. Determinación del título viral	60
3.12.4. Determinación de la multiplicidad de infección (MOI)	60
3.12.5. Transducción de las células diana	61
3.13. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ARNm POR RT-QPCR	61
3.13.1 Extracción del ARN total	61
3.13.2. Transcripción reversa (RT)	61
3.13.3. Diseño de cebadores	61
3.13.4. Realización de la PCR cuantitativa	63
3.13.5. Cuantificación relativa	63
3.14. DETECCIÓN DE VARIANTES DE OCT1 GENERADAS POR “SPLICING” ALTERNATIVO	63
3.15. MÉTODOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR	64
3.15.1. PCR de alta fidelidad	64
3.15.2. Purificación de ADN contenido en geles de agarosa	64
3.15.3. Digestión con enzimas de restricción	65
3.15.4. Secuenciación	65

3.16. ESTUDIOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	65
3.16.1. Fundamento	65
3.16.2. Procedimiento	66
3.17. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	66
3.17.1. Obtención de crudos de membrana de las líneas celulares	66
3.17.2. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	66
3.17.2.1. Preparación de los geles	66
3.17.2.2. Preparación de las muestras	67
3.17.2.3. Condiciones de la electroforesis y de la transferencia	67
3.17.3. Inmunodetección	67
3.18. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA	68
3.18.1. Preparación de muestras (células en cultivos)	68
3.18.2. Inmunodetección	68
3.19. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOHISTOQUÍMICA	68
3.20. ESTUDIO HISTOLÓGICO. MICROSCOPIA ÓPTICA	69
3.21. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	69
3.21.1. Determinación de proteínas totales	69
3.21.2. Determinación de la viabilidad celular por el test de formazán	69
3.21.3. Determinación de radioactividad	70
3.21.4. Medida de sorafenib por HPLC-MS/MS	70
3.21.4.1. Preparación de muestras de tejido	70
3.21.4.2. Preparación de células	70
3.22. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	71
4. RESULTADOS	73
4.1. EFECTO DE LA EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR OCT1 EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON SORAFENIB EN PACIENTES CON HCC	75
4.1.1. Puesta a punto de un método de detección de OCT1	77
4.1.2. Expresión de OCT1 en pacientes con HCC	81
4.1.3. Relación entre expresión de OCT1 y respuesta al sorafenib en HCC	84
4.2. PAPEL DE OCT1 EN LA CAPTACIÓN DE SORAFENIB EN TUMORES HEPÁTICOS	87
4.2.1. Captación de sorafenib en el modelo de inducción química de HCC	88

4.2.2. Captación de sorafenib en el modelo de HCC en ratones -----	93
4.2.3. Captación de sorafenib en el modelo de inducción química de CCA -----	94
4.3. DESARROLLO DE UNA ESTRATEGÍA DE QUIMIOSENSIBILIZACIÓN DEL HCC BASADA EN LA RECUPERACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE OCT1 MEDIANTE VECTORES LENTIVIRALES -----	96
4.3.1. Uso de vectores lentivirales para la expresión estable de OCT1 en líneas celulares de HCC -----	96
4.3.2. Efecto de la expresión estable de OCT1 sobre la captación y la sensibilidad del HCC al sorafenib -----	103
4.3.3. Efecto de la sobre-expresión del OCT1 sobre la respuesta del HCC al sorafenib en un modelo <i>in vivo</i> de tumorigénesis -----	107
4.4. MECANISMOS EPIGÉNETICOS Y POST-TRANSCRIPCIONALES IMPLICADOS EN LA CAÍDA DE EXPRESIÓN DE OCT1 EN TUMORES HEPÁTICOS -----	109
4.4.1. Papel de las proteínas implicadas en la estabilidad y la degradación del ARNm en la disminución de la expresión de OCT1 en HCC y CCA -----	110
4.4.2. Papel de la metilación del ADN sobre la expresión de OCT1 en HCC y CCA -----	113
4.4.2.1 Efecto de la inhibición de la metilación del ADN sobre la expresión de OCT1 en HCC y CCA -----	118
4.4.2.2. Efecto de inhibidores de histonas desacetilasas sobre la expresión de OCT1 en HCC y CCA -----	121
4.4.3. Regulación de la expresión de OCT1 mediante microARNs en HCC y CCA -----	123
4.4.4. “Splicing” de OCT1 en HCC y CCA -----	131
5. DISCUSIÓN -----	135
6. CONCLUSIONES -----	143
7. BIBLIOGRAFÍA -----	147
8. ENGLISH PART -----	171



1. OBJETIVOS

Los tumores hepáticos constituyen la tercera causa de muerte por cáncer a nivel mundial. Los tumores primarios hepáticos más frecuentes incluyen el carcinoma hepatocelular (HCC), derivado de las células del parénquima hepático, y el colangiocarcinoma (CCA), derivado de las células que forman los conductos biliares, los colangiocitos. A diferencia de la mayor parte de los cánceres el CCA presenta una incidencia creciente en las últimas décadas.

La resección quirúrgica es la mejor opción curativa para los pacientes con este tipo de tumores, sin embargo, sólo es aplicable a un grupo limitado de pacientes debido a que el diagnóstico se realiza normalmente cuando el tumor se encuentra muy avanzado.

Estos tumores se caracterizan por presentar una baja sensibilidad a los fármacos antitumorales debido a que presentan o desarrollan resistencia a la quimioterapia. Entre los mecanismos de quimiorresistencia (MOC) destacan los implicados en la reducción del contenido intracelular del fármaco por alteración de los niveles de expresión o la funcionalidad de las proteínas implicadas en su captación. El sorafenib, un inhibidor de proteínas con actividad tirosina quinasa, es hasta la fecha el fármaco de elección para el tratamiento del HCC, sin embargo, su eficacia clínica es muy baja y sólo consigue ligeras mejoras en la supervivencia de los pacientes.

Para que el sorafenib pueda ejercer su acción es imprescindible que acceda al interior celular, donde se encuentran sus dianas moleculares. Por su carácter polar en soluciones acuosas no puede difundir libremente a través de la membrana plasmática, por lo que requiere de sistemas de transporte para alcanzar el interior celular. Nuestro grupo de investigación demostró que el transportador de cationes orgánicos OCT1 (gen *SLC22A1*) es capaz de transportar sorafenib, por lo que cambios en los niveles de expresión y/o en la función de este transportador pueden modificar la eficacia del sorafenib. Además, trabajos previos han descrito que en HCC y CCA hay una menor expresión del OCT1 que en las células sanas, así como una alta frecuencia de mutaciones y variantes de “splicing” aberrante, lo cual podría derivar en una menor captación y, por tanto, una menor eficacia de este fármaco. Sin embargo, los mecanismos implicados en las alteraciones de la expresión de OCT1 en los tumores hepáticos no se conocen con exactitud. Otra cuestión interesante es si los niveles de expresión o actividad de este transportador pueden tener repercusión clínica directa en la respuesta al sorafenib.

Con estos antecedentes nos planteamos como **objetivo global de esta Tesis Doctoral** investigar el valor pronóstico de la proteína OCT1 en la respuesta al tratamiento con sorafenib en pacientes con cáncer hepático primario, así como evaluar los mecanismos, tanto epigenéticos, como post-transcripcionales, potencialmente implicados en la disminución de la expresión de OCT1 en los tumores hepáticos.

Para alcanzar este objetivo global se diseñaron los siguientes objetivos parciales:

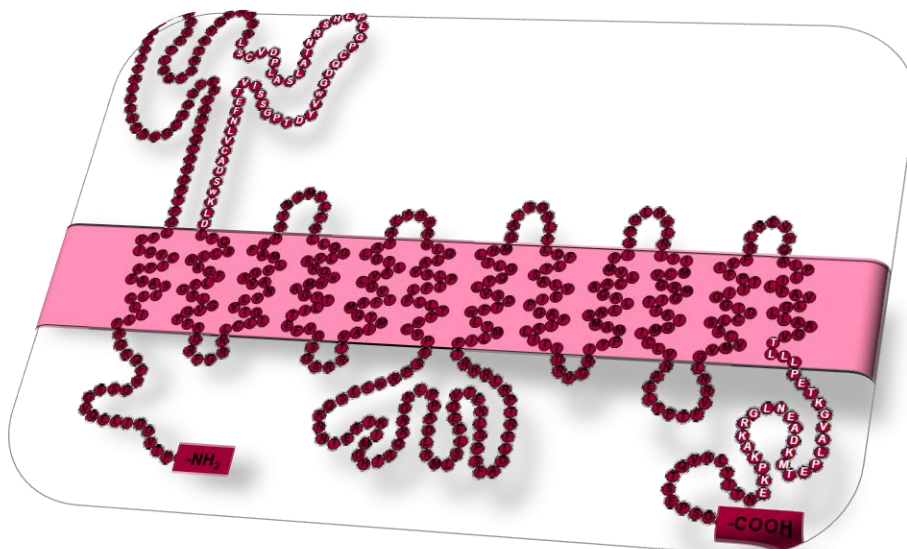
Objetivo 1: Evaluar en un estudio retrospectivo en pacientes con HCC tratados con sorafenib la posible correlación entre la expresión del OCT1 y/o su localización en la membrana plasmática con la respuesta de estos pacientes al tratamiento con sorafenib.

Objetivo 2: Investigar *in vivo* utilizando modelos experimentales la expresión de OCT1 en HCC y CCA y su papel en la captación de sorafenib por las células tumorales.

Objetivo 3: Evaluar en modelos *in vitro* e *in vivo* la relación entre la captación de sorafenib y la actividad citostática del fármaco.

Objetivo 4: Estudiar los mecanismos implicados en la reducción de la expresión del OCT1 en los tumores hepáticos; tanto a nivel epigenético, evaluando el papel de la metilación del ADN, desacetilación de histonas, o microARNs con potencial efecto regulador de la expresión de OCT1, como post-transcripcional, analizando la modulación de la degradación/estabilidad del ARN, o la aparición de formas de “splicing” aberrante.

Objetivo 5: Evaluar la utilidad de estrategias de sobre-expresión de OCT1 en el tumor para potenciar el efecto farmacológico del sorafenib.



2. INTRODUCCIÓN

2.1. SISTEMA HEPATOBILIAR

2.1.1. Generalidades

El hígado es la víscera más voluminosa del organismo, representa alrededor del 2,5% del peso corporal total, es decir, entre 1,5 y 2 kg en adultos. Recibe aporte sanguíneo por la arteria hepática, que provee sangre oxigenada, y por la vena porta, que le envía sangre del bazo, estómago, páncreas e intestino, lo que le permite recibir los elementos nutritivos absorbidos por este último antes de su paso a la circulación general.

Alrededor del 80% del volumen del hígado está formado por los hepatocitos, células epiteliales parenquimales, que se unen entre sí dejando espacios vasculares libres heterogéneos denominados sinusoides. Además, entre los hepatocitos adyacentes se encuentra un pequeño espacio formado por invaginación de sus propias membranas plasmáticas, lo que constituye el canalículo biliar, en el cual se forma la bilis primaria y se vierte al conducto biliar.

El sistema biliar incluye las unidades secretoras del hígado, el canalículo biliar, ductulos biliares (canales de Hering), los ductos biliares intrahepáticos y extrahepáticos, el conducto hepático común, el conducto cístico, la vesícula biliar y el conducto biliar común. Los colangiocitos son células epiteliales que recubren los ductos intrahepáticos y extrahepáticos del árbol biliar, y su principal función fisiológica es la modificación de la bilis derivada de hepatocitos, un proceso complejo regulado por hormonas, péptidos, nucleótidos, neurotransmisores y otras moléculas (Tabibian JH *et al.*, 2013).

2.1.2. Hepatocitos

Los hepatocitos son las células principales del hígado y son responsables de la mayoría de las funciones metabólicas de este órgano. Son células poliédricas con 6 caras que poseen una marcada polaridad, distinguiéndose regiones de distinta especificidad morfológica y funcional en la membrana plasmática (Evans WH *et al.*, 1980; Meier PJ *et al.*, 1988).

La membrana basolateral presenta el cotransportador de ácidos biliares acoplado al transporte de sodio (NTCP), los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP1B1 y OATP1B3) (Chandra P *et al.*, 2004), el transportador de cationes orgánicos (OCT1), y los transportadores de cationes orgánicos con un sitio de unión a los nucleótidos (OCTN1 y OCTN2) (Yabuuchi H. I *et al.*, 1999, Wu X *et al.*, 1998), entre otros.

La membrana apical presenta un transportador de sales biliares dependiente de ATP (BSEP); el transportador de aniones orgánicos MRP2; los transportadores MDR1 y MDR3, y el transportador BCRP (Chandra P *et al.*, 2004; Treyer A *et al.*, 2013).

2.1.3. Colangiocitos

Los colangiocitos representan una pequeña proporción del total de células hepáticas (entre un 3 y un 5%), sin embargo, juegan un papel fisiológico importante debido a que forman el sistema biliar ductal (Kanno N *et al.*, 2000).

El sistema biliar es un complejo entramado que se forma por la unión de los ductos biliares intrahepáticos formando conductos de mayor tamaño hasta que convergen en los ductos biliares extrahepáticos, los cuales finalmente vierten la bilis a la vesícula biliar y, posteriormente, al intestino (Ludwig J *et al.*, 1987). Así, 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 a las más pequeñas (Masyuk TV *et al.*, 2001).

Los colangiocitos se caracterizan por la presencia de un núcleo multilobulado, numerosas vesículas en la región subapical, alta densidad de microvellosidades y lisosomas, y pocas mitocondrias (Benedetti A *et al.*, 1996). Se ha descrito que los colangiocitos también poseen un cilio primario (Ishii M *et al.*, 1989; Larusso NF *et al.*, 2011) en su membrana apical, que desempeña funciones sensoriales y tiene un importante papel regulando las actividades biológicas de estas células, incluyendo la diferenciación celular, la proliferación y la secreción (Masyuk TV *et al.*, 2003).

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 B *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

Una parte de la población celular del hígado está formada por las células hepáticas no parenquimales; que presentan una actividad metabólica baja, entre ellas están las células endoteliales, que ocupan el mayor volumen hepático de las células hepáticas no parenquimales, las células de Ito (o células estrelladas), que almacenan vitamina A, sintetizan diferentes proteínas del tejido conectivo y secretan factores de crecimiento y las células de Kupffer, responsables de la fagocitosis de bacterias y sustancias extrañas que puedan acceder al sinusoides (Michalopoulos GK *et al.*, 1997; Guyton A *et al.*, 2000).

2.2. FUNCIONES DEL SISTEMA HEPATOBILIAR

El hígado desempeña múltiples funciones, entre ellas:

- Participa en el metabolismo de los hidratos de carbono: homeostasis de la glucosa, catabolismo de hexosas, gluconeogénesis, glucogenolisis y glucogenogénesis.
- Participa en el metabolismo de lípidos: síntesis y catabolismo de colesterol, producción de triglicéridos y ácidos grasos, síntesis y metabolismo de lipoproteínas plasmáticas, β -oxidación de ácidos grasos y producción de cuerpos cetónicos durante el ayuno.
- Participa en la síntesis y metabolismo de proteínas: como la albúmina y las de fase aguda, además de proteínas de unión a hormonas o esteroides, transformación del amonio en urea, catabolismo de bases púricas y pirimidínicas e interconversión de aminoácidos no esenciales.

Además de las funciones metabólicas el hígado participa en:

- Producción de bilis: el hígado excreta la bilis al duodeno, donde desempeña un papel fundamental en la digestión de grasas y vitaminas liposolubles. Los colangiocitos llevan a cabo procesos de secreción y absorción de agua, electrolitos y otros solutos orgánicos de la bilis modificando así la composición de la bilis durante el tránsito de la misma a través de los conductos biliares (Alpini G *et al.*, 2001).
- Síntesis de factores de coagulación, como el fibrinógeno, factores III, V, VII, IX y XI, del grupo hemo y del factor de crecimiento IGF-1.
- Almacén de múltiples sustancias como glucosa en forma de glucógeno, vitamina B12, hierro y cobre.
- Destoxificación y otras reacciones de biotransformación.
- Función inmunitaria por la actividad de las células Kupffer.

2.3. CÁNCER HEPÁTICO

Los tumores hepáticos constituyen el quinto tipo de cáncer más frecuente y son la tercera causa de muerte por cáncer. En general, son más frecuentes en hombres que en mujeres (Torre LA *et al.*, 2015). Se pueden clasificar según su origen en: i) primarios, derivados de células hepáticas, entre los que se encuentran el carcinoma hepatocelular (HCC), derivado de hepatocitos, el hepatoblastoma (HB), que se desarrolla en niños, y el colangiocarcinoma (CCA), derivado de colangiocitos; y; ii) secundarios, debidos a metástasis de tumores originados en otros tejidos, frecuentemente tumores colorrectales (Benson AB *et al.*, 2007).

Además, existen otros menos frecuentes, como el hemangioma, el adenoma colangiocelular, el cistadenoma biliar, el adenoma hepatocelular o el hemangioendotelioma infantil, entre otros. En algunas ocasiones aparecen tumores mixtos HCC-CCA, que combinan características de ambos tipos, aunque su frecuencia es muy baja; entre un 1 y un 4% de los tumores hepáticos primarios (Aoki K *et al.*, 1993; Maeda T *et al.*, 1995).

2.3.1. Carcinoma hepatocelular

El HCC es el cáncer hepático primario más frecuente, representando el quinto tipo de cáncer más común a nivel global. Deriva de los hepatocitos y se caracteriza por un mal pronóstico, principalmente porque su diagnóstico suele ser tardío, cuando la enfermedad está en un estadio avanzado, es frecuente que haya una cirrosis subyacente y es muy resistente a la quimioterapia (McGlynn KA *et al.*, 2015).

Etiología

La mayoría de los casos de HCC se desarrollan a partir de una enfermedad hepática crónica. Así, las infecciones por el virus de la hepatitis B y C (VHB y VHC) son un importante factor de riesgo, junto con la cirrosis. También se ha asociado el desarrollo de HCC con la exposición a aflatoxinas o a agua contaminada con toxinas de algas azul-verdosas, con el consumo de nuez de betel y con el tabaquismo.

Está aceptado que el daño crónico por consumo elevado de alcohol y el síndrome metabólico conducen a esteatosis, esteatohepatitis, cirrosis y finalmente a HCC (Recio-Boiles A *et al.*, 2018).

Epidemiología

El HCC es más común en hombres que en mujeres, con una proporción de 2,4:1 a nivel mundial. La edad media de los pacientes en el momento del diagnóstico del HCC es alrededor de los 50 años. La prevalencia del HCC es mayor en los países asiáticos y africanos y menor en los países desarrollados, exceptuando algunos como Japón, Italia y Francia. La incidencia del HCC está aumentando en algunas regiones del mundo, en concreto, en EE.UU ha pasado de 1,4 casos/100.000 habitantes al año entre 1976-1980 a 6,2 casos/100.000 habitantes en 2011 (Ghoury YA *et al.*, 2017). Además, aunque la incidencia del HCC aumenta con la edad, se ha observado que existe una tendencia a desarrollar este tipo de tumor a una edad más temprana en las áreas con alta incidencia (Dimitroulis D *et al.*, 2017).

Patogenia

La hepatocarcinogénesis es un proceso complejo, con múltiples pasos, en la cual pueden estar alteradas diversas vías de señalización celular, lo que contribuye a que esta enfermedad tenga a un perfil molecular heterogéneo.

Aunque se han descrito múltiples asociaciones de genes con el HCC, la mayoría de los eventos genéticos iniciadores de HCC son desconocidos. La inestabilidad genómica, incluido el polimorfismo cromosómico o las mutaciones de nucleótido único (SNPs), puede promover el desarrollo del cáncer de hígado. Además, se ha descrito la presencia de mutaciones en varios genes en HCC (por ejemplo, promotor TERT, *TP53*, *CTNNB1*, *ARID1A*, *FGF*) (Recio-Boiles A *et al.*, 2018). Entre las mutaciones destacan las que afectan al gen *TP53* (presentes entre un 25-40% de los cánceres, dependiendo del estadio), y al gen codificante de β -catenina (alrededor del 25% de los tumores hepáticos, sobre todo los HCC desarrollados por una infección por VHC). Además de las mutaciones en oncogenes, se han descrito mutaciones en genes supresores de tumores, alteraciones epigenéticas, y modulación de la transcripción de oncogenes por microARNs (Farazi PA *et al.*, 2006; Ji J *et al.*, 2009). El resultado de estas alteraciones es la activación de cascadas de señalización relacionadas con la supervivencia celular y la proliferación; así, las vías JAK/STAT, Wnt/ β -catenina, y PI3K-AKT-mTOR se han identificado como principales impulsoras del desarrollo del HCC (Recio-Boiles A *et al.*, 2018). Una de las cascadas más frecuentemente alteradas es la ruta de proliferación iniciada por el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) mediada por Ras, que está activada en más del 50% de los casos de HCC (Villanueva *et al.*, 2007).

Diagnóstico

En la mayoría de los casos la aparición de los síntomas clínicos del HCC (malestar, 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 (Llovet JM *et al.*, 2008a). Algunos estudios han confirmado que la detección temprana del HCC confiere un beneficio de supervivencia para los pacientes (Van Meer S *et al.*, 2015).

El diagnóstico de HCC se basa principalmente en técnicas de imagen y pruebas de laboratorio. Las técnicas de imagen más utilizadas en el diagnóstico son la ecografía, la tomografía computarizada (TC), y la resonancia magnética (RM) (Ghanaati H *et al.*, 2012).

Además, se utilizan para el diagnóstico de HCC la detección de los niveles séricos de marcadores tumorales como la α -fetoproteína (AFP), la fracción de lectina AFP (AFP-L3) y la des- γ -carboxi protrombina (DCP). Sin embargo, estos marcadores carecen de suficiente

sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de HCC sin otras pruebas complementarias (Sterling RK *et al.*, 2009).

Estadificación

La estadificación tumoral que describe el grado de extensión del tumor es un factor crítico para el pronóstico de la enfermedad y para optimizar el tratamiento en cada caso. Sin embargo, el pronóstico para los pacientes con HCC no sólo se asocia con el estadio de la enfermedad, sino que también depende de la función hepática subyacente y del estado funcional de cada paciente, ya que, como se ha comentado anteriormente, el HCC aparece en la mayoría de los casos asociado a cirrosis, lo que puede comprometer la función hepática, por lo que es imprescindible considerar este concepto conjuntamente con la extensión tumoral (Llovet JM *et al.*, 2003). El sistema de estadificación del HCC denominado BCLC, propuesto por el Hospital Clínico de Barcelona (BCLC “Barcelona Clinic Liver Cancer”) es uno de los más aceptados, y surgió de la identificación de factores pronósticos en varios ensayos clínicos, llevando a proponer una clasificación con cinco estadios que se asocian con el pronóstico y a los que se ha asignado el tratamiento que se considera más adecuado (Bruix J *et al.*, 2001).

El BCLC es un sistema de estadificación que tiene en cuenta el tamaño y número de tumores, la función hepática subyacente, y el estado funcional general del paciente (Tabla 1.1) (De Lope CR *et al.*, 2012).

Tabla 1.1. Estadificación del HCC (BCLC “Barcelona Clinic Liver Cancer”).

Estadio	PS	Características del tumor	Función hepática
0	0	Único \leq 2 cm	Child-Pugh A
A	0	Único o hasta 3 nódulos \leq 3 cm	Child-Pugh A-B
B (HCC intermedio)	0	Múltiples nódulos y grandes	Child-Pugh A-B
C (HCC avanzado)	1-2	Invasión vascular o extensión extrahepática	Child-Pugh A-B
D (HCC estadio final)	3-4	Cualquiera	Child-Pugh C

PS, del inglés “Performance Status”.

El puntaje Child-Pugh (CP) es un sistema de clasificación simple y ampliamente utilizado para la función hepática (Tabla 1.2) (Subramaniam S *et al.*, 2013), aunque existen inconvenientes al utilizar el sistema CP en la evaluación de la función hepática, incluidas las variaciones entre laboratorios, las fluctuaciones diarias en los parámetros clave y la naturaleza subjetiva de la clasificación clínica de las enfermedades hepáticas crónicas (Botta F *et al.*, 2003).

Tabla 1.2. Criterios clínicos utilizados para clasificar la enfermedad hepática empleando la escala CP (Child-Pugh) (A: menor severidad – C: mayor severidad).

Score	A	B	C
Encefalopatía hepática	Ausente	Leve	Moderada
Ascitis	Ausente	Leve	Moderada-severa
Bilirrubina sérica (mg/dl)	1-2	2-3	> 3
Albúmina sérica (mg/dl)	> 3,5	2,8-3,5	< 2,8
PT (segundos)	< 4	4-6	> 6

PT, del inglés "Prothrombin Time".

Tratamiento

El tratamiento de elección para los pacientes con HCC en fases iniciales de desarrollo es la resección quirúrgica completa del tumor, sin embargo, esta opción no es siempre posible por distintas razones (Bruix J *et al.*, 2005). Junto con la resección curativa, el trasplante hepático es el tratamiento de primera opción, especialmente en presencia de enfermedad hepática subyacente, ya que elimina el tumor y el hígado cirrótico que predispone al desarrollo de HCC. Sin embargo, la opción del trasplante se ve limitada por la escasez de órganos y, además, porque con frecuencia los pacientes abandonan someterse a la operación del trasplante durante el tiempo de espera (6% durante el primer año a 43% durante el segundo año) (Yao FY *et al.*, 2002).

Los pacientes con HCC que no son elegibles para resección quirúrgica o para trasplante hepático pueden recibir otro tipo de tratamientos, como la terapia local ablativa (Livraghi T *et al.*, 2002), que consiste en la administración de calor con radiofrecuencia o frío (crioablación) para eliminar el tejido tumoral. Otra opción es la quimioembolización por catéter transarterial (TACE), un tratamiento paliativo para pacientes con HCC inoperables con lesiones grandes o multinodulares limitadas al hígado y con una función hepática adecuada (Facciorusso A *et al.*, 2016). Consiste en administrar localmente la quimioterapia

junto con un agente que restringe el aporte de sangre al tumor. Se han utilizado diversos protocolos de tratamiento con diferentes agentes quimioterápicos (Lencioni R *et al.*, 2012). La estrategia se dirige a conseguir la concentración máxima y sostenida del fármaco/s dentro del tumor, manteniendo la exposición sistémica lo más baja posible, además, se suma el efecto beneficioso de reducir la irrigación de los tumores.

La radioterapia conformada tridimensional (CRT) permite crear una imagen tridimensional del tumor y que se administre la mayor dosis de radiación posible al tumor sin afectar al tejido sano. Ha mostrado buenos resultados a dosis entre 40 y 60 Gy en pacientes con HCC avanzado, con una tasa media de respuesta del 45%, una mediana de supervivencia de 10 a 15 meses, una supervivencia a 1 año > 70% y a los 5 años entre 9-25%. La CRT combinada con TACE en varios esquemas de dosis ha mostrado ventajas como terapia de rescate y se considera una opción para pacientes inoperables debido a su estado funcional (Tsai CL *et al.*, 2016).

Las opciones terapéuticas del HCC avanzado son limitadas debido a la resistencia a la quimioterapia. La terapia sistémica con doxorubicina o cisplatino produce una respuesta baja, y las combinaciones de fármacos ofrecen un mejor control de la enfermedad, pero apenas mejora de la supervivencia. Además, debido a la disfunción hepática subyacente, los pacientes tienen una tolerancia limitada a la dosis completa de poliquimioterapia (Kim DW *et al.*, 2017). Otros agentes citotóxicos, como la gemcitabina, han demostrado un beneficio clínico muy limitado (Matsumoto K *et al.*, 2008).

El sorafenib es un inhibidor oral de las multi-quinasas y ha sido el primer fármaco que ha demostrado una mejoría estadísticamente significativa en la supervivencia global en pacientes con HCC avanzado con CP clase A y moderada en los de CP clase B (Abou-Alfa GK *et al.*, 2006). Recientemente, se ha propuesto que otro inhibidor de multi-quinasas, el regorafenib, podría ser una opción para pacientes que no responden o no toleran el sorafenib (Bruix J *et al.*, 2013).

2.3.2. Colangiocarcinoma

El colangiocarcinoma (CCA) es la neoplasia biliar maligna más frecuente y la segunda neoplasia maligna hepática primaria más común. Engloba distintos tipos de tumores que se suelen clasificar en función de su localización anatómica en: i) intrahepático (iCCA), producido a partir de pequeños conductos biliares en el hígado, y dos tipos de CCA extrahepático, ambos producidos en el epitelio del árbol biliar extrahepático; ii) perihiliar (pCCA), desarrollado en el tramo de conductos a la salida del hígado y iii) distal (dCCA).

Aunque es más común en Asia, su incidencia en Europa y América del Norte ha aumentado significativamente en las últimas décadas. El pronóstico de CCA es funesto, ya que la cirugía es el único tratamiento potencialmente curativo, pero la mayoría de los pacientes se diagnostican cuando los tumores están en estadios avanzados, lo que imposibilita la cirugía. Además, hay un alto porcentaje de recurrencia tras la operación y la respuesta a la quimioterapia disponible es muy baja (Banales JM *et al.*, 2016).

Epidemiología

El CCA supone entre el 10-25% de las neoplasias hepatobiliares primarias. Las tasas de incidencia de CCA son heterogéneas, con diferencias inter e intra-continenciales, encontrándose las más altas en el sudeste asiático y las más bajas en Australia. Dentro del sudeste de Asia, las cifras varían entre 0,1 y 71,3 casos/100.000 habitantes, mientras que en los países europeos las tasas de incidencia oscilan entre 0,4 y 1,8 casos/100.000 habitantes (Khan SA *et al.*, 2012; Witjes CD *et al.*, 2012). El CCA es ligeramente más común en hombres que en mujeres en proporción de 1,2-1,5:1 (Tyson GL *et al.*, 2011) y, a nivel mundial, los pacientes diagnosticados son, normalmente, mayores de 50 años.

Etiología

La etiología del CCA no está clara, se considera una enfermedad “de novo” sin una causa aparente, aunque sí se ha encontrado una asociación clara con varios factores de riesgo, algunos generales, como la edad (> de 65 años), la obesidad o el consumo del alcohol. Sin embargo, los factores de riesgo más importantes son los que causan inflamaciones crónicas del hígado, como las infecciones parasitarias por trematodos hepatobiliares de las especies *O. viverrini* y *C. sinensis*, la colangitis esclerosante primaria, defectos biliares congénitos como la enfermedad de Caroli, infecciones virales, procedimientos post-quirúrgicos, como anastomosis bilio-digestivas, y la exposición a factores químicos como asbestos o el agente de contraste thorotrast (Banales JM *et al.*, 2016).

Patogenia

El CCA engloba a un grupo de cánceres biliares heterogéneo, no sólo por la localización anatómica, sino que, además, los CCAs pueden tener distintas células de origen (Komuta M *et al.*, 2012), como células stem hepáticas, colangiocitos inmaduros NCAM⁺, y células de las glándulas peribiliares (Cardinale V *et al.*, 2012).

En base al patrón de crecimiento macroscópico del tumor, los CCAs se clasifican en: formadores de masa, periductales infiltrantes, e intraductales, siendo los primeros los más frecuentes.

La inflamación y la colestasis son factores clave en la colangiocarcinogénesis. Las citocinas proinflamatorias, como la interleucina-6 (IL-6), activan la sintasa del óxido nítrico, lo que resulta en un aumento del daño oxidativo del ADN, inhibición de enzimas de reparación del ADN y la expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX-2). Además, las vías proinflamatorias regulan negativamente la expresión y actividad de transportadores hepato biliares contribuyendo así a la colestasis (Kosters A *et al.*, 2010). Los ácidos biliares y oxiesteroles activan el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y favorecen la expresión de COX-2, que desregula el crecimiento de las células colangiolares, estimulando la proliferación y disminuyendo la apoptosis, también regulan positivamente las vías de señalización pro-oncogénicas, como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), IL-6 y EGFR (Yoon JH *et al.*, 2002).

Mediante estudios de secuenciación genética se han identificado en los CCAs mutaciones somáticas en oncogenes (como, por ejemplo, *KRAS*, *PI3KCA* y *MET*), o genes supresores tumorales (como, *TP53* o *SMAD4*) y genes modificadores de cromatina (como, *ARID1A*, *BAP1* y *PBMR1*) (Ong CK *et al.*, 2012, Chan-On W *et al.*, 2013; Voss JS *et al.*, 2013). Recientemente, se han encontrado modificaciones oncogénicas en la proteína de fusión del factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGFR2) en hasta el 45% de los pacientes con iCCA (Borad MJ *et al.*, 2015). También se encontró un aumento, sin alteración genómica, de EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico humano-2 (*HER2*) y *MET*, especialmente en pacientes con mal pronóstico (Andersen JB *et al.*, 2012). Estudios del perfil de expresión del genoma completo en CCA han sugerido la división de iCCA en dos principales subtipos biológicos: i) el tipo inflamatorio, que se caracteriza por la activación a procesos inflamatorios, sobre-expresión de citocinas y activación de STAT3, y ii) el tipo proliferativo, que se caracteriza por la activación de rutas de señalización oncogénica (Sia D *et al.*, 2013).

Diagnóstico

Los síntomas del CCA son poco específicos y aparecen en etapas muy avanzadas de la enfermedad. Las manifestaciones clínicas más comunes son dolor abdominal, pérdida de peso y debilidad, ictericia, orina oscura, prurito y fiebre (Farhat MH *et al.*, 2008). Si el CCA se localiza en el conducto biliar común o conducto hepático la ictericia debida a la obstrucción puede ocurrir en estadios iniciales, sin embargo, la ictericia se manifiesta en estadios más tardíos si se trata de un iCCA o pCCA.

El marcador tumoral más utilizado para ayudar en el diagnóstico del CCA es el antígeno carbohidrato 19-9 (CA 19-9). Su precisión para distinguir CCA de HCC es del 63-67% (Tao LY *et al.*, 2010). El uso de otros marcadores tumorales está limitado debido a su baja especificidad (por ejemplo, CEA y CA-125) o por la necesidad de validación adicional (por ejemplo, CA242 y CYFRA 21-1).

Las técnicas de diagnóstico por imagen son muy útiles para evaluar la localización y la extensión del tumor. La más utilizada es la colangiografía, que es especialmente útil en el caso de CCA extrahepático (Gores GJ *et al.*, 2000). También son utilizadas la TC y RM que, en algunos casos, pueden ayudar a distinguir el CCA del HCC en tumores de más de 2 cm (Rimola J *et al.*, 2009). Además, la tomografía por emisión de positrones (PET) combinada con TC tiene una sensibilidad y especificidad de hasta 95% y 83% en la evaluación del tumor primario (Annunziata S *et al.*, 2014).

Tratamiento

La única terapia curativa para el CCA es la resección quirúrgica y, por ello, es el tratamiento de elección cuando es posible realizarla (Blechacz B *et al.*, 2008).

La mayoría de los pacientes con CCA no son candidatos para cirugía cuando son diagnosticados y, además, entre el 10-45% de los aceptados para resección son descartados tras la laparotomía (Morimoto Y *et al.*, 2003; Konstadoulakis MM *et al.*, 2007). Aunque las técnicas quirúrgicas han ido mejorando, la tasa de recurrencia es alta (49-64%) y, generalmente, ocurre dentro de los 2 a 3 años posteriores a la resección (Choi SB *et al.*, 2009).

El trasplante hepático no es recomendable como monoterapia para el CCA debido a las altas tasas de recurrencia y a la baja supervivencia a largo plazo.

Recientemente, la quimiorradiación neoadyuvante seguida de trasplante hepático se ha propuesto como un tratamiento eficaz para el pCCA. Las tasas de recurrencia son del 20% y la supervivencia a 5 años sin recurrencia del 68%. Sin embargo, los criterios de selección de pacientes son estrictos y entre el 25-31% de los pacientes acaban siendo excluidos mientras están en lista de espera por progresión de su enfermedad (Darwish Murad S *et al.*, 2012).

Se pueden aplicar terapias locoregionales, como ablación por radiofrecuencia, radioterapia, TACE, o radioterapia intraarterial selectiva, pero ninguna ha demostrado un beneficio en la supervivencia de los pacientes (Boehm LM *et al.*, 2015).

Los fármacos antitumorales mejor estudiados son el 5-FU y la gemcitabina (Alberts S.R *et al.*, 2007). El tratamiento con gemcitabina se ha propuesto como una alternativa para los pacientes con CCA irresecable, y el 5-FU se ha probado en combinación con distintos

fármacos con escaso éxito. Una de las combinaciones más utilizadas es gemcitabina y cisplatino, pero sólo un estudio describió una mejora de 6 meses en la supervivencia global (Valle J *et al.*, 2010).

Respecto a la utilidad de inhibidores de tirosina quinasas (TKIs) para el CCA, los ensayos clínicos realizados hasta la fecha han demostrado un efecto beneficioso limitado del sorafenib (Luo X *et al.*, 2017; Pan TT *et al.*, 2017).

2.4. INHIBIDORES DE TIROSINA QUINASA EN CÁNCER HEPÁTICO

Las proteínas tirosina quinasas (TKs) son enzimas con una subunidad catalítica que transfiere el fosfato del ATP a un residuo tirosina de otras proteínas para inducir un cambio en su actividad. Estas enzimas se encuentran en varias cascadas de señalización, por lo que las alteraciones en TKs juegan un papel en la iniciación o progresión del cáncer (Radha V *et al.*, 1996).

2.4.1. Ruta RAF/MEK/ERK

Las TKs son importantes dianas en la farmacología antitumoral debido a su función en rutas de transducción de señales que están implicadas en el control del crecimiento celular, metabolismo, diferenciación y apoptosis.

La vía de señalización RAS/RAF/MEK/ERK está implicada en la regulación de diferentes procesos celulares, incluida la proliferación celular, la diferenciación, la supervivencia y la apoptosis, y permite la transducción de señales desde la superficie celular hasta el citoplasma y el núcleo. La señalización aberrante de esta ruta impulsa el inicio y la progresión del tumor y puede ser activada por receptores de superficie celular, como EGFR, PDGFR o VEGFR. RAF consta de 3 isoformas (A-, B-, y C-RAF), de las cuales B-RAF se ha relacionado directamente con procesos oncogénicos. Las proteínas RAF fosforilan las quinasas MAPK y ERK (MEK), que fosforilan a distintos factores de transcripción, modulando así la expresión génica (Pachmayr E *et al.*, 2017).

La regulación aumentada de la vía RAS/RAF/MEK/ERK se observa comúnmente en varios tipos de cáncer y, como consecuencia, un alto porcentaje de los cánceres presentan mutaciones activadoras en B-RAF o RAS (Campbell PM *et al.*, 2004). Otra consecuencia de la activación de esta ruta es la inhibición de la apoptosis mediante la fosforilación de Bad, lo que permite que Bcl-2 genere una respuesta antiapoptótica (McCubrey JA *et al.*, 2007).

2.4.2. Ruta de VEGF

VEGF es la principal proteína pro-angiogénica. De hecho, la señalización mediada por VEGF promueve la proliferación, diferenciación y migración de las células epiteliales, tanto fisiológicamente, como en tumores sólidos (Tang D *et al.*, 2006). La familia VEGF está compuesta por seis proteínas estructuralmente relacionadas que se unen a tres receptores celulares expresados en la superficie (VEGFR-1/2/3). VEGFR-1 y VEGFR-2 se expresan principalmente en células endoteliales y VEGFR-3 en el endotelio linfático (Ferrara N *et al.*, 2004). La principal señal pro-angiogénica se genera a partir del VEGFR-2, que se une a la fosfolipasa (PL) -C γ y activa la proteína quinasa C (PKC). Este mecanismo activa MAPK a través de un mecanismo dependiente de MEK e independiente de RAS (Takahashi T *et al.*, 1999), aunque existen otros estudios que sugieren que el efecto de VEGF también está mediado por la activación de RAS (Meadows KN *et al.*, 2001).

2.4.3. Antitumorales inhibidores de tirosina quinasas

En las últimas décadas se ha diseñado un grupo de fármacos antitumorales, denominados TKIs, con el objetivo de bloquear las proteínas quinasas implicadas en rutas que promueven el desarrollo tumoral (Hartmann JT *et al.*, 2009).

2.4.3.1. Sorafenib

El sorafenib, *N*-(3-trifluorometil-4-clorofenil)-*N'*-(4-[2-metilcarbamoil piridina-4-yl] oxifenil) urea, (también conocido como BAY43-9006, o Nexavar[®]), es una bi-aril urea, que se utiliza como tosilato de sorafenib, con actividad inhibidora de multiquinasas, 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 L *et al.*, 2006). Es capaz de inducir apoptosis por la inhibición de la proteína Mcl-1 (Liu L *et al.*, 2006). Además, inhibe ciertos receptores de tirosina quinasa (RTKs) implicados en la angiogénesis como VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β , c-KIT, FLT-3 y el receptor RET (Wilhelm SM *et al.*, 2004).

El mecanismo de acción del sorafenib es una inhibición competitiva del dominio catalítico de unión al ATP de sus respectivas quinasas, 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 PT *et al.*, 2004; Wilhelm SM *et al.*, 2004). Además, se ha descrito que hay una alteración en la glicosilación de las proteínas en las células de HCC tratadas con sorafenib (Liu T *et al.*, 2017).

El sorafenib ha mostrado una potente actividad antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo* frente al HCC y CCA, así como en carcinomas de células renales, mama, colon, páncreas y ovario

(Strumberg D *et al.*, 2005; Wilhelm SM *et al.*, 2008; Pan TT *et al.*, 2017). Actualmente, el sorafenib está aprobado para el tratamiento de pacientes con HCC irresecable (Llovet JM *et al.*, 2008b), con carcinoma renal avanzado (Escudier B *et al.*, 2007) y con cáncer de tiroides (Pitoy F *et al.*, 2016).

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- β (Liu L *et al.*, 2006), FLT-3, RET y c-kit (Abou-Alfa GK *et al.*, 2006).

El sorafenib se utiliza en el tratamiento de los tumores hepáticos por vía oral a dosis de 400 mg dos veces al día (Bolondi L *et al.*, 2015). Uno de los ensayos clínicos más relevantes que demostró el potencial del sorafenib como tratamiento del HCC fue el ensayo SHARP (Sorafenib Hepatocellular carcinoma Assessment Randomized Protocol), el cual mostró que este fármaco prolongaba la supervivencia media comparado con el grupo de pacientes que recibieron el placebo (10,7 meses vs 7,9 meses) y el tiempo de progresión en pacientes con HCC avanzado (Llovet JM *et al.*, 2008b). 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.

El ensayo Asia-Pacific (AP) encontró que la supervivencia de los pacientes tratados con sorafenib aumentaba de 4,2 meses en el grupo placebo a 6,5 meses en el grupo de sorafenib, además, el tiempo de progresión fue de 2,8 meses en el grupo de sorafenib vs 1,4 meses en el grupo placebo (Cheng AL *et al.*, 2009). El estudio GIDEON demostró un excelente perfil de seguridad del sorafenib en pacientes con HCC con CP A y B (Marrero JA *et al.*, 2016). Además, algunos casos clínicos han mostrado una remisión completa de la enfermedad a largo plazo (Park JG *et al.*, 2017).

Un meta-análisis reciente ha sugerido que la combinación de la resección quirúrgica con el tratamiento con sorafenib es una buena estrategia terapéutica en pacientes con HCC en estadio BCLC B, C y D (Chang L *et al.*, 2017). Aunque su eficacia es moderada en el tratamiento del HCC, este fármaco se considera seguro, ya que no afecta a la función hepática (Raoul JL *et al.*, 2012).

El sorafenib se puede utilizar en combinación con otros tipos de tratamientos (Gao JJ *et al.*, 2015). Una opción es la combinación con TACE, ya que la hipoxia tumoral que induce esta estrategia puede inducir la producción de factores pro-angiogénicos, por lo que el bloqueo

de la expresión de VEGF y otras vías pro-angiogénicas con sorafenib puede prevenir la recurrencia o la progresión de la enfermedad (Xiao EH *et al.*, 2009). Los primeros ensayos clínicos mostraron la seguridad y eficacia de la combinación de TACE con sorafenib en el HCC intermedio y avanzado (Zhao Y *et al.*, 2013).

Aunque el tratamiento con sorafenib supuso un hito en la terapia del HCC, el efecto de este fármaco en el CCA no está claro. En ensayos *in vitro* con líneas celulares de CCA humano el sorafenib mostró una potente actividad antitumoral por la inhibición de la ruta de las MAPK y parada del ciclo celular (Huether A *et al.*, 2007). Aunque el sorafenib es, generalmente, bien tolerado por los pacientes con CCA (Pan TT *et al.*, 2017), el efecto sobre la supervivencia es bajo (Luo X *et al.*, 2017) y sólo ligeramente mejor en combinación con gemcitabina (Li H *et al.*, 2016).

Hasta la fecha, los resultados de los ensayos clínicos en pacientes con CCA no son concluyentes; se ha descrito una baja o nula actividad antitumoral (Bengala C *et al.*, 2010; El-Khoueiry AB *et al.*, 2012), un efecto moderado (LaRocca RV *et al.*, 2007) y en un caso aislado una potente actividad, con un aumento de la supervivencia (Pinter M *et al.*, 2011).

En general, el tratamiento con sorafenib en pacientes con tumores hepáticos tiene efectos beneficiosos moderados y transitorios por una pérdida de la eficacia debida a mecanismos de resistencia y, además, presenta efectos tóxicos; afectaciones dérmicas, como el “síndrome mano-pie”, hipertensión, fatiga, proteinuria, o diarrea y, más raramente, efectos cardiovasculares adversos muy graves (Li Y *et al.*, 2015).

2.4.3.2. Otros fármacos inhibidores de la actividad tirosina quinasa

Existen varios TKIs aprobados o utilizados en ensayos clínicos para el tratamiento de distintos tipos de tumores con distinto éxito. A continuación, se comentan los que se han probado en tumores hepatobiliares.

El **regorafenib** se utiliza como segunda línea de tratamiento en HCC. Los datos del ensayo RESORCE, un estudio de fase III controlado con placebo que evaluó la eficacia y seguridad de este fármaco en pacientes con HCC que progresaron tras el tratamiento sistémico con sorafenib, mostraron una ligera mejora de la supervivencia global de 2,8 meses del tratamiento con regorafenib en comparación con placebo (10,6 meses frente a 7,8 meses) (Trojan J *et al.*, 2016).

El **sunitinib** inhibe múltiples TKs, como PDGFR- α y PDGFR- β , VEGFR-1, VEGFR-2, y VEGFR-3, KIT, FLT-3, el receptor del factor estimulador de colonias (CSF-1R) y el receptor RET (Mendel DB *et al.*, 2003; Patyna S *et al.*, 2006). En un ensayo aleatorizado de fase III

para comparar el efecto de sunitinib vs sorafenib en HCC, la mediana de supervivencia fue de 7,9 meses en el grupo de sunitinib y de 10,2 meses en el de sorafenib (Cheng AL *et al.*, 2013).

El **tivantinib** (ARQ 197) es un inhibidor selectivo de la tirosina quinasa MET. Los estudios de fase I y II han mostrado potencial en el tratamiento del HCC cuando los pacientes no responden al sorafenib o cuando no es tolerado por los pacientes (Pievsky D *et al.*, 2016).

2.5. RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL EN CÁNCER HEPÁTICO

La existencia de quimiorresistencia antes de la exposición a los agentes quimioterápicos o resistencia primaria, o su desarrollo o potenciación durante el tratamiento o resistencia adquirida, constituyen un problema clínico común en el tratamiento del cáncer (Marin JJ *et al.*, 2009). El cáncer hepático se encuentra entre los tumores con menor sensibilidad a la quimioterapia debido a varios mecanismos que contribuyen a la quimiorresistencia y que se han clasificado en 7 grupos o MOCs (del inglés, mechanisms of chemoresistance) (Marin JJ *et al.*, 2010; Briz. O *et al.*, 2017).

MOC-1: Incluye los mecanismos que llevan a la disminución de la concentración intracelular de los fármacos, y engloba dos tipos de mecanismos: i) MOC1-a, mediante la reducción de la captación de los fármacos y ii) MOC-1b, mediante el aumento del eflujo de los fármacos.

MOC-2: Engloba a los mecanismos que participan en la disminución de la actividad intracelular del fármaco, bien por una reducción en la actividad de las enzimas responsables del paso de profármacos a compuestos activos o bien por un aumento de la actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo de los fármacos para producir metabolitos inactivos.

MOC-3: Incluye cambios en la expresión o mutaciones en las dianas de los fármacos.

MOC-4: Engloba los mecanismos que provocan un incremento en la capacidad de la reparación del ADN en las células tumorales, lo que lleva a la resistencia a los agentes antitumorales cuyo mecanismo de acción se basa en la alteración de ADN.

MOC-5: Incluye los procesos que desregulan el balance apoptosis/supervivencia; como los procesos que llevan a la activación del crecimiento celular mediante la reducción de apoptosis (MOC-5a) o el aumento de las vías de supervivencia (MOC-5b) que inducen resistencia a varios fármacos antitumorales.

MOC-6: Mecanismos debidos a cambios en el microambiente tumoral, entre los que se incluyen la hipoxia y la acidificación, pueden reducir la respuesta a la quimioterapia.

MOC-7: Incluye los mecanismos que modulan la transición epitelial-mesenquimal (EMT) de las células tumorales, un proceso en el cual las células epiteliales del tumor pierden su polaridad y adquieren un fenotipo con características mesenquimales, lo que aumenta su capacidad de invasión, metástasis y su resistencia a fármacos.

2.5.1. Papel de los transportadores implicados en la disminución de la concentración intracelular hepática de fármacos (MOC-1)

El concepto de transportoma hace referencia al conjunto de los genes relacionados con el transporte de fármacos cuyos cambios de expresión pueden determinar la respuesta a un tratamiento antitumoral (Huang Y *et al.*, 2004).

La concentración intracelular de los fármacos está determinada, en parte, por el balance entre captación y eflujo. La mayoría de los fármacos no pueden ser transportados a través la membrana plasmática por difusión debido a su bajo carácter lipofílico y, por ello, requieren la participación de transportadores específicos expresados en la membrana plasmática (Chandra P *et al.*, 2004).

El transporte de gran número de moléculas orgánicas o iones inorgánicos, tanto sustratos naturales como fármacos, a través la membrana plasmática se puede realizar mediante un grupo de proteínas transportadoras de la familia SLC ("Solute Carriers"). Las células hepáticas expresan varias proteínas de la familia SLC, lo que puede ser un factor determinante de la captación y en consecuencia de la actividad antitumoral de varios fármacos (Okaba M *et al.*, 2008). Sin embargo, el contenido intracelular del fármaco puede verse disminuido por la actividad de proteínas ABC ("ATP-binding cassette") que participan en el eflujo de los fármacos. Además, hay que tener en cuenta que puede existir una diferencia en la expresión de los transportadores en el tejido tumoral en comparación con el tejido no tumoral, lo que, junto con la presencia de polimorfismos, puede afectar a la función de estos transportadores (Kerb R *et al.*, 2001; Suzuki. H *et al.*, 2002). Estos cambios en la expresión pueden ocurrir durante el desarrollo tumoral o tras la quimioterapia.

Los transportadores SLC constituyen una gran superfamilia de transportadores, que actualmente comprende más de 400 miembros organizados en 52 familias (Hediger MA *et al.*, 2013; Perland E *et al.*, 2017). Por la importancia en esta Tesis Doctoral comentaremos en detalle el transportador OCT1.

2.6. EL TRANSPORTADOR DE CATIONES ORGÁNICOS OCT1 (GEN *SLC22A1*)

El transportador de cationes orgánicos OCT1 es un miembro de la familia SLC, del subgrupo SLC22A, que contiene 3 miembros principales OCT1, OCT2 y OCT3, que muestran una identidad en su secuencia de aminoácidos entre el 50-70% (Koepsell H *et al.*, 2015). Los miembros de esta familia transportan cationes orgánicos endógenos y xenobióticos, incluidos varios fármacos. Alrededor del 40% de los fármacos son cationes orgánicos y, por ello, son potenciales sustratos de OCT1 (Nies AT *et al.*, 2009). El transporte de compuestos a través OCT1 se clasifica como difusión facilitada independiente de sodio, cloro o gradiente de protones (Koepsell H *et al.*, 2011).

2.6.1. Estructura del OCT1 (gen *SLC22A1*)

El gen *SLC22A1* humano se clonó por primera vez en el año 1997 (Gorboulev V *et al.*, 1997; Zhang L *et al.*, 1997). Contiene 11 exones y 10 intrones (abarcando un total de 37,41 kb) (Hayer M *et al.*, 1999). Se localiza en el locus cromosómico 6q26 en un grupo de genes que contiene OCT1, OCT2 y OCT3 (Koehler MR *et al.*, 1997). La variante silvestre del OCT1 humano tiene 554 aminoácidos, muestra 12 dominios trans-membrana (TMD) de estructura hélices α , los extremos N- y C- terminales se localizan en sitios intracelulares en el citoplasma, y entre los TMD 1 y 2 hay un lazo extracelular grande que contiene sitios de glicosilación. Además, el OCT1 tiene también otro lazo intracelular entre los TMD 6 y 7 que contiene sitios de fosforilación (Zhang L *et al.*, 1997). El peso molecular de la proteína OCT1 es aproximadamente de 61 kDa (Koepsell H *et al.*, 2007; Lozano E *et al.*, 2013). Además de la forma silvestre (variante 1) de OCT1 se han descrito variantes formadas por SNPs, y variantes debidas a “splicing” aberrante (Herraez E *et al.*, 2013).

2.6.2. Expresión de OCT1

El OCT1 se expresa mayoritariamente en el hígado (Gorboulev V *et al.*, 1997), en la membrana sinusoidal de los hepatocitos y, en menor medida, en los colangiocitos (Meyer-Wentrup F *et al.*, 1998; Nies AT *et al.*, 2009). La expresión de OCT1 presenta una variabilidad interindividual muy alta, tanto a nivel de ARNm, como a nivel de proteína (Nies AT *et al.*, 2009; Kim MH *et al.*, 2012). Además de su expresión en el hígado, el OCT1 humano se expresa en el riñón, en concreto en los túbulos proximal y distal de la nefrona (Tzvetkov MV *et al.*, 2009), en el intestino delgado en los enterocitos, donde participa en la captación de cationes orgánicos del lumen intestinal (Han TK *et al.*, 2013; Koepsell H *et al.*, 2015), corazón, cerebro, placenta, glándulas mamarias, ojo, tejido adiposo y en células del sistema inmune (Hyrsova L *et al.*, 2016b).

2.6.3. Función de OCT1

La función principal de OCT1 es llevar a cabo el transporte de cationes orgánicos endógenos, además de fármacos catiónicos, desde la sangre hacia los hepatocitos a través la membrana sinusoidal de los mismos. El transporte de los sustratos puede ocurrir en ambas direcciones a través de la membrana plasmática, así, el OCT1 no sólo participa en la captación, sino también en el eflujo de sus sustratos. La captación hepatocitaria mediada por OCT1 constituye el primer paso en la detoxificación de compuestos catiónicos endógenos y xenobióticos (Koepsell H *et al.*, 2007). En el intestino el OCT1 está implicado en la absorción y secreción de los cationes orgánicos (Koepsell H *et al.*, 2007). En el riñón el OCT1 humano participa en la reabsorción de los compuestos filtrados (Jonker JW *et al.*, 2004). Además, el OCT1 puede participar en el transporte de fármacos a través los bronquios en el pulmón y a través la barrera hematoencefálica (Lin CJ *et al.*, 2010; Ingoglia F *et al.*, 2015). En el sistema inmune, el OCT1 puede mediar la captación de los fármacos antivirales (Minuesa G *et al.*, 2008).

La mayoría de los sustratos de OCT1 son aminas terciarias que tienen carga positiva a pH fisiológico, y aminas cuaternarias que tienen una carga positiva independientemente del pH. Generalmente, los sustratos de OCT1 se clasifican en dos tipos; I y II (Meijer DK *et al.*, 1990). El tipo I incluye los sustratos con una masa molecular menor de 500 g/mol o con un grupo catiónico que está alejado del anillo aromático. Entre los sustratos típicos del tipo I se encuentran el tetraetilamonio (TEA) y el 1-metil-4-fenilpiridino (MPP⁺). El tipo II incluye los cationes más hidrofóbicos, voluminosos, y con frecuencia polivalentes, y los sustratos típicos en el tipo II son la *d*-tubocurarina y la quinina (Van Montfoort JE *et al.*, 2001).

Los sustratos más utilizados para la evaluación de la actividad del OCT1 humano son el TEA, el MPP⁺ y la N₁-metilnicotinamida (Van Montfoort JE *et al.*, 2001). Aunque las especificidades de sustrato de OCT1, OCT2 y OCT3 se superponen significativamente, existen diferencias en la especificidad entre los OCTs. (Koepsell H *et al.*, 2007).

Entre los principales sustratos endógenos de OCT1 se encuentra la tiamina (Chen L *et al.*, 2014), monoaminas como la colina, creatinina, L-carnitina, guanidina, el metabolito de L-arginina (agmatina), histidil-prolina dicetopiperazina, y poliaminas como putrescina (Koepsell H *et al.*, 2007; Koepsell H *et al.*, 2015) o espermidina (Winter TN *et al.*, 2011). En el sistema nervioso el OCT1 juega un papel en la recaptación de los neurotransmisores como catecolaminas (dopamina, adrenalina y noradrenalina), serotonina e histamina por las neuronas presinápticas desde el espacio sináptico (Jonker JW *et al.*, 2004; Koepsell H *et al.*, 2004).

En la Tabla 1.3 se muestran algunos sustratos de OCT1 endógenos, xenobióticos y fármacos (Lozano E *et al.*, 2013; Hyrsova L *et al.*, 2016b).

Tabla 1.3. Sustratos de OCT1 endógenos, xenobióticos y fármacos.

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

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.

Papel de OCT1 en la captación de fármacos antitumorales

En cuanto al transporte de fármacos antitumorales catiónicos, OCT1 está implicado en la captación y en mantener concentraciones terapéuticas de mitoxantrona (Koepsell H *et al.*, 2007), m-yodobencilguanidina (Bayer M *et al.*, 2009), irinotecán y paclitaxel (Gupta S *et al.*, 2012). Ensayos *in vitro* demostraron que las células transfectadas con OCT1 presentaban mayor capacidad de captación de oxaliplatino y picoplatino, pero no de cisplatino o carboplatino (Zhang S *et al.*, 2006).

En lo que se refiere a fármacos TKIs, varios estudios han demostrado el papel de OCT1 en la captación de imatinib en células de leucemia mieloide crónica (Thomas J *et al.*, 2004; Minematsu T *et al.*, 2011). Además, recientemente se ha propuesto que los niveles de expresión de OCT1 pueden servir como marcador para predecir la respuesta al imatinib en pacientes con leucemia mieloide crónica (Ben Hassine I *et al.*, 2017).

Estudios realizados por nuestro grupo utilizando oocitos de rana *Xenopus laevis* demostraron que OCT1 es capaz de captar sorafenib, y además, la transfección de líneas celulares derivadas de HCC o CCA humano con OCT1 induce una mayor sensibilidad al sorafenib (Herraez E *et al.*, 2013). Por otro lado, un estudio reciente sugiere la posibilidad de utilizar los niveles de expresión de ARNm de OCT1 en pacientes con HCC como marcador pronóstico para determinar la respuesta al sorafenib (Grimm D *et al.*, 2016).

Además, se han descrito interacciones entre fármacos sustratos del OCT1, 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 MV *et al.*, 2012).

2.6.4. Regulación de la expresión de OCT1

El OCT1 es uno de los transportadores más expresados en los hepatocitos, mientras que presenta una expresión baja en otros tejidos, lo que sugiere que su expresión puede ser controlada mediante los factores de transcripción denominados LEFTs “liver-enriched transcription factors” entre los que se incluyen HNF-1 α , HNF-3 γ , HNF-4 α , y FOXA3 (Castell JV *et al.*, 2006; Kamiyama Y *et al.*, 2007). Un mecanismo de regulación de OCT1 por HNF-4 α es la unión del último a los elementos de respuesta en el promotor de OCT1, lo que lleva a la activación de la transcripción de OCT1, sin embargo, este proceso puede ser inhibido por SHP “small heterodimer partner”, un correpresor transcripcional cuya expresión puede ser inducida por los ácidos biliares (Saborowski M *et al.*, 2006). Este mecanismo de

regulación puede explicar el efecto inhibitorio de la expresión OCT1 mediada por HNF-4 α en casos de colestasis (Nies AT *et al.*, 2009). Además, los factores USF1 y USF2 “upstream stimulating factors” han sido identificados como reguladores de la expresión de OCT1 en hepatocitos mediante “cognate-E box” (5'-CACGTG-3'); la activación de estos factores activa HNF-4 α y lleva a un aumento de la expresión de OCT1. Los receptores nucleares como PXR y FXR y el receptor de glucocorticosteroides pueden modular la expresión de OCT1 a través de HNF-4 α (Rulcova A *et al.*, 2013; Hyrsova L *et al.*, 2016a).

Además, existen sistemas de regulación postraduccional, como la fosforilación y desfosforilación de los sitios de unión al sustrato, lo que puede inducir cambios en la actividad transportadora del OCT1 de manera rápida (Ciarimboli G *et al.*, 2005). Estos cambios se llevan a cabo mediante la quinasa II dependiente de Ca²⁺/calmodulina (CaMKII) (Martel F *et al.*, 2001) y la tirosina quinasa Src-like p56lck (Ciarimboli G *et al.*, 2004), que 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 G *et al.*, 2005).

2.6.5. Variantes de OCT1

Aunque se han descrito alrededor de 1000 mutaciones (SNPs, del inglés “Single Nucleotide Polymorphism”) en el gen *SLC22A1* (tanto en el promotor, 5'UTR, el ORF, intrones, y 3'UTR), la mayoría de ellas ocurren en secuencias no codificantes y, por ello, no se ha estudiado su efecto biológico (Kerb R *et al.*, 2002; Saito S *et al.*, 2002; Itoda M *et al.*, 2004). En nuestro grupo se describió la presencia en HCC de 3 nuevos SNPs no conocidos hasta entonces: c.181delCGinsT (R61S fs*10), c.262delT (C88A fs*16) y c.589C>T (P197S). Dos de estas variantes (c.181delCGinsT y c.589C>T) también estaban presentes en algunas biopsias de CCA. Las mutaciones R61S fs*10 y C88A fs*16 daban como resultado una proteína truncada y no funcional, mientras que la mutación P197S no afectaba a la estructura de la proteína, ni tampoco a su función (Herraez E *et al.*, 2013).

La mayoría de los polimorfismos “non-synonymous” que se asocian con una función alterada del transportador presentan variabilidad heterogénea entre diferentes grupos étnicos. Muchos de los SNPs descritos dan lugar a una proteína no funcional o con una actividad transportadora menor, como es el caso de las variantes M420del, C88R, L160F, P341L o M408V. Sin embargo, otros SNPs, como la S14F presentan una mayor capacidad transportadora de MPP⁺ (Shu Y *et al.*, 2003), pero menor para metformina (Shu Y *et al.*, 2007) y sin cambios en la captación de TEA (Herraez E *et al.*, 2013).

La presencia de las variantes genéticas que presentan actividad reducida puede tener efectos a nivel fisiológico y farmacológico. Al nivel fisiológico, una disminución de la actividad de OCT1 puede llevar a la acumulación de compuestos tóxicos por falta de

destoxificación hepática (Yang MC *et al.*, 2001). A nivel farmacológico, la disminución de OCT1 puede afectar a la actividad de varios fármacos, entre ellos el sorafenib que al no poder atravesar libremente la membrana plasmática no podría llegar al interior celular donde se encuentran sus dianas (Herraez E *et al.*, 2013).

Por otro lado, se han detectado isoformas truncadas y no funcionales causadas por mecanismos de “splicing” alternativo, que aparecen con mayor frecuencia en tumores hepáticos tanto HCC como CCA (Hayer M *et al.*, 1999; Herraez E *et al.*, 2013).

2.7. EPIGÉNÉTICA EN EL CÁNCER

El término epigenética fue acuñado por Conrad Waddington en 1952 (Waddington CH, 1952), aunque las aportaciones iniciales sobre la epigenética se consideran anteriores. En los años 70 se creó el concepto de “encendido y apagado de la actividad génica”, sugiriendo el papel de la metilación del ADN sobre la expresión génica (Holliday R *et al.*, 1975; Riggs AD *et al.*, 1975). Más adelante, se descubrieron las enzimas responsables de la metilación de ADN denominadas ADN metil transferasas (DNMTs), se pusieron a punto las primeras técnicas para evaluar la metilación del ADN, y se descubrió que el análogo de nucleósido 5-azacitidina tenía actividad inhibitoria sobre las enzimas ADN metil transferasas (Jones PA *et al.*, 1980). Más recientemente, se han desarrollado nuevas técnicas para evaluar la metilación mediante secuenciación, y plataformas de análisis genómico que permiten el estudio de la epigenética en gran variedad de campos y contextos, hasta llegar a estudiar la secuenciación epigenética humana (American Association for Cancer Research Human Epigenome Task Force, 2008).

Los mecanismos epigenéticos juegan un papel clave en el desarrollo del cáncer y afectan los estados celulares en múltiples etapas de la enfermedad. Durante la carcinogénesis, las alteraciones en la cromatina y la metilación del ADN favorecen la reprogramación celular oncogénica (Wainwright EN *et al.*, 2017).

En el cáncer hepático, diferentes mecanismos epigenéticos, como modificaciones de histonas, metilación de ADN, remodelación de cromatina y expresión de ARNs no codificantes impulsan la proliferación celular, la invasión, y la metástasis durante la iniciación y la progresión del HCC. Estas alteraciones epigenéticas, debido a su reversibilidad, son dianas potenciales para el desarrollo de biomarcadores y estrategias terapéuticas (Wahid B *et al.*, 2017).

2.7.1. Metilación de ADN

La metilación del ADN es un proceso de modificación epigenética basado en la adición de un grupo metilo a la posición 5' del anillo pirimidínico de las citosinas que van seguidas de guaninas (denominadas islas CpG). Las islas CpG se encuentran en el promotor de un 60% de los genes codificantes en humanos. (Esteller M *et al.*, 2008).

La metilación de ADN se lleva a cabo mediante DNMTs que catalizan la transferencia de un grupo de metilo de S-adenosil-metionina (SAM) hasta la posición 5' del anillo de la citosina. Existen varias isoformas de las enzimas DNMTs; la DNMT1 se ha relacionado con el mantenimiento de la metilación durante la replicación del ADN, mientras que la DNMT3A y la DNMT3B están implicadas en los procesos de metilación *de novo* que tienen lugar durante el desarrollo embrionario (Klose RJ *et al.*, 2006).

Por otro lado, existen otros tipos de proteínas denominadas TET ("ten-eleven translocation") donde se incluyen las proteínas TET1, TET2, y TET3, que están implicadas en el proceso de desmetilación del ADN, en el que la 5-metil-citosina (5mC) se transforma en 5-hidroximetil-citosina (5hmC); este proceso está implicado en distintas etapas del desarrollo celular, así como en la progresión tumoral (Tahiliani M *et al.*, 2009).

Normalmente, en el genoma, los dinucleótidos CpG incluidos en las islas CpG en el promotor se encuentran sin metilación, mientras que los dinucleótidos CpG fuera de la zona del promotor se encuentran metilados. Este perfil de metilación corresponde a una actividad alta de transcripción en los genes que poseen promotores que incluyen islas CpG, por otro lado, los genes que carecen de islas CpG en la zona promotora se encuentran, habitualmente, silenciados (Fernandez AF *et al.*, 2012).

En cáncer, se han observado cambios drásticos en los patrones de metilación del ADN ligados a una reprogramación del epigenoma que induce alteraciones marcadas en los patrones de expresión génica. Hay dos tipos de cambios de metilación; i) la hipermetilación de genes supresores tumorales, y ii) la hipometilación global del ADN, que afecta a secuencias repetitivas, y elementos transponibles y retrovirales integrados en el genoma (Jones PA *et al.*, 2012).

El proceso de hipermetilación en el cáncer está asociado con la inactivación de genes supresores tumorales y afecta a varios procesos biológicos que participan en el ciclo celular, incluyendo proliferación celular, adhesión y diferenciación (Esteller M *et al.*, 2008). Además, para varios tipos de cáncer, el patrón de metilación ha permitido establecer una firma de metilación que puede ser útil en el diagnóstico del tipo tumoral (Paz MF *et al.*, 2003). En general, se ha observado que hay más alteraciones por mecanismos epigenéticos que por mecanismos genéticos en el cáncer (Herman JG *et al.*, 2003).

En HCC, el silenciamiento por metilación de islas CpG en secuencias promotoras del ADN resulta en la disminución de la expresión génica de varios genes supresores de tumores,

además juega un papel importante en las vías asociadas con la carcinogénesis tales como la adhesión celular, la reparación de ADN, la apoptosis y la regulación del ciclo celular (Esteller M *et al.*, 2001). Utilizando las diferencias en el perfil de metilación se puede distinguir el tejido tumoral del tejido adyacente no tumoral. Entre los genes que se encuentran generalmente hipermetilados en el HCC se incluyen: *RASSF1A* "RAS association domain family 1A", *P16*, *DLC-1* "deleted in human liver cancer", *RUNX3* "runt-related transcription factor 3" y *SOCS-1* "suppressor of cytokine signaling", entre otros (Khan FS *et al.*, 2017).

En CCA, los genes más estudiados que sufren una disminución de expresión debido a la hipermetilación de su promotor son: *p16INK4A*, *RASSF1A*, *hMLH1* "mutL homologue 1", *MGMT* "O6-Methylguanine-DNA methyltransferase", *DAPK* "Death Associated Protein Kinase", *SOCS3* "Suppressor of Cytokine Signaling 3" (Serafini FM *et al.*, 2016), además de supresores tumorales específicos para el tejido colangiolar, como el factor de transcripción *SOX17* (Merino-Azpitarte M *et al.*, 2017).

Respecto a la expresión del gen *SLC22A1* en HCC, dos estudios demostraron que su promotor está hipermetilado en el tejido tumoral, lo cual se asociaba con una marcada disminución de su expresión (Schaeffeler E *et al.*, 2011; Zolk O *et al.*, 2012).

En comparación con las mutaciones genéticas, los cambios epigenéticos son más reversibles. En el caso de la metilación del ADN, los agentes desmetilantes que actúan mediante la inhibición de metiltransferasas (DNMTIs), como la decitabina (DAC), se utilizan en el tratamiento de varios tipos de cáncer hematológicos (Ørskov AD *et al.*, 2017). Además, los DNMTIs se utilizan en combinación con otras terapias u otros moduladores epigenéticos, como los inhibidores de las histonas desacetilasas, en la terapia de ciertos tumores sólidos (Stone ML *et al.*, 2017; Topper MJ *et al.*, 2017). En un estudio de fase II en pacientes con HCC avanzado la DAC a dosis bajas demostró un efecto beneficioso sobre el tiempo de supervivencia sin progresión del tumor (Mei Q *et al.*, 2015). Por otro lado, la combinación de guadecitabina (binucleótido de DAC) y deoxiguanosina aumentó la sensibilidad del HCC a la terapia con oxaliplatino (Kuang Y *et al.*, 2015).

La combinación de sorafenib y DAC en el tratamiento de leucemia mieloide aguda o crónica resultó en un aumento del efecto antitumoral del sorafenib (Muppidi MR *et al.*, 2015; Gu J *et al.*, 2017). Sin embargo, no existen a día de hoy estudios sobre el efecto de la combinación de sorafenib con DAC en los tumores hepáticos.

2.7.2. Acetilación de histonas

En el núcleo de células eucariotas, el ADN se encuentra empaquetado en la cromatina constituyendo los nucleosomas. Las histonas (H2A, H2B, H3 y H4) son el soporte sobre el que se pliega el ADN mediante la formación de octámeros para la composición de los nucleosomas, así en contacto directo con el octámero hay aproximadamente 146 pb.

Las histonas son susceptibles a cambios post-transduccionales que afectan la función del ADN, entre ellos, los cambios más estudiados son la acetilación, la metilación de lisinas y argininas, y la fosforilación de serinas, además de otros cambios como ubiquitinación, sumoilación, ribosilación o isomerización de prolinas que se estudian para evaluar su efecto sobre la dinámica de la cromatina y el proceso de transcripción.

Estos cambios se llevan a cabo mediante enzimas que forman partes de complejos multiproteicos implicados en regulación de la transcripción u otros procesos genómicos (Bannister AJ *et al.*, 2011).

El grado de acetilación de histonas es el resultado del balance en la función de dos tipos de enzimas; i) las enzimas histona acetil transferasas (HATs), implicadas en la adición de un grupo acetilo a las lisinas localizadas en el amino terminal de las histonas, ii) las enzimas desacetilasas de histonas (HDACs), cuya función es la eliminación del grupo acetilo añadido a las histonas (Sanchez-Mut JV *et al.*, 2012). La acetilación de las histonas resulta normalmente en un aumento de la actividad transcripcional del ADN, mientras que el proceso contrario lleva a un silenciamiento génico.

Las modificaciones en la acetilación de histonas están entre las modificaciones de cromatina más estudiadas en cáncer, y se han relacionado con el grado de metilación del mismo ADN (Fraga MF *et al.*, 2005).

El uso de inhibidores de HDACs (HDACIs) como la tricostatina A (TSA) ha mostrado un efecto sinérgico en combinación con agentes desmetilantes en la reversión de la metilación aberrante de genes supresores tumorales (Kirschbaum M *et al.*, 2011).

En el caso del HCC, estudios preclínicos han sugerido que el tratamiento con HDACIs puede inducir apoptosis en líneas celulares (Ma BB *et al.*, 2010). Por otro lado, en ensayos clínicos de fase II en pacientes con HCC avanzado se ha demostrado la eficacia y seguridad del tratamiento con algunos HDACIs (Yeo W *et al.*, 2012; Zhao J *et al.*, 2016). En cuanto a ensayos para la potenciación antitumoral, se ha descrito, tanto *in vitro* como *in vivo*, que en HCC la combinación de HDACIs y sorafenib genera efectos aditivos o sinérgicos (Lachenmayer A *et al.*, 2012; Chen C.H *et al.*, 2014; Hsu FT *et al.*, 2014).

2.7.3. Papel de los microARNs en la regulación de la expresión génica

Se sabe que el 90% del genoma humano da lugar a ARNs no codificantes, entre ellos los microARNs, moléculas de entre 21 y 25 nucleótidos que actúan como reguladores de la expresión génica (He L *et al.*, 2004).

La expresión de los microARNs puede seguir 2 alternativas; así hay algunos microARNs localizados en agrupaciones cuya transcripción se lleva a cabo utilizando su propio promotor, mientras que hay otro grupo de microARNs que se localizan en zonas intrónicas o exónicas de otros genes y que se expresan durante la transcripción del gen que les contiene. La transcripción de la mayoría de los microARNs se completa mediante la polimerasa de ARN II, y en menor medida por la polimerasa de ARN III, lo que da lugar a los pre-microARNs (de una longitud alrededor de 33 pb) que contienen una caperuza o CAP, y una cola de poliA (Lee Y *et al.*, 2004; Borchert GM *et al.*, 2006). Para la formación de los microARNs maduros, los pre-microARNs se someten a un proceso de 2 reacciones, la primera tiene lugar en el núcleo y se lleva a cabo mediante un complejo proteico llamado microprocesador que consta de la enzima Drosha (que tiene actividad ARNasa tipo III) junto con la enzima de unión a ADN DGCR8; y la segunda reacción ocurre en el citoplasma por la endorribonucleasa tipo III denominada Dicer (Gregory RI *et al.*, 2004). Después de la reacción con Dicer, el ARN maduro se une a las proteínas Argonauta (Ago) para formar el complejo RISC.

A pesar de que los mecanismos utilizados por los microARN para regular la expresión génica no se conocen totalmente, se ha descrito que los microARNs pueden inhibir la traducción de varios modos; así, los nucleótidos 2 a 7 localizados en el extremo 5' del microARN (región denominada "seed structure") se unen a secuencias complementarias en la zona 3'UTR del ARNm diana. Si la afinidad de secuencias hace que la unión entre microARN y ARNm sea completa se induce la degradación del ARNm; mientras que en el caso de que la unión entre el microARN y el ARNm diana sea parcial habría una disminución en la traducción sin degradación del ARNm (Carthew RW *et al.*, 2009).

Sin embargo, estudios recientes han demostrado que existen microARNs que se unen a otras zonas del ARNm diana diferentes al 3'UTR, incluidas la ORF, y la zona 5'UTR del ARNm (Mandke P *et al.*, 2012; Lytle JR *et al.*, 2007).

Cada microARN puede regular más de un gen diana, y cada gen puede ser regulado por más de un microARN, lo que resulta en una alta complejidad en la red de microARNs y regulación génica (Lewis BP *et al.*, 2003). Los microARNs desregulados afectan a diversos complejos funcionales, factores transcripcionales, matriz extracelular, citoesqueleto, tirosina quinasa y señalización de proteínas G, apoptosis, ciclo celular y diferenciación. Además,

pueden alterar la composición del microambiente extracelular, afectando, por ejemplo, a la transformación de fibroblastos normales a fibroblastos asociados a tumores que respaldan el crecimiento tumoral (Schoepp M *et al.*, 2017).

En relación con procesos tumorales existen varios estudios que, utilizando diferentes plataformas de análisis (microarray, PCR array, y secuenciación de alto rendimiento), han demostrado cambios en la expresión de microARNs entre el tejido tumoral y el tejido no tumoral en la mayoría de los tipos de cáncer (Iorio MV *et al.*, 2012).

La detección de los cambios en la expresión de microARNs en los tumores llevó a crear el concepto “oncomirs”, que se refiere a conjunto de microARNs sobre-expresados en el cáncer y que juegan un papel en la disminución de expresión de genes supresores tumorales. Además, los microARNs con expresión disminuida en el tejido tumoral se denominan microARNs supresores tumorales, y normalmente sus dianas son los oncogenes (Esquela-Kerscher A *et al.*, 2006).

Recientemente, se han desarrollado varias medidas bioinformáticas para la predicción de la interacción entre el microARN y el ARNm diana; estas medidas se pueden utilizar, tanto para la predicción de los posibles ARNm dianas para un microARN, como para detectar los microARNs reguladores de un gen. Para llevar a cabo esta predicción se pueden utilizar bases de datos como miRBase, TargetScan y miRanda entre otros, cada una de las cuales aplica un algoritmo para la predicción de unión entre el microARN y el ARNm diana atendiendo a las características de ambas secuencias para dar un “score” o puntuación que representa la posible interacción entre el microARN y el ARNm (Riffo-Campos ÁL *et al.*, 2016).

2.8. REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN CÁNCER

En eucariotas el ARNm sufre procesos post-transcripcionales que incluyen fundamentalmente el “capping” y la poliadenilación. El “capping” consiste en añadir un nucleótido al extremo 5´ del ARNm para aumentar su estabilidad, mientras que la poliadenilación se basa en añadir una cadena de 250 nucleótidos adenina al extremo 3´ del ARNm, que va a aumentar su vida media y facilitar su traducción.

2.8.1. Estabilidad/degradación de ARNm mediante las “ARE binding proteins”

La existencia de un balance entre la estabilidad del ARNm y su degradación es clave para el control de la trasducción del ARNm y la síntesis de las proteínas. Uno de los puntos de control del balance entre la estabilidad y la degradación del ARNm ocurre en elementos denominados ARE (“AU rich elements”), zonas ricas en secuencias AU, que se encuentran en la zona 3’UTR del ARNm y están formados por secuencias agrupadas en repeticiones entre 1 y 5 veces de 5 nucleótidos (AUUUA) o 9 nucleótidos (UUUUUUUUU) (Bakheet T *et al.*, 2006).

Varios estudios demostraron que el papel de las secuencias ARE en la degradación o estabilidad del gen diana radica en que son zonas para la unión de un grupo de proteínas que facilitan la degradación del ARNm diana. Estas proteínas se denominan AUBPs (“ARE binding proteins”). Así, por ejemplo, se ha descrito que estas secuencias juegan un papel importante en mantener bajos niveles de expresión de genes implicados en el ciclo celular (Audic Y *et al.*, 2004). Sin embargo, también se han descrito proteínas AUBPs que pueden unirse a los sitios ARE del ARNm aumentando la estabilidad del mismo.

Una de las proteínas AUBPs más conocidas es la HuR (también denominada ELAVL1), que generalmente aumenta la estabilidad de los ARNm diana. La HuR además participa en el transporte de los ARNm del núcleo al citoplasma. Los ARE específicos de HuR se solapan normalmente con el sitio de unión de otra proteína AUBPs, la tristetraprolina (TTP, también denominada TIS11 o ZFP36), que participa en la degradación del ARNm diana. Las proteínas HuR y TTP conjuntas muestran un papel importante en la regulación de procesos como la inflamación y en la expresión de genes implicados en procesos tumorales (Wang H *et al.*, 2016). Además de TTP, la familia tristetraprolina contiene otros miembros; BRF1 y BRF2, que también juegan un papel en la regulación génica mediante la degradación de sus ARNm diana a través su unión a las secuencias ARE (Reznik B *et al.*, 2014).

Otra AUBP es la AUF1 (también denominada hnRNP) y, aunque hay controversia sobre su función, la mayoría de los trabajos apuntan a que tiene un papel en la degradación del ARNm diana; sin embargo, algunos casos han descrito que esta proteína participa en el aumento de la estabilidad de ciertos ARNm (White EJ *et al.*, 2017). Cambios en la expresión de AUF1 se han vinculado con los cambios de la expresión génica de varios oncogenes en distintos tipos de cáncer (Zucconi BE *et al.*, 2011).

La CUGBP1 es otra AUBP que participa en la degradación del ARNm diana. La CUGBP1 está muy expresada en el hígado y regula la traducción de proteínas que son críticas para el mantenimiento de las funciones hepáticas; está implicada en procesos de diferenciación y

proliferación celular, además, juega un papel en la regulación de HDAC, lo que puede resultar en modificación epigenética durante el envejecimiento (Jones K *et al.*, 2012).

Los factores de transcripción de la familia de proteínas FBPs (far-upstream element binding proteins) median la degradación de ARNm al cual se unen, y juegan un papel en la regulación de vías celulares. Se encuentran sobre-expresados en el cáncer de hígado y estimulan la proliferación de células tumorales, además, su expresión alta se correlaciona con un mal pronóstico (Samarin J *et al.*, 2016).

2.8.2. “Splicing” alternativo

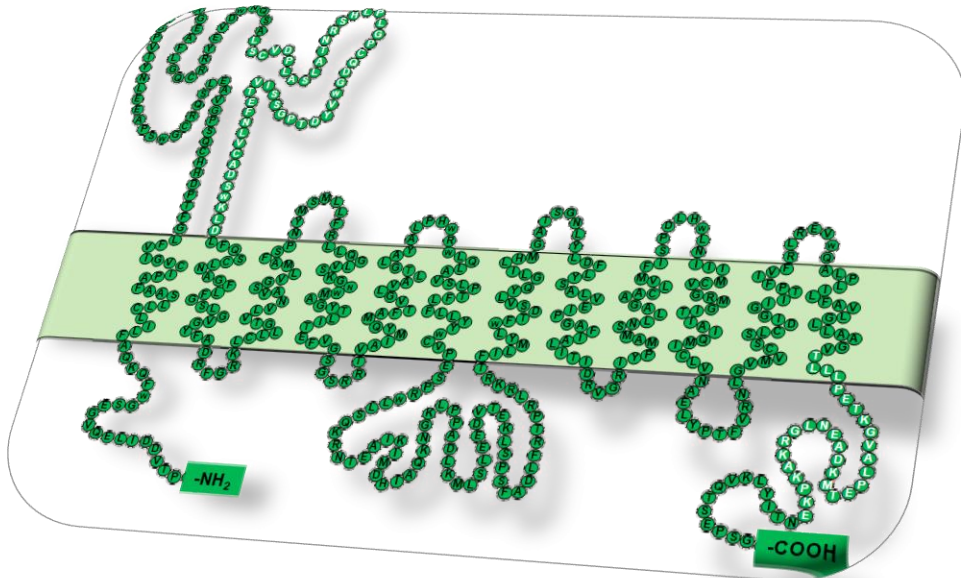
Tras la transcripción, el precursor del ARNm (pre-ARNm) se somete un proceso de edición o “splicing” consistente en la eliminación de intrones y unión de los exones formando el ARNm maduro. Este proceso es importante porque aumenta la capacidad codificante del genoma, ya que con variantes de “splicing” cada gen puede producir más de un tipo de ARNm maduro y, por lo tanto, más de un producto proteico. Recientemente, se ha descrito que la mayoría de los genes codificantes dan más de una isoforma de proteínas, ya que al estudiar el proteoma en comparación con los genes codificantes del genoma resulta en la presencia de un número de isoformas proteicas ente 5 y 10 veces mayor que el número de genes codificantes (Kim MS *et al.*, 2014). Hay estudios que definen al “splicing” como un proceso cotranscripcional que ocurre al mismo tiempo que la transcripción (Jimeno-González S *et al.*, 2015; Naftelberg S *et al.*, 2015).

El “splicing” aberrante de los pre-ARNm se observa con frecuencia en cáncer. Estas alteraciones en el splicing pueden ser debidas a una compleja interacción entre las modificaciones en la expresión y/o actividad de los factores del splicing (SF) que se unen a secuencias específicas en los pre-ARNm y regulan el proceso de “splicing” (Gonçalves V *et al.*, 2017). Por otro lado, el “splicing” aberrante puede ser debido a mutaciones en los genes codificantes del ARNm que cambian las secuencias implicadas en el proceso de splicing. Además de su importancia en el desarrollo de cáncer (Singh B *et al.*, 2017), el “splicing” alternativo juega un papel en la resistencia a fármacos antitumorales, incluidos los TKIs (Siegfried Z *et al.*, 2018).

Como se comentó anteriormente, en el caso de OCT1 se ha descrito la presencia de variantes generadas por “splicing” alternativo. La mayoría de estas formas se generan por una escisión de exones o a la retención de secuencias intrónicas del transcrito, 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 M *et al.*, 1999), 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 L *et al.*, 2012),

la variante c.1276+1insGTAAGTTG combinada con la escisión del exón 9, y la variante generada por la escisión del exón 10 (Herraez E *et al.*, 2013).

En general, se considera que las variantes de “splicing” generan proteínas truncadas que no son funcionales (Hayer M *et al.*, 1999), ya que los cambios en la región carboxilo terminal, así como la pérdida estructural de dos o más dominios transmembrana del transportador alteran la función de la proteína debido al fallo en la localización en la membrana plasmática.



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Muestras humanas

Las muestras de tejido hepático de pacientes con CCA y HCC se obtuvieron a través del Servicio de Cirugía Hepatobiliar y Pancreática del Hospital Universitario de Salamanca, del Biobanco de tumores del Hospital Universitario de San Sebastián y de los Hospitales Universitarios de Würzburg, Friburgo y Hannover (Alemania).

Los protocolos fueron aprobados por los Comités Éticos de Investigación Clínica del área de Salud de los distintos hospitales de procedencia. Sólo se utilizaron muestras de las que se disponía consentimiento informado firmado por los pacientes para su uso en investigación biomédica. Los datos personales fueron tratados con confidencialidad y seguridad, de acuerdo con la normativa basada en la Ley 15/99 (R.D. 994/99).

3.1.2. Animales

Para los modelos experimentales de desarrollo de HCC y de CCA se utilizaron ratas machos de la raza Wistar procedentes del animalario del Edificio Departamental de la Universidad de Salamanca.

Para el modelo de HCC en ratones se utilizaron ratones $Fxr^{-/-}$ del genotipo B6.129X1(FVB)-Nr1h4^{tm1Gonz/j} procedentes de Charles River, que se criaron en el animalario de la Universidad de Salamanca.

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

En todos los casos 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.

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): Alexander o PCL/PRF/5 (CRL 8024) y HepG2 (HB-8065), de HCC humano; CHO (CCL-61), de ovario de hámster chino y HEK-293T (CRL-11268), embrionarias de riñón humano.

De la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Alemania): TFK-1 (ACC 344) y EGI-1 (ACC 385), de CCA humano.

Las células HuH7 de HCC humano fueron cedidas por el Dr. Pedro Majano (Hospital Universitario de la Princesa, Madrid).

3.1.4. Bacterias

Se utilizó la cepa DH5 α , de *Escherichia coli*, proporcionada por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

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): CO₂ y N₂ líquido.

AppliChem (Madrid): ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico (HEPES), agar, extracto de levaduras, fenol, 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, 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.

Fermentas (Quimigranel, Madrid): T4 polinucleótido quinasa.

GE Healthcare (Barcelona): reactivos de detección ECL ("Enhanced Chemiluminiscence"), 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” y algunas enzimas de restricción.

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, mezcla de antibióticos penicilina/estreptomicina, 4,6-diamidino-2-fenilindol (Dapi), kit comercial para la transcripción reversa (RT) “SuperScript® VILO™”, líquido estabilizador “RNA/ater”, marcadores de peso molecular de ADN (25, 100 y 500 pb y 1 kb plus), medios de cultivo Opti-MEM, DMEM con glutamax, Advanced MEM, medio RPMI 1640 con Glutamax™-I, medio SOC, Accuprime® Pfx ADN polimerasa de alta fidelidad, Platinum® PCR Supermix High Fidelity, solución de carga para electroforesis en gel desnaturizante, suero bovino fetal (FBS), SYBR Green I para teñir ADN en geles de agarosa (“SYBR Safe”).

Lonza (Basilea, Suiza): aminoácidos no esenciales MEM.

Menarini Diagnostics (Barcelona): portaobjetos Optiplus™.

Merck (Barcelona): acetato sódico anhidro, ácido fórmico, β-mercaptoetanol, cloruro sódico, etanol, formaldehído, hidróxido sódico, isopropanol, metanol, reactivo de Folin Ciocalteau y tartrato disódico.

MP Biomedicals LLC (Santa Ana, EE.UU.): líquido de centelleo UniverSol™ ES.

Perkin Elmer Life Sciences (Boston, EE.UU.): [¹⁴C]-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.

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”.

Sartorius (Goettingen, Alemania): filtros de nitrato de celulosa de 0,2 μm y 0,1 μm de tamaño de poro.

Sigma-Aldrich (Madrid): ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), albúmina sérica bovina (fracción V), ampicilina, 2-acetamidofluoreno (AAF), 5-aza-2-deoxicitidina (decitabina, DAC), azul de bromofenol, azul de Tripán, bicarbonato sódico, butirato sódico, clorhidrato de quinina, cloruro de colina, D-glucosa, dimetilsulfóxido (DMSO), dodecil sulfato sódico (SDS), fenil butirato, glutamina, mezcla de antibióticos y antimicótico (penicilina, estreptomicina y anfotericina B), mezcla de inhibidores de proteasas (4-(2-aminoetil) bencenosulfonilfluoruro 104 mM, pepstatina A 1,5 mM, E-64 1,64 mM, bestatina 4 mM, leupeptina 2 mM y aprotinina 80 μM), N-dietilnitrosamina (DEN), paraformaldehído, piruvato sódico, tioacetamida (TAA), tricostatina A (TSA), tripsina de páncreas porcino, Tris (trishidroximetil aminometano) base (Trizma) o clorhidrato (Tris HCl), y xileno cianol.

Takara (Laboratorios Conda, Madrid): algunas enzimas de restricción y solución de carga para electroforesis en gel.

VWR Internacional (Barcelona): ácido acético glacial, ácido clorhídrico, carbonato sódico, cloruro cálcico, cloruro magnésico, cloruro potásico, dihidrógeno fosfato potásico, fosfato ácido potásico, fosfato disódico, indicador universal de pH, mezcla de glicoles y resinas para realizar cortes en el criostato Tissue-Tek[®] O.C.T. (“Optimum Cutting Temperature”), sulfato magnésico y Tween[®] 20.

Whatman (Madrid): papel Whatman para la transferencia en western blot.

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

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

Todos los 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 del Sistema MiliQ Integral 3 (Millipore-Merck, Madrid).

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

Las centrifugaciones se realizaron en centrífugas refrigeradas 5417R y 5810R marca Eppendorf (Hamburgo, Alemania), Beckam Avanti J-20, y L8-M Ultracentrifuge, rotor 70.1 Ti y SW 28 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 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, Salamanca).

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).

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® 7300 Sequence Detection System, de Applied Biosystems.

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.).

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).

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 CO₂ 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 N₂ líquido (Thermo Fisher). Se utilizaron placas de cultivo y frascos Roux de cuello inclinado de la marca TPP (Biotech S.L., Madrid) para el cultivo de las líneas celulares. 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).

La radiactividad de lo isótopo ¹⁴C 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 desgasificador de vacío (modelo G12354A); un inyector de 20 µl 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 µm de tamaño de poro termostatzada 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.

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).

3.4. ESTUDIO CLÍNICO RETROSPECTIVO PARA EVALUAR EL PAPEL DEL OCT1 SOBRE LA RESPUESTA AL SORAFENIB

Para realizar el estudio TRANSFER (TRANsporter SoraFEnib Response) se utilizaron remanentes de biopsias de HCC obtenidas con fines diagnósticos de pacientes con HCC en tres centros hospitalarios alemanes; de Würzburg (n=14), de Friburgo (n=20) y de Hannover (n=5), entre los años 2007 y 2015. Los datos clínicos y demográficos de los pacientes y las características del tumor se obtuvieron a partir de las historias clínicas.

Los criterios de inclusión fueron: i) diagnóstico de HCC basado en anatomía patológica o en técnicas de imagen (tomografía computarizada con detectores múltiples y con contraste dinámico o resonancia magnética), según las recomendaciones de la EASL “European Association for the Study of the Liver” (EASL-EORTC clinical practice guidelines: 2012); ii) tratamiento con sorafenib para HCC avanzado con seguimiento de los pacientes (supervivencia y/o respuesta radiológica) durante un tiempo mínimo de 4 semanas; iii) intervalo de tiempo entre la adquisición del tejido y el inicio del tratamiento con sorafenib no más de 18 meses; iv) función hepática compensada antes del tratamiento (Child-Pugh (CP) Class A o B); v) buen estado funcional (PS 0-2); vi) disponibilidad de tejido tumoral parafinado para el análisis histológico.

Los criterios de exclusión fueron: i) tumores "mixtos" diagnosticados mediante análisis histológico; ii) sin diagnóstico definitivo de HCC; iii) quimioterapia sistémica diferente a sorafenib entre la obtención del tejido y el inicio del tratamiento con sorafenib (se permitió la terapia local, como la quimioembolización transarterial); iv) descompensación de la función hepática (clase C de CP) antes del inicio del tratamiento con sorafenib; v) estado funcional PS > 2.

En los cortes de parafina se analizó la expresión de OCT1 mediante inmunohistoquímica, como se describe en el apartado 3.19.

3.5. EXPERIMENTOS “IN VIVO”

3.5.1. Modelo experimental de HCC en ratas

Se llevó a cabo siguiendo una modificación del modelo clásico de iniciación-promoción-progresión descrito por Solt y Farber (Solt DB *et al.*, 1976).

Como iniciador se utilizó N-dietilnitrosamina (DEN), que se administró por inyección intraperitoneal, a la dosis de 200 mg/kg p.c., a ratas machos de 130-150 g de peso.

Dos semanas después se inició un tratamiento con el promotor 2-acetamidofluoreno (AAF), a la dosis de 50 mg/kg p.c., dos veces por semana, inyectado por vía subcutánea. Este

tratamiento se llevó a cabo durante tres semanas y en su punto medio, es decir, tres semanas después de la administración de DEN, los animales fueron sometidos a una hepatectomía parcial de dos tercios de la masa hepática. Para la realización de la hepatectomía se siguió una adaptación del método de Higgins y Anderson (Higgins et al. 1931), según se ha descrito en trabajos previos de nuestro grupo (Marín et al 1993), Tras la anestesia los animales eran parcialmente hepatectomizados por ligadura y posterior extirpación de los lóbulos hepáticos lateral izquierdo y medio.

Los animales sometidos al protocolo de Solt y Farber se sacrificaron a las 20 ó a las 32 semanas del inicio del tratamiento, tiempo en el que, como se ha descrito en trabajos previos de nuestro grupo (Monte MJ *et al.*, 1999; Mendoza ME *et al.*, 2002), los hígados de estos animales presentan alteraciones propias de los estadios de hepatoma y HCC, respectivamente. Por tanto, se utilizaron 3 grupos de ratas:

Grupo Control: ratas no sometidas al protocolo de Solt y Farber.

Grupo Hepatoma: ratas sometidas al protocolo de hepatocarcinogénesis de Solt y Farber sacrificadas a las 20 semanas del inicio del mismo.

Grupo Carcinoma: ratas sometidas al protocolo de hepatocarcinogénesis de Solt y Farber y sacrificadas a las 32 semanas de iniciado el mismo.

3.5.2. Modelo experimental de HCC en ratones

Como modelo de HCC en ratones se utilizó la cepa de ratones comercial $Fxr^{-/-}$, ya que desarrollan HCC espontáneamente entre los 14-18 meses de vida, tiempo al cual se realizaron los experimentos de captación de sorafenib en estos animales.

3.5.3. Modelo experimental de CCA en ratas

Se utilizaron ratas Wistar macho a las que se administró TAA disuelta en el agua de bebida a la dosis de 0,05% (p/v) durante 36 semanas, según se había establecido previamente en nuestro grupo (Lozano E *et al.*, 2014). Como animales control se utilizaron ratas del mismo sexo y edad, que no recibieron tratamiento.

3.5.4. Captación de sorafenib en los modelos experimentales de HCC y CCA

Para evaluar la diferencia en la captación de sorafenib entre el tejido tumoral y el tejido adyacente no tumoral en los modelos experimentales “*in vivo*” de CCA y de HCC utilizados en esta Tesis Doctoral se siguieron los siguientes protocolos:

En el caso de las ratas con desarrollo de CCA o HCC: tras anestésiar al animal con pentobarbital sódico (i.p., 50 mg/kg p.c.), se iniciaba el procedimiento quirúrgico con la inserción de un catéter en la vena yugular izquierda. Se utilizó esta vía para administrar el sorafenib (i.v., 10 mg/kg p.c.) y se colocó un catéter en la arteria carótida izquierda para

obtener muestras de sangre. Además, tras realizar una laparotomía ventral media se colocaba un catéter en el conducto biliar para obtener muestras de bilis.

Una hora tras la administración de sorafenib se recogían muestras de tejido hepático que se congelaron inmediatamente en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C hasta su utilización para determinar el contenido de sorafenib en el tejido mediante HPLC-MS/MS (apartado 3.21.4.), o bien se colocaban en tubos con RNA/later[®], para posteriormente extraer ARN total. También se realizaron determinaciones analíticas en el suero recogido.

En el caso de los ratones Fxr^{-/-} se eligió como vía de administración de sorafenib la vía intraperitoneal. Se iniciaba el experimento administrando el sorafenib a la dosis de 10 mg/kg. p.c., y una hora después, con el animal bajo anestesia con pentobarbital sódico (i.p., 50 mg/kg p.c.), se realizaba una laparotomía ventral media, se recogía una muestra de sangre de la vena cava y de tejido (tanto de HCC, como de tejido hepático adyacente al tumor) se sacrificaba por sobredosis de anestesia. Igual que en los casos anteriores, los tejidos se colocaban inmediatamente en N₂ líquido o RNA/later[®] y, posteriormente, se almacenaban a -80°C hasta su utilización para determinar el contenido de sorafenib mediante HPLC-MS/MS (apartado 3.21.4) o extraer ARN total (apartado 3.13.1).

3.5.5. Ensayo *in vivo* de respuesta antitumoral al sorafenib en tumores con o sin sobre-expresión de OCT1

Para llevar a cabo el ensayo *in vivo* de respuesta antitumoral al sorafenib se utilizaron ratonas nude atímicas, a las que se les implantó por vía subcutánea en el dorso 10⁷ células HepG2 (Mock o transducidas con OCT1) resuspendidas en Matrigel estéril. Tres semanas después del implante subcutáneo se observaron tumores de un tamaño de aproximadamente 27 mm³ y los animales fueron divididos en 2 grupos experimentales:

- Grupo tratado con sorafenib: que recibió por vía i.p. sorafenib preparado en solución salina (10 mg/kg p.c.), que se administró 3 veces por semana durante 4 semanas.
- Grupo control: que recibió por vía i.p. el vehículo en los mismos tiempos.

Diariamente se realizó un seguimiento del estado general de los animales y de la evolución del volumen tumoral. Tras 4 semanas de tratamiento, 2 días después de recibir la última dosis de fármaco, los animales fueron sacrificados.

3.6. CULTIVOS CELULARES

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

Alexander y HepG2: MEM suplementado con 2,2 g/l de bicarbonato sódico y 110 mg/l de piruvato sódico.

HEK-293T: DMEM suplementado con GlutaMAX™.

TFK-1: RPMI 1640 con GlutaMAX™.

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.

HuH7: DMEM suplementado con 2,2 g/l de bicarbonato sódico, 2,38 g/l de HEPES, y 3,5 g/l de D-glucosa.

A todos los medios se les añadió FBS inactivado al 10% (v/v) y una mezcla de antibióticos y antimicótico al 1% que contenía: penicilina (20 U/ml), estreptomina (0,02 mg/ml) y anfotericina B (0,05 µg/ml); excepto a los medios de las líneas de CCA humanas (TFK-1, EGI-1) y las células HEK-293T a los que se les añadía una mezcla al 1% de penicilina y estreptomina (sin el antimicótico).

3.6.1. 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 a una densidad adecuada en función de la línea celular y del tipo de experimento. Se determinó el tiempo adecuado para la recogida de las células en cada caso, tras el cual se procesaban para la obtención del ARN total (apartado 3.13.1.) o proteínas totales (apartado 3.21.1.).

3.6.2. 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 las células se exponían durante 6 h a los agentes citostáticos, y tras 66 h se determinaba la viabilidad mediante el test de formazán (apartado 3.21.2.).

3.7. EXPERIMENTOS *IN VITRO* DE MODULACIÓN EPIGÉNÉTICA DE LA EXPRESIÓN DE OCT1

Para investigar el efecto de factores epigenéticos sobre la expresión de OCT1 en tumores hepáticos se utilizaron 3 líneas celulares de HCC (HuH7, Alexander y HepG2) y dos líneas celulares de CCA (EGI-1 y TFK-1). Las células se incubaron con DAC (1 µM, durante un tiempo de exposición variable según la línea celular), butirato sódico (5 mM, durante 24 h), fenil butirato (5 mM, durante 24 h) y tricostatina A (300 nM, durante 24 h).

Puesto que la DAC se degrada en el medio de cultivo, esta era remplazada cada 24 horas con medio fresco con DAC hasta el final del experimento.

Una vez finalizado el tiempo experimental las células se lisaron para estudiar la expresión génica de OCT1 mediante RT-QPCR (apartado 3.13.). Además, en el caso de las células EGI-1 se realizaron experimentos de captación de sorafenib (apartado 3.8.3.).

3.8. EXPERIMENTOS DE CAPTACIÓN EN LÍNEAS CELULARES

Soluciones utilizadas:

Medio de captación (MC), pH 7,4: NaCl 96 mM, KCl 5,3 mM, KH_2PO_4 1,1 mM, MgSO_4 0,8 mM, CaCl_2 1,8 mM, D-glucosa 11 mM, y Hepes 50 mM.

Medio Lowry: NaOH 100 mM y Na_2CO_3 189 mM.

3.8.1. Experimentos de captación de compuestos fluorescentes

Para estos estudios se utilizaron células derivadas de HCC con o sin sobre-expresión estable de OCT1. Una vez tripsinizadas se incubaron 50.000 células con el compuesto fluorescente a una concentración adecuada, como se muestra en la Tabla MM-1, en ausencia o presencia de 250 μM quinina, un inhibidor de OCT1, a 37°C, y durante un tiempo de incubación variable según el experimento. A continuación, se determinó el contenido intracelular de los compuestos fluorescentes mediante citometría de flujo (apartado 3.16.).

3.8.2. Experimentos de captación de tetraetilamonio [^{14}C]-TEA

Para estos estudios se utilizaron células HepG2 con o sin expresión estable de OCT1. Tras 30 min de preincubación con MC se añadía MC con [^{14}C]-TEA a una concentración de 50 μM , en presencia o ausencia de quinina a una concentración de 250 μM y se realizaba la incubación a 37°C durante 1 h.

Algunos pocillos con células se incubaron sin el compuesto radioactivo y se utilizaron como blanco de captación.

La captación se paraba con MC frío, tras lo cual se realizaban 4 lavados con el mismo medio. Igual que en el caso anterior las células se lisaban con medio 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 la radioactividad (apartado 3.21.3.) y la concentración de proteínas (apartado 3.21.1.).

Tabla MM-1. Características de los compuestos fluorescentes utilizados como candidatos para determinar la actividad de OCT1.

Compuesto	Abreviatura	Concentración	Canal de detección (λ)
Dihidroetidio	DHE	5 μ M	FL3 (670 nm long pass)
Mitoxantrona	MTX	25 μ M	FL3 (670 nm long pass)
Carboxy Rodamina	CarRod	25 μ M	FL3 (670 nm long pass)
Naranja de Acridina	NaAcr	0,1 μ M	FL2 (585 \pm 42 nm)
LDS 751	LDS 751	5 μ M	FL4 (661 \pm 16 nm)

3.8.3. Experimentos de captación de sorafenib en células

Tras 30 min de preincubación con MC se añadía MC con 5 μ M de sorafenib con o sin quinina a una concentración de 250 μ M, y las células se incubaban a 37°C durante 1 h. Además, algunos pocillos se incubaron en ausencia de sorafenib y quinina para utilizarlos como blancos de captación.

La captación se paraba con MC frío y los lavados se repetían 4 veces. Para finalizar el experimento, las células se lisaban en agua a 4°C, y se determinaba el contenido de sorafenib en este lisado por HPLC-MS/MS (apartado 3.21.4.).

3.9. ESTUDIOS “*IN SILICO*”

3.9.1. Determinación del papel de la metilación en la expresión del gen *SLC22A1* en datos del TCGA “The Cancer Genome Atlas”

Utilizando los datos de pacientes con HCC y CCA que están disponibles públicamente en la base de datos TCGA se llevaron a cabo 2 tipos de estudios:

- i) Evaluación de la expresión del gen *SLC22A1* por RNA-seq en muestras de CCA o HCC en comparación con el tejido adyacente no tumoral. La expresión se cuantificó utilizando la métrica (RPKM, “Reads Per Kilobase Million”). Se utilizó la prueba T de dos colas de Mann-Whitney para comparar los niveles de expresión génica entre los grupos.
- ii) Evaluación de la metilación del gen *SLC22A1*. En la base de datos TCGA se recoge la información del análisis del perfil de metilación de ADN en todo el genoma; así, se evaluó el nivel de metilación de varias regiones localizadas en la zona promotora del *SLC22A1* en muestras de CCA o HCC en comparación con el tejido adyacente

no tumoral utilizando la métrica Infinium HumanMethylation450 BeadChip. Esta base de datos procesa la información utilizando el paquete RnBeads, excluyendo del estudio las sondas con las siguientes características; i) sondas enriquecidas con SNP (> 2 SNP en una región de unión genómica de 50 pares de bases de la sonda); ii) sondas de baja calidad; y iii) sondas de cromosomas X. Los datos fueron sometidos a la normalización BMIQ. La metilación del ADN para el gen de interés (*SLC22A1*) se cuantificó utilizando la métrica del valor- β , que varía de 0 (0% de metilación) a 1 (100% de metilación). Las sondas se consideraron significativamente y diferencialmente metiladas (DMP) cuando la diferencia del valor- $\beta \geq \pm 0,2$ y el valor $p < 0,05$ (prueba T de dos colas de Mann-Whitney). La cobertura del gen *SLC22A1* se llevó a cabo utilizando 13 sondas.

Las sondas utilizadas para el análisis de metilación cubren la región no codificante 5'UTR (del inglés "untranslated region"), el sitio de iniciación de transcripción TSS (del inglés "Transcription starting site"), el exon 1, la ORF, la región no codificante 3'UTR y epigenómica ("CpG island y open sea") teniendo en cuenta el efecto biológico de las alteraciones de la metilación de ADN sobre la expresión del gen.

3.10. MÉTODOS DE CLONACIÓN CLÁSICA

3.10.1. Clonación de la secuencia codificante de OCT3 en el plásmido lentiviral pWPI

3.10.1.1. Obtención del ADNc del gen *SLC22A3* con los extremos adecuados

Para obtener la ORF del gen *SLC22A3* silvestre, que codifica OCT3, se diseñaron "primers" en base a la secuencia NM_021977 de la base de datos GenBank. Además, en el extremo 5' de estos "primers" se añadieron sitios de restricción para las enzimas *MluI* y *SpeI* que servirían para la posterior ligación con el vector de destino pWPI. Utilizando estos "primers" se llevó a cabo una PCR analítica (apartado 3.15.1.) para amplificar la secuencia codificante del OCT3 utilizando como molde el ADN complementario de hígado sano. En la Tabla MM-2 se recogen los "primers" y condiciones utilizadas en la PCR. 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 en gel de agarosa (apartado 3.15.2.).

Una vez obtenida la ORF del OCT3 se procedió a la ligación de este producto con el plásmido pWPI, el cual había sido modificado previamente en nuestro grupo para crear distintos sitios de clonación mediante el uso de enzimas de restricción. Como enzimas de restricción se eligieron *MluI* y *SpeI*, ya que ninguna de las dos cortaba en la ORF del OCT3.

Tabla MM-2. Secuencia de los “primers” para el gen *SLC22A3* diseñada en base a la secuencia del NM_021977. En el extremo 5’ de los “primers” se añadió una secuencia que contenía un sitio de restricción para las enzimas *MluI* y *SpeI* (en azul).

Oligonucleótidos	Condiciones para la PCR
OCT3-(F) (5’→3’) AATTGGCCACGCGTACCATGCCCTCCTTCGACG	5 min, 95°C
	15 s, 95° C
OCT3 (R) (5’→3’) AACCTTGGACTAGTAAGGTGAGAGCGGGAAACTGG	30 s, 60°C
	2 min, 68°C
	10 min, 68°C

F, forward; R, reverse.

3.10.1.2. Preparación del plásmido pWPI y el inserto (OCT3) para la ligación

Para introducir nuestro gen de interés en el plásmido lentiviral pWPI éste debía ser previamente preparado para la ligación. El primer paso consistió en la linealización del plásmido pWPI con las enzimas de restricción *MluI* y *SpeI* como se detalla en el apartado 3.15.3.

A continuación, el producto de la reacción se sometió a electroforesis en un gel de agarosa y a una posterior purificación, como se indica en el apartado 3.15.2. y, finalmente, se cuantificó en un NanoDrop la cantidad obtenida. El OCT3 obtenido, como se explicó en el apartado anterior, se sometió a la misma reacción con las enzimas *MluI* y *SpeI* para obtener extremos adecuados para la ligación.

3.10.1.3. Ligación del ADNc de OCT3 y el plásmido pWPI

Tras la preparación del plásmido de destino pWPI y del inserto OCT3, se llevó a cabo la reacción de ligación utilizando la enzima T4 ligasa en un tampón apropiado y con una relación vector:inserto de 1:5.

A continuación, se transformaron bacterias *E. coli* DH5α con el producto de reacción por choque térmico, como se describe en el apartado 3.11.1. Se sembraron en placas con medio LB con agar suplementado con ampicilina como antibiótico de selección. Algunas de las colonias se crecieron en medio LB líquido suplementado con el antibiótico, de las cuales se extrajo el ADN plasmídico (apartado 3.11.2.). La identidad de los clones seleccionados se confirmó con un estudio de restricción utilizando las enzimas *Acc561* y *NotI* (apartado 3.15.3.) y, finalmente, mediante secuenciación (apartado 3.15.4.).

En la Figura MM-1A se muestra la estructura del plásmido pWPI-MCS-OCT3 y en la Figura MM-1B el estudio de restricción teórico utilizando las enzimas de restricción *Acc561* y *NotI*, que generaban patrones de bandas diferentes en función de si el OCT3 estaba insertado en el plásmido pWPI, o de si no había inserto. En la Figura MM-1C se muestra el gel

procedente del estudio de restricción de 10 clones. Como se puede observar varios de los clones (1-3) fueron positivos respecto al patrón esperado para el pWPI-MCS-OCT3, ya que el tamaño de los fragmentos de ADN coincidía con el esperado para esa condición en el estudio teórico. Se eligió el clon 1 y se validó de manera definitiva su identidad mediante secuenciación (apartado 3.15.4).

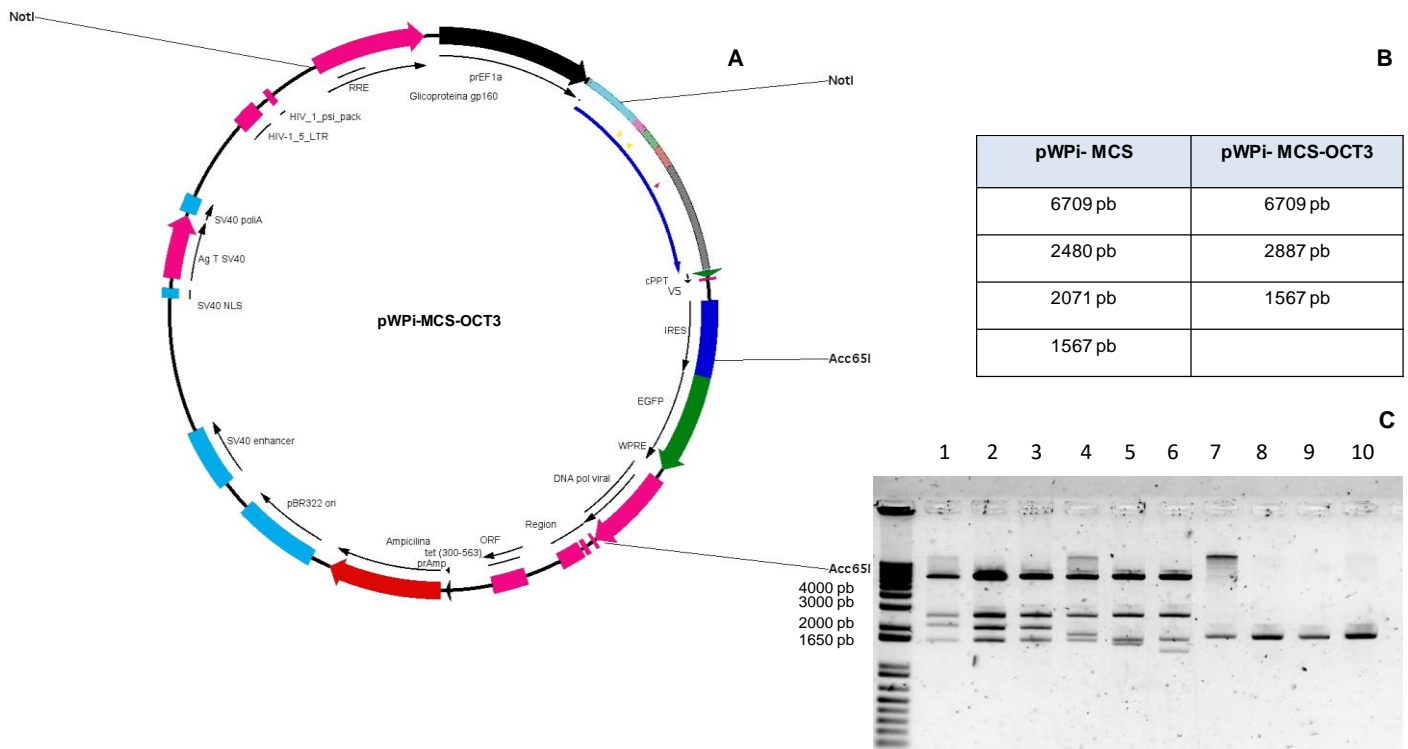


Figura MM-1: Esquema del plásmido lentiviral pWPI-MCS-OCT3, que contiene la secuencia de OCT3 seguida de la etiqueta V5 y los genes de interés del vector pWPI. Se muestran los sitios de corte para las enzimas de restricción utilizadas (*Acc561* y *NotI*) (A). Representación teórica del estudio de restricción del vector pWPI-OCT3 con las enzimas *Acc561* y *NotI*, y el tamaño esperado para los fragmentos de ADN para cada una de las posibilidades (con el OCT3, o el plásmido pWPI vacío sin el inserto) (B). Electroforesis en gel de agarosa al 1% tras tinción con SYBR Green I de los productos obtenidos en la digestión de los clones con *Acc561* y *NotI*. La primera calle del gel representa el patrón de tamaños moleculares de ADN. Los clones positivos son 1, 2 y 3, los clones 4, 5 y 6 corresponden al plásmido con insertos mutados o diferentes al gen OCT3, y el resto de clones corresponden a formas no conocidas.

3.10.2. Generación de plásmidos pLVTHM portadores de pre-microARNs y sh-ARNs

3.10.2.1. Obtención del ADNc de los microARNs con los extremos adecuados

Las secuencias de los pre-microARNs se obtuvieron a través la base de datos miRBase. En base a ellas, se diseñaron oligonucleótidos para obtener los microARNs de interés con extremos adecuados para las enzimas de restricción *MluI* y *ClaI* (Tabla MM-3). La estrategia a seguir consistía en diseñar 4 secuencias de oligonucleótidos, a hibridar dos a dos (es decir dos parejas de oligos F y R) y, posteriormente, ligar estas secuencias hibridadas para

generar la secuencia completa de cada pre-microARN. Así, se comenzó realizando una hibridación de cada oligo F1 con su complementario, que denominamos oligo R1, y de cada oligo F2 con el oligo R2.

A continuación, se fosforilaron los dos oligonucleótidos obtenidos mediante una quinasa en presencia de ATP. Seguidamente, se realizó la ligación para unir las dos secuencias hibridadas que forman cada pre-microARN, para lo cual se llevó a cabo la reacción de ligación utilizando la enzima T4 ligasa en un tampón apropiado y con una relación vector: inserto de 1:1.

Para la clonación del sh-OCT1 y sh-Luc2 se utilizó la misma estrategia, sin embargo, debido al tamaño menor de estas secuencias, se diseñaron sólo dos oligos (F y R) y, por ello, se realizó la hibridación seguida de la fosforilación y se utilizó este producto para la ligación del sh-ARN con el plásmido pLVTHM.

3.10.2.2. Ligación de los pre-microARNs o sh-ARN con el plásmido pLVTHM

Tras la preparación del plásmido de destino pLVTHM y del inserto pre-microARN o sh-ARN, se llevó a cabo la reacción de ligación utilizando la enzima T4 ligasa en un tampón apropiado y con una relación vector:inserto de 1:25.

A continuación, se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α con el producto de reacción por choque térmico como se describe en el apartado 3.11.1. Se sembraron en placas con medio LB con agar, suplementado con ampicilina como antibiótico de selección. Algunas de las colonias se crecieron en medio LB líquido suplementado con el antibiótico, de las cuales se extrajo el ADN plasmídico (apartado 3.11.2.). La identidad de los clones seleccionados se confirmó con un estudio de restricción utilizando las enzimas *EcoRI* y *XbaI* (apartado 3.15.3.) y, finalmente, mediante secuenciación (apartado 3.15.4.).

En la Figura MM-2 se muestra la estructura del plásmido pLVTHM-miRNA-141, como representativo de la clonación de los pre-microARNs en este tipo de vector lentiviral. Del estudio de restricción teórico con las enzimas *EcoRI* y *XbaI*, se obtenían patrones de bandas diferentes en función de si el microARN estaba insertado en el plásmido pLVTHM, o de si no había inserto (Figura MM-2B). Como se puede observar en la Figura MM-2C los clones (calle 2-5) fueron positivos respecto al patrón esperado para el pLVTHM-miRNA-141, ya que el tamaño de los fragmentos de ADN coincidía con el esperado para esa condición en el estudio teórico. Se eligió el clon 1 y se validó de manera definitiva su identidad mediante secuenciación (apartado 3.15.4.).

Tabla MM-3. Secuencia de los “primers” utilizados para generar los pre-microARNs y sh-ARN de interés.

microARNs	Oligonucleótidos	Secuencia
hsa-mir-330	Oligo F1	CGCGTCTTTGGCGATCACTGCCTCTCTGGGCCTGTGTCTTAGGCTCTGCAAGA
	Oligo R1	GGTTGATCTTGCAGAGCCTAAGACACAGGCCAGAGAGGCAGTGATCGCCAAAGA
	Oligo F2	TCAACCGAGCAAAGCACACGGCCTGCAGAGAGGCAGCGCTCTGCCCAT
	Oligo R2	CGATGGGCAGAGCGCTGCCTCTCTGCAGGCCGTGTGCTTTGCTC
hsa-mir-769	Oligo F1	CGCGTGCCTTGGTGCTGATTCTGGGCTCTGACCTGAGACCTCTGGGTTCTGAGCTGTGATGTT
	Oligo R1	GAGCAACATCACAGCTCAGAACCAGAGGTCTCAGGTCAGAGCCCAGGAATCAGCA CCAAGGCA
	Oligo F2	GCTCTCGAGCTGGGATCTCCGGGGTCTTGGTTCAGGGCCGGGGCCTCTGGGTTCCA AGCTTTTTGAAAT
	Oligo R2	CGATTTCCAAAAAGCTTGAACCCAGAGGCCCGGCCCTGAACCAAGACCCCGGAG ATCCAGCTCGA
hsa-mir-141	Oligo F1	CGCGTCGGCCGGCCCTGGGTCCATCTTCCAGTACAGTGTTGGATGGTCTAAT
	Oligo R1	GCTTCACAATTAGACCATCCAACACTGTACTGGAAGATGGACCCAGGGCCGGCCGA
	Oligo F2	TGTGAAGCTCCTAACACTGTCTGGTAAAGATGGCTCCCGGGTGGGTTCTTTTTGGAA AT
	Oligo R2	CGATTTCCAAAAAGAACCACCCGGGAGCCATCTTACCAGACAGTGTTAGGA
hsa-mir-6806	Oligo F1	CGCGTTGCTCTGTAGGCATGAGGCAGGGCCCAGGTTCCAT
	Oligo R1	ATCACATGGAACCTGGGCCCTGCCTCATGCCTACAGAGCAA
	Oligo F2	GTGATGCTGAAGCTCTGACATTCTGCAGTTTTTGGAAAT
	Oligo R2	CGATTTCCAAAAACTGCAGGAATGTCAGAGCTTCAGC
hsa-mir-1287	Oligo F1	CGCGTGTGTGCTGTCCAGGTGCTGGATCAGTGGTTCGAGTCTGAGCCT
	Oligo R1	GGCTTTTAAAGGCTCAGACTCGAACCACTGATCCAGCACCTGGACAGCACAACA
	Oligo F2	TAAAAGCCACTCTAGCCACAGATGCAGTGATTGGAGCCATGACAATTTTTGGAAAT
	Oligo R2	CGATTTCCAAAAATTGTCATGGCTCCAATCACTGCATCTGTGGCTAGAGT
hsa-mir-1468	Oligo F1	CGCGTGGTGGGTGGTTTCTCCGTTTGCCTGTTTCGCTGATGTGCATTC
	Oligo R1	AGTTGAATGCACATCAGCGAAACAGGCAAACGGAGAAACCACCCACCA
	Oligo F2	AACTCATTCTCAGCAAATAAGCAAATGGAAAATTCGTCCATCTTTTTGGAAAT
	Oligo R2	CGATTTCCAAAAAGATGGACGAATTTTCCATTTGCTTATTTGCTGAGAATG
sh-OCT1	OligoF1	CGCGTAAGAACGGTGGCGATCATGTACCAGATGGTTCAAGAGACCATCTGGTACATG ATCGCCACCGTTCTTTTTTGGAAAT
	OligoR1	CGATTTCCAAAAAAGAACGGTGGCGATCATGTACCAGATGGTCTCTTGAACCATCT GGTACATGATCGCCACCGTTCTTA
sh-Luc2	OligoF1	CGCGTCTGACGCGGAATACTTCGATTCAAGAGATCGAAGTATTCCGCGTCAGTTTTT GGAAATCG
	OligoR1	CGATTTCCAAAAACTGACGCGGAATACTTCGATCTCTTGAATCGAAGTATTCCGCGTC AGACGCG

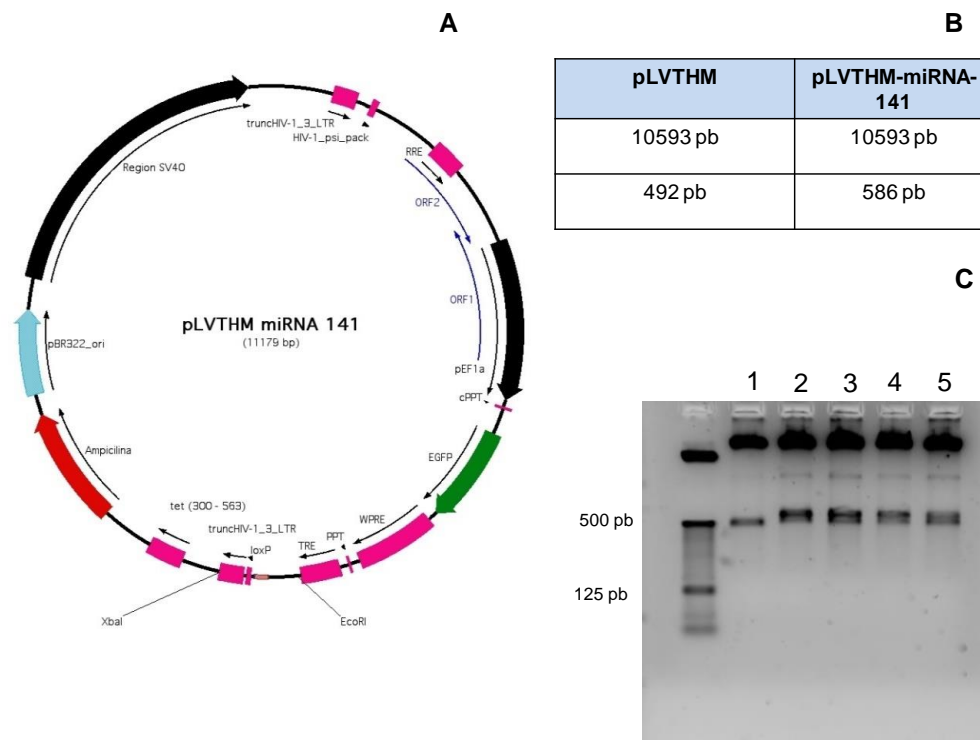


Figura MM-2: Esquema del plásmido lentiviral pLVTHM-miRNA-141, obtenido tras la ligación del plásmido pLVTHM y la secuencia del microARN (hsa-mir-141). Se muestran los sitios de corte para las enzimas de restricción utilizadas (*EcoRI* y *XbaI*) (A). Representación teórica del estudio de restricción del vector pLVTHM-miRNA-141 con las enzimas *EcoRI* y *XbaI*, y el tamaño esperado para los fragmentos de ADN para cada una de las posibilidades (plásmido pLVTHM vacío sin el inserto, o el plásmido pLVTHM con el microARN) (B). Electroforesis en gel de agarosa al 1% tras tinción con SYBR Green I de los productos obtenidos en la digestión de los clones con *EcoRI* y *XbaI*. La primera calle del gel representa el patrón de tamaños moleculares de ADN (C). La calle 1 corresponde a un plásmido vacío y los clones positivos son 2, 3, 4 y 5.

3.11. CULTIVO DE BACTERIAS

Soluciones utilizadas

Medio Luria-Bertani (LB): 10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levaduras y 10 g/l NaCl; pH 7,0.

Las placas de medio LB-agar tenían 15 g/l de agar.

Medio SOC: 20 g/l triptona, 5 g/l extracto de levaduras, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM glucosa; pH 7,0.

Tanto el medio LB, como el SOC, se autoclavaron para su esterilización.

3.11.1. Transformación de bacterias por choque térmico

Los productos de reacciones que se deseaban amplificar se introducían en bacterias *E. coli* DH5α mediante transformación por choque térmico, que consistió en elevar la temperatura a 42°C durante 2 min, y seguidamente se enfriaron en hielo durante 2 min. Sobre la mezcla

se añadió medio SOC (500 µl) y se incubó en agitación durante 1 h a 37°C. Aproximadamente un tercio del volumen se sembró en condiciones de esterilidad por extensión con un asa de vidrio en una placa con medio LB y agar suplementado con 100 µg/ml de ampicilina. Se incubaron en una estufa a 37°C durante aproximadamente 16 h.

3.11.2. Purificación de ADN plasmídico de cultivos de bacterias

A partir de las placas en las que se habían sembrado bacterias transformadas, se seleccionaron algunas de las colonias que aparecían bien definidas, y se crecieron en medio LB suplementado con ampicilina. Para purificar el ADN plasmídico del LB se utilizó el kit comercial “illustra PlasmidPrep Mini Spin”.

3.12. PRODUCCIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES

Soluciones utilizadas

• Polietilenimina (PEI): 1 mg/ml PEI, 25 mM HEPES y 150 mM NaCl; pH 7,5.

3.12.1. Fundamento

Para generar lentivirus recombinantes defectivos es necesario sustituir los genes de las proteínas virales por el transgén en el plásmido genómico lentiviral. En la producción de los virus se tiene que utilizar una línea celular (célula empaquetadora) que se transfecta con los dos plásmidos que codifican las proteínas estructurales de los lentivirus y con el plásmido recombinante que contenga el ADN de interés, flanqueado por los LTR y por la señal de empaquetamiento, además de otros elementos necesarios en *cis* como el TSS (Sitio de inicio de transcripción), y el tracto polipurínico necesario para la síntesis de la segunda cadena. De esta manera, se generarán partículas retrovirales recombinantes y defectivas, que pueden ser purificadas y concentradas a partir de los sobrenadantes del cultivo celular (Kuroda H.R *et al.*, 2009).

3.12.2. Producción de las partículas virales

Se utilizaron las células HEK-293T como células empaquetadoras. Se sembraron a subconfluencia en placas de 10 cm de diámetro recubiertas de colágeno. Posteriormente, se transfectaron utilizando el método de la PEI con 3 tipos de plásmidos; i) los vectores de transferencia pWPI-OCT3 o el pLVTHM, que portaba el microARN o el sh-ARN de interés. Ambos tipos de vectores contenían además el gen “reporter” EGFP. Para la producción de virus controles se utilizó el plásmido pWPI vacío, que solamente codificaba la EGFP, o el

plásmido pLVTHM-sh-Luc2; ii) el plásmido psPAX2, que codifica proteínas estructurales, y iii) el vector de expresión pMD2.G que codificaba la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular.

Para formar los complejos PEI:ADN se mezclaban 6 µg del plásmido psPAX2, 4,5 µg del plásmido pMD2.G y 6 µg del plásmido de transferencia, disueltos en 1,2 ml de solución salina, con 60 µl de PEI. La mezcla se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y, a continuación, se añadió a la placa de cultivo de células HEK-293T. A las 16 h se retiró el medio de cultivo con los complejos PEI:ADN y se añadió medio fresco.

Se recogieron sobrenadantes de las placas de cultivo a las 40 h, 48 h y 72 h después de la transfección, que se filtraron a través de filtros de 0,45 µm de tamaño de poro. Las partículas virales se concentraron por ultracentrifugación a 53.000 xg durante 130 min a 16°C. El precipitado se resuspendió en medio RPMI y se guardó a -80°C hasta su uso.

3.12.3. Determinación del título viral

El título viral o concentración de virus se determinó infectando células HEK-293T con diluciones seriadas de la solución viral y analizando 4 días después de la transducción el porcentaje de células EGFP positivas por citometría de flujo. La concentración de partículas virales se calculó por la fórmula:

$$\text{Título (TU/ml)} = \frac{10^{-ED_{50}} * 2 * N^{\circ} \text{ de células}}{\text{Vol}}$$

- ED₅₀ es el log10 de la dilución de la suspensión viral que consiguió infectar el 50% de las células.
- TU: Unidades transformantes (partículas virales infectivas)
- Vol: volumen del medio de cultivo (ml)

3.12.4. Determinación de la multiplicidad de infección (MOI)

La MOI es la relación entre el número de partículas infecciosas de virus y el número de células diana presentes en un cultivo. Se determinó la MOI óptima para cada línea celular en placas de 96 pocillos, tras sembrar un número adecuado de células según la línea celular. A las 24 h se transducían con MOIs de 10, 25, 50 y 100 de partículas lentivirales pWP1 con o sin polibreno (8 µg/ml), como se describe en el apartado 3.12.5. A los 4 días tras la transducción, se determinó el porcentaje de células fluorescentes que expresaban la EGFP por citometría de flujo.

3.12.5. Transducción de las células diana

Se sembraron las células en placas de 24 pocillos y se transdujeron a las 24 h con los lentivirus recombinantes según la MOI óptima para esa línea celular con polibreno. A las 24 h se retiró el medio de cultivo y se añadió medio fresco. A los 4 días tras la transducción, se determinó el porcentaje de células fluorescentes que expresaban la EGFP por citometría de flujo.

En algunos casos se seleccionaron clones de las células que expresaban establemente la proteína de interés por el método de la dilución límite.

3.13. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ARNm POR RT-QPCR

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 K *et al.*, 1986), la PCR cuantitativa a tiempo real, que se llevó a cabo utilizando como sistema de detección SYBR Select I master mix.

3.13.1. 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 5×10^6 células. El ARN total purificado se cuantificaba por NanoDrop.

3.13.2. Transcripción reversa (RT)

Para sintetizar el ADNc para utilizar como molde en la PCR se realizó una RT de 2 μ g de ARN total, utilizando la mezcla de reactivos “SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit” (Invitrogen), o de “High Capacity Reverse Transcriptase kit” (Applied Biosystem).

3.13.3. Diseño de cebadores

Los cebadores o “primers” específicos para el ADNc de cada una de las proteínas a estudiar se diseñaron con el programa OligoAnalyzer 3.1. 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.

En las tablas MM-4, MM-5 y MM-6 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 de muestras humanas, de rata o ratón, respectivamente.

Tabla MM-4. Cebadores utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes por RT-QPCR en muestras humanas.

Proteína	Gen	"Primer" forward (5'-3')	"Primer" reverse (3'-5')	Amplicón (pb)	Número de acceso
AUF1	<i>HNRNPD</i>	GTAAGAACGAGGAGGAT GAAGGGAAAATGT	TTGATCCATGACCTTATC TACTCTCCGA	203	NM_001003810.1
BRF1	<i>ZFP36L1</i>	GCGTGTGGGACTCCAGA CA	TCTTGTACCCTTGCATA AAACTTCGCTCA	164	NM_004926.3
BRF2	<i>ZFP36L2</i>	CCCGTTATTCGTCGTGGC TCAA	CCAGGGATTCTCTGTCT TGCACA	163	NM_006887.4
CUGBP	<i>CELF1</i>	CCTCAGAGCAAAGGGTG CTGTT	TCCTGTCTTCCACTGCAT TGTTCTTCT	160	NM_006560.3
FBP2	<i>KHSRP</i>	GTTGGAAGATGGAGATCA ACCGGAGA	GTCATTGAAGTCCTTGGG GGAGGAT	105	NM_003685.2
GAPDH	<i>GAPDH</i>	TGAGCCCGCAGCCTCC	TACGACCAAATCCGTTGA CTCC	149	NM_002046
HPRT1	<i>HPRT1</i>	GCCCTGGCGTCGTGATTA GT	AGCAAGACGTTTCAGTCCT GTCCATAA	140	NM_000194
HuR	<i>ELAVL1</i>	CGGGATAAAGTAGCAGGA CACAGCTT	GGGCGAGCATACGACAC CTT	137	NM_001419.2
OCT1 total	<i>SLC22A1</i>	TGCAGACAGGTTTGGCCG T	GCCCCGAGCCAACAAATT CTGTGAT	187	NM_003057
OCT1 silvestre	<i>SLC22A1</i>	GATTTTTATCTCACCTGAC CTGCACTGGTT	AGGCCCAACACCGCAA CA	249	NM_003057
TTP	<i>ZFP36</i>	CTGCCATCTACGAGAGCC TCCT	CTGCCATCTACGAGAGC CTCCT	270	NM_003407.3

Tabla MM-5. Cebadores utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes por RT-QPCR en muestras de rata.

Proteína	Gen	"Primer" forward (5'-3')	"Primer" reverse (3'-5')	Amplicón (pb)	Número de acceso
Actb	<i>Actb</i>	TCTGTGTGGATTGGTGGC TCTA	CTGCTTGCTGATCCACATCT G	121	NM_031144
Oct1	<i>Slc22a1</i>	CATTGCAGACAGGTTTGG CCGTAA	GCAGGCGAAAGAGCAACAT GGAT	119	NM_012697

Tabla MM-6. Cebadores utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes por RT-QPCR en muestras de ratón.

Proteína	Gen	"Primer" forward (5'-3')	"Primer" reverse (3'-5')	Amplicón (pb)	Número de acceso
Gapdh	<i>Gapdh</i>	ACACTGAGCAAGAGAGG CCCTA	GGGTGCAGCGAACTTTATT GATGGTATT	122	NM_008084
Oct1	<i>Slc22a1</i>	TCGTCACTGAGTTTAACC TGGTGTGT	TTACGGCCAAACCTGTCTG CAA	127	NM_009202

3.13.4. Realización de la PCR cuantitativa

Las condiciones de temperatura para la PCR fueron las mismas en todos los casos. Las muestras se incubaron primero durante 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 ARN problema se corrigió por la del normalizador, GAPDH, HPRT1 o β -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 ultra pura.

3.13.5. 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 ADNc 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 ΔCt como Ct diana-Ct control endógeno.

Calcular $\Delta\Delta Ct$ como ΔCt muestra- ΔCt calibrador/muestra control.

3.14. DETECCIÓN DE VARIANTES DE OCT1 GENERADAS POR “SPLICING” ALTERNATIVO

Para evaluar de manera semicuantitativa la presencia de variantes generadas por “splicing” alternativo del ARNm inmaduro del OCT1 en las biopsias de HCC y CCA se diseñaron oligonucleótidos que anillaban en regiones específicas situadas entre los exones 6 y 11 (Tabla MM-7). Se utilizaron combinaciones de estos oligonucleótidos para la detección selectiva por PCR analítica de las variantes generadas por un “splicing” alternativo. Los “primers” F1 y R1 son comunes a todas las isoformas del OCT1 descritas.

Tabla MM-7. “Primers” utilizados para la detección de variantes de OCT1 generadas por un “splicing” alternativo.

Secuencia (5'→3')	Posición	Tipo de primer
GGAAGCGCACCTTCATCCTGAT	Exón 6	F1
CAGGTGCCCGAGGGTTCT	Exón 11	R1

La PCR analítica se llevó a cabo con el kit Platinum® PCR Supermix High Fidelity (Invitrogen), y utilizando los “primers” F1 y R1. 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. La intensidad de las bandas correspondientes a la forma silvestre o las formas truncadas de OCT1 se cuantificó por densitometría.

3.15. MÉTODOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Soluciones utilizadas

Tampón MOPS: MOPS 20 mM, acetato sódico anhidro 8 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0.

Tampón TAE: trizma base 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0.

Tampón TE: Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0.

3.15.1. PCR de alta fidelidad

La PCR de alta fidelidad se llevó a cabo con el kit “AccuPrime Pfx SuperMix”, que contenía la polimerasa de ADN Pfx de alta fidelidad, MgCl₂ 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; seguido de 30-40 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.

3.15.2. Purificación del ADN contenido en geles de agarosa

Tras la visualización de los productos de PCR separados por electroforesis en un gel de agarosa, se cortó el fragmento del gel que contenía la banda correspondiente al ADN de interés bajo luz azul de λ de 460 nm. Se usó el kit “illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification” para extraer y purificar el ADN siguiendo el protocolo de la casa comercial. La concentración de ADN tras la elución se determinó por espectrofotometría.

3.15.3. Digestión con enzimas de restricción

El ADN se mezcló con el tampón de reacción adecuado para la enzima usada, la albúmina sérica bovina al 0,1%, la enzima de restricción (5 U/ μ g ADN) y agua ultrapura hasta un volumen de 20 μ l ó 50 μ l, según la condición experimental. La reacción de restricción se incubó a 37°C durante el tiempo indicado por la casa comercial. Los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en un gel de agarosa. Sus tamaños se calcularon por comparación con estándares de ADN.

3.15.4. Secuenciación

La secuenciación del ADN para comprobar la identidad de los plásmidos clonados y de los productos de PCR se realizó en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca. Se llevó a cabo una secuenciación de terminación de la cadena de tipo Sanger partiendo de 500 ng de ADN plasmídico y 3,3 pmol de un primer específico disueltos en 8 μ l de agua ultrapura, y 2 μ l del reactivo "BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing" (Applied Biosystems). El análisis de los cromatogramas tras la electroforesis capilar se realizó con el programa informático FinchTV 1.4 (Geospiza, PerkinElmer, Seattle, EE.UU.) y para la visualización de las secuencias de ADN se usó el programa Gene Construction Kit.

3.16. ESTUDIOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

Soluciones utilizadas:

Medio de captación (MC): NaCl 96 mM, KCl 5,3 mM, KH_2PO_4 1,1 mM, MgSO_4 0,8 mM, CaCl_2 1,8 mM, D-glucosa 11 mM, y Hepes 50 mM, pH 7,4.

Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na_2HPO_4 0,5 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, pH 7,4.

3.16.1. 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 SLC. Para evaluar la función de OCT1 se utilizaron diferentes compuestos catiónicos como sustratos de este transportador (Tabla MM-1), los cuales se acumulan en el interior de la célula dependiendo de la actividad de este transportador. Para realizar estos estudios, las células se incubaron en presencia de los sustratos y como inhibidor específico de la actividad de OCT1 se utilizó la quinina.

3.16.2. Procedimiento

Para procesar las células, estas se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se suspendieron en MC que contenía el compuesto fluorescente a la concentración determinada según el tipo de experimento (Tabla MM-1) con o sin quinina (250 μ M). Se incubó la suspensión celular a 37°C en oscuridad durante el tiempo determinado para cada experimento.

Tras la incubación, se añadió 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 los filtros de emisión indicados en la Tabla MM-1. Se determinó el valor de la fluorescencia media de cada una de las muestras analizadas en el citómetro de flujo.

También se utilizó el citómetro de flujo para cuantificar el porcentaje de células positivas para EGFP tras la transducción con lentivirus. Para ello las células se suspendieron en PBS. La fluorescencia se midió utilizando como fuente emisora de luz el láser de argón de $\lambda = 488$ nm y el detector de emisión FL1 (530/30 nm).

3.17. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

3.17.1. Obtención de crudos de membrana de las líneas celulares

Tampón A: 250 mM Sacarosa, 0,2 mM CaCl_2 , 10 mM MgCl_2 , 100 mM KNO_3 , 10 mM HEPES-Tris pH 7,4.

Las células se tripsinizaron y suspendieron en el tampón A (0,5 ml/millón de células) y se disgregaron en un potter manual "tight fitting". A continuación, para separar los crudos de membrana del citoplasma se utilizó una ultracentrífuga a una velocidad de 46.700 rpm durante 95 min a 16°C.

Tras la centrifugación, se recogía el sobrenadante que contenía las proteínas del citoplasma y el contenido intracelular, y se resuspendía el precipitado (crudos de membrana) en buffer A (0,1 ml/millón de células).

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

3.17.2.1. Preparación de los geles

La electroforesis vertical se llevó a cabo en geles de poliacrilamida del 7,5% (p/v), en Tris-HCl utilizando el soporte del sistema "Mini-Protean II Cell".

3.17.2.2. Preparación de las muestras

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

3.17.2.3. Condiciones de la electroforesis y de la transferencia

Soluciones utilizadas:

Tampón de migración: 25 mM Trizma base, 0,2 M glicina, y 3,5 mM SDS.

Tampón de transferencia: 25 mM Trizma base, 0,2 M glicina, 3,5 mM SDS y 20% (v/v) metanol.

La electroforesis se realizó en una cubeta con tampón de migración, a una corriente constante de 15 mA para el gel concentrador, incrementándose a 30 mA 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 a 4°C.

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.

3.17.3. 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 con Tween 20 (0,2%) en agitación. Seguidamente se incubó durante 1 h con el anticuerpo primario correspondiente, también en agitación. Se utilizaron los anticuerpos primarios que se muestran en la Tabla MM-8 diluidos en leche al 1% (p/v) en PBS-T.

Se utilizó el anticuerpo secundario adecuado en cada caso marcado con peroxidasa (HRP) a una dilución 1:2000 en leche al 1% (p/v) en PBS-T. Para la detección se utilizó un método quimioluminiscente (ECL) y un equipo de análisis de imagen LAS-4000.

Tabla MM-8. Anticuerpos primarios utilizados en la detección de proteínas por western blot

Anticuerpo	Referencia	Especie de origen	Dilución	Casa comercial
Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa	Ab2871	Ratón	1:200	Abcam
OCT1	Ab118539	Conejo	1:100	Abcam

3.18. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA

3.18.1. Preparación de muestras (células en cultivo)

Para el marcaje por inmunofluorescencia las células se sembraron en placas de 24 pocillos sobre cubres para inmunofluorescencia a la densidad óptima según la línea celular, y se mantuvieron en cultivo hasta que alcanzaban entre el 60 y el 80% de confluencia.

En el caso de tejidos, se utilizaron cortes de criostato de 5 μm de espesor, que se secaron al aire y se mantuvieron congelados a -80°C hasta su utilización. El procedimiento posterior fue similar al que se describe para las células.

3.18.2. Inmunodetección

Las células 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 1% de suero bovino fetal se realizó a temperatura ambiente durante 1 h. La tabla MM-9 muestra los anticuerpos primarios utilizados en este estudio y las diluciones empleadas.

Tabla MM-9. Anticuerpos primarios utilizados en la detección de proteínas por inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Referencia	Especie de origen	Dilución	Casa comercial
Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa	Ab2871	Ratón	1:200	Abcam
OCT1-cola	LS-C161155	Conejo	1:100	LifeSpan BioSciences
OCT1-cabeza	LS-C31870	Conejo	1:100	LifeSpan BioSciences
V5	R96025	Ratón	1:600	Invitrogen

A continuación, se realizaron tres lavados de 15 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[®] o Alexa Fluor-594[®] (dilución 1:1000) y con DAPI para teñir los núcleos (dilución 1:5000). Después de tres lavados de 15 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 (Leica TCS SP2).

3.19. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOHISTOQUÍMICA

Para detectar el OCT1 se utilizaron dos anticuerpos primarios policlonales de conejo de la casa comercial LifeSpan BioSciences, LS-C31870 y LS-C161155, producidos contra la región de OCT1 N-terminal (residuos 100-149) y C-terminal (residuos 510-539),

respectivamente. Se utilizó el kit “Mouse and rabbit AP/Fast Red (ABC) Detection IHC Kit (Abcam)”. Después de la desparafinación en xileno y la rehidratación en soluciones de etanol de concentraciones decrecientes, las muestras se incubaron en una solución de desenmascaramiento de antígenos a pH 6,0 a 96°C durante 20 min, se lavaron cuatro veces en tampón “PBS” (pH 7,4), se incubaron con una solución de bloqueo durante 5 min para reducir el marcaje inespecífico y, a continuación, se incubaron durante 30 min con anticuerpo anti-OCT1 diluido 1:100, seguido de 15 min con anticuerpo secundario biotinilado contra el anticuerpo primario, 15 min con estreptavidina-fosfatasa alcalina, y 10 min con el substrato-cromógeno “Fast-Red” disuelto en tampón de fosfato de naftol. Después de cada una de las etapas anteriores, las muestras se lavaron cuatro veces en tampón “PBS”. Todos los procedimientos se llevaron a cabo a temperatura ambiente a menos que se especifique lo contrario. Los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina y se montaron con medio de montaje acuoso y las tinciones se visualizaron en un microscopio óptico.

3.20. ESTUDIO HISTOLÓGICO. MICROSCOPIA ÓPTICA

Los cortes de tejido de 5 µm de espesor realizados en un criostato se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 20 min, se tiñeron por el método clásico de hematoxilina-eosina, 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.

3.21. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

3.21.1. Determinación de proteínas totales

Para medir la concentración total de proteínas se utilizó una modificación del método de Lowry (Lowry OH *et al.*, 1951) realizada por Markwell (Markwell MA *et al.*, 1978), basado en la reducción de las proteínas con cobre en medio alcalino y la posterior reducción del ácido fosfomolibdico fosfotúngstico con las proteínas tratadas.

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

Soluciones utilizadas:

Solución de MTT: 5 mg/ml de MTT en PBS.

Solución de lisis: 10% SDS y 10 mM HCl en agua.

Para la determinación de la viabilidad celular, en primer lugar, se añadieron 110 µl de 0,5 mg/ml MTT en medio de cultivo en cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Tras 4 h de incubación a 37°C, se añadió sobre la mezcla anterior 100 µl/pocillo de la solución de lisis.

Finalmente, tras 12 h de incubación a 37°C, se determinó la intensidad del color en el sobrenadante por espectrofotometría a una longitud de onda de 595 nm en un lector de ELISA. Como blanco se utilizaron pocillos de la placa en los que no se habían sembrado células, pero sí habían sido incubados con las distintas concentraciones de los compuestos ensayados y posteriormente con medio de cultivo suplementado con MTT y solución de lisis de igual forma que el resto de los pocillos.

3.21.3. Determinación de radioactividad

La radiactividad del isótopo ¹⁴C se midió en un contador de centelleo líquido, utilizando en cada medida 4 ml de líquido de centelleo.

3.21.4. Medida de sorafenib por HPLC-MS/MS

3.21.4.1. Preparación de muestras de tejido

Para medir el contenido de sorafenib en las muestras de tejidos se procesaron alrededor de 30 mg de tejido mediante homogenización en solución salina (10 µl/mg de tejido). A continuación, se diluyó el homogenado con metanol (1:4) y se centrifugó la muestra 5 min a 4°C a 20.000 xg. Finalmente se recogían 90 µl del sobrenadante para analizar en el HPLC-MS/MS.

3.21.4.2. Preparación de células

Para medir el contenido de sorafenib en las células, éstas se lisaron en agua ultrapura y, a continuación, se diluyó este lisado con metanol (1:4), se centrifugaban 5 min a 4°C a 20.000 xg. Igual que en el caso anterior se recogían 90 µl del sobrenadante para analizar en el HPLC-MS/MS.

Una vez que se prepararon las muestras se siguió una modificación del método descrito por Sparidans (Sparidans RW *et al.*, 2009) 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) termostaticada 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_2) 350°C, flujo del gas 10 ml/min, presión del nebulizador 20 psi, voltaje 2500 V.

La presencia de sorafenib en las muestras se confirmó empleando el modo de trabajo MRM siguiendo la transición específica del ion precursor (ion molecular - H^+) 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.

3.22. 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.

Los resultados del estudio TRANSFER se analizaron mediante SPSS (IBM® SPSS® Version 20.0), y se utilizaron los tests de Fisher's exact o log-rank (Mantel-Cox). La correlación entre la expresión de OCT1 y el grado de la metilación se realizó mediante el test Mann-Witney.

4.1. EFECTO DE LA EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR OCT1 EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON SORAFENIB EN PACIENTES CON HCC

Como se ha comentado en el apartado de introducción, el sorafenib (Nexavar®) es el fármaco de elección en el tratamiento del HCC avanzado, a pesar de que el efecto beneficioso para los pacientes es limitado, lo que se ha asociado con la elevada quimiorresistencia de estos tumores (Bruix J *et al.*, 2012; Nishida N *et al.*, 2015). Aunque se ha descrito que el sorafenib podría ser más beneficioso en algunos subgrupos de pacientes con HCC, especialmente los que tienen hepatitis C y no presentan metástasis (Bruix J *et al.*, 2017), no se dispone de buenos factores predictivos de respuesta.

Por su carácter catiónico en soluciones acuosas, los fármacos TKIs, como el sorafenib, no pueden difundir a través de la membrana plasmática y deben ser captados por proteínas transportadoras para alcanzar el interior celular, donde se encuentran sus dianas moleculares. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se encontró una caída marcada en la expresión del transportador OCT1 a nivel de ARNm en tumores hepáticos, tanto HCC como CCA, en comparación con el hígado sano (Martinez-Bacerra P *et al.*, 2012). Varios trabajos habían descrito la existencia de variantes genéticas (Leabman MK *et al.*, 2003) en el gen *SLC22A1*. Nuestro grupo llevó a cabo la secuenciación completa del ORF del gen *SLC22A1* en muestras de biopsias de HCC y CCA (Herraez E *et al.*, 2013) y encontró que en estos tumores estaban presentes algunas de las variantes genéticas previamente descritas (Hayer M *et al.*, 1999; Kerb R *et al.*, 2002; Shu Y *et al.*, 2003; Sakata T *et al.*, 2004). Además, en las biopsias de HCC que se analizaron se detectaron 3 nuevas mutaciones no descritas hasta entonces; c.181delCGinsT (R61S fs*10), c.262delT (C88A fs*16) y c.589C>T (P197S). Dos de estas variantes (c.181delCGinsT y c.589C>T) también estaban presentes en algunas biopsias de CCA. Las mutaciones R61S fs*10 y C88A fs*16 dan como resultado una proteína truncada y no funcional, pero la mutación P197S no afecta a la estructura de la proteína, ni tampoco a su función (Herraez E *et al.*, 2013).

En varios estudios se había descrito la presencia de isoformas del OCT1 humano generadas por “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 M *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 L *et al.*, 2012).

En el estudio realizado por nuestro grupo (Herraez E *et al.*, 2013) también se detectaron las variantes con pérdida del exón 9 aislado, de los exones 9 y 10, y la variante c.1276+1insGTAAGTTG. Además, se encontraron 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.

Además de la reducción en la expresión de OCT1, se encontró que el tejido tumoral presentaba mayor “splicing” alternativo en comparación con el tejido adyacente no tumoral. Generalmente, se considera que las variantes de “splicing” generan proteínas truncadas que no son funcionales (Hayer M *et al.*, 1999).

Durante un tiempo ha existido cierta controversia sobre cómo era captado el sorafenib por las células. Se había planteado la hipótesis de que pudiese ser transportado por el OCT1, como se había sugerido para otro compuesto de la familia de TKIs, el imatinib, que se administra para el tratamiento de pacientes con leucemia mieloide crónica (Minematsu T *et al.*, 2011). Dos estudios independientes habían demostrado que los pacientes con leucemia con mayores niveles de expresión de OCT1 respondían mejor a este fármaco que los que presentaban una expresión baja (Wang L *et al.*, 2008; Nardinelli L *et al.*, 2012).

En relación con el sorafenib, algunos autores sugerían que este fármaco entraba en las células mayoritariamente por difusión (Swift B *et al.*, 2013), aunque varios estudios, incluidos los *in vitro* llevados a cabo por nuestro grupo demostraron que el transportador OCT1 mediaba la captación celular del sorafenib y que las células que expresaban OCT1 eran más sensibles a este fármaco (Herraez E *et al.*, 2013). Recientemente, se ha demostrado que existe una correlación entre la expresión de OCT1 a nivel de ARNm y la respuesta al tratamiento con sorafenib en pacientes con HCC (Grimm D *et al.*, 2016).

En esta Tesis Doctoral nos planteamos como primer objetivo investigar si la expresión de OCT1 a nivel proteico, teniendo en cuenta su correcta localización en la membrana plasmática (imprescindible para su actividad transportadora), podía tener más interés como marcador para predecir la repuesta al sorafenib en pacientes con HCC que el análisis de expresión del gen medida a nivel de ARNm.

Para llevar a cabo este objetivo se estableció un estudio en colaboración con el Dr. Andreas Geier, del Hospital Universitario de Würzburg (Alemania), en el que participaron otros 3 centros hospitalarios alemanes que aportaron muestras de biopsias (cortes de parafina), junto con los datos correspondientes a las características demográficas y clínicas de los pacientes. El estudio, que se denominó TRANSFER, de las siglas en inglés TRANSPORTER SORAFENIB RESPONSE, consistía en el análisis por inmunohistoquímica de OCT1 utilizando anticuerpos específicos en muestras de HCC avanzado y su relación con los datos de respuesta al tratamiento con sorafenib.

4.1.1. Puesta a punto de un método de detección de OCT1

Puesto que, como se ha comentado anteriormente, es frecuente que debido a mutaciones de tipo “nonsense” y al “splicing” alternativo una proporción importante del ARNm de OCT1 sintetizado en células de HCC dé lugar a proteínas truncadas y no funcionales (Herraez E *et al.*, 2013) decidimos utilizar dos anticuerpos comerciales, uno frente a la región N-terminal, que reconoce los residuos de aminoácidos de la región antigénica 100-149, que a partir de ahora denominaremos “anticuerpo de cabeza” y el otro frente a la región C-terminal, que reconoce los residuos de aminoácidos de la región antigénica 510-539 y que denominaremos “anticuerpo de cola” (Figura 1).

Se planteó como hipótesis que el anticuerpo que reconoce la zona N-terminal permitiría detectar el OCT1 total, es decir, tanto las formas truncadas como la completa, mientras que el anticuerpo que reconoce la zona C-terminal sólo detectaría la proteína con la secuencia completa.

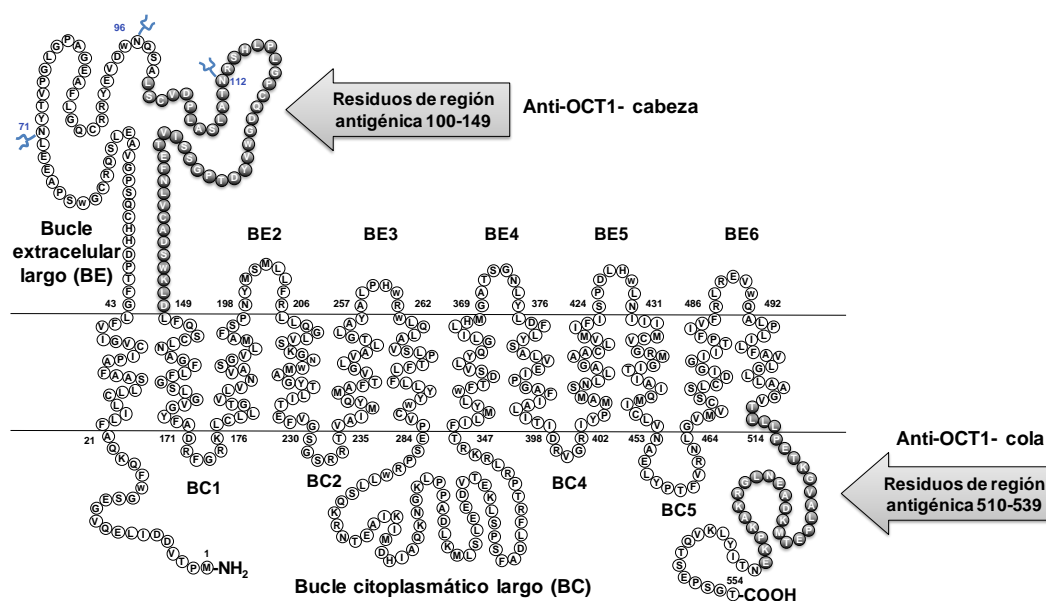


Figura 1. Modelo bidimensional de la secuencia de aminoácidos de OCT1 donde se muestra la región de la proteína reconocida por el anticuerpo policlonal anti-OCT1 de la región de cabeza (N-terminal) o el anticuerpo policlonal anti-OCT1 de la región de cola (C-terminal).

En primer lugar, se realizaron pruebas de inmunohistoquímica en cortes de parafina de hígado humano sano con ambos anticuerpos anti-OCT1. El protocolo experimental se detalla en el apartado 3.19. de Material y Métodos. Como control negativo se llevó a cabo el mismo procedimiento, pero omitiendo el anticuerpo primario, por lo que las muestras se incubaron únicamente con el anticuerpo secundario. Esto nos permitió confirmar que en los controles negativos no se detectaba señal y sólo aparecía un ligero ruido de fondo (Figura 2A).

Sin embargo, cuando se realizó la inmunohistoquímica en las mismas muestras utilizando los anticuerpos primarios anti-OCT1 de cabeza (Figura 2B) o de cola (Figura 2C), observamos un marcaje claro en la membrana plasmática de los hepatocitos con ambos anticuerpos.

Para confirmar la eficacia de estos anticuerpos también se llevó a cabo un análisis de inmunofluorescencia acoplada a microscopía confocal en cortes de criostato de hígado humano sano. Encontramos que el anticuerpo de cola daba una señal intensa en la membrana plasmática de los hepatocitos (Figura 2D), mientras que con el anticuerpo de cabeza la señal era inespecífica, lo que se interpretó como ruido de fondo (datos no mostrados), por lo que concluimos que este último anticuerpo no era apropiado para estudios de inmunofluorescencia.

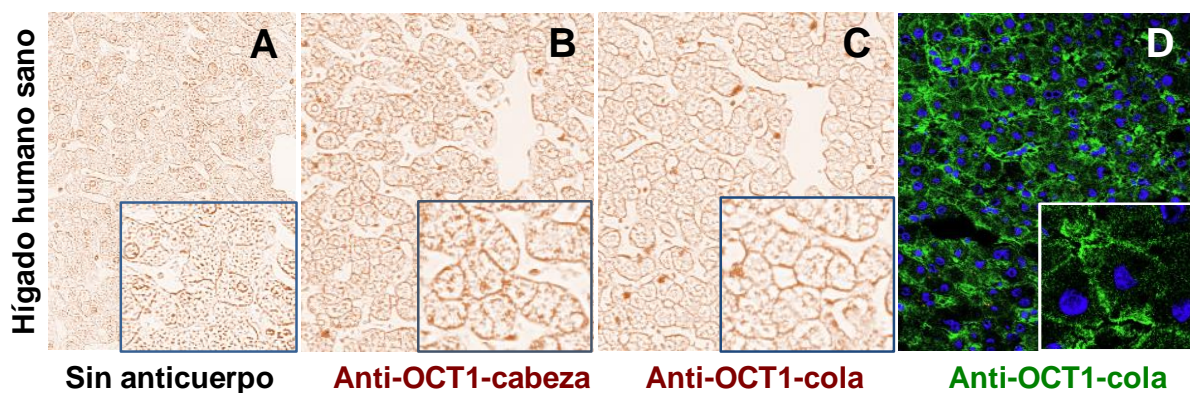


Figura 2. Imágenes representativas del análisis por inmunohistoquímica de OCT1 en hígado humano sano. El control negativo (sin anticuerpo primario) (A), o utilizando como anticuerpo primario el anti-OCT1 que reconoce la zona N-terminal del OCT1 (región de cabeza) (B) o el anti-OCT1 que reconoce la zona C-terminal (región de cola) (C). Imagen representativa del análisis por inmunofluorescencia combinada con microscopía confocal utilizando el anticuerpo anti-OCT1 de cola (verde); los núcleos fueron teñidos con Dapi (D).

Las hojas informativas de los anticuerpos suministradas por la casa comercial no garantizaban la ausencia de reactividad cruzada de estos anticuerpos con otras proteínas de la familia OCT. Por ello, para evaluar la especificidad de los anticuerpos anti-OCT1, decidimos realizar experimentos adicionales. Se determinó si eran capaces de detectar OCT3, otra proteína de esta familia que se expresa en el tejido hepático. Se eligió la línea celular CHO, derivada de ovario de hámster chino, que no expresa las proteínas humanas OCT1 ni OCT3 para desarrollar sublíneas de CHO con expresión estable de OCT1 o de OCT3. Para ello, se utilizaron lentivirus portadores de la ORF de OCT1 (generados previamente en nuestro laboratorio como parte del Trabajo de Fin de Máster de Rocío Sánchez-Vegazo) o lentivirus portadores de la ORF de OCT3, que se desarrollaron en el marco de esta Tesis Doctoral como se describe en el apartado 3.10.1. de Material y Métodos. Tanto en los vectores

lentivirales portadores de OCT1, como en los portadores de OCT3, las ORFs iban seguidas de una secuencia IRES que precedía a la ORF de la proteína fluorescente EGFP, lo que permite el seguimiento y cuantificación de las células transducidas. Además, para el caso de los lentivirus portadores de OCT3 se incluyó la etiqueta V5 en el extremo C-terminal.

Utilizando las sublíneas CHO-OCT1 y CHO-OCT3 obtenidas se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-OCT1 de cola (Figura 3). Como se observa en la Figura 3B, en las células CHO que expresaban OCT1 aparecía una señal clara en la membrana plasmática (en rojo). Sin embargo, en las células CHO transducidas con OCT3 no se detectaba señal debida a reactividad con el anticuerpo anti-OCT1 (Figura 3C), como lo demuestra la ausencia de señal de fluorescencia roja, pero sí confirmamos la presencia del OCT3 utilizando un anticuerpo que reconoce la etiqueta V5 (en verde). Además, con el anticuerpo anti-OCT1 de cola no detectamos ningún marcaje en las células CHO silvestres (Figura 3A). Estos resultados en conjunto nos permitieron confirmar la utilidad de este anticuerpo para la detección específica de OCT1.

Como se comentó anteriormente, el anticuerpo anti-OCT1 de cabeza no es adecuado para su uso en inmunofluorescencia por lo que no se pudo utilizar para detectar OCT1 en las células control positivo (CHO-OCT1).

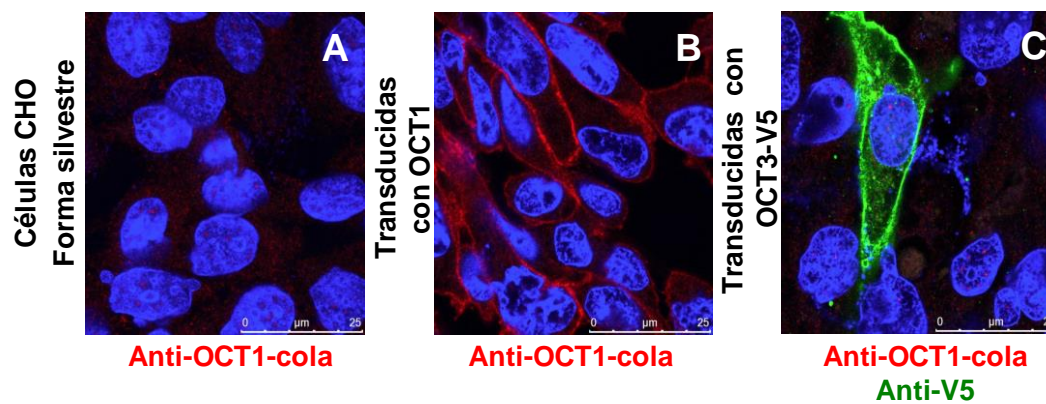


Figura 3. Imágenes representativas de inmunofluorescencia-microscopía confocal para determinar la selectividad del anticuerpo de OCT1 “de cola” utilizando células de ovario de hámster chino (CHO) silvestres (A) o con expresión de OCT1 humana (B) o de OCT3 humana etiquetado con V5 (C). El marcaje en rojo corresponde a OCT1 y en verde a V5. Los núcleos se tiñeron con Dapi.

En cuanto a la capacidad de detectar la presencia de OCT1 en la membrana plasmática por análisis inmunohistoquímico, no se observaron diferencias entre ambos anticuerpos en todas las muestras de HCC analizadas en nuestro estudio.

Para facilitar la interpretación de los resultados del análisis de inmunohistoquímica se clasificó la intensidad de la señal de OCT1 en los cortes de HCC según una puntuación simplificada.

La Figura 4 muestra el criterio que se ha seguido para la valoración de la expresión de OCT1 en base a la intensidad de la señal obtenida utilizando el anticuerpo anti-OCT1 de cabeza: ausente (Figura 4A), baja (Figura 4B), moderada (Figura 4C), y alta (Figura 4D). La presencia de señal en la membrana plasmática se valoró como negativa (Figura 4A-4C) o positiva (Figura 4D). El análisis de las distintas muestras mostró una marcada variabilidad interindividual, sin embargo, se confirmó la observación previa de la caída de la expresión de OCT1 en HCC cuando se evaluó la abundancia de OCT1 según los criterios de catalogación anteriormente descritos.

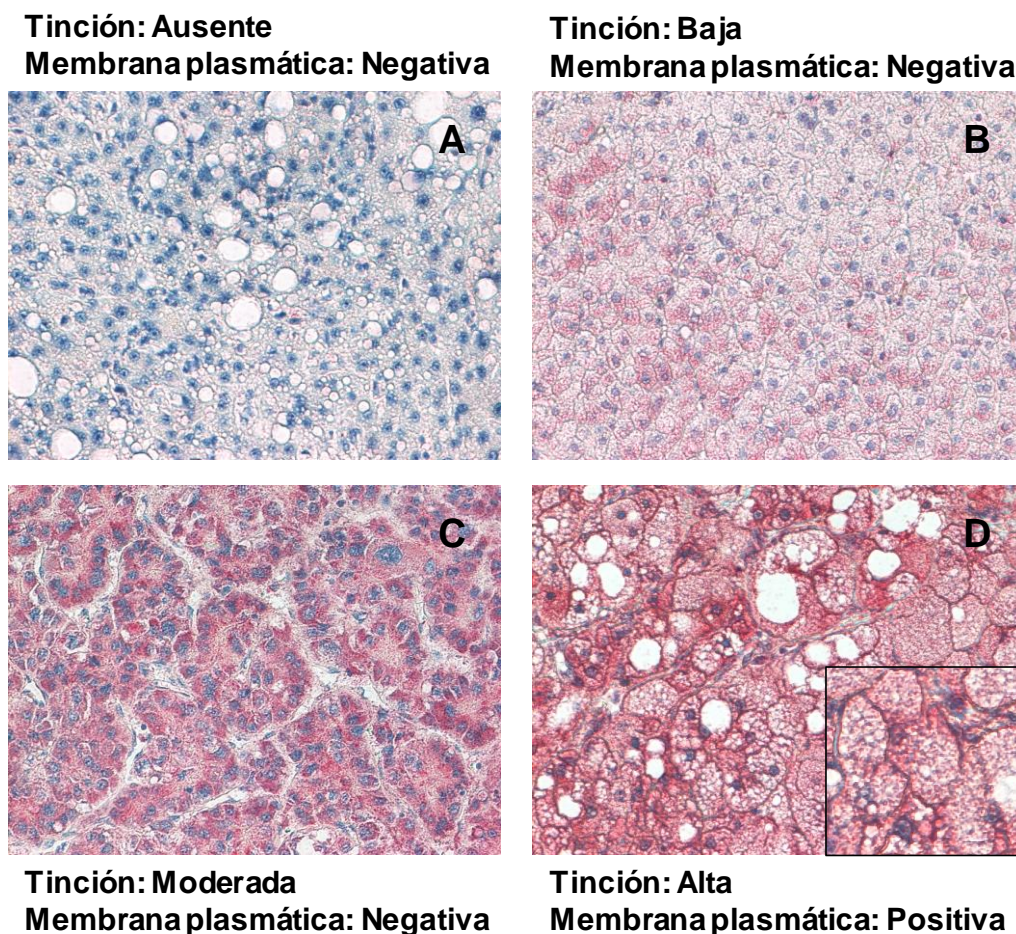


Figura 4. Imágenes representativas del análisis por inmunohistoquímica de OCT1 que muestran los criterios establecidos para la catalogación de las muestras de HCC dependiendo del grado de intensidad del marcaje con el anticuerpo “de cabeza” como: ausente (A), baja (B), moderada (C) y alta (D), así como la ausencia (A, B, C) o presencia (D) de la señal en la membrana plasmática.

Cuando se utilizó el anticuerpo de cola se obtuvieron unos resultados similares, aunque la señal era menos intensa que cuando se utilizaba el anticuerpo de cabeza (Figura 5).

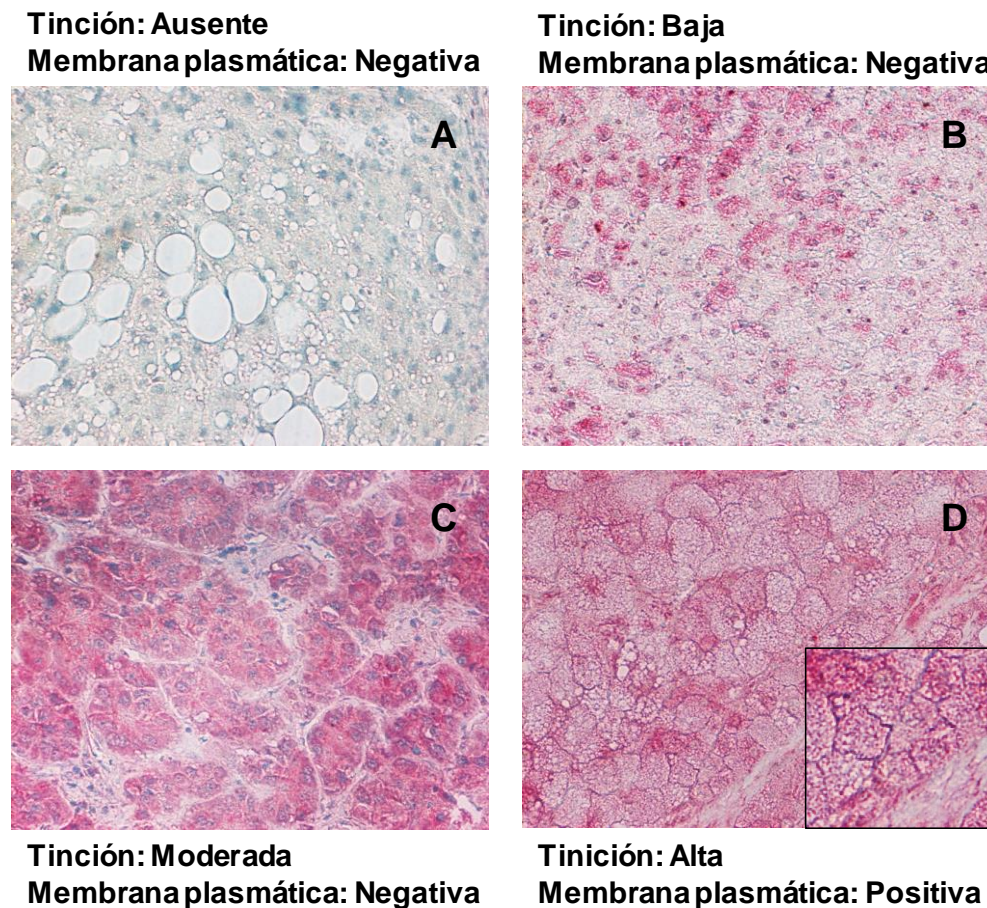


Figura 5. Imágenes representativas del análisis por inmunohistoquímica de OCT1 que muestran los criterios establecidos para la catalogación de las biopsias de HCC dependiendo del grado de intensidad del marcaje con el anticuerpo de cola como: ausente (A), baja (B), moderada (C) y alta (D), así como la ausencia (A, B, C) o presencia (D) de la señal en la membrana plasmática.

El hecho de que la señal intracelular obtenida cuando se utilizaba el anticuerpo de cola fuera más débil que la obtenida con el anticuerpo de cabeza se podría interpretar como una consecuencia de que no se detecten las proteínas incompletas.

Puesto que con ambos anticuerpos se obtuvieron resultados similares en cuanto a tinción y marcaje en la membrana, los siguientes análisis se describen y discuten sin distinguir entre los dos anticuerpos.

4.1.2. Expresión de OCT1 en pacientes con HCC

Una vez confirmada la capacidad y especificidad de los anticuerpos que se iban a utilizar para detectar OCT1 mediante un método inmunohistoquímico se analizó la calidad de las muestras recibidas de los distintos hospitales. Se seleccionaron y se incluyeron en el estudio un total

de 39 muestras que cumplían los requisitos de calidad y cantidad para garantizar un análisis fiable.

La Tabla 1 recoge las características demográficas y clínicas de los pacientes y las características de los tumores. La edad media de los pacientes incluidos en el estudio TRANSFER fue de 67 años, siendo la mayoría hombres ($\approx 90\%$). En cuanto a las hepatopatías crónicas subyacentes las más frecuentes fueron enfermedad alcohólica y hepatitis víricas y en menor medida esteatosis hepática no alcohólica y hemocromatosis.

En relación a la escala “Child-Pugh”, que se utiliza para evaluar el pronóstico de la enfermedad hepática crónica, al inicio del tratamiento con sorafenib este valor fue A en dos tercios de los pacientes, mientras que un grupo menor de pacientes fue B, y en otro más pequeño no pudo ser calculado por no disponer de los resultados de los análisis de laboratorio necesarios. Respecto al estadio de los tumores según el sistema de estadificación BCLC, alrededor de un 40% se clasificaron como B y otro 40% como C y sólo uno de los tumores fue de estadio A. Para el resto de los tumores analizados no se recibió esta información.

Todos los pacientes incluidos en este estudio recibieron sorafenib durante al menos 4 semanas. En la Tabla 1 se incluye también información relativa a la terapia utilizada con los pacientes antes del tratamiento con sorafenib. La mitad de los pacientes se habían sometido a una resección quirúrgica sola o combinada con quimioembolización por catéter transarterial (TACE) con o sin ablación por radiofrecuencia (RFA), un tercio de los pacientes sólo fue tratado con TACE y un porcentaje reducido de pacientes recibió RFA sola o en combinación con TACE. Un 10% de los pacientes no recibió ningún tipo de quimioterapia o radioterapia antes del tratamiento con sorafenib.

Una vez realizada la inmunohistoquímica en todos los cortes de parafina, cada una de las muestras se clasificó en función de la intensidad de la tinción y la localización de la señal de OCT1, siguiendo la clasificación mencionada anteriormente. A pesar de una importante variabilidad en la intensidad de expresión de OCT1 entre las distintas muestras, los resultados mostraron una expresión inferior a la del tejido hepático sano en la mitad de los tumores (Figura 6A). Sólo en un tercio de los tumores se detectó una expresión alta de OCT1, mientras que el resto presentó una expresión moderada del transportador.

Cuando se analizó la localización del transportador, encontramos que sólo un 15% de los tumores presentaban una expresión alta de OCT1 y mostraron una clara señal en la membrana plasmática (Figura 6B). Es decir, que tan sólo un tercio de los tumores con expresión de OCT1 presentaban la localización correcta del transportador en la membrana plasmática.

Tabla 1. Información demográfica y clínica de los pacientes incluidos en el estudio TRANSFER.

Pacientes		
Edad, años (media \pm EEM)	67,4 \pm 1,6	
Rango de edad	49-87	
Hombres	35	(89,7%)
Mujeres	4	(10,3%)
Tratamiento previo al sorafenib		
Ninguno	5	(12,8%)
Resección	7	(18,0%)
TACE	12	(30,8%)
RFA	1	(2,6%)
Resección+TACE	10	(25,6%)
TACE+RFA	2	(5,1%)
Resección+TACE+RFA	2	(5,1%)
Etiología del HCC		
Alcohol	11	(28,2%)
Hepatitis B	4	(10,3%)
Hepatitis C	11	(28,2%)
Hemochromatosis	2	(5,1%)
NAFLD	3	(7,7%)
Desconocida	8	(20,5%)
Clasificación Child-Pugh		
A	26	(66,6%)
B	7	(18,0%)
Desconocida	6	(15,7%)
Clasificación BCLC		
A	1	(2,5%)
B	15	(38,5%)
C	16	(41,0%)
Desconocida	7	(18,0%)

BCLC, Barcelona Clinic Liver Cancer; NAFLD, esteatosis hepática no alcohólica; RFA, ablación por radiofrecuencia, TACE, quimioembolización por catéter transarterial.

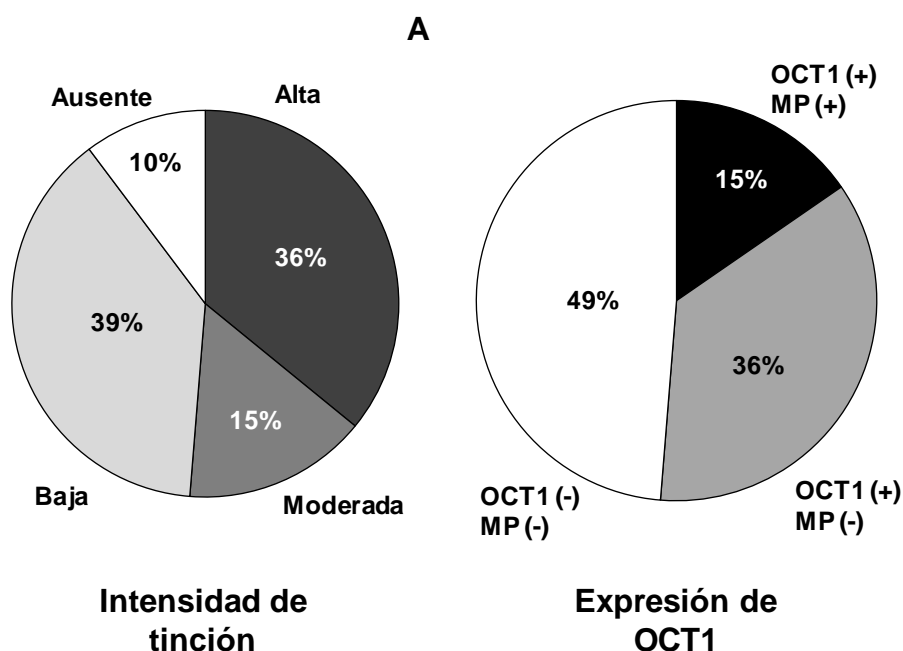


Figura 6. Clasificación de los pacientes con HCC según el grado de marcateo de OCT1 (A), o teniendo en cuenta la localización de la proteína en la membrana plasmática (B). OCT1 (-): ausencia de expresión de OCT1, OCT1 (+): presencia de OCT1, MP (+): marcateo de OCT1 localizado en la membrana plasmática, MP (-) marcateo de OCT1 localizado fuera de la membrana plasmática.

4.1.3. Relación entre expresión de OCT1 y respuesta al sorafenib en HCC

Para evaluar si los resultados obtenidos en el análisis inmunohistoquímico eran relevantes desde un punto de vista funcional y para valorar el papel del transportador OCT1 en la sensibilidad al sorafenib analizamos retrospectivamente la respuesta al tratamiento con este fármaco en relación con la abundancia y la localización de OCT1 en la muestra del tumor.

Para ello, se realizaron curvas de Kaplan-Meier para analizar la relación entre la supervivencia de los pacientes y la expresión/localización de OCT1 en las biopsias de HCC. Cuando se estudió la supervivencia de los pacientes en función de que los tumores expresaran o no la proteína OCT1 no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia entre los dos grupos de pacientes (Figura 7A). Se planteó la posibilidad de que el elevado número de tumores que daban señal para OCT1, pero cuya localización era intracelular, podía ser responsable de un artefacto en el análisis.

Puesto que la presencia de la proteína en la membrana plasmática es imprescindible para su función de transporte de sorafenib se realizaron curvas Kaplan-Meier tras separar a los pacientes en función de si presentaban o no el OCT1 localizado correctamente en la membrana plasmática. Como se observa en la Figura 7B, los pacientes en los que el OCT1

estaba localizado en la membrana plasmática de las células tumorales presentaron una mayor supervivencia que los pacientes cuyos tumores presentaban una localización citoplasmática de OCT1, y las diferencias eran significativas.

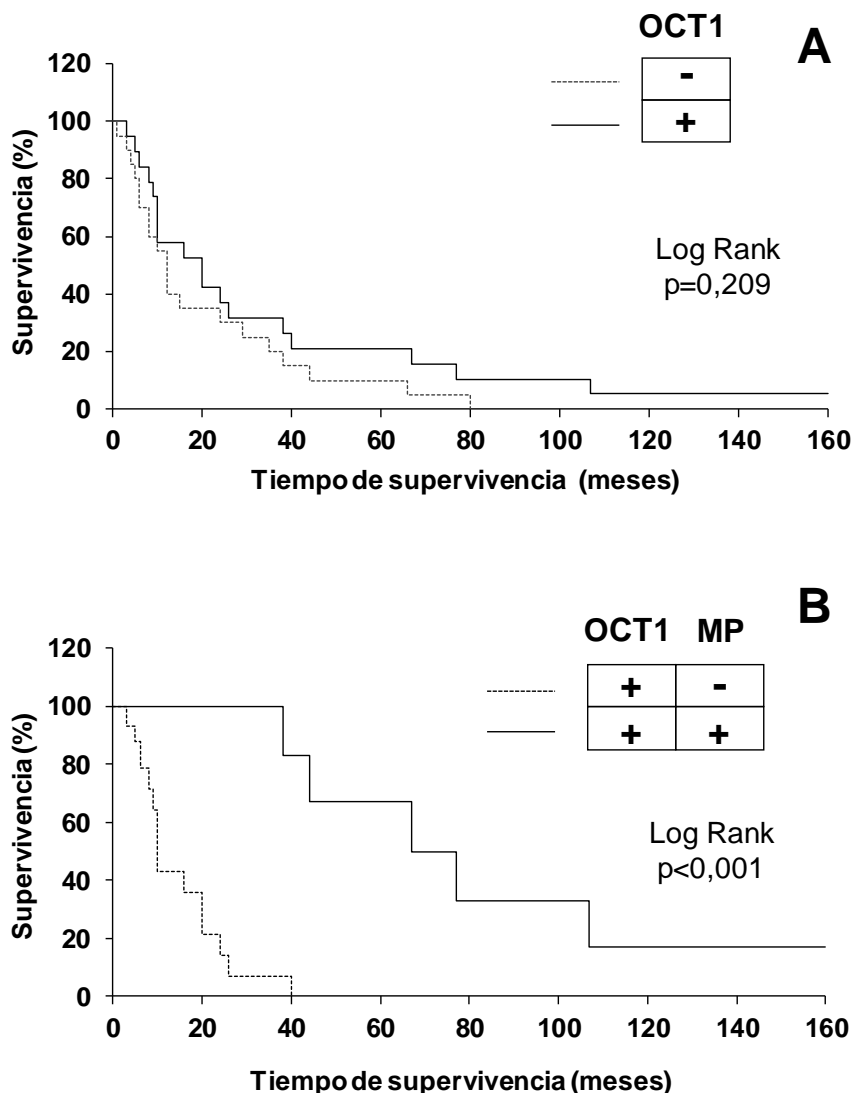


Figura 7. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia expresada como porcentaje de pacientes con HCC tras iniciar el tratamiento con sorafenib. Los pacientes se clasificaron únicamente en base al grado de tinción de OCT1 (A) o teniendo en cuenta también la localización del marcaje de OCT1 en la membrana plasmática (B). Las comparaciones se realizaron por la prueba de Log Rank (Mantel-Cox). (MP: membrana plasmática).

Se obtuvo un resultado similar cuando se analizaron los datos de manera individual mediante una gráfica de tipo “waterfall plot” (Figura 8) para determinar el efecto beneficioso de la expresión y localización de OCT1 en la membrana plasmática sobre la supervivencia global de los pacientes con HCC. Encontramos que los pacientes con tinción positiva de OCT1 en la membrana plasmática estaban entre aquellos que alcanzaron un mayor tiempo de supervivencia.

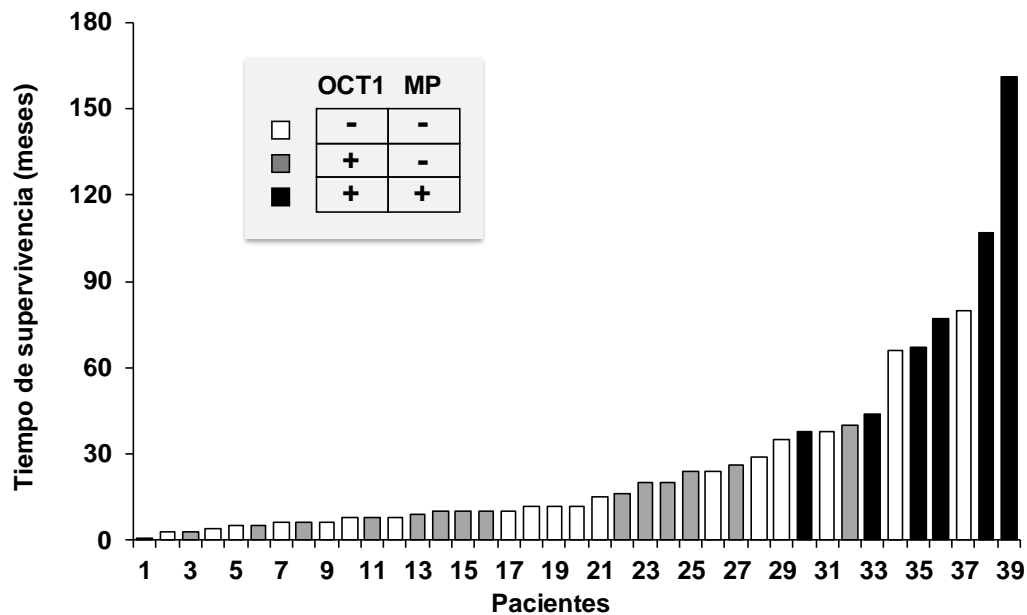


Figura 8. Respuesta clínica al sorafenib en los pacientes con HCC determinada por el tiempo de la supervivencia de los pacientes desde el tratamiento con sorafenib. Los pacientes se clasificaron según el nivel de expresión de OCT1 y la localización de OCT1 en la membrana celular. OCT1 (-): ausencia de expresión de OCT1, OCT1 (+): presencia de OCT1, MP (+): marcaje de OCT1 en la membrana plasmática, MP (-) marcaje de OCT1 localizado fuera de la membrana plasmática.

Es habitual realizar una valoración radiológica para monitorizar la respuesta al tratamiento, sobre todo, para ajustarlo si no hay respuesta. Lo más frecuente es realizarla por ecografía o resonancia magnética nuclear (RMN), que actualmente se considera la prueba más sensible. Aunque no existe un criterio estándar, el más empleado considera que hay: i) Respuesta completa (RC) cuando se consigue hacer desaparecer la lesión; ii) respuesta parcial (RP) cuando hay una reducción del tamaño tumoral de, al menos, un 30% del diámetro de la lesión principal respecto a los basales; iii) progresión de la enfermedad (PE), cuando hay un aumento de, al menos, un 20% del diámetro de la lesión principal respecto a los basales; y iv) enfermedad estable (EE) cuando no se cumplen criterios para catalogarla como respuesta parcial, ni progresión. Tampoco existe un protocolo estándar de cuándo evaluar la respuesta radiológica.

Como fuente de información complementaria se estudió si existía una relación entre la intensidad de expresión y localización de OCT1 en la membrana plasmática y la respuesta al tratamiento analizada por radiología. Como se observa en la Figura 9A, los resultados indicaron que la presencia de OCT1 en la membrana plasmática no parecía correlacionarse con la respuesta radiológica de los pacientes, ya que no se observaron diferencias entre el porcentaje de pacientes con una respuesta parcial o enfermedad estable y los pacientes con enfermedad en progresión y la expresión y/o la localización de OCT1.

Para investigar si la expresión de OCT1 en los tumores de HCC podía modificarse durante la progresión del tumor o debido al tratamiento con TACE se analizó la relación entre el estadio tumoral, categorizado según el sistema de estadificación BCLC (Figura 9B) o el tratamiento con TACE (Figura 9C) y la expresión de OCT1 en la membrana plasmática. Encontramos que ni el estadio tumoral, ni el tratamiento con TACE parecen tener relación con la expresión de OCT1 y su localización en la membrana plasmática.

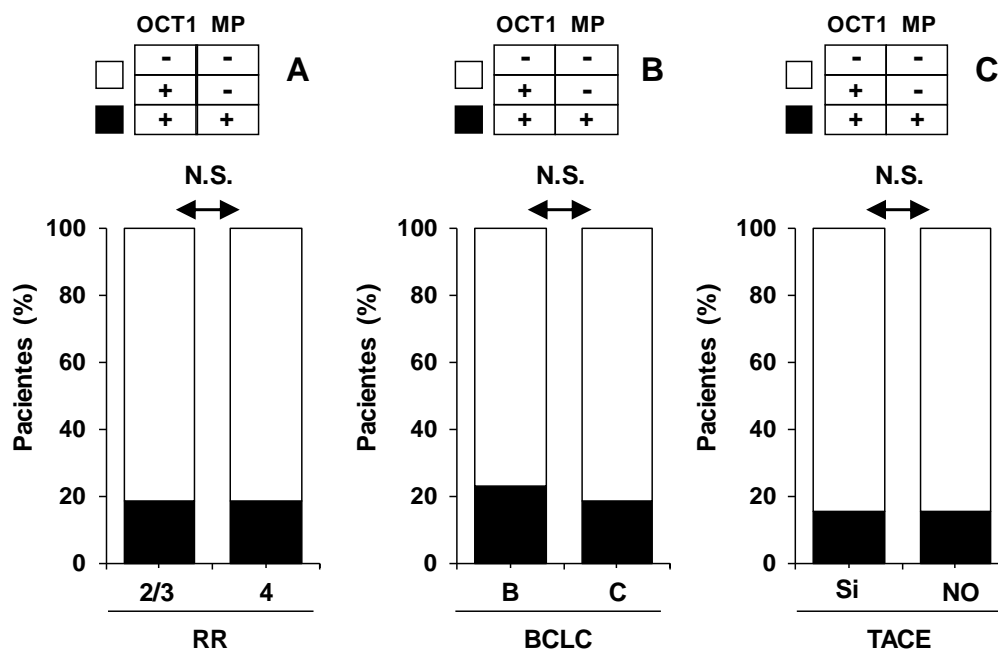
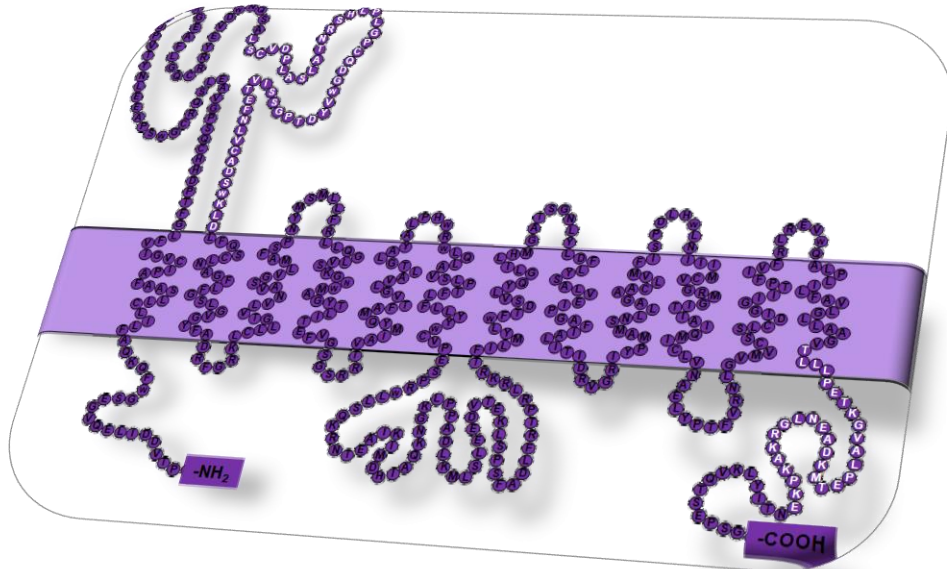


Figura 9. Ausencia de correlación entre la expresión de OCT1 y su localización en la membrana plasmática, y parámetros clínicos comunes, como (A) la respuesta radiológica (RR), codificada como: 1) respuesta total, 2) respuesta parcial, 3) enfermedad estable, 4) progresión de la enfermedad; (B) BCLC estadio B vs. C; (C) tratamiento previo con quimioembolización por catéter transarterial (TACE). N.S.: no significativo, $p > 0,05$ por el test exacto de Fisher.

4.2. PAPEL DE OCT1 EN LA CAPTACIÓN DE SORAFENIB EN TUMORES HEPÁTICOS

Como ya se ha comentado, el sorafenib requiere de sistemas de transporte a través de la membrana plasmática para alcanzar sus dianas intracelulares. Los resultados previos de estudios *in vitro* en nuestro laboratorio demostraron que la proteína OCT1 era capaz de transportar este fármaco (Herraez E *et al.*, 2013) y los datos obtenidos en el estudio retrospectivo en pacientes con HCC tratados con sorafenib (TRANSFER), que se han comentado en el apartado 4.1, apoyan que la proteína OCT1 puede jugar un papel importante en la respuesta de los pacientes a este TKI.



5. Discusión

Los tumores hepáticos primarios, representados principalmente por HCC, CCA y hepatoblastoma, constituyen el quinto tipo de cáncer más frecuente a nivel mundial y la tercera causa de muerte debida al cáncer (Torre LA *et al.*, 2016). Aunque la cirugía es el único tratamiento curativo eficaz, como en la mayoría de los casos el tumor se diagnostica en un estadio avanzado, la resección quirúrgica frecuentemente no puede realizarse. Por otro lado, la quimioterapia disponible no es suficientemente eficaz, mostrando en el mejor de los casos un leve efecto beneficioso sobre la supervivencia de los pacientes (Llovet JM *et al.*, 2008b). Esto también ocurre con el sorafenib, el fármaco de elección para el tratamiento del HCC hasta la fecha, pero cuya eficacia farmacológica es muy limitada (Bruix J *et al.*, 2012) debido al alta quimiorresistencia de las células tumorales.

Varios estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación demostraron que el transportador OCT1 juega un papel importante en la captación de sorafenib, un fármaco que a pH fisiológico es un catión orgánico que no puede difundir libremente a través de la membrana plasmática, sin embargo, la expresión de este transportador en tumores hepáticos está muy disminuida (Martinez-Becerra P *et al.*, 2012; Herraiz E *et al.*, 2013; Namisaki T *et al.*, 2014). Estudios publicados mientras se realizaba esta Tesis Doctoral sugerían que los niveles de expresión de OCT1 (tanto a nivel de ARNm, como de proteínas) podían servir como biomarcador pronóstico de la respuesta al tratamiento sistémico con sorafenib en pacientes con HCC (Grimm D *et al.*, 2016; Namisaki T *et al.*, 2014).

En esta Tesis Doctoral hemos dado un paso más en el estudio de la relación del OCT1 y la respuesta al sorafenib abordando la cuestión de si la presencia del transportador en la membrana plasmática (su localización fisiológica) es un marcador útil para el pronóstico de la respuesta al sorafenib en los pacientes con HCC, y más preciso o eficaz que la evaluación de la expresión al nivel de ARNm o de proteína.

Aunque se ha descrito una correlación entre la expresión de ARNm de OCT1 y la respuesta al sorafenib en HCC (Grimm D *et al.*, 2016), el hecho de que una importante proporción de la expresión de OCT1 sea en forma de proteínas truncadas y/o no funcionales (bien por mecanismos de “splicing” alternativo o por la presencia de SNPs), sugiere que la detección de OCT1 en su localización subcelular funcional, puede ser un método más eficaz para predecir la capacidad de este transportador de participar en la respuesta al sorafenib .

Los resultados obtenidos en el estudio TRANSFER, que llevamos a cabo en colaboración con el Dr. Andreas Geier de la Universidad de Würzburg en Alemania, demostraron que la ausencia de la localización específica del transportador OCT1 en la membrana plasmática se correlaciona con una supervivencia global menos favorable en los pacientes con HCC tratados con sorafenib, incluso aunque el OCT1 tenga una expresión alta en el citoplasma de

las células tumorales, lo que es esperable, puesto que la proteína localizada en el interior celular no contribuye al transporte de sorafenib. Así, la menor entrada del sorafenib en la célula tumoral impide su efecto terapéutico beneficioso.

En nuestro estudio no se encontró una correlación entre la expresión de OCT1 y el estadio del tumor según la clasificación BCLC, sin embargo, en otros estudios, en los que se incluyeron pacientes con estadios menos avanzados, se ha descrito una correlación entre la expresión de OCT1 y el estadio del tumor (Heise M *et al.*, 2012). Es interesante remarcar que, contrariamente a lo descrito por estos autores, en nuestro estudio se observó que el pretratamiento con TACE no afectó a la presencia de OCT1 en la membrana plasmática. Tampoco se encontró una correlación entre la respuesta radiológica y la presencia de OCT1 en la membrana plasmática de las células tumorales, aunque hay que señalar que la respuesta radiológica no es un parámetro muy preciso, ya que no se realiza igual en todos los hospitales. Además, al ser un estudio retrospectivo, en nuestra serie no se disponía de datos de seguimiento de todos los pacientes en los tiempos adecuados.

Nos llamó la atención el hecho de que algunos pacientes con tumores con baja expresión de OCT1 presentaran una respuesta moderada tras el tratamiento con sorafenib. Nuestra hipótesis es que, aunque la expresión de OCT3 (*SLC22A3*) en el tejido hepático sano es mucho menor que la de OCT1, el transportador OCT3 podría reemplazar al OCT1 como principal transportador de cationes orgánicos en algunos casos de HCC. Así, aunque varios análisis de niveles de expresión de ARNm de OCT1 y OCT3 en muestras pareadas de HCC y tejido adyacente no tumoral muestran una caída marcada de ambos transportadores en la mayoría de los casos de HCC, también se ha descrito que en algunos tumores con una expresión drásticamente disminuida de OCT1, la expresión de OCT3 se mantiene o incluso aumenta (Schaeffeler E *et al.*, 2011; Heise M *et al.*, 2012). Por ello, en estos tumores, el transportador OCT3 podría permitir una captación de sorafenib suficiente para obtener concentraciones intracelulares eficaces.

Aunque este estudio se ha centrado en la relación entre la presencia/localización de OCT1 y la respuesta clínica al sorafenib, los resultados obtenidos aquí sugieren que podría ser interesante llevar a cabo investigaciones similares para dilucidar si esta relación también es válida para otros TKI, como el regorafenib, que actualmente se utiliza como segunda opción en los pacientes con HCC que presentan baja tolerancia o mala respuesta al tratamiento con sorafenib, o a otros prometedores inhibidores de MET, como tivantinib y cabozantinib, que actualmente están en evaluación clínica para el tratamiento del HCC (Santoro A *et al.*, 2013).

En el hígado sano la expresión de OCT1, tanto a nivel de ARNm como de proteína, muestra una gran variabilidad interindividual debido, tanto a factores genéticos como no genéticos

(Nies AT *et al.*, 2009), sin embargo, no se conocen con exactitud los mecanismos implicados en la caída de la expresión del OCT1 en los tumores hepáticos (Herraez E *et al.*, 2013, Schaeffeler E *et al.*, 2011). Un aspecto importante de esta Tesis Doctoral ha sido la investigación de los procesos implicados en la baja expresión de OCT1 en los tumores hepáticos.

Para esclarecer el papel de OCT1 en la captación/respuesta al sorafenib se utilizaron modelos experimentales *in vivo* en los cuales se confirmó una marcada caída en la expresión de OCT1 en el tejido tumoral, tanto en el modelo de HCC basado en el de Solt & Farber, como en ratones *Fxr*^{-/-} que desarrollan tumores espontáneamente con la edad, como en el modelo de CCA inducido químicamente por administración crónica de TAA, lo que indica que la caída de OCT1 es una constante en los tumores hepáticos e independiente de la etiología del tumor. Además, se observó una variabilidad interindividual en la expresión de este transportador en el tejido no tumoral en los modelos utilizados de HCC y CCA, y que la caída de OCT1 en el tejido tumoral se relacionaba con una menor captación de sorafenib, lo cual concuerda con los datos clínicos del estudio TRANSFER, que sugieren que la presencia de OCT1 en la membrana plasmática de las células cancerosas se asocia con una mejor respuesta de los pacientes con HCC avanzado tratados con sorafenib.

En cuanto a las razones por las que los tumores presentan una disminución de la expresión de este transportador, se han evaluado varios mecanismos. Primeramente, se evaluó si cambios en la expresión de las proteínas implicadas en la estabilidad del ARNm (RBP de *RNA binding proteins*) podrían ser responsables de la alteración de expresión de OCT1 en el tejido tumoral estimulando mecanismos de aceleración de la degradación del ARNm de OCT1. Sin embargo, los resultados obtenidos a nivel de ARNm de las principales RBPs descartan un posible papel de cambios en su expresión en la disminución de la expresión de OCT1 en HCC y CCA.

Por otro lado, el “splicing” alternativo es otro mecanismo importante en la regulación de la expresión génica. Las desregulaciones en los patrones de “splicing” se han asociado con muchas enfermedades humanas, entre las que se incluye el cáncer. De hecho, varios estudios han demostrado que el “splicing” aberrante de muchos genes, incluido el *SLC22A1* está aumentado en HCC (Herraez E *et al.*, 2013; Tremblay MP *et al.*, 2016) lo que sugiere que el cambio en el perfil global de “splicing” alternativo juega un papel, tanto en la carcinogénesis, como en la alta variabilidad de expresión génica interindividual. En estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo se detectaron variantes de “splicing” aberrantes de OCT1 generadas por la pérdida de uno o más exones y/o la retención de secuencias intrónicas en biopsias de HCC y CCA. Estas formas de ARNm codifican para proteínas

truncadas no funcionales que se acumulan dentro de la célula en lugar de dirigirse a la membrana plasmática (Herraez E *et al.*, 2013). Por ello, la cuantificación del “splicing” de OCT1 puede ser clave para conocer los niveles de transportador funcional. En los estudios realizados en esta Tesis Doctoral se encontró que, además de la reducción en ARNm de OCT1 en el tejido tumoral (tanto HCC como CCA) en comparación con el tejido no tumoral, la proporción de formas de “splicing” aberrante está marcadamente aumentada en los tumores y en el tejido circundante, lo cual contribuye notablemente a una reducción aún mayor de la función de OCT1. Curiosamente, tanto en HCC, como en CCA, la aparición de formas de “splicing” aberrante no estaba estrictamente relacionada con la carcinogénesis, ya que se encontró una proporción similar de “splicing” aberrante en el tejido cirrótico circundante y en el tejido tumoral, sin embargo, estas formas de “splicing” aberrante no se detectaban en el tejido hepático sano.

Uno de los mecanismos que podrían justificar la caída de la expresión de OCT1 en HCC es la metilación del ADN a nivel del promotor de OCT1 (Schaeffeler E *et al.*, 2011). Varios estudios han descrito que la metilación del ADN se modifica en muchas enfermedades, entre ellas el cáncer. También se sabe que una mayor metilación de la zona promotora de genes conduce a una menor expresión de dichos genes. Por ello, se evaluó en este trabajo el papel de la metilación en la disminución de la expresión de OCT1 en los tumores hepáticos. Existían estudios previos que demostraban un aumento en la metilación del gen *SLC22A1* (medida por espectrometría de masas MALDI-TOF) en muestras de HCC (Schaeffeler E *et al.*, 2011), y se había sugerido que el grado de metilación se correlacionaba inversamente con la expresión de OCT1 en estos tumores (Schaeffeler E *et al.*, 2011; Liu D *et al.*, 2017). En esta Tesis Doctoral, el análisis del perfil de metilación y expresión de OCT1 en una serie con un alto número de muestras de HCC confirmó la relación directa entre la metilación del ADN de sitios concretos del gen *SLC22A1* y la expresión de OCT1 en HCC. Además, evaluamos si el mismo fenómeno ocurría en el caso de CCA, y encontramos que de modo similar a lo que ocurría para HCC, en CCA varios sitios del gen *SLC22A1* estaban hipermetilados en comparación con el nivel de metilación del tejido no tumoral circundante, y además existía una relación directa inversa entre metilación y expresión de OCT1.

Puesto que la metilación del gen *SLC22A1* podría ser clave en la disminución del OCT1 en el tejido tumoral, evaluamos el potencial de agentes desmetilantes, como la DAC para la recuperación de la expresión de OCT1 en líneas celulares de HCC y CCA. Nuestros datos demostraron que el tratamiento con DAC inducía un aumento en la expresión de OCT1 en las líneas de HCC y CCA (aunque de modo más marcado en estas últimas), probablemente debido a que la captación celular de DAC se realiza mediante el transportador ENT1

“Equilibrative Nucleoside Transporter” (Ueda K *et al.*, 2015), cuyos niveles de expresión pueden ser muy diferentes en las líneas derivadas de CCA y HCC.

Los agentes inhibidores de la metilación del ADN, como la DAC, se utilizan clínicamente en algunos tipos de cáncer. En este sentido, se ha observado un efecto sinérgico en pacientes con leucemia mieloide aguda que recibieron una combinación de sorafenib y DAC (Muppidi MR *et al.*, 2015). Estos resultados sugieren que podría ser útil investigar si el tratamiento combinado de sorafenib y DAC podría potenciar el efecto antitumoral de la quimioterapia en pacientes con HCC. En cuanto a los agentes inhibidores de histonas desacetilasas, hemos encontrado diferencia en la eficacia de los derivados de butirato y la tricostatina A. Esta diferencia puede ser debida a que el TSA es un HDAI más selectivo que los derivados de butirato, además requiere un sistema de transporte para alcanzar el interior celular (Steliou K *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indican que los microARNs también desempeñan un papel importante en la regulación de la expresión de OCT1. Los cambios de expresión de los microARNs en cáncer se cree que contribuyen a modificar procesos fisiológicos, como la apoptosis o la autofagia, además de promover la carcinogénesis, la progresión tumoral y la metástasis (Kim KM *et al.*, 2014). En biopsias de HCC, se ha descrito una diferencia marcada en el panel de expresión de microARNs entre el tumor y el tejido adyacente no tumoral (Murakami Y *et al.*, 2006). Los microARN también tienen utilidad como biomarcadores. Así, se ha propuesto un grupo de microARNs que pueden ser útiles para predecir la probabilidad de supervivencia general en pacientes con HCC (Liu G *et al.*, 2017). En la última década, el desarrollo de herramientas bioinformáticas ha permitido predecir, realizando análisis *in silico*, los microARNs candidatos para regular un gen concreto o los posibles genes diana de un microARN conocido (Peterson SM *et al.*, 2014). En este trabajo llevamos a cabo una selección de algunos microARNs que mostraban una alta expresión en HCC como posibles reguladores de la expresión de OCT1 utilizando un ensayo *in silico* y aplicando los criterios de la unión entre los microARNs y el gen *SLC22A1*. Los ensayos *in vitro* demostraron que el hsa-mir-330 y el hsa-mir-1468 inducían una reducción de la expresión del OCT1. Se ha descrito una asociación entre el hsa-mir-330 y el cáncer y, en concreto, en los pacientes con HCC el hsa-mir-330 se asocia con peor pronóstico y contribuye a un fenotipo más agresivo del tumor. Por otro lado, se sabe que este microARN parece desempeñar un papel oncogénico en el glioblastoma humano (Qu S *et al.*, 2012), y se ha descrito que está implicado en la respuesta inflamatoria (Gu TT *et al.*, 2017).

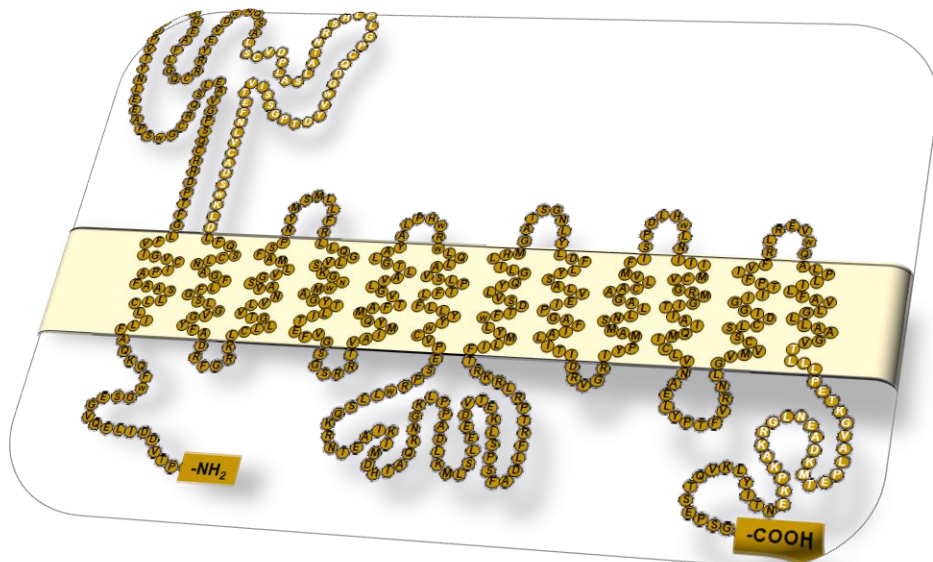
En cuanto al hsa-mir-1468, que también mostró tener un efecto inhibitorio sobre la expresión del OCT1, varias publicaciones lo vinculan con procesos tumorales, así ha sido considerado

un biomarcador para la determinación de la supervivencia en pacientes con HCC (Liu G *et al.*, 2017) y con adenocarcinoma de pulmón (Lin K *et al.*, 2016). Respecto a la relación del hsa-mir-141 con el CCA, los datos disponibles son muy dispares. Su expresión se ha encontrado elevada en algunos estudios, mientras que en otros se describe una reducción (Li Z *et al.*, 2017). La controversia se encuentra también en cuanto a su papel en el HCC, es decir, mientras que algunos estudios le achacan un papel antitumoral (Lou G *et al.*, 2016), otros autores sugieren su implicación en la resistencia a fármacos como el 5-FU (PMID: 25896253, Shi L *et al.*, 2015). Nuestros datos apoyan el concepto de que el aumento de hsa-mir-141, tanto en HCC como en CCA, podría estar implicado en el descenso de la expresión de OCT1.

En resumen, una menor expresión de OCT1 en HCC y CCA, debida en parte al “splicing” aberrante, factores epigenéticos como la metilación de ADN y una degradación de ARNm mediada por microARNs, da como resultado una disminución de la captación de sorafenib por las células tumorales y, por tanto, una reducción de la concentración del fármaco que alcanza su sitio de acción intracelular. Por ello, aumentar la expresión y/o función de OCT1 constituye un objetivo interesante para sensibilizar el HCC y CCA al efecto farmacológico del sorafenib y, probablemente, de otros TKIs que también puedan ser sustratos del transportador OCT1. En esta Tesis Doctoral se ha demostrado que la expresión estable de OCT1 en células de HCC mediante vectores lentivirales no afecta al crecimiento tumoral pero aumenta, tanto la captación, como la respuesta al tratamiento con sorafenib *in vitro* e *in vivo*, lo que indica que la restauración de la expresión de OCT1 en los tumores hepatobiliares puede ser una estrategia terapéutica para aumentar la sensibilidad de estos tumores al sorafenib.

Hay que tener en cuenta que la actividad farmacológica del sorafenib puede verse reducida por otros mecanismos de quimiorresistencia adicionales a la menor captación por descenso de la expresión de OCT1 (Marin JJ *et al.*, 2010). Así, en estudios *in vitro* con células de hepatoma se ha descrito quimiorresistencia al sorafenib mediada por los transportadores de eflujo MRP3 (Tomonari T *et al.*, 2016) y BCRP (Namisaki T *et al.*, 2014).

Además de la quimiorresistencia al sorafenib mediada por proteínas transportadoras (tanto de entrada como de eflujo celular) se han descrito otros mecanismos que contribuyen a la quimiorresistencia como la activación de las quinasas RAF y la vía PI3K/AKT (Dash S *et al.*, 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research. 2015). Se sabe que otros factores como un cross-talk entre PI3K/AKT y JAK-STAT, activación de rutas inducibles por hipoxia y el fenotipo de transmisión epitelio-mesenquimal están relacionadas con la resistencia a este fármaco en pacientes con HCC (Hankey G. J *et al.*, 1990).



6. Conclusiones

CONCLUSIÓN PRIMERA:

La presencia del OCT1 en la membrana plasmática de las células tumorales hepáticas es mejor marcador pronóstico de la respuesta al sorafenib que la determinación en el tumor de los niveles de ARNm o proteínas de este transportador.

CONCLUSIÓN SEGUNDA:

La disminución de la expresión del OCT1 en los tumores hepáticos que hemos observado en modelos experimentales *in vivo*, tanto de HCC como de CCA, se acompaña de una menor acumulación de sorafenib en los tumores en comparación con el tejido adyacente no tumoral, que presenta una mayor expresión de este transportador. Por ello, podemos sugerir que OCT1 constituye un mecanismo de quimiorresistencia para el sorafenib y otros fármacos que sean sustratos de este transportador.

CONCLUSIÓN TERCERA:

La sobre-expresión de OCT1 en células derivadas de HCC, les confiere una mayor capacidad para captar sorafenib, y potencia su sensibilidad a este fármaco. Asimismo, en el modelo *in vivo* de implante subcutáneo en ratones inmunodeficientes los tumores hepatocelulares con sobre-expresión de OCT1 presentan una mejor respuesta antitumoral al tratamiento con sorafenib que los tumores con baja expresión de esta proteína transportadora.

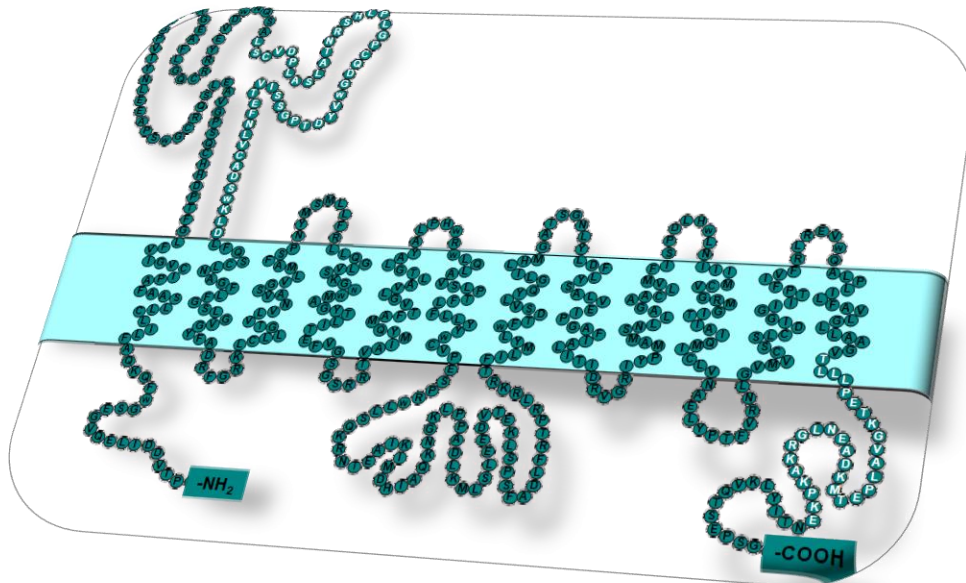
CONCLUSIÓN CUARTA:

La disminución de la expresión de OCT1 en tumores hepáticos, tanto HCC como CCA, es debida a mecanismos epigenéticos, como la hipermetilación del promotor del gen *SLC22A1*, y al papel de ciertos microARNs como el hsa-mir-330; mientras que la actividad de las histonas desacetilasas parece tener un papel menos relevante en la modulación de la expresión de este transportador.

CONCLUSIÓN QUINTA:

El “splicing” aberrante, que se presenta con frecuencia en los tumores hepáticos, y sorprendentemente también en el tejido circundante al tumor, también es responsable de la baja actividad del transportador OCT1 en los tumores hepáticos, ya que genera proteínas

truncadas no funcionales. Sin embargo, las evidencias disponibles sobre las proteínas que modulan la estabilidad/degradación del ARNm no apoyan, pero tampoco descartan, su papel en la regulación de la expresión del OCT1 en estos tumores.



6. BIBLIOGRAFÍA

(1995). "Terminology of nodular hepatocellular lesions." *Hepatology* 22(3): 983-993. (International Working Party).

(2008). "Moving AHEAD with an international human epigenome project." *Nature* 454(7205): 711-715. (American Association for Cancer Research Human Epigenome Task Force).

Abou-Alfa, G. K., L. Schwartz, S. Ricci, D. Amadori, A. Santoro, A. Figer, J. De Greve, J. Y. Douillard, C. Lathia, B. Schwartz, I. Taylor, M. Moscovici and L. B. Saltz (2006). "Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma." *J Clin Oncol* 24(26): 4293-4300.

Alberts, S. R., G. J. Gores, G. P. Kim, L. R. Roberts, M. L. Kendrick, C. B. Rosen, S. T. Chari and J. A. Martenson (2007). "Treatment options for hepatobiliary and pancreatic cancer." *Mayo Clin Proc* 82(5): 628-637.

Alpini G, Prall R, LaRusso NF (2001). *The liver; biology & photobiology*; 4th edition Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.

Andersen, J. B., B. Spee, B. R. Blechacz, I. Avital, M. Komuta, A. Barbour, E. A. Conner, M. C. Gillen, T. Roskams, L. R. Roberts, V. M. Factor and S. S. Thorgeirsson (2012). "Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors." *Gastroenterology* 142(4): 1021-1031 e1015.

Annunziata, S., C. Caldarella, D. A. Pizzuto, F. Galiandro, R. Sadeghi, L. Giovannella and G. Treglia (2014). "Diagnostic accuracy of fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the evaluation of the primary tumor in patients with cholangiocarcinoma: a meta-analysis." *Biomed Res Int* 2014: 247693.

Aoki, K., K. Takayasu, T. Kawano, Y. Muramatsu, N. Moriyama, F. Wakao, J. Yamamoto, K. Shimada, T. Takayama, T. Kosuge and et al. (1993). "Combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma: clinical features and computed tomographic findings." *Hepatology* 18(5): 1090-1095.

Audic, Y. and R. S. Hartley (2004). "Post-transcriptional regulation in cancer." *Biol Cell* 96(7): 479-498.

Bakheet, T., B. R. Williams and K. S. Khabar (2006). "ARED 3.0: the large and diverse AU-rich transcriptome." *Nucleic Acids Res* 34(Database issue): D111-114.

Banales, J. M., V. Cardinale, G. Carpino, M. Marzioni, J. B. Andersen, P. Invernizzi, G. E. Lind, T. Folseraas, S. J. Forbes, L. Fouassier, A. Geier, D. F. Calvisi, J. C. Mertens, M. Trauner, A. Benedetti, L. Maroni, J. Vaquero, R. I. Macias, C. Raggi, M. J. Perugorria, E. Gaudio, K. M. Boberg, J. J. Marin and D. Alvaro (2016). "Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA)." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13(5): 261-280.

Bannister, A. J. and T. Kouzarides (2011). "Regulation of chromatin by histone modifications." *Cell Res* 21(3): 381-395.

Bayer, M., Z. Kuci, E. Schomig, D. Grundemann, H. Dittmann, R. Handgretinger and G. Bruchelt (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(3): 287-294.

- Ben Hassine, I., H. Gharbi, I. Soltani, M. Teber, A. Farrah, H. Ben Hadj Othman, H. Amouri, H. Bellaaj, R. B. Lakhal, N. B. Romdhane, S. Abbes and S. Menif (2017). "hOCT1 gene expression predict for optimal response to Imatinib in Tunisian patients with chronic myeloid leukemia." *Cancer Chemother Pharmacol* 79(4): 737-745.
- Benedetti, A., C. Bassotti, K. Rapino, L. Marucci and A. M. Jezequel (1996). "A morphometric study of the epithelium lining the rat intrahepatic biliary tree." *J Hepatol* 24(3): 335-342.
- Bengala, C., F. Bertolini, N. Malavasi, C. Boni, E. Aitini, C. Dealis, S. Zironi, R. Depenni, A. Fontana, C. Del Giovane, G. Luppi and P. Conte (2010). "Sorafenib in patients with advanced biliary tract carcinoma: a phase II trial." *Br J Cancer* 102(1): 68-72.
- Benson, A. B., 3rd (2007). "Epidemiology, disease progression, and economic burden of colorectal cancer." *J Manag Care Pharm* 13(6 Suppl C): S5-18.
- Blechacz, B. and G. J. Gores (2008). "Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment." *Hepatology* 48(1): 308-321.
- Boehm, L. M., T. T. Jayakrishnan, J. T. Miura, A. J. Zacharias, F. M. Johnston, K. K. Turaga and T. C. Gamblin (2015). "Comparative effectiveness of hepatic artery based therapies for unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma." *J Surg Oncol* 111(2): 213-220.
- Bolondi, L., A. Craxi, F. Trevisani, B. Daniele, G. G. Di Costanzo, S. Fagioli, C. Camma, P. Bruzzi, R. Danesi, F. Spandonaro, C. Boni, A. Santoro and M. Colombo (2015). "Refining sorafenib therapy: lessons from clinical practice." *Future Oncol* 11(3): 449-465.
- Borad, M. J., G. J. Gores and L. R. Roberts (2015). "Fibroblast growth factor receptor 2 fusions as a target for treating cholangiocarcinoma." *Curr Opin Gastroenterol* 31(3): 264-268.
- Borchert, G. M., W. Lanier and B. L. Davidson (2006). "RNA polymerase III transcribes human microRNAs." *Nat Struct Mol Biol* 13(12): 1097-1101.
- Botta, F., E. Giannini, P. Romagnoli, A. Fasoli, F. Malfatti, B. Chiarbonello, E. Testa, D. Risso, G. Colla and R. Testa (2003). "MELD scoring system is useful for predicting prognosis in patients with liver cirrhosis and is correlated with residual liver function: a European study." *Gut* 52(1): 134-139.
- Briz O, Perez M.J, Marin JJ. (2017) "Further understanding of mechanisms involved in liver cancer chemoresistance" *Hepatoma Res* (3):22-26
- Bruix, J., A. L. Cheng, G. Meinhardt, K. Nakajima, Y. De Sanctis and J. Llovet (2017). "Prognostic factors and predictors of sorafenib benefit in patients with hepatocellular carcinoma: Analysis of two phase III studies." *J Hepatol* 67(5): 999-1008.
- Bruix, J., J. L. Raoul, M. Sherman, V. Mazzaferro, L. Bolondi, A. Craxi, P. R. Galle, A. Santoro, M. Beaugrand, A. Sangiovanni, C. Porta, G. Gerken, J. A. Marrero, A. Nadel, M. Shan, M. Moscovici, D. Voliotis and J. M. Llovet (2012). "Efficacy and safety of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: subanalyses of a phase III trial." *J Hepatol* 57(4): 821-829.
- Bruix, J. and M. Sherman (2005). "Management of hepatocellular carcinoma." *Hepatology* 42(5): 1208-1236.
- Bruix, J., M. Sherman, J. M. Llovet, M. Beaugrand, R. Lencioni, A. K. Burroughs, E. Christensen, L. Pagliaro, M. Colombo and J. Rodes (2001). "Clinical management of

hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver." *J Hepatol* 35(3): 421-430.

Bruix, J., W. Y. Tak, A. Gasbarrini, A. Santoro, M. Colombo, H. Y. Lim, V. Mazzaferro, R. Wiest, M. Reig, A. Wagner and L. Bolondi (2013). "Regorafenib as second-line therapy for intermediate or advanced hepatocellular carcinoma: multicentre, open-label, phase II safety study." *Eur J Cancer* 49(16): 3412-3419.

Campbell, P. M. and C. J. Der (2004). "Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis." *Semin Cancer Biol* 14(2): 105-114.

Cardinale, V., G. Carpino, L. Reid, E. Gaudio and D. Alvaro (2012). "Multiple cells of origin in cholangiocarcinoma underlie biological, epidemiological and clinical heterogeneity." *World J Gastrointest Oncol* 4(5): 94-102.

Carthew, R. W. and E. J. Sontheimer (2009). "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs." *Cell* 136(4): 642-655.

Castell, J. V., R. Jover, C. P. Martinez-Jimenez and M. J. Gomez-Lechon (2006). "Hepatocyte cell lines: their use, scope and limitations in drug metabolism studies." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2(2): 183-212.

Chandra, P. and K. L. Brouwer (2004). "The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts." *Pharm Res* 21(5): 719-735.

Chang, L., Y. Wang, J. Zhang and T. Guo (2017). "The best strategy for HCC patients at each BCLC stage: a network meta-analysis of observational studies." *Oncotarget* 8(12): 20418-20427.

Chan-On, W., M. L. Nairismagi, C. K. Ong, W. K. Lim, S. Dima, C. Pairojkul, K. H. Lim, J. R. McPherson, I. Cutcutache, H. L. Heng, L. Ooi, A. Chung, P. Chow, P. C. Cheow, S. Y. Lee, S. P. Choo, I. B. Tan, D. Duda, A. Nastase, S. S. Myint, B. H. Wong, A. Gan, V. Rajasegaran, C. C. Ng, S. Nagarajan, A. Jusakul, S. Zhang, P. Vohra, W. Yu, D. Huang, P. Sithithaworn, P. Yongvanit, S. Wongkham, N. Khuntikeo, V. Bhudhisawasdi, I. Popescu, S. G. Rozen, P. Tan and B. T. Teh (2013). "Exome sequencing identifies distinct mutational patterns in liver fluke-related and non-infection-related bile duct cancers." *Nat Genet* 45(12): 1474-1478.

Chen, C. H., M. C. Chen, J. C. Wang, A. C. Tsai, C. S. Chen, J. P. Liou, S. L. Pan and C. M. Teng (2014). "Synergistic interaction between the HDAC inhibitor, MPT0E028, and sorafenib in liver cancer cells in vitro and in vivo." *Clin Cancer Res* 20(5): 1274-1287.

Chen, L., Y. Shu, X. Liang, E. C. Chen, S. W. Yee, A. A. Zur, S. Li, L. Xu, K. R. Keshari, M. J. Lin, H. C. Chien, Y. Zhang, K. M. Morrissey, J. Liu, J. Ostrem, N. S. Younger, J. Kurhanewicz, K. M. Shokat, K. Ashrafi and K. M. Giacomini (2014). "OCT1 is a high-capacity thiamine transporter that regulates hepatic steatosis and is a target of metformin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(27): 9983-9988.

Cheng, A. L., Y. K. Kang, Z. Chen, C. J. Tsao, S. Qin, J. S. Kim, R. Luo, J. Feng, S. Ye, T. S. Yang, J. Xu, Y. Sun, H. Liang, J. Liu, J. Wang, W. Y. Tak, H. Pan, K. Burock, J. Zou, D. Voliotis and Z. Guan (2009). "Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial." *Lancet Oncol* 10(1): 25-34.

Cheng, A. L., Y. K. Kang, D. Y. Lin, J. W. Park, M. Kudo, S. Qin, H. C. Chung, X. Song, J. Xu, G. Poggi, M. Omata, S. Pitman Lowenthal, S. Lanzalone, L. Yang, M. J. Lechuga and E.

Raymond (2013). "Sunitinib versus sorafenib in advanced hepatocellular cancer: results of a randomized phase III trial." *J Clin Oncol* 31(32): 4067-4075.

Chien, M. H., W. J. Lee, Y. C. Yang, Y. L. Li, B. R. Chen, T. Y. Cheng, P. W. Yang, M. Y. Wang, Y. H. Jan, Y. K. Lin, J. M. Lee, M. Hsiao, J. S. Chen and K. T. Hua (2017). "KSRP suppresses cell invasion and metastasis through miR-23a-mediated EGR3 mRNA degradation in non-small cell lung cancer." *Biochim Biophys Acta* 1860(10): 1013-1024.

Choi, S. B., K. S. Kim, J. Y. Choi, S. W. Park, J. S. Choi, W. J. Lee and J. B. Chung (2009). "The prognosis and survival outcome of intrahepatic cholangiocarcinoma following surgical resection: association of lymph node metastasis and lymph node dissection with survival." *Ann Surg Oncol* 16(11): 3048-3056.

Ciarimboli, G. and E. Schlatter (2005). "Regulation of organic cation transport." *Pflugers Arch* 449(5): 423-441.

Ciarimboli, G., K. Struwe, P. Arndt, V. Gorboulev, H. Koepsell, E. Schlatter and J. R. Hirsch (2004). "Regulation of the human organic cation transporter hOCT1." *J Cell Physiol* 201(3): 420-428.

Dai, W., G. Zhang and E. V. Makeyev (2012). "RNA-binding protein HuR autoregulates its expression by promoting alternative polyadenylation site usage." *Nucleic Acids Res* 40(2): 787-800.

Darwish Murad, S., W. R. Kim, T. Therneau, G. J. Gores, C. B. Rosen, J. A. Martenson, S. R. Alberts and J. K. Heimbach (2012). "Predictors of pretransplant dropout and posttransplant recurrence in patients with perihilar cholangiocarcinoma." *Hepatology* 56(3): 972-981.

Dash S, Chava S, Chandra PK, Panigrahi R, Ferraris PK, Liu J, Chang H, Buell J, Marin JJ. "Organic Cation Transporter-1 (OCT1) dependent and independent mechanisms of sorafenib resistance in human hepatocellular carcinomas." *Proceedings of the 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research*. 2015:132-133.

De Lope, C. R., S. Tremosini, A. Forner, M. Reig and J. Bruix (2012). "Management of HCC." *J Hepatol* 56 Suppl 1: S75-87.

Dimitroulis, D., C. Damaskos, S. Valsami, S. Davakis, N. Garmpis, E. Spartalis, A. Athanasiou, D. Moris, S. Sakellariou, S. Kykalos, G. Tsourouflis, A. Garmpi, I. Delladetsima, K. Kontzoglou and G. Kouraklis (2017). "From diagnosis to treatment of hepatocellular carcinoma: An epidemic problem for both developed and developing world." *World J Gastroenterol* 23(29): 5282-5294.

El-Khoueiry, A. B., C. J. Rankin, E. Ben-Josef, H. J. Lenz, P. J. Gold, R. D. Hamilton, R. Govindarajan, C. Eng and C. D. Blanke (2012). "SWOG 0514: a phase II study of sorafenib in patients with unresectable or metastatic gallbladder carcinoma and cholangiocarcinoma." *Invest New Drugs* 30(4): 1646-1651.

Escudier, B., N. Lassau, E. Angevin, J. C. Soria, L. Chami, M. Lamuraglia, E. Zafarana, V. Landreau, B. Schwartz, E. Brendel, J. P. Armand and C. Robert (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(6): 1801-1809.

Esquela-Kerscher, A. and F. J. Slack (2006). "Oncomirs - microRNAs with a role in cancer." *Nat Rev Cancer* 6(4): 259-269.

- Esteller, M. (2008). "Epigenetics in cancer." *N Engl J Med* 358(11): 1148-1159.
- Esteller, M., P. G. Corn, S. B. Baylin and J. G. Herman (2001). "A gene hypermethylation profile of human cancer." *Cancer Res* 61(8): 3225-3229.
- Evans, W. H. (1980). "A biochemical dissection of the functional polarity of the plasma membrane of the hepatocyte." *Biochim Biophys Acta* 604(1): 27-64.
- Facciorusso, A., M. Di Maso and N. Muscatiello (2016). "Microwave ablation versus radiofrequency ablation for the treatment of hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis." *Int J Hyperthermia* 32(3): 339-344.
- Farazi, P. A. and R. A. DePinho (2006). "Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment." *Nat Rev Cancer* 6(9): 674-687.
- Farhat, M. H., A. I. Shamseddine, A. N. Tawil, G. Berjawi, C. Sidani, W. Shamseddeen and K. A. Barada (2008). "Prognostic factors in patients with advanced cholangiocarcinoma: role of surgery, chemotherapy and body mass index." *World J Gastroenterol* 14(20): 3224-3230.
- Fernandez, A. F., Y. Assenov, J. I. Martin-Subero, B. Balint, R. Siebert, H. Taniguchi, H. Yamamoto, M. Hidalgo, A. C. Tan, O. Galm, I. Ferrer, M. Sanchez-Cespedes, A. Villanueva, J. Carmona, J. V. Sanchez-Mut, M. Berdasco, V. Moreno, G. Capella, D. Monk, E. Ballestar, S. Ropero, R. Martinez, M. Sanchez-Carbayo, F. Prosper, X. Agirre, M. F. Fraga, O. Grana, L. Perez-Jurado, J. Mora, S. Puig, J. Prat, L. Badimon, A. A. Puca, S. J. Meltzer, T. Lengauer, J. Bridgewater, C. Bock and M. Esteller (2012). "A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples." *Genome Res* 22(2): 407-419.
- Fernandez-Ramos, D. and M. L. Martinez-Chantar (2015). "NEDDylation in liver cancer: The regulation of the RNA binding protein Hu antigen R." *Pancreatology* 15(4 Suppl): S49-54.
- Ferrara, N. (2004). "Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress." *Endocr Rev* 25(4): 581-611.
- Fialova, B., P. Luzna, J. Gursky, K. Langova, Z. Kolar and K. S. Trtkova (2016). "Epigenetic modulation of AR gene expression in prostate cancer DU145 cells with the combination of sodium butyrate and 5'-Aza-2'-deoxycytidine." *Oncol Rep* 36(4): 2365-2374.
- Fraga, M. F., E. Ballestar, A. Villar-Garea, M. Boix-Chornet, J. Espada, G. Schotta, T. Bonaldi, C. Haydon, S. Ropero, K. Petrie, N. G. Iyer, A. Perez-Rosado, E. Calvo, J. A. Lopez, A. Cano, M. J. Calasanz, D. Colomer, M. A. Piris, N. Ahn, A. Imhof, C. Caldas, T. Jenuwein and M. Esteller (2005). "Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer." *Nat Genet* 37(4): 391-400.
- Gao, J. J., Z. Y. Shi, J. F. Xia, Y. Inagaki and W. Tang (2015). "Sorafenib-based combined molecule targeting in treatment of hepatocellular carcinoma." *World J Gastroenterol* 21(42): 12059-12070.
- Geier, A., R. I. Macias, D. Bettinger, J. Weiss, H. Bantel, D. Jahn, R. Al-Abdulla and J. J. Marin (2017). "The lack of the organic cation transporter OCT1 at the plasma membrane of tumor cells precludes a positive response to sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma." *Oncotarget* 8(9): 15846-15857.
- Geissler, R. and A. Grimson (2016). "A position-specific 3'UTR sequence that accelerates mRNA decay." *RNA Biol* 13(11): 1075-1077.

- Ghanaati, H., S. M. Alavian, A. Jafarian, N. Ebrahimi Daryani, M. Nassiri-Toosi, A. H. Jalali and M. Shakiba (2012). "Imaging and Imaging-Guided Interventions in the Diagnosis and Management of Hepatocellular Carcinoma (HCC)-Review of Evidence." *Iran J Radiol* 9(4): 167-177.
- Ghouri, Y. A., I. Mian and J. H. Rowe (2017). "Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis." *J Carcinog* 16: 1.
- Goncalves, V., J. F. S. Pereira and P. Jordan (2017). "Signaling Pathways Driving Aberrant Splicing in Cancer Cells." *Genes (Basel)* 9(1).
- Gorboulev, V., J. C. Ulzheimer, A. Akhoundova, I. Ulzheimer-Teuber, U. Karbach, S. Quester, C. Baumann, F. Lang, A. E. Busch and H. Koepsell (1997). "Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters." *DNA Cell Biol* 16(7): 871-881.
- Gores, G. J. (2000). "Early detection and treatment of cholangiocarcinoma." *Liver Transpl* 6(6 Suppl 2): S30-34.
- Gregory, R. I., K. P. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch and R. Shiekhattar (2004). "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." *Nature* 432(7014): 235-240.
- Grimm, D., J. Lieb, V. Weyer, J. Vollmar, F. Darstein, A. Lautem, M. Hoppe-Lotichius, S. Koch, A. Schad, J. M. Schattenberg, M. A. Worns, A. Weinmann, P. R. Galle and T. Zimmermann (2016). "Organic Cation Transporter 1 (OCT1) mRNA expression in hepatocellular carcinoma as a biomarker for sorafenib treatment." *BMC Cancer* 16: 94.
- Gu, J., Z. Wang, M. Xiao, X. Mao, L. Zhu, Y. Wang and W. Huang (2017). "Chronic myelomonocytic leukemia with double-mutations in DNMT3A and FLT3-ITD treated with decitabine and sorafenib." *Cancer Biol Ther* 18(11): 843-849.
- Gu, T. T., L. Song, T. Y. Chen, X. Wang, X. J. Zhao, X. Q. Ding, Y. Z. Yang, Y. Pan, D. M. Zhang and L. D. Kong (2017). "Fructose downregulates miR-330 to induce renal inflammatory response and insulin signaling impairment: Attenuation by morin." *Mol Nutr Food Res* 61(8).
- Gupta, S., G. Wulf, M. Henjakovic, H. Koepsell, G. Burckhardt and Y. Hagos (2012). "Human organic cation transporter 1 is expressed in lymphoma cells and increases susceptibility to irinotecan and paclitaxel." *J Pharmacol Exp Ther* 341(1): 16-23.
- Hankey, G. J. (1990). "Benign recurrent unilateral abducens nerve palsy." *Aust N Z J Med* 20(2): 173-174.
- Guyton A (2000). *Textbook of medical physiology*.
- Han, T. K., R. S. Everett, W. R. Proctor, C. M. Ng, C. L. Costales, K. L. Brouwer and D. R. Thakker (2013). "Organic cation transporter 1 (OCT1/mOct1) is localized in the apical membrane of Caco-2 cell monolayers and enterocytes." *Mol Pharmacol* 84(2): 182-189.
- Hartmann, J. T., M. Haap, H. G. Kopp and H. P. Lipp (2009). "Tyrosine kinase inhibitors - a review on pharmacology, metabolism and side effects." *Curr Drug Metab* 10(5): 470-481.
- Hayer, M., H. Bonisch and M. Bruss (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(Pt 6): 473-482.

- He, L. and G. J. Hannon (2004). "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation." *Nat Rev Genet* 5(7): 522-531.
- Hediger, M. A., B. Clemençon, R. E. Burrier and E. A. Bruford (2013). "The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction." *Mol Aspects Med* 34(2-3): 95-107.
- Heise, M., A. Lautem, J. Knapstein, J. M. Schattenberg, M. Hoppe-Lotichius, D. Foltys, N. Weiler, A. Zimmermann, A. Schad, D. Grundemann, G. Otto, P. R. Galle, M. Schuchmann and T. Zimmermann (2012). "Downregulation of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) in human hepatocellular carcinoma and their prognostic significance." *BMC Cancer* 12: 109.
- Herman, J. G. and S. B. Baylin (2003). "Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation." *N Engl J Med* 349(21): 2042-2054.
- Herraez, E., E. Lozano, R. I. Macias, J. Vaquero, L. Bujanda, J. M. Banales, J. J. Marin and O. Briz (2013). "Expression of SLC22A1 variants may affect the response of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma to sorafenib." *Hepatology* 58(3): 1065-1073.
- Higgins G.H, R.M Anderson (1931) "Experimental pathology of liver I. Restoration of liver of white rats following partial surgical removal." *Arch. Path* 12: 186-202.
- Holliday, R. and J. E. Pugh (1975). "DNA modification mechanisms and gene activity during development." *Science* 187(4173): 226-232.
- Hsu, F. T., Y. C. Liu, I. T. Chiang, R. S. Liu, H. E. Wang, W. J. Lin and J. J. Hwang (2014). "Sorafenib increases efficacy of vorinostat against human hepatocellular carcinoma through transduction inhibition of vorinostat-induced ERK/NF-kappaB signaling." *Int J Oncol* 45(1): 177-188.
- Huang, Y., P. Anderle, K. J. Bussey, C. Barbacioru, U. Shankavaram, Z. Dai, W. C. Reinhold, A. Papp, J. N. Weinstein and W. Sadee (2004). "Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance." *Cancer Res* 64(12): 4294-4301.
- Huether, A., M. Hopfner, V. Baradari, D. Schuppan and H. Scherubl (2007). "Sorafenib alone or as combination therapy for growth control of cholangiocarcinoma." *Biochem Pharmacol* 73(9): 1308-1317.
- Hyrsova, L., T. Smutny, A. Carazo, S. Moravcik, J. Mandikova, F. Trejtnar, S. Gerbal-Chaloin and P. Pavek (2016a). "The pregnane X receptor down-regulates organic cation transporter 1 (SLC22A1) in human hepatocytes by competing for ("squenching") SRC-1 coactivator." *Br J Pharmacol* 173(10): 1703-1715.
- Hyrsova, L., T. Smutny, F. Trejtnar and P. Pavek (2016b). "Expression of organic cation transporter 1 (OCT1): unique patterns of indirect regulation by nuclear receptors and hepatospecific gene regulation." *Drug Metab Rev* 48(2): 139-158.
- Ingoglia, F., R. Visigalli, B. M. Rotoli, A. Barilli, B. Riccardi, P. Puccini and V. Dall'Asta (2015). "Functional characterization of the organic cation transporters (OCTs) in human airway pulmonary epithelial cells." *Biochim Biophys Acta* 1848(7): 1563-1572.
- Iorio, M. V. and C. M. Croce (2012). "MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review." *EMBO Mol Med* 4(3): 143-159.

- Ishii, M., B. Vroman and N. F. LaRusso (1989). "Isolation and morphologic characterization of bile duct epithelial cells from normal rat liver." *Gastroenterology* 97(5): 1236-1247.
- Itoda, M., Y. Saito, K. Maekawa, H. Hichiya, K. Komamura, S. Kamakura, M. Kitakaze, H. Tomoike, K. Ueno, S. Ozawa and J. Sawada (2004). "Seven novel single nucleotide polymorphisms in the human SLC22A1 gene encoding organic cation transporter 1 (OCT1)." *Drug Metab Pharmacokinet* 19(4): 308-312.
- Ji, J., J. Shi, A. Budhu, Z. Yu, M. Forgues, S. Roessler, S. Ambs, Y. Chen, P. S. Meltzer, C. M. Croce, L. X. Qin, K. Man, C. M. Lo, J. Lee, I. O. Ng, J. Fan, Z. Y. Tang, H. C. Sun and X. W. Wang (2009). "MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer." *N Engl J Med* 361(15): 1437-1447.
- Jiao, W., J. Zhao, M. Wang, Y. Wang, Y. Luo, Y. Zhao, D. Tang and Y. Shen (2013). "CUG-binding protein 1 (CUGBP1) expression and prognosis of non-small cell lung cancer." *Clin Transl Oncol* 15(10): 789-795.
- Jimeno-Gonzalez, S., L. Payan-Bravo, A. M. Munoz-Cabello, M. Guijo, G. Gutierrez, F. Prado and J. C. Reyes (2015). "Defective histone supply causes changes in RNA polymerase II elongation rate and cotranscriptional pre-mRNA splicing." *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(48): 14840-14845.
- Jones, K., L. Timchenko and N. A. Timchenko (2012). "The role of CUGBP1 in age-dependent changes of liver functions." *Ageing Res Rev* 11(4): 442-449.
- Jones, P. A. (2012). "Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond." *Nat Rev Genet* 13(7): 484-492.
- Jones, P. A. and S. M. Taylor (1980). "Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation." *Cell* 20(1): 85-93.
- Jonker, J. W. and A. H. Schinkel (2004). "Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3)." *J Pharmacol Exp Ther* 308(1): 2-9.
- Kamiyama, Y., T. Matsubara, K. Yoshinari, K. Nagata, H. Kamimura and Y. Yamazoe (2007). "Role of human hepatocyte nuclear factor 4alpha in the expression of drug-metabolizing enzymes and transporters in human hepatocytes assessed by use of small interfering RNA." *Drug Metab Pharmacokinet* 22(4): 287-298.
- Kanno, N., G. LeSage, S. Glaser, D. Alvaro and G. Alpini (2000). "Functional heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium." *Hepatology* 31(3): 555-561.
- Kerb, R., U. Brinkmann, N. Chatskaia, D. Gorbunov, V. Gorboulev, E. Mornhinweg, A. Keil, M. Eichelbaum and H. Koepsell (2002). "Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences." *Pharmacogenetics* 12(8): 591-595.
- Kerb, R., S. Hoffmeyer and U. Brinkmann (2001). "ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2." *Pharmacogenomics* 2(1): 51-64.

Khan, F. S., I. Ali, U. K. Afridi, M. Ishtiaq and R. Mehmood (2017). "Epigenetic mechanisms regulating the development of hepatocellular carcinoma and their promise for therapeutics." *Hepatol Int* 11(1): 45-53.

Khan, S. A., S. Emadossadaty, N. G. Ladep, H. C. Thomas, P. Elliott, S. D. Taylor-Robinson and M. B. Toledano (2012). "Rising trends in cholangiocarcinoma: is the ICD classification system misleading us?" *J Hepatol* 56(4): 848-854.

Kim, D. W., C. Talati and R. Kim (2017). "Hepatocellular carcinoma (HCC): beyond sorafenib-chemotherapy." *J Gastrointest Oncol* 8(2): 256-265.

Kim, I., K. Morimura, Y. Shah, Q. Yang, J. M. Ward and F. J. Gonzalez (2007). "Spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice." *Carcinogenesis* 28(5): 940-946.

Kim, K. M. and S. G. Kim (2014). "Autophagy and microRNA dysregulation in liver diseases." *Arch Pharm Res* 37(9): 1097-1116.

Kim, M. H., H. J. Shin, S. J. Lim, J. S. Park, S. S. Lee, I. S. Song and J. G. Shin (2012). "Inter-individual variability in OCT1 expression and its relationship with OCT1 genotype in liver samples from a Korean population." *Drug Metab Pharmacokinet* 27(5): 530-535.

Kim, M. S., S. M. Pinto, D. Getnet, R. S. Nirujogi, S. S. Manda, R. Chaerkady, A. K. Madugundu, D. S. Kelkar, R. Isserlin, S. Jain, J. K. Thomas, B. Muthusamy, P. Leal-Rojas, P. Kumar, N. A. Sahasrabudde, L. Balakrishnan, J. Advani, B. George, S. Renuse, L. D. Selvan, A. H. Patil, V. Nanjappa, A. Radhakrishnan, S. Prasad, T. Subbannayya, R. Raju, M. Kumar, S. K. Sreenivasamurthy, A. Marimuthu, G. J. Sathe, S. Chavan, K. K. Datta, Y. Subbannayya, A. Sahu, S. D. Yelamanchi, S. Jayaram, P. Rajagopalan, J. Sharma, K. R. Murthy, N. Syed, R. Goel, A. A. Khan, S. Ahmad, G. Dey, K. Mudgal, A. Chatterjee, T. C. Huang, J. Zhong, X. Wu, P. G. Shaw, D. Freed, M. S. Zahari, K. K. Mukherjee, S. Shankar, A. Mahadevan, H. Lam, C. J. Mitchell, S. K. Shankar, P. Satishchandra, J. T. Schroeder, R. Sirdeshmukh, A. Maitra, S. D. Leach, C. G. Drake, M. K. Halushka, T. S. Prasad, R. H. Hruban, C. L. Kerr, G. D. Bader, C. A. Iacobuzio-Donahue, H. Gowda and A. Pandey (2014). "A draft map of the human proteome." *Nature* 509(7502): 575-581.

Kirschbaum, M., P. Frankel, L. Popplewell, J. Zain, M. Delioukina, V. Pullarkat, D. Matsuoka, B. Pulone, A. J. Rotter, I. Espinoza-Delgado, A. Nademanee, S. J. Forman, D. Gandara and E. Newman (2011). "Phase II study of vorinostat for treatment of relapsed or refractory indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma." *J Clin Oncol* 29(9): 1198-1203.

Klose, R. J. and A. P. Bird (2006). "Genomic DNA methylation: the mark and its mediators." *Trends Biochem Sci* 31(2): 89-97.

Koehler, M. R., B. Wissinger, V. Gorboulev, H. Koepsell and M. Schmid (1997). "The two human organic cation transporter genes SLC22A1 and SLC22A2 are located on chromosome 6q26." *Cytogenet Cell Genet* 79(3-4): 198-200.

Koepsell, H. (2004). "Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs." *Trends Pharmacol Sci* 25(7): 375-381.

Koepsell, H. (2011). "Substrate recognition and translocation by polyspecific organic cation transporters." *Biol Chem* 392(1-2): 95-101.

Koepsell, H. (2015). "Role of organic cation transporters in drug-drug interaction." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 11(10): 1619-1633.

- Koepsell, H., K. Lips and C. Volk (2007). "Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications." *Pharm Res* 24(7): 1227-1251.
- Komuta, M., O. Govaere, V. Vandecaveye, J. Akiba, W. Van Steenberghe, C. Verslype, W. Laleman, J. Pirenne, R. Aerts, H. Yano, F. Nevens, B. Topal and T. Roskams (2012). "Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes." *Hepatology* 55(6): 1876-1888.
- Konstadoulakis, M. M., S. Roayaie, I. P. Gomas, D. Labow, M. I. Fiel, C. M. Miller and M. E. Schwartz (2008). "Fifteen-year, single-center experience with the surgical management of intrahepatic cholangiocarcinoma: operative results and long-term outcome." *Surgery* 143(3): 366-374.
- Kosters, A. and S. J. Karpen (2010). "The role of inflammation in cholestasis: clinical and basic aspects." *Semin Liver Dis* 30(2): 186-194.
- Kuang, Y., A. El-Khoueiry, P. Taverna, M. Ljungman and N. Neamati (2015). "Guadecitabine (SGI-110) priming sensitizes hepatocellular carcinoma cells to oxaliplatin." *Mol Oncol* 9(9): 1799-1814.
- Kuroda, H., R. H. Kutner, N. G. Bazan and J. Reiser (2009). "Simplified lentivirus vector production in protein-free media using polyethylenimine-mediated transfection." *J Virol Methods* 157(2): 113-121.
- Lachenmayer, A., S. Toffanin, L. Cabellos, C. Alsinet, Y. Hoshida, A. Villanueva, B. Minguez, H. W. Tsai, S. C. Ward, S. Thung, S. L. Friedman and J. M. Llovet (2012). "Combination therapy for hepatocellular carcinoma: additive preclinical efficacy of the HDAC inhibitor panobinostat with sorafenib." *J Hepatol* 56(6): 1343-1350.
- LaRocca, R. V., M. D. Hicks, L. Mull and B. Foreman (2007). "Effective palliation of advanced cholangiocarcinoma with sorafenib: a two-patient case report." *J Gastrointest Cancer* 38(2-4): 154-156.
- Larusso, N. F. and T. V. Masyuk (2011). "The role of cilia in the regulation of bile flow." *Dig Dis* 29(1): 6-12.
- Leabman, M. K., C. C. Huang, D. Stryke, S. J. Johns, M. Kawamoto, T. E. Ferrin, J. DeYoung, T. R. Taylor, M. De La Cruz, I. Herskowitz and K. M. Giacomini (2003). "PharmGKB update: I. Genetic variants of the organic cation transporter 2 (OCT2, SLC22A2)." *Pharmacol Rev* 55(3): 399.
- Lee, Y., M. Kim, J. Han, K. H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek and V. N. Kim (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." *EMBO J* 23(20): 4051-4060.
- Lencioni, R., T. de Baere, M. Burrel, J. G. Caridi, J. Lammer, K. Malagari, R. C. Martin, E. O'Grady, M. I. Real, T. J. Vogl, A. Watkinson and J. F. Geschwind (2012). "Transcatheter treatment of hepatocellular carcinoma with Doxorubicin-loaded DC Bead (DEBDOX): technical recommendations." *Cardiovasc Intervent Radiol* 35(5): 980-985.
- Lewis, B. P., I. H. Shih, M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel and C. B. Burge (2003). "Prediction of mammalian microRNA targets." *Cell* 115(7): 787-798.

- Li, H., Z. Zhang, Z. Zhou, X. Ding and G. Zhou (2016). "Optimal combination of gemcitabine, sorafenib, and S-1 shows increased efficacy in treating cholangiocarcinoma in vitro and in vivo." *Anticancer Drugs* 27(7): 600-608.
- Li, Y., Z. H. Gao and X. J. Qu (2015). "The adverse effects of sorafenib in patients with advanced cancers." *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 116(3): 216-221.
- Li, Z., J. Shen, M. T. Chan and W. K. Wu (2017). "The role of microRNAs in intrahepatic cholangiocarcinoma." *J Cell Mol Med* 21(1): 177-184.
- Lin, C. J., Y. Tai, M. T. Huang, Y. F. Tsai, H. J. Hsu, K. Y. Tzen and H. H. Liou (2010). "Cellular localization of the organic cation transporters, OCT1 and OCT2, in brain microvessel endothelial cells and its implication for MPTP transport across the blood-brain barrier and MPTP-induced dopaminergic toxicity in rodents." *J Neurochem* 114(3): 717-727.
- Lin, K., T. Xu, B. S. He, Y. Q. Pan, H. L. Sun, H. X. Peng, X. X. Hu and S. K. Wang (2016). "MicroRNA expression profiles predict progression and clinical outcome in lung adenocarcinoma." *Onco Targets Ther* 9: 5679-5692.
- Liu, D., P. Liu, L. Cao, Q. Zhang and Y. Chen (2017). "Screening the key genes of hepatocellular adenoma via microarray analysis of DNA expression and methylation profiles." *Oncol Lett* 14(4): 3975-3980.
- Liu, G., H. Wang, J. D. Fu, J. Y. Liu, A. G. Yan and Y. Y. Guan (2017). "A five-miRNA expression signature predicts survival in hepatocellular carcinoma." *APMIS* 125(7): 614-622.
- Liu, L., Y. Cao, C. Chen, X. Zhang, A. McNabola, D. Wilkie, S. Wilhelm, M. Lynch and C. Carter (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(24): 11851-11858.
- Liu, T., R. Liu, S. Zhang, K. Guo, Q. Zhang, W. Li and Y. Liu (2017). "Sorafenib induced alteration of protein glycosylation in hepatocellular carcinoma cells." *Oncol Lett* 14(1): 517-524.
- Livraghi, T. and F. Meloni (2002). "Treatment of hepatocellular carcinoma by percutaneous interventional methods." *Hepatology* 49(43): 62-71.
- Llovet, J. M., A. Burroughs and J. Bruix (2003). "Hepatocellular carcinoma." *Lancet* 362(9399): 1907-1917.
- Llovet, J. M., A. M. Di Bisceglie, J. Bruix, B. S. Kramer, R. Lencioni, A. X. Zhu, M. Sherman, M. Schwartz, M. Lotze, J. Talwalkar and G. J. Gores (2008a). "Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma." *J Natl Cancer Inst* 100(10): 698-711.
- Llovet, J. M., S. Ricci, V. Mazzaferro, P. Hilgard, E. Gane, J. F. Blanc, A. C. de Oliveira, A. Santoro, J. L. Raoul, A. Forner, M. Schwartz, C. Porta, S. Zeuzem, L. Bolondi, T. F. Greten, P. R. Galle, J. F. Seitz, I. Borbath, D. Haussinger, T. Giannaris, M. Shan, M. Moscovici, D. Voliotis and J. Bruix (2008b). "Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma." *N Engl J Med* 359(4): 378-390.
- Lou, G., X. Dong, C. Xia, B. Ye, Q. Yan, S. Wu, Y. Yu, F. Liu, M. Zheng, Z. Chen and Y. Liu (2016). "Direct targeting sperm-associated antigen 9 by miR-141 influences hepatocellular carcinoma cell growth and metastasis via JNK pathway." *J Exp Clin Cancer Res* 35: 14.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.
- Lozano, E., E. Herraéz, O. Briz, V. S. Robledo, J. Hernandez-Iglesias, A. Gonzalez-Hernandez and J. J. Marin (2013). "Role of the plasma membrane transporter of organic cations OCT1 and its genetic variants in modern liver pharmacology." *Biomed Res Int* 2013: 692071.
- Lozano, E., L. Sanchez-Vicente, M. J. Monte, E. Herraéz, O. Briz, J. M. Banales, J. J. Marin and R. I. Macias (2014). "Cocarcinogenic effects of intrahepatic bile acid accumulation in cholangiocarcinoma development." *Mol Cancer Res* 12(1): 91-100.
- Ludwig, J. (1987). "New concepts in biliary cirrhosis." *Semin Liver Dis* 7(4): 293-301.
- Luo, X., W. Jia, Z. Huang, X. Li, B. Xing, X. Jiang, J. Li, A. Si, T. Yang, C. Gao, W. Y. Lau and F. Shen (2017). "Effectiveness and safety of sorafenib in the treatment of unresectable and advanced intrahepatic cholangiocarcinoma: a pilot study." *Oncotarget* 8(10): 17246-17257.
- Lytle, J. R., T. A. Yario and J. A. Steitz (2007). "Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(23): 9667-9672.
- Ma, B. B., F. Sung, Q. Tao, F. F. Poon, V. W. Lui, W. Yeo, S. L. Chan and A. T. Chan (2010). "The preclinical activity of the histone deacetylase inhibitor PXD101 (belinostat) in hepatocellular carcinoma cell lines." *Invest New Drugs* 28(2): 107-114.
- Maeda, T., E. Adachi, K. Kajiyama, K. Sugimachi and M. Tsuneyoshi (1995). "Combined hepatocellular and cholangiocarcinoma: proposed criteria according to cytokeratin expression and analysis of clinicopathologic features." *Hum Pathol* 26(9): 956-964.
- Mandke, P., N. Wyatt, J. Fraser, B. Bates, S. J. Berberich and M. P. Markey (2012). "MicroRNA-34a modulates MDM4 expression via a target site in the open reading frame." *PLoS One* 7(8): e42034.
- Marin, J. J., E. R. Barbero, M. C. Herrera, A. Tabernero and M. J. Monte (1993). "Bile acid-induced modifications in DNA synthesis by the regenerating perfused rat liver." *Hepatology* 18(5): 1182-1192.
- 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, J. J., M. R. Romero and O. Briz (2010). "Molecular bases of liver cancer refractoriness to pharmacological treatment." *Curr Med Chem* 17(8): 709-740.
- Marin, J. J., R. I. Macias, O. Briz, J. M. Banales and M. J. Monte (2015). "Bile Acids in Physiology, Pathology and Pharmacology." *Curr Drug Metab* 17(1): 4-29.
- 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.
- Marrero, J. A., M. Kudo, A. P. Venook, S. L. Ye, J. P. Bronowicki, X. P. Chen, L. Dagher, J. Furuse, J. H. Geschwind, L. L. de Guevara, C. Papandreou, T. Takayama, A. J. Sanyal, S. K. Yoon, K. Nakajima, R. Lehr, S. Heldner and R. Lencioni (2016). "Observational registry of

sorafenib use in clinical practice across Child-Pugh subgroups: The GIDEON study." *J Hepatol* 65(6): 1140-1147.

Martel, F., E. Keating, C. Calhau, D. Grundemann, E. Schomig and I. Azevedo (2001). "Regulation of human extraneuronal monoamine transporter (hEMT) expressed in HEK293 cells by intracellular second messenger systems." *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 364(6): 487-495.

Martinez-Becerra, P., I. Monte, M. R. Romero, M. A. Serrano, J. Vaquero, R. I. Macias, A. Del Rio, N. Grane-Boladeras, F. Jimenez, F. G. San-Martin, M. Pastor-Anglada and J. J. Marin (2012). "Up-regulation of FXR isoforms is not required for stimulation of the expression of genes involved in the lack of response of colon cancer to chemotherapy." *Pharmacol Res* 66(5): 419-427.

Martinez-Becerra, P., J. Vaquero, M. R. Romero, E. Lozano, C. Anadon, R. I. Macias, M. A. Serrano, N. Grane-Boladeras, L. Munoz-Bellvis, L. Alvarez, B. Sangro, M. Pastor-Anglada and J. J. Marin (2012). "No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors." *Mol Pharm* 9(6): 1693-1704.

Masyuk, T. V., B. Q. Huang, C. J. Ward, A. I. Masyuk, D. Yuan, P. L. Splinter, R. Punyashthiti, E. L. Ritman, V. E. Torres, P. C. Harris and N. F. LaRusso (2003). "Defects in cholangiocyte fibrocystin expression and ciliary structure in the PCK rat." *Gastroenterology* 125(5): 1303-1310.

Masyuk, T. V., E. L. Ritman and N. F. LaRusso (2001). "Quantitative assessment of the rat intrahepatic biliary system by three-dimensional reconstruction." *Am J Pathol* 158(6): 2079-2088.

Matsumoto, K., T. Nagahara, J. Okano and Y. Murawaki (2008). "The growth inhibition of hepatocellular and cholangiocellular carcinoma cells by gemcitabine and the roles of extracellular signal-regulated and checkpoint kinases." *Oncol Rep* 20(4): 863-872.

McCubrey, J. A., L. S. Steelman, W. H. Chappell, S. L. Abrams, E. W. Wong, F. Chang, B. Lehmann, D. M. Terrian, M. Milella, A. Tafuri, F. Stivala, M. Libra, J. Basecke, C. Evangelisti, A. M. Martelli and R. A. Franklin (2007). "Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance." *Biochim Biophys Acta* 1773(8): 1263-1284.

McGlynn, K. A., J. L. Petrick and W. T. London (2015). "Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability." *Clin Liver Dis* 19(2): 223-238.

Meadows, K. N., P. Bryant and K. Pumiglia (2001). "Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation." *J Biol Chem* 276(52): 49289-49298.

Mei, Q., M. Chen, X. Lu, X. Li, F. Duan, M. Wang, G. Luo and W. Han (2015). "An open-label, single-arm, phase I/II study of lower-dose decitabine based therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma." *Oncotarget* 6(18): 16698-16711.

Meier, P. J. (1988). "Transport polarity of hepatocytes." *Semin Liver Dis* 8(4): 293-307.

Meijer, D. K., W. E. Mol, M. Muller and G. Kurz (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(1): 35-70.

- Mendel, D. B., A. D. Laird, X. Xin, S. G. Louie, J. G. Christensen, G. Li, R. E. Schreck, T. J. Abrams, T. J. Ngai, L. B. Lee, L. J. Murray, J. Carver, E. Chan, K. G. Moss, J. O. Haznedar, J. Sukbuntherng, R. A. Blake, L. Sun, C. Tang, T. Miller, S. Shirazian, G. McMahon and J. M. Cherrington (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(1): 327-337.
- Mendoza, M. E., M. J. Monte, M. Y. El-Mir, M. D. Badia and J. J. Marin (2002). "Changes in the pattern of bile acids in the nuclei of rat liver cells during hepatocarcinogenesis." *Clin Sci (Lond)* 102(2): 143-150.
- Merino-Azpitarte, M., E. Lozano, M. J. Perugorria, A. Esparza-Baquer, O. Erice, A. Santos-Laso, C. J. O'Rourke, J. B. Andersen, R. Jimenez-Aguero, A. Lacasta, M. D'Amato, O. Briz, N. Jalan-Sakrikar, R. C. Huebert, K. M. Thelen, S. A. Gradilone, A. M. Aransay, J. L. Lavin, M. G. Fernandez-Barrena, A. Matheu, M. Marzioni, G. J. Gores, L. Bujanda, J. J. G. Marin and J. M. Banales (2017). "SOX17 regulates cholangiocyte differentiation and acts as a tumor suppressor in cholangiocarcinoma." *J Hepatol* 67(1): 72-83.
- Meyer-Wentrup, F., U. Karbach, V. Gorboulev, P. Arndt and H. Koepsell (1998). "Membrane localization of the electrogenic cation transporter rOCT1 in rat liver." *Biochem Biophys Res Commun* 248(3): 673-678.
- Michalopoulos, G. K. and M. C. DeFrances (1997). "Liver regeneration." *Science* 276(5309): 60-66.
- Minematsu, T. and K. M. Giacomini (2011). "Interactions of tyrosine kinase inhibitors with organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion proteins." *Mol Cancer Ther* 10(3): 531-539.
- Minuesa, G., S. Purcet, I. Erkizia, M. Molina-Arcas, M. Bofill, N. Izquierdo-Useros, F. J. Casado, B. Clotet, M. Pastor-Anglada and J. Martinez-Picado (2008). "Expression and functionality of anti-human immunodeficiency virus and anticancer drug uptake transporters in immune cells." *J Pharmacol Exp Ther* 324(2): 558-567.
- Monte, M. J., S. Dominguez, M. F. Palomero, R. I. Macias and J. J. Marin (1999). "Further evidence of the usefulness of bile acids as molecules for shuttling cytostatic drugs toward liver tumors." *J Hepatol* 31(3): 521-528.
- Monte, M. J., F. Palomero, G. R. Sainz, M. Dominguez, M. Diez, A. Torano and J. J. Marin (2000). "Bile acid secretion during rat liver carcinogenesis." *Life Sci* 66(12): 1085-1095.
- Morimoto, Y., Y. Tanaka, T. Ito, M. Nakahara, H. Nakaba, T. Nishida, M. Fujikawa, S. Yamamoto and T. Kitagawa (2003). "Long-term survival and prognostic factors in the surgical treatment for intrahepatic cholangiocarcinoma." *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 10(6): 432-440.
- Muppidi, M. R., S. Portwood, E. A. Griffiths, J. E. Thompson, L. A. Ford, C. W. Freyer, M. Wetzler and E. S. Wang (2015). "Decitabine and Sorafenib Therapy in FLT-3 ITD-Mutant Acute Myeloid Leukemia." *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 15 Suppl: S73-79.
- Murakami, Y., T. Yasuda, K. Saigo, T. Urashima, H. Toyoda, T. Okanoue and K. Shimotohno (2006). "Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues." *Oncogene* 25(17): 2537-2545.

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.

Naftelberg, S., I. E. Schor, G. Ast and A. R. Kornblihtt (2015). "Regulation of alternative splicing through coupling with transcription and chromatin structure." *Annu Rev Biochem* 84: 165-198.

Namisaki, T., E. Schaeffeler, H. Fukui, H. Yoshiji, Y. Nakajima, P. Fritz, M. Schwab and A. T. Nies (2014). "Differential expression of drug uptake and efflux transporters in Japanese patients with hepatocellular carcinoma." *Drug Metab Dispos* 42(12): 2033-2040.

Nardinelli, L., S. S. Sanabani, A. Didone, B. Ferreira Pde, M. Serpa, M. M. Novaes, M. Marchiani, A. L. Ruiz, I. S. Lima, A. Chamone Dde and I. Bendit (2012). "Pretherapeutic expression of the hOCT1 gene predicts a complete molecular response to imatinib mesylate in chronic-phase chronic myeloid leukemia." *Acta Haematol* 127(4): 228-234.

Nies, A. T., H. Koepsell, S. Winter, O. Burk, K. Klein, R. Kerb, U. M. Zanger, D. Keppler, M. Schwab and E. Schaeffeler (2009). "Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver." *Hepatology* 50(4): 1227-1240.

Nishida, N., M. Kitano, T. Sakurai and M. Kudo (2015). "Molecular Mechanism and Prediction of Sorafenib Chemoresistance in Human Hepatocellular Carcinoma." *Dig Dis* 33(6): 771-779.

Okabe, M., G. Szakacs, M. A. Reimers, T. Suzuki, M. D. Hall, T. Abe, J. N. Weinstein and M. M. Gottesman (2008). "Profiling SLCO and SLC22 genes in the NCI-60 cancer cell lines to identify drug uptake transporters." *Mol Cancer Ther* 7(9): 3081-3091.

Ong, C. K., C. Subimerb, C. Pairojkul, S. Wongkham, I. Cutcutache, W. Yu, J. R. McPherson, G. E. Allen, C. C. Ng, B. H. Wong, S. S. Myint, V. Rajasegaran, H. L. Heng, A. Gan, Z. J. Zang, Y. Wu, J. Wu, M. H. Lee, D. Huang, P. Ong, W. Chan-on, Y. Cao, C. N. Qian, K. H. Lim, A. Ooi, K. Dykema, K. Furge, V. Kukongviriyapan, B. Sripa, C. Wongkham, P. Yongvanit, P. A. Futreal, V. Bhudhisawasdi, S. Rozen, P. Tan and B. T. Teh (2012). "Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma." *Nat Genet* 44(6): 690-693.

Orskov, A. D. and K. Gronbaek (2017). "DNA Methyltransferase Inhibitors in Myeloid Cancer: Clonal Eradication or Clonal Differentiation?" *Cancer J* 23(5): 277-285.

Pachmayr, E., C. Treese and U. Stein (2017). "Underlying Mechanisms for Distant Metastasis - Molecular Biology." *Visc Med* 33(1): 11-20.

Pan, T. T., W. Wang, W. D. Jia and G. L. Xu (2017). "A single-center experience of sorafenib monotherapy in patients with advanced intrahepatic cholangiocarcinoma." *Oncol Lett* 13(5): 2957-2964.

Park, J. G., W. Y. Tak, S. Y. Park, Y. O. Kweon, S. Y. Jang, S. H. Lee, Y. R. Lee, S. K. Jang, K. Hur and H. J. Lee (2017). "Long-term follow-up of complete remission of advanced hepatocellular carcinoma following sorafenib therapy: A case report." *Oncol Lett* 14(4): 4853-4856.

Patyna, S., A. D. Laird, D. B. Mendel, M. O'Farrell A, C. Liang, H. Guan, T. Vojtkovsky, S. Vasile, X. Wang, J. Chen, M. Grazzini, C. Y. Yang, J. O. Haznedar, J. Sukbuntherng, W. Z. Zhong, J. M. Cherrington and D. Hu-Lowe (2006). "SU14813: a novel multiple receptor

tyrosine kinase inhibitor with potent antiangiogenic and antitumor activity." *Mol Cancer Ther* 5(7): 1774-1782.

Paz, M. F., M. F. Fraga, S. Avila, M. Guo, M. Pollan, J. G. Herman and M. Esteller (2003). "A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines." *Cancer Res* 63(5): 1114-1121.

Perland, E. and R. Fredriksson (2017). "Classification Systems of Secondary Active Transporters." *Trends Pharmacol Sci* 38(3): 305-315.

Peterson, S. M., J. A. Thompson, M. L. Ufkin, P. Sathyanarayana, L. Liaw and C. B. Congdon (2014). "Common features of microRNA target prediction tools." *Front Genet* 5: 23.

Pievsky, D. and N. Pyrsopoulos (2016). "Profile of tivantinib and its potential in the treatment of hepatocellular carcinoma: the evidence to date." *J Hepatocell Carcinoma* 3: 69-76.

Pinter, M., W. Sieghart, M. Reisegger, F. Wrba and M. Peck-Radosavljevic (2011). "Sorafenib in unresectable intrahepatic cholangiocellular carcinoma: a case report." *Wien Klin Wochenschr* 123(1-2): 61-64.

Pitoin, F. and F. Jerkovich (2016). "Selective use of sorafenib in the treatment of thyroid cancer." *Drug Des Devel Ther* 10: 1119-1131.

Qu, S., Y. Yao, C. Shang, Y. Xue, J. Ma, Z. Li and Y. Liu (2012). "MicroRNA-330 is an oncogenic factor in glioblastoma cells by regulating SH3GL2 gene." *PLoS One* 7(9): e46010.

Radha, V., S. Nambirajan and G. Swarup (1996). "Association of Lyn tyrosine kinase with the nuclear matrix and cell-cycle-dependent changes in matrix-associated tyrosine kinase activity." *Eur J Biochem* 236(2): 352-359.

Raoul, J. L., J. Bruix, T. F. Greten, M. Sherman, V. Mazzaferro, P. Hilgard, H. Scherubl, M. E. Scheulen, G. Germanidis, S. Dominguez, S. Ricci, A. Nadel, M. Moscovici, D. Voliotis and J. M. Llovet (2012). "Relationship between baseline hepatic status and outcome, and effect of sorafenib on liver function: SHARP trial subanalyses." *J Hepatol* 56(5): 1080-1088.

Rawluszko-Wieczorek, A. A., N. Horst, K. Horbacka, A. S. Bandura, M. Swiderska, P. Krokowicz and P. P. Jagodzinski (2015). "Effect of DNA methylation profile on OATP3A1 and OATP4A1 transcript levels in colorectal cancer." *Biomed Pharmacother* 74: 233-242.

Recio-Boiles, A. and H. M. Babiker (2018). *Cancer, Liver*. StatPearls. Treasure Island (FL).

Reznik, B., S. L. Clement and J. Lykke-Andersen (2014). "hnRNP F complexes with tristetraprolin and stimulates ARE-mRNA decay." *PLoS One* 9(6): e100992.

Riffo-Campos, A. L., I. Riquelme and P. Brebi-Mieville (2016). "Tools for Sequence-Based miRNA Target Prediction: What to Choose?" *Int J Mol Sci* 17(12).

Riggs, A. D. (1975). "X inactivation, differentiation, and DNA methylation." *Cytogenet Cell Genet* 14(1): 9-25.

Rimola, J., A. Forner, M. Reig, R. Vilana, C. R. de Lope, C. Ayuso and J. Bruix (2009). "Cholangiocarcinoma in cirrhosis: absence of contrast washout in delayed phases by magnetic resonance imaging avoids misdiagnosis of hepatocellular carcinoma." *Hepatology* 50(3): 791-798.

- Rulcova, A., L. Krausova, T. Smutny, R. Vrzal, Z. Dvorak, R. Jover and P. Pavek (2013). "Glucocorticoid receptor regulates organic cation transporter 1 (OCT1, SLC22A1) expression via HNF4alpha upregulation in primary human hepatocytes." *Pharmacol Rep* 65(5): 1322-1335.
- Saborowski, M., G. A. Kullak-Ublick and J. J. Eloranta (2006). "The human organic cation transporter-1 gene is transactivated by hepatocyte nuclear factor-4alpha." *J Pharmacol Exp Ther* 317(2): 778-785.
- Saito, S., A. Iida, A. Sekine, C. Ogawa, S. Kawauchi, S. Higuchi and Y. Nakamura (2002). "Catalog of 238 variations among six human genes encoding solute carriers (hSLCs) in the Japanese population." *J Hum Genet* 47(11): 576-584.
- Sakata, T., N. Anzai, H. J. Shin, R. Noshiro, T. Hirata, H. Yokoyama, Y. Kanai and H. Endou (2004). "Novel single nucleotide polymorphisms of organic cation transporter 1 (SLC22A1) affecting transport functions." *Biochem Biophys Res Commun* 313(3): 789-793.
- Samarin, J., V. Laketa, M. Malz, S. Roessler, I. Stein, E. Horwitz, S. Singer, E. Dimou, A. Cigliano, M. Bissinger, C. S. Falk, X. Chen, S. Dooley, E. Pikarsky, D. F. Calvisi, C. Schultz, P. Schirmacher and K. Breuhahn (2016). "PI3K/AKT/mTOR-dependent stabilization of oncogenic far-upstream element binding proteins in hepatocellular carcinoma cells." *Hepatology* 63(3): 813-826.
- Sanchez-Diaz, P. and L. O. Penalva (2006). "Post-transcription meets post-genomic: the saga of RNA binding proteins in a new era." *RNA Biol* 3(3): 101-109.
- Sanchez-Mut, J. V., D. Huertas and M. Esteller (2012). "Aberrant epigenetic landscape in intellectual disability." *Prog Brain Res* 197: 53-71.
- Santoro, A., L. Rimassa, I. Borbath, B. Daniele, S. Salvagni, J. L. Van Laethem, H. Van Vlierberghe, J. Trojan, F. T. Kolligs, A. Weiss, S. Miles, A. Gasbarrini, M. Lencioni, L. Cicalese, M. Sherman, C. Gridelli, P. Buggisch, G. Gerken, R. M. Schmid, C. Boni, N. Personeni, Z. Hassoun, G. Abbadessa, B. Schwartz, R. Von Roemeling, M. E. Lamar, Y. Chen and C. Porta (2013). "Tivantinib for second-line treatment of advanced hepatocellular carcinoma: a randomised, placebo-controlled phase 2 study." *Lancet Oncol* 14(1): 55-63.
- Schaeffeler, E., C. Hellerbrand, A. T. Nies, S. Winter, S. Kruck, U. Hofmann, H. van der Kuip, U. M. Zanger, H. Koepsell and M. Schwab (2011). "DNA methylation is associated with downregulation of the organic cation transporter OCT1 (SLC22A1) in human hepatocellular carcinoma." *Genome Med* 3(12): 82.
- Schoepp, M., A. J. Strose and J. Haier (2017). "Dysregulation of miRNA Expression in Cancer Associated Fibroblasts (CAFs) and Its Consequences on the Tumor Microenvironment." *Cancers (Basel)* 9(6).
- Serafini, F. M. and D. Radvinsky (2016). "The pathways of genetic transformation in cholangiocarcinogenesis." *Cancer Genet* 209(12): 554-558.
- Shi, L., L. Wu, Z. Chen, J. Yang, X. Chen, F. Yu, F. Zheng and X. Lin (2015). "MiR-141 Activates Nrf2-Dependent Antioxidant Pathway via Down-Regulating the Expression of Keap1 Conferring the Resistance of Hepatocellular Carcinoma Cells to 5-Fluorouracil." *Cell Physiol Biochem* 35(6): 2333-2348.
- Shu, Y., M. K. Leabman, B. Feng, L. M. Mangravite, C. C. Huang, D. Stryke, M. Kawamoto, S. J. Johns, J. DeYoung, E. Carlson, T. E. Ferrin, I. Herskowitz and K. M. Giacomini (2003).

"Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter, OCT1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10): 5902-5907.

Shu, Y., S. A. Sheardown, C. Brown, R. P. Owen, S. Zhang, R. A. Castro, A. G. Ianculescu, L. Yue, J. C. Lo, E. G. Burchard, C. M. Brett and K. M. Giacomini (2007). "Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action." *J Clin Invest* 117(5): 1422-1431.

Sia, D., Y. Hoshida, A. Villanueva, S. Roayaie, J. Ferrer, B. Tabak, J. Peix, M. Sole, V. Tovar, C. Alsinet, H. Cornella, B. Klotzle, J. B. Fan, C. Cotsoglou, S. N. Thung, J. Fuster, S. Waxman, J. C. Garcia-Valdecasas, J. Bruix, M. E. Schwartz, R. Beroukhim, V. Mazzaferro and J. M. Llovet (2013). "Integrative molecular analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma reveals 2 classes that have different outcomes." *Gastroenterology* 144(4): 829-840.

Siegfried, Z. and R. Karni (2018). "The role of alternative splicing in cancer drug resistance." *Curr Opin Genet Dev* 48: 16-21.

Singh, B. and E. Eyras (2017). "The role of alternative splicing in cancer." *Transcription* 8(2): 91-98.

Solt, D. B., J. B. Hay and E. Farber (1976). "New principles for the analysis of chemical carcinogenesis." *Nature* 263: 701-703.

Sparidans, R. W., M. L. Vlaming, J. S. Lagas, A. H. Schinkel, J. H. Schellens and J. H. Beijnen (2009). "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.

Steliou, K., M. S. Boosalis, S. P. Perrine, J. Sangerman and D. V. Faller (2012). "Butyrate histone deacetylase inhibitors." *Biores Open Access* 1(4): 192-198.

Sterling, R. K., L. Jeffers, F. Gordon, A. P. Venook, K. R. Reddy, S. Satomura, F. Kanke, M. E. Schwartz and M. Sherman (2009). "Utility of Lens culinaris agglutinin-reactive fraction of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin, alone or in combination, as biomarkers for hepatocellular carcinoma." *Clin Gastroenterol Hepatol* 7(1): 104-113.

Stone, M. L., K. B. Chiappinelli, H. Li, L. M. Murphy, M. E. Travers, M. J. Topper, D. Mathios, M. Lim, I. M. Shih, T. L. Wang, C. F. Hung, V. Bhargava, K. R. Wiehagen, G. S. Cowley, K. E. Bachman, R. Strick, P. L. Strissel, S. B. Baylin and C. A. Zahnow (2017). "Epigenetic therapy activates type I interferon signaling in murine ovarian cancer to reduce immunosuppression and tumor burden." *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(51): E10981-E10990.

Strumberg, D. (2005). "Preclinical and clinical development of the oral multikinase inhibitor sorafenib in cancer treatment." *Drugs Today (Barc)* 41(12): 773-784.

Subramaniam, S., R. K. Kelley and A. P. Venook (2013). "A review of hepatocellular carcinoma (HCC) staging systems." *Chin Clin Oncol* 2(4): 33.

Suzuki, H. and Y. Sugiyama (2002). "Single nucleotide polymorphisms in multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2): its impact on drug disposition." *Adv Drug Deliv Rev* 54(10): 1311-1331.

Swift, B., N. Nebot, J. K. Lee, T. Han, W. R. Proctor, D. R. Thakker, D. Lang, M. Radtke, M. J. Gnoth and K. L. Brouwer (2013). "Sorafenib hepatobiliary disposition: mechanisms of

hepatic uptake and disposition of generated metabolites." *Drug Metab Dispos* 41(6): 1179-1186.

Tabibian, J. H., A. I. Masyuk, T. V. Masyuk, S. P. O'Hara and N. F. LaRusso (2013). "Physiology of cholangiocytes." *Compr Physiol* 3(1): 541-565.

Tahiliani, M., K. P. Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind and A. Rao (2009). "Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1." *Science* 324(5929): 930-935.

Takahashi, T., H. Ueno and M. Shibuya (1999). "VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells." *Oncogene* 18(13): 2221-2230.

Tang, D., H. Nagano, H. Yamamoto, H. Wada, M. Nakamura, M. Kondo, H. Ota, S. Yoshioka, H. Kato, B. Damdinsuren, S. Marubashi, A. Miyamoto, Y. Takeda, K. Umeshita, K. Dono, K. Wakasa and M. Monden (2006). "Angiogenesis in cholangiocellular carcinoma: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietin-1/2, thrombospondin-1 and clinicopathological significance." *Oncol Rep* 15(3): 525-532.

Tao, L. Y., L. Cai, X. D. He, W. Liu and Q. Qu (2010). "Comparison of serum tumor markers for intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma." *Am Surg* 76(11): 1210-1213.

Tarasova, L., I. Kalnina, K. Geldnere, A. Bumbure, R. Ritenberga, L. Nikitina-Zake, D. Fridmanis, I. Vaivade, V. Pirags and J. Klovins (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(9): 659-666.

Thomas, J., L. Wang, R. E. Clark and M. Pirmohamed (2004). "Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance." *Blood* 104(12): 3739-3745.

Tomonari, T., S. Takeishi, T. Taniguchi, T. Tanaka, H. Tanaka, S. Fujimoto, T. Kimura, K. Okamoto, H. Miyamoto, N. Muguruma and T. Takayama (2016). "MRP3 as a novel resistance factor for sorafenib in hepatocellular carcinoma." *Oncotarget* 7(6): 7207-7215.

Topper, M. J., M. Vaz, K. B. Chiappinelli, C. E. DeStefano Shields, N. Niknafs, R. C. Yen, A. Wenzel, J. Hicks, M. Ballew, M. Stone, P. T. Tran, C. A. Zahnow, M. D. Hellmann, V. Anagnostou, P. L. Strissel, R. Strick, V. E. Velculescu and S. B. Baylin (2017). "Epigenetic Therapy Ties MYC Depletion to Reversing Immune Evasion and Treating Lung Cancer." *Cell* 171(6): 1284-1300 e1221.

Torre, L. A., F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent and A. Jemal (2015). "Global cancer statistics, 2012." *CA Cancer J Clin* 65(2): 87-108.

Torre, L. A., R. L. Siegel, E. M. Ward and A. Jemal (2016). "Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 25(1): 16-27.

Tremblay, M. P., V. E. Armero, A. Allaire, S. Boudreault, C. Martenon-Brodeur, M. Durand, E. Lapointe, P. Thibault, M. Tremblay-Letourneau, J. P. Perreault, M. S. Scott and M. Bisailon (2016). "Global profiling of alternative RNA splicing events provides insights into molecular differences between various types of hepatocellular carcinoma." *BMC Genomics* 17: 683.

- Treyer, A. and A. Musch (2013). "Hepatocyte polarity." *Compr Physiol* 3(1): 243-287.
- Trojan, J. and O. Waidmann (2016). "Role of regorafenib as second-line therapy and landscape of investigational treatment options in advanced hepatocellular carcinoma." *J Hepatocell Carcinoma* 3: 31-36.
- Tsai, C. L., F. M. Hsu and J. C. Cheng (2016). "How to Improve Therapeutic Ratio in Radiotherapy of HCC." *Liver Cancer* 5(3): 210-220.
- Tyson, G. L. and H. B. El-Serag (2011). "Risk factors for cholangiocarcinoma." *Hepatology* 54(1): 173-184.
- Tzvetkov, M. V., A. R. Saadatmand, K. Bokelmann, I. Meineke, R. Kaiser and J. Brockmoller (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(1): 22-29.
- Tzvetkov, M. V., S. V. Vormfelde, D. Balen, I. Meineke, T. Schmidt, D. Sehrt, I. Sabolic, H. Koepsell and J. Brockmoller (2009). "The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3 on the renal clearance of metformin." *Clin Pharmacol Ther* 86(3): 299-306.
- Ueda, K., M. Hosokawa and S. Iwakawa (2015). "Cellular Uptake of Decitabine by Equilibrative Nucleoside Transporters in HCT116 Cells." *Biol Pharm Bull* 38(8): 1113-1119.
- Valle, J., H. Wasan, D. H. Palmer, D. Cunningham, A. Anthony, A. Maraveyas, S. Madhusudan, T. Iveson, S. Hughes, S. P. Pereira, M. Roughton and J. Bridgewater (2010). "Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer." *N Engl J Med* 362(14): 1273-1281.
- Van Meer, S., R. A. de Man, M. J. Coenraad, D. Sprengers, K. M. van Nieuwkerk, H. J. Klumpen, P. L. Jansen, I. J. JN, M. G. van Oijen, P. D. Siersema and K. J. van Erpecum (2015). "Surveillance for hepatocellular carcinoma is associated with increased survival: Results from a large cohort in the Netherlands." *J Hepatol* 63(5): 1156-1163.
- Van Montfoort, J. E., M. Muller, G. M. Groothuis, D. K. Meijer, H. Koepsell and P. J. Meier (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(1): 110-115.
- Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM (2007) Genomics and signalling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis.* 27: 55-76.
- Voss, J. S., L. M. Holtegaard, S. E. Kerr, E. G. Fritcher, L. R. Roberts, G. J. Gores, J. Zhang, W. E. Highsmith, K. C. Halling and B. R. Kipp (2013). "Molecular profiling of cholangiocarcinoma shows potential for targeted therapy treatment decisions." *Hum Pathol* 44(7): 1216-1222.
- Vroman, B. and N. F. LaRusso (1996). "Development and characterization of polarized primary cultures of rat intrahepatic bile duct epithelial cells." *Lab Invest* 74(1): 303-313.
- Waddington, C. H. (1952). "Selection of the genetic basis for an acquired character." *Nature* 169(4302): 625-626.

Wahid, B., A. Ali, S. Rafique and M. Idrees (2017). "New Insights into the Epigenetics of Hepatocellular Carcinoma." *Biomed Res Int* 2017: 1609575.

Wainwright, E. N. and P. Scaffidi (2017). "Epigenetics and Cancer Stem Cells: Unleashing, Hijacking, and Restricting Cellular Plasticity." *Trends Cancer* 3(5): 372-386.

Wan, P. T., M. J. Garnett, S. M. Roe, S. Lee, D. Niculescu-Duvaz, V. M. Good, C. M. Jones, C. J. Marshall, C. J. Springer, D. Barford and R. Marais (2004). "Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF." *Cell* 116(6): 855-867.

Wang, H., N. Ding, J. Guo, J. Xia and Y. Ruan (2016). "Dysregulation of TTP and HuR plays an important role in cancers." *Tumour Biol* 37(11): 14451-14461.

Wang, L., A. Giannoudis, S. Lane, P. Williamson, M. Pirmohamed and R. E. Clark (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(2): 258-264.

White, E. J., A. E. Matsangos and G. M. Wilson (2017). "AUF1 regulation of coding and noncoding RNA." *Wiley Interdiscip Rev RNA* 8(2).

Wilhelm, S. M., L. Adnane, P. Newell, A. Villanueva, J. M. Llovet and M. Lynch (2008). "Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling." *Mol Cancer Ther* 7(10): 3129-3140.

Wilhelm, S. M., C. Carter, L. Tang, D. Wilkie, A. McNabola, H. Rong, C. Chen, X. Zhang, P. Vincent, M. McHugh, Y. Cao, J. Shujath, S. Gawlak, D. Eveleigh, B. Rowley, L. Liu, L. Adnane, M. Lynch, D. Auclair, I. Taylor, R. Gedrich, A. Voznesensky, B. Riedl, L. E. Post, G. Bollag and P. A. Trail (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(19): 7099-7109.

Winter, T. N., W. F. Elmquist and C. A. Fairbanks (2011). "OCT2 and MATE1 provide bidirectional agmatine transport." *Mol Pharm* 8(1): 133-142.

Witjes, C. D., H. E. Karim-Kos, O. Visser, E. de Vries, I. J. JN, R. A. de Man, J. W. Coebergh and C. Verhoef (2012). "Intrahepatic cholangiocarcinoma in a low endemic area: rising incidence and improved survival." *HPB (Oxford)* 14(11): 777-781.

Wu, X., P. D. Prasad, F. H. Leibach and V. Ganapathy (1998). "cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family." *Biochem Biophys Res Commun* 246(3): 589-595.

Xiao, E. H., D. Guo and D. J. Bian (2009). "Effect of preoperative transcatheter arterial chemoembolization on angiogenesis of hepatocellular carcinoma cells." *World J Gastroenterol* 15(36): 4582-4586.

Yabuuchi, H., I. Tamai, J. Nezu, K. Sakamoto, A. Oku, M. Shimane, Y. Sai and A. Tsuji (1999). "Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations." *J Pharmacol Exp Ther* 289(2): 768-773.

Yang, F., X. Huang, T. Yi, Y. Yen, D. D. Moore and W. Huang (2007). "Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor." *Cancer Res* 67(3): 863-867.

Yang, M. C., A. J. McLean and D. G. Le Couteur (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(1): 130-136.

Yao, F. Y., N. M. Bass, B. Nikolai, T. J. Davern, R. Kerlan, V. Wu, N. L. Ascher and J. P. Roberts (2002). "Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: analysis of survival according to the intention-to-treat principle and dropout from the waiting list." *Liver Transpl* 8(10): 873-883.

Yeo, W., H. C. Chung, S. L. Chan, L. Z. Wang, R. Lim, J. Picus, M. Boyer, F. K. Mo, J. Koh, S. Y. Rha, E. P. Hui, H. C. Jeung, J. K. Roh, S. C. Yu, K. F. To, Q. Tao, B. B. Ma, A. W. Chan, J. H. Tong, C. Erlichman, A. T. Chan and B. C. Goh (2012). "Epigenetic therapy using belinostat for patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a multicenter phase I/II study with biomarker and pharmacokinetic analysis of tumors from patients in the Mayo Phase II Consortium and the Cancer Therapeutics Research Group." *J Clin Oncol* 30(27): 3361-3367.

Yoon, J. H., H. Higuchi, N. W. Werneburg, S. H. Kaufmann and G. J. Gores (2002). "Bile acids induce cyclooxygenase-2 expression via the epidermal growth factor receptor in a human cholangiocarcinoma cell line." *Gastroenterology* 122(4): 985-993.

Zhang, L., M. J. Dresser, A. T. Gray, S. C. Yost, S. Terashita and K. M. Giacomini (1997). "Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter." *Mol Pharmacol* 51(6): 913-921.

Zhang, S., K. S. Lovejoy, J. E. Shima, L. L. Lagpacan, Y. Shu, A. Lapuk, Y. Chen, T. Komori, J. W. Gray, X. Chen, S. J. Lippard and K. M. Giacomini (2006). "Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity." *Cancer Res* 66(17): 8847-8857.

Zhao, J. and M. W. Lawless (2016). "Resminostat: Opening the door to epigenetic treatments for liver cancer." *Hepatology* 63(2): 668-669.

Zhao, Y., W. J. Wang, S. Guan, H. L. Li, R. C. Xu, J. B. Wu, J. S. Liu, H. P. Li, W. Bai, Z. X. Yin, D. M. Fan, Z. L. Zhang and G. H. Han (2013). "Sorafenib combined with transarterial chemoembolization for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: a large-scale multicenter study of 222 patients." *Ann Oncol* 24(7): 1786-1792.

Zolk, O. and M. F. Fromm (2012). "Drug transporter regulation in tumors by DNA methylation." *Genome Med* 4(1): 10.

Zucconi, B. E. and G. M. Wilson (2011). "Modulation of neoplastic gene regulatory pathways by the RNA-binding factor AUF1." *Front Biosci (Landmark Ed)* 16: 2307-2325.

**SALAMANCA UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY
DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY**



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**ROLE OF THE GENE *SLC22A1* IN THE RESISTANCE
OF HEPATIC TUMOURS TO SORAFENIB**

Presented by **Ruba Al Abdulla** to obtain PhD in the University of Salamanca

2018

AIMS

The most common types of primary hepatic tumours in adults are hepatocellular carcinoma (HCC), derived from the parenchymal hepatocytes, and cholangiocarcinoma (CCA), which is derived from the cholangiocytes that form the bile ducts. Hepatic tumours are the third common cause of cancer-related death worldwide. In contrast with most types of cancer, the incidence and mortality of CCA have increased over the last decades.

Surgical resection is the best curative therapeutic approach for these tumours when applicable, however, in most cases, diagnosis is reached when tumours are already in an advanced stage, and this accounts for a significant reduction of the patients who are candidates for surgery.

Both HCC and CCA are characterized by low sensitivity to antitumoral chemotherapy due to the high efficacy of mechanisms of chemoresistance (MOC) present in tumour cells or acquired upon treatment. Among these MOC, the reduction in the intracellular concentration of drugs, caused by the alteration in the expression of proteins involved in the uptake or efflux of the drug, must be considered.

Sorafenib, a tyrosine kinase inhibitor (TKI), is the drug of choice in the treatment of advanced HCC. However, its beneficial clinical effect is very limited with a poor improvement in overall survival.

Because the molecular targets of sorafenib are some tyrosine kinase proteins located in the cytoplasm, it is absolutely necessary for this drug to cross the plasma membrane of target cells. However, owing to polar characteristics of sorafenib in aqueous solutions, its ability to be taken up by simple diffusion is very low. Accordingly, a transporter must be involved. In previous studies, our group has demonstrated that the human organic cationic transporter 1 (hOCT1, gen symbol *SLC22A1*) is the main carrier accounting for sorafenib uptake by liver cells. In cancer cells hOCT1 determines sorafenib antitumoral efficacy. Previous studies have reported a significantly reduced expression of hOCT1 in both HCC and CCA when compared to adjacent non-tumour cells. In addition, a high frequency of SNP mutations and enhanced aberrant splicing of hOCT1 was found in these tumours. These factors lead to diminished uptake of sorafenib and therefore reduced antitumor activity of this drug. However, the mechanisms of hOCT1 depletion in these tumours are poorly understood. Another important question that deserved to be addressed was whether the recovery of hOCT1 expression could reverse the resistance of HCC to sorafenib and enhance the clinical effect of the drug.

Taking this information in consideration, we defined as the **global aim** of this Doctoral Thesis to investigate the prognostic relevance of hOCT1 in the lack of response to sorafenib in patients with advanced HCC, and to evaluate the epigenetic and post-transcriptional factors as candidates involved in the low expression of hOCT1 in hepatic tumours.

In order to reach this objective, we designed five **partial aims**:

Aim 1: To evaluate in a retrospective study the relationship between the outcome of patients with HCC treated with sorafenib and hOCT1 expression and/or the correct localization at the plasma membrane of cancer cells.

Aim 2: To investigate *in vivo*, using different animal models, the OCT1 expression in HCC and CCA, and the role of OCT1 in sorafenib uptake by tumour cells.

Aim 3: To evaluate the relationship between sorafenib uptake by hOCT1 and its cytostatic activity using *in vitro* and *in vivo* models.

Aim 4: To evaluate the impact of epigenetic (DNA methylation, histone deacetylation, microRNAs) and post-transcriptional (RNA stability and degradation, alternative splicing) mechanisms involved in the lower expression of hOCT1 in liver tumours.

Aim 5: To evaluate gene therapy strategies to increase hOCT1 expression in tumour cells in order to sensitize them to sorafenib.

Summary

Hepatic cancers, mainly hepatocellular carcinoma (HCC) and cholangiocarcinoma (CCA), are the third leading cause of cancer related death worldwide (Torre LA *et al.*, 2016). Both types of tumours have a silent evolution and are characterized by a poor prognosis because, in most cases, they are diagnosed at an advanced stage, when surgical resection is not an option (Jensen LH *et al.*, 2011), and the currently available pharmacological treatments have a low beneficial effect on patient's outcome. Sorafenib, a tyrosine kinase inhibitor (TKI), is the first-line treatment in patients with advanced HCC, however, its effect on survival and tumour progression is limited due to the marked chemoresistance of these tumours (Llovet JM *et al.*, 2003).

The *SLC22A1* gene encodes the human organic cation transporter, hOCT1, involved in the uptake of many drugs, including TKIs (Minematsu T *et al.*, 2011). Cells expressing hOCT1 have an increased ability to take up sorafenib and a better response in dose-effect curves than cells with low hOCT1 expression (Herraez E *et al.*, 2013). However, it is well known that *SLC22A1* expression is diminished in both HCC and CCA due to genetic mutations and the presence of aberrant splicing variants (Herraez E *et al.*, 2013).

Several studies have reported epigenetics to be modified in many cancers. It is also known that higher DNA methylation of the promoter leads to lower gene expression. Among other genes, *SLC22A1* has been found to be methylated in HCC (Zolk O *et al.*, 2012), and an inverse correlation between promoter methylation and hOCT1 expression has been described (Schaeffeler E *et al.*, 2011). Aberrant splicing is also increased in cancer, leading to the production of non-functional proteins. Specifically, splicing variants of hOCT1 found in hepatic tumours generated truncated proteins that failed to transport sorafenib (Herraez E *et al.*, 2013).

In this Doctoral Thesis, we have investigated the role of *SLC22A1* in the chemoresistance to sorafenib in hepatic cancers and determined the involvement of epigenetic and post-transcriptional factors in the regulation of hOCT1 expression in these tumours. The work of this Doctoral Thesis included the following aspects:

1. A clinical retrospective study was conducted to determine the impact of hOCT1 expression and localization at the plasma membrane of tumour cells on the response of patients with HCC to sorafenib. Previous studies have demonstrated the correlation between the expression of hOCT1 and the sensitivity to sorafenib (Grimm D *et al.*, 2016) but, as mentioned, it has also been reported that aberrant splicing and SNPs lead to the generation of truncated protein variants of hOCT1 that usually are not localized in the plasma

membrane, thus cannot participate in sorafenib uptake, therefore we investigated in HCC samples whether the localization in the plasma membrane is a better prognostic marker than merely the expression of hOCT1 to predict the response to sorafenib in HCC. Our results have confirmed this hypothesis, since we found that the localization of hOCT1 at the plasma membrane was associated with a better response of patients to sorafenib while no significant correlation was found between hOCT1 global expression and the response to sorafenib. These results were published in *Oncotarget* (Geier A *et al.*, 2017).

2. Animal models of HCC and CCA, including *Fxr*^{-/-} mice that develop HCC spontaneously with age, and rat models of chemically induced HCC and CCA were used to confirm the importance of OCT1 in sorafenib uptake *in vivo*. After tumours were developed, animals received one dose of sorafenib and one hour later they were sacrificed to determine the biodistribution of the drug in tumour and adjacent non-tumour hepatic tissue and extrahepatic tissues by HPLC-MS/MS and to measure Oct1 expression by RT-QPCR in liver samples. The expression of Oct1 was markedly reduced in tumour tissues compared to the adjacent non-tumour tissues in both HCC and CCA models. Moreover, the lower expression of Oct1 was accompanied by significant diminished accumulation of sorafenib in tumours. These results confirmed the *in vitro* previously reported impact of hOCT1 expression on cell uptake of sorafenib.

3. The effect of restoring hOCT1 expression on the response to sorafenib in hepatic cancers was evaluated in models *in vitro* and *in vivo*. Stable expression of hOCT1 was obtained in HCC cell lines (HepG2-hOCT1 and HuH7-hOCT1) using lentiviral vectors encoding the ORF of both EGFP and hOCT1. Cells transduced with empty vectors (Mock) were used as control. The expression of hOCT1 was confirmed using RT-QPCR and western blot. The correct localization of the protein was confirmed by immunofluorescence and its function was analysed by measuring the capacity of cells to take up ¹⁴C-[TEA]. Once confirmed the presence of functional hOCT1 protein in HCC cell lines, we studied the effect of hOCT1 on both sorafenib uptake and efficacy. In both cell lines, hOCT1 expression was associated with a significant increase in the capacity to take up sorafenib. Furthermore, the presence of quinine, an inhibitor of hOCT1, reduced significantly sorafenib uptake only in cells transduced with hOCT1 but not in Mock cells, which confirm that sorafenib uptake was increased due to the presence of hOCT1. To determine the capacity of hOCT1 to sensitize cells to sorafenib, cells were incubated with sorafenib for 6 h in the presence or absence of quinine and 66 h later, cells viability was determined, and we observed that both HepG2-hOCT1 and HuH7-hOCT1 cells were significantly more sensitive to sorafenib treatment when compared with Mock cells. Taking these results in consideration we conducted an *in vivo* study to evaluate the effect of hOCT1 on sorafenib efficacy. HepG2-hOCT1 and Mock

cells were injected subcutaneously in immunodeficient nu/nu mice, and when tumours were formed, mice have received either sorafenib treatment or saline solution in the control group for 4 weeks. We found a remarkable response to sorafenib only in tumours derived from hOCT1 expressing cells, whereas no significant difference was observed in the growth of HepG2-hOCT1 or Mock derived cells. All our results have confirmed the important role of hOCT1 expression in the uptake and sensitivity of hepatic tumours to sorafenib.

Regorafenib is a TKI that is being investigated in clinical trials as second-line treatment in HCC patients that present low tolerance or reduced response to sorafenib. Because the molecular structures of regorafenib and sorafenib are very similar, we investigated *in vitro* (using Mock and hOCT1 HepG2 and HuH7 cells) the role of hOCT1 in the uptake and sensitivity to regorafenib. However, no difference was found in cell uptake or sensitivity to regorafenib between Mock and hOCT1-expressing cells. Our results indicate that hOCT1 do not play a role in the uptake of regorafenib.

4. Investigation of the epigenetic and post-transcriptional mechanisms including RNA binding proteins, DNA methylation, miRNAs and aberrant splicing as possible causes of the loss of hOCT1 expression in HCC and CCA. Analysis of the TCGA data showed a negative correlation between hOCT1 expression and DNA methylation in HCC and CCA; furthermore, treating HCC and CCA cell lines with decitabine, a DNMT inhibitor, induced a significant increase in hOCT1 expression, which suggest that DNA methylation of hOCT1 promoter is involved in hOCT1 deficiency in hepatic cancers. To study the role of histone deacetylation HCC and CCA cell lines were treated with histone deacetylase inhibitors (sodium butyrate, phenyl butyrate and trichostatin A). We found a positive effect of sodium butyrate on hOCT1 expression, a variable effect of phenyl butyrate among different cell lines but no modification on hOCT1 expression levels after trichostatin A treatment.

In silico study was carried out to select miRNAs that could target hOCT1, we found 5 miRNAs that reached the highest score in the selection process criteria (hsa-mir-141, hsa-mir-330, hsa-mir-769, hsa-mir-1287 and hsa-mir-1468). We have added to this list hsa-mir-6806 as it was reported as a predicted miRNA that target hOCT1 (Hyrsova L *et al.*, 2016). Using lentiviral vectors, a stable expression of these miRNAs was obtained in HepG2 cells. Short hairpin against Luc2 (sh-Luc2) was used as negative control and sh-hOCT1 was used as positive control to reduce hOCT1. Among the six miRNAs assayed hsa-mir-141 displayed a tendency to inhibit the hOCT1 expression, and both hsa-mir-330 and hsa-mir-1468 induced a marked decrease in hOCT1 mRNA levels, which was similar to that induced by sh-OCT1. Similar experiments were carried out in CCA using EGI1 cells and we found a

consistency inhibition of hOCT1 mRNA expression upon the overexpression of these 3 miRNAs.

To quantify the importance of aberrant splicing in overall expression/function of hOCT1 in HCC and CCA two approaches were conducted: first, we performed in paired samples of HCC and adjacent non-tumour tissue two RT-QPCR, one specific for the wild type sequence of hOCT1 and the other one to determine total hOCT1 mRNA isoforms. In the second approach, we evaluated the presence of splicing variants in HCC and CCA using specific primers to amplify the hOCT1 amplicon between the exons 6 and 11 and the length of the amplified fragment was used to identify the presence of wild type and splicing variants of hOCT1. Measurement by densitometry of the abundance of splicing variants indicated higher proportion of aberrant forms in HCC and CCA than in healthy liver. However, enhanced aberrant splicing was detected in both tumour and adjacent non-tumour tissue and was absent only in the healthy liver. These results suggest the aberrant splicing is a major mechanism beyond the low levels of functional hOCT1 in hepatic cancers moreover it is observed in pre-tumour cirrhotic tissue.

Conclusions

First conclusion:

Detection of hOCT1 at the plasma membrane of liver tumour cells is a good prognostic marker, better than hOCT1 mRNA determination, to predict the response to sorafenib.

Second Conclusion:

Using *in vivo* experimental models of both HCC and CCA, a reduced OCT1 expression was observed, which was associated with diminished uptake of sorafenib by these tumours, as compared to the adjacent non-tumour tissue, which have higher expression levels of this transporter. Therefore, we can suggest that the decrease expression of hOCT1 is a mechanism of chemoresistance to sorafenib and other drugs that are substrates of this transporter.

Third Conclusion:

Overexpressing hOCT1 in HCC derived cells, leads to increase their capacity to uptake sorafenib, and augment their sensitivity to this drug. In the *in vivo* subcutaneous xenograft model in immunodeficient mice, tumours generated by cells with hOCT1 overexpression have shown a better response to sorafenib when compared with the tumours with lower expression of this transporter.

Fourth Conclusion:

The low expression of hOCT1 in hepatic tumours, both HCC and CCA, can be due in part to epigenetic mechanisms, such as the hypermethylation of *SLC22A1* promoter, the activity of histone deacetylases, which seems to have less effect on hOCT1 expression. Moreover, miRNAs that are overexpressed in hepatic tumours, such as hsa-mir-330, play an important role as suppressors of hOCT1 expression.

Fifth Conclusion:

Alternative splicing of hOCT1 seems to be increased in hepatic tumours. Surprisingly, aberrant splicing was also found to be elevated in the adjacent non-tumour tissue. The generation of aberrant isoforms of mRNA splicing participates in the lower activity of hOCT1, while it leads to the formation of truncated non-functional proteins. Moreover, there are no sufficient evidences to support the lack of involvement of AUBPs that modulate RNA stability in the expression regulation of hOCT1 in these tumours.

References

- Geier, A., R. I. Macias, D. Bettinger, J. Weiss, H. Bantel, D. Jahn, R. Al-Abdulla and J. J. Marin (2017). "The lack of the organic cation transporter OCT1 at the plasma membrane of tumor cells precludes a positive response to sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma." *Oncotarget* 8(9): 15846-15857.
- Grimm, D., J. Lieb, V. Weyer, J. Vollmar, F. Darstein, A. Lautem, M. Hoppe-Lotichius, S. Koch, A. Schad, J. M. Schattenberg, M. A. Worns, A. Weinmann, P. R. Galle and T. Zimmermann (2016). "Organic Cation Transporter 1 (OCT1) mRNA expression in hepatocellular carcinoma as a biomarker for sorafenib treatment." *BMC Cancer* 16: 94.
- Herraez, E., E. Lozano, R. I. Macias, J. Vaquero, L. Bujanda, J. M. Banales, J. J. Marin and O. Briz (2013). "Expression of SLC22A1 variants may affect the response of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma to sorafenib." *Hepatology* 58(3): 1065-1073.
- Jensen, L. H. and A. Jakobsen (2011). "Combining biological agents and chemotherapy in the treatment of cholangiocarcinoma." *Expert Rev Anticancer Ther* 11(4): 589-600.
- Llovet, J. M. and J. Bruix (2003). "Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival." *Hepatology* 37(2): 429-442.
- Minematsu, T. and K. M. Giacomini (2011). "Interactions of tyrosine kinase inhibitors with organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion proteins." *Mol Cancer Ther* 10(3): 531-539.
- Schaeffeler, E., C. Hellerbrand, A. T. Nies, S. Winter, S. Kruck, U. Hofmann, H. van der Kuip, U. M. Zanger, H. Koepsell and M. Schwab (2011). "DNA methylation is associated with downregulation of the organic cation transporter OCT1 (SLC22A1) in human hepatocellular carcinoma." *Genome Med* 3(12): 82.
- Torre, L. A., R. L. Siegel, E. M. Ward and A. Jemal (2016). "Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 25(1): 16-27.
- Zolk, O. and M. F. Fromm (2012). "Drug transporter regulation in tumors by DNA methylation." *Genome Med* 4(1): 10.

REVIEW ARTICLE

Molecular Bases of Chemoresistance in Cholangiocarcinoma

J.J.G. Marin^{1,2,*}, E. Lozano^{1,2}, O. Briz^{1,2}, R. Al-Abdulla¹, M.A. Serrano^{1,2} and R.I.R. Macias^{1,2}

¹Laboratory of Experimental Hepatology and Drug Targeting (HEVEFARM), Biomedical Research Institute of Salamanca (IBSAL), University of Salamanca, Salamanca, Spain; ²Centre for the Study of Liver and Gastrointestinal Diseases (CIBERehd), National Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain

ARTICLE HISTORY

Received: December 03, 2014
Revised: February 17, 2015
Accepted: February 17, 2015

DOI:
10.2174/1389450116666150223121508

Abstract: The multidrug resistance (MDR) phenotype accounts for the poor response of cholangiocarcinoma to available antitumor drugs. This is an important limitation to the use of pharmacological approaches, both as adjuvant therapies and for treating advanced CCA when surgical removal is not possible. MDR is the result of a complex combination of defense mechanisms against toxic compounds already present in cholangiocytes, which play a role in the physiology of these cells by protecting the biliary epithelium from the toxins reaching the biliary tree with the blood that perfuses this tissue, or that are secreted by hepatocytes into bile, to which cholangiocytes are exposed. These mechanisms of chemoresistance (MOC) are also present, usually with enhanced efficacy, in tumors derived from cholangiolar cells. The present review article is an update of the state-of-the-art regarding the MOC involved in the poor response of CCA to antitumor drugs. These MOC have been classified as: changes in the amount of drug in the cells due to decreased uptake (MOC-1a) or enhanced efflux (MOC-1b); altered proportions between prodrug, active drug and inactive metabolites (MOC-2); changes in the molecular targets of antitumor drugs (MOC-3); an enhanced ability of tumor cells to repair drug-induced DNA damage (MOC-4), and an impaired apoptosis/survival balance (MOC-5).

Keywords: Chemotherapy, drug metabolism, drug transport, liver cancer, pharmacology, treatment, tumor.

1. INTRODUCTION

The mechanisms of defense against toxic compounds that reach the biliary tree with the blood that perfuses this tissue or that are secreted into bile by hepatocytes protect normal cholangiocytes against chemical stress. Similar mechanisms, in some cases with enhanced efficacy, are also present in tumors derived from cholangiolar cells resulting in the so-called multidrug resistance (MDR) phenotype. This is an important limitation for the use of pharmacological approaches, both as adjuvant therapies and for treating advanced CCA when surgical removal is not possible. Several studies have attempted to characterize the genetic fingerprint of chemoresistance in CCA [1, 2].

The present review article is an update of the state-of-the-art regarding the MOC involved in the poor response of CCA to antitumor drugs. These MOC have been classified as: changes in the amount of drug in the cells due to reduced uptake (MOC-1a) or enhanced efflux (MOC-1b); altered proportions between prodrug, active drug and inactive metabolites (MOC-2); changes in the molecular targets of antitumor drugs (MOC-3); an enhanced ability of tumor cells to

repair drug-induced DNA damage (MOC-4), and an impaired apoptosis/survival balance (MOC-5).

2. MECHANISMS OF CHEMORESISTANCE TYPE 1A. TRANSPORTERS

Uptake by tumor cells is required for the effectiveness of most anticancer drugs. Accordingly, changes in the expression and/or activity of the transporters involved in this process usually result in a lower response to chemotherapy (MOC-1a). The transporters that account for the transfer of anticancer drugs across the plasma membrane belong to the family of solute carrier (SLC) proteins. Although the role of these transporters in the chemoresistance of CCA is poorly understood, some data are available (Table 1).

Organic anion-transporting polypeptides (OATPs) are plasma membrane transporters (*SLCO* genes) able to transport a large variety of endogenous and xenobiotic compounds, including many drugs [3]. OATP1A2 (gene symbol *SLCO1A2*) mediates the cellular uptake of anticancer drugs, including methotrexate, taxanes, and imatinib [3]. In some types of tumors, determination of the expression levels of OATP1A2 has been proposed as a potential biomarker to predict the response to taxane-based chemotherapy [4]. OATP1A2 is expressed in normal cholangiocytes, where it may carry out the reabsorption of xenobiotics secreted into bile by hepatocytes. Interestingly, OATP1A2 expression is

*Address correspondence to this author at the Laboratory of Experimental Hepatology and Drug Targeting (HEVEFARM), Biomedical Research Institute of Salamanca (IBSAL), University of Salamanca, Salamanca, Spain; Tel/Fax: +34-663182872 / +34-923294669; E-mail: jjgmarin@usal.es

Table 1. Mechanisms of chemoresistance (MOC) types 1a and 1b affecting the response of cholangiocarcinoma to antitumor drugs.

MOC	Proteins Involved	Drugs Affected
1a	OATP1A2	Methotrexate, taxanes, imatinib
1a	OATP1B1, OATP1B3	Irinotecan
1a	OCT1, OCT3	Sorafenib
1a	ENT1, CNT1	Gemcitabine, 5-fluorouracil
1a	CTR1	Platinum derivatives
1a	NIS	¹³¹ I
1a	PEPT1	δ-Aminolevulinic acid derivatives
1b	MDR1	Doxorubicin, etoposide, paclitaxel, vinblastine
1b	MRP1	Doxorubicin, vincristine, etoposide, heavy metal anions
1b	MRP3	Etoposide, doxorubicin, pirarubicin
1b	MRP4	Tyrosine kinase inhibitors (TKIs)
1b	MRP5	Nucleoside derivatives
1b	BCRP	Oxazaphosphorines, methotrexate, glutamylated methotrexate derivatives, tamoxifen, doxorubicin, mitoxantrone, irinotecan, topotecan, etoposide, imatinib
1b	ATP7A, ATP7B	Platinum derivatives

lower in CCA than in adjacent healthy liver tissue [5]. In addition, there are genetic variants of OATP1A2, such as p.Glu172Asp, p.Arg168Cys and p.Asn277del, that result in altered transport function and may contribute to interindividual differences in the disposition of drugs that are substrates for this transporter [6]. Whether the expression and function of OATP1A2 play an important role in the reduced sensitivity of CCA to antitumor drugs is not known.

OATP1B1 (*SLCO1B1*) and OATP1B3 (*SLCO1B3*) are able to transport a wide variety of anticancer drugs [3]. Both isoforms are polymorphic. Many genetic variants resulting in altered drug transport have been identified and characterized *in vitro*. Regarding antitumor drugs, irinotecan pharmacokinetics has been reported to be altered in patients with cancer harboring the p.Val174Ala variant of OATP1B1 or *SLCO1B1**15 [7]. A reduction in OATP1B1 and OATP1B3 expression or functionality appears to account for the lower accumulation of drugs that are substrates for these transporters in hepatocellular carcinoma [8]. The situation may be similar in the case of CCA, where a decrease in the expression of OATP1B1 and OATP1B3 has also been described [1, 5].

Cationic anticancer drugs such as platinum derivatives and tyrosine kinase inhibitors (TKIs) are taken up *via* organic cation transporters (OCT). Among these, OCT1 (*SLC22A1*) and OCT3 (*SLC22A3*) are expressed in cholangiocytes. A marked reduction in the expression or function of OCT1 due to the presence of inactivating mutations in CCA has been associated with a reduced OCT1-mediated sorafenib uptake and hence lower sensitivity to this drug [9]. Although in CCA a down-regulation of OCT3 has also been

found [10], the role of this transporter in the sensitivity of CCA to TKIs is not known.

One of the most efficient anticancer drugs used in the treatment of CCA is the nucleoside analog gemcitabine (2',2'-difluorodeoxycytidine). High-affinity concentrative nucleoside transporters (CNTs) and low-affinity equilibrative nucleoside transporters (ENTs) belonging to the SLC28 and SLC29 families of transporters, respectively, are involved in gemcitabine uptake [11]. Low ENT1 (*SLC29A1*) expression is considered to be a predictive biomarker of chemoresistance to gemcitabine in patients with advanced CCA treated with this drug as an adjuvant to surgery [12] or in patients who have received gemcitabine as first-line treatment [13]. Moreover, ENT1 has also been found to be down-regulated in 5-fluorouracil (5-FU)-resistant CCA cell lines [14]. Since CNT1 (*SLC28A1*) is also down-regulated in these tumors [1], it is possible that this transporter could also be involved in the chemoresistance of CCA to the same drugs.

The copper transporter CTR1 (*SLC31A1*) is able to transport platinum derivatives. As occurs in some other types of cancer [15], the reduction in CTR1 expression observed in CCA [1] may result in enhanced chemoresistance to platinum derivatives.

Radioiodine therapy with ¹³¹I has been proposed as therapy for CCA due to the expression of the sodium-iodide symporter NIS (*SLC5A5*) at the plasma membrane of cholangiocytes. However, the decreased expression of this transporter in CCA cells may account for their poorer sensitivity to this drug [16].

Changes in the expression of the H⁺/peptide cotransporter PEPT1 (*SLC15A1*) account for differences in the accumulation and response of CCA to δ -aminolevulinic acid derivatives used in photodynamic therapy [17].

3. MECHANISMS OF CHEMORESISTANCE TYPE 1B. EXPORT PUMPS

Regarding MOC-1b, several members of the superfamily of ABC proteins are involved in the efflux of a large variety of anticancer drugs from tumor cells [18] (Table 1). Although the over-expression of these pumps is one of the major causes accounting for the MDR phenotype, information about the expression of ABC proteins in CCA remains limited.

The ABCB family includes the prototype of MDR proteins, *i.e.*, ABCB1, also known as P-glycoprotein or MDR1. This is expressed at the apical membrane of normal polarized cells in liver and other tissues [19]. It is expressed in normal cholangiocytes [20] and, at high levels, in some CCA cell lines [21]. It is also expressed in gallbladder carcinoma tissue [22], where this pump has been suggested to play a role in its marked MDR phenotype [22, 23]. In this sense, ABCB1 is able to export a large variety of anticancer drugs such as doxorubicin, etoposide, paclitaxel and vinblastine [24, 25].

The ABCC family includes several transporters known as multidrug resistance-associated proteins (MRPs). The expression of these genes has also been implicated in the chemoresistance of biliary tumors. *In vitro* studies have found the expression of MRP1, MRP2 and MRP3, albeit at different levels, in all CCA cell lines [21]. However, clinical studies have reported that MRP2 is undetectable in CCA and only weakly expressed in a low proportion of gallbladder carcinomas, suggesting that this MRP isoform does not play a major role in the MDR phenotype of biliary tract cancer [26]. The lack of MRP2 expression in CCA is not surprising, owing to the absence of this protein in normal cholangiocytes [27]. In contrast, MRP1 and MRP3 have been found to be over-expressed in most biliary tumors analyzed [26, 28]. Although the actual impact in chemoresistance of the higher relative expression of MRP1 in CCA as compared with adjacent non-tumoral tissue is not known, based on the above evidence, the use of MRP1 substrates, such as doxorubicin [29], vincristine [30], etoposide and some heavy metal anions [31], is not recommended [28, 32]. Regarding the future, MRP1 silencing has been suggested as a strategy to increase cisplatin-induced apoptosis in gallbladder cancer cells [33, 34].

The role of MRP3 in the multidrug resistance phenotype of CCA is supported by the *in vitro* observation that MRP3 mRNA expression levels in CCA cells are inversely correlated with their sensitivity to etoposide, doxorubicin and pirarubicin [21].

Other members of the ABCC family, such as MRP4 and MRP5, are also over-expressed in CCA [1]. Both MRP4 and MRP5 can play a role in CCA chemoresistance by exporting TKIs and nucleoside derivatives, respectively [2].

The ABCD, ABCE and ABCF families do not contain members of known clinical relevance in respect of drug re-

sistance. In contrast, the ABCG family includes ABCG2, also known as BCRP (breast cancer resistance protein), which is involved in chemotherapeutic failure in many tumors [35], in which this pump may account for the extrusion of a large variety of anticancer drugs, such as oxaphosphorines [36], methotrexate [37], glutamylated methotrexate derivatives [38], tamoxifen [39], doxorubicin [40], mitoxantrone [40], irinotecan [41], topotecan [41, 42], etoposide [43] and imatinib [44]. Owing to its high capacity to transport anticancer drugs, the expression of ABCG2 constitutes an important problem in cancer chemotherapy [45]. More precisely, ABCG2 is expressed at similar levels both in healthy bile ducts and CCA [1, 46]. However, the importance of ABCG2 in CCA chemoresistance is not well known; on one hand, some studies have reported that ABCG2 expression could be regulated by the transcriptional co-activator amplified in breast cancer 1 (AIB1) that is frequently found overexpressed in human CCA specimens and CCA cell lines, promoting the chemoresistance of CCA cells due to an accelerated drug efflux [47]. In contrast, other reports have indicated that in advanced gallbladder carcinoma tissue, and also in poorly differentiated CCA, a fraction of ABCG2 protein cannot work as a plasma membrane efflux pump because it is found in the intracellular compartment [46].

Other non-ABC proteins may also be involved in drug efflux. Thus, Menkes (ATP7A) and Wilson (ATP7B) copper-transporter proteins are able to export platinum-derived drugs [48]. In clinical samples, the mRNA expression levels of both pumps in CCA tumors are similar to those found in adjacent non-tumoral tissue [1]. Several studies have reported an up-regulation of these pumps in CCA cells following chronic exposure to cisplatin [49].

4. MECHANISMS OF CHEMORESISTANCE TYPE 2. METABOLISM

CCA cells can inactivate anticancer drugs by over-expressing detoxifying enzymes, including phase I enzymes such as cytochrome P450-related enzymes, or phase II enzymes, such as those involved in conjugation with glucuronic acid or with glutathione (Table 2). Gemcitabine is one of the most important cytidine analogues with antitumor activity [50] and is used in combination with platinum derivatives in the treatment of CCA [51, 52]. The enzyme cytidine deaminase (CDA) metabolizes gemcitabine to yield the inactive metabolite, 2',2'-difluorodeoxyuridine (dFdU), which is excreted into urine [53]. This has prompted investigators to explore whether CDA might be useful as a prediction factor of gemcitabine sensitivity. However, the expression of the CDA gene in CCA is not different in gemcitabine-sensitive and -resistant cells, suggesting that CDA expression does not effectively predict sensitivity to this drug [54]. 5-FU has also been widely used as part of anti-tumor chemotherapy for the treatment of CCA. Data obtained from clinical studies have revealed relatively poor response rates of CCA to 5-FU-based regimens. In cells, 5-FU is transformed into several metabolites; thus, it must be activated to FdUMP, which inhibits thymidylate synthase, through a complex process in which several enzymes such as thymidine phosphorylase (TP), uridine phosphorylase (UP) and orotate phosphoribosyl transferase (OPRT) are involved. Whether changes in the expression/activity of any of these enzymes account for the

reduced sensitivity of CCA to 5-FU is not known. Furthermore, dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), which is the rate-limiting enzyme in the degradation of 5-FU, is a strong factor in determining the effect of 5-FU [55]. Thus, 80% of 5-FU administered is normally inactivated by DPD, mainly in the liver, where this enzyme is predominantly expressed [56]. When DPD is over-expressed in tumor cells, 5-FU resistance is enhanced [57]. Although high levels of DPD have been detected in biliary tract cancer compared with non-tumoral tissues [58], no clear relationship between DPD mRNA levels and 5-FU sensitivity in either CCA cell lines [21] or CCA patients [59] has been found. This may partly be due to the existence of genetic polymorphisms - 39 genetic variants have been identified in the human DPD gene [60]. The most frequent one is the intronic mutation or intervening sequence (IVS) that leads exon 14 (c.IVS14+1G>A) to be skipped, which results in an inactive protein [61]. The lack of response to 5-FU may be also due to reduced drug activation. Down-regulation or impaired activity of the enzymes TP, UP and OPRT have been associated with poorer responses to treatment with 5-FU [62]. Thus, the levels of OPRT mRNA in CCA from 5-FU-responder patients is significantly higher than those detected in tumors from non-responders, suggesting that determination of OPRT expression could be used to predict the response of CCA to 5-FU [59].

Table 2. Mechanisms of chemoresistance (MOC) type 2 affecting the response of cholangiocarcinoma to anti-tumor drugs.

MOC	Proteins Involved	Drugs Affected
2	CDA	Gemcitabine
2	DPD, TP, UP, OPRT	5-Fluorouracil
2	CYP3A4	Erlotinib, sunitinib, sorafenib
2	UGT1A1	Irinotecan, SN-38, etoposide
2	UGT1A9	Sorafenib
2	GSTP1	Cisplatin, oxaliplatin, carboplatin, etoposide, doxorubicin
2	MTs	Irinotecan

CYPs are an important family of more than 60 enzymes that catalyze the oxidation of endogenous and exogenous compounds, accounting for 80-90% of the phase I reactions involved in drug metabolism. These include the activation and inactivation of anticancer drugs [63]. Although owing to their importance there is a large body of information regarding the role of CYPs in chemoresistance, our knowledge is very scant as regards CCA. For instance, one of these enzymes, CYP3A4, is involved in resistance to drugs, such as erlotinib, sunitinib and sorafenib, that are potentially useful in CCA treatment [64].

The uridine diphosphate glucuronosyltransferases (UGT) constitute a superfamily of conjugating enzymes that favor

the excretion of several molecules by transferring one moiety of glucuronic acid to their substrates. Some anticancer drugs are substrates of UGTs; for example, irinotecan (SN-38) or etoposide [65, 66] can be biotransformed by UGT1A1, whereas UGT1A9 is involved in sorafenib metabolism [67]. However, the expression levels and the presence of genetic variants of these enzymes in CCA patients remain unknown.

Conjugation with glutathione by glutathione-S transferases (GSTs) plays an important role in cellular defense against many endogenous and xenobiotic toxic compounds, including many anticancer drugs such as platinum derivatives, e.g., cisplatin, oxaliplatin and carboplatin [68]. Accordingly, enhanced GST-dependent conjugating activity may result in a higher degree of chemoresistance to anticancer drugs [69]. Among the GST isoforms, GSTP1 has been associated with drug resistance in several types of cancers, including CCA [21, 70, 71]. Indeed, GSTP1 mRNA levels are very high in CCA cells, which may account for their marked insensitivity to chemotherapeutic drugs [21]. Some polymorphisms in GSTP1 that lead to amino acid substitutions in the active electrophile-binding site of the enzyme are of particular relevance for the pharmacogenetics of etoposide, doxorubicin, cisplatin, oxaliplatin and carboplatin [72]. Regarding other GST isoforms, such as GSTM3 and GSTM4, these are up-regulated in gemcitabine-resistant cells. However, although gemcitabine is a drug commonly used in the treatment of CCA, inconclusive results have been reported regarding the expression of GSTM3 and GSTM4 in CCA chemoresistant cells [54].

Metallothioneins (MTs) are thought to play a role in the neutralization of toxic heavy metals. MT overexpression has been shown to be associated with irinotecan resistance in gastric cancer [73]. In addition, MT overexpression has been reported in gallbladder carcinoma [74], intrahepatic CCA and Klatskin tumors [75]. Accordingly, it has been suggested that the determination of MT expression may be useful to predict the response to chemotherapy in CCA [75].

5. MECHANISMS OF CHEMORESISTANCE TYPE 3. TARGETS

The efficacy of anticancer drugs may be reduced by changes in their molecular targets (Table 3). Several studies have analyzed the expression levels and the presence of genetic variants of these genes regarding the clinical outcomes of CCA patients in order to identify key factors that could permit the selection of patients with the highest likelihood of responding to a specific pharmacological regime.

The enzyme thymidylate synthase (TS) is the target of the antimetabolite 5-FU. *In vitro* assays conducted in human biliary tract carcinoma cell lines and other human digestive carcinoma cell lines have demonstrated that the resistance to 5-FU is associated with increased TS activity [76]. This issue is somewhat controversial because one *in vitro* study carried out on CCA cell lines obtained from patients from endemic areas of parasitic infection by *Opisthorchis* failed to find any relationship between TS mRNA levels and sensitivity to 5-FU [21]. In contrast, in a different study on the mechanisms underlying 5-FU resistance of CCA a trend towards enhanced TS expression was found in cell lines derived from CCA associated with liver fluke infection [14]. The authors

of a drug-response assay carried out using tumor tissue obtained from intrahepatic CCA concluded that TS mRNA levels could not predict the success of 5-FU chemotherapy [59]. This concept was further supported by *in vivo* studies, in which the determination of TS mRNA in tumors resected surgically from patients with intrahepatic CCA revealed no correlation between expression and prognosis [77]. In contrast, a phase II trial in patients with incurable biliary cancer treated with gemcitabine plus capecitabine reported that the longest overall survival was found in patients with the TS 5'GC polymorphism, *i.e.*, double (2R) or triple (3R) 28-bp tandem repeats plus G>C substitution at the 12th nucleotide in the second repeat of the 3R allele (3RG>3RC) [78]; this results in decreased RNA stability and hence a lower transcriptional activity of TS. Moreover, the authors of a recent study have suggested that simvastatin enhances the chemotherapeutic efficacy of 5-FU and S-1 regimen (a combination of tegafur, oteracil and gimeracil) in CCA cell lines by suppression of TS expression [79].

Table 3. Mechanisms of chemoresistance (MOC) types 3 and 4 affecting the response of cholangiocarcinoma to antitumor drugs.

MOC	Proteins Involved	Drugs Affected
3	TS	5-Fluorouracil
3	ER- β	5-Fluorouracil, gemcitabine, tamoxifen
3	EGFR	Erlotinib, cisplatin, 5-FU, gemcitabine
3	IGF-1R	Gemcitabine
3	mTOR	Rapamycin derivatives
4	ERCC1	Cisplatin
4	UNG1	5-Fluorouracil
4	RAD51	Cyclophosphamide, epirubicin, docetaxel
4	MutS (MSH2, MSH3, MSH6)	Cisplatin, 5-FU
4	MutLa (hMLH1, PMS2)	Cisplatin, 5-FU
4	p53R2	Gemcitabine
4	TLK1	Cisplatin

Estrogen receptor (ER) expression has been detected in human CCA cell lines [80, 81] and human biopsies of intrahepatic CCA [81], with over-expression of both the ER- α and ER- β subtypes. Analysis of ER- α and ER- β in resected gallbladder carcinomas from patients receiving postoperative adjuvant chemotherapy with 5-FU or gemcitabine revealed that the presence of ER- β was an independent prognostic factor associated with the survival rate [82]. The administration of estrogen modulators, such as tamoxifen, may offer an alternative adjuvant treatment for CCA, because tamoxifen causes a dose-dependent inhibition of CCA cell growth both

in vitro and *in vivo* [80]. The loss of ER- β expression in cancer cells has been associated with methylation of the ER- β promoter and the lack of response to tamoxifen [83], but it is less frequent in CCA. A recent study in rodents with thioacetamide-induced intrahepatic CCA has confirmed the effectiveness of using selective ER- β agonists, such as KB9520, and it was proposed that the mechanism of tumor growth inhibition would be the induction of apoptosis [84].

The epidermal growth factor receptor (EGFR), a membrane tyrosine kinase (TK) receptor, is the target of some antitumor drugs, such as erlotinib, or specific monoclonal antibodies, such as cetuximab. Up-regulation of EGFR has been reported as the mechanism accounting for the development of chemoresistance to erlotinib in HuCCT1 cells derived from biliary tract cancer [85]. This was supported by the results of a retrospective immunohistochemical analysis of 236 CCA samples, which demonstrated that EGFR over-expression is a significantly poor prognostic factor in patients with intrahepatic but not extrahepatic CCA [86]. Using the SCK cell line, obtained from a Korean patient with intrahepatic CCA, and the SCK^R subline with acquired resistance to cisplatin, 5-FU, and gemcitabine, after long-term exposure of the cells to cisplatin, the phosphorylation status of 42 TK receptors was analyzed [87]. The results suggested that chemoresistance in SCK^R cells involves changes in EGFR signaling and the L1 cell adhesion molecule (L1CAM) [87]. Another study in formalin-fixed paraffin-embedded tumor samples obtained from patients with resected CCA and treated with gemcitabine-based chemotherapy investigated the prognostic values of several biomarkers in relationship to overall survival. Only the expression levels of EGFR, heparanase and fms-related tyrosine kinase 1 (FLT1) were significantly associated with survival [88].

Insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF-1R) is a TK receptor that can be activated by its ligands IGF-1, IGF-2 or by insulin at supraphysiological concentrations, and may contribute to tumor angiogenesis through the up-regulation of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in certain types of tumors [89, 90]. The existence of an over-expression of IGF-1R and its ligands in human CCA cell lines and CCA tumor biopsies, as well as in gallbladder carcinoma samples, has been reported [81, 91, 92]. Different strategies have been proposed to inhibit IGF-1R function, such as the use of antibodies against the receptor or its ligands [93, 94] or treatment with small molecules with inhibitory activity, such as NVP-AEW541, which has been shown to be active against biliary tract cancer cells *in vitro* and to potentiate the efficacy of gemcitabine [92].

The mammalian target of rapamycin (mTOR), a protein kinase involved in the control of cell growth, is the key downstream signaling molecule of the AKT1 pathway and is the target of rapamycin (sirolimus) and its derivatives. A recent study carried out in patients with CCA described a significantly higher 5-year overall survival rate for patients whose tumors over-expressed phosphorylated mTOR and phosphorylated AKT1 [95]. The analysis by immunohistochemistry of the expression of several members of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway in 30 patients with CCA revealed a significant correlation between mTOR expression levels and the presence of metastasis [96].

6. MECHANISMS OF CHEMORESISTANCE TYPE 4. DNA REPAIR

The mechanism of action of many anticancer drugs is based on their ability to damage the genetic material of dividing cells, which occurs through either direct interaction with the DNA structure, as happens with cisplatin, or indirectly, as is the case for 5-FU. The cellular response to DNA damage is either to try to repair it or to activate apoptosis when the injury is very severe. Thus, tumor cells exposed to genotoxic agents must repair DNA to survive or tolerate the injury. Accordingly, chemoresistance to DNA-damaging drugs may be due to an enhancement in these abilities (Table 3). Depending on the type of DNA damage, a variety of repair strategies are available in the cell to preserve its genome integrity. Upon detection, DNA damage can be repaired directly by specific DNA-repairing enzymes or it may result in the activation of enzymatic repair systems involving several activated protein cascades; *i.e.*, nucleotide- and base-excision repair (NER, BER), DNA mismatch repair (MMR), and recombination repair.

The NER system is an important excision mechanism that removes a wide variety of bulky DNA adducts, such as those generated by cisplatin and alkylating agents. The excision repair cross-complementing 1 protein (ERCC1) is an endonuclease that plays a crucial role in the NER system. Changes in the expression levels of ERCC1 have been associated with clinical chemoresistance to platinum derivatives in several human solid cancers such as hepatocarcinoma [97] and colon cancer [98]. Although ERCC1 expression is low in most biliary tract tumors, it has been found to be increased in a low number (5%) of these tumors [99]. ERCC1 has significant prognostic value in advanced biliary tract carcinoma patients treated with cisplatin. A survival benefit was observed in ERCC1-negative patients subjected to cisplatin-containing chemotherapy but not to oxaliplatin-containing treatments, which suggests that the mechanism of action involving ERCC1 in cisplatin-induced DNA damage may be different from that due to oxaliplatin [100].

The cytotoxic effect of 5-FU has mainly been attributed to the misincorporation of fluoronucleotides into DNA and RNA during their synthesis. The BER system, which is initiated by uracil-DNA glycosylase 1 (UNG1), is the major route for the repair of 5-FU-induced DNA lesions. Indeed, UNG1 up-regulation in 5-FU-resistant CCA cell lines has been found [14].

DNA double-strand breaks caused by several anticancer drugs can be efficiently repaired by homologous recombination. Proteins belonging to the RAD51 family play a major role in this process. High RAD51 expression has been associated with poor sensitivity to regimens containing cyclophosphamide, epirubicin and docetaxel in breast cancer [101]. RAD51 is elevated in the large majority of CCA [102], although a relationship between the RAD51 pathway and chemoresistance in CCA has not yet been established.

The MMR system is involved in the repair of single wrongly matched nucleotides or short insertions and deletions. The MutS (composed of MSH2, MSH3, and MSH6) and MutLα (composed of hMLH1 and PMS2) complexes of proteins can bind to the mismatch, recognize the correct

DNA strand, and then repair the error. Down-regulation of the *MSH2* or *MLH1* genes or impaired function of this system lead to a lack of ability to identify and repair DNA damage. Defects in the MMR machinery predispose cells to suffer genetic instability, which results in the so-called microsatellite instability (MSI) phenotype, characterized by a high rate of mutations. MSI has been observed in several types of cancer, including CCA [103]. A high prevalence of MSI has been reported in intrahepatic CCA induced by thorotrast (62% of tumors) [104], a radiocontrast agent containing thorium dioxide, and in liver fluke-related CCA (45% of cases) [105]. In patients with biliary tract cancers, a loss of *MLH1* expression by promoter hypermethylation may account for the MSI phenotype of the tumor [104]. Although MSI has been associated with resistance to cisplatin and 5-FU in other tumors, such as colon cancer [106, 107], this has not yet been investigated in CCA. However, a higher rate of inactivating mutations in genes encoding K-ras, p53 and MDM2, potentially involved in chemoresistance, due to this genomic instability has been found in CCA patients with an MSI phenotype [103].

The regulation of DNA repair mechanisms is carried out by multiple pathways, such as p53R2, a ribonucleotide reductase involved in supplying nucleotides to repair damaged DNA, which is regulated directly by p53. Increased expression of p53R2 has been proposed as a predictive marker for resistance to gemcitabine in CCA [54].

Tousled-like kinase 1 (TLK1), a serine/threonine protein kinase involved in the regulation of chromatin assembly and DNA repair pathways, is highly expressed in CCA tumors and CCA cell lines, and it plays a crucial role in the repair of cisplatin-induced DNA damage in CCA [108]. Thus, the silencing of TLK1 sensitizes CCA cells to cisplatin-induced apoptosis [108].

7. MECHANISMS OF CHEMORESISTANCE TYPE 5A. APOPTOSIS

The ability to escape apoptosis is typical of both the carcinogenic potential and the chemoresistance of many types of tumors, including CCA. Tumor cells can avoid drug-induced apoptosis either by the down-regulation or inactivation of proapoptotic mediators (MOC-5a) or by increasing the expression or activity of antiapoptotic factors (MOC-5b).

Regarding the first group of mechanisms, several lines of evidence support an important role of proapoptotic genes in the response of CCA to chemotherapy (Table 4). Some of them involve the mitochondrion-mediated pathway of apoptosis. The loss of function due to the presence of mutations or impaired expression of pro-apoptotic genes, such as *BAX*, *BAK* and those encoding caspases, may result in enhanced chemoresistance in CCA. Several studies have been conducted to overcome this situation, for example by Bax activation with drugs such as navitoclax [109]. The use of a combination of doxorubicin plus HMME-SDT (a therapy based on exposure of the lesion to ultrasound waves in combination with porphyrins to induce apoptosis) could help to overcome the limitations of each therapy alone in the treatment of CCA. This is because the combination is able to induce greater DNA damage and apoptosis, associated with higher levels of Bax, as well as other apoptotic factors, in-

Table 4. Mechanisms of chemoresistance (MOC) types 5a and 5b affecting the response of cholangiocarcinoma to antitumor drugs.

MOC	Proteins Involved	Involved Pathway	Changes in CCA	Example of Drug Affected
5a	Bax	Mitochondrial pathway	Down-regulated	Doxorubicin
5a	Bak	Mitochondrial pathway	Down-regulated	Doxorubicin
5a	Caspase 3	Mitochondrial pathway	Down-regulated	Oxaliplatin, 5-FU
5a	Caspase 9	Mitochondrial pathway	Down-regulated	Oxaliplatin, 5-FU
5a	Caspase 8	Extrinsic pathway	Down-regulated	Cisplatin
5a	Fas	Extrinsic pathway	Down-regulated	Doxorubicin
5a	P21	Cell cycle check point	Down-regulated	Doxorubicin, gemcitabine
5b	PI3K-AKT	Survival pathway	Up-regulated	Oxaliplatin, cisplatin, 5-FU
5b	RAF-MEK-ERK	Survival pathway	Up-regulated	Oxaliplatin, cisplatin, 5-FU
5b	ERK	Survival pathway	Up-regulated	Sorafenib, 5-FU
5b	Bcl2	Mitochondrial pathway	Up-regulated	Cisplatin, 5-FU, doxorubicin

cluding Fas and p53, and with a decrease in the anti-apoptotic factor Bcl-2 [110]. Another combination, oxaliplatin and exendin-4, has been associated with an increase in caspase 3 protein expression and the induction of apoptosis in CCA cells [111].

The role of NK4, an antagonist for hepatocyte growth factor (HGF) and the Met receptor, in regulating the response of CCA cells to 5-FU has been investigated [112]. NK4 was found to enhance 5-FU-induced caspase 3 and caspase 9 activation. Accordingly, the down-regulation of NK4 in response to 5-FU may represent an intrinsic mechanism of resistance to this anticancer drug in CCA [112]. Bortezomib, a specific 26S proteasome inhibitor that inhibits CCA proliferation and induces caspase-dependent apoptosis, acts through an NF- κ B-independent pathway that involves caspases 4, 12, 8, 9, and 3 [113]. In CCA cells, one of the third generation of platinum-derived antitumor drugs, lobaplatin, has been found to increase the expression of Bax and caspase 3, as well as to up-regulate p53 [114]. Caspase activation in CCA is also increased in a Smad-dependent pathway through the enhancement of TGF- β -induced apoptosis [115]. Slug is a suppressor of PUMA (p53 up-regulated modulator of apoptosis), which plays an important role in controlling apoptosis. Thus, another approach to induce apoptosis suggests the use of RNAi targeting Slug in order to sensitize CCA to cisplatin through the up-regulation of PUMA [116].

Regarding the extrinsic pathway of apoptosis, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is a promising target for CCA therapy [117]. However, many CCA cells are resistant to TRAIL-mediated apoptosis. When several cell lines derived from CCA were studied, some of them, such as KKKU-M139 and HuCCA-1 cells were found to be resistant to TRAIL therapy. In these cells, triptolide was able to sensitize these cells to TRAIL-induced apoptosis [118]. Moreover, a high expression of miR-25, whose target

is TRAIL death receptor-4 (DR4), protects CCA cells against TRAIL-induced apoptosis [119]. E3 ubiquitin-protein ligase X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP, IAP3 or BIRC4) inhibits caspases 3 and 9 as well as the TRAIL pathway. Accordingly, increased activity of XIAP in CCA cells can enhance chemoresistance [120]. The inhibition of CCA cell proliferation without affecting the apoptotic pathway can be induced by the XIAP antagonist embelin [120].

Both primary cholangiocytes and malignant CCA cells are highly resistant to Fas-mediated apoptosis [121]. The Fas-calmodulin interaction leads to the inhibition of Fas-mediated apoptosis and may be involved in chemoresistance in CCA [122]. This may also be a therapeutic target because some calmodulin antagonists, such as N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalene sulfonamide, tamoxifen, and trifluoperazine, strongly inhibit Fas-calmodulin interactions by blocking the Fas-binding site on calmodulin [122]. Additionally, Fas expression can be increased by certain strategies, such as combining doxorubicin and HMME-SDT [110].

Changes in the expression/function in proteins involved in cell cycle checkpoints can also affect responses to chemotherapy. Thus, the tumor suppressor protein p53 (*TP53* gene) plays an important role in the survival/apoptosis balance in many cancers, including CCA. The presence of mutations in *TP53* has been suggested as a predictor of the outcome of patients with CCA [123]. Enhanced induction of apoptosis, in part by increasing p53 expression, constitutes the mechanism of action of antitumor drugs such as lobaplatin [114] and of combinations used to overcome chemoresistance in CCA, such as doxorubicin plus HMME-SDT [110].

In many cancers, a relationship between the poor expression of p21 (*CDKN1A* gene), a mediator of cell cycle arrest, and chemoresistance has been established. Thus, increasing the levels of p21 by inhibition of heme oxygenase-1 has been suggested as a strategy to increase sensitivity to anticancer drugs such as doxorubicin and gemcitabine [124].

8. MECHANISMS OF CHEMORESISTANCE TYPE 5B. SURVIVAL

The mechanisms included in MOC-5b involve changes in anti-apoptotic factors, such as members of the Bcl-2 protein family, which are up-regulated in many cancers, including CCA (Table 4). The levels of Bcl-2 in CCA cell lines can be increased up to 15-fold as compared with non-malignant cells [125]. In CCA cells, characterized by marked chemoresistance to both cisplatin and 5-FU, high Bcl-2 levels together with low Bax levels have been observed [126]. Inhibition of the expression of Bcl-2 is the therapeutic aim of several compounds currently under investigation, such as mycoepoxydine [127], thymoquinone [128] and DHMEQ [129]. In addition, berberine inhibits growth and induces G1 arrest and apoptosis associated with a reduction in the expression of Bcl-2 and Bcl-x [130], or combination of doxorubicin plus HMME-SDT [110].

Another approach for sensitizing CCA is the use of BH3 mimetics. These are a new class of cancer drugs that specifically target a mechanism of cancer cell survival [131]. BH3 mimetics are small molecules that function as competitive inhibitors of the anti-apoptotic Bcl-2 members by binding to their hydrophobic cleft. Under certain conditions, the antagonism of the family of anti-apoptotic Bcl-2 proteins can unleash pro-death molecules in cancer cells. Thus, in CCA cells BH3 mimetics, such as navitoclax, are able to disrupt Bcl-2/Bak heterodimers, allowing Bak to execute the cell death program [132].

Survivin is an anti-apoptotic protein encoded by the *BIRC5* gene. Similarly to Bcl-2 and cyclin B1, survivin is overexpressed in CCA cell lines, and the three proteins increase cell resistance to apoptosis. Down-regulation of these genes by 17-AAG, an inhibitor of heat-shock protein 90, has been found to reduce cell growth, induce G2/M cell cycle arrest and activate apoptosis [133].

Signaling pathways such as PI3K-AKT-mTOR and RAF-MEK-ERK have been found to play a role in the resistance of CCA cells to apoptosis in response to oxaliplatin [134], cisplatin, 5-FU and gemcitabine [126]. The dual inhibition of these two pathways can partly reverse this resistance [135]. In a different approach, the AMPK/mTOR/HIF1 α /MRP1- and ERK-mediated pathways were targeted with metformin. The result was an enhanced sensitivity of CCA cells to certain chemotherapeutic agents, such as sorafenib and 5-FU [136]. Sorafenib and sunitinib are multikinase inhibitors that are preferable to specific TK inhibitors owing to their ability to inhibit Erk1, Erk2 and the AKT pathway and hence to reduce chemoresistance [137]. Sorafenib was found to accelerate STAT3 dephosphorylation and hence sensitize CCA cells to TRAIL-mediated apoptosis [138]. L1 cell adhesion molecule and EGFR activation, which are connected to the AKT and ERK pathways, have been found to confer resistance to cisplatin in intrahepatic CCA cells [87].

Cisplatin-resistant SCK cells, derived from human intrahepatic CCA, were also observed to be resistant to 5-FU and gemcitabine. In these cells, inhibition of the AKT signaling pathway, but not that mediated by Erk1/2, down-regulates Bcl-2 and up-regulates Bax [126]. Additional studies further support the concept that the AKT pathway, as well as the

Nrf2 pathway, plays an important role in cell proliferation and chemoresistance in CCA [47].

9. FUTURE PERSPECTIVES

The identification of the MOC involved in the poor response of CCA to chemotherapy is an issue of considerable clinical relevance because the prediction of the failure of a given pharmacological regime will prevent an unnecessary delay in using an alternative therapeutic approach, will reduce the side effects and hence the suffering of the patient, and will limit the costs of the overall management of the patient for the health system. In addition, the urgently needed development of novel and more efficient drugs against CCA, as well as new strategies to overcome the marked chemoresistance of these tumors, require a better understanding of the molecular and genetic bases involved in the mechanisms accounting for the MDR phenotype. In other sections of the current issue of the journal, the present situation of the results obtained using different approaches to advance in the treatment of CCA are discussed.

LIST OF ABBREVIATIONS

17-AAG	=	17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin
5-FU	=	5-fluorouracil
ABCs	=	ATP-binding cassette proteins
Bcl2	=	B cell Lymphoma 2
BCRP	=	Breast cancer resistance protein
BER	=	Base excision repair
CCA	=	Cholangiocarcinoma
CDA	=	Cytidine deaminase
CNT	=	Concentrative nucleoside transporter
CYPs	=	Cytochrome P450-related enzymes
dFdU	=	2',2'- difluorodeoxyuridine
DHMEQ	=	Dehydroxymethylepoxyquinomicin
DPD	=	Dihydropyrimidine dehydrogenase
EGFR	=	Epidermal growth factor receptor
ENT	=	Equilibrative nucleoside transporter
ERCC1	=	Excision repair cross-complementation group 1
FdUMP	=	5-fluoro-2'- deoxyuridine, 5'-monophosphate
FLT1	=	fms-related tyrosine kinase 1
GSTs	=	Glutathione-S transferases
HMME-SDT	=	Hematoporphyrin Monomethyl Ether-Sonodynamic Therapy
IGF-1R	=	Insulin-like growth factor type 1 receptor
IVS	=	Intronic mutation or intervening sequence
MDR	=	Multidrug resistance
MMR	=	DNA mismatch repair
MOC	=	Mechanism of chemoresistance

MRP	=	Multidrug resistance protein
MSI	=	Microsatellite instability
mTOR	=	Mammalian target of rapamycin
MTs	=	Metallothioneins
NER	=	Nucleotide excision repair
OATP	=	Organic anion-transporting polypeptide
OPRT	=	Orotate phosphoribosyl transferase
PI3K	=	Phosphatidylinositol 3-kinase
PUMA	=	p53 up-regulated modulator of apoptosis
SLC	=	Solute carrier
TK	=	Tyrosine kinase
TKI	=	Tyrosine kinase inhibitor
TLK1	=	Tousled-like kinase 1
TP	=	Thymidine phosphorylase
TRAIL	=	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TS	=	Thymidylate synthase
UNG1	=	Uracil-DNA glycosylase 1
UP	=	Uridine phosphorylase
VEGFR	=	Vascular endothelial growth factor receptor
XIAP	=	Ligase X-linked inhibitor of apoptosis

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Carlos III Institute of Health, Spain (Grants FIS PI15/00179 and PI16/00598), the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2013-40620-R and SAF2016-75197-R), “Junta de Castilla y León” (SA015U13, BIO/SA65/13 and BIO/ SA52/15), Fundación Mutua Madrileña (Call 2015) and CIBERehd (EHD15PI05/2016). E.L. was supported by a postdoctoral grant from the “Fundación Miguel Casado San José”. R.A. was supported by a doctoral grant from “Junta de Castilla y León” and Fondo Social Europeo (EDU/858/2013).

REFERENCES

- [1] Martínez-Becerra P, Vaquero J, Romero MR, *et al.* No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors. *Mol Pharm* 2012; 9(6): 1693-704.
- [2] Marin JJ, Romero MR, Briz O. Molecular bases of liver cancer refractoriness to pharmacological treatment. *Curr Med Chem* 2010; 17(8): 709-40.
- [3] Marin JJ. Plasma membrane transporters in modern liver pharmacology. *Scientifica* 2012; 2012: 428139.
- [4] Hashimoto Y, Tatsumi S, Takeda R, *et al.* Expression of organic anion-transporting polypeptide 1A2 and organic cation transporter 6 as a predictor of pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2014; 145(1): 101-11.
- [5] Wlcek K, Svoboda M, Riha J, *et al.* The analysis of organic anion transporting polypeptide (OATP) mRNA and protein patterns in primary and metastatic liver cancer. *Cancer Biol Ther* 2011; 11(9): 801-11.
- [6] Badagnani I, Castro RA, Taylor TR, *et al.* Interaction of methotrexate with organic-anion transporting polypeptide 1A2 and its genetic variants. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318(2): 521-9.
- [7] Sai K, Saito Y, Maekawa K, *et al.* Additive effects of drug transporter genetic polymorphisms on irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics in Japanese cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66(1): 95-105.
- [8] Zollner G, Wagner M, Fickert P, *et al.* Hepatobiliary transporter expression in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2005; 25(2): 367-79.
- [9] Herraiz E, Lozano E, Macias RI, *et al.* Expression of SLC22A1 variants may affect the response of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma to sorafenib. *Hepatology* 2013; 58(3): 1065-73.
- [10] Lautem A, Heise M, Grasel A, *et al.* Downregulation of organic cation transporter 1 (SLC22A1) is associated with tumor progression and reduced patient survival in human cholangiocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2013; 42(4): 1297-304.
- [11] Pastor-Anglada M, Molina-Arcas M, Casado FJ, Bellosillo B, Colomer D, Gil J. Nucleoside transporters in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2004; 18(3): 385-93.
- [12] Sasaki H, Murakami Y, Uemura K, *et al.* Concurrent analysis of human equilibrative nucleoside transporter 1 and ribonucleotide reductase subunit 1 expression increases predictive value for prognosis in cholangiocarcinoma patients treated with adjuvant gemcitabine-based chemotherapy. *Br J Cancer* 2014; 111(7): 1275-84.
- [13] Borbath I, Verbrugge L, Lai R, *et al.* Human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) expression is a potential predictive tool for response to gemcitabine in patients with advanced cholangiocarcinoma. *Eur J Cancer* 2012; 48(7): 990-6.
- [14] Namwat N, Amimanan P, Loilome W, *et al.* Characterization of 5-fluorouracil-resistant cholangiocarcinoma cell lines. *Chemotherapy* 2008; 54(5): 343-51.
- [15] Song IS, Savaraj N, Siddik ZH, *et al.* Role of human copper transporter Ctr1 in the transport of platinum-based antitumor agents in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells. *Mol Cancer Ther* 2004; 3(12): 1543-9.
- [16] Liu B, Herve J, Bioulac-Sage P, *et al.* Sodium iodide symporter is expressed at the preneoplastic stages of liver carcinogenesis and in human cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 2007; 132(4): 1495-503.
- [17] Chung CW, Kim CH, Lee HM, *et al.* Aminolevulinic acid derivatives-based photodynamic therapy in human intra- and extrahepatic cholangiocarcinoma cells. *Eur J Pharm Biopharm* 2013; 85(3 Pt A): 503-10.
- [18] Chan LM, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* 2004; 21(1): 25-51.
- [19] Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(21): 7735-8.
- [20] Gigliozzi A, Fraioli F, Sundaram P, *et al.* Molecular identification and functional characterization of Mdr1a in rat cholangiocytes. *Gastroenterology* 2000; 119(4): 1113-22.
- [21] Tepsiri N, Chaturat L, Sripan B, *et al.* Drug sensitivity and drug resistance profiles of human intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2005; 11(18): 2748-53.
- [22] Cao L, Duchrow M, Windhovel U, Kujath P, Bruch HP, Broll R. Expression of MDR1 mRNA and encoding P-glycoprotein in archival formalin-fixed paraffin-embedded gall bladder cancer tissues. *Eur J Cancer* 1998; 34(10): 1612-7.
- [23] Wang BL, Zhai HY, Chen BY, *et al.* Clinical relationship between MDR1 gene and gallbladder cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004; 3(2): 296-9.
- [24] Hunter J, Hirst BH, Simmons NL. Epithelial secretion of vinblastine by human intestinal adenocarcinoma cell (HCT-8 and T84) layers expressing P-glycoprotein. *Br J Cancer* 1991; 64(3): 437-44.
- [25] Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 361-98.

- [26] Rau S, Autschbach F, Riedel HD, *et al.* Expression of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human cholangiocellular carcinomas. *Eur J Clin Invest* 2008; 38(2): 134-42.
- [27] Rost D, König J, Weiss G, Klar E, Stremmel W, Keppler D. Expression and localization of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human gallbladder epithelia. *Gastroenterology* 2001; 121(5): 1203-8.
- [28] Srimunta U, Sawanyawisuth K, Kraiklang R, *et al.* High expression of ABCG1 indicates poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13 Suppl: 125-30.
- [29] Grant CE, Valdimarsson G, Hipfner DR, Almquist KC, Cole SP, Deeley RG. Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res* 1994; 54(2): 357-61.
- [30] Cole SP, Sparks KE, Fraser K, Loe DW, Grant CE, Wilson GM, *et al.* Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res* 1994; 54(22): 5902-10.
- [31] Zaman GJ, Flens MJ, van Leusden MR, *et al.* The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(19): 8822-6.
- [32] Chang XB. A molecular understanding of ATP-dependent solute transport by multidrug resistance-associated protein MRP1. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26(1): 15-37.
- [33] Wang W, Sun YP, Huang XZ, *et al.* Emodin enhances sensitivity of gallbladder cancer cells to platinum drugs via glutathione depletion and MRP1 downregulation. *Biochem Pharmacol* 2010; 79(8): 1134-40.
- [34] Wang H, Li X, Chen T, *et al.* Mechanisms of verapamil-enhanced chemosensitivity of gallbladder cancer cells to platinum drugs: glutathione reduction and MRP1 downregulation. *Oncol Rep* 2013; 29(2): 676-84.
- [35] Marin JJ, Romero MR, Martinez-Becerra P, Herraes E, Briz O. Overview of the molecular bases of resistance to chemotherapy in liver and gastrointestinal tumours. *Curr Mol Med* 2009; 9(9): 1108-29.
- [36] Zhang J, Tian Q, Yung Chan S, *et al.* Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications. *Drug Metab Rev* 2005; 37(4): 611-703.
- [37] Volk EL, Rohde K, Rhee M, *et al.* Methotrexate cross-resistance in a mitoxantrone-selected multidrug-resistant MCF7 breast cancer cell line is attributable to enhanced energy-dependent drug efflux. *Cancer Res* 2000; 60(13): 3514-21.
- [38] Volk EL, Schneider E. Wild-type breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is a methotrexate polyglutamate transporter. *Cancer Res* 2003; 63(17): 5538-43.
- [39] Sugimoto Y, Tsukahara S, Imai Y, Ueda K, Tsuruo T. Reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by estrogen antagonists and agonists. *Mol Cancer Ther* 2003; 2(1): 105-12.
- [40] Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, *et al.* A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(26): 15665-70.
- [41] Schellens JH, Maliapaard M, Scheper RJ, *et al.* Transport of topoisomerase I inhibitors by the breast cancer resistance protein. Potential clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 922: 188-94.
- [42] Maliapaard M, van Gastelen MA, de Jong LA, *et al.* Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Res* 1999; 59(18): 4559-63.
- [43] Allen JD, Van Dort SC, Buitelaar M, van Tellingen O, Schinkel AH. Mouse breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) mediates etoposide resistance and transport, but etoposide oral availability is limited primarily by P-glycoprotein. *Cancer Res* 2003; 63(6): 1339-44.
- [44] Burger H, van Tol H, Boersma AW, *et al.* Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood* 2004; 104(9): 2940-2.
- [45] Kusuhara H, Sugiyama Y. ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflugers Archiv : Eur J Physiol* 2007; 453(5): 735-44.
- [46] Aust S, Obrist P, Jaeger W, *et al.* Subcellular localization of the ABCG2 transporter in normal and malignant human gallbladder epithelium. *Lab Invest* 2004; 84(8): 1024-36.
- [47] Chen Q, Li W, Wan Y, *et al.* Amplified in breast cancer 1 enhances human cholangiocarcinoma growth and chemoresistance by simultaneous activation of Akt and Nrf2 pathways. *Hepatology* 2012; 55(6): 1820-9.
- [48] Safaei R. Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. *Cancer Lett* 2006; 234(1): 34-9.
- [49] Ohbu M, Ogawa K, Konno S, *et al.* Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is expressed in human gastric carcinoma. *Cancer Lett* 2003; 189(1): 33-8.
- [50] Heinemann V, Hertel LW, Grindley GB, Plunkett W. Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res* 1988; 48(14): 4024-31.
- [51] Yao D, Kunam VK, Li X. A review of the clinical diagnosis and therapy of cholangiocarcinoma. *J Int Med Res* 2014; 42(1): 3-16.
- [52] Andersen JB. Molecular pathogenesis of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2015; 22(2): 101-13.
- [53] Sugiyama E, Kaniwa N, Kim SR, *et al.* Pharmacokinetics of gemcitabine in Japanese cancer patients: the impact of a cytidine deaminase polymorphism. *J Clin Oncol* 2007; 25(1): 32-42.
- [54] Sato J, Kimura T, Saito T, *et al.* Gene expression analysis for predicting gemcitabine resistance in human cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2011; 18(5): 700-11.
- [55] Kubota T. 5-fluorouracil and dihydropyrimidine dehydrogenase. *Int J Clin Oncol* 2003; 8(3): 127-31.
- [56] Diasio RB, Harris BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet* 1989; 16(4): 215-37.
- [57] Takebe N, Zhao SC, Ural AU, *et al.* Retroviral transduction of human dihydropyrimidine dehydrogenase cDNA confers resistance to 5-fluorouracil in murine hematopoietic progenitor cells and human CD34+-enriched peripheral blood progenitor cells. *Cancer Gene Ther* 2001; 8(12): 966-73.
- [58] Shimoda M, Sawada T, Kubota K. Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase are upregulated in pancreatic and biliary tract cancers. *Pathobiology* 2009; 76(4): 193-8.
- [59] Hahnvajanawong C, Chaiyagool J, Seubwai W, *et al.* Orotate phosphoribosyl transferase mRNA expression and the response of cholangiocarcinoma to 5-fluorouracil. *World J Gastroenterol* 2012; 18(30): 3955-61.
- [60] Deenen MJ, Tol J, Burylo AM, *et al.* Relationship between single nucleotide polymorphisms and haplotypes in DPYD and toxicity and efficacy of capecitabine in advanced colorectal cancer. *Clinical Cancer Res* 2011; 17(10): 3455-68.
- [61] van Kuilenburg AB, Baars JW, Meisma R, van Gennip AH. Lethal 5-fluorouracil toxicity associated with a novel mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Ann Oncol* 2003; 14(2): 341-2.
- [62] Evrard A, Cuq P, Ciccolini J, Vian L, Cano JP. Increased cytotoxicity and bystander effect of 5-fluorouracil and 5-deoxy-5-fluorouridine in human colorectal cancer cells transfected with thymidine phosphorylase. *Br J Cancer* 1999; 80(11): 1726-33.
- [63] Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Ann Rev Med* 2006; 57: 119-37.
- [64] Adams VR, Leggas M. Sunitinib malate for the treatment of metastatic renal cell carcinoma and gastrointestinal stromal tumors. *Clin Ther* 2007; 29(7): 1338-53.
- [65] Kiang TK, Ensom MH, Chang TK. UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacol Ther* 2005; 106(1): 97-132.
- [66] Wen Z, Tallman MN, Ali SY, Smith PC. UDP-glucuronosyltransferase 1A1 is the principal enzyme responsible for etoposide glucuronidation in human liver and intestinal microsomes: structural characterization of phenolic and alcoholic glucuronides of etoposide and estimation of enzyme kinetics. *Drug Metab Dispos* 2007; 35(3): 371-80.
- [67] Peer CJ, Sissung TM, Kim A, *et al.* Sorafenib is an inhibitor of UGT1A1 but is metabolized by UGT1A9: implications of genetic variants on pharmacokinetics and hyperbilirubinemia. *Clin Cancer Res* 2012; 18(7): 2099-107.
- [68] Ohya Y, Oue H, Nagatomi K, Ouchi T. Design of macromolecular prodrug of cisplatin using dextran with branched galactose units as targeting moieties to hepatoma cells. *Biomacromolecules* 2001; 2(3): 927-33.
- [69] Okuyama T, Maehara Y, Endo K, *et al.* Expression of glutathione S-transferase-pi and sensitivity of human gastric cancer cells to cisplatin. *Cancer* 1994; 74(4): 1230-6.
- [70] Nakajima T, Takayama T, Miyanishi K, *et al.* Reversal of multiple drug resistance in cholangiocarcinoma by the glutathione S-transferase-pi-specific inhibitor O1-hexadecyl-gamma-glutamyl-S-

- benzylcysteinyl-D-phenylglycine ethylester. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306(3): 861-9.
- [71] Cullen KJ, Newkirk KA, Schumaker LM, Aldosari N, Rone JD, Haddad BR. Glutathione S-transferase pi amplification is associated with cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and primary tumors. *Cancer Res* 2003; 63(23): 8097-102.
- [72] Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W, *et al.* A multivariate analysis of genomic polymorphisms: prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004; 91(2): 344-54.
- [73] Chun JH, Kim HK, Kim E, *et al.* Increased expression of metallothionein is associated with irinotecan resistance in gastric cancer. *Cancer Res* 2004; 64(14): 4703-6.
- [74] Shukla VK, Aryya NC, Pitale A, *et al.* Metallothionein expression in carcinoma of the gallbladder. *Histopathology*. 1998; 33(2): 154-7.
- [75] Schmitz KJ, Lang H, Kaiser G, *et al.* Metallothionein overexpression and its prognostic relevance in intrahepatic cholangiocarcinoma and extrahepatic hilar cholangiocarcinoma (Klatskin tumors). *Hum Pathol* 2009; 40(12): 1706-14.
- [76] Habara K, Ajiki T, Kamigaki T, Nakamura T, Kuroda Y. High expression of thymidylate synthase leads to resistance to 5-fluorouracil in biliary tract carcinoma *in vitro*. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92(10): 1127-32.
- [77] Morine Y, Shimada M, Utsunomiya T, *et al.* Role of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surg Today* 2012; 42(2): 135-40.
- [78] Iqbal S, Rankin C, Lenz HJ, *et al.* A phase II trial of gemcitabine and capecitabine in patients with unresectable or metastatic gallbladder cancer or cholangiocarcinoma: Southwest Oncology Group study S0202. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 68(6): 1595-602.
- [79] Cai JP, Chen W, Hou X, Liang LJ, Hao XY, Yin XY. Simvastatin enhances the chemotherapeutic efficacy of S-1 against bile duct cancer: E2F-1/TS downregulation might be the mechanism. *Anti-cancer Drugs* 2013; 24(10): 1020-9.
- [80] Sampson LK, Vickers SM, Ying W, Phillips JO. Tamoxifen-mediated growth inhibition of human cholangiocarcinoma. *Cancer Res* 1997; 57(9): 1743-9.
- [81] Alvaro D, Barbaro B, Franchitto A, *et al.* Estrogens and insulin-like growth factor I modulate neoplastic cell growth in human cholangiocarcinoma. *Am J Pathol* 2006; 169(3): 877-88.
- [82] Park JS, Jung WH, Kim JK, *et al.* Estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta, and progesterone receptor as possible prognostic factor in radically resected gallbladder carcinoma. *J Surg Res* 2009; 152(1): 104-10.
- [83] Suzuki F, Akahira J, Miura I, *et al.* Loss of estrogen receptor beta isoform expression and its correlation with aberrant DNA methylation of the 5'-untranslated region in human epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Sci* 2008; 99(12): 2365-72.
- [84] Marzioni M, Torrice A, Saccomanno S, *et al.* An oestrogen receptor beta-selective agonist exerts anti-neoplastic effects in experimental intrahepatic cholangiocarcinoma. *Dig Liver Dis* 2012; 44(2): 134-42.
- [85] Jimeno A, Rubio-Viqueira B, Amador ML, *et al.* Epidermal growth factor receptor dynamics influences response to epidermal growth factor receptor targeted agents. *Cancer Res* 2005; 65(8): 3003-10.
- [86] Yoshikawa D, Ojima H, Iwasaki M, *et al.* Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 2008; 98(2): 418-25.
- [87] Yoon H, Min JK, Lee DG, Kim DG, Koh SS, Hong HJ. L1 cell adhesion molecule and epidermal growth factor receptor activation confer cisplatin resistance in intrahepatic cholangiocarcinoma cells. *Cancer Lett* 2012; 316(1): 70-6.
- [88] Hoffmann AC, Goekurt E, Danenberg PV, *et al.* EGFR, FLT1 and heparanase as markers identifying patients at risk of short survival in cholangiocarcinoma. *PLoS One*. 2013; 8(5): e64186.
- [89] Reinmuth N, Liu W, Fan F, *et al.* Blockade of insulin-like growth factor I receptor function inhibits growth and angiogenesis of colon cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8(10): 3259-69.
- [90] Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, *et al.* Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by an insulin-like growth factor-I receptor autocrine loop in human pancreatic cancer. *Am J Pathol* 2003; 163(3): 1001-11.
- [91] Kornprat P, Rehak P, Ruschoff J, Langner C. Expression of IGF-I, IGF-II, and IGF-IR in gallbladder carcinoma. A systematic analysis including primary and corresponding metastatic tumours. *J Clin Pathol* 2006; 59(2): 202-6.
- [92] Wolf S, Lorenz J, Mossner J, Wiedmann M. Treatment of biliary tract cancer with NVP-AEW541: mechanisms of action and resistance. *World J Gastroenterol* 2010; 16(2): 156-66.
- [93] Zhang H, Yee D. The therapeutic potential of agents targeting the type I insulin-like growth factor receptor. *Expert Opin Investig Drugs* 2004; 13(12): 1569-77.
- [94] Sachdev D, Yee D. Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(1): 1-12.
- [95] Lee D, Do IG, Choi K, *et al.* The expression of phospho-AKT1 and phospho-mTOR is associated with a favorable prognosis independent of PTEN expression in intrahepatic cholangiocarcinomas. *Mod Pathol* 2012; 25(1): 131-9.
- [96] Yothaisong S, Dokduang H, Techasen A, *et al.* Increased activation of PI3K/AKT signaling pathway is associated with cholangiocarcinoma metastasis and PI3K/mTOR inhibition presents a possible therapeutic strategy. *Tumour Biol* 2013; 34(6): 3637-48.
- [97] Ueda S, Shirabe K, Morita K, *et al.* Evaluation of ERCC1 expression for cisplatin sensitivity in human hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2011; 18(4): 1204-11.
- [98] Arnould S, Hennebelle I, Canal P, Bugat R, Guichard S. Cellular determinants of oxaliplatin sensitivity in colon cancer cell lines. *Eur J Cancer* 2003; 39(1): 112-9.
- [99] Fisher SB, Fisher KE, Patel SH, *et al.* Excision repair cross-complementing gene-1, ribonucleotide reductase subunit M1, ribonucleotide reductase subunit M2, and human equilibrative nucleoside transporter-1 expression and prognostic value in biliary tract malignancy. *Cancer* 2013; 119(2): 454-62.
- [100] Hwang IG, Jang JS, Do JH, *et al.* Different relation between ERCC1 overexpression and treatment outcomes of two platinum agents in advanced biliary tract adenocarcinoma patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 68(4): 935-44.
- [101] Asakawa H, Koizumi H, Koike A, *et al.* Prediction of breast cancer sensitivity to neoadjuvant chemotherapy based on status of DNA damage repair proteins. *Breast Cancer Res* 2010; 12(2): R17.
- [102] Obama K, Satoh S, Hamamoto R, Sakai Y, Nakamura Y, Furukawa Y. Enhanced expression of RAD51 associating protein-1 is involved in the growth of intrahepatic cholangiocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2008; 14(5): 1333-9.
- [103] Momoi H, Itoh T, Nozaki Y, *et al.* Microsatellite instability and alternative genetic pathway in intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 2001; 35(2): 235-44.
- [104] Liu D, Momoi H, Li L, Ishikawa Y, Fukumoto M. Microsatellite instability in thiorotast-induced human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Int J Cancer* 2002; 102(4): 366-71.
- [105] Limpaboon T, Khaenam P, Chinnasri P, *et al.* Promoter hypermethylation is a major event of hMLH1 gene inactivation in liver fluke related cholangiocarcinoma. *Cancer Lett* 2005; 217(2): 213-9.
- [106] Vaisman A, Varchenko M, Umar A, *et al.* The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. *Cancer Res* 1998; 58(16): 3579-85.
- [107] Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, *et al.* Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(20): 3219-26.
- [108] Takayama Y, Kokuryo T, Yokoyama Y, *et al.* Silencing of Touloukian-like kinase 1 sensitizes cholangiocarcinoma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Cancer Lett* 2010; 296(1): 27-34.
- [109] Mertens JC, Fingas CD, Christensen JD, *et al.* Therapeutic effects of deleting cancer-associated fibroblasts in cholangiocarcinoma. *Cancer Res* 2013; 73(2): 897-907.
- [110] Liang L, Xie S, Jiang L, Jin H, Li S, Liu J. The Combined effects of hematoporphyrin monomethyl ether-SDT and doxorubicin on the proliferation of QBC939 cell lines. *Ultrasound Med Biol* 2013; 39(1): 146-60.
- [111] Chen BD, Zhao WC, Jia QA, *et al.* Effect of the GLP-1 analog exendin-4 and oxaliplatin on intrahepatic cholangiocarcinoma cell line and mouse model. *Int J Mol Sci* 2013; 14(12): 24293-304.
- [112] Ge X, Wang Y, Li Q, Yu H, Ji G, Miao L. NK4 regulates 5-fluorouracil sensitivity in cholangiocarcinoma cells by modulating the intrinsic apoptosis pathway. *Oncol Rep* 2013; 30(1): 448-54.
- [113] Vaeteewoottacharn K, Kariya R, Matsuda K, *et al.* Perturbation of proteasome function by bortezomib leading to ER stress-induced

- apoptotic cell death in cholangiocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013; 139(9): 1551-62.
- [114] Wang Z, Tang X, Zhang Y, *et al.* Lobaplatin induces apoptosis and arrests cell cycle progression in human cholangiocarcinoma cell line RBE. *Biomed Pharmacother* 2012; 66(3): 161-6.
- [115] Lin Y, Zhang B, Liang H, Lu Y, Ai X, Chen X. JNK inhibitor SP600125 enhances TGF-beta-induced apoptosis of RBE human cholangiocarcinoma cells in a Smad-dependent manner. *Mol Med Rep.* 2013; 8(6): 1623-9.
- [116] Zhang K, Chen D, Wang X, *et al.* RNA interference targeting slug increases cholangiocarcinoma cell sensitivity to cisplatin *via* upregulating PUMA. *Int J Mol Sci* 2011; 12(1): 385-400.
- [117] Tanaka S, Sugimachi K, Shirabe K, Shimada M, Wands JR. Expression and antitumor effects of TRAIL in human cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2000; 32(3): 523-7.
- [118] Panichakul T, Intachote P, Wongkajorsilp A, Sripa B, Sirisinha S. Triptolide sensitizes resistant cholangiocarcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *AntiCancer Res* 2006; 26(1A): 259-65.
- [119] Razumilava N, Bronk SF, Smoot RL, *et al.* miR-25 targets TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) death receptor-4 and promotes apoptosis resistance in cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2012; 55(2): 465-75.
- [120] Wehrkamp CJ, Gutwein AR, Natarajan SK, Phillippi MA, Mott JL. XIAP antagonist embelin inhibited proliferation of cholangiocarcinoma cells. *PLoS One* 2014; 9(3): e90238.
- [121] Humphreys EH, Williams KT, Adams DH, Afford SC. Primary and malignant cholangiocytes undergo CD40 mediated Fas dependent apoptosis, but are insensitive to direct activation with exogenous Fas ligand. *PLoS One* 2010; 5(11): e14037.
- [122] Fernandez TF, Samal AB, Bedwell GJ, Chen Y, Saad JS. Structural and biophysical characterization of the interactions between the death domain of Fas receptor and calmodulin. *J Biol Chem* 2013; 288(30): 21898-908.
- [123] Fevery J, Verslype C. An update on cholangiocarcinoma associated with primary sclerosing cholangitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2010; 26(3): 236-45.
- [124] Kongpetch S, Kukongviriyapan V, Prawan A, Senggunprai L, Kukongviriyapan U, Buranrat B. Crucial role of heme oxygenase-1 on the sensitivity of cholangiocarcinoma cells to chemotherapeutic agents. *PLoS One* 2012; 7(4): e34994.
- [125] Harnois DM, Que FG, Celli A, LaRusso NF, Gores GJ. Bcl-2 is overexpressed and alters the threshold for apoptosis in a cholangiocarcinoma cell line. *Hepatology* 1997; 26(4): 884-90.
- [126] Yoon H, Min JK, Lee JW, Kim DG, Hong HJ. Acquisition of chemoresistance in intrahepatic cholangiocarcinoma cells by activation of AKT and extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 405(3): 333-7.
- [127] Li W, Li M, Su X, Qin L, Miao M, Yu C, *et al.* Mycoepoxydiene induces apoptosis and inhibits TPA-induced invasion in human cholangiocarcinoma cells *via* blocking NF-kappaB pathway. *Biochimie* 2014; 101: 183-91.
- [128] Xu D, Ma Y, Zhao B, *et al.* Thymoquinone induces G2/M arrest, inactivates PI3K/Akt and nuclear factor-kappaB pathways in human cholangiocarcinomas both *in vitro* and *in vivo*. *Oncol Rep* 2014; 31(5): 2063-70.
- [129] Seubwai W, Wongkham C, Puapairoj A, *et al.* Aberrant expression of NF-kappaB in liver fluke associated cholangiocarcinoma: implications for targeted therapy. *PLoS One* 2014; 9(8): e106056.
- [130] He W, Wang B, Zhuang Y, Shao D, Sun K, Chen J. Berberine inhibits growth and induces G1 arrest and apoptosis in human cholangiocarcinoma QBC939 cells. *J Pharmacol Sci* 2012; 119(4): 341-8.
- [131] Ni Chonghaile T, Letai A. Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells. *Oncogene* 2008; 27 Suppl 1: S149-57.
- [132] Rizvi S, Mertens JC, Bronk SF, *et al.* Platelet-derived growth factor primes cancer-associated fibroblasts for apoptosis. *J Biol Chem* 2014; 289(33): 22835-49.
- [133] Zhang J, Zheng Z, Zhao Y, Zhang T, Gu X, Yang W. The heat shock protein 90 inhibitor 17-AAG suppresses growth and induces apoptosis in human cholangiocarcinoma cells. *Clin Exp Med* 2013; 13(4): 323-8.
- [134] Leelawat K, Narong S, Udomchaiprasertkul W, Leelawat S, Tungpradubkul S. Inhibition of PI3K increases oxaliplatin sensitivity in cholangiocarcinoma cells. *Cancer Cell Int* 2009; 9: 3.
- [135] Ewald F, Norz D, Grottko A, Hofmann BT, Nashan B, Jucker M. Dual Inhibition of PI3K-AKT-mTOR- and RAF-MEK-ERK-signaling is synergistic in cholangiocarcinoma and reverses acquired resistance to MEK-inhibitors. *Invest New Drugs* 2014; 32(6): 1144-54.
- [136] Ling S, Feng T, Ke Q, Fan N, Li L, Li Z, *et al.* Metformin inhibits proliferation and enhances chemosensitivity of intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines. *Oncol Rep* 2014; 31(6): 2611-8.
- [137] Dokduang H, Juntana S, Techasen A, *et al.* Survey of activated kinase proteins reveals potential targets for cholangiocarcinoma treatment. *Tumour Biol* 2013; 34(6): 3519-28.
- [138] Blehacz BR, Smoot RL, Bronk SF, Werneburg NW, Sirica AE, Gores GJ. Sorafenib inhibits signal transducer and activator of transcription-3 signaling in cholangiocarcinoma cells by activating the phosphatase shatterproof 2. *Hepatology* 2009; 50(6): 1861-70.

The lack of the organic cation transporter OCT1 at the plasma membrane of tumor cells precludes a positive response to sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma

Andreas Geier¹, Rocio I.R. Macias², Dominik Bettinger³, Johannes Weiss¹, Heike Bantel⁴, Daniel Jahn¹, Ruba Al-Abdulla², Jose J.G. Marin²

¹Division of Hepatology, Department of Medicine II, University Hospital Würzburg, Würzburg, Germany

²Experimental Hepatology and Drug Targeting, CIBERehd, IBSAL, University of Salamanca, Salamanca, Spain

³Department of Medicine II, University Hospital Freiburg, Freiburg, Germany

⁴Department of Gastroenterology, Hepatology and Endocrinology, Hannover Medical School, Hannover, Germany

Correspondence to: Andreas Geier, email: geier_a2@ukw.de

Keywords: organic cation transporter, chemoresistance, hepatocellular carcinoma, tyrosine-kinase inhibitor, sorafenib

Received: August 31, 2016

Accepted: January 06, 2017

Published: February 02, 2017

ABSTRACT

Background: Sorafenib is the drug of choice in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma (HCC). Beneficial effects are limited by mechanisms of chemoresistance, which include downregulation and/or impaired function of plasma membrane transporters accounting for drug uptake. The organic cation transporter 1 (OCT1) plays a major role in sorafenib uptake and decreased expression in HCC has been associated with poorer response.

Methods: The multicenter retrospective TRANSFER study involved tumor biopsies from 39 patients with advanced HCC and sorafenib therapy for ≥ 4 wk. Endpoint was the relationship between clinicopathological features and immunohistological result. Immunostaining was performed using specific primary anti-OCT1-head and anti-OCT1-tail antibodies. Tumors were classified according to a simplified staining score as absent, weak, moderate or strong, taking into account the localization of the staining at the plasma membrane as positive or negative.

Results: Results confirmed OCT1 downregulation in half of the cases investigated (10% absent, 38% weak). However, only one third of tumors expressing OCT1 displayed plasma membrane location (15% vs. 36% cytosolic expression). When comparing HCC with and without OCT1 expression, no different sorafenib response was found. When tumors expressing OCT1 at the plasma membrane were considered separately, a marked longer survival was found (Log Rank $p < 0.001$). No association between OCT1 expression at the plasma membrane with tumor stage, previous treatment with TACE or radiological response was seen.

In conclusion, these results indicate that the presence of OCT1 at the plasma membrane, rather than its expression levels, is related to better outcome of HCC patients treated with sorafenib.

BACKGROUND

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the sixth most common cancer worldwide and the third cause of death due to cancer [1–4]. Over the last two decades the expected outcome of patients with HCC has been improved considerably from a dismal prognosis to 30–

40% of patients in developed countries nowadays being diagnosed at early stages allowing for curative treatment approaches such as local ablation, tumor resection or liver transplantation [5, 6]. However, the prognosis of advanced tumors has not changed considerably despite the introduction of targeted systemic treatment. Since 2008 the multikinase inhibitor sorafenib has become the

standard of systemic therapy for advanced stage HCC and its approval represents a breakthrough in the management of advanced tumors [7]. Sorafenib treatment improved the time to progression (TTP) and extended overall survival by 2.8 and 2.3 months compared to placebo in advanced HCC patients (10.7 months vs 7.9 months in SHARP; 6.5 months vs 4.2 months in Asia-Pacific) [7, 8]. Data from second line treatment indicated a statistically significant difference in outcome between MET-high populations treated with placebo and tivantinib (median overall survival of 7.2 months for tivantinib compared with 3.8 months for placebo) whereas no such difference could be observed in MET-low populations [9]. These data support the general need for a personalized strategy in the treatment of HCC according to the presence of molecular targets in each tumor [10]. Thus, antitumoral effects of sorafenib are heterogeneous in different patients, which makes necessary to identify biomarkers either in tumor or peripheral blood to predict patient outcomes in a personalized manner. On one hand, blood biomarkers such as phorbol myristate acetate-induced phosphorylation of extracellular signal-related kinase (ERK) have been identified in peripheral blood lymphocytes [11]. Furthermore, baseline pERK expression was identified as a promising intratumoral marker of response since HCC patients whose tumors expressed higher levels of this target structure had a longer TTP following treatment with sorafenib in the phase II study [12]. Besides the preservation of the molecular targets of this drug in tumor cells, the absence of respective drug transporters also represents a putative predictor of poor response to the treatment. The mechanism of action of sorafenib depends on its access to the intracellular site of action on transmembrane tyrosine kinase receptors, which may be affected by changes in the expression and activity of transporters accounting for its uptake. The organic cation transporter-1 (OCT1, gene symbol *SLC22A1*) has been suggested to play a major role in this process [13, 14]. OCT1 functions as an electrogenic, sodium- and proton-independent bidirectional polyspecific transporter [15]. Human OCT1 is located at the basolateral membrane of hepatocytes, enterocytes, and renal proximal tubular cells, where it mediates the facilitated transport of a variety of structurally diverse organic cations, including endogenous and xenobiotic compounds, such as toxins and drugs [16]. Its role in sorafenib uptake has prompted us and other groups to investigate the usefulness of determining OCT1 expression in tumor tissue as a prognostic biomarker for the response to systemic treatment of HCC with this drug [13, 14, 17]. The identification of polymorphic genetic variants of human OCT1 that severely affect transport activity suggested that some of the inter-individual differences in response to cationic drugs may be caused by variable activity of this transporter among tumors [14]. Recently, two novel

SLC22A1 variants *R61Sfs*10* and *C88Afs*16* encoding truncated proteins unable to reach the plasma membrane of liver tumor cells together with an abundant proportion of aberrant alternative splicing have been described as common features in HCC [13]. In the present study we have addressed the question on whether the presence of the transporter at the plasma membrane, rather than overall OCT1 expression (mRNA/protein) levels in tumor cells, is a better prognostic marker for the outcome of HCC patients treated with sorafenib.

RESULTS

Patient characteristics

Patients in the *TRANSFER* study were 67.4±1.6 years of age and predominantly male. Most frequent underlying chronic liver diseases were alcoholic and viral hepatitis (Table 1). Child-Pugh score (CPS) at the time of sorafenib initiation was CPS A in two thirds of the patients while a minority was either CPS B or could not be calculated due to missing laboratory values. HCC diagnosis was invariably based on liver histology with an equal distribution of BCLC stages B and C (38.5% and 41.0%, respectively). 87.2% of the patients underwent surgical resection or locoregional treatment, either transarterial chemoembolization (TACE) or radiofrequency ablation, or both prior to sorafenib treatment.

Immunohistochemical staining of OCT1

Prior to analyze the presence of OCT1 at the plasma membrane in HCC samples collected from these patients, two different antibodies raised against different regions of the protein were tested on healthy liver tissue (Figure 1A–1D). In the negative control, i.e., when neither of these two antibodies was used before incubation with the secondary antibody, no signal was detected (Figure 1A). In contrast, both LS-C31870 anti-OCT1-head (Figure 1B) and LS-C161155 anti-OCT1-tail (Figure 1C) antibodies were able to detect OCT1 at the hepatocyte plasma membrane in immunohistochemical analyses. Similar results were obtained in immunofluorescence analysis using anti-OCT1-tail antibody (Figure 1D). In contrast, strong noise and poor specific signal was obtained with the anti-OCT1-head antibody (data not shown), which precludes its use in this technique.

To evaluate the specificity of the OCT1 signal detected at the plasma membrane of human liver cells, *in vitro* experiments were carried out using CHO cells. The immunofluorescence assays showed the absence of anti-OCT1-tail antibody reactivity with endogenous proteins of these hamster cells (Figure 1E). In contrast, when CHO cells were transduced with human OCT1, immunofluorescence analysis using the anti-OCT1-tail

Table 1: Clinical information on patients and tumors

Patients		
Age (mean±EEM)	67.4±1.6	
Age range	49-87	
Male	35	(89.7%)
Female	4	(10.3%)
Sorafenib pretreatment		
No	5	(12.8%)
Resection	7	(18.0%)
TACE	12	(30.8%)
RFA	1	(2.6%)
Resection, TACE	10	(25.6%)
TACE, RFA	2	(5.1%)
Resection, TACE, RFA	2	(5.1%)
HCC Etiology		
Alcohol use	11	(28.2%)
Hepatitis B	4	(10.3%)
Hepatitis C	11	(28.2%)
Hemochromatosis	2	(5.1%)
NAFLD	3	(7.7%)
Unknown	8	(20.5)
Child-Pugh status		
Child-Pugh A	26	(66.6%)
Child-Pugh B	7	(18.0%)
Unknown	6	(15.7%)
BCLC classification		
A	1	(2.5%)
B	15	(38.5%)
C	16	(41.0%)
Unknown	7	(18.0%)

Patients (n=39) were diagnosed of suffering from hepatocellular carcinoma and were included in the study based on eligibility criteria described in detail in Method section.

antibody permitted to detect this protein at the plasma membrane (Figure 1F). No signal was found when CHO cells were transduced with human OCT3-V5, even if they expressed the recombinant protein at the plasma membrane, as detected using an anti-V5 antibody (Figure 1G). These results demonstrated that the anti-OCT1-tail antibody used in the immunohistochemical analysis of OCT1 in patient samples has no cross-reactivity with OCT3.

Localization and quantification of OCT1 protein staining in HCC tumor tissue

Due to frequent nonsense mutations and aberrant splicing, an important proportion of OCT1 mRNA found in HCC is expected to generate non-functional truncated peptides [13]. Thus, to analyze the presence of OCT1 in patient samples we have used two antibodies raised against the N-terminal region, i.e., the head of

the protein (Figure 2A) and the C-terminal region, i.e., the OCT1-tail (Figure 3A). Regarding the ability to detect the presence of OCT1 at the plasma membrane no difference was observed between both antibodies in all samples analyzed, probably because most protein found at the plasma membrane contained the complete sequence. To make easier the interpretation of the results, a simplified staining score of quantitative OCT1 protein expression in HCC cells was established (see Materials and Methods section). Localization of the OCT1 staining at the plasma membrane was classified as either positive or negative (Figure 2B–2E and Figure 3B–3E). In spite of marked interindividual variability, ranging from absent to strong (Figure 2B–2E and Figure 3B–3E), the results from the immunohistochemical analysis have confirmed previous observations on the downregulation of OCT1 in HCC when measured as the abundance of OCT1 mRNA or protein [13, 17, 19–21]. Indeed, when the tumors were classified according to the intensity of staining approximately half of them displayed marked (defined as moderate or strong staining scores) OCT1 expression (Figure 4A). Because an important part of

OCT1 in HCC cells corresponds to truncated peptides [13], it was not surprising that staining at the plasma membrane was detected in only one third of HCC samples that markedly expressed OCT1 (Figure 4B). Interestingly, the intracellular signal obtained with the anti-OCT1-tail antibody was somehow weaker than that obtained with the anti-OCT1-head antibody. Since the use of either antibody gave the same results in the global analysis carried out here, from now on we will describe and discuss the results without distinguishing between anti-OCT1-head and –tail antibodies.

Relationship between treatment response and OCT1 abundance/localization

To assess whether these findings are relevant from the functional point of view and to understand the role of OCT1 transport function in the sensitivity to sorafenib we next analyzed the treatment response according to OCT1 abundance and localization. This was consistent with results obtained using Kaplan-Meier plots to study the survival of patients treated with sorafenib. The

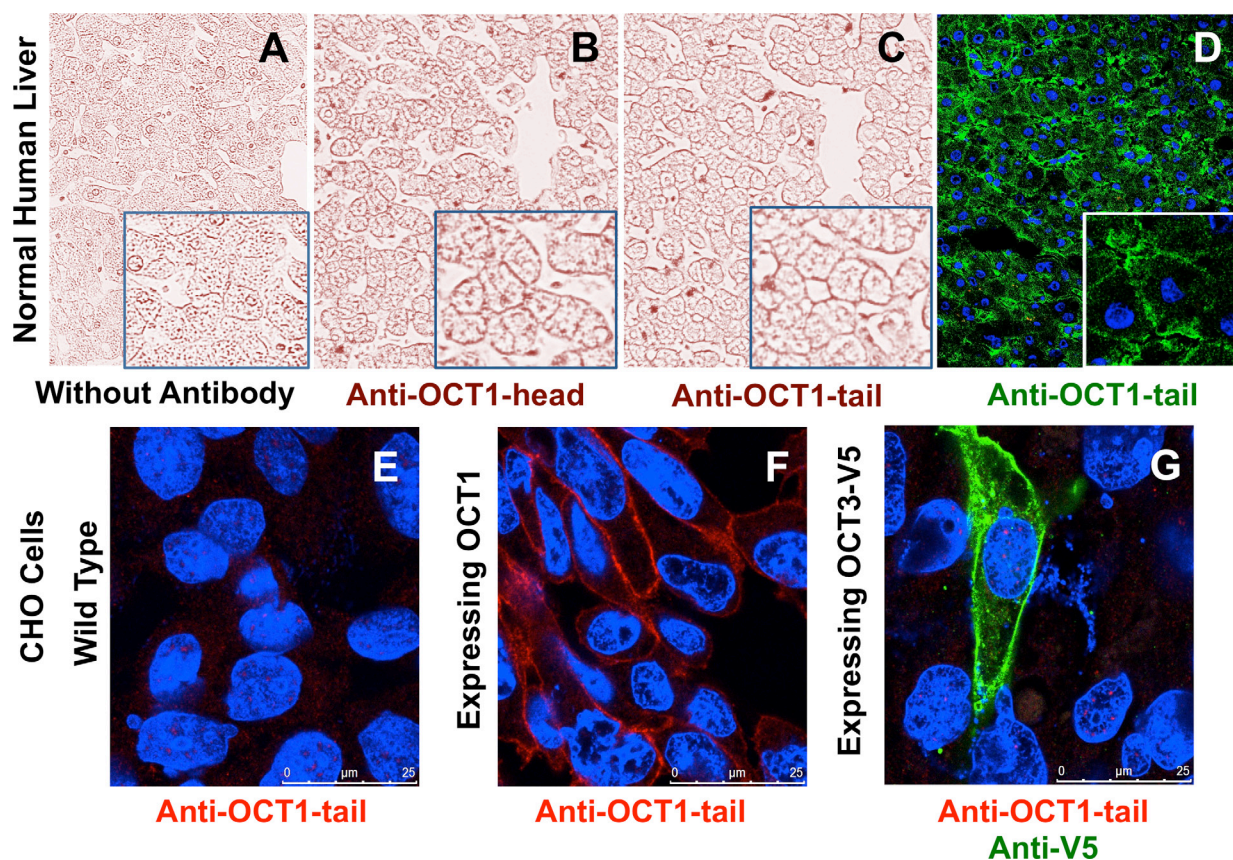
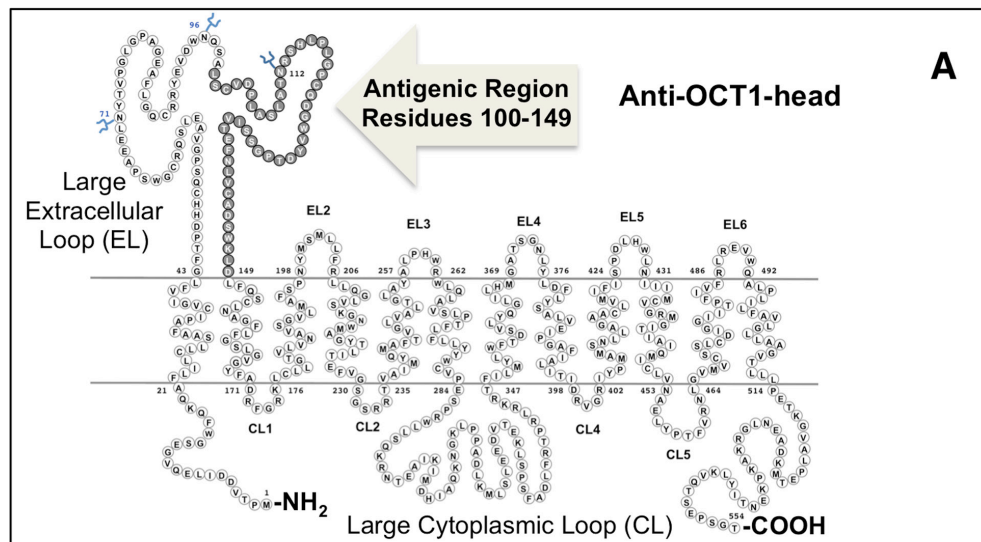


Figure 1: Representative images of immunohistochemical analysis of OCT1 in healthy human liver using no primary antibody (negative control). A. or two different primary rabbit polyclonal anti-OCT1 antibodies LS-C31870 B. and LS-C161155 C. raised against the head and tail of the protein, respectively. Immunofluorescence combined with confocal microscopy of normal liver tissue stained with anti-OCT1-tail antibody D. Study of the selectivity of anti-OCT1-tail antibody using Chinese hamster ovary (CHO) cells either wild type E. or expressing human OCT1 F. or OCT3 tagged with V5 antigen G. The nuclei were stained with Dapi.

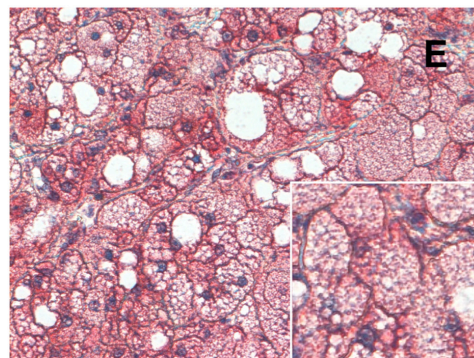
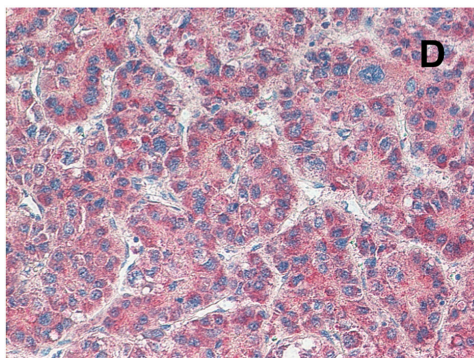
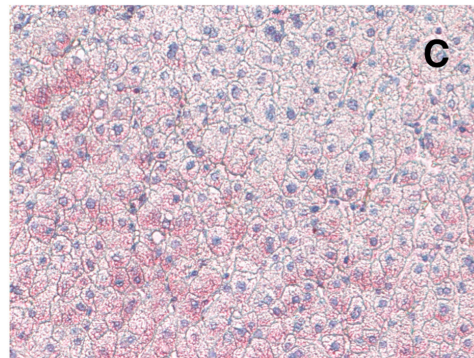
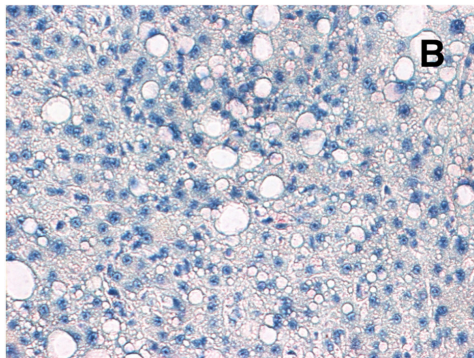
general comparison of patients bearing HCC with and without OCT1 protein expression revealed no significant difference in survival (Figure 5A). Because the absence of the transporter at the plasma membrane precludes the function of the protein as a transporter, even if it is highly

expressed in tumor cells, we further analyzed the role of subcellular localization. When patients with tumors with evident expression of OCT1 at the plasma membrane were segregated into a different group, a markedly longer survival was observed in patients with positive membrane



Staining: Absent
Plasma membrane: Negative

Staining: Weak
Plasma membrane: Negative



Staining: Moderate
Plasma membrane: Negative

Staining: Strong
Plasma membrane: Positive

Figure 2: Schematic drawing of OCT1 showing the antigenic region used to raise the rabbit polyclonal LS-C31870 anti-OCT1-head antibody. A. Representative images of immunohistochemical analysis showing the criteria used for hepatocellular carcinoma score depending upon the degree of slides staining with anti-OCT1-head antibody as: absent **B**, weak **C**, moderate **D**, and strong **E**, and the lack (**B**, **C**, **D**) or the presence **E**, of staining at the plasma membrane.

staining compared to those with a negative value for this criterium (Figure 5B). Waterfall plotting illustrates a more pronounced beneficial effect of sorafenib treatment in patients with expression of OCT1 at the plasma membrane (Figure 6). Analysis of individual cases reveals that all six

patients with positive membrane staining were among the top ten survivors in this study. The effect of positive OCT1 staining at the plasma membrane on radiological response was less pronounced and did not reach statistical significance (Figure 7A). This may be accounted for by the

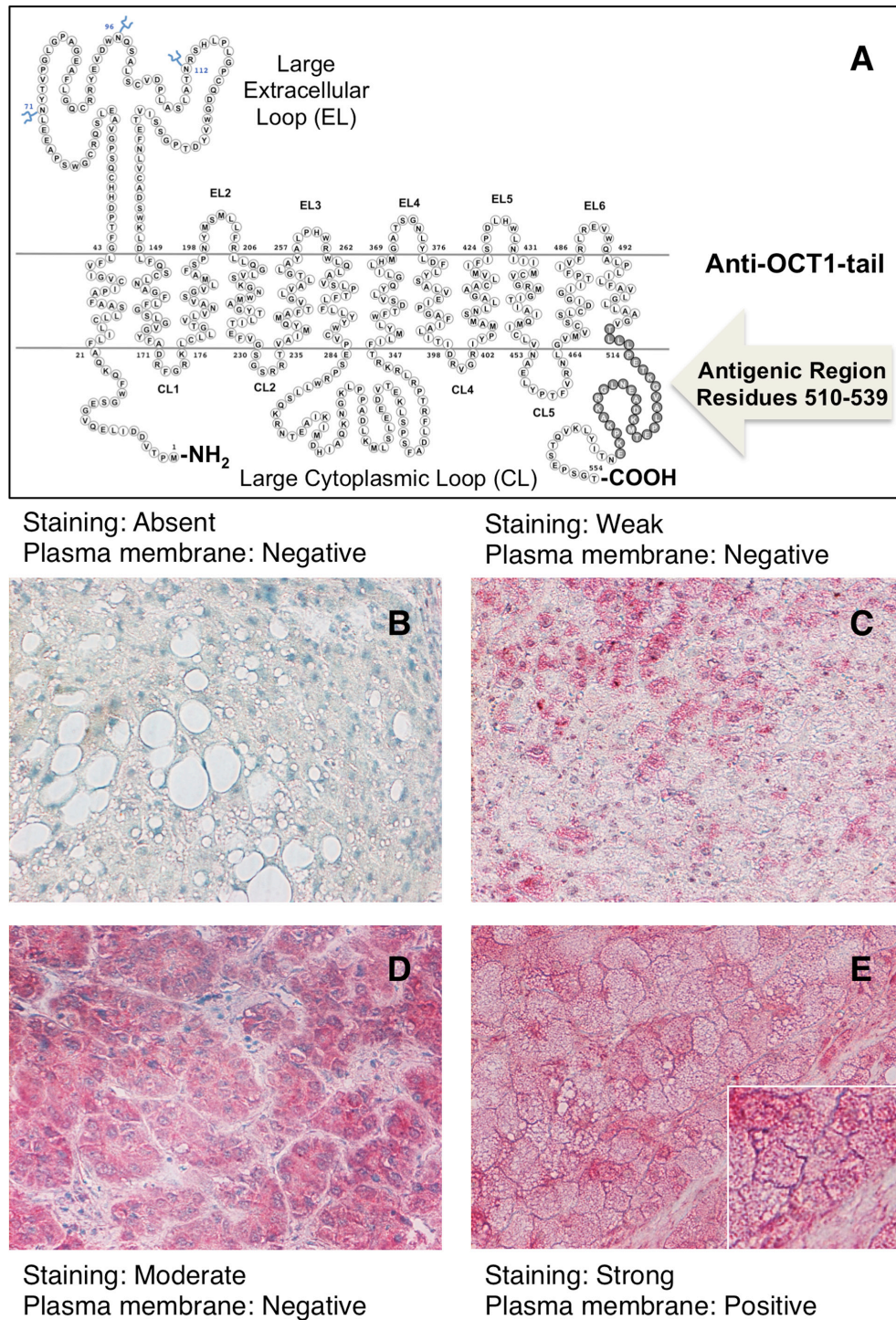


Figure 3: Schematic drawing of OCT1 showing the antigenic region used to raise the rabbit polyclonal LS-C161155 anti-OCT1-tail antibody. A. Representative images of immunohistochemical analysis showing the criteria used for hepatocellular carcinoma score depending upon the degree of slides staining with anti-OCT1-tail antibody as: absent B. weak C. moderate D. and strong E. and the lack (B, C, D) or the presence E. of staining at the plasma membrane.

retrospective nature of this study, which lacks standardized staging algorithms.

Relationship between OCT1 expression and tumor stage or TACE pretreatment

Adaptive changes in target molecule expression during tumor progression and after pretreatment have been described in the past. Therefore, we analyzed the impact of tumor stage and previous TACE (total of 26 patients) on OCT1 staining at the plasma membrane. Notably, when we investigated tumor stage according to BCLC criteria (Figure 7B) and pretreatment with TACE (Figure 7C), no relationship of these conditions with the presence of OCT1 at the plasma membrane of HCC cell was observed.

DISCUSSION

OCT1 plays a major role in the hepatocellular uptake of sorafenib, the so far only licensed systemic treatment for HCC [7]. It has been recently shown that overall OCT1 (mRNA/protein) levels in tumor tissue detected using RT-QPCR, mRNA-microarray or immunoblotting may serve as a prognostic biomarker for the response to systemic treatment of HCC with this

drug [13, 14, 17]. In the present study, we have taken a step forward by addressing the question on whether the presence of the transporter at its functional site in the plasma membrane, rather than its overall expression in tumor cells, is a better prognostic marker for the outcome of HCC patients treated with sorafenib. As the principal finding of the *TRANSFER* study, we here show for the first time that the site-specific absence of the transporter at the plasma membrane precludes a favorable overall survival, even if OCT1 is highly expressed in the cytosol of tumor cells. It is important to highlight that intracellular OCT1 is not expected to contribute to sorafenib uptake and hence it does not play a role in allowing the drug reaching its intracellular molecular targets.

Marked interindividual variability regarding OCT1 mRNA and/or protein in normal liver has been reported and the underlying genetic and non-genetic factors have been partly elucidated [22]. Whether similar mechanisms are involved in the downregulation of OCT1 found in HCC [13, 23] is unknown. Some of the causes for this decreased expression could be epigenetic, thus DNA methylation of *SLC22A1* gene has been associated with downregulation of OCT1 in HCC [23], but complete elucidation of the low expression of this transporter in tumor cells is currently missing. The clinical repercussion

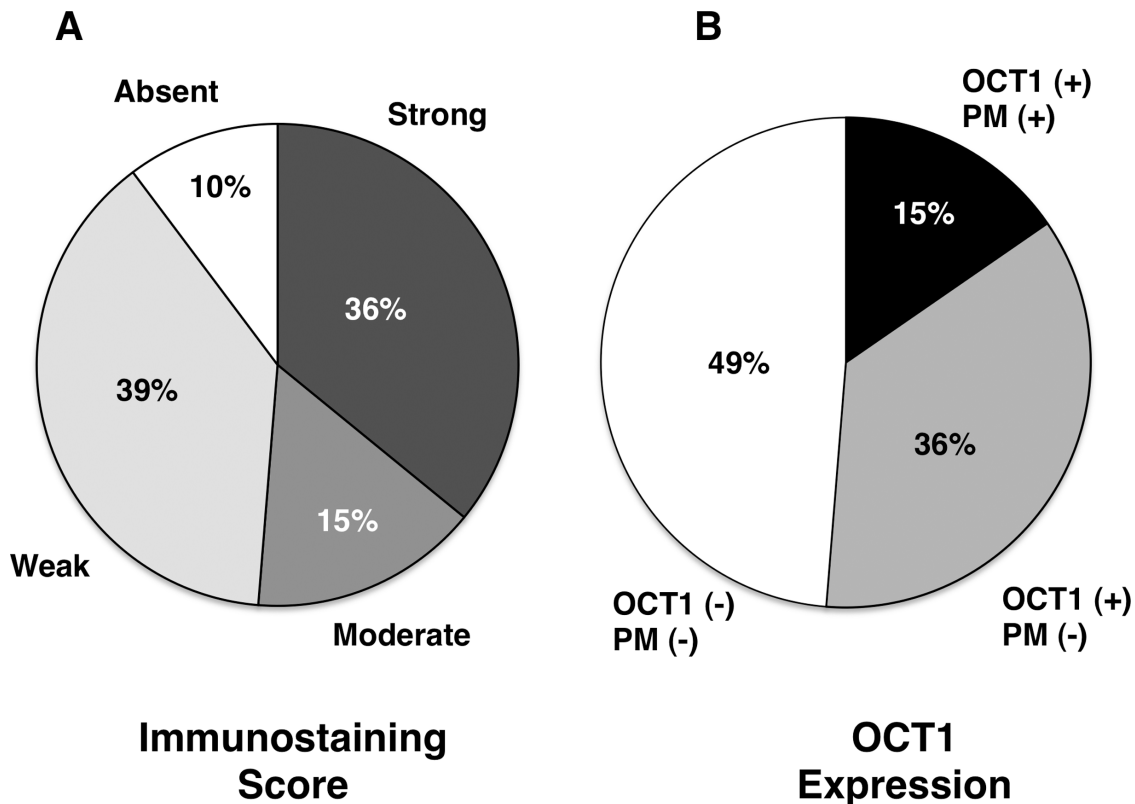


Figure 4: Classification of patients with hepatocellular carcinoma based only on the degree of OCT1 staining with anti-OCT1-head or anti-OCT1-tail antibodies. **A.** or taking also into account the presence of the staining at the plasma membrane **B.**

of the low or absent expression of OCT1 in HCC has been reported to include impaired drug uptake and presumably a reduced clinical effect of sorafenib [13]. Subsequent studies have supported this concept by reporting a relationship between intratumoral levels of OCT1 mRNA and the response to sorafenib [17]. However, it should be considered that non-functional aberrant variants constitute a marked proportion of synthesized OCT1 mRNA. Under these circumstances, it seems that the detection of OCT1 at the protein level would better reflect OCT1 function.

Using this approach OCT1 downregulation in HCC has been also confirmed [21]. The main contribution of the present study is to highlight that, in addition to reduced OCT1 expression (mRNA/protein) levels in the tumor, the reduction in functional OCT1 at the plasma membrane of tumor cells plays a key role among the multifactorial mechanisms of chemoresistance (MOC) determining the response of HCC to sorafenib. It is interesting to note that neither the stage of the tumor nor the pretreatment with TACE affected the presence of OCT1 at the plasma

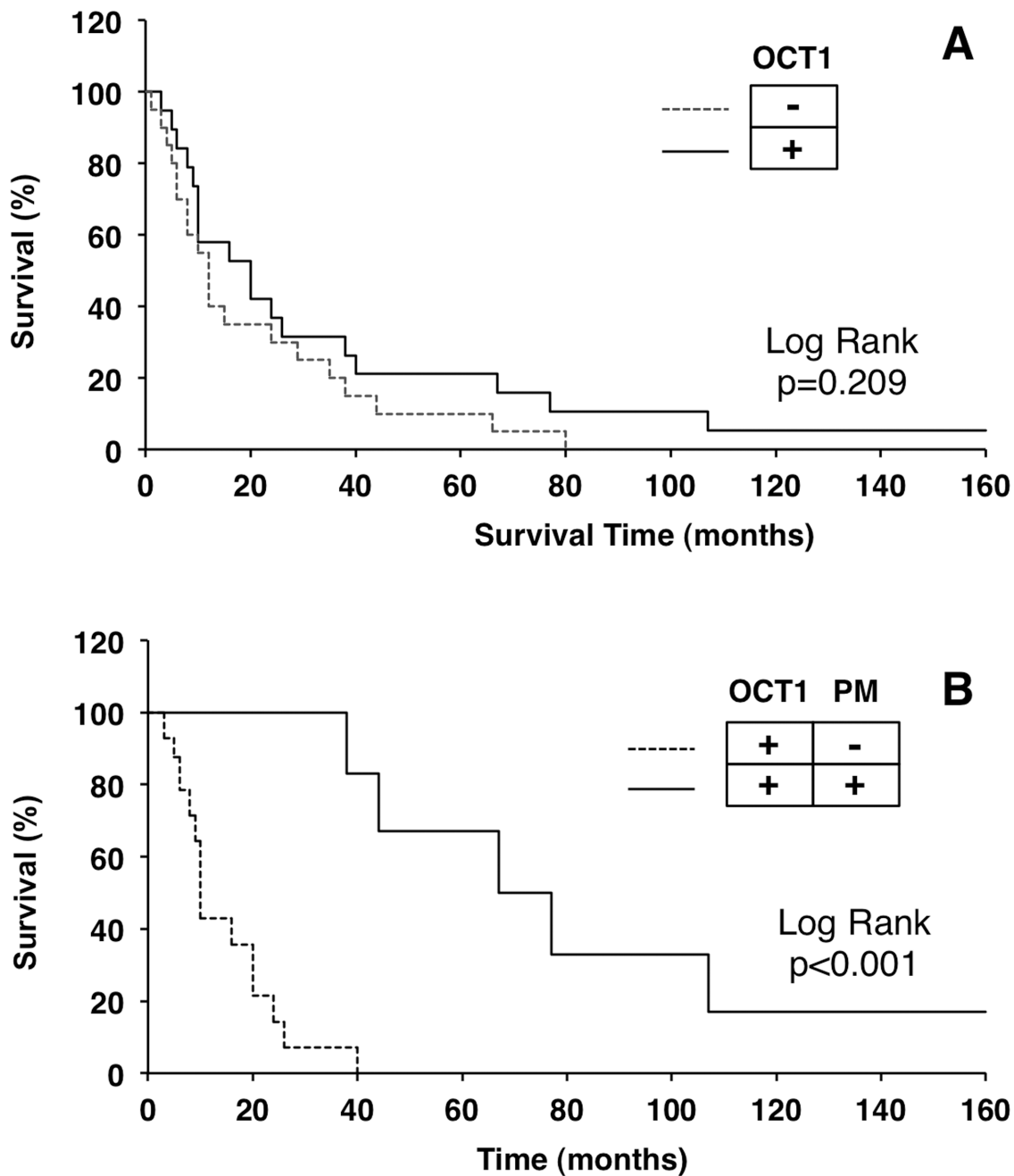


Figure 5: Kaplan-Meier plots of survival after starting hepatocellular treatment with sorafenib. Patients were classified based only on the degree of OCT1 staining. **A.** or taking also into account the presence of the staining at the plasma membrane. **B.** Comparisons were performed with the Log Rank (Mantel-Cox) test.

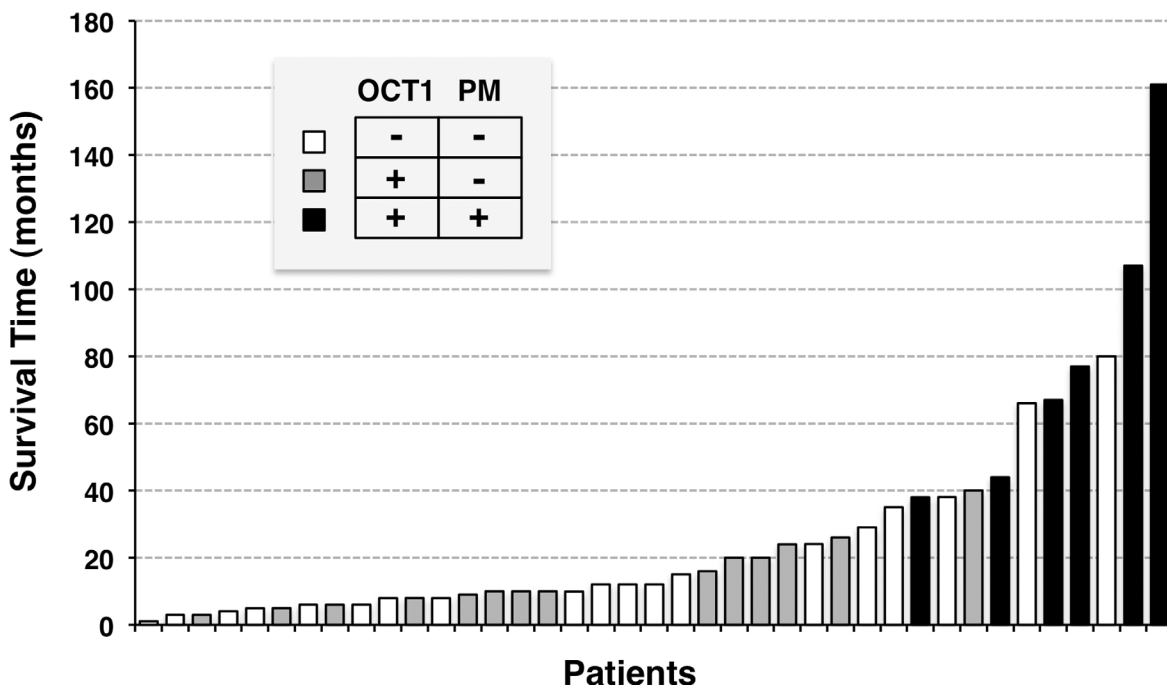


Figure 6: Waterfall plot of the clinical response to sorafenib treatment as determined by overall survival after starting systemic pharmacological treatment with sorafenib. Patients were classified based on the degree of OCT1 staining and the presence of the staining at the plasma membrane.

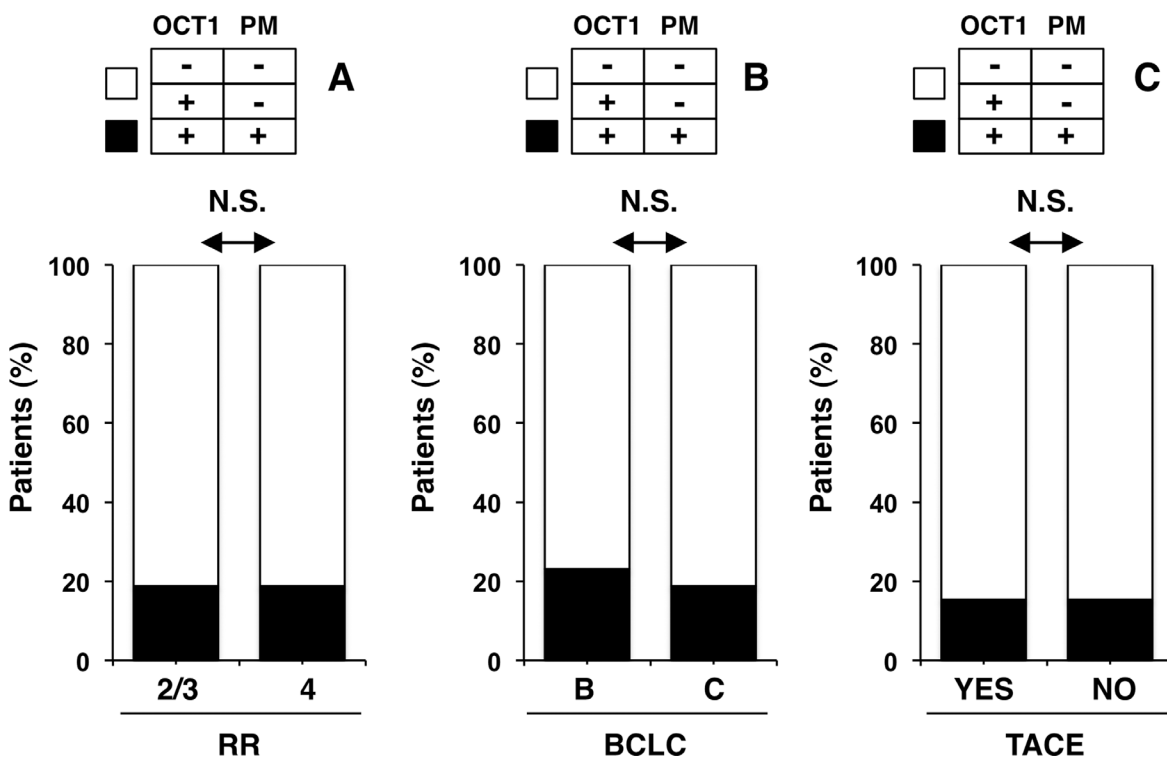


Figure 7: Absence of relationship between the expression of OCT1 and its presence at the plasma membrane with commonly used clinical criteria, such as. A. radiological response (RR), whose code was: 1) Complete response; 2) Partial response; 3) Stable disease; 4) Progression disease; B. BCLC stage B versus C; C. pretreatment by TACE. N.S., $p > 0.05$ by the Fisher's exact test.

membrane. Moreover, no relationship with the radiological response was found. This indicates that a more efficient sorafenib uptake through OCT1 results in a long-term beneficial effect, which was not seen at the moment when the unscheduled radiological follow-up of these patients had been carried out in this retrospective study.

It is also important to mention that although pharmacological activity of sorafenib is dependent on its intracellular concentration, sensitivity to this drug can be reduced by several mechanisms of chemoresistance (MOCs) other than reduced uptake through OCT1 [24]. Thus, *in vitro* induction of chemoresistance in human hepatoma cells by continuous exposure to sorafenib results in HCC cell clones with marked intrinsic differences regarding their MOC. In spite of maintained OCT1 expression, some clones developed chemoresistance to sorafenib by enhanced efflux through upregulation of the ABC protein, MRP3 [25] or activation of RAF kinases and PI3K/AKT pathway [26]. A role in MOC related to changes in the expression of ABC pumps, mainly ABCG2, has also been reported in clinical samples of HCC [21].

The fact that sorafenib was still moderately effective in patients bearing tumors with negligible expression of OCT1 is consistent with the fact that, although OCT3 (*SLC22A3*) expression in normal liver tissue is markedly lower than that of OCT1, OCT3 might replace OCT1 as major organic cation transporter in some cases of HCC. Analysis of mRNA levels for OCT1 and OCT3 in paired samples of HCC and surrounding liver tissue revealed downregulation of both transporters in most cases. However, in some tumors with dramatic downregulation of OCT1, the expression of OCT3 was preserved or increased [20, 23]. Consequently, in these tumors, OCT3 could be able to mediate enough sorafenib uptake to reach effective intracellular concentrations.

Of note, when examined in patients with HCC at earlier stages who have underwent liver resection or transplantation, OCT1 downregulation correlated with tumor progression [20]. However, in our series of patients with advanced HCC this relationship was no longer evident. The proportion of HCC with negative OCT1 immunostaining was similar in tumors of BCLC grade B and C.

In conclusion, these results indicate that the presence at the plasma membrane, rather than the overall OCT1 expression, is related with a favorable outcome in HCC patients treated with sorafenib. Although the present study has been focused on the clinical response to sorafenib, the interesting results obtained here suggest that further investigations are required to elucidate whether similar relationship is also valid for other TKIs, such as novel and promising MET inhibitors tivantinib and cabozantinib, currently under clinical evaluation for the treatment of HCC [9]. A prospective study is warranted to investigate the use of OCT1 immunostaining for the guidance of systemic first line treatment with sorafenib in the future.

MATERIALS AND METHODS

Study population and eligibility

The *TRANSFER* (TRANSPORTER SoraFENib Response) study was a multicenter retrospective investigation involving liver tumor biopsy samples collected for diagnostic or treatment purposes of HCC in patients who were treated with sorafenib in three German centers: University Hospital Würzburg (n=14), University Hospital Freiburg (n=20) and Hannover Medical School (n=5) from 2007 to 2015. Clinical data including hepatorenal function (MELD), BCLC stage, previous locoregional therapy, radiological response and survival were recorded. The study was approved by the Institutional Review Board of each participating center and conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. Written informed consent for the use of patient tissue samples was waived and clinical data were anonymized. Clinical and tumor characteristics are shown in Table 1.

Inclusion criteria were: i) Diagnosis of HCC based on pathology or imaging techniques obtained by dynamic contrast-enhanced multidetector CT scan or MRI according to the EASL guidelines [18]; ii) Sorafenib therapy for advanced HCC with known outcome (survival, radiological response), minimum duration of 4 weeks; iii) Compensated liver function prior to therapy (Child Pugh Class A or B); iv) Good Performance Status (PS 0-2); v) Availability of formalin fixed tumor tissue for histological analysis; vi) Time interval between tissue acquisition and start of sorafenib treatment no longer than 18 months. In fact, the mean time interval was 13.6 ± 22.2 months (median 7.1 months) including six patients with extended time interval who were accepted for inclusion by the lead investigator.

Exclusion criteria were: i) "Mixed" tumors as diagnosed by histological analysis; ii) No definite diagnosis of HCC; iii) Systemic chemotherapy, other than sorafenib, between tissue acquisition and start of sorafenib treatment. However, local therapy such as transarterial chemoembolization was allowed; iv) Decompensation of liver function (Child-Pugh Class C) before initiation of sorafenib treatment; v) Performance Status PS>2.

Immunohistochemistry analysis

Formalin-fixed, paraffin embedded HCC tissue was used. Immunostaining was performed on whole sections from paraffin-embedded material using two different primary anti-OCT1 rabbit polyclonal antibodies obtained from LifeSpan BioSciences, Madrid, LS-C31870 and LS-C161155, raised against the N-terminal (residues 100-149) and C-terminal (residues 510-539) regions of human OCT1 protein, respectively. Mouse and rabbit AP/Fast Red (ABC) Detection IHC Kit (Abcam) was used as

briefly described below. After deparaffinization in xylene and rehydration in a graded series of ethanol, samples were subjected to antigen retrieval at pH 6.0 using steamer heating for 20 min, washed four times in buffer (pH 7.4), incubated with protein blocking solution for 5 min to block nonspecific background staining and incubated 30 min with one of the two anti-OCT1 antibodies used here (both diluted 1/100), followed by 15 min with biotinylated secondary antibody against the primary antibody, 15 min with streptavidin alkaline phosphatase, and 10 min with the substrate-chromogen fast red dissolved in naphthol phosphate buffer. After each of the previous step samples were washed four times in buffer. All procedures were carried out at room temperature unless otherwise specified. Slides were counter-stained with hematoxylin and mounted with aqueous mounting medium. In negative control sections, wherein primary antibody was omitted, no immunostaining was observed (Figure 1A).

The slides were visualized under a light microscope and immunohistochemical stainings were reviewed independently by two observers, who were blinded to clinical data. Tumors were classified according to a simplified staining score as absent, weak, moderate or strong, and taking into account the localization of the staining at the plasma membrane as positive or negative (Figure 2B–2E and Figure 3B–3E). Slides with discrepancies were visualized a second time by the two observers together to achieve a consensus.

OCT1 and OCT3 *in vitro* expression

Using total RNA isolated from healthy liver, the open reading frames (ORF) of human OCT1 and OCT3 were amplified by reverse transcription followed by high-fidelity PCR using AccuPrime Pfx DNA polymerase (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). The purified amplicon was cloned into a modified pWPI lentiviral vector, which was manipulated to include the V5 antigen as a tag linked at the C-terminal of the transporter protein. Recombinant lentiviruses were produced in HEK293T cells transfected using a standard polyethylenimine (PEI) protocol with the transfer vectors pWPI-OCT1/pWPI-OCT3, encoding both the desired OCT1/OCT3 and EGFP, and the packaging plasmids psPAX2 and pMD2.G. Viral titers were determined by infection of HEK293T cells with serial dilutions of the viral solution, and analysis of EGFP-positive cells was carried out with a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, Madrid). These lentiviral vectors were used to transduce Chinese hamster ovary (CHO) cells 48 h before immunofluorescence analyses were carried out.

Immunofluorescence analysis

Human liver cryosections (5 μ m thin) or cultured CHO cells were fixed using ice-cold methanol for 3

min. After blocking with PBS supplemented with 5% fetal bovine serum for 30 min, wild type cells or those expressing OCT1 or OCT3-V5 were incubated for 1 h with primary antibodies against OCT1-head or OCT1-tail and/or against V5 (mouse monoclonal anti-V5, R96025, Invitrogen). As secondary antibodies anti-mouse or anti-rabbit Alexa 594- or Alexa 488-conjugated antibodies, both from Life Technology, were used as appropriate. The nuclei were stained with Dapi. The images were obtained using a confocal microscope (Leica TCS SP2).

Statistical analysis

The statistical analysis has been performed using SPSS (IBM® SPSS® Version 20.0 for Mac). Fisher's exact or log-rank (Mantel-Cox) tests were used as appropriate.

ACKNOWLEDGMENTS

RA was supported by a predoctoral grant from the "Junta de Castilla y Leon", Spain and "Fondo Social Europeo" (EDU/858/2013).

CONFLICTS OF INTEREST

AG served as advisory board member and speaker for BAYER.

GRANT SUPPORT

This study was supported in part by the Carlos III Institute of Health, Spain (Grants FIS-PI11/00337, PI15/00179 and PI16/00598), Ministry of Science and Innovation, Spain (SAF2013-40620-R and SAF2016-75197-R), "Junta de Castilla y Leon", Spain (SA015U13 and BIO/SA52/15), "Fundacion Mutua Madrileña", Spain (Call 2015), and "Fundacion Samuel Solórzano Barruso", Spain (FS/10-2014).

REFERENCES

1. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007; 132:2557-2576.
2. Altekruse SF, McGlynn KA, Reichman ME. Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005. *J Clin Oncol*. 2009; 27:1485-1491.
3. Bosetti C, Levi F, Boffetta P, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Trends in mortality from hepatocellular carcinoma in Europe, 1980-2004. *Hepatology*. 2008; 48:137-145.
4. El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in USA. *Hepatol Res*. 2007; 37:S88-94.

5. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2005; 42:1208-1236.
6. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2003; 362:1907-1917.
7. 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, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008; 359:378-390.
8. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, Luo R, Feng J, Ye S, Yang TS, Xu J, Sun Y, Liang H, Liu J, Wang J, Tak WY, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol*. 2009; 10:25-34.
9. Santoro A, Rimassa L, Borbath I, Daniele B, Salvagni S, Van Laethem JL, Van Vlierberghe H, Trojan J, Kolligs FT, Weiss A, Miles S, Gasbarrini A, Lencioni M, Cicalese L, Sherman M, Gridelli C, et al. Tivantinib for second-line treatment of advanced hepatocellular carcinoma: a randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2013; 14:55-63.
10. Abou-Alfa GK. Approaching the era of personalised therapy for liver cancer? *Lancet Oncol*. 2013; 14:7-8.
11. Strumberg D, Clark JW, Awada A, Moore MJ, Richly H, Hendlisz A, Hirte HW, Eder JP, Lenz HJ, Schwartz B. Safety, pharmacokinetics, and preliminary antitumor activity of sorafenib: a review of four phase I trials in patients with advanced refractory solid tumors. *Oncologist*. 2007; 12:426-437.
12. 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. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*. 2006; 24:4293-4300.
13. Herraes E, Lozano E, Macias RI, Vaquero J, Bujanda L, Banales JM, Marin JJ, Briz O. Expression of SLC22A1 variants may affect the response of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma to sorafenib. *Hepatology*. 2013; 58:1065-1073.
14. Lozano E, Herraes E, Briz O, Robledo VS, Hernandez-Iglesias J, Gonzalez-Hernandez A, Marin JJ. Role of the plasma membrane transporter of organic cations OCT1 and its genetic variants in modern liver pharmacology. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:692071.
15. Koepsell H, Lips K, Volk C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res*. 2007; 24:1227-1251.
16. Jonker JW, Schinkel AH. Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J Pharmacol Exp Ther*. 2004; 308:2-9.
17. Grimm D, Lieb J, Weyer V, Vollmar J, Darstein F, Lautem A, Hoppe-Lotichius M, Koch S, Schad A, Schattenberg JM, Worns MA, Weinmann A, Galle PR, Zimmermann T. Organic Cation Transporter 1 (OCT1) mRNA expression in hepatocellular carcinoma as a biomarker for sorafenib treatment. *BMC Cancer*. 2015; 16:94.
18. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2012; 56:908-943.
19. Park T, Yi SG, Shin YK, Lee S. Combining multiple microarrays in the presence of controlling variables. *Bioinformatics*. 2006; 22:1682-1689.
20. 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. Downregulation of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) in human hepatocellular carcinoma and their prognostic significance. *BMC Cancer*. 2012; 12:109.
21. Namisaki T, Schaeffeler E, Fukui H, Yoshiji H, Nakajima Y, Fritz P, Schwab M, Nies AT. Differential expression of drug uptake and efflux transporters in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Drug Metab Dispos*. 2014; 42:2033-2040.
22. Nies AT, Koepsell H, Winter S, Burk O, Klein K, Kerb R, Zanger UM, Keppler D, Schwab M, Schaeffeler E. Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology*. 2009; 50:1227-1240.
23. Schaeffeler E, Hellerbrand C, Nies AT, Winter S, Kruck S, Hofmann U, van der Kuip H, Zanger UM, Koepsell H, Schwab M. DNA methylation is associated with downregulation of the organic cation transporter OCT1 (SLC22A1) in human hepatocellular carcinoma. *Genome Med*. 2011; 3:82.
24. Marin JJ, Romero MR, Briz O. Molecular bases of liver cancer refractoriness to pharmacological treatment. *Curr Med Chem*. 2010; 17:709-740.
25. Tomonari T, Takeishi S, Taniguchi T, Tanaka T, Tanaka H, Fujimoto S, Kimura T, Okamoto K, Miyamoto H, Muguruma N, Takayama T. MRP3 as a novel resistance factor for sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016; 7:7207-7215. doi: 10.18632/oncotarget.6889.
26. Dash S, Chava S, Chandra PK, Panigrahi R, Ferraris PK, Liu J, Chang H, Buell J, Marin JJ. Organic Cation Transporter-1 (OCT1) dependent and independent mechanisms of sorafenib resistance in human hepatocellular carcinomas. *Proceedings of the 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research*. 2015:132-133.