

VNIVERSIDAD D SALAMANCA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA



CARACTERIZACIÓN DE LA FARMACORRESISTENCIA EN
CÁNCER HEPÁTICO:
ESTRATEGIAS DE SUPERACIÓN MEDIADA POR
PROTEÍNAS ABC

TESIS DOCTORAL

Ana Peleteiro Vigil

2022



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLoGÍA Y FARMACOLOGÍA



CARACTERIZACIÓN DE LA FARMACORRESISTENCIA EN
CÁNCER HEPÁTICO:
ESTRATEGIAS DE SUPERACIÓN MEDIADA POR
PROTEÍNAS ABC

Memoria presentada por Dña. Ana Peleteiro Vigil para optar al Título de
Doctor por la Universidad de Salamanca

Salamanca, 24 de febrero de 2022

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

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada “Caracterización de la farmacorresistencia en cáncer hepático: estrategias de superación mediada por proteínas ABC”, presentada por Dña. Ana Peleteiro Vigil 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. María Jesús Monte Río, Catedrática del Departamento de Fisiología y Farmacología, y la Dra. Dña. Elisa Herráez Aguilar, Profesora Contratado Doctor del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día 24 de febrero de dos mil veintidós.



Fdo. José Juan García Marín

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

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada “Caracterización de la farmacorresistencia en cáncer hepático: estrategias de superación mediada por proteínas ABC”, presentada por Dña. Ana Peleteiro Vigil 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. María Jesús Monte Río, Catedrática del Departamento de Fisiología y Farmacología, y la Dra. Dña. Elisa Herráez Aguilar, Profesora Contratado Doctor del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca, a día 24 de febrero de dos mil veintidós.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. J. Monte Río', with a stylized flourish at the end.

Fdo. María Jesús Monte Río

D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA, Dña. MARÍA JESÚS MONTE RÍO, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA, y Dña. ELISA HERRÁEZ AGUILAR, PROFESORA CONTRATADO DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada “Caracterización de la farmacorresistencia en cáncer hepático: estrategias de superación mediada por proteínas ABC”, presentada por Dña. Ana Peleteiro Vigil para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección conjunta en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día 24 de febrero de dos mil veintidós.



Fdo. José Juan García Marín



Fdo. María Jesús Monte Río



Fdo. Elisa Herráez Aguilar

FINANCIACIÓN

La doctoranda ha disfrutado durante la realización de esta Tesis Doctoral de un Contrato de Investigación para la formación de personal universitario (FPU), del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (BOE-B-2017-2646), y una ayuda complementaria de movilidad para estancias breves destinada a beneficiarios FPU (BOE-B-2020-47021) durante 3 meses en Signatope GmbH en el NMI Natural and Medical Sciences Institute en la Universidad de Tübingen (Alemania).

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

Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional. **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 Empresa. 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**". Coordinador: Jesús María Bañales Asurmendi. Investigador principal de la Universidad de Salamanca: José Juan García Marín. Periodo: 2018-2020.

Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Ayudas para la Adquisición de Equipamiento Científico-Técnico. Subprograma Estatal de Infraestructuras de Investigación y Equipamiento Científico-Técnico (Plan Estatal I+D+I 2017-2020) Convocatoria 2018. Proyecto: EQC2018-004591-P. **"Sistema de separación de**

nanopartículas por flujo asimétrico para la purificación de virus y exosomas”.

Investigador principal: José Juan García Marín.

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

Consejería de Educación, Junta de Castilla y León. Programa. Proyecto SA074P20. **“Reajustes personalizados en el tratamiento farmacológico del carcinoma hepatocelular basados en la heterogeneidad tumoral y la aparición de sensibilización colateral”.** Investigador principal: José Juan García Marín. Periodo: 2021-2023.

AGRADECIMIENTOS

He hecho un esfuerzo científico por ser concisa y expresar en pocas palabras los principales motivos de esta etapa por los que os estaré siempre agradecida a cada uno. No se aceptan reclamaciones.

A mis directores:

Al Dr. José Juan G. Marín, por hacerme crecer con tus desafíos, apadrinarme antes de salir de la crisálida y tu gran capacidad de formar un equipo de "gente buena y buena gente".

A la Dra. María Jesús Monte, por tu ojo crítico, minuciosidad y ejemplaridad académica. Ser gijonesa también suma.

A la Dra. Elisa Herráez, por tu ingenio, tus inteligentes aportaciones a esta Tesis y nuestra pasión/obsesión sana por la organización.

Al resto del HEVEPHARM y colaboradores:

A la Dra. María Ángeles Serrano, una de mis referencias femeninas de éxito y fortaleza, por remar a contracorriente.

A la Dra. Rocío I.R. Macías, por el preciado material aportado a esta Tesis, la naturalidad con la que afrontas cualquier reto y tu inagotable dulzura en el trato.

Al Dr. Óscar Briz, porque has sido esencial. Sin tus desinteresadas y creativas aportaciones, esta tesis no sería lo mismo.

A la Dra. Marta R. Romero, por tu capacidad para hacer sentir cualquier reto como un camino de flores.

A la Dra. Elisa Lozano, por tu admirable paciencia, constancia y el placer que es compartir tiempo contigo.

To the Signatope team, especially to Dr. Oliver Pötz, Dr. Helen S. Hammer and Katharina Bendel, for your kindness, professionalism and high efficiency. My time with you was extremely valuable.

A la Dra. Mai, por ilusionarse siempre conmigo y acompañarme en mis más locas aventuras.

A Candela, por ejercer de la infalible hermana mayor que nunca tuve.

A Ricky, por **siempre mi "novato"** y fantástico colega, por aportar la magia en el lab.

A Paula Sanchón, mi gran compañera y relevo en la militancia, por nuestra filosofía de vida.

Al Dr. Álvaro Gacho, por tu generosidad, enorme resiliencia y pasión por "la tierrina".

A la Dra. Sara Ortiz y a Anabel, por vuestro imprescindible y valioso trabajo aportado en esta Tesis.

A Laura P. Silva y a la Dra. Marta Alonso, por vuestra admirable capacidad para compatibilizar vuestras decisiones personales con la Ciencia.

A Bea S. de Blas y María Reviejo, la alegría del huerto y, espero, futuras responsables del Comité de Festejos HEVEPHARM.

A Emilia, por hacerme sentir siempre como en casa.

Al personal de microscopía del CIC, Ana, Ángel, Sara y David, por toda vuestra ayuda y el tiempo invertido en inmortalizar los ensayos más bonitos de esta Tesis.

A Flori, Toñi y Puri, por vuestra disposición para ayudar en lo que haga falta.

A la familia que se elige:

A INNOVA-Salamanca, especialmente a Moi, Nacho y Alex, por los valiosos compañeros de viaje que me ha traído mientras luchábamos por nuestros derechos.

A Olaya y Laura, por acompañarme siempre a donde voy y ser partícipes de las etapas más importantes de mi vida.

A mis amigos "biotecs" exiliados, Heaths, Cloe y Faus, por toda vuestra ayuda, consejos y no fallarme nunca. También a Pablo, Vicky y Ángel. Sois lo mejor que guardo de mi primera etapa en Salamanca.

To my dear Erasmus friends: Klára, Ari, Iago, Chai and Hristo, for inspiring me with your adventurous soul and all the beautiful stories we keep.

A mis compañeras de piso legítimas, Escar, Sara, Marina, y al adoptivo, Mike, por contribuir a una convivencia idílica, divertida y colmada de entendimiento.

A Marcos, por todo el asesoramiento y *coaching* gratuito que me has dado.

A Guillermo, por mostrarme el mundo en 4K.

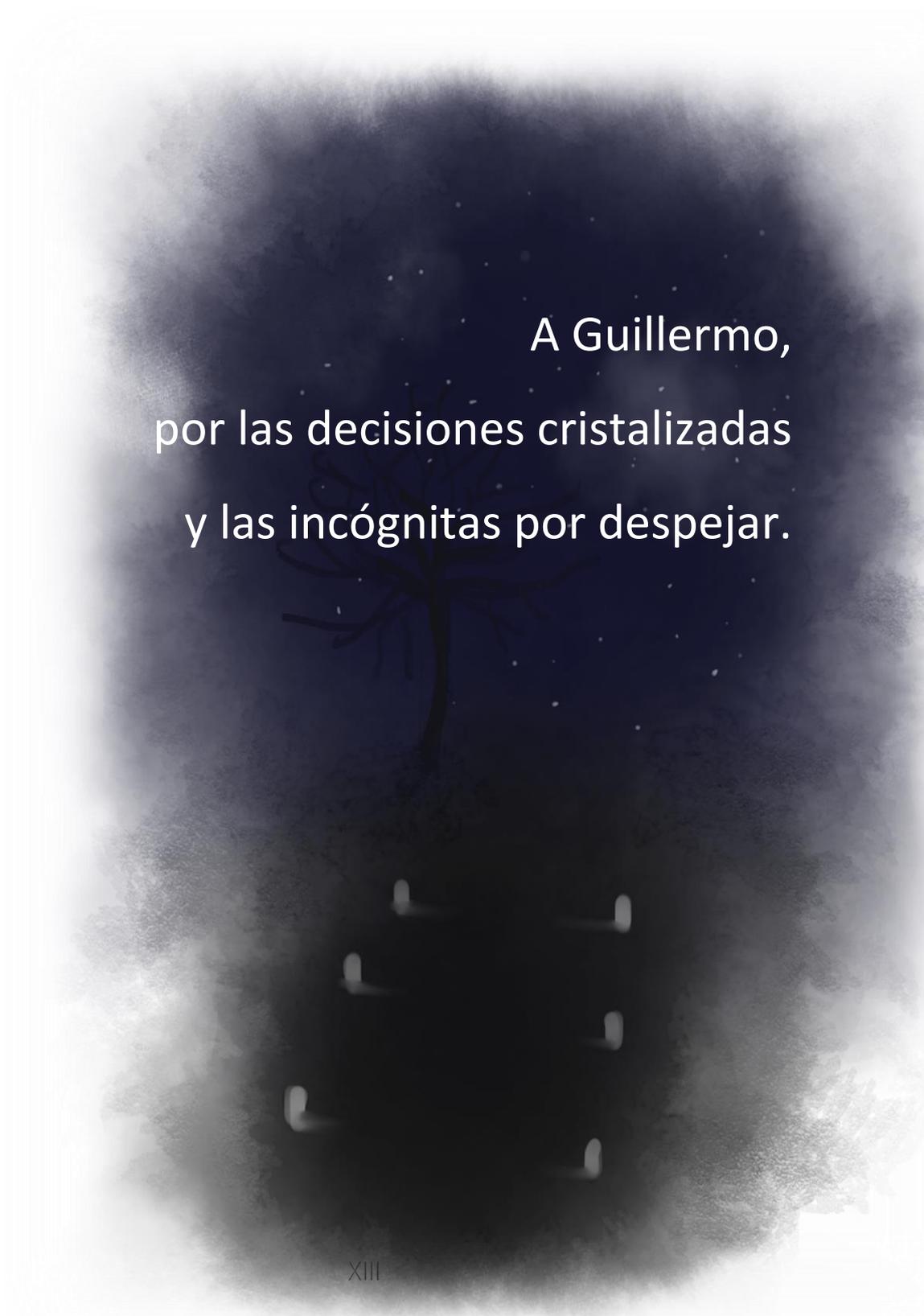
A mi familia:

A mis padres, fuente eterna de apoyo, amor y comprensión. Aunque el "polluelo" elija su destino, nada sería lo mismo sin los valores en los que me habéis educado y la libertad con la que me habéis permitido tomar mis decisiones.

A mi hermana Marta, por haber sido siempre más pragmática en la vida. Ojalá en la siguiente etapa estemos más cerca para aprender la una de la otra.

Mil gracias a todos.



A dark, atmospheric illustration of a tree with glowing spots on its trunk, set against a starry night sky. The tree is silhouetted against a dark blue and black background filled with small white stars. The trunk of the tree has several glowing white spots, possibly representing light or energy. The overall mood is mysterious and contemplative.

A Guillermo,
por las decisiones cristalizadas
y las incógnitas por despejar.

ABREVIATURAS

5-FU: 5-Fluorouracilo

ABC: *ATP-binding cassette*

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ADP: Adenosín difosfato

AF4: Fraccionamiento de flujo campo-flujo asimétrico

AFP: α -fetoproteína

AFPsp: **Péptido señal de la α -fetoproteína**

AMPC: Adenosinmonofosfato cíclico

ANOVA: Análisis de varianza

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

AT: Adyacente al tumor

ATP: Adenosín trifosfato

AP1: Proteína activadora 1

BCA: *Bicinchoninic acid*

BCLC: *Barcelona Clinic Liver Cancer*

BCRP: *Breast cancer resistance protein*

BRAF: Protooncogén B-Raf

BSA: Albúmina sérica bovina

BSEP: *Bile salt export pump*

CA: Antígeno carbohidratado

CAI: Índice de adaptación de codones

CAM: Calceína-acetoximetil éster

CAR: Receptor constitutivo de androstano (receptor nuclear) o *chimeric antigen receptor* (receptor quimérico de membrana)

Cas9: *CRISPR associated protein 9*

CAT: Cloranfenicol acetil-transferasa

CCA: Colangiocarcinoma

C/EBP: *CCAAT-enhancer-binding proteins*
CEUS: Ecografía con contraste
CF: Carboxifluoresceína
CFDA: Diacetato de 5(6)-carboxifluoresceína
CHAPS: 3-((3-colamidopropil) dimetilamonio)-1-propanosulfonato
CHO: *Chinese hamster ovary*
CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad
CMV: Citomegalovirus
CRISPR: *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*
CYP: Citocromo
Da: Daltons
DAB: Diaminobenzidina
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
dCCA: Colangiocarcinoma distal
DE: Desviación estándar
DMEM: *Dulbecco's modified Eagle medium*
DMSO: Dimetilsulfóxido
D.O.: Densidad óptica
EBR: Reactivo de bloqueo para ELISA
eCCA: Colangiocarcinoma extrahepático
ECL: *Enhanced chemiluminescence*
ED₅₀: *50% effective dose*
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
EEM: Error estándar de la media
EGFP: *Enhanced green fluorescent protein*
EGFR: Receptor del factor de crecimiento epitelial
EMT: Transición epitelio-mesenquimal
EN: Péptidos endógenos o péptidos ligeros
ERBB2IP: Proteína de interacción con ERBB2
F: *Forward primer*
FA: Ácido fórmico

FBS: *Fetal bovine serum*

FDA: *Food and Drug Administration*

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico

FGFR: Receptor de FGF

FOLFOX: Ácido folínico, 5-fluorouracilo y oxaliplatino

FXR: Receptor X farnesoide

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GC: Guanina y citosina

GPC3: Glipicano 3

GST: Glutación-S-transferasa

HCC: Carcinoma hepatocelular

HEK: *Human embryonic kidney*

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico

HER2 o ERBB2: Factor de crecimiento epidérmico humano 2 o *Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2*

HGF o c-MET: Factor de crecimiento hepatocitario

His: Histidina

HMG: *High mobility group*

HNF: Factor nuclear de hepatocito

HPRT: Hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa 1

IAA: Yodoacetamida

IC₅₀: Concentración inhibitoria 50

iCCA: Colangiocarcinoma intrahepático

IDH: Isocitrato deshidrogenasa

IF: Inmunofluorescencia

IFN- γ : **Interferón γ**

IHQ: Inmunohistoquímica

IL: Interleucina

IP: Inmunoprecipitación

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

IRES: Internal ribosome entry site

KI: Inhibidor de quinasas
KRAS: *Kirsten RAS oncogene homolog*
LB: Medio Luria-Bertani
LC-MS: Cromatografía líquida-espectrometría de masas
LIT: Linfocitos infiltrantes de tumor
LRH-1: Receptor homólogo hepático 1
LXR: Receptor X hepático
mAbs: Anticuerpos monoclonales
MATE: *Multidrug and toxin extrusion protein*
MCS: *Multicloning site*
MDR: Resistencia a múltiples fármacos
MEM: *Eagle's minimal essential medium*
MOI: Multiplicidad de infección
MPR: Mecanismo de farmacorresistencia
MPR-1b: Mecanismo de farmacorresistencia que implica una mayor expulsión de fármacos antitumorales de la célula
MRP: Proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos
MRP^{K.O.}: *knockout* de proteína MRP
MUC-1: Glucoproteína mucina 1
MWCO: *Molecular weight cut-off*
NBD: Dominio de unión a nucleótido
NFE2L2 o NRF2: Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2
NIH: *National Institutes of Health*
Ni-NTA: *Nickel-nitrilotriacetic acid*
NLS: Secuencia de localización nuclear
NTCP: Cotransportador de ácidos biliares acoplado al transporte de sodio
OAT: Transportador de aniones orgánicos
OATP: Polipéptido transportador de aniones orgánicos
OCT: Transportador de cationes orgánicos
OCTN: Transportadores de cationes orgánicos con un sitio de unión a los nucleótidos
ORF: *Open reading frame*

OST: Transportador de solutos orgánicos
PAM: Motivo adyacente protoespaciador
pb: Pares de bases de nucleótidos
PBS: *Phosphate buffered saline*
PBSC: PBS con detergente CHAPS
pCCA: Colangiocarcinoma perihiliar
PD-1: *Programmed death protein-1*
PDB: Protein data bank
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PD-L1: *Programmed death ligand-1*
PECAM-1: Molécula de adhesión a célula endotelial de plaquetas 1
pI: Punto isoeléctrico
PM: Peso molecular
PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPAR: Receptores activados por proliferadores de peroxisomas
PPC: Péptido de penetración celular
PSA: Antígeno prostático específico
PSC: Colangitis esclerosante primaria
PXR: Receptor X de pregnano
qPCR: *Quantitative polymerase chain reaction*
R: *Reverse primer*
RAR: Receptor de ácido retinoico
RCT: Receptores de células T
RIPA: *Radioimmunoprecipitation assay*
RMN: Resonancia magnética nuclear
rpm: Revoluciones por minuto
RT: Retrotranscripción
RXR: Receptor X retinoide
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SIS: Isótopos estables o péptidos pesados
SLC: *Solute carrier protein*

SNP: *Single nucleotide polymorphism*

SOC: *Medio super optimal broth*

SOX: *Sry-related HMG box*

SP: Péptido señal

Sry: *Sex-determining region Y*

STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3

TAA: Tioacetamida

TACE: Quimioembolización transarterial

TAC: Tomografía axial computarizada

Tat: Péptido de penetración celular de TAT

TAT: Transactivador de transcripción del VIH-1

Tat_R: Péptido de penetración celular de TAT con la secuencia de aminoácidos invertida

TBS: Tampón Tris salino

TCEP: Tris(2-carboxietil)fosfina

TE: Tampón de elución

TEA: Tetraetilamonio o clorhidrato de trietanolamina

TGF-**β**: **Factor de crecimiento transformante β**

TIP: *transporting injected particles*

TK: Tirosina quinasa

TKI: Inhibidor de tirosina quinasa

TMD: Dominio transmembrana

TNF-**α**: **Factor de necrosis tumoral α**

TU: Unidades de virus transductoras (transducción con lentivirus) o tampón de unión (purificación de proteínas)

TXP: Proteómica triple X

UAF: Unidades arbitrarias de fluorescencia

VEGFR: Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

VIH-1: Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

VSV: Virus de la estomatitis vesicular

WB: *Western blot*

WT: *Wild-type* o silvestre

X-flow: Flujo cruzado

xg: *Times gravity*

ZIP: Potencia de interacción cero

ϵ 1%: Coeficiente porcentual de extinción en solución

λ : Longitud de onda

ÍNDICE

ABREVIATURAS	XV
ÍNDICE	1
1. OBJETIVOS	4
2. INTRODUCCIÓN	8
2.1. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL SISTEMA HEPATOBILIAR	10
2.1.1. GENERALIDADES	10
2.1.2. TIPOS CELULARES	11
2.1.3. FUNCIONES	15
2.2. CÁNCER HEPÁTICO	16
2.2.1. GENERALIDADES	16
2.2.2. CARCINOMA HEPATOCELULAR (HCC)	17
2.2.3. COLANGIOCARCINOMA (CCA)	20
2.3. FARMACORRESISTENCIA EN CÁNCER HEPÁTICO	23
2.3.1. MECANISMOS DE FARMACORRESISTENCIA	23
2.3.2. TRANSPORTADORES IMPLICADOS EN EL EFLUJO DE FÁRMACOS (MPR-1B): LA SUPERFAMILIA DE PROTEÍNAS ABC	24
2.4. ESTRATEGIAS DE SUPERACIÓN DE LA FARMACORRESISTENCIA EN CÁNCER HEPÁTICO	31
2.4.1. QUIMIOTERAPIA COMBINADA	32
2.4.2. TERAPIA BIOLÓGICA	37
3. MATERIALES Y MÉTODOS	46
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	48
3.1.1. MUESTRAS HUMANAS	48
3.1.2. LÍNEAS CELULARES	50
3.1.3. BACTERIAS	50
3.2. CULTIVOS CELULARES	50
3.2.1. CULTIVOS DE CÉLULAS PARA ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA, LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y FUNCIONALIDAD DE PROTEÍNAS	51

3.2.2.	ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR	52
3.2.3.	GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES <i>KNOCKOUT</i> MEDIANTE EL USO DEL SISTEMA CRISPR/CAS9	52
3.3.	CULTIVO DE BACTERIAS	52
3.3.1.	TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS POR CHOQUE TÉRMICO	53
3.3.2.	PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS	53
3.3.3.	PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	53
3.4.	TÉCNICAS DE CLONACIÓN Y MUTAGÉNESIS DIRIGIDA	56
3.4.1.	CLONACIÓN CLÁSICA	56
3.4.2.	MODIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO PET-DEST42 POR MUTAGÉNESIS DIRIGIDA	60
3.4.3.	CLONACIÓN POR RECOMBINACIÓN “GATEWAY™”	61
3.5.	ENSAYO DE DETECCIÓN DE ESCISIONES EN EL GENOMA	62
3.6.	PRODUCCIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES	63
3.6.1.	PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN	63
3.6.2.	TITULACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO	64
3.6.3.	TRANSDUCCIÓN DE LAS CÉLULAS DIANA	65
3.7.	ESTUDIOS DE TRANSPORTE <i>IN VITRO</i>	65
3.7.1.	SOLUCIONES EMPLEADAS	65
3.7.2.	ESTUDIOS DE CAPTACIÓN Y EFLUJO DE COMPUESTOS FLUORESCENTES	65
3.8.	ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ARNm POR RT-qPCR	66
3.8.1.	DISEÑO DE CEBADORES	66
3.8.2.	EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL	67
3.8.3.	TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)	68
3.8.4.	PCR CUANTITATIVA (qPCR)	68
3.9.	DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR TINCIÓN Y <i>WESTERN BLOT</i>	69
3.9.1.	SOLUCIONES EMPLEADAS	69
3.9.2.	OBTENCIÓN DE HOMOGENADOS DE TEJIDO O DE CULTIVOS CELULARES	70
3.9.3.	ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) Y TINCIÓN POR AZUL DE COOMASSIE	70
3.9.4.	TRANSFERENCIA Y TINCIÓN DE LA MEMBRANA CON ROJO PONCEAU	70
3.9.5.	INMUNODETECCIÓN	71
3.9.6.	REVELADO	72
3.10.	DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA	72
3.10.1.	SOLUCIONES EMPLEADAS	72
3.10.2.	FIJACIÓN	72

3.10.3. INMUNODETECCIÓN	72
3.11. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOHISTOQUÍMICA	73
3.12. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR FRACCIONAMIENTO DE FLUJO CAMPO-FLUJO ASIMÉTRICO (AF4)	74
3.13. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	78
3.13.1. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	78
3.13.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	78
3.13.3. DETERMINACIÓN DE LA FLUORESCENCIA	82
3.13.4. CUANTIFICACIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO	82
3.13.5. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR	83
3.14. MÉTODOS COMUNES DE BIOLOGÍA MOLECULAR	83
3.14.1. SOLUCIONES EMPLEADAS DE USO COMÚN EN VARIAS TÉCNICAS	83
3.14.2. PCR DE ALTA FIDELIDAD	83
3.14.3. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA NO DESNATURALIZANTE	83
3.14.4. PURIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO	83
3.14.5. PURIFICACIÓN DEL ADN CONTENIDO EN GELES DE AGAROSA Y DE REACCIONES ENZIMÁTICAS	84
3.14.6. DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	84
3.14.7. SECUENCIACIÓN DE ADN	84
3.15. ESTUDIOS <i>IN SILICO</i> PARA LA CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS	85
3.16. ANÁLISIS Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	85

<u>CAPÍTULO I: PAPEL DE LAS PROTEÍNAS ABC EN LA FARMACORRESISTENCIA Y UTILIDAD COMO DIANAS FARMACOLÓGICAS EN HCC</u>	<u>86</u>
--	-----------

<u>CAPÍTULO II: PAPEL DE LAS PROTEÍNAS ABC EN LA FARMACORRESISTENCIA DEL CCA Y DESARROLLO DE TERAPIAS BIOLÓGICAS PARA SU SUPERACIÓN</u>	<u>87</u>
---	-----------

<u>5. CONCLUSIONES</u>	<u>88</u>
------------------------	-----------

<u>6. BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>92</u>
------------------------	-----------

1. OBJETIVOS

OBJETIVOS

Tras el cáncer de pulmón y el cáncer colorrectal, el cáncer primario de hígado, principalmente el carcinoma hepatocelular (HCC) y el colangiocarcinoma (CCA), representan la tercera causa de mortalidad por cáncer a nivel mundial. A pesar de que la terapia curativa de elección es la resección quirúrgica, esta medida no exime al paciente oncológico de un tratamiento farmacológico neoadyuvante y/o adyuvante. Además, este tipo de tumores suelen diagnosticarse cuando el estadio del cáncer es ya muy avanzado y sólo admite tratamiento quimioterápico. Desafortunadamente, uno de los principales obstáculos que compromete el éxito de estas terapias es la elevada refractariedad a los fármacos antineoplásicos de los tumores hepáticos.

A pesar de la gran diversidad biológica y clínica del cáncer hepático y la existencia de subtipos anatómicos e histológicos, un rasgo común a todos ellos es el marcado fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (MDR). Este resulta de la combinación de diversos mecanismos de farmacorresistencia (MPR) en las células tumorales, que confiere resistencia simultánea a un amplio espectro de fármacos. La sobreexpresión de bombas exportadoras pertenecientes a la superfamilia ABC limita en gran medida el éxito del tratamiento farmacológico frente al cáncer. La caracterización del perfil de expresión de estas proteínas en cada tipo de tumor podría facilitar el desarrollo de estrategias farmacológicas más selectivas y eficaces, así como identificar nuevos biomarcadores de predicción de la falta de respuesta al tratamiento.

La escasa eficacia de los regímenes quimioterapéuticos frente a los tumores hepáticos ha impulsado el desarrollo de fármacos como los inhibidores de receptores con actividad tirosina quinasa (TKIs). Sin embargo, el éxito de los TKIs, como sucede con otros agentes antitumorales, se ve reducido por la falta de respuesta de los pacientes debido a la preexistencia o a la aparición durante el tratamiento de MPRs. Dada la importancia de los MPRs relacionados con la expulsión de fármacos en este tipo de tumores, resulta fundamental dilucidar la capacidad de los TKIs para actuar como sustratos y/o inhibidores de las bombas ABC, así como la selectividad de interacción con los distintos tipos de bombas. Esta información es crucial para buscar sinergias entre estas moléculas y otros agentes antitumorales con objeto de diseñar regímenes de quimioterapia combinada más eficaces y con menos efectos adversos.

Por otra parte, la terapia farmacológica de elección en CCA consiste en la combinación de gemcitabina y cisplatino, pero su eficacia es escasa y la falta de especificidad provoca numerosos e indeseables efectos secundarios. Los avances y resultados favorables en el campo de la terapia biológica prometen desbancar este tipo de agentes quimioterapéuticos clásicos para dar el salto definitivo hacia la medicina de precisión. La mayor eficacia y tolerancia de estos nuevos tratamientos ha extendido considerablemente su uso frente a cánceres hematológicos, aunque su utilidad en tumores sólidos aún debe investigarse a fondo.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo global de esta Tesis Doctoral fue estudiar el perfil de expresión de proteínas ABC en HCC y CCA, para después explorar estrategias de superación de la falta de respuesta al tratamiento farmacológico, empleando TKIs y nuevas aproximaciones de terapia biológica coadyuvante. Para alcanzar dicho objetivo, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

Objetivo 1: Analizar el perfil de expresión de proteínas ABC en muestras humanas de HCC y CCA, así como en líneas celulares de ambos tipos de tumores en condiciones basales y sometidas a estrés farmacológico.

Objetivo 2: Desarrollar y validar modelos celulares *knockout* para proteínas ABC implicadas en la farmacorresistencia del HCC mediante la tecnología de edición génica programada CRISPR/Cas9.

Objetivo 3: Evaluar *in vitro* la selectividad de los fármacos TKI sobre bombas ABC y su capacidad para potenciar el efecto de agentes de quimioterapia clásica para el tratamiento del HCC.

Objetivo 4: Desarrollar y evaluar *in vitro* una estrategia de terapia biológica frente al CCA basada en la capacidad de SOX17 para reprimir la expresión de bombas ABC, utilizando la proteína recombinante SOX17 unida al péptido de penetración celular Tat (Tat-SOX17).

Objetivo 5: Desarrollar y evaluar *in vitro* una estrategia de terapia biológica frente al CCA basada en la utilización de células humanas con expresión y secreción estable de Tat-SOX17.

2.INTRODUCCIÓN

2.1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL SISTEMA HEPATOBILIAR

2.1.1. Generalidades

El sistema hepatobiliar forma parte del aparato digestivo e incluye el hígado, la vesícula y las vías biliares. Se trata de un sistema fundamental para mantener la homeostasis del organismo, al excretar productos de desecho lipófilos a través de la bilis y detoxificar la sangre proveniente del intestino, metabolizando y eliminando sustancias antes de que pasen a la circulación sistémica.

Después de la piel y junto con el cerebro, el hígado es el órgano sólido más grande del organismo, con un peso aproximado de 1,5 kg en adultos. Recibe una irrigación sanguínea dual: casi un 80% de la sangre proviene de la vena porta, mientras que el 20% restante es sangre oxigenada que emana de la arteria hepática. La sangre portal procede del estómago, intestino, páncreas y bazo, y contiene sustancias que serán filtradas por el hígado para su metabolismo y/o eliminación (Boron & Boulpaep, 2017). Morfológicamente, el ligamento falciforme divide el hígado en dos lóbulos principales: el derecho y el izquierdo. No obstante, desde un punto de vista funcional, existen ocho segmentos hepáticos que reciben riego sanguíneo de ramas provenientes de la vena porta y la arteria hepática. Paralelamente, en cada uno de estos segmentos la sangre es devuelta a una rama de la vena hepática y la bilis se libera al conducto biliar (Couinaud, 1957) (figura I-1).

Por otra parte, el sistema biliar complementa la función del hígado, concentrando, almacenando y conduciendo la bilis hacia el duodeno. El árbol biliar emerge de los ductulos biliares o canales de Hering, que representan la unión fisiológica entre el sistema canalicular hepatocitario y el sistema biliar colangiolar. Estos convergen en los conductos biliares intrahepáticos y, posteriormente, en los extrahepáticos. Entre estos últimos se encuentra la vesícula biliar que, al contrario que el resto del tracto biliar, no aparece en todos los vertebrados (figura I-1).

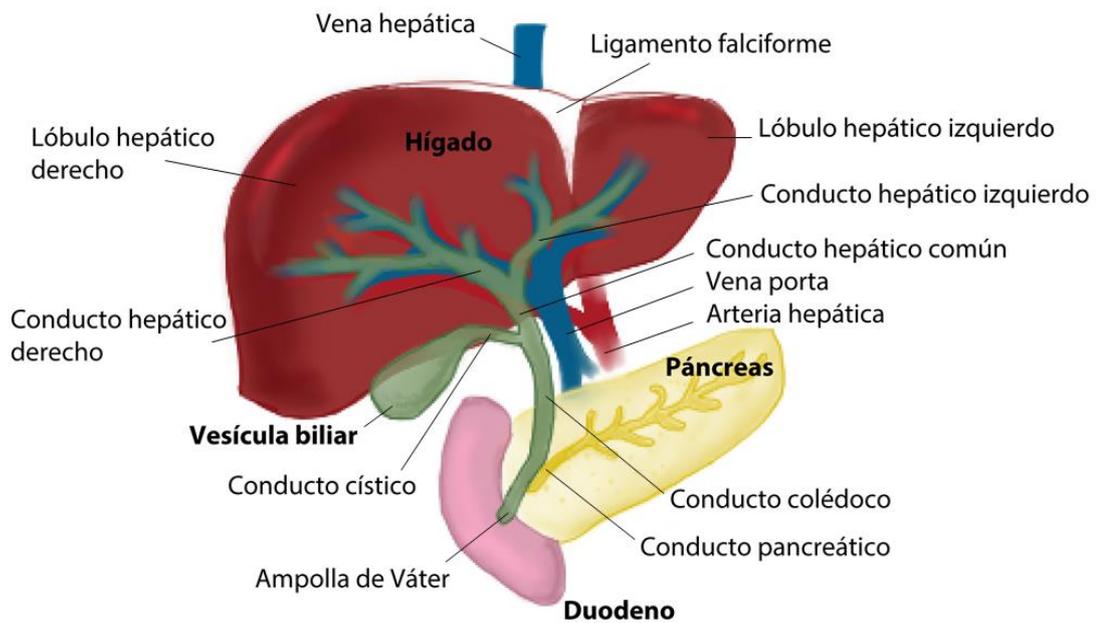


Figura I-1. Sistema hepatobiliar y su conexión con el páncreas y el duodeno.

2.1.2. Tipos celulares

2.1.2.1. Hepatocitos

Los hepatocitos son células epiteliales secretoras de bilis y suponen más del 80% del total de células hepáticas. Los hepatocitos generan la bilis en el espacio interhepatocitario, formando los denominados canalículos biliares, paralelos a los sinusoides, que son capilares donde se mezclan sangre portal y arterial, y cuyo revestimiento fenestrado permite el intercambio de sustancias con los hepatocitos colindantes a través del espacio perisinusoidal o de Disse. Esto convierte a los hepatocitos en células altamente polarizadas (Meier, 1988), pudiendo diferenciarse en ellos:

- Membrana basal o sinusoidal, con microvellosidades que se proyectan al espacio de Disse para facilitar la captación de solutos procedentes de la sangre sinusoidal.
- Membrana lateral, mediante las que se unen hepatocitos contiguos por uniones estrechas, desmosomas y uniones comunicantes o *gap junctions*, generando un patrón hexagonal.

INTRODUCCIÓN

- Membrana apical o canalicular, que forma los canalículos biliares y a través de cuyas microvellosidades los hepatocitos secretan los componentes de la bilis a la luz canalicular.

Los hepatocitos se distribuyen en unidades funcionales denominadas lobulillos (figura I-2), formados por conjuntos hexagonales dispuestos alrededor de una vena hepática central. En cada esquina del lobulillo se halla una tríada portal, compuesta por una arteriola hepática, una vénula portal y un conducto biliar. Los vasos sanguíneos de la tríada conectan con la vena central a través de los sinusoides, dispuestos radialmente dentro del lobulillo (Rappaport & Wilson, 1958).

Además, los hepatocitos presentan un fenotipo marcado por la zonación, que supone la especialización metabólica según su localización en el lobulillo, lo que viene determinado en parte por la composición de la sangre con la que son perfundidos (Rappaport & Wilson, 1958).

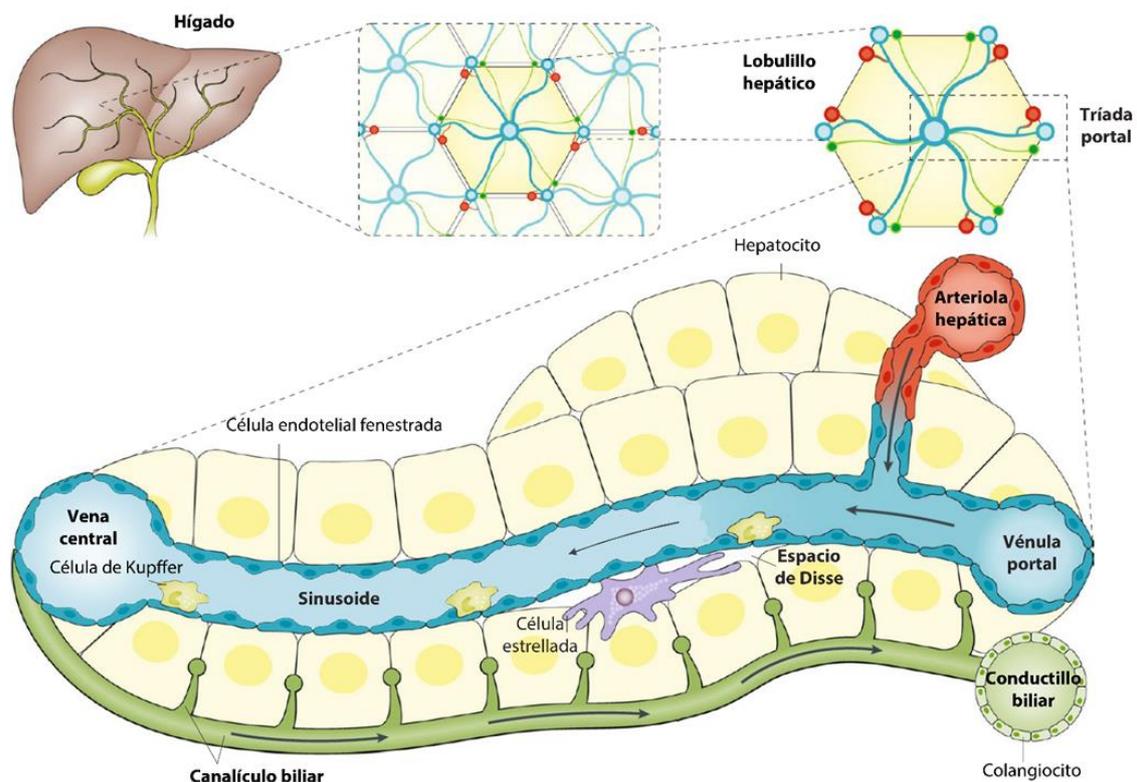


Figura I-2. Lobulillo hepático, con detalle del sinusoides, la tríada portal y la diversidad celular hepática. Imagen utilizada y traducida al español con el permiso de sus autores (Ben-Moshe & Itzkovitz, 2019).

2.1.2.2. Colangiocitos

Los colangiocitos son las células epiteliales biliares que conforman el árbol biliar, representando tan solo un 3-5% de las células hepáticas. Su función fundamental es la modificación de la bilis primaria secretada por los hepatocitos a los canalículos, un proceso altamente regulado por diversos factores entre los que se encuentran hormonas, neurotransmisores, péptidos, nucleótidos e incluso los ácidos biliares, componentes principales de la bilis (Tabibian *et al.*, 2013). Esta función pueden desarrollarla gracias a su polarización, distinguiéndose en estas células:

- Membrana apical o luminal, con microvellosidades y un cilio único sensible a los estímulos químicos y mecánicos que regula procesos como la diferenciación, proliferación y secreción en el colangiocito. Esta región de la membrana también presenta transportadores imprescindibles para la secreción de cationes orgánicos, Cl^- , HCO_3^- y agua al canal de Hering, y para la absorción de ácidos biliares, aminoácidos, iones y glucosa de la bilis.
- Membrana basolateral, con transportadores que equilibran el contenido intracelular de HCO_3^- y otros iones, a la par que expulsa las moléculas captadas de la bilis a través de la membrana apical para pasarlas a la sangre. También se encuentran en esta membrana la mayoría de los receptores hormonales implicados en la regulación de la actividad del colangiocito. Al igual que los hepatocitos, los colangiocitos están unidos y se comunican entre sí a través de uniones estrechas y *gap junctions* localizadas en regiones adyacentes de la membrana basolateral (Tabibian *et al.*, 2013).

Los colangiocitos son una población heterogénea y dinámica de células que difieren en tamaño y morfología, pudiendo dividirse en colangiocitos pequeños y grandes. Los colangiocitos pequeños se encuentran en los conductos biliares de menor calibre, tienen una forma aplanada y están menos diferenciados, lo que les dota de una gran plasticidad. Por el contrario, los colangiocitos grandes están en los conductos de mayor diámetro, tienen una forma cuboidea y están diferenciados. A estas particularidades también se suma la expresión diferencial de determinadas

proteínas, tanto intracelulares como de membrana (Benedetti *et al.*, 1996; Marzioni *et al.*, 2002).

El árbol biliar conforma un entramado de conductos que dirigen la bilis hasta la vesícula biliar en ayunas, y de ahí hasta el duodeno en periodo postprandial. Según su localización, los conductos biliares se dividen en:

- Intrahepáticos: emergen de los canales de Hering, que recogen la bilis primaria que los hepatocitos han vertido a los canalículos biliares. De aquí nacen los conductillos perilobulillares y acaban drenando en los conductillos interlobulillares, que se unen para dar los conductos septales y, luego, los conductos lobulares y los conductos hepáticos izquierdo y derecho.
- Extrahepáticos: el conducto hepático común, el conducto cístico, la vesícula biliar y el conducto biliar común o colédoco, que confluye con el conducto pancreático para desembocar en el duodeno a través de la ampolla de Váter. El esfínter de Oddi regula el paso de bilis o jugo pancreático a esta porción del intestino (Ludwig, 1987).

El origen de los conductos biliares difiere según su localización intra o extrahepática: se cree que los colangiocitos intrahepáticos provienen de los hepatoblastos, también precursores de los hepatocitos, mientras que los colangiocitos extrahepáticos derivarían del endodermo, al igual que las células epiteliales del páncreas y el duodeno (Raynaud *et al.*, 2011; Si-Tayeb *et al.*, 2010).

2.1.2.3. Otros tipos celulares

Algo más del 6% del volumen del parénquima hepático está formado por células diferentes a los hepatocitos y colangiocitos (figura I-2): células endoteliales (2,8%) que tapizan los canales vasculares o sinusoides, formando una estructura fenestrada contráctil, a través de la cual los solutos plasmáticos pueden acceder libremente al espacio de Disse; células de Kupffer (2,1%), macrófagos hepáticos que se localizan en el espacio vascular sinusoidal para eliminar bacterias, endotoxinas, parásitos y eritrocitos senescentes; y células estrelladas (células de Ito o de almacenamiento de grasa, 1,4%), halladas en el espacio de Disse, que poseen grandes bolsas de grasa en

su citoplasma donde almacenan vitamina A y, tras una lesión hepática, se activan transformándose en fibroblastos para mediar los procesos de fibrogénesis (Boron & Boulpaep, 2017).

2.1.3. Funciones

El hígado se localiza estratégicamente en el sistema circulatorio para recibir la sangre portal proveniente del estómago, intestino delgado, intestino grueso, páncreas y bazo. En esta posición, desempeña un papel fundamental en el manejo de los nutrientes asimilados por el intestino delgado, pero sus funciones son mucho más amplias:

- Metabolismo de glúcidos: control de la homeostasis glucídica mediante la formación y degradación de glucógeno, procesos conocidos como glucogenogénesis y glucogenólisis, además de su almacenamiento. La glucosa también puede ser sintetizada en los hepatocitos a partir de distintos precursores en lo que se conoce como gluconeogénesis.
- Metabolismo de lípidos: síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, producción y **metabolismo de lipoproteínas y catabolismo de ácidos grasos por β -oxidación** y cetogénesis. Además, los hepatocitos también llevan a cabo la síntesis *de novo* y el catabolismo del colesterol, empleado en un 80% para formar los ácidos biliares.
- Metabolismo nitrogenado: formación de proteínas plasmáticas (albúmina y factores de coagulación), síntesis del grupo hemo y metabolismo de porfirinas, interconversión de aminoácidos no esenciales, catabolismo proteico para la obtención de energía y degradación de bases púricas y pirimidínicas.
- Metabolismo de sustancias endógenas y xenobióticos: eliminación de sustancias endógenas (bilirrubina y algunas hormonas) y de compuestos exógenos (toxinas y fármacos) a través de la bilis, además de reacciones de biotransformación que activan o inactivan algunas sustancias (hormona tiroidea, vitamina D y profármacos).

- Producción de bilis: secreción de ácidos biliares a la bilis, que actúan como emulsificantes de las grasas, favoreciendo su digestión y absorción cuando la bilis es secretada desde la vesícula biliar al intestino delgado a través del colédoco.
- Almacenamiento de sustancias: vitaminas (A, D, E, K y B₁₂) y minerales (hierro en forma de ferritina y cobre) en el hígado, y bilis en la vesícula biliar.

La naturaleza y variedad de las funciones desempeñadas por el hígado hacen que esté especialmente expuesto y pueda sufrir daños que ocasionan la muerte de las distintas células que lo conforman. Es por ello que, al tratarse de un órgano esencial para el mantenimiento de la homeostasis, el hígado posee la excepcional capacidad de regenerarse. Este hecho ya se conocía desde la Antigüedad y se manifiesta en un corto periodo de tiempo tras la hepatectomía parcial, durante el cual la masa de tejido restante puede volver a crecer y recobrar su tamaño original (Michalopoulos & DeFrances, 1997). Las células hepáticas poseen una gran plasticidad, de modo que distintos tipos celulares pueden participar en la reconstrucción del hígado generando nuevos hepatocitos sin descuidar las funciones metabólicas. Los últimos avances en el campo de la genética y la genómica han demostrado la robustez y alta conservación evolutiva de la regeneración hepática, pero aún se desconocen muchas de las claves que relacionan los mecanismos implicados (Bangru & Kalsotra, 2020).

2.2. CÁNCER HEPÁTICO

2.2.1. Generalidades

El cáncer de hígado es el sexto cáncer más frecuente y la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo (Global Cancer Observatory (GLOBOCAN), 2020) (figura I-3).

Los tumores hepáticos se caracterizan por su elevada heterogeneidad, que puede ser provocada por la inestabilidad genómica, los cambios en el microambiente y/o alteraciones en las cascadas de señalización (L. Li & Wang, 2016). Esta heterogeneidad justifica el interés en implantar la medicina de precisión, pues el diagnóstico personalizado de pacientes oncológicos, basado en las características

genéticas y moleculares de cada tumor, permitirá un ajuste individualizado del tratamiento.

Según su origen, la mayoría de los tumores hepáticos se clasifican en carcinoma hepatocelular (HCC), colangiocarcinoma (CCA) y hepatoblastoma, siendo los dos primeros los más frecuentes en adultos y el tercero, en pacientes pediátricos (Nagtegaal *et al.*, 2019).

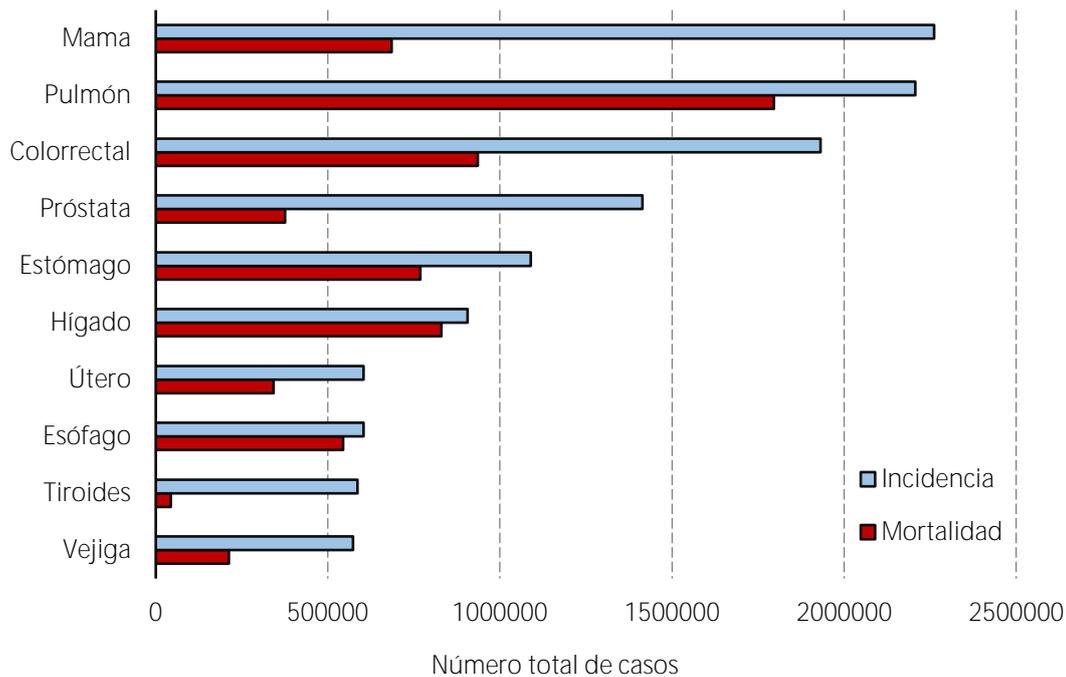


Figura I-3. Incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más frecuentes para todas las edades y sexos a nivel mundial en 2020 (Global Cancer Observatory (GLOBOCAN), 2020).

2.2.2. Carcinoma hepatocelular (HCC)

2.2.2.1. Epidemiología y factores de riesgo

El HCC constituye el 80-85% de los casos de cáncer hepático primario diagnosticados a nivel mundial, siendo más frecuente en varones y en zonas del África subsahariana y en el Este de Asia, aunque la tendencia indica un aumento en la incidencia en Europa del Este, América del Norte y Oceanía (Center & Jemal, 2011; Global Cancer Observatory (GLOBOCAN), 2020).

Los factores de riesgo incluyen infección por los virus de la hepatitis B o C (VHB o VHC), enfermedad del hígado graso, cirrosis alcohólica, tabaquismo, obesidad, diabetes, sobrecarga de hierro e ingesta de determinados carcinógenos en la dieta,

causantes de un daño crónico en el hígado con potencial para desencadenar tumores. Además, la edad y el sexo masculino también son factores predisponentes a padecer este tipo de tumores (Fattovich *et al.*, 2004).

2.2.2.2. Fisiopatología

El HCC se origina generalmente tras un estado de inflamación hepática crónica y fibrosis derivada de la exposición a los factores previamente mencionados. Si bien el 80 – 90% de los casos de HCC son precedidos por cirrosis, el resto (10 – 20%) se desarrolla sobre hígado no cirrótico (Simonetti *et al.*, 1991). Por ello, la comprensión de cómo se genera esta enfermedad requiere en gran medida descifrar los mecanismos moleculares que potencian el desarrollo de tumores en el hígado cirrótico. El acortamiento de los telómeros, el deterioro en el control de la proliferación de los hepatocitos y las alteraciones en el microambiente hepatocitario podrían ser algunos de los factores favorecedores de la hepatocarcinogénesis (H. El-Serag & Rudolph, 2007).

2.2.2.3. Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico del tumor en un estado poco avanzado es clave para actuar a tiempo y mejorar el pronóstico de la enfermedad. Los métodos tradicionales de diagnóstico y cribado de HCC se han basado en el reconocimiento de un nódulo > 10 mm en el hígado por ecografía, seguido por tomografía computarizada y resonancia magnética, que también se pueden complementar con el análisis de la alfa-fetoproteína sérica (H. B. El-Serag *et al.*, 2008). Solo si los resultados de estas pruebas no coinciden completamente con el diagnóstico de HCC, sería necesaria la confirmación por análisis de biopsias, ya que puede confundirse con CCA intrahepático (iCCA) (B. Huang *et al.*, 2016). En los últimos años, las técnicas de imagen han pasado de la mera aplicación cualitativa a la cuantitativa, lo que a medio plazo podría convertirlas en potentes herramientas no invasivas para el estudio de la fisiopatología subyacente y el seguimiento del tratamiento en cáncer hepático (Sartoris *et al.*, 2021).

El tratamiento del HCC depende del estadio tumoral. Para los pacientes en los estadios más tempranos, se procede a la resección quirúrgica del tumor o al trasplante

completo del hígado, según histopatología. Sin embargo, en algunos casos en los que la cirugía es demasiado arriesgada, el tumor puede destruirse mediante ablación percutánea. Para pacientes con HCC en estadio intermedio, la quimioembolización transarterial (TACE) es el tratamiento estándar (Ayuso *et al.*, 2018). En los casos de HCC más avanzado, el tratamiento de elección es la quimioterapia con sorafenib o, en EE.UU., lenvatinib (U.S. Food & Drug Administration, 2018) y, como opciones de segunda línea, regorafenib (Ayuso *et al.*, 2018; Center for Drug Evaluation and Research, 2017b) y nivolumab (Center for Drug Evaluation and Research, 2017a).

Sin embargo, la aparición de farmacorresistencia es muy frecuente en los pacientes tratados con quimioterapia clásica o fármacos vectorizados, a lo cual hay que sumarle la toxicidad y la escasa eficacia de estos tratamientos (Cheng *et al.*, 2009; Llovet *et al.*, 2008). La validación clínica de nuevos tratamientos para los pacientes con HCC es acuciante. Una de las aproximaciones más prometedoras es la inmunoterapia, con fármacos que ayudan a combatir la resistencia a los antitumorales tradicionales atacando las células iniciadoras del tumor, inhiben los puntos de control inmunitarios, evitan las respuestas inflamatorias o impiden la progresión del cáncer. Además, la nanotecnología puede ayudar a mejorar la formulación de estos tratamientos, aumentando su eficacia (Anwanwan *et al.*, 2020). Pero hasta la fecha, ninguna propuesta ha conseguido desbancar al modesto efecto del sorafenib en el intento de aumentar la esperanza de vida de los pacientes (Couri & Pillai, 2019).

Una dificultad añadida al tratamiento del HCC es que los pacientes presentan características muy heterogéneas. En la práctica clínica el tratamiento se elige según el estadio tumoral en que se encuentra el paciente, pero en los estadios más avanzados se requeriría un estudio más detallado de cada paciente. El análisis molecular de las biopsias ayudaría a determinar la huella genética del HCC avanzado y así ajustar mejor la terapia (Schulze *et al.*, 2015).

El mayor reto en el tratamiento del HCC está en encontrar buenas combinaciones de agentes antitumorales y administrarlas según el fenotipo de cada tumor. Así, el hallazgo de nuevas sinergias entre fármacos podría recuperar muchos de los tratamientos ya aprobados, pero hoy en desuso por su falta de eficacia cuando se administran en los regímenes terapéuticos habituales.

2.2.3. Colangiocarcinoma (CCA)

2.2.3.1. Clasificación

El término CCA comprende diversos tumores de las vías biliares y se puede diferenciar según varias características en (Nakeeb *et al.*, 1996) (figura I-4):

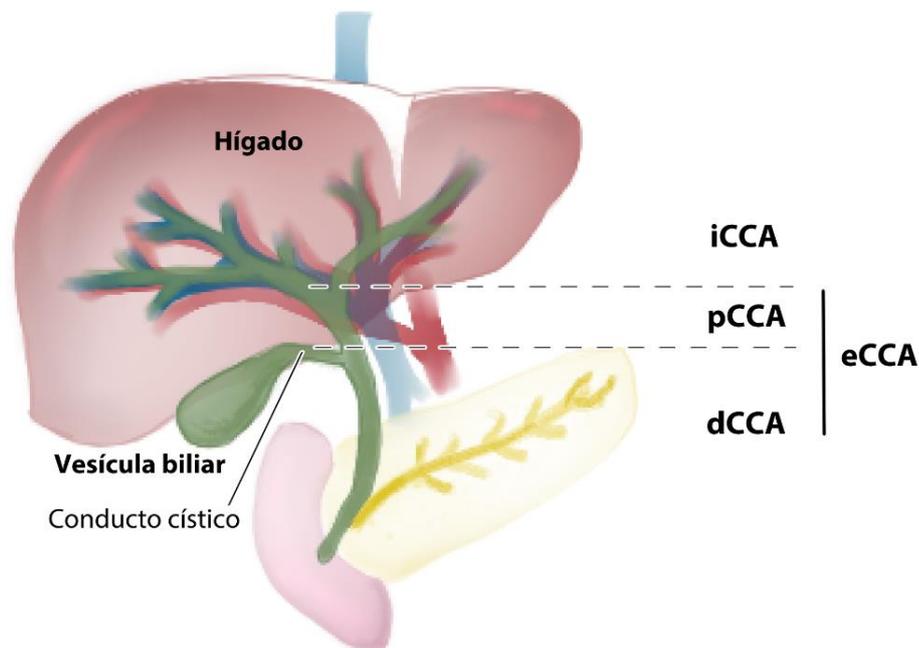


Figura I-4. Ubicación anatómica de los distintos subtipos de colangiocarcinoma (CCA). iCCA, CCA intrahepático; pCCA, CCA perihiliar; dCCA, CCA distal.

- Colangiocarcinoma intrahepático (iCCA), ubicado en los conductos secundarios del árbol biliar en el hígado.
- Colangiocarcinoma perihiliar (pCCA), originado en las vías biliares extrahepáticas por encima del conducto cístico.
- Colangiocarcinoma distal (dCCA), originado en las vías biliares extrahepáticas por debajo del conducto cístico.

Aunque el uso del término CCA extrahepático (eCCA) implica una considerable simplificación por las diferencias clínicas entre pCCA y dCCA, lo emplearé para referirme a ambos tipos de CCA en conjunto.

2.2.3.2. Epidemiología y factores de riesgo

Aunque con mucha menor incidencia (10-15%), el CCA es el segundo tipo de cáncer hepático más frecuente después del HCC. En EE.UU., el 80% de los CCA diagnosticados son eCCA, siendo el 20% restante iCCA (Banales *et al.*, 2016; DeOliveira *et al.*, 2007; Nakeeb *et al.*, 1996). Aunque la clasificación y el diagnóstico de CCA son problemáticos y dificultan la obtención de estadísticas fiables, diversos estudios recientes muestran una tendencia invertida: los casos y las muertes por iCCA han aumentado, mientras que para los eCCA se ha producido un descenso en incidencia y mortalidad en las últimas décadas (Banales *et al.*, 2020; Shaib & El-Serag, 2004). A nivel global, la mayor incidencia se observa en Tailandia y otros países del sudeste asiático, donde son más frecuentes las parasitosis hepáticas (Sripa & Pairojkul, 2008).

Respecto a los factores de riesgo, solo un 10% de los casos están asociados a inflamación hepática crónica (Shaib & El-Serag, 2004), aunque existen evidencias de que también puede asociarse con colangitis primaria esclerosante (PSC) (Burak *et al.*, 2004; Chalasani *et al.*, 2000), parasitosis hepáticas (sobre todo infecciones con *Opisthorcosis viverrini*) (Thamavit *et al.*, 1987), infecciones por VHB y VHC y obstrucciones en los conductos biliares (Clements *et al.*, 2020).

2.2.3.3. Fisiopatología

La etiología concreta del CCA se desconoce y los distintos subtipos pueden presentar gran similitud genética e histológica.

El iCCA se origina normalmente en ausencia de cirrosis (D. H. Lee & Lee, 2017), pudiendo provenir de la transformación de hepatocitos maduros (Fan *et al.*, 2012; Sekiya & Suzuki, 2012), células progenitoras (Cardinale *et al.*, 2012; Carpino *et al.*, 2015) o colangiocitos cuboidales no secretores de mucina (Komuta *et al.*, 2012), según su localización en el árbol biliar.

En el caso de los pCCA y dCCA, existen evidencias de que muy probablemente se originen a partir de las glándulas peribiliares ubicadas en los conductos biliares hiliares y los colangiocitos secretores de mucina (Carpino *et al.*, 2015; Nakanuma & Sato, 2012) tras lesiones preneoplásicas (Banales *et al.*, 2016).

2.2.3.4. Diagnóstico y tratamiento

Debido a que el CCA es una patología asintomática en los primeros estadios, la mayoría de los pacientes se diagnostican en un estado avanzado. Para ello, se emplean técnicas de imagen, como ecografía, ecografía con contraste (CEUS), tomografía axial computarizada (TAC) y resonancia magnética nuclear (RMN). No obstante, la falta de patrones radiológicos definidos en CCA hace imprescindible la confirmación del diagnóstico mediante la cuantificación en suero del antígeno carbohidratado 19-9 (CA 19-9) y/o el análisis citológico e histológico de biopsias (Banales *et al.*, 2016; Bridgewater *et al.*, 2014).

Para los casos en los que es posible, el tratamiento de elección siempre es la resección quirúrgica del tumor, acompañada de un tratamiento coadyuvante con capecitabina (Shroff *et al.*, 2019). Para los demás pacientes, se opta en primera instancia por un régimen combinado de quimioterapia (Valle *et al.*, 2016) con gemcitabina y cisplatino (Okusaka *et al.*, 2010; Valle *et al.*, 2010); como tratamiento de segunda línea, se combinan ácido folínico, 5-fluorouracilo y oxaliplatino (FOLFOX) (Lamarca *et al.*, 2019).

Sin embargo, los fármacos empleados en la clínica para el tratamiento del CCA no operable muestran escasa eficacia, por lo que muchos de los ensayos clínicos en marcha se centran en el uso de nuevas combinaciones de agentes quimioterapéuticos conocidos, terapia dirigida e inmunoterapia (NIH, [Clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov)). La mayoría de estos nuevos abordajes requieren la previa determinación del perfil molecular del tumor para determinar en qué pacientes podría ser eficaz el tratamiento. Por ahora, los resultados más prometedores se están obteniendo en el campo de la terapia dirigida, donde se están probando inhibidores de la isocitrato deshidrogenasa 1 y/o 2 (IDH1/2), como el ivosidenib (Abou-Alfa *et al.*, 2019b; Lowery *et al.*, 2021), e inhibidores del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR) (Javle *et al.*, 2018; Mazzaferro *et al.*, 2021; Meric-Bernstam *et al.*, 2018).

2.3. FARMACORRESISTENCIA EN CÁNCER HEPÁTICO

2.3.1. Mecanismos de farmacorresistencia

A pesar de los distintos tratamientos que están emergiendo contra el cáncer hepático, los pacientes de HCC y CCA que no pueden optar por la cirugía aún dependen de una terapia farmacológica que presenta escasa eficacia.

La razón de la alta refractariedad de este tipo de tumores no se ha esclarecido del todo, pero se conocen distintos mecanismos de farmacorresistencia (MPRs) (Marin & Macias, 2021) implicados en la falta de respuesta a los tratamientos farmacológicos. Estos MPRs se pueden tipificar según la función de las proteínas implicadas, que en **conjunto constituyen el denominado “resistoma”**. En nuestro grupo de investigación, hemos simplificado el estudio de estos MPRs dividiéndolos en siete grupos (Marin *et al.*, 2017; Marin *et al.*, 2020b)(figura I-5):

- MPR-1: menor entrada (MPR-1a) y mayor salida (MPR-1b) del fármaco
- MPR-2: menor activación o mayor inactivación metabólica del fármaco
- MPR-3: modificaciones en las dianas terapéuticas
- MPR-4: mayor reparación del daño en el ADN
- MPR-5: activación de vías de proliferación y supervivencia, inhibición de la apoptosis
- MPR-6: factores del microambiente tumoral
- MPR-7: transición del fenotipo epitelial al mesenquimal, favoreciendo las características de células *stem* y la invasividad del tumor

INTRODUCCIÓN

Si bien no debemos pasar por alto ninguno de estos mecanismos, esta Tesis se ha centrado en el estudio del MPR-1b intrínseco (sobrexpresión de bombas de eflujo durante la carcinogénesis) y adquirido (sobrexpresión de bombas de eflujo tras exposición a fármacos).

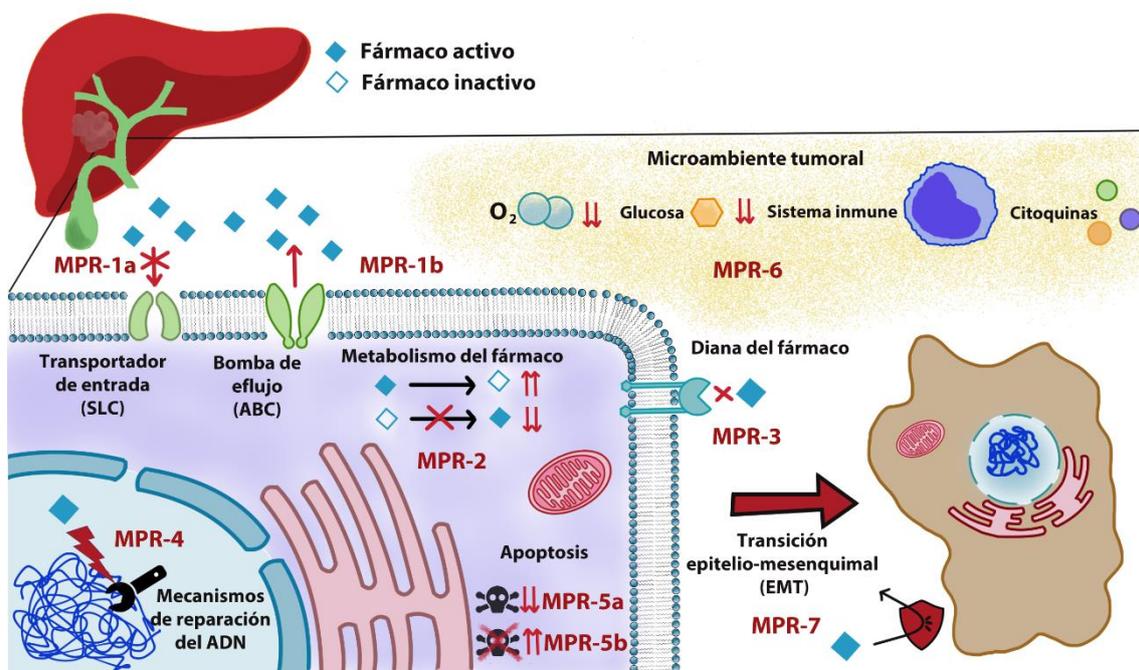


Figura I-5. Mecanismos de farmacoresistencia (MPR) en cáncer hepático. Modificada de Marin *et al.* (2020a).

2.3.2. Transportadores implicados en el eflujo de fármacos (MPR-1b): la superfamilia de proteínas ABC

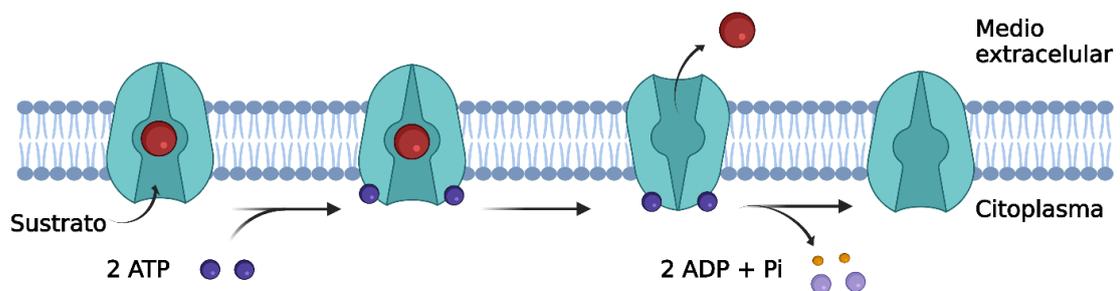
2.3.2.1. Generalidades

Las proteínas transportadoras de membrana dependientes de ATP o transportadores ABC (siglas en inglés para *ATP-binding cassette*) humanas están codificadas por 48 genes, clasificados en siete subfamilias designadas desde ABCA hasta ABCG (NIH, ncbi.nlm.nih.gov/gene/) (Dean *et al.*, 2001).

La estructura típica de los transportadores ABC se caracteriza por constar de cuatro dominios: dos dominios de unión a nucleótidos citoplasmáticos (*nucleotide binding domain* o NBD; unen e hidrolizan ATP) y dos dominios transmembrana (*transmembrane domain* o TMD; reconocen y transportan sustratos) (Bakos *et al.*, 1996; Higgins, 1992; C. Kast & Gros, 1998; C. Kast & Grost, 1997). Si bien la estructura y función

de los NBD son similares en todas las familias, los TMD son muy heterogéneos, lo que dota a estas proteínas de gran versatilidad. De este modo, los transportadores ABC pueden reconocer diversos sustratos y utilizar la energía de la hidrólisis del ATP para transportar moléculas a través de las membranas celulares, independientemente de la existencia de un gradiente de concentración positivo o negativo a ambos lados de la membrana plasmática (Hyde *et al.*, 1990). El mecanismo de exportación de sustratos se basa en la translocación dependiente de ATP; este modelo consiste en la unión del sustrato al TMD y una molécula de ATP a cada NBD, que se hidroliza secuencialmente a ADP y fosfato para producir cambios conformacionales que permiten la expulsión del sustrato del interior celular y, finalmente, la restauración de la estructura inicial (Higgins & Linton, 2004)(figura I-6).

Las bombas ABC se expresan en todos los tejidos humanos, pudiendo además localizarse en la membrana plasmática, mitocondrial, lisosomal, peroxisomal o del retículo endoplasmático. Transportan sustratos endógenos como lípidos, péptidos, nucleósidos, esteroides y ácidos biliares, así como sustancias exógenas como fármacos y toxinas, participando en los procesos de absorción, distribución y excreción de los mismos (Dean *et al.*, 2001).



Created in [BioRender.com](https://www.biorender.com) 

Figura I-6. Mecanismo de transporte de las bombas ABC.

2.3.2.2. Subfamilias ABC implicadas en el transporte de fármacos

La mayoría de proteínas responsables del eflujo de xenobióticos en el organismo pertenecen a la superfamilia ABC, aunque no todas ellas están implicadas en el desarrollo del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (MDR) (tabla I-1). Las principales bombas involucradas en la reducción de la concentración intracelular de fármacos antitumorales en HCC y CCA, cuya estructura y localización celular se ilustra en la figura I-7, se incluyen en las siguientes subfamilias (revisadas ampliamente en Liu (2019)):

- ABCB: está integrada por 11 genes codificantes de *full transporters* (compuestos por 2 NBD y 2 TMD) y *half transporters* (con 1 NBD y 1 TMD) que deben formar dímeros para ejercer su función. Uno de los primeros transportadores ABC descritos y mejor caracterizado es MDR1 o P-gp (*multidrug resistance protein* o *permeability glycoprotein*), codificado por el gen *ABCB1*. En el hígado, MDR1 se localiza en la membrana canalicular de los hepatocitos y los colangiocitos y es un transportador promiscuo de sustratos hidrofóbicos a la bilis, entre los que se incluyen lípidos, esteroides, péptidos y multitud de fármacos incluyendo glucósidos cardiotónicos, antihistamínicos, analgésicos narcóticos o inmunosupresores (Chan *et al.*, 2004; Matheny *et al.*, 2001), además de varios fármacos antitumorales (Marin *et al.*, 2009). MDR3 es otro miembro de esta familia con capacidad para transportar algunos xenobióticos, entre ellos paclitaxel y vinblastina, aunque con una eficacia menor que la de MDR1 (Smith *et al.*, 2000). Esta proteína se localiza en la membrana canalicular de los hepatocitos, donde se encarga de la translocación de fosfatidilcolina desde la cara interna hasta la cara externa de la bicapa lipídica (Prescher *et al.*, 2019). De esta forma, neutraliza el efecto detergente de los ácidos biliares, presentes a concentraciones elevadas en la bilis.
- ABCC: formada por 12 genes que codifican para transportadores completos, entre los que se encuentran las proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos o MRPs (del inglés *multidrug resistance associated proteins*), cuya función principal es la protección frente a compuestos tóxicos, como metales pesados, toxinas y xenobióticos. Particularmente, las isoformas *ABCC1* (MRP1), *ABCC2* (MRP2), *ABCC3*

(MRP3), *ABCC4* (MRP4), *ABCC5* (MRP5) y *ABCC6* (MRP6) confieren resistencia a una gran variedad de fármacos en distintos tumores. MRP1, MRP2, MRP3 y MRP6 se localizan en la membrana basolateral de células polarizadas para impedir que las sustancias potencialmente dañinas accedan al interior de la célula. Por otro lado, MRP2 y, probablemente, MRP5 aparecen en la membrana apical para secretar estos compuestos tóxicos, por ejemplo, a la bilis o a la orina. Su estructura es similar a la de otros transportadores ABC, pero MRP1, MRP2, MRP3 y MRP6 poseen un TMD adicional en el extremo amino terminal que se requiere para su correcto funcionamiento y localización. Menos conocidos son MRP7 y MRP8, cuyo ARNm se ha detectado a bajos niveles en el hígado y se han demostrado capaces de transportar algunos fármacos antitumorales como paclitaxel y vincristina, en el caso de MRP7 (Shen *et al.*, 2009), o metotrexato y el fluorouracilo, en el de MRP8 (Oguri *et al.*, 2007).

- ABCG: está integrada por 5 genes codificantes de *half transporters* que, como ya se ha comentado, poseen un único NBD en el extremo amino terminal y un solo TMD en el carboxilo terminal. La mayoría de los miembros de esta subfamilia son bombas exportadoras de colesterol que no están involucrados en el desarrollo del fenotipo MDR. No obstante, *ABCG2*, que codifica para la proteína BCRP (*breast cancer resistance protein*), presenta una amplia especificidad de sustrato. Estos incluyen una gran variedad de fármacos antitumorales que bombea al exterior celular, lo que hace que BCRP desempeñe un papel importante en el desarrollo de resistencia a la quimioterapia antitumoral.

Tabla I-1. Proteínas ABC implicadas en el transporte de los fármacos de primera y segunda línea en carcinoma hepatocelular (HCC) y colangiocarcinoma (CCA).

Proteína	HCC			CCA		
	1ª línea		2ª línea	1ª línea		Coadyuvante / 2ª línea
	Sorafenib	Lenvatinib	Regorafenib	Gemcitabina	Cisplatino	Capecitabina 5-FU
MDR1	(Hu <i>et al.</i> , 2009)	(Ozeki <i>et al.</i> , 2019)	(Kort <i>et al.</i> , 2015)	(Bergman <i>et al.</i> , 2003; Hassan <i>et al.</i> , 2020; Qian <i>et al.</i> , 2019; Rudin <i>et al.</i> , 2011)	(Ren <i>et al.</i> , 2007)	(T. Wang <i>et al.</i> , 2015; Chikazawa <i>et al.</i> , 2010)
		(J. Li <i>et al.</i> , 2020)	(Al-Shammari <i>et al.</i> , 2019; Fujita <i>et al.</i> , 2017)			(Oshikata <i>et al.</i> , 2011)
MRP1	-	-	-	(Kohan & Boroujerdi, 2015)	-	-
MRP2	(Shibayama <i>et al.</i> , 2011)	(Ozeki <i>et al.</i> , 2019)	(Ohya <i>et al.</i> , 2015; Hotta <i>et al.</i> , 2015)	-	(Cui <i>et al.</i> , 1999; Kawabe <i>et al.</i> , 1999; Koike <i>et al.</i> , 1997)	-
	(Hu <i>et al.</i> , 2009)	(J. Li <i>et al.</i> , 2020)				
MRP3	-	-	-	-	-	-
MRP4	(Hu <i>et al.</i> , 2009)	-	-	-	(Savaraj <i>et al.</i> , 2003; X. Zhang <i>et al.</i> , 2015; Y. H. Zhang <i>et al.</i> , 2010; Wakamatsu <i>et al.</i> , 2007)	(G. Zhang <i>et al.</i> , 2015; Q. Chen <i>et al.</i> , 2017)
MRP5	-	-	-	(Oguri <i>et al.</i> , 2006; Kohan & Boroujerdi, 2015)	-	(Jilek <i>et al.</i> , 2020; Pratt <i>et al.</i> , 2005; Nambaru <i>et al.</i> , 2011)
MRP6	-	-	-	-	-	-
BCRP	(Hu <i>et al.</i> , 2009)	(Ozeki <i>et al.</i> , 2019; J. Li <i>et al.</i> , 2020)	(Kort <i>et al.</i> , 2015)	(Qian <i>et al.</i> , 2019; Rudin <i>et al.</i> , 2011)	(Sogawa <i>et al.</i> , 2021; Ceckova <i>et al.</i> , 2008)	(Yuan <i>et al.</i> , 2009)
	(Agarwal <i>et al.</i> , 2011; Bae <i>et al.</i> , 2018)		(Al-Shammari <i>et al.</i> , 2019; Fujita <i>et al.</i> , 2017)			(Chikazawa <i>et al.</i> , 2010)

El código de colores indica si la proteína transporta o no al fármaco, de acuerdo con el estudio citado en cada caso. Verde=transporta; rojo=no transporta; amarillo=posiblemente transporta.

2.3.2.3. Regulación de la expresión de proteínas ABC

Se desconocen todos los detalles sobre la compleja regulación de la expresión de las bombas ABC, en la que están implicados múltiples receptores nucleares. Estos receptores suelen activarse en presencia de moléculas potencialmente tóxicas (entre las que se incluyen algunos ácidos biliares), que aumentan el estrés oxidativo en la célula. Muchos de ellos forman un dímero con el receptor X retinoide (RXR), siendo destacables:

INTRODUCCIÓN

- El receptor de ácido retinoico (RAR), que induce la expresión de *ABCC2* (Denson *et al.*, 2000) y reprime *ABCC3* (W. Chen *et al.*, 2007).
- El receptor constitutivo de androstano (CAR), que induce la expresión de *ABCC1* (Rosenfeld *et al.*, 2003), *ABCC2* (H. R. Kast *et al.*, 2002; Rosenfeld *et al.*, 2003), *ABCC3* (Rosenfeld *et al.*, 2003), *ABCC4* (Assem *et al.*, 2004) y *ABCG2* (Jigorel *et al.*, 2006).
- Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), **concretamente PPAR α y PPAR γ , que regulan la transcripción de *ABCB1*** (Q. Chen *et al.*, 2010; More *et al.*, 2017; Xie *et al.*, 2021; Yousefi *et al.*, 2017), *ABCC1* (Hirai *et al.*, 2007), *ABCC3*, *ABCC4* (Massimi *et al.*, 2018; Moffit *et al.*, 2006) y *ABCG2* (Hirai *et al.*, 2007; Szatmari *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2021).
- EL receptor X de pregnano (PXR), que induce la expresión de *ABCB1* (Geick *et al.*, 2001; Synold *et al.*, 2001), *ABCC2* (Teng & Piquette-Miller, 2005), *ABCC3* (Teng *et al.*, 2003; Teng & Piquette-Miller, 2007) y *ABCG2* (Lemmen *et al.*, 2013).
- El receptor X farnesoide (FXR), que induce la expresión de *ABCC2* (Fang *et al.*, 2021) y reprime la expresión de *ABCC4* al inhibir la actividad de CAR (Renga *et al.*, 2011).
- El receptor X hepático (LXR), inductor de *ABCB1* (S. Kim *et al.*, 2018) y *ABCC2* (Adachi *et al.*, 2009).

También se ha probado la activación del promotor de *ABCC6* por RXR (Ratajewski *et al.*, 2006) **y por el factor de crecimiento transformante (TGF β), mientras que el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y el interferón γ (IFN- γ) lo reprimen** (Bohan *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2006).

Por otro lado, tanto en hepatocitos como en colangiocitos, se ha visto que la expresión de *ABCC3* es inducida por el receptor homólogo hepático 1 (LRH-1), **dependiente de TNF α** (Bohan *et al.*, 2003) **y activado por la vía Wnt/ β -catenina** (Botrugno *et al.*, 2004). *ABCB1* (Chikazawa *et al.*, 2010; T. Wang *et al.*, 2015) y *ABCG2* (Chikazawa *et al.*, 2010) también parecen inducirse a través de esta vía. Otros factores de transcripción implicados en la regulación de la expresión de proteínas ABC son el factor nuclear **alfa de hepatocito 4 (HNF4 α)** (de Boussac *et al.*, 2010; Douet *et al.*, 2006; Qadri *et al.*, 2009) y, muy notablemente, el factor 2 relacionado con el factor nuclear

eritroide 2 (NFE2L2 o NRF2), capaz de inducir la expresión de la mayoría de proteínas ABC implicadas en el transporte de xenobióticos (Canet *et al.*, 2015; Ibbotson *et al.*, 2017; Kang *et al.*, 2014; E. J. Kim *et al.*, 2020; X. Wang *et al.*, 2014; X. Zhang *et al.*, 2020).

Además, se han identificado sitios de unión para elementos de la familia C/EBP (de las siglas en inglés para *CCAAT-enhancer-binding proteins*) en el promotor de MRP2 (Stöckel *et al.*, 2000), lo que sugiere que podrían regular la expresión de este transportador hepático. También se han hallado secuencias consenso para la proteína activadora 1 (AP1) en el promotor de varios genes de transportadores ABC (Fromm *et al.*, 1999; Stöckel *et al.*, 2000; Zhu & Center, 1994), implicada en procesos celulares como la proliferación, la diferenciación, la apoptosis o el desarrollo de tumores.

2.4. ESTRATEGIAS DE SUPERACIÓN DE LA FARMACORRESISTENCIA EN CÁNCER HEPÁTICO

A pesar de los constantes esfuerzos invertidos en investigación, los tratamientos farmacológicos empleados frente a cáncer hepático presentan escasa eficacia en los estadios más avanzados. De ahí la urgencia de hallar alternativas terapéuticas, basadas en nuevos regímenes de agentes quimioterapéuticos y en aproximaciones de ataque al tumor más selectivas.

La tecnología de secuenciación del ADN ha permitido revelar la heterogeneidad genética entre las células malignas y normales, facilitando la identificación de posibles dianas moleculares para nuevos fármacos. Así surge la terapia dirigida, donde los fármacos actúan sobre dianas específicas de las células cancerosas para bloquear su crecimiento y propagación. Estas dianas pueden ser antígenos de superficie y factores de crecimiento, así como receptores o vías de transducción de señales reguladoras del ciclo celular, muerte celular, metástasis y angiogénesis. Según la naturaleza y el mecanismo de acción de los fármacos, se distinguen dos grandes grupos de terapia molecular dirigida: la quimioterapia basada en moléculas pequeñas, como los inhibidores de quinasas (KIs) y las terapias biológicas basadas en macromoléculas, como los anticuerpos monoclonales (mAbs) (Y. T. Lee *et al.*, 2018).

A continuación, se exponen varias aproximaciones enfocadas a superar la farmacorresistencia tumoral: la quimioterapia combinada con terapia dirigida y algunas prometedoras estrategias de terapia biológica.

2.4.1. Quimioterapia combinada

2.4.1.1. Origen

La terapia combinada comenzó en 1947 con el uso de estreptomicina y ácido paraaminosalicílico frente a la tuberculosis. El objetivo era vencer las resistencias desarrolladas a cada fármaco y minimizar los efectos secundarios derivados de las elevadas dosis administradas, hecho que corroboraron los ensayos clínicos publicados en 1952 (Daniels & Hill, 1952). Desde entonces, esta estrategia se siguió implementando para el tratamiento de diversas patologías y la primera quimioterapia combinada efectiva llegó en 1960 para el cáncer de testículo (M. C. Li *et al.*, 1960). Unos años después, se demostró en pacientes con linfoma de Hodgkin que la quimioterapia combinada era más eficaz que la monoterapia o la quimioterapia secuencial (*i.e.* en la que los fármacos se administran a distintos tiempos) (Moxley *et al.*, 1967), pudiendo remitir la enfermedad al completo (DeVita *et al.*, 1972). Desde entonces, la quimioterapia combinada se ha incluido en la mayoría de los programas. Por otra parte, el avance en la terapia dirigida, junto con campañas de prevención y mayor precisión en el diagnóstico, se ha traducido en un notable descenso de la mortalidad por cáncer en lo que va de siglo (DeVita & Chu, 2008).

2.4.1.2. Relevancia

Si bien las tasas de mortalidad por edad han disminuido para todos los tipos de cáncer, los fármacos desarrollados más recientemente solo contribuyen a un pequeño porcentaje de esta mejoría (Mokhtari *et al.*, 2017). De ahí la necesidad de recurrir a nuevos enfoques que no necesariamente requieran volcar aún más recursos económicos y humanos en la búsqueda de una cura.

La terapia combinada busca potenciar el efecto citotóxico de la quimioterapia convencional incluyendo fármacos con mecanismos de acción más selectivos. Además, las células cancerosas suelen ser incapaces de adaptarse a la toxicidad

simultánea de varios compuestos, lo que minimiza el desarrollo de MPRs (G. R. Zimmermann *et al.*, 2007). Todo ello conlleva un aumento de la eficacia del tratamiento y/o la reducción de las dosis de cada agente, lo que finalmente podría repercutir en la calidad de vida de los pacientes oncológicos al disminuir las reacciones adversas asociadas a cada fármaco (Mokhtari *et al.*, 2017).

Una de las estrategias en auge es el reposicionamiento de fármacos cuya diana terapéutica juega un rol importante en la tumorigénesis, pero que inicialmente habían sido aprobados para su uso frente a otros tipos de cáncer e incluso para enfermedades distintas (Ashburn & Thor, 2004; Chong & Sullivan, 2007). Esta aproximación reduce los costes generales y el tiempo de la investigación, rentabiliza la terapia y favorece la inversión de esfuerzos en otras enfermedades desatendidas. Una historia notable de reposicionamiento exitoso es el caso de la talidomida, retirada por su teratogenicidad y en la actualidad empleada para tratar la lepra y el mieloma múltiple (Amare *et al.*, 2021).

Por todos estos motivos, no es de extrañar que muchos ensayos clínicos en marcha en cáncer hepático, especialmente HCC, se centren en buscar terapias combinadas que mejoren el pronóstico de la enfermedad.

2.4.1.3. Terapia dirigida: Inhibidores de quinasas (KIs)

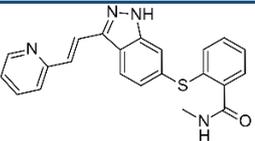
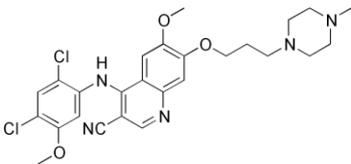
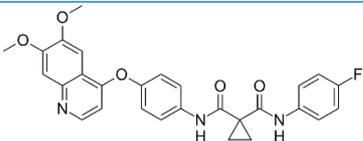
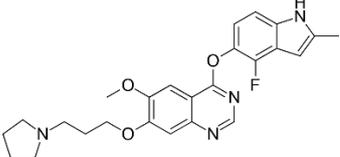
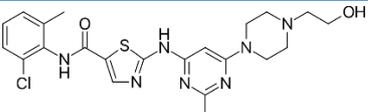
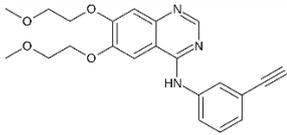
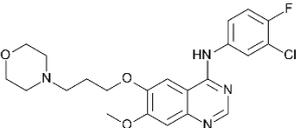
La terapia dirigida es la base de la medicina de precisión: actúa directamente sobre las vías de señalización implicadas en la proliferación celular y la diseminación de las células tumorales. Dentro de las terapias dirigidas, se engloba el grupo de **“moléculas pequeñas”**. **Estas son fármacos** con un peso molecular inferior a 900 Da que bloquean un amplio espectro de dianas en el interior celular, incluyendo quinasas, proteínas reguladoras epigenéticas, enzimas reparadoras de daños en el ADN y proteasomas (Zhong *et al.*, 2021).

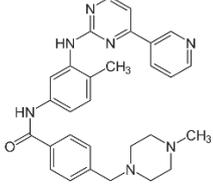
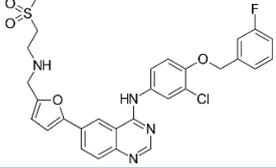
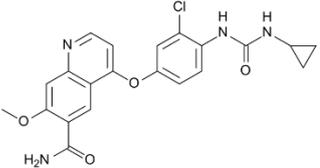
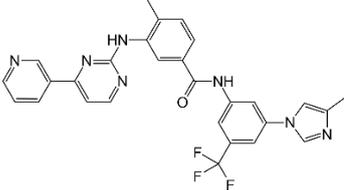
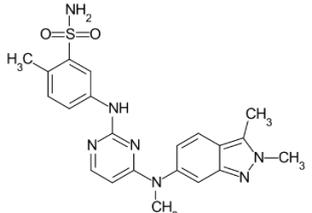
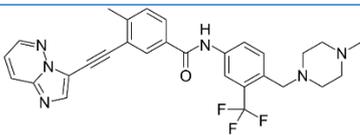
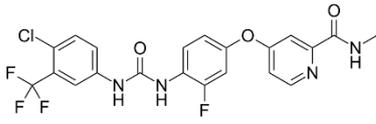
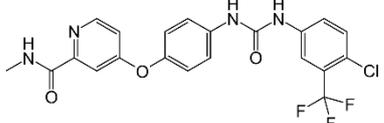
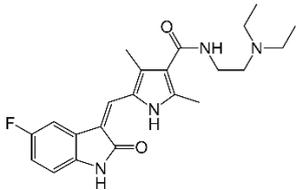
Concretamente, las proteínas quinasa son un tipo de enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato del ATP a los grupos hidroxilo de los residuos de otra proteína, es decir, los fosforila. De esta forma, las proteínas son modificadas con el fin de activar o desactivar sus funciones (Ardito *et al.*, 2017). Dependiendo de la abundancia de ciertos aminoácidos en los residuos del sustrato, las proteínas quinasa se dividen en tirosina quinasa (TKs, que incluyen tirosina quinasa receptoras y no

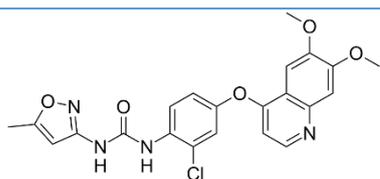
INTRODUCCIÓN

receptoras), serina / treonina quinasas y enzimas similares a TKs. La desregulación de las proteínas quinasas está relacionada con diversas enfermedades, en particular el cáncer, por lo que son dianas terapéuticas tumorales muy estudiadas. Así, se han descrito gran variedad de fármacos KI, que suelen clasificarse según su afinidad a los distintos tipos de proteínas quinasas y el modo en que se unen a ellas (Zhong *et al.*, 2021). En la tabla I-2 se recogen algunos de los inhibidores de tirosina quinasas (TKIs) más empleados en el tratamiento antitumoral y sus dianas.

Tabla I-2. Estructura química, dianas e indicaciones de los principales fármacos inhibidores de tirosina quinasas (TKIs) empleados en el tratamiento antitumoral. Adaptada de Zhong *et al.* (2021).

Estructura química	Fármaco	Dianas terapéuticas	Indicaciones
	Axitinib	VEGFR-1/2/3	CCR
	Bosutinib	BCR-ABL, SRC	LMC
	Cabozantinib	VEGFR-1/2/3, TYRO3, TIE2, HGFR, CD117, TRK2, RET, FLT3	CCR, HCC
	Cediranib	VEGFR-1/2/3, PDGFRα/β , CD117	En ensayos clínicos para el cáncer de ovario
	Dasatinib	BCR-ABL, SRC, CD117, LCK, PDGFR- β	LLA
	Erlotinib	EGFR	CPNM, cáncer de páncreas
	Gefitinib	EGFR	CPNM

	Imatinib	BCR-ABL, PDGFR- α/β , CD117, CSF1R, DDR1/2	LMC, LLA, TEGI
	Lapatinib	EGFR, HER2	Cáncer de mama
	Lenvatinib	PDGFR- α , VEGFR-1/2/3, FGFR-1/2/3/4, CD117, RET	CTD, CCR, HCC, carcinoma endometrial
	Nilotinib	BCR-ABL, DDR1/2	LMC
	Pazopanib	PDGFR- α/β , VEGFR-1/2/3, FGFR-1/3, CD117, ITK, LCK	CCR, STB
	Ponatinib	BCR-ABL, PDGFR- α , VEGFR-2, FGFR-1, SRC, FLT3, CD117	LMC, LLA
	Regorafenib	VEGFR-1/2/3, PDGFR α/β , FGFR1/2, RAF, CD117, RET, CSF1R, TIE2	CRC, TEGI, HCC
	Sorafenib	FLT3, VEGFR-2/3, CD117, RET, PDGFR β , RAF, FLT3	CCR, HCC, CTD
	Sunitinib	PDGFR- α/β , VEGFR-1/2/3, CSF1R, CD117, RET, FLT3	CCR, TEGI, pNET



Tivozanib

PDGFR- β , VEGFR-
1/2/3, CD117

CCR

Dianas (siglas en inglés): BCR-ABL, *breakpoint cluster region protein-Abelson tyrosine kinase*; CD117, *antigen for cluster of differentiation 117*; CSF1R, *colony stimulating factor 1 receptor*; DDR, *discoidin domain receptor*; EGFR, *epidermal growth factor receptor*; FLT3, *fms-like tyrosine kinase 3*; HER2, *human epidermal growth factor receptor 2*; HGFR, *hepatocyte growth factor receptor*; ITK, *interleukin-2-inducible T-cell kinase*; LCK, *lymphocyte-specific tyrosine protein kinase*; PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*; RAF, *rapidly accelerated fibrosarcoma serine/threonine protein kinase*; RET, *rearranged during transfection receptor tyrosine kinase*; SRC, *stored response chain tyrosine kinase family*; TIE2, *endothelium-specific receptor tyrosine kinase 2*; TRK2, *tropomyosin receptor kinase*; TYRO3, *tyrosine-protein kinase receptor 3*; VEGFR, *vascular endothelial growth factor receptor*. Indicaciones: CCR, carcinoma de células renales; CPNM, carcinoma pulmonar no microcítico; CTD, cáncer de tiroides diferenciado; CRC, cáncer colorrectal; HCC, carcinoma hepatocelular; LLA, leucemia linfocítica aguda; LMC, leucemia mieloide crónica; pNET, tumores neuroendocrinos pancreáticos; STB, sarcoma de tejidos blandos; TEGI, tumores del estroma gastrointestinal.

Los TKIs se unen típicamente a los sitios de unión de ATP de las TK para impedir su acción. En cambio, cuando estos fármacos interactúan con transportadores ABC, parece que lo hacen a través de su sitio de unión a sustratos. De esta forma, si se encuentran a baja concentración, pueden ser expulsados de la célula, mientras que a concentraciones altas actuarían como inhibidores competitivos de las bombas (Brózik *et al.*, 2011). Esta dualidad en su mecanismo de acción se ve afectada por otros factores como la expresión basal de proteínas ABC y la afinidad del TKI a las mismas, pudiendo generar un efecto sensibilizante de gran interés en la superación de la farmacoresistencia adquirida. Sin embargo, la toxicidad de los TKIs provoca una respuesta celular adaptativa, induciendo la expresión de transportadores ABC y facilitando la aparición de resistencia a los pocos meses de iniciar el tratamiento (Beretta *et al.*, 2017).

Como se ha mencionado previamente, las terapias de elección en HCC se basan en TKIs: sorafenib o lenvatinib como primera línea, y regorafenib como segunda línea. Estos tres fármacos son inhibidores de múltiples quinasas y todos ellos actúan, entre otros, sobre receptores TK. La mejora en el pronóstico del HCC en pacientes tratados con sorafenib es limitada y sus efectos secundarios, muy molestos y peligrosos. Por ello, muchos ensayos clínicos en marcha se centran en la búsqueda de terapias

combinadas sinérgicas entre este y otros TKIs con agentes antitumorales (NIH, [Clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov)), que permitan reducir las dosis y aumentar la eficacia.

Por otra parte, el régimen quimioterapéutico frente al CCA se basa en la combinación de gemcitabina y cisplatino. Al igual que sucede con los fármacos aprobados para HCC, este tratamiento presenta una eficacia escasa, con una supervivencia general media inferior a un año (Valle *et al.*, 2010, 2014). La utilidad de los TKIs y otros tipos de terapia dirigida en el tratamiento del CCA está siendo investigada en ensayos clínicos activos (NIH, [Clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov)), lo cual arroja esperanza para el tratamiento futuro de estos pacientes.

2.4.2. Terapia biológica

2.4.2.1. Aspectos generales

Las terapias convencionales como la cirugía, la radiación y la quimioterapia han sido de gran utilidad para combatir el cáncer. Sin embargo, sus efectos secundarios son importantes y pueden afectar a los tejidos adyacentes u otras zonas del organismo. Si bien superar estas limitaciones sigue siendo un gran desafío, los avances en el conocimiento de los mecanismos desencadenantes del cáncer están permitiendo el desarrollo de tratamientos mucho más selectivos, siendo la terapia biológica la apuesta principal. Según la definición del NIH estadounidense, se trata de **un “tipo de tratamiento en el que se usan sustancias elaboradas por organismos vivos para tratar enfermedades”** (National Cancer Institute) y, en cáncer, incluye las siguientes aproximaciones (Schirmacher, 2019):

- La inmunoterapia, como las citocinas recombinantes, la transferencia de células T modificadas al paciente, las vacunas de tratamiento contra el cáncer y los anticuerpos monoclonales que activan la respuesta inmunitaria frente a las células tumorales.
- Algunas terapias dirigidas, como los anticuerpos monoclonales que bloquean determinadas proteínas solubles o receptores en la membrana de las células cancerosas para impedir su proliferación.

2.4.2.2. Proteínas recombinantes

I. Producción

El uso de proteínas en terapéutica se remonta a finales del siglo XIX, con la extracción del suero de conejos y caballos inmunizados para tratar el tétanos y la difteria, y continúa en la década de 1920 con la purificación de insulina de páncreas porcino y bovino para tratar la diabetes (Redwan, 2009). En la actualidad, las proteínas derivadas de animales han sido en su mayoría sustituidas por la producción en biorreactores de proteínas humanas recombinantes, superando así parte de los problemas de inmunogenicidad y otros efectos indeseados.

Las proteínas recombinantes, conocidas también como proteínas heterólogas, son aquellas obtenidas tras la expresión de ADN recombinante (generado artificialmente mediante técnicas de clonación) -no nativo- en las células o especies huésped. Este tipo de proteínas se pueden producir en células procariotas (*Escherichia coli*) y en células eucariotas de levaduras (*Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*), plantas (arroz y tomate) y mamíferos (células de ovario de hámster chino CHO y células renales humanas HEK293), así como en animales transgénicos (insectos). Dependiendo de las características y el objetivo de la proteína que se quiera producir, seleccionaremos un sistema de expresión u otro. Las particularidades de cada sistema se resumen en la tabla I-3.

La mayoría de las proteínas terapéuticas aprobadas y en ensayos clínicos se generan a partir de ADN recombinante introducido por transformación o transfección/transducción en el sistema de expresión. El proceso de purificación y la formulación dependerán en gran medida de las propiedades fisicoquímicas y estructurales de la proteína, que deben ser cuidadosamente estudiadas para conservar su actividad farmacológica.

Tabla I-3. Comparación entre los sistemas de expresión más empleados para la producción de proteínas recombinantes. Adaptada de Crommelin *et al.* (2019).

	Procariotas	Levaduras	Insectos transgénicos	Células de mamífero
Velocidad de crecimiento	++++	+++	++	+
Rendimiento	+++	++++	++	+
Complejidad de la manipulación y escalado	+	++	+++	++++
Modificaciones postraduccionales	+	++	+++	++++
Plegamiento	Limitado (cuerpos de inclusión)	Correcto	Correcto	Correcto
Coste	+	++	+++	++++
Riesgo de contaminación	++	+	+++	++++
Proteínas producidas	Bajo PM, sencillas	Cualquier PM, complejidad intermedia	Cualquier PM, complejas	Cualquier PM, complejas

El número de cruces indica si el parámetro correspondiente es reducido (+) o elevado (++++). PM, peso molecular.

II. Interés en clínica

Según su mecanismo de acción, las proteínas recombinantes pueden cumplir una función complementaria o sustitutiva de una proteína endógena, proporcionar una nueva actividad, interferir sobre determinadas moléculas o actuar como vehículos de otros fármacos (Dimitrov, 2012). Algunos ejemplos clásicos de proteínas recombinantes empleadas en clínica son la insulina (Goeddel, Kleid, *et al.*, 1979), la hormona del crecimiento (Goeddel *et al.*, 1979), la eritropoyetina (F. K. Lin *et al.*, 1985) y la hormona foliculoestimulante (Olijve *et al.*, 1996). En el caso concreto del tratamiento del cáncer, cada vez son más los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, basados en la tecnología del ADN recombinante con utilidad terapéutica. Los más novedosos se conocen como inhibidores de punto de control inmunitario, diseñados frente a las proteínas PD-1 y PD-L1 (de *programmed death* y *programmed death ligand*) (Basu *et al.*, 2019). Otro ejemplo de proteínas recombinantes empleadas como tratamiento adyuvante del cáncer son algunas citocinas (sobre todo ciertas interleucinas e interferones) con capacidad para activar el sistema inmunitario (Conlon *et al.*, 2019).

III. Desafíos

Si bien las proteínas recombinantes prometen una mayor eficacia en el tratamiento de diversas enfermedades, su uso clínico aún se enfrenta a múltiples dificultades. La producción de estas proteínas terapéuticas es un proceso complejo y costoso. Para minimizar los problemas de producción, es esencial estudiar las características de la proteína y elegir un vector y un sistema de expresión apropiados (Rosano & Ceccarelli, 2014). Sin embargo, una selección correcta del plásmido de expresión y el huésped no es sinónimo de éxito en los pasos posteriores. La purificación suele ser un proceso laborioso en el cual pueden perderse grandes cantidades de proteína. Además, la copurificación de la proteína de interés con proteínas del huésped es común y no debe ser ignorada, ya que pueden ser causantes de inmunogenicidad.

Otro punto crucial es la correcta formulación y conservación de este tipo de productos biofarmacéuticos. Ligeros cambios en parámetros como el pH, la osmolaridad o la temperatura pueden comprometer gravemente la estabilidad de la proteína, favoreciendo su agregación, lo que finalmente supone la pérdida de actividad biológica y la aparición de inmunogenicidad (Pham & Meng, 2020).

Mención aparte merece la biodisponibilidad de estos fármacos. A pesar de los considerables esfuerzos realizados durante casi 100 años, solo una vía de administración ha demostrado suficiente eficacia hasta ahora. La vía parenteral es la única que logra una distribución sistémica en el paciente (Crommelin *et al.*, 2019), permitiendo que las proteínas recombinantes ejerzan su acción sobre los receptores de membrana o los ligandos solubles sobre los que se unen.

IV. Péptidos de penetración celular (PPCs)

Los PPCs son pequeñas secuencias, de 30 aminoácidos como máximo, capaces de atravesar la membrana celular sin dañar su integridad gracias a su naturaleza catiónica, anfipática o hidrofóbica, compatible con las propiedades fisicoquímicas de la membrana (Pooga & Langel, 2015). En la actualidad, se han descubierto cientos de PPCs (CPPsite 2.0), la mayoría con estructura lineal y de origen sintético (p.e. R8), aunque muchos de ellos también derivan de proteínas (p.e. Tat) o son quiméricos (p.e.

Transportán) (Agrawal *et al.*, 2016). Su aplicación en Medicina es especialmente **interesante gracias a la capacidad de transportar consigo otras moléculas (“carga”)** como agentes quimioterapéuticos, proteínas, ácidos nucleicos y sondas para diagnóstico por imagen (Borrelli *et al.*, 2018), que de otra forma no podrían atravesar la membrana celular.

El paso preliminar a la translocación celular de los PPCs, generalmente catiónicos, es la interacción electrostática del péptido con los proteoglicanos y los fosfolípidos de la membrana, cargados negativamente. La forma exacta por la que los PPCs entran en la célula se desconoce, pero se han descrito dos mecanismos principales (Ruseska & Zimmer, 2020):

- La endocitosis, dependiente de energía. Puede darse por macropinocitosis, o bien mediante clatrininas o caveolinas localizadas en las invaginaciones de la membrana plasmática.
- La translocación directa, no dependiente de energía. Se da a baja temperatura sin la mediación de otras proteínas por formación de micelas invertidas, poros **transitorios o distribución “tipo alfombra” sobre la membrana plasmática.**

Se ha demostrado que el mecanismo y la eficacia de translocación de muchos PPCs puede variar según las propiedades fisicoquímicas del PPC (carga, hidrofobicidad, tamaño y forma), la molécula que transporta (tamaño y carga eléctrica) y las condiciones experimentales (concentración del PPC, temperatura, medio de cultivo y línea celular) (Zou *et al.*, 2017).

El péptido Tat (de aquí en adelante, Tat) fue el primer PPC descubierto y es el más estudiado (Frankel & Pabo, 1988; Green & Loewenstein, 1988). Procede del dominio en α -hélice del transactivador de transcripción (TAT) del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH1) y está conformado por 11 aminoácidos (YGRKKRRQRRR) que abarcan los residuos 47-57 del dominio básico rico en argininas 48-60 (Ezhevsky *et al.*, 1997; Vivès *et al.*, 1997). Tat posee una estructura sencilla de naturaleza marcadamente básica, presenta una baja toxicidad y es apropiado para transportar cargas de muy diverso tamaño, que introduce en la célula principalmente por endocitosis (Zou *et al.*, 2017). En los últimos años, este popular PPC se ha utilizado en experimentación para transportar cargas muy diversas, como péptidos modificados con propiedades

antibacterianas (Patel *et al.*, 2021) o cardioprotectoras (Boisguérin *et al.*, 2020), proteínas terapéuticas para combatir patologías como la mucositis oral (Boss *et al.*, 2021; J. Luo *et al.*, 2019), e incluso agentes de imagen para el seguimiento *ex vivo* de la efectividad de un tratamiento antitumoral (Hingorani *et al.*, 2020). Tat también se ha empleado en fórmulas más complejas, conjugado con polímeros, liposomas o nanopartículas para formar sistemas de liberación de fármacos. Ejemplos recientes de agentes vehiculizados en estos sistemas han sido el antiinflamatorio tetrametilpirazina frente a lesiones de la médula espinal (J. Li *et al.*, 2021), nanocristales de docetaxel frente a células de cáncer de cuello uterino (Lv *et al.*, 2021), doxorubicina combinada con nanopartículas magnéticas frente a células de hepatoblastoma (Jabalera *et al.*, 2021) o ARN pequeño de interferencia frente a la proteína inflamatoria HMGB1 (*high mobility group box 1*) combinado con dihidroartemisinina para la nefritis (Diao *et al.*, 2021).

2.4.2.3. Terapia celular

I. Origen y manipulación

La terapia celular consiste en la transferencia de células vivas, autólogas (donde el mismo individuo es donante y receptor) o alogénicas (procedentes de un individuo donante diferente al receptor), a un paciente para paliar o curar una enfermedad (El-Kadiry *et al.*, 2021).

El uso de células madre en terapia celular es muy común, pero también pueden emplearse células somáticas diferenciadas. Este segundo tipo de terapia celular requiere el aislamiento de células somáticas del cuerpo humano, su propagación, expansión, selección y final administración al paciente por infusión, inyección en distintas localizaciones o implantación quirúrgica (U.S. Department of Health and Human Services, 2001). Las células empleadas son de muy diverso tipo, desde hepatocitos hasta células del sistema inmunitario, y pueden modificarse genéticamente *ex vivo* (Nordon & Schindhelm, 1996).

II. Interés en clínica

La terapia celular abarca múltiples áreas terapéuticas, como la medicina regenerativa, la inmunoterapia y la terapia contra el cáncer. Su utilidad radica en la capacidad de las células diferenciadas para actuar como una fuente *in vivo* de enzimas, citocinas y factores de crecimiento (El-Kadiry *et al.*, 2021).

En cáncer, los tipos de terapia celular más extendidos se basan en inmunoterapia, como las vacunas con células presentadoras de antígenos y las terapias celulares adoptivas. Dentro del segundo grupo, se incluyen:

- La terapia con células T con receptor de antígeno quimérico (CAR, de *chimeric antigen receptor*), que son linfocitos T del paciente (autólogos) modificados genéticamente para expresar un CAR. Este receptor es una proteína de fusión resultado de la combinación de la región variable de un anticuerpo monoclonal con uno o más dominios de señalización intracelular del receptor de células T. De este modo, el fragmento del anticuerpo permite el reconocimiento de un antígeno tumoral específico y activa la célula T para combatir las células cancerosas (Miliotou & Papadopoulou, 2018).
- La terapia con células T con receptores de células T (RCT) modificados, cuyo fundamento y obtención es muy similar a la de las células T-CAR. La principal diferencia entre ambas radica en el reconocimiento de sus antígenos: los RCTs se unen a péptidos procedentes de proteínas tumorales (intracelulares o de membrana) presentados en la membrana celular a través del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), mientras que los CAR solo reconocen proteínas de superficie naturalmente expresados en las células tumorales. Esto le da a la terapia con células T-RCT una mayor versatilidad, especialmente frente a tumores sólidos, ya que emplean el mecanismo de reconocimiento de antígenos natural y pueden penetrar más fácilmente en el tumor (Pinte *et al.*, 2021).
- La terapia con linfocitos infiltrantes de tumor (LIT), que consiste en la infusión de linfocitos T autólogos procedentes de un tumor sólido en el paciente, previa amplificación y selección de los mismos *ex vivo*. Al contrario de las células T-CAR o RCT, estos linfocitos no han sido modificados genéticamente, por lo que se reduce el riesgo de reacciones adversas, aunque su obtención es más compleja

(B. Lin *et al.*, 2020).

Entre las ventajas de estos tratamientos respecto a los fármacos citostáticos convencionales se encuentran una mayor especificidad, baja toxicidad, buena tolerancia y capacidad para generar memoria inmunitaria (Schirmacher, 2019).

A pesar de que la mayoría de las terapias celulares adoptivas aprobadas utilizan células T-CAR para tratar cánceres hematológicos, su utilidad frente al cáncer hepático está siendo investigada. Muchos ensayos clínicos en HCC se basan en terapias con células T-CAR frente al glicoproteína-3 (GPC3), que activa la vía Wnt- β -catenina y la señalización a través de FGFs (S. L. Huang *et al.*, 2021). También se está estudiando la utilidad de las células T-CAR en CCA avanzado, donde se ha **probado un “cóctel” de inmunoterapia** en la que se administraron secuencialmente dos tipos de linfocitos modificados, unos dirigidos frente a EGFR y otros frente a CD133. Sin embargo, la eficacia fue escasa y los efectos adversos, severos (Feng *et al.*, 2017). En la actualidad, hay varios ensayos clínicos en marcha para explorar el uso de células T-CAR dirigidas frente a GPC3 y a la glucoproteína mucina 1 (MUC-1) en CCA (clinicaltrials.gov) (Ilyas *et al.*, 2021).

Respecto a la terapia con células T-RCT, se han desarrollado recientemente células T con un RCT frente al VHB (Hafezi *et al.*, 2021), y ya han sido probadas con resultados esperanzadores en un ensayo en fase I para pacientes con HCC avanzado asociado a infección por VHB (clinicaltrials.gov) (Meng *et al.*, 2021).

Por otra parte, se ha probado con éxito la terapia LIT frente a CCA, extrayendo de un paciente linfocitos T CD4+ capaces de reconocer una forma mutada de la proteína de interacción con ERBB2 (ERBB2IP) expresada en el tumor (Tran *et al.*, 2014).

Sin embargo, aunque muy prometedoras, hasta la fecha aún no se ha aprobado ninguna terapia celular para su uso frente al cáncer de hígado (Beumer-Chuwonpad *et al.*, 2021; Y. Chen *et al.*, 2018).



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Muestras humanas

Las muestras de tejido hepático de pacientes con HCC (n=34) y CCA (n=50), tomadas tras la resección de la pieza quirúrgica, se obtuvieron a través de los bancos de tumores del Hospital Universitario de Salamanca y del Hospital Clínic de Barcelona. Todos los pacientes habían firmado el consentimiento informado para el uso de las muestras de tejido en investigación biomédica. Los datos personales fueron tratados con confidencialidad y seguridad, de acuerdo con la normativa que se recoge en el Real Decreto 1720/2007, del 21 de diciembre, y los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del área de Salud de cada uno de los hospitales de procedencia. En las tablas MM-1 y MM-2 se recoge la información más relevante acerca de los pacientes incluidos en el estudio.

Tabla MM-1. Características clínicas y demográficas de los pacientes con HCC.

Variable	HCC (n=34)
Edad (media ± DE)	67,1 ± 13,0
Edad (rango)	19-84
Varones, n (%)	29 (85)
Mujeres, n (%)	5 (15)
Enfermedad subyacente	n (%)
Cirrosis	8 (24)
Hepatitis B	3 (9)
Hepatitis C	10 (29)
Hepatitis crónica	2 (6)
Alcohol	8 (24)
Esteatosis	11 (32)
No identificada	2 (6)
Estadio tumoral BCLC	n (%)
0	4 (12)
A	28 (82)
B	2 (6)
Grado de diferenciación	n (%)
G1	8 (24)
G2	19 (56)
G2-G3	2 (6)
G3	2 (6)
ND	3 (9)

BCLC, Barcelona Clinic Liver Cancer; HCC, carcinoma hepatocelular; ND, no disponible.

Tabla MM-2. Características clínicas y demográficas de los pacientes con CCA.

Variable	CCA (n=50)
Edad (media \pm DE)	69,4 \pm 7,7
Edad (rango)	53-84
Varones, n (%)	34 (68)
Mujeres, n (%)	16 (32)
Tipo de CCA	n (%)
iCCA	35 (70)
pCCA (eCCA)	3 (6)
dCCA (eCCA)	12 (24)
Enfermedad subyacente	n (%)
Cirrosis	7 (14)
Hepatitis C	1 (2)
Hepatitis crónica	6 (12)
Colangitis	1 (2)
Colecistitis	2 (4)
Cálculos biliares	4 (8)
Esteatosis	10 (20)
Diabetes	7 (14)
No identificada	19 (38)
Estadio tumoral	n (%)
I	16 (32)
II	25 (50)
III	4 (8)
IV	4 (8)
ND	1 (2)
Grado de diferenciación	n (%)
G1	14 (28)
G2	25 (50)
G3	4 (8)
G4	1 (2)
ND	6 (12)

dCCA, colangiocarcinoma distal; eCCA, colangiocarcinoma extrahepático; pCCA, colangiocarcinoma perihilar; iCCA, colangiocarcinoma intrahepático; ND, no disponible.

10 pacientes con HCC y 7 pacientes con CCA presentaban más de una enfermedad subyacente. Ninguno de los pacientes había recibido tratamiento farmacológico previa extracción del tumor.

3.1.2. Líneas celulares

En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- Proporcionadas por la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Alemania): TFK-1 (ACC 344) y EGI-1 (ACC 385), de eCCA humano.
- Proporcionadas por la American Type Culture Collection (ATCC, LGC Standards, Barcelona): Alexander o PLC/PRF/5 (CRL 8024) de carcinoma hepatocelular y HEK293T (CRL-11268), derivadas de las células HEK293 embrionarias de riñón, para la producción de vectores lentivirales.

3.1.3. Bacterias

Se utilizaron bacterias de la cepa DH5 α de *E. coli*, químicamente competentes, proporcionadas por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca para la producción de plásmidos.

Las bacterias *E. coli* "One Shot™ Mach1T1" competentes (Thermo Fisher Scientific), de elevada eficacia de transformación, se utilizaron para generar los vectores de entrada (pEntry) y de expresión por clonación "Gateway™". Para la propagación y amplificación de los vectores donadores (pDONR) y plásmidos de destino (pDEST) no recombinados se utilizaron las bacterias *E. coli* "One Shot™ ccdB Survival™2 T1®" (Thermo Fisher Scientific).

Las bacterias *E. coli* One Shot™ BL21 Star™ (DE3) competentes (Thermo Fisher Scientific) se utilizaron para la producción de proteínas recombinantes y también se probaron las cepas *E. coli* Rosetta™ 2(DE3) pLysS (Merck) y *E. coli* Tuner™(DE3) (Merck).

3.2. CULTIVOS CELULARES

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

- Alexander: MEM suplementado con 2,2 g/L de bicarbonato sódico y 110 mg/L de piruvato sódico

- EGI-1: DMEM suplementado con 2,2 g/L de bicarbonato sódico, 2,38 g/L de HEPES, y un 1% del cóctel comercial de aminoácidos no esenciales
- **HEK293T: DMEM suplementado con 1% GlutaMAX™**
- TFK-1: RPMI-1640 con 1% GlutaMAX™

Todos los medios fueron suplementados con un 10% de FBS inactivado (56°C durante 30 min) y 1% de una mezcla de antibióticos que contiene penicilina (20 U/mL) y estreptomicina (0,02 mg/mL). El medio de las Alexander fue suplementado con la misma mezcla de antibióticos a la que se añadió un antimicótico (anfotericina B 0,05 µg/mL).

Se utilizaron placas de cultivo de 96 pocillos (Duerolab), 24 y 6 pocillos, placas circulares de 10 cm de diámetro, así como frascos de cultivo de 25 y 75 cm² de Corning (Thermo Fisher Scientific). La esterilización de las soluciones se hizo mediante filtros **Sterivex de 0,1 µm (Merck-Millipore)**.

Los cultivos celulares se mantuvieron en incubadores a 37°C, en atmósfera del 5% de CO₂ en aire y humedad relativa del 80%. Las células HEK293T y TFK-1 fueron cultivadas en superficies recubiertas con 0,5 mg/mL colágeno tipo I.

Para realizar los pases del cultivo o sembrar células para los experimentos pertinentes, se realizaba una tripsinización (0,25% de tripsina y 20 mM de EDTA en PBS) de las células y se recogían en medio de cultivo.

3.2.1. Cultivos de células para estudios de expresión génica, localización subcelular y funcionalidad de proteínas

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos en un volumen final de 3 mL/pocillo a una densidad celular adecuada en función de la línea celular. En el caso de los estudios de translocación de proteínas recombinantes con un PPC, las células se incubaban con la proteína correspondiente durante el tiempo fijado antes de su recogida. Tras el tiempo establecido para cada experimento, las células se recogían y se procesaban para la obtención de ARN total ([apartado 3.8.2.](#)) o proteínas totales ([apartado 3.9.2.](#)); para realizar estudios de transporte por citometría de flujo ([apartado 3.7.](#)); o bien se fijaban para visualizar las proteínas de interés por inmunofluorescencia

(apartado 3.10). En el caso de los estudios de proteómica (apartado 3.13.2.2.), se recogía el pellet de células tratadas o no durante 72 h con la IC_{50} de distintos fármacos y se conservaba a $-80^{\circ}C$ hasta su procesamiento.

3.2.2. Estudios de viabilidad celular

Para valorar el efecto de los fármacos antitumorales en las distintas líneas celulares empleadas en esta Tesis Doctoral, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a la densidad adecuada en función de la línea celular. A las 24 h se añadían los agentes citostáticos, a los que se exponían las células durante 72 h, para después realizar el test de formazán (apartado 3.13.5.).

3.2.3. Generación de líneas celulares *knockout* mediante el uso del sistema CRISPR/Cas9

3.2.3.1. Transfección transitoria con lípidos catiónicos

El silenciamiento de los genes de interés se llevó a cabo mediante la tecnología CRISPR/Cas9 por transfección transitoria de la línea celular Alexander con los plásmidos que contenían la secuencia codificante del ARN guía (apartado 3.4.1.1.) y la ORF de la endonucleasa Cas9, respectivamente, “Lipofectamine™ LTX Reagent” y “Plus™ Reagent”.

3.2.3.2. Selección clonal

Tras el silenciamiento por CRISPR/Cas9 y la validación de los ARN guía, los clones de células con la expresión de los genes de estudio anulada se seleccionaron por el método de dilución límite.

3.3. CULTIVO DE BACTERIAS

Los medios de cultivo empleados fueron los siguientes:

- 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

3.3.1. Transformación de bacterias por choque térmico

Se mezclaron 2 μ L (5-10 ng ADN) del plásmido de interés con 50 μ L de suspensión bacteriana, que se incubó durante 30 min en hielo. Para facilitar la entrada del plásmido, las bacterias se sometieron a un choque térmico.

3.3.2. Producción y purificación de plásmidos

3.3.2.1. Selección de colonias y crecimiento en medio líquido

Se seleccionaron colonias de bacterias aisladas que habían crecido en la placa en ausencia de colonias satélite alrededor. Se rasparon con una punta de pipeta estéril y se inocularon en 6 mL de medio LB suplementado con el antibiótico de selección apropiado. Finalmente, se incubaron 16 h en agitación a 37°C.

3.3.2.2. Purificación del ADN plasmídico de cultivos de bacterias

Se utilizó el kit comercial “*illustra PlasmidPrep Mini Spin*” para la extracción del ADN plasmídico de cultivos de *E. coli*. El ADN plasmídico purificado se cuantificó espectrofotométricamente a λ 260 nm en un NanoDrop™ 1000 (apartado 3.13.1). Se realizó un estudio de restricción (apartado 3.14.6.) con el fin de comprobar la identidad del clon seleccionado.

3.3.3. Producción y purificación de proteínas recombinantes

3.3.3.1. Crecimiento de bacterias en medio líquido

Las colonias de bacterias *E. coli* BL21 Star™ (DE3), destinadas a la producción de proteínas, se inocularon por arrastre en 100 mL de medio LB suplementado con ampicilina. Se incubaron en agitación a 37°C durante el tiempo necesario hasta alcanzar una turbidez determinada en la fase de crecimiento exponencial que asegurase el buen estado de las células (Madigan *et al.*, 2012).

3.3.3.2. Inducción de la expresión de proteínas recombinantes

Una vez el cultivo bacteriano alcanzaba la densidad óptica determinada, se procedía a la inducción de la expresión de la proteína de interés añadiendo al medio isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a la concentración establecida y se dejaba el cultivo durante 4 h en agitación a 37°C.

3.3.3.3. Recogida y lisis de bacterias

Tampón de lavado: tampón fosfato (20 mM NaH₂PO₄ y 500 mM NaCl; pH 7,4) del “His Buffer Kit” de GE Healthcare, 1 mM PMSF

Tampón de lisis (recomendado por el fabricante): tampón fosfato (20 mM NaH₂PO₄ y 500 mM NaCl; pH 7,4) del “His Buffer Kit” de GE Healthcare, 1 mM PMSF, 0,2 mg/mL lisozima de Sigma-Aldrich, 9,2 U/mL ADNasa TURBO™ de Thermo Fisher Scientific, 1 mM MgCl₂

Transcurrido el tiempo de inducción con IPTG, se dividió el contenido del matraz en dos tubos de 50 mL sobre hielo. Las bacterias en el medio de cultivo se centrifugaron a una velocidad de 5000 *xg* durante 15 min a 4°C.

A continuación, se retiró el sobrenadante (medio de cultivo) y el pellet se resuspendió cuidadosamente en 6 mL de tampón de lavado, conservado a 4°C. Se centrifugó nuevamente el material a una velocidad de 5000 *xg* durante 15 min a 4°C. Después, se retiró el sobrenadante y se procedió a la lisis de las bacterias.

- Lisis enzimática

Las bacterias se resuspendieron por completo en el tampón de lisis (2 mL de tampón de lisis por cada pellet proveniente de 50 mL de cultivo procesado) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h.

- Lisis mecánica

Tras la lisis enzimática, se agitaron las muestras en un vórtex y se dividieron en alícuotas de 1 mL en tubos de 2 mL. La lisis mecánica se realizó por sonicación en un baño de ultrasonidos a 4°C, empleando 10 pulsos de 15 s a una potencia de 400 W.

Una vez finalizada la sonicación, las muestras se sometieron a un ciclo de congelación-descongelación para completar su lisis.

3.3.3.4. Purificación de las proteínas recombinantes de la fracción soluble

Tampón de unión o *binding buffer*: tampón fosfato (20 mM NaH_2PO_4 y 500 mM NaCl; pH 7,4) y 10 – 40 mM imidazol del “His Buffer Kit” de GE Healthcare; 1 mM PMSF

Tampón de elución o *elution buffer*: tampón fosfato (20 mM NaH_2PO_4 y 500 mM NaCl; pH 7,4) y 500 mM imidazol del “His Buffer Kit” de GE Healthcare; 1 mM PMSF

Previo a la purificación de la proteína recombinante soluble, se clarificaron los lisados por centrifugación a máxima velocidad durante 10 min a 4°C. Al sobrenadante o fracción soluble se le añadió imidazol a la misma concentración que la fijada para el tampón de unión.

A continuación, se siguió el protocolo indicado por el fabricante para la purificación de las fracciones solubles en columnas “His Spin Trap” (GE Healthcare) (figura MM-1A). La purificación se llevó a cabo al pasar la fracción soluble del lisado total de proteínas a través de la columna tras sucesivos pasos de lavado y elución. Los

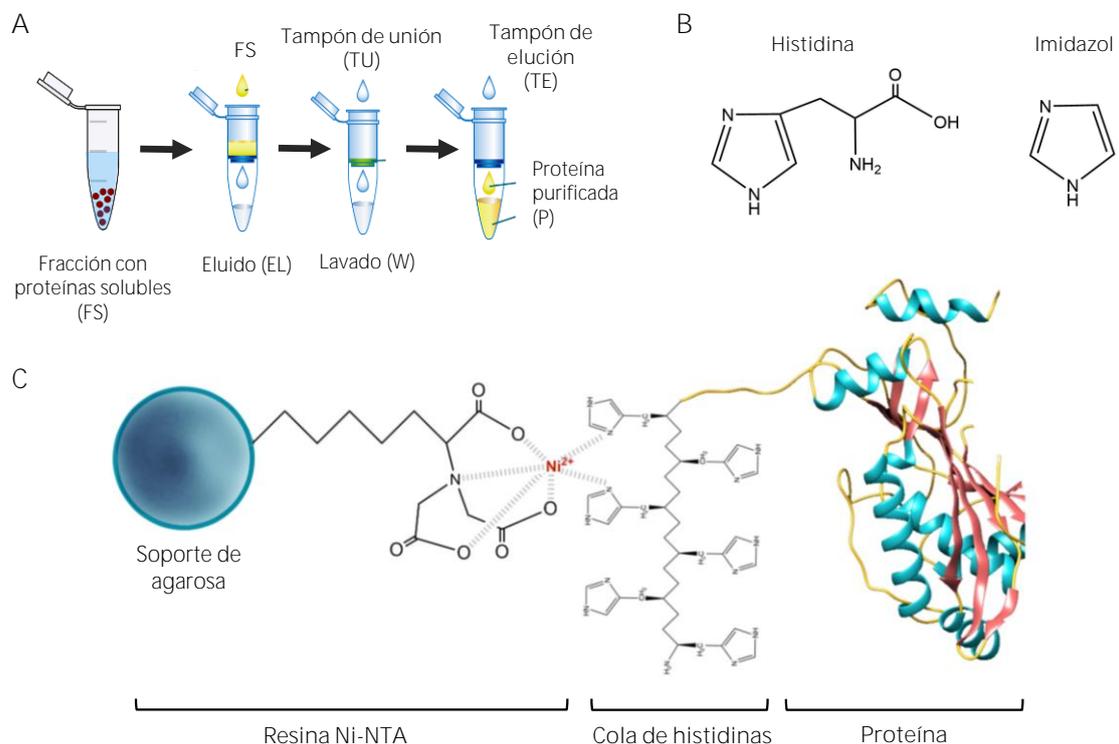


Figura MM-1. Fundamento de la purificación de proteínas por cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC). Esquema de los pasos a seguir en el protocolo de purificación por columnas de afinidad de níquel - ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) (A). Similitud estructural entre la histidina y el imidazol (B). Representación de la unión entre la resina Ni-NTA de la columna de afinidad y la cola de seis histidinas de la proteína de interés (C).

tampones requeridos contienen una concentración de imidazol determinada, pues, debido a la similitud estructural de esta molécula con la histidina, compite con las proteínas por su unión a la columna (figura MM-1B, C).

3.3.3.5. Diálisis

Con objeto de evitar interferencias en posteriores experimentos *in vitro*, las muestras de proteína purificada se sometieron a diálisis para retirar los solutos potencialmente tóxicos para las células. Se empleó una membrana de celulosa regenerada de Spectrum®Labs.com con un corte de peso molecular (MWCO) en 12-14 kDa, adecuado para asegurar la retención completa de nuestra proteína.

3.4. TÉCNICAS DE CLONACIÓN Y MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

3.4.1. Clonación clásica

3.4.1.1. Clonación de las secuencias codificantes del ARN guía para el silenciamiento de bombas ABC por CRISPR/Cas9

El diseño de los oligonucleótidos para clonar cada una de las secuencias codificantes de los ARN guía dirigidos a un gen específico se efectuó tomando como molde la ORF de la isoforma más larga publicada en PubMed. Se seleccionó un exón común a todas las variantes de las ORFs para cada gen de interés. La secuencia nucleotídica de este exón se analizó con la herramienta *online* de diseño de guías de IDT™, que determina las regiones con PAM (de *Protospacer Adjacent Motif*) y muestra múltiples guías. Se seleccionó la guía con mayor eficacia y especificidad, basándonos en los índices proporcionados por el programa *on-target score* y *off-target risk*, respectivamente.

Los oligonucleótidos generados a través de IDT™ contenían la secuencia codificante del ARN guía más un extremo compatible para su ligación con el pGEM-sgc-*PacI* linealizado por una enzima específica para permitir su ligación (tabla MM-3).

En paralelo, se preparó una mezcla de 1 µg del vector pGEM-sgc-*PacI*, clonado previamente en nuestro laboratorio a partir del pGEM®-T Easy (Promega), con tampón "CutSmart" (NE BioLabs) y la enzima *BbsI* (NE BioLabs) en agua ultrapura. El plásmido

se linealizó tras incubarlo 15 min a 37°C, seguidos de 20 min a 65°C para la inactivación de la enzima en un termociclador. El resultado se comprobó en gel de agarosa ([apartado 3.14.3.](#)) y el ADN lineal se purificó de la mezcla de reacción utilizando el “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare) ([apartado 3.14.5.](#)).

Tabla MM-3. Oligonucleótidos codificantes de ARN guía dirigidos a bombas ABC diseñados para su clonación en el plásmido pGEM-sgc-*Pacl*.

Gen	Proteína	Secuencia 5' – 3'	Tipo
ABCC1	MRP1	CACCGGATCAAGACCGCTGTCATT	F
		AAACAATGACAGCGGTCTTGATCC	R
ABCC2	MRP2	CACCGAAAAGTACGGACAGCTATCA	F
		AAACTGATAGCTGTCCGTACTIONTTTC	R
ABCC4	MRP4	CACCGAAGGTACGATTCCTTAGTGT	F
		AAACACACTAAGGAATCGTACCTTC	R
ABCC5	MRP5	CACCGTAGACACCATATACTGACC	F
		AAACGGTCAGTATATGGTGTCTAC	R

F, *forward*; R, *reverse*.

A continuación, el plásmido pGEM-sgc-*Pacl* linealizado y los oligonucleótidos hibridados se ligaron con la ADN ligasa T4 (Thermo Fisher Scientific) mediante incubación 1 h a temperatura ambiente seguida de 18 h a 4°C.

Una vez obtenidos los vectores, se transformaron bacterias *E. coli* DH5α por choque térmico y se sembraron en placas de medio LB con agar, suplementado con 100 µg/mL de ampicilina ([apartado 3.3.1.](#)). Se crecieron algunas de las colonias en medio LB líquido suplementado con el antibiótico, de las que se extrajo el ADN plasmídico ([apartado 3.3.2.](#)). La identidad de los clones seleccionados se confirmó mediante estudio de restricción ([apartado 3.14.6.](#)) y secuenciación ([apartado 3.14.7.](#)) utilizando el *primer forward* universal M13F (tabla MM-4) del Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca.

3.4.1.2. Clonación de las secuencias codificantes para tdTomato y SOX17 secretables con Tat en el vector lentiviral pWPI

Los vectores de expresión pWPI-AFPsp-Tat-tdTomato, pWPI-AFPsp-tdTomato-Tat y pWPI-AFPsp-SOX17-Tat_R se generaron mediante una estrategia de clonación en múltiples pasos detallada en el [apartado 4.2.3.D.](#) Las secuencias de los *primers* empleados y el protocolo simplificado se exponen a continuación.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Clonación de las ORFs tdTomato y SOX17 con Tat en pGEM®-T

Las ORFs de tdTomato y hSOX17 se amplificaron por PCR a partir de 5 ng de los plásmidos tdTomato-N1 y pWPI-SOX17 respectivamente, este último obtenido previamente en nuestro laboratorio (Lozano *et al.*, 2020). Los *primers* empleados se muestran en la tabla MM-4.

La PCR se llevó a cabo con la enzima “AccuPrime Pfx ADN polimerasa” (Thermo Fisher Scientific) de alta fidelidad. Los productos obtenidos tras la PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa (apartado 3.14.3.) y las bandas de los tamaños adecuados se purificaron por extracción del ADN del gel de agarosa con el “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare) (apartado 3.14.5.). El amplicón purificado se adeniló con una Taq polimerasa (Biotools) en los extremos 3' y se ligó con el pGEM®-T (Promega) con la ADN ligasa T4 (Promega).

Una vez obtenidos los vectores, se transformaron bacterias *E. coli* DH5α por choque térmico y se sembraron en placas de medio LB con agar suplementado con ampicilina 100 µg/mL (apartado 3.3.1.). Se crecieron algunas de las colonias en medio LB líquido suplementado con el antibiótico, de las que se extrajo el ADN plasmídico (apartado 3.3.2.). Todos los plásmidos obtenidos se comprobaron por estudio de restricción (apartado 3.14.6.) y secuenciación (apartado 3.14.7.) (tabla MM-4).

Tabla MM-4. *Primers* empleados para clonar y secuenciar las ORFs de tdTomato y SOX17 unidas a la secuencia de Tat en un vector pGEM®-T.

Aplicación	Secuencia 5' – 3'	Tipo
Amplificación ORF tdTomato + Tat en cabeza	CGTCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGA CGAAGAATGGTGAGCAAGGGCGAGG	F
	ACTAGTCTATTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGTA	R
Amplificación ORF tdTomato sin codón parada + Tat en cola	CGTCTCCATGGTGAGCAAGGGCGAGG	F
	ACTAGTCTATTATCTTCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTC CTGCCATACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG	R
Amplificación ORF SOX17 sin codón de parada + Tat reverso en cola	GAAGACCCATGAGCAGCCCGGATGC	F
	ACTAGTCTATTAATAGCCCCTCTTCTCCGTCTCTGT CGTCGTCTTACGTCAGGATAGTTGCAGTAATATACC GC	R
Secuenciación productos clonados en pGEM®-T	TGTA AACGACGGCCAGT	M13F
	CAGGAAACAGCTATGAC	M13R

ORF, *open reading frame*; F, *forward*; M13, *primer universal*; R, *reverse*.

II. Clonación de AFPsp-tdTomato y AFPsp-SOX17 con Tat en pWPI-MCS

La siguiente etapa de clonación se dividió en varios pasos: la extracción del inserto generado por digestión del pGEM®-T, la obtención de la secuencia AFPsp por hibridación de los oligonucleótidos y la ligación secuencial de los fragmentos obtenidos en los dos pasos anteriores con el plásmido pWPI-MCS linealizado.

▪ Digestión de los pGEM y del pWPI-MCS

La digestión de los insertos clonados en pGEM®-T se realizó con las enzimas *Esp3I* (Thermo Fisher Scientific) y *SpeI* (NE Biolabs) para pGEM-Tat-tdTomato y pGEM-tdTomato-Tat. En el caso de pGEM-SOX17-Tat_R, se emplearon *BbsI* (NE Biolabs) y *SpeI* en el tampón "CutSmart®" (NE Biolabs). En paralelo, se linealizó el vector lentiviral pWPI-MCS con las enzimas *MluI* (NE Biolabs) y *SpeI*, también en el tampón "CutSmart®".

Ambas digestiones se realizaron en un termociclador a 37°C durante 30 min y a 80°C durante 20 min. Los productos fueron visualizados y purificados de gel de agarosa (apartados 3.14.3. y 3.14.5.).

▪ Hibridación de oligonucleótidos para AFPsp

Se hibridaron 2 µg de cada oligonucleótido, mostrados en la tabla MM-5.

Tabla MM-5. Oligonucleótidos y primers empleados para clonar y secuenciar Tat-tdTomato, tdTomato-Tat y SOX17-Tat_R unidas en cabeza a la secuencia de AFPsp en un vector pWPI-MCS.

Aplicación	Secuencia 5' – 3'	Tipo
Clonación de AFPsp en Tat-tdTomato	CGCGTACCATGAAGTGGGTGGAATCAATTTTTTAATTTTC CTACTAAATTTTACTGAATCCAGA	F
	CATATCTGGATTTCAGTAAAATTTAGTAGGAAAATTA AATTGATTCCACCCACTTCATGGTA	R
Clonación de AFPsp en tdTomato-Tat	CGCGTACCATGAAGTGGGTGGAATCAATTTTTTAATTTTC CTACTAAATTTTACTGAATCCAGA	F
	CCATTCTGGATTTCAGTAAAATTTAGTAGGAAAATTA AATTGATTCCACCCACTTCATGGTA	R
Clonación de AFPsp - SOX17-Tat _R)	CGCGTACCATGAAGTGGGTGGAATCAATTTTTTAATTTTC CTACTAAATTTTACTGAATCCAGA	F
	TCATTCTGGATTTCAGTAAAATTTAGTAGGAAA ATTAATAAATTTGATTCCACCCACTTCATGGTA	R
Secuenciación de productos clonados en pWPI-MCS	GGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGA	F
	TGCTATTATGTCTACTATTCTTTCCCTGCACT	R

AFPsp, péptido señal de la α-fetoproteína; ORF, open reading frame; F, forward; R, reverse.

▪ Ligación secuencial de los fragmentos generados con el pWPI-MCS lineal

MATERIALES Y MÉTODOS

Los pGEM digeridos y el híbrido de oligonucleótidos con la secuencia de AFPsp se ligaron con una ADN ligasa T4 (Thermo Fisher Scientific). Transcurrido este tiempo, se procedió directamente y del mismo modo a la ligación de este nuevo producto con el pWPI-MCS lineal.

Para la amplificación de los productos obtenidos por ligación, se transformaron por choque térmico *E. coli* "One Shot™ Mach1™ T1" (Thermo Fisher Scientific) y se sembraron en placas de agar con ampicilina (apartado 3.3.1.). Se siguió el mismo protocolo que para el resto de clonaciones, indicado en los apartados 3.3.2., 3.14.6. y 3.14.7..

3.4.2. Modificación del plásmido pET-DEST42 por mutagénesis dirigida

Con objeto de introducir la secuencia del péptido Tat en el plásmido pET-DEST42 (Thermo Fisher Scientific) se siguió una estrategia de mutagénesis dirigida adaptada del método de Laible & Boonrod (2009).

Se utilizaron dos *primers* específicos y todos los plásmidos obtenidos se comprobaron por estudio de restricción (apartado 3.14.6.) y secuenciación (apartado 3.14.7.) (tabla MM-6).

Tabla MM-6. *Primers* diseñados para la mutagénesis dirigida y secuenciación del plásmido de destino (pET-DEST42-Tat).

Secuencia	Aplicación	Secuencia 5' – 3'	Tipo
Tat	Introducción de Tat en pET-DEST42	AGACAGCGACGAAGAAACAAGTTTGTACAA	F
		AAAAGCTGAACGAGAAACG	
Tat	Secuenciación pET-DEST42-Tat	CGCTTCTTCCTGCCATACATGATATTCCTTCTT	R
		AAAGTTAAACAAAATTATT	
Tat	Secuenciación pET-DEST42-Tat	TAATACGACTCACTATAGGG	T7F

F, *forward*; R, *reverse*. T7F, *primer* universal T7 forward, proporcionado por el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca.

3.4.3. Clonación por recombinación “Gateway™”

Los plásmidos pET-Tat-CAT y pET-Tat-SOX17 fueron clonados mediante la combinación de técnicas basadas en PCR de alta fidelidad, el uso de enzimas de restricción y la tecnología “Gateway™”. En la tabla MM-7 se muestran los *primers* empleados.

Tabla MM-7. *Primers* diseñados para la clonación por “Gateway™” y secuenciación del plásmido de entrada de SOX17 (pEntry-SOX17) y los plásmidos de expresión de Tat-SOX17 y Tat-CAT (pET-Tat-SOX17 y pET-Tat-CAT).

Secuencia	Aplicación	Secuencia 5' – 3'	Tipo
Tat-CAT	Secuenciación pET-Tat-CAT	TAATACGACTCACTATAGGG	T7F
SOX17 (<i>Homo sapiens</i>)	Amplificación ORF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTG	F
		ATGAGCAGCCCGGATGCC	R
	Secuenciación ORF	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTG	R
		CACGTCAGGATAGTTGCAGTAATATACCGC	F
		CCAGCGCCCTTCACGTGTACTA	R
		CGCGCCCGGTACTTGTAGTT	F
TCATGGTGTGGGCTAAGGACGA	R		
GGTGCTGGTGTGGTGCT	R		

F, *forward*; R, *reverse*. T7F, *primer* universal T7 *forward* proporcionado por el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca.

- Amplificación de la secuencia codificante de SOX17

La ORF humana de *SOX17* se amplificó sin el codón de parada y flanqueada por los adaptadores *attB1* (GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTNN) y *attB2* (GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTN) por PCR a partir del plásmido pWPI-SOX17, obtenido previamente en nuestro laboratorio (Lozano *et al.*, 2020). En el extremo 3' de los *primers* se añadieron uno o dos nucleótidos adicionales (N) para mantener la fase de lectura con la región *attB*.

La PCR se llevó a cabo con la enzima “AccuPrime Pfx ADN polimerasa” (Thermo Fisher Scientific) de alta fidelidad y en presencia de un 5% de DMSO, con el fin de mejorar la accesibilidad de la enzima a la ORF de *SOX17*, rica en guanina y citosina. 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 del gel de

agarosa con el “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare) ([apartado 3.14.5.](#)).

- Recombinación BP

La ORF de interés flanqueada por sitios *attB* se clonó en el vector donador pDONR221 (Thermo Fisher Scientific) mediante una reacción de recombinación con la **mezcla enzimática “Gateway™ BP Clonase II” (Thermo Fisher Scientific) a 25°C durante 4 h**, para seguidamente inactivar con proteinasa K a 37°C durante 10 min. En el caso de CAT, el vector de entrada se generó a partir del pcDNA6.2/GW/V5/CAT (Thermo Fisher Scientific), mientras que para *SOX17* se partió del producto de PCR generado desde el pWPI-*SOX17*. En el caso de la secuencia de *SOX17* optimizada para expresión en *E. coli* (*SOX17opt*, adquirida por encargo a GenScript), se recombinó mediante una reacción BP el plásmido pcDNA3.1./*SOX17opt/c-Myc* con el pDONR221.

La identidad de los clones seleccionados se confirmó con un estudio de restricción ([apartado 3.14.6.](#)) y secuenciación ([apartado 3.14.7.](#)), utilizando los *primers* presentados en la tabla MM-7.

- Recombinación LR

Los vectores de entrada generados en el paso anterior (pEntry-CAT, pEntry-*SOX17* y pEntry-*SOX17opt*) se recombinaron con el vector de destino pET-DEST42-Tat. En todos los casos se utilizó la **mezcla enzimática “Gateway™ LR Clonase II” (Thermo Fisher Scientific)** en condiciones de incubación de 25°C durante 16 h. Al cabo de este tiempo, las reacciones se detuvieron por tratamiento con proteinasa K a 37°C durante 10 min.

3.5. ENSAYO DE DETECCIÓN DE ESCISIONES EN EL GENOMA

El ensayo de detección de escisiones en el genoma es un método fiable y rápido basado en la capacidad de la endonucleasa I T7 para detectar y cortar heterodímeros de ADN (Lowell & Klein, 2000).

La eficacia de los ARN guía diseñados se comprobó con el kit “GeneArt® Genomic

Cleavage Detection” (Thermo Fisher Scientific), que contiene: tampón de lisis, proteinasa K, mezcla para PCR “AmpliTaq Gold® 360”, endonucleasa I T7 y tampón de reacción 10x. Los *primers* diseñados se recogen en la tabla MM-8.

Tabla MM-8. *Primers* diseñados para la validación de los ARN guía clonados en el plásmido pGEM-sgc-Pacl en líneas celulares humanas por el ensayo de detección de escisiones en el genoma y secuenciación de los *loci* de interés mutados por CRISPR/Cas9 en poblaciones monoclonales de células.

Gen	Proteína	Secuencia 5' – 3'	Tipo	Amplificación (pb)
ABCC1	MRP1	CTCAGGAGAAAGTTGCAGTGCCAA	F	395
		GCTACCCTCATCCTACTGCTCCA	R	
ABCC2	MRP2	GAGGCTTAATGAACTATGATCCTGCCACT	F	622
		CCACCCATTGTCTGTGAACACACTTC	R	
ABCC4	MRP4	GACCTAACACAGAGTCTGGCTGAGAA	F	542
		ATGGAATAGAGCCCTGAAACCACAGAA	R	
ABCC5	MRP5	TCTGGTTTGTGGTAGGTGCTCAGT	F	657
		CCGTCTTGGGTATTCTCTGTAGCAGT	R	

F, forward; R, reverse.

3.6. PRODUCCIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES

3.6.1. Producción y purificación

Para la producción de lentivirus, se emplearon 1×10^7 células HEK293T en placas Petri de 10 cm de diámetro pretratadas con colágeno, transfectadas 24 h después de su siembra con los siguientes plásmidos:

- pWPI-AFPsp-Tat-tdTomato, pWPI-AFPsp-tdTomato-Tat o pWPI-AFPsp-SOX17-Tat_R (6 µg): vectores que contenían las proteínas recombinantes de interés. Todos presentaban el gen reportero EGFP (*Enhanced Green Fluorescence Protein*) separado del transgén de estudio por un elemento IRES, lo que permitía el seguimiento de la fluorescencia de las células transducidas, tanto por microscopía de fluorescencia como por citometría de flujo.
- psPAX2 (6 µg): vector empaquetador que codifica para las proteínas estructurales y que facilitan el ensamblaje, además de las necesarias para la replicación viral.

MATERIALES Y MÉTODOS

- pMD2.G (4,5 µg): vector con la glicoproteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV), capaz de infectar gran variedad de células eucariotas de mamíferos debido a la ubicuidad de su receptor, y muy estable, lo que permite su ultracentrifugación.

Se realizaron tres recogidas de medio de cultivo con lentivirus, que era reemplazado por medio fresco, 48 h, 56 h y 72 h después de la transfección. Los medios recogidos se almacenaban a 4°C.

Una vez recogidos todos los medios, se retiró el *debris* con filtros de 0,45 µm y el volumen total se ultracentrifugó durante 130 minutos a 16°C y 20.000 rpm. Transcurrido este tiempo, se retiró todo el sobrenadante y se añadieron 200 µL de medio base RPMI. Tras una incubación a 4°C durante 4 h, las partículas virales se alicuotaron para favorecer su resuspensión y se almacenaron a -80°C cuando fue necesario.

3.6.2. Titulación por citometría de flujo

Para el cálculo del rendimiento de la producción por citometría de flujo, se sembraron 20.000 células HEK293T por pocillo en una placa de 96 pocillos tratada con colágeno. 24 h después, las células fueron transducidas con diluciones seriadas 1:2 de los lentivirus, partiendo de una dilución 1:100 (suspensión de lentivirus:medio de cultivo). Cada condición se realizó por duplicado, incluyendo un blanco de células no transducidas.

Pasadas 16 h de la spin-inoculación, se cambió el medio de cultivo por uno fresco. El porcentaje de células EGFP+ se determinó 4 días post-transducción por citometría de flujo.

La concentración de partículas virales se calculó por la fórmula

$$\text{Título (TU/mL)} = \frac{10^{-ED_{50}} \cdot 2 \cdot n^{\circ}\text{células}}{V}$$

, donde TU son las unidades transformantes (partículas virales infectivas), ED_{50} equivale al log10 de la dilución de la suspensión viral que consiguió transducir el 50%

de las células (50% *effective dose*) y V es el volumen del medio de cultivo (mL).

3.6.3. Transducción de las células diana

Se sembraron 200.000 células HEK293T por pocillo en placas de 24 pocillos pretratadas con colágeno y se transdujeron a las 24 h con los lentivirus recombinantes en presencia de polibreno a MOI 25 (multiplicidad de infección, indica el número de partículas virales disponibles para infectar una célula). Se centrifugaron las placas a 1800 xg durante 90 min a 32°C. A las 16 h se retiró el medio de cultivo y se añadió medio nuevo.

3.7. ESTUDIOS DE TRANSPORTE *IN VITRO*

3.7.1. Soluciones empleadas

Medio de captación pH 7,4: NaCl 96 mM, KCl 5,3 mM, KH₂PO₄ 1 mM, MgSO₄ 0,8 mM, CaCl₂ 1,8 mM, D-glucosa 11 mM, y HEPES 50 mM

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

3.7.2. Estudios de captación y eflujo de compuestos fluorescentes

Para comprobar la funcionalidad de las bombas MRP expresadas en las líneas celulares Alexander y TFK-1, se llevaron a cabo experimentos donde las células se incubaban con marcadores celulares que eran metabolizados a sustratos de MRPs fluorescentes en el interior celular (tabla MM-9) durante distintos tiempos y se determinaba el contenido intracelular de dichos metabolitos por citometría de flujo.

Tabla MM-9. Marcadores celulares empleados para estudiar la actividad transportadora de las

Proteínas	Marcador celular	Concentración
MRP1, MRP2	Calceína-acetoximetil éster (CAM)	10 nM o 50 nM
MRP3, MRP4, MRP5	Diacetato de 5(6)-carboxifluoresceína (CFDA)	1 μM

proteínas ABC por citometría de flujo.

Se emplearon células Alexander *mock* (transfectadas con el plásmido que contiene la ORF de Cas9) y clones Alexander MRP1^{K.O.}, MRP2^{K.O.}, MRP4^{K.O.} y MRP5^{K.O.}, en los que cada una de estas proteínas había sido silenciada con el sistema CRISPR/Cas9. En otra serie de experimentos, se emplearon células TFK-1 silvestres (*wild-type*, WT) tratadas o no con distintos fármacos antitumorales durante 72 h.

Para los estudios de captación o carga, las células Alexander en suspensión en medio de captación fueron incubadas con el sustrato fluorescente a 37°C durante 15 min en ausencia o presencia de TKIs a 10 μM . En el caso de las células TFK-1, suspendidas igualmente en medio de captación, la incubación con el sustrato fluorescente a 37°C se realizó durante 30 min en ausencia de otros compuestos. El transporte se detenía añadiendo 900 μL de medio de captación a 4°C.

Por otro lado, para el estudio del eflujo mediado por las bombas MRP, se cargaban las células en suspensión durante 15 o 30 min con el marcador celular y se diluían con 900 μL de medio de captación a 37°C sólo o con un TKI 10 μM . Entonces, se determinaba el contenido intracelular del sustrato o carga inicial. A los 30 min de incubación a 37°C, se medía de nuevo el contenido intracelular del sustrato o la carga final. El eflujo se calculaba como la diferencia entre la carga final y la inicial, y se expresaba en porcentaje de la carga inicial.

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

Además de diferentes cultivos celulares ([apartado 3.2.1.](#)), todas las muestras tumorales indicadas en las tablas MM-1 y MM-2 fueron analizadas por RT-qPCR. Como controles para las medidas por RT-qPCR, se incluyeron muestras del tejido hepático adyacente al tumor de 8 de los pacientes con HCC y 9 de los pacientes con iCCA.

3.8.1. Diseño de cebadores

Los cebadores o *primers* específicos para cuantificar el ADN codificante de cada una de las proteínas de interés (tabla MM-10) se diseñaron con el programa “[OligoAnalyzer 3.1](#)” (Integrated DNA Technologies, Coralville, EE.UU.) y su

especificidad se chequeó con el programa [BLAST](#) (Camacho *et al.*, 2009; Geer LY *et al.*, 2010). Los *primers* se diseñaron, siempre que fue posible, sobre la unión de dos exones codificantes, utilizando como molde la secuencia del ARNm específica para cada gen, publicada en la base de datos [GenBank](#) (Geer LY *et al.*, 2010).

Gen	Proteína	Secuencia 5' – 3'	Tipo	pb	Número de acceso
<i>ABCB1</i>	MDR1	GCGCGAGGTCGGAATGGAT	F	198	NM_000927
		CCATGGATGATGGCAGCCAAAGTT	R		
<i>ABCC1</i>	MRP1	CCGCTCTGGGACTGGAATGT	F	166	NM_004996
		GTGTCATCTGAATGTAGCCTCGGT	R		
<i>ABCC2</i>	MRP2	TGAAGAGGAAGCCACAGTCCATGA	F	171	NM_000392
		TTCAGATGCCTGCCATTGGACCTA	R		
<i>ABCC3</i>	MRP3	CCAAGTTCTGGGACTCCAACCTG	F	160	NM_003786
		ATGATGTAGCCACGACAATGGTGC	R		
<i>ABCC4</i>	MRP4	TGCAAGGGTTCTGGGATAAAGA	F	141	NM_005845
		CTTTGGCACTTTCTCAATTAACG	R		
<i>ABCC5</i>	MRP5	CGTGAAGTGCAGAAGACTAGAGAGACT	F	128	NM_005688
		GGCACACGATGGACAGGATGA	R		
<i>ABCC6</i>	MRP6	GTGGGTTTCTGGCCTGGTCT	F	164	NM_001171
		ATGCTATTGCCTTGTGTGCCTCC	R		
<i>ABCG2</i>	BCRP	CCCAGGCCTCTATAGCTCAGATCATT	F	161	NM_004827
		CACGGCTGAAACACTGCTGAAACA	R		
<i>GAPDH</i>	GAPDH	TGAGCCCAGCAGCCTCC	F	138	NM_002046
		TACGACCAAATCCGTTGACTCC	R		
<i>HPRT1</i>	HPRT1	GCCCTGGCGTCGTGATTAGT	F	140	NM_000194
		AGCAAGACGTTTCAGTCTGTCCATAA	R		
<i>SOX2</i>	SOX2	CGCAAGATGGCCCAGGAGAA	F	121	NM_003106.3
		GCCGCTTAGCCTCGTCGAT	R		
<i>SOX9</i>	SOX9	TGGGCAAGCTCTGGAGACTTCT	F	95	NM_000346.3
		CGGGTGGTCCTTCTTGTGCT	R		
<i>SOX17</i>	SOX17	TCATGGTGTGGGCTAAGGACGA	F	196	NM_022454
		CGCGGCCGTACTIONGTAGTT	R		

Tabla MM-10. *Primers* utilizados para cuantificar la expresión de genes humanos por RT-qPCR. F, *forward*; R, *reverse*; pb, pares de bases del amplicón generado.

3.8.2. Extracción de ARN total

El ARN total se extrajo a partir de homogenados de células o de tejido (hígado) con el kit “*Illustra RNAspin mini RNA Isolation*” (GE Healthcare), basado en la purificación del ARN adsorbido a membranas de sílice. Se procesaron un máximo de 5 millones de células o 30 mg de tejido por columna, siguiendo las instrucciones del proveedor. El ARN

purificado se cuantificó por espectrofotometría a $\lambda 260$ nm en un NanoDrop™ 1000 (apartado 3.13.1).

3.8.3. Transcripción reversa (RT)

El ADNc molde para PCR cuantitativa se sintetizó a partir del ARN purificado por **transcripción reversa (RT), utilizando el kit comercial “High-Capacity cDNA Reverse Transcription”** (Thermo Fisher Scientific).

3.8.4. PCR cuantitativa (qPCR)

La determinación de los niveles de expresión de genes se realizó mediante PCR cuantitativa (qPCR) (Morrison TB *et al.*, 1998).

Se empleó SYBR Green I como fluorocromo, presente en la mezcla “SYBR Select Master Mix” (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), y el termociclador QuantStudio™ 3 (Thermo Fisher Scientific).

Las condiciones de tiempo y temperatura para la PCR fueron:

- Un ciclo: 2 min a 50°C (activación de la Uracil-N-glicosilasa (UNG) AmpErase™)
- Un ciclo: 10 min a 95°C (activación de la ADN polimerasa)
- 40 ciclos: 15 s a 95°C (desnaturalización), 1 min a 60°C (hibridación y extensión)

Todas las determinaciones se realizaron siempre por duplicado.

Para corregir variaciones en la cantidad de ARN de partida, se utilizó la expresión de un gen endógeno (Chelly *et al.*, 1988) (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa/GAPDH o hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa 1/HPRT1) como normalizador, de forma que:

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

, donde ΔCt es la expresión del gen diana normalizada frente al control interno en la muestra problema.

Para poder comparar los resultados entre diferentes análisis, se utilizó una muestra de ADN control, a la que se le otorgó el valor 1 o 100% de expresión del gen

de interés. Así, se calculó la expresión del gen de interés normalizada en la muestra problema y relativa a la muestra control:

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

Y, finalmente, se determinó la ratio de la expresión relativa (R o diferencia en número de veces entre la expresión normalizada del gen de interés en la muestra problema y en el control) mediante la fórmula:

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

, que constituye una estimación rápida para comparar resultados de expresión relativa obtenida a partir de un modelo matemático presentado por Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific).

3.9. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR TINCIÓN Y *WESTERN BLOT*

3.9.1. Soluciones empleadas

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

Tampón RIPA: 1% Nonidet P-40, 0,5% desoxicolato sódico y 0,1% SDS disueltos en PBS

Solución de carga 4x: 250 mM Tris-HCl base pH 6,8, 9,2% SDS, 10% glicerol, 20% β -mercaptoetanol, 0,08% azul de bromofenol

Tampón de migración: 25 mM Tris-HCl base, 192 mM L-glicina y 1% SDS

Solución azul de Coomassie: "Quick Coomassie" (Generon)

Tampón de transferencia: 25 mM Tris-HCl base, 192 mM L-glicina, 1% SDS y 20% metanol

Solución rojo Ponceau: 0,1% rojo Ponceau S, 0,5% ácido acético

Tampón Tris salino (TBS): 20 mM Tris-HCl base, 137 mM NaCl, pH 7,6

TBS-Tween: TBS suplementado con 0,1% de Tween-20 (v/v)

3.9.2. Obtención de homogenados de tejido o de cultivos celulares

Para obtener un homogenado de proteínas a partir de tejido congelado a -80°C se pesaron entre 50 y 100 mg de tejido, que se homogenizó en una mezcla de tampón **RIPA y un cóctel de inhibidores de proteasas al 1% (v/v) utilizando el equipo "Bullet Blender Storm"**. Se emplearon las condiciones de tiempo y velocidad adecuadas para cada tipo de tejido, siguiendo las especificaciones de la casa comercial.

3.9.3. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y tinción por azul de Coomassie

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

La electroforesis vertical se llevó a cabo en una cubeta con la solución de migración a una corriente constante de 300 V durante 20 min, tiempo necesario para la completa resolución de la proteína de interés.

Cuando se quería visualizar la totalidad de proteínas presentes en el gel, éste se **incubaba con 25 mL de la solución de tinción de proteínas "Quick Coomassie"** durante 1-2 h según la proporción de acrilamida en el gel y, tras un lavado con agua destilada para retirar el exceso de colorante, se fotografiaba el resultado.

3.9.4. Transferencia y tinción de la membrana con rojo Ponceau

Tras la electroforesis, las proteínas en geles de poliacrilamida *stain-free* o no teñidos con azul de Coomassie se sometieron a una transferencia húmeda a una membrana de nitrocelulosa. Para ello, se utilizó una cubeta con tampón de transferencia en frío y agitación, conectada a una fuente de alimentación con una corriente constante de 250 mA durante 90-120 min, en función del peso molecular de

la proteína de interés.

Al final del proceso y cuando era necesario, la membrana de nitrocelulosa se incubaba durante 5 min en la solución rojo *Ponceau* para comprobar la eficacia de la transferencia y valorar la carga de proteínas en cada calle.

3.9.5. Inmunodetección

Previo a la inmunodetección, se realizó un bloqueo de la membrana 1 h a temperatura ambiente y en agitación con albumina sérica bovina (BSA) o leche descremada al 1-5% (p/v) diluida en tampón TBS-Tween, según las especificaciones del anticuerpo.

Seguidamente, la membrana bloqueada se incubó con el anticuerpo primario correspondiente en agitación durante toda la noche a 4°C, o bien durante 1 h a temperatura ambiente, según la sensibilidad y especificidad del mismo. Los anticuerpos primarios se utilizaron diluidos en leche o BSA al 0-5% (p/v) en TBS-Tween, según las recomendaciones de la casa comercial (tabla MM-11).

Tabla MM-11. Anticuerpos primarios empleados para detectar proteínas por *western blot*.

Antígeno (especie)	Referencia	Especie huésped	Dilución	Casa comercial
SOX17 (<i>Homo sapiens</i>)	AF1924	<i>Capra aegagrus hircus</i>	1:1000 (leche 5%)	R&D
His-tag6x	MA1-21315	<i>Mus musculus</i>	1:2000 (leche 5%)	Thermo Fisher Scientific
V5-tag	46-0705	<i>Mus musculus</i>	1:4000 (leche 5%)	Thermo Fisher Scientific
GAPDH (<i>Homo sapiens</i>)	sc-32233	<i>Mus musculus</i>	1:1000 (leche 5%)	Santa Cruz Biotechnology
α -actinina (<i>Homo sapiens</i>)	MAB1682	<i>Mus musculus</i>	1:1000 (leche 5%)	Merck
MRP1 (<i>Homo sapiens</i>)	alx-801-007	<i>Rattus norvegicus</i>	1:500 (leche 2%)	Enzo
MRP2 (<i>Homo sapiens</i>)	alx-801-016	<i>Mus musculus</i>	1:300 (leche 2%)	Enzo
MRP4 (<i>Homo sapiens</i>)	ab15602	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:500 (leche 2%)	Abcam
MRP5 (<i>Homo sapiens</i>)	MA1-35683	<i>Rattus norvegicus</i>	1:50 (leche 1%)	Thermo Fisher Scientific

3.9.6. Revelado

El revelado se realizó mediante un método quimioluminiscente y un equipo de análisis de imagen LAS-4000 (Fujifilm) o ChemiDoc (Bio-Rad). Las membranas se incubaron en oscuridad con los reactivos ECL (*Enhanced ChemoLuminescence*) y los tiempos de exposición en el equipo de imagen se adecuaron para obtener una señal detectable y con el menor ruido de fondo.

3.10. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA

3.10.1. Soluciones empleadas

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

3.10.2. Fijación

Las células se sembraron sobre un cubreobjetos estéril de vidrio y a la densidad preestablecida para obtener una confluencia del 60-90% en el momento de la fijación.

Según los anticuerpos y las proteínas a marcar, la fijación se llevó a cabo 1 min con metanol puro a -20°C o 20 min con paraformaldehído al 4% (p/v) a temperatura ambiente.

3.10.3. Inmunodetección

Con objeto de bloquear las uniones inespecíficas, el cubreobjetos con las células fijadas se incubó a temperatura ambiente durante 30 min con FBS al 5% (v/v) en PBS. A continuación, los cubreobjetos se trataron durante 1 h con la solución de anticuerpos primarios correspondientes diluidos en PBS (tabla MM-12) y después se lavaron tres veces con PBS durante 10 min.

A la mezcla con los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón, rata, cabra o conejo conjugados con Alexa Fluor-488® o Alexa Fluor-594® (dilución 1:1000) se

añadió DAPI para teñir los núcleos (dilución 1:5000).

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

Tabla MM-12. Anticuerpos primarios empleados para detectar proteínas por inmunofluorescencia.

Antígeno (especie)	Referencia	Especie huésped	Dilución	Casa comercial
SOX17 (<i>Homo sapiens</i>)	AF1924	<i>Capra aegagrus hircus</i>	1:100, triton X-100 0,1% (FBS 1%)	R&D
His-tag6x	MA1-21315	<i>Mus musculus</i>	1:500 (FBS 1%)	Thermo Fisher Scientific
Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa (<i>Homo sapiens</i>)	ab2871	<i>Mus musculus</i>	1:100 (FBS 1%)	Abcam
Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa (<i>Homo sapiens</i>)	ab76020	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:100 (FBS 1%)	Abcam
MDR1 (<i>Homo sapiens</i>)	C219	<i>Mus musculus</i>	1:25 (FBS 5%)	Thermo Fisher Scientific
MRP1 (<i>Homo sapiens</i>)	alx-801-007	<i>Rattus norvegicus</i>	1:40 (FBS 1%)	Enzo
MRP2 (<i>Homo sapiens</i>)	alx-801-016	<i>Mus musculus</i>	1:30 (FBS 1%)	Enzo
MRP3 (<i>Homo sapiens</i>)	ab3375	<i>Mus musculus</i>	1:50 (FBS 1%)	Abcam
MRP4 (<i>Homo sapiens</i>)	NB100-1471	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:100 (FBS 1%)	Novus
MRP5 (<i>Homo sapiens</i>)	AM31988SU-N	<i>Rattus norvegicus</i>	1:25 (PBS)	Acris
BCRP (<i>Homo sapiens</i>)	BXP-34	<i>Mus musculus</i>	1:50, triton X-100 0,1% (FBS 1%)	Sigma-Aldrich

FBS, fetal bovine serum; PBS, phosphate buffered saline.

3.11. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOHISTOQUÍMICA

Para el marcaje de proteínas por inmunohistoquímica (IHQ) en cortes de tejidos humanos se utilizaron las plataformas automatizadas Leica Bond III™ (A. Menarini Diagnostics) y BenchMark ULTRA® (Ventana Medical Systems) del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca. Se incluyeron 8 muestras de iCCA, 8 de eCCA y 5 de HCC, así como el tejido adyacente no tumoral en 14 de los CCA y todos

los HCC.

Las secciones de tejidos se incubaron con los anticuerpos primarios específicos (tabla MM-13) y, tras el lavado con “Bond Wash Solution”, con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa de rábano picante (*horseradish peroxidase* o HRP). Tras un segundo lavado con “Bond Wash Solution”, se incubó con diaminobenzidina (DAB) y se realizó una contratinción con hematoxilina. Por último, se llevó a cabo una deshidratación en alcoholes de gradación creciente, inmersión en xilol y montaje con “DEXPEX” (Merck).

Tabla MM-13. Anticuerpos primarios empleados para detectar proteínas por inmunohistoquímica.

Antígeno (especie)	Referencia	Especie huésped	Dilución	Casa comercial
MDR1 (<i>Homo sapiens</i>)	E1Y7B	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:50	Cell Signaling Technology
MRP1 (<i>Homo sapiens</i>)	sc-18835	<i>Mus musculus</i>	1:50	Santa Cruz
MRP2 (<i>Homo sapiens</i>)	ALX-801-037	<i>Mus musculus</i>	1:25	Enzo
MRP3 (<i>Homo sapiens</i>)	M0318	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:50	Sigma

3.12. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR FRACCIONAMIENTO DE FLUJO CAMPO-FLUJO ASIMÉTRICO (AF4)

El fraccionamiento de flujo campo-flujo asimétrico (*asymmetric flow field-flow fractionation* o AF4) es una técnica empleada para la separación y caracterización de partículas y polímeros dentro de un rango de 1 nm – 100 μm de diámetro (500 Da a $1 \cdot 10^{12}$ Da) (Schimpf *et al.*, 2000). Su principio de separación se basa en el perfil parabólico que muestran los flujos laminares al pasar por un canal largo y estrecho, lo cual organiza las partículas transportadas en la fase móvil en capas de diferente espesor y velocidad de flujo según su coeficiente de difusión en un determinado fluido (Wahlund & Giddings, 1987). Este flujo laminar se consigue gracias a la acción de un flujo cruzado perpendicular al canal que se opone al flujo de entrada. De esta forma, se consigue separar las partículas previamente concentradas en la parte inferior del canal según su tamaño y sin necesidad de una fase estacionaria. Esta ausencia de

interacción con una matriz inmóvil hace que el AF4 sea una técnica mucho más delicada con los analitos y muy apropiada para aplicaciones donde se requiere conservar la estructura de las partículas (Rambaldi *et al.*, 2011).

Al contrario que los sistemas tradicionales de fraccionamiento de flujo de campo (*flow-field fractionation* o FFF) (Giddings *et al.*, 1976), en el AF4 solo la pared inferior del canal es permeable a la fase móvil; suele estar constituida por una membrana con un corte de tamaño de partícula variable sobre una frita porosa de polimetilmetacrilato o cerámica (Wahlund & Giddings, 1987). La fase móvil y las partículas lo suficientemente pequeñas atravesarán el canal gracias a la fuerza del flujo cruzado, que las empuja hacia la membrana.

El proceso de AF4 consta de tres etapas (Wahlund & Giddings, 1987)(figura MM-2):

1. Inyección de la muestra. La muestra se inyecta a través de la válvula de inyección y entra en el canal. Las partículas aún están desorganizadas.
2. Focalización de la muestra. Se inicia mientras la muestra está siendo inyectada gracias a la acción de un flujo de focalización o *focus*. Entonces, las partículas de la muestra se concentran en la zona inicial del canal, en el punto donde el flujo de inyección o TIP (de las siglas en inglés *transporting injected particles*) se encuentra con el flujo *focus*. Este proceso puede llevar desde unos segundos hasta varios minutos. El flujo resultante de la combinación de los flujos TIP y *focus* abandona el canal a través de la membrana y la frita porosa **como "flujo cruzado"**. La otra corriente del flujo *focus* genera un flujo constante hacia los detectores y sale hacia el final del canal.
3. Elución de la muestra. Tras la focalización, las partículas se han organizado perpendicularmente según su tamaño en capas de distinto grosor. Durante la elución, el flujo *focus* se va reduciendo gradualmente hasta llegar a 0, mientras que el flujo TIP aumenta en paralelo para mantener el flujo del canal constante. Este flujo arrastra las partículas, de forma que las más pequeñas son las primeras en salir del canal, seguidas de otras de tamaño creciente. Los

parámetros que determinan el tiempo de retención (t_R) de las partículas se expresan en la siguiente fórmula (Wahlund & Giddings, 1987):

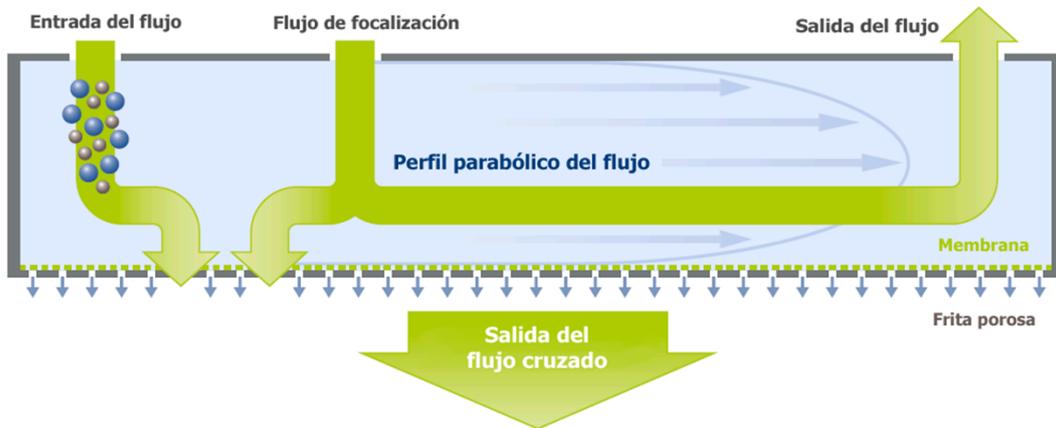
$$t_R = \frac{\omega^2}{6 \cdot D} \cdot \ln \left(1 + \frac{V_{cruzado}}{V_{canal}} \right)$$

, donde ω es la altura del canal [m], D es el coeficiente de difusión del analito [$m^2 \cdot s^{-1}$], $V_{cruzado}$ es el flujo cruzado [$L \cdot s^{-1}$] y V_{canal} es el flujo del canal [$L \cdot s^{-1}$].

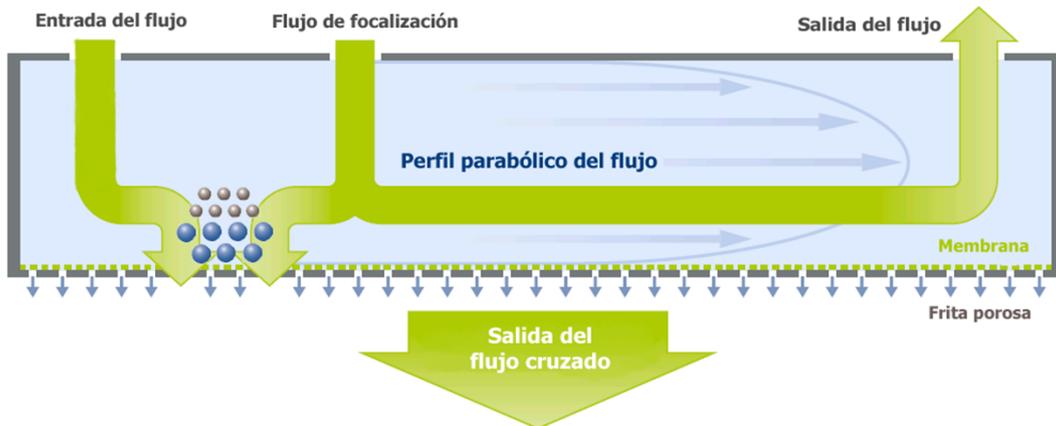
En general, la separación FFF puede diluir la muestra significativamente, lo que condiciona de forma considerable el rango inferior de detección. Durante la elución, la muestra se acerca a la membrana de acumulación, formándose dos capas: los primeros μm contienen muestra, mientras que los μm restantes contienen solo el eluyente. Al final del canal, ambas capas se mezclan. La tecnología “Smart Outlet Stream Splitting” (S3) divide el flujo a través del puerto de purga del canal, dirigiendo la muestra hacia el detector y eliminando el eluyente de la capa superior. Esto evita el efecto de dilución y mejora la sensibilidad de detección y la altura de pico usando la misma cantidad de inyección (Myeong HM *et al.*, 1997; Wahlund & Giddings, 1987).

En el apartado 4.2.3.B se detalla la puesta a punto del método empleado para la detección y el cambio de solvente en muestras proteicas en esta Tesis Doctoral.

1. Inyección de la muestra



2. Focalización de la muestra



3. Elución de la muestra



Figura MM-2. Principio de separación de partículas por fraccionamiento por flujo campo-flujo asimétrico (AF4). Ilustraciones adaptadas y traducidas al castellano con permiso de Postnova.

3.13. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

3.13.1. Cuantificación de ácidos nucleicos

Las muestras de ADN plasmídico y ARN total purificado se cuantificaron por espectrofotometría a una $\lambda 260$ nm en un NanoDrop™ 1000.

3.13.2. Cuantificación de proteínas

3.13.2.1. Cuantificación de proteína total

Para medir la concentración total de proteínas en homogenados de tejidos o células se utilizó una modificación del método de Lowry realizada por Markwell (Markwell *et al.*, 1978).

Las proteínas purificadas de *E. coli* se cuantificaron espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a $\lambda 280$ nm en un NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific).

3.13.2.2. Cuantificación de proteínas por proteómica triple X (TXP)

La TXP es una innovadora aproximación para la cuantificación de proteínas, basada en la proteólisis con tripsina de la muestra para reducir su complejidad y la posterior detección de los péptidos de interés resultantes mediante inmunoprecipitación, seguida de análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) (figura MM-3) (Poetz *et al.*, 2009).

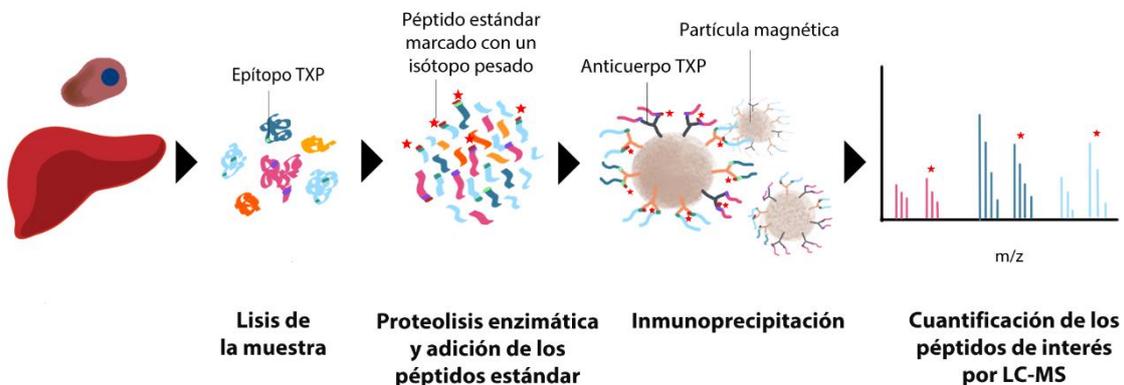


Figura MM-3. Flujo de trabajo en proteómica triple X. Este método se empleó para el análisis de distintas proteínas en muestras de tejido y líneas celulares.

El término TXP hace referencia al epítipo de cada péptido de interés, constituido por cuatro aminoácidos: tres de ellos (triple X) son variables y el restante es una arginina o lisina C-terminal. Debido a que los anticuerpos TXP se generan frente a estos **pequeños epítipos, presentan lo que se conoce como “especificidad de grupo peptídico”, pudiendo reconocer desde decenas hasta cientos de péptidos de un proteoma digerido** (Planatscher *et al.*, 2014; Poetz *et al.*, 2009). Esto les dota de una gran versatilidad y se reduce drásticamente el número de anticuerpos necesarios para el análisis. Así, la técnica TXP tiene especial interés en el estudio de proteínas homólogas, como es el caso de los transportadores de eflujo de la familia ABC (Weiß *et al.*, 2018).

Antes de la inmunoprecipitación, la muestra completamente tripsinizada se mezcla con los péptidos estándar etiquetados con isótopos estables o péptidos pesados (SIS), que se diferenciarán por peso molecular de los correspondientes péptidos endógenos o péptidos ligeros (EN) en el LC-MS y se emplearán como referencia para la cuantificación.

Los análisis con esta técnica han sido desarrollados con los especialistas y en las instalaciones de Signatope GmbH, ubicada en el Natural and Medical Sciences Institute (NMI) en la Universidad de Tübingen (Reutlingen, Alemania) durante mi estancia predoctoral.

I. Soluciones empleadas

ABCC: 50 mM bicarbonato de amonio (ABC), 0,03 % (w/v) CHAPS (3-((3-colamidopropil)dimetilamonio)-1-propanosulfonato) en H₂O desionizada, pH 7,4

Anticuerpos TXP: suero generado en Pineda Antikörper Service (Berlín, Alemania), anticuerpos purificados en Signatope GmbH

Benzonasa: Merck

FA: 1% ácido fórmico en H₂O desionizada

Fase móvil A: 0,1% ácido fórmico, H₂O grado LC-MS

Fase móvil B: 80% acetonitrilo, 0,1% ácido fórmico y H₂O grado LC-MS

IAA: 0,5 M yodoacetamida en H₂O desionizada

MATERIALES Y MÉTODOS

PBSC: solución de PBS 10x, 0,03 % (w/v) CHAPS en H₂O desionizada

Péptidos estándar sintéticos: INTAVIS Peptide Services (Tübingen, Alemania)

PMSE: 200 mM PMSF en etanol (grado LC-MS)

Reactivo de bloqueo para ELISA (EBR): Roche

Tampón de lisis: 1 % (w/v) NP-40, 0,01 % (v/v) SDS, 0,15 M NaCl, 0,01 M Na₂HPO₄·2·H₂O, 2 mM EDTA en H₂O desionizada, pH 7,2

TCEP: 0,1 M tris(2-carboxietil)fosfina en H₂O desionizada

TEA: 200 mM clorhidrato de trietanolamina en H₂O desionizada, pH 8,5

Tripsina: 1 mg/ mL tripsina (Thermo Fisher Scientific) resuspendida en 50 mM de ácido acético

II. Lisis

Los pellets procedentes de cultivos celulares ([apartado 3.2.1.](#)) se trataron con un tampón de lisis al que se añadió benzonasa para degradar los ácidos nucleicos.

En el caso de los tejidos (30-50 mg por muestra, [apartado 3.1.1.](#)), se mantuvieron congelados en nitrógeno líquido (-196°C) y fueron homogeneizados durante 1 min 50 s a 2000 rpm con el equipo Mikrodismembrator U de Sartorius (Goettingen, Alemania). Después, se lisaron como se ha indicado anteriormente. La disponibilidad de muestras de tejido para estos ensayos fue limitada, y se incluyeron 8 y 7 muestras de tejido hepático adyacente al tumor procedentes de los pacientes con HCC e iCCA, respectivamente, y 8 muestras de tejido de cada tipo de tumor (HCC e iCCA).

III. Cuantificación de proteína total

La valoración del contenido proteico total se realizó siguiendo las instrucciones **del proveedor del kit "Pierce™ BCA Protein Assay" (Thermo Fisher Scientific).**

IV. Proteólisis enzimática

Se tomaron 130 µg de muestra y se aplicó el siguiente protocolo para su digestión:

- a) Dilución de la muestra en TEA y tampón de lisis.

- b) Desnaturalización de las proteínas por calor. Las muestras se incubaron durante 5 min a 99°C y 650 rpm en un bloque térmico Thermomixer comfort de Eppendorf (Hamburgo, Alemania). Después, se añadió TCEP, un agente reductor que rompe los puentes disulfuro de las proteínas.
- c) Alquilación. La IAA es un agente alquilante que impide que los puentes disulfuro vuelvan a formarse, aumentando la eficacia de la digestión. Tras añadir IAA a las muestras, se realizó una incubación durante 30 min a 22°C y 650 rpm en oscuridad en un bloque térmico Thermomixer C (Eppendorf).
- d) Proteólisis con tripsina. Se añadió tripsina en proporción 1:35 (tripsina:proteínas en la muestra) y la mezcla se incubó durante 16 h a 37°C y 650 rpm en un bloque térmico Thermomixer C (Eppendorf).
- e) Inactivación de la tripsina. Transcurridas las 16 h de proteólisis, se inhibió la tripsina con PMSF y las muestras fueron distribuidas en placas de 96 pocillos para la inmunoprecipitación y almacenadas a -80°C tras sellarlas térmicamente.

V. Inmunoprecipitación

Se tomaron las placas de 96 pocillos con las muestras y se diluyeron en PBSC. Después, se añadió la mezcla de SIS preparada en EBR, así como la mezcla con los anticuerpos TXP correspondientes. En paralelo, se hizo una recta patrón con los EN y las mezclas de SIS y anticuerpos anteriores. Las perlas magnéticas empleadas fueron **“Pierce™ Protein A/G” (Thermo Fisher Scientific)**.

Los pasos de mezcla de la muestra con las mezclas de SIS y anticuerpos (1 h), incubación de la muestra con las perlas magnéticas (1 h), lavados (cinco en total, 4 min 30 s cada uno) y elución (4 min 30 s) se realizaron de manera automática con un procesador de partículas magnéticas King Fisher™ (Thermo Fisher Scientific).

Los dos primeros lavados se realizaron en PBSC y los tres siguientes en ABCC. Los complejos de proteína G-anticuerpos TXP-péptidos **se eluyeron en 20 µL de FA al 1%**. Finalmente, estos eluidos se separaron de los restos de perlas magnéticas con un imán y se transfirieron a una nueva placa recubierta de vidrio y con tapa de silicona para su análisis en el LC-MS/MS.

VI. Análisis por LC-MS

El eluido obtenido tras la inmunoprecipitación se separó por cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC). Se empleó una precolumna para eliminar las sales y anticuerpos de la muestra.

La cromatografía consistió en un método de captura de 0,15 min con un flujo de 150 μL / min, seguido de un método de separación de los péptidos con un gradiente del 8% al 50% de fase móvil B en 3 min en una columna Acclaim Pepmap RSLC C18 (75 μm de DI \times 150 mm, 3 μm , Thermo Fisher Scientific) con el sistema UltiMate™ 3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific). Después, se aplicó un lavado y equilibrado durante 2 min, con un flujo de 1,5 $\mu\text{L}/\text{min}$. La detección por espectrometría de masas se realizó utilizando un espectrómetro de masas QExactive Plus™ (Thermo Fisher Scientific).

Se empleó el software Xcalibur™ (Thermo Fisher Scientific) para el control del equipo. La integración de los picos se realizó con TraceFinder™ (Thermo Fisher Scientific) y estos datos fueron procesados en Excel con un script desarrollado por el equipo de Signatope.

3.13.3. Determinación de la fluorescencia

La fluorescencia en medio de cultivo de células HEK293T transducidas con lentivirus AFPsp-Tat-tdTomato y AFPsp-tdTomato-Tat se determinó en un fluorímetro Hitachi F-4010 a λ de excitación 554 nm y λ de emisión 581 nm, utilizando como blanco medio de cultivo fresco.

3.13.4. Cuantificación del crecimiento bacteriano

Para controlar el crecimiento bacteriano en el medio de cultivo durante la fase exponencial, se realizaron medidas de la absorbancia a λ 600 nm en un espectrofotómetro Hitachi U-2000 (Grupo Taper), utilizando como blanco el medio de cultivo fresco.

3.13.5. Determinación de la viabilidad celular

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

3.14. MÉTODOS COMUNES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.14.1. Soluciones empleadas de uso común en varias técnicas

Tampón TAE pH 8,3: 40 mM Tris base, 1 mM EDTA y 20 mM ácido acético

Tampón TE pH 8,0: 10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA

3.14.2. PCR de alta fidelidad

La PCR de alta fidelidad se llevó a cabo con la Taq polimerasa de Biotools o con el kit **"AccuPrime Pfx SuperMix" (Thermo Fisher Scientific)** siguiendo las instrucciones del proveedor.

3.14.3. Electroforesis en geles de agarosa no desnaturalizante

Para preparar los geles de agarosa se mezcló tampón TAE con 1-2% de agarosa (p/v), dependiendo del tamaño de los amplicones a analizar. Se llevó la mezcla a ebullición para suspender la agarosa y se añadió SYBR Green I para visualizar el ADN por fluorescencia. El resultado de la electroforesis se visualizó en un equipo de análisis de imagen LAS-4000.

3.14.4. Purificación de ADN genómico

El ADN genómico de células se purificó con el kit **"QIAamp DNA Mini" (Qiagen)** siguiendo las instrucciones del proveedor.

3.14.5. Purificación del ADN contenido en geles de agarosa y de reacciones enzimáticas

Tras su visualización, en ocasiones fue necesario recuperar el producto de PCR separado por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión (*low melting*). Para ello, se cortó el fragmento del gel que contenía la banda de ADN de interés. Se usó el kit "illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification" (GE Healthcare) para extraer y purificar el ADN siguiendo las instrucciones del proveedor.

3.14.6. Digestión con enzimas de restricción

El ADN se mezcló con el tampón de reacción adecuado para la enzima usada, la **enzima de restricción (5 U/ μ g de ADN) y agua ultrapura. Cuando la casa comercial lo recomendaba, también se añadía albúmina bovina sérica al 1% a la mezcla. La reacción de restricción se incubó 3 h a 37°C para enzimas clásicas o 20 min a 37°C para las **enzimas "Fast Digest™"**. Los fragmentos de ADN se separaron para su análisis por electroforesis en un gel de agarosa.**

3.14.7. Secuenciación de ADN

La identidad de los plásmidos clonados y de los productos de PCR se estudió mediante secuenciación de terminación de la cadena de tipo Sanger en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca.

Para la detección de mutaciones en los dos alelos de los genes silenciados por CRISPR/Cas9, en algunos casos se envió una mezcla en agua ultrapura de 50 ng del exón diana amplificado por PCR a partir de ADN genómico ([apartado 3.14.4.](#)) y 3,3 pmol del *primer forward* específico empleado para la PCR (tabla MM-4).

3.15. ESTUDIOS *IN SILICO* PARA LA CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS

Las características fisicoquímicas de las proteínas de interés producidas en *E.coli* se determinaron con la herramienta gratuita *online* IPC 2.0 (Kozlowski, 2021).

La herramienta gratuita *online* [Phyre2](#) se empleó para predecir la estructura de las proteínas silenciadas por tecnología CRISPR/Cas9, tanto en su forma completa como truncada. Las estructuras generadas y los archivos del Protein Data Bank se visualizaron con el *software* Chimera 1.14.

3.16. ANÁLISIS Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para la determinación de la significación estadística (p) se aplicó la prueba *t* de valores pareados o no pareados según correspondía. En los casos donde se compararon tres o más grupos, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para valores pareados o no, cuya significación fue corregida por el test de Bonferroni para comparaciones múltiples.

El tratamiento de los datos para ambos estudios fue realizado con los programas Excel de Microsoft Office y GraphPad Prism 6.

El análisis y la creación de mapas dosis-respuesta con los resultados de mortalidad para distintas combinaciones de fármacos se realizó en RStudio con el programa SynergyFinder 2.0.

CAPÍTULO I: PAPEL DE LAS
PROTEÍNAS ABC EN LA
FARMACORRESISTENCIA Y
UTILIDAD COMO DIANAS
FARMACOLÓGICAS EN HCC

CAPÍTULO II: PAPEL DE LAS
PROTEÍNAS ABC EN LA
FARMACORRESISTENCIA DEL
CCA Y DESARROLLO DE
TERAPIAS BIOLÓGICAS PARA
SU SUPERACIÓN

5. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN PRIMERA:

El patrón de expresión de bombas de expulsión de fármacos en carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma, a pesar de presentar una notable variabilidad interindividual, se caracteriza por la elevada expresión de MDR1, MRP1, MRP4, MRP5 y BCRP en el primero, y MDR1, MRP1 y MRP3 en el segundo. Este fenotipo podría estar implicado en la resistencia intrínseca de los tumores hepáticos a fármacos que son sustratos de estas bombas de la superfamilia ABC y señala a estas proteínas como potenciales dianas en el desarrollo de nuevas estrategias para mejorar la respuesta al tratamiento farmacológico.

CONCLUSIÓN SEGUNDA:

Los fármacos de primera línea empleados en el tratamiento del carcinoma hepatocelular, es decir, el sorafenib, y del colangiocarcinoma, esto es, el cisplatino y la gemcitabina, inducen la expresión de proteínas ABC, especialmente de MRP1, MRP2 y BCRP, en células Alexander derivadas de carcinoma hepatocelular. Esto puede aumentar su capacidad exportadora y, por lo tanto, su farmacoresistencia. Por el contrario, el tratamiento con estos fármacos de células TFK-1 derivadas de colangiocarcinoma reduce, mediante un mecanismo independiente de los factores de transcripción SOX2, SOX9 y SOX17, la expresión de MRP1 y MRP2, lo que limita su capacidad de expulsar los sustratos de estas bombas.

CONCLUSIÓN TERCERA:

La edición génica mediante tecnología CRISPR/Cas9 ha permitido desarrollar modelos celulares monoclonales de células Alexander con anulación de la expresión funcional de MRP1, MRP2, MRP4 y MRP5, que se han revelado como herramientas útiles en la determinación de la capacidad de distintos fármacos para interactuar con estas bombas.

CONCLUSIÓN CUARTA:

Utilizando los modelos celulares de silenciamiento estable de la expresión de bombas de la familia MRP, se ha podido demostrar que los fármacos inhibidores de receptores con actividad tirosina quinasa (TKIs) tivozanib, ponatinib y lenvatinib son capaces de inhibir el transporte mediado por las bombas MRP1 y MRP2; que el

sorafenib inhibe el transporte mediado por MRP4 y MRP5; y que el regorafenib inhibe selectivamente MRP5. Esta capacidad de los TKIs podría aumentar la concentración intracelular de fármacos expulsados por estas proteínas, lo que sugiere su potencial utilidad en terapias combinadas para superar la resistencia a otros agentes antitumorales.

CONCLUSIÓN QUINTA:

Se ha puesto a punto un método para la expresión y purificación de proteínas en bacterias *E. coli* de la cepa BL21(DE3) mediante el uso de columnas de afinidad de Ni-NTA y el método de fraccionamiento de flujo campo-flujo asimétrico (AF4), que ha permitido obtener las proteínas recombinantes Tat-CAT y Tat-SOX17.

CONCLUSIÓN SEXTA:

La presencia del péptido Tat en las proteínas Tat-CAT y Tat-SOX17 les confiere la capacidad de atravesar la membrana plasmática de las células de mamífero en cultivo. Además, la presencia de SOX17 en la proteína Tat-SOX17 le otorga la propiedad de alcanzar el núcleo celular.

CONCLUSIÓN SÉPTIMA:

Mediante la transducción con lentivirus portadores de la secuencia codificante de interés se han generado líneas celulares estables derivadas de células embrionarias de riñón (HEK293T) capaces de sintetizar y secretar al medio de cultivo la proteína AFPsp-SOX17-Tat_R.

CONCLUSIÓN OCTAVA:

El tratamiento de células de colangiocarcinoma con la proteína AFPsp-SOX17-Tat_R producida y secretada por las células manipuladas a tal fin, consigue aumentar los niveles del supresor tumoral SOX17 en el núcleo y alterar la expresión génica de las células receptoras. Esta estrategia podría ser la base para el desarrollo de una nueva terapia celular adoptiva adyuvante, por ejemplo, frente a tumores con baja expresión de SOX17 como el colangiocarcinoma.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, H., Tochio, N., Miyamoto, K., Koshihara, S., Inoue, M., Kigawa, T., & Yokoyama, S. (n.d.). Solution structure of the HMG box of human Transcription factor SOX-17. *TO BE PUBLISHED*. <https://doi.org/10.2210/PDB2YUL/PDB>
- Abou-Alfa, G., Shi, Q., Knox, J. J., Kaubisch, A., Niedzwiecki, D., Posey, J., Tan, B. R., Kavan, P., Goel, R., Lammers, P. E., Bekaii-Saab, T. S., Tam, V. C., Rajdev, L., Kelley, R. K., el Dika, I., Zemla, T., Potaracke, R. I., Balletti, J., El-Khoueiry, A. B., ... Venook, A. P. (2019a). Assessment of Treatment With Sorafenib Plus Doxorubicin vs Sorafenib Alone in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma: Phase 3 CALGB 80802 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology*, 5(11), 1582–1588. <https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2019.2792>
- Abou-Alfa, G., Shi, Q., Knox, J., Kaubisch, A., Niedzwiecki, D., Posey, J., Benjamin R Tan, Brj., Kavan, P., Goel, R., Lammers, P., Bekaii-Saab, T., Tam, V., Rajdev, L., Kelley, R., Dika, I., Zemla, T., Potaracke, R., Balletti, J., El-Khoueiry, A., ... Venook, A. (2019b). ClarIDHy: a global, phase III, randomized, double-blind study of ivosidenib (IVO) vs placebo in patients with advanced cholangiocarcinoma (CC) with an. *JAMA Oncol.*, 5(11), 1582–1588. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.2792>.
- Adachi, T., Nakagawa, H., Hagiya, Y., Yasuoka, T., & Ishikawa, T. (2009). Transport-metabolism interplay: LXRalpha-mediated induction of human ABC transporter ABCC2 (cMOAT/MRP2) in HepG2 cells. *Molecular Pharmaceutics*, 6(6), 1678–1688. <https://doi.org/10.1021/MP9001156>
- Agarwal, S., Sane, R., Ohlfest, J. R., & Elmquist, W. F. (2011). The role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in the distribution of sorafenib to the brain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 336(1), 223–233. <https://doi.org/10.1124/JPET.110.175034>
- Agrawal, P., Bhalla, S., Usmani, S. S., Singh, S., Chaudhary, K., Raghava, G. P. S., & Gautam, A. (2016). CPPsite 2.0: a repository of experimentally validated cell-penetrating peptides. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1098–D1103. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV1266>
- Allen, J., Brinkhuis, R., Deemter, L., Wijnholds, J., & Schinkel, A. (2000). Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and Mrp1 to basal drug resistance - PubMed. *Cancer Res*, 60(20), 5761–5766. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11059771/>
- Al-Shammari, A. H., Masuo, Y., Fujita, K. ichi, Yoshikawa, Y., Nakamichi, N., Kubota, Y., Sasaki, Y., & Kato, Y. (2019). Influx and Efflux Transporters Contribute to the Increased Dermal Exposure to Active Metabolite of Regorafenib After Repeated Oral Administration in Mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108(6), 2173–2179. <https://doi.org/10.1016/J.XPHS.2019.01.018>
- Amare, G. G., Meharie, B. G., & Belayneh, Y. M. (2021). A drug repositioning success: The repositioned therapeutic applications and mechanisms of action of thalidomide. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 27(3), 673–678. <https://doi.org/10.1177/1078155220975825>

- Amawi, H., Sim, H. M., Tiwari, A. K., Ambudkar, S. v., & Shukla, S. (2019). ABC Transporter-Mediated Multidrug-Resistant Cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1141, 549–580. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7647-4_12
- Amponsah, P. S., Fan, P., Bauer, N., Zhao, Z., Gladkich, J., Fellenberg, J., & Herr, I. (2017). microRNA-210 overexpression inhibits tumor growth and potentially reverses gemcitabine resistance in pancreatic cancer. *Cancer Letters*, 388, 107–117. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2016.11.035>
- Anwanwan, D., Singh, S. K., Singh, S., Saikam, V., & Singh, R. (2020). Challenges in liver cancer and possible treatment approaches. *Biochimica et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, 1873(1), 188314. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2019.188314>
- Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G., & Muzio, L. Io. (2017). The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 40(2), 271. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2017.3036>
- Ashburn, T. T., & Thor, K. B. (2004). Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 3(8), 673–683. <https://doi.org/10.1038/NRD1468>
- Assem, M., Schuetz, E. G., Leggas, M., Sun, D., Yasuda, K., Reid, G., Zelcer, N., Adachi, M., Strom, S., Evans, R. M., Moore, D. D., Borst, P., & Schuetz, J. D. (2004). Interactions between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(21), 22250–22257. <https://doi.org/10.1074/JBC.M314111200>
- Asukai, K., Kawamoto, K., Eguchi, H., Konno, M., Asai, A., Iwagami, Y., Yamada, D., Asaoka, T., Noda, T., Wada, H., Gotoh, K., Nishida, N., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., & Ishii, H. (2017). Micro-RNA-130a-3p Regulates Gemcitabine Resistance via PPARγ in Cholangiocarcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, 24(8), 2344–2352. <https://doi.org/10.1245/S10434-017-5871-X>
- Attallah, C., Etcheverrigaray, M., Kratje, R., & Oggero, M. (2017). A highly efficient modified human serum albumin signal peptide to secrete proteins in cells derived from different mammalian species. *Protein Expression and Purification*, 132, 27–33. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2017.01.003>
- Ayuso, C., Rimola, J., Vilana, R., Burrel, M., Darnell, A., García-Criado, A., Bianchi, L., Belmonte, E., Caparroz, C., Barrufet, M., Bruix, J., & Brú, C. (2018). Diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma (HCC): current guidelines. *European Journal of Radiology*, 101, 72–81. <https://doi.org/10.1016/J.EJRAD.2018.01.025>
- Bae, S. H., D’Cunha, R., Shao, J., & An, G. (2018). Effect of 5,7-dimethoxyflavone on Bcrp1-mediated transport of sorafenib in vitro and in vivo in mice. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 117, 27–34. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2018.02.004>**
- Bakos, É., Hegedüs, T., Holló, Z., Welker, E., Tusnády, G. E., Zaman, G. J. R., Flens, M. J., Váradi, A., & Sarkadi, B. (1996). Membrane topology and glycosylation of the human multidrug

- resistance-associated protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(21), 12322–12326. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.21.12322>
- Banales, J. M., Cardinale, V., Carpino, G., Marzioni, M., Andersen, J. B., Invernizzi, P., Lind, G. E., Folseraas, T., Forbes, S. J., Fouassier, L., Geier, A., Calvisi, D. F., Mertens, J. C., Trauner, M., **Benedetti, A., Maroni, L., Vaquero, J., Macias, R. I. R., Raggi, C., ...** Alvaro, D. (2016). Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 13(5), 261–280. <https://doi.org/10.1038/NGASTRO.2016.51>
- Banales, J. M., Marin, J. J. G., Lamarca, A., Rodrigues, P. M., Khan, S. A., Roberts, L. R., Cardinale, V., Carpino, G., Andersen, J. B., Braconi, C., Calvisi, D. F., Perugorria, M. J., Fabris, L., Boulter, L., Macias, R. I. R., **Gaudio, E., Alvaro, D., Gradilone, S. A., Strazzabosco, M., ...** Gores, G. J. (2020). Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 17(9), 557–588. <https://doi.org/10.1038/S41575-020-0310-Z>
- Bangru, S., & Kalsotra, A. (2020). Cellular and molecular basis of liver regeneration. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 100, 74–87. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.12.004>
- Basu, K., Green, E. M., Cheng, Y., & Craik, C. S. (2019). Why recombinant antibodies — benefits and applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 60, 153. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2019.01.012>
- Benedetti, A., Bassotti, C., Rapino, K., Marucci, L., & Jezequel, A. M. (1996). A morphometric study of the epithelium lining the rat intrahepatic biliary tree. *Journal of Hepatology*, 24(3), 335–342. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(96\)80014-6](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(96)80014-6)
- Ben-Moshe, S., & Itzkovitz, S. (2019). Spatial heterogeneity in the mammalian liver. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 16(7), 395–410. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0134-x>
- Beretta, G. L., Cassinelli, G., Pennati, M., Zuco, V., & Gatti, L. (2017). Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: The dual role of tyrosine kinase inhibitors as multitargeting agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 142, 271–289. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2017.07.062>
- Bergman, A. M., Pinedo, H. M., Talianidis, I., Veerman, G., Loves, W. J. P., van der Wilt, C. L., & Peters, G. J. (2003). Increased sensitivity to gemcitabine of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein-overexpressing human cancer cell lines. *British Journal of Cancer*, 88(12), 1963–1970. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJC.6601011>
- Beumer-Chuwonpad, A., Taggenbrock, R. L. R. E., Ngo, T. A., & van Gisbergen, K. P. J. M. (2021). The Potential of Tissue-Resident Memory T Cells for Adoptive Immunotherapy against Cancer. *Cells*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/CELLS10092234>
- Biswas, T., Houghton, J. L., Garneau-Tsodikova, S., & Tsodikov, O. V. (2012). The structural basis for substrate versatility of chloramphenicol acetyltransferase CAT(I). *Protein Sci.*, 21, 520–530. <https://doi.org/10.2210/PDB3U9F/PDB>

- Bohan, A., Chen, W. S., Denson, L. A., Held, M. A., & Boyer, J. L. (2003). Tumor necrosis factor alpha-dependent up-regulation of Lrh-1 and Mrp3(Abcc3) reduces liver injury in obstructive cholestasis. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(38), 36688–36698. <https://doi.org/10.1074/JBC.M304011200>
- Boisguérin, P., Covinhes, A., Gallot, L., Barrère, C., Vincent, A., Busson, M., Piot, C., Nargeot, J., Lebleu, B., & Barrère-Lemaire, S. (2020). A novel therapeutic peptide targeting myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, *116*(3), 633–644. <https://doi.org/10.1093/CVR/CVZ145>
- Bonin, S., Pascolo, L., Crocé, L. S., Stanta, G., & Tiribelli, C. (2002). Gene expression of ABC proteins in hepatocellular carcinoma, perineoplastic tissue, and liver diseases. *Molecular Medicine*, *8*(6), 318. <https://doi.org/10.1007/bf03402158>
- Borger, D. R., Tanabe, K. K., Fan, K. C., Lopez, H. U., Fantin, V. R., Straley, K. S., Schenkein, D. P., Hezel, A. F., Ancukiewicz, M., Liebman, H. M., Kwak, E. L., Clark, J. W., Ryan, D. P., Deshpande, V., Dias-Santagata, D., Ellisen, L. W., Zhu, A. X., & Iafrate, A. J. (2012). Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping. *The Oncologist*, *17*(1), 72–79. <https://doi.org/10.1634/THEONCOLOGIST.2011-0386>
- Boron, W. F., & Boulpaep, E. L. (2017). *Fisiología médica* (W. Boron & E. Boulpaep, Eds.; 3^a edición). Elsevier.
- Borrelli, A., Tornesello, A. L., Tornesello, M. L., & Buonaguro, F. M. (2018). Cell Penetrating Peptides as Molecular Carriers for Anti-Cancer Agents. *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, *23*(2). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23020295>
- Boss, M. K., Ke, Y., Bian, L., Harrison, L. G., Lee, B. I., Prebble, A., Martin, T., Trageser, E., Hall, S., Wang, D. D., Wang, S., Chow, L., Holwerda, B., Raben, D., Regan, D., Karam, S. D., Dow, S., Young, C. D., & Wang, X. J. (2021). Therapeutic Intervention Using a Smad7-Based Tat Protein to Treat Radiation-Induced Oral Mucositis. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. <https://doi.org/10.1016/J.IJROBP.2021.09.039>
- Botrugno, O. A., Fayard, E., Annicotte, J. S., Haby, C., Brennan, T., Wendling, O., Tanaka, T., Kodama, T., Thomas, W., Auwerx, J., & Schoonjans, K. (2004). Synergy between LRH-1 and beta-catenin induces G1 cyclin-mediated cell proliferation. *Molecular Cell*, *15*(4), 499–509. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2004.07.009>
- Boulter, L., Guest, R. v., Kendall, T. J., Wilson, D. H., Wojtacha, D., Robson, A. J., Ridgway, R. A., Samuel, K., van Rooijen, N., Barry, S. T., Wigmore, S. J., Sansom, O. J., & Forbes, S. J. (2015). WNT signaling drives cholangiocarcinoma growth and can be pharmacologically inhibited. *The Journal of Clinical Investigation*, *125*(3), 1269–1285. <https://doi.org/10.1172/JCI76452>
- Bridgewater, J., Galle, P. R., Khan, S. A., Llovet, J. M., Park, J. W., Patel, T., Pawlik, T. M., & Gores, G. J. (2014). Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Journal of Hepatology*, *60*(6), 1268–1289. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2014.01.021>

- Brooks, H., Lebleu, B., & Vivès, E. (2005). Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(4), 559–577. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2004.12.001>
- Brózik, A., Hegedüs, C., Erdei, Z., Hegedüs, T., Özvegy-Laczka, C., Szakács, G., & Sarkadi, B. (2011). Tyrosine kinase inhibitors as modulators of ATP binding cassette multidrug transporters: substrates, chemosensitizers or inducers of acquired multidrug resistance? *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 7(5), 623–642. <https://doi.org/10.1517/17425255.2011.562892>
- Burak, K., Angulo, P., Pasha, T. M., Egan, K., Petz, J., & Lindor, K. D. (2004). Incidence and risk factors for cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *The American Journal of Gastroenterology*, 99(3), 523–526. <https://doi.org/10.1111/J.1572-0241.2004.04067.X>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Canet, M. J., Merrell, M. D., Harder, B. G., Maher, J. M., Wu, T., Lickteig, A. J., Jackson, J. P., Zhang, D. D., Yamamoto, M., & Cherrington, N. J. (2015). Identification of a functional antioxidant response element within the eighth intron of the human ABCC3 gene. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 43(1), 93–99. <https://doi.org/10.1124/DMD.114.060103>
- Cardinale, V., Wang, Y., Carpino, G., Reid, L. M., Gaudio, E., & Alvaro, D. (2012). Mucin-producing cholangiocarcinoma might derive from biliary tree stem/progenitor cells located in peribiliary glands. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 55(6), 2041–2042. <https://doi.org/10.1002/HEP.25587>
- Carpino, G., Cardinale, V., Renzi, A., Hov, J. R., Berloco, P. B., Rossi, M., Karlsen, T. H., Alvaro, D., & Gaudio, E. (2015). Activation of biliary tree stem cells within peribiliary glands in primary sclerosing cholangitis. *Journal of Hepatology*, 63(5), 1220–1228. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2015.06.018>
- Ceckova, M., Vackova, Z., Radilova, H., Libra, A., Buncek, M., & Staud, F. (2008). Effect of ABCG2 on cytotoxicity of platinum drugs: interference of EGFP. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 22(8), 1846–1852. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2008.09.001>
- Center for Drug Evaluation and Research, U. F. and D. A. H. P. (2017a, September 22). *FDA grants accelerated approval to nivolumab for HCC previously treated with sorafenib* | FDA. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-nivolumab-hcc-previously-treated-sorafenib>
- Center for Drug Evaluation and Research, U. F. and D. A. H. Page. (2017b, April 27). *Approved Drugs - Regorafenib*. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/regorafenib>
- Center, M., & Jemal, A. (2011). International trends in liver cancer incidence rates. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for*

- Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 20(11), 2362–2368. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-11-0643>
- Chalasanani, N., Baluyut, A., Ismail, A., Zaman, A., Sood, G., Ghalib, R., McCashland, T. M., Rajender Reddy, K., Zervos, X., Anbari, M. A., & Hoen, H. (2000). Cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis: a multicenter case-control study. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 31(1), 7–11. <https://doi.org/10.1002/HEP.510310103>
- Chan, L. M. S., Lowes, S., & Hirst, B. H. (2004). The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 21(1), 25–51. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2003.07.003>
- Chelly, J., Kaplan, J. C., Maire, P., Gautron, S., & Kahn, A. (1988). Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. *Nature*, 333(6176), 858–860. <https://doi.org/10.1038/333858a0>
- Chen, L., Yang, Z., Cao, Y., Hu, Y., Bao, W., Wu, D., Hu, L., Xie, J., & Yu, H. (2021). Pan-cancer analysis and single-cell analysis revealed the role of ABCC5 transporter in hepatocellular carcinoma. *Channels (Austin, Tex.)*, 15(1), 541–554. <https://doi.org/10.1080/19336950.2021.1968592>
- Chen, M., Xue, X., Wang, F., An, Y., Tang, D., Xu, Y., Wang, H., Yuan, Z., Gao, W., Wei, J., Zhang, J., & Miao, Y. (2012). Expression and promoter methylation analysis of ATP-binding cassette genes in pancreatic cancer. *Oncology Reports*, 27(1), 265–269. <https://doi.org/10.3892/OR.2011.1475>
- Chen, Q., Meng, F., Wang, L., Mao, Y., Zhou, H., Hua, D., Zhang, H., & Wang, W. (2017). A polymorphism in ABCC4 is related to efficacy of 5-FU/capecitabine-based chemotherapy in colorectal cancer patients. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-07491-3>
- Chen, Q., Zhou, J., Jiang, C., & Chen, J. (2010). Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in SGC7901/VCR cells by PPAR γ activation by troglitazone. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences = Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ying De Wen Ban = Huazhong Keji Daxue Xuebao. Yixue Yingdewen Ban*, 30(3), 326–331. <https://doi.org/10.1007/S11596-010-0351-6>
- Chen, W., Cai, S. Y., Xu, S., Denson, L. A., Soroka, C. J., & Boyer, J. L. (2007). Nuclear receptors RXR α :RAR α are repressors for human MRP3 expression. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(5), G1221. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00191.2006>
- Chen, Y., Chen, P., Lin, P., Hsiao, Y., & Chu, P. (2016, June). ABCG2 Overexpression Confers Poor Outcomes in Hepatocellular Carcinoma of Elderly Patients - PubMed. *Anticancer Res.*, 2983–2988. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27272814/>
- Chen, Y., E, C. Y., Gong, Z. W., Liu, S., Wang, Z. X., Yang, Y. S., & Zhang, X. W. (2018). Chimeric antigen receptor-engineered T-cell therapy for liver cancer. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International : HBPD INT*, 17(4), 301–309. <https://doi.org/10.1016/J.HBPD.2018.05.005>

- Chen, Z., Huang, C., Ma, T., Jiang, L., Tang, L., Shi, T., Zhang, S., Zhang, L., Zhu, P., Li, J., & Shen, A. (2018). Reversal effect of quercetin on multidrug resistance via FZD7/ β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma cells. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 43, 37–45. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2018.03.040>
- Cheng, A. L., Kang, Y. K., Chen, Z., Tsao, C. J., Qin, S., Kim, J. S., Luo, R., Feng, J., Ye, S., Yang, T. S., Xu, J., Sun, Y., Liang, H., Liu, J., Wang, J., Tak, W. Y., Pan, H., Burock, K., Zou, J., ... Guan, Z. (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. *The Lancet. Oncology*, 10(1), 25–34. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70285-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70285-7)
- Chikazawa, N., Tanaka, H., Tasaka, T., Nakamura, M., Tanaka, M., Onichi, H., & Katano, M. (2010). Inhibition of Wnt signaling pathway decreases chemotherapy-resistant side-population colon cancer cells - PubMed. *Anticancer Res*, 30(6), 2041–2048. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20651349/>
- Choi, J., Zielke, C., Nilsson, L., & Lee, S. (2017). Characterization of the molar mass distribution of macromolecules in beer for different mashing processes using asymmetric flow field-flow fractionation (AF4) coupled with multiple detectors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(19), 4551–4558. <https://doi.org/10.1007/S00216-017-0393-8>
- Chong, C. R., & Sullivan, D. J. (2007). New uses for old drugs. *Nature*, 448(7154), 645–646. <https://doi.org/10.1038/448645A>
- Cirqueira, C. S., Felipe-Silva, A. S., Wakamatsu, A., Marins, L. V., Rocha, E. C., de Mello, E. S., & Alves, V. A. F. (2019). Immunohistochemical Assessment of the Expression of Biliary Transportation Proteins MRP2 and MRP3 in Hepatocellular Carcinoma and in Cholangiocarcinoma. *Pathology Oncology Research: POR*, 25(4), 1363–1371. <https://doi.org/10.1007/S12253-018-0386-8>
- Clements, O., Eliahoo, J., Kim, J. U., Taylor-Robinson, S. D., & Khan, S. A. (2020). Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Hepatology*, 72(1). <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2019.09.007>
- Cole, S. P. C., Sparks, K. E., Fraser, K., Loe, D. W., Grant, C. E., Wilson, G. M., & Deeley, R. G. (1994). Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Research*, 54(22), 5902–5910. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7954421/>
- Conlon, K. C., Miljkovic, M. D., & Waldmann, T. A. (2019). Cytokines in the Treatment of Cancer. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 39(1), 6. <https://doi.org/10.1089/JIR.2018.0019>
- Couinaud, C. (1957). *Le foie et études anatomiques et chirurgicales*. Masson & Cie.
- Couri, T., & Pillai, A. (2019). Goals and targets for personalized therapy for HCC. *Hepatology International*, 13(2), 125–137. <https://doi.org/10.1007/S12072-018-9919-1>

- Crommelin, D. J. A., Sindelar, R. D., & Meibohm, B. (2019). Pharmaceutical biotechnology: Fundamentals and applications. *Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications*, 1–653. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-00710-2>
- Cui, Y., König J, Buchholz, J., Spring, H., Leier, I., & Keppler, D. (1999). Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells - PubMed. *Mol Pharmacol*, 55(5), 929–937. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10220572/>
- Daniels, M., & Hill, A. B. (1952). Chemotherapy of pulmonary tuberculosis in young adults; an analysis of the combined results of three Medical Research Council trials. *British Medical Journal*, 1(4769), 1162–1168. <https://doi.org/10.1136/BMJ.1.4769.1162>
- de Boussac, H., Ratajewski, M., Sachrajda, I., Köblös, G., Tordai, A., Pulaski, L., Buday, L., Váradi, A., & Arányi, T. (2010). The ERK1/2-hepatocyte nuclear factor 4alpha axis regulates human ABCB6 gene expression in hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(30), 22800–22808. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.105593>
- Dean, M., Hamon, Y., & Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research*, 42(7), 1007–1017. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)31588-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)31588-1)
- Denson, L. A., Auld, K. L., Schiek, D. S., McClure, M. H., Mangelsdorf, D. J., & Karpen, S. J. (2000). Interleukin-1beta suppresses retinoid transactivation of two hepatic transporter genes involved in bile formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8835–8843. <https://doi.org/10.1074/JBC.275.12.8835>
- DeOliveira, M. L., Cunningham, S. C., Cameron, J. L., Kamangar, F., Winter, J. M., Lillemoe, K. D., Choti, M. A., Yeo, C. J., & Schulick, R. D. (2007). Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Annals of Surgery*, 245(5), 755–762. <https://doi.org/10.1097/01.SLA.0000251366.62632.D3>
- DeVita, V. T., & Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer Research*, 68(21), 8643–8653. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6611>
- DeVita, Vtj., Canellos, G., & Moxley 3rd, J. (1972, December). *A decade of combination chemotherapy of advanced Hodgkin's disease* - PubMed. Cancer. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4565815/>
- Diao, L., Li, M., Tao, J., Xu, X., Wang, Y., & Hu, Y. (2021). Therapeutic effects of cationic liposomes on lupus-prone MRL/lpr mice are mediated via inhibition of TLR4-triggered B-cell activation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 40, 102491. <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2021.102491>
- Díaz-González, Á., Sapena, V., Boix, L., Brunet, M., Torres, F., LLarch, N., Samper, E., Millán, O., Corominas, J., Iserte, G., Sanduzzi-Zamparelli, M., da Fonseca, L. G., Darnell, A., Belmonte, E., Forner, A., Ayuso, C., Bruix, J., & Reig, M. (2020). Pharmacokinetics and pharmacogenetics of sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma: Implications for combination trials. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 40(10), 2476–2488. <https://doi.org/10.1111/LIV.14587>

- Dimitrov, D. S. (2012). Therapeutic Proteins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 899, 1. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-921-1_1
- Douet, V., VanWart, C. M., Heller, M. B., Reinhard, S., & le Saux, O. (2006). HNF4alpha and NF-E2 are key transcriptional regulators of the murine Abcc6 gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1759(8–9), 426–436. <https://doi.org/10.1016/J.BBAEXP.2006.08.002>
- Eddabra, L., Wenner, T., el Btaouri, H., Baranek, T., Madoulet, C., Cornillet-Lefebvre, P., & Hamid, M. (2012). Arginine 482 to glycine mutation in ABCG2/BCRP increases etoposide transport and resistance to the drug in HEK-293 cells. *Oncology Reports*, 27(1), 232–237. <https://doi.org/10.3892/OR.2011.1468>
- El-Dika, I., Capanu, M., Chou, J. F., Harding, J. J., Ly, M., Hrabovsky, A. D., Do, R. K. G., Shia, J., Millang, B., Ma, J., O'Reilly, E. M., & Abou-Alfa, G. (2020). Phase II trial of sorafenib and doxorubicin in patients with advanced hepatocellular carcinoma after disease progression on sorafenib. *Cancer Medicine*, 9(20), 7453–7459. <https://doi.org/10.1002/CAM4.3389>
- Elfadadny, A., El-Husseiny, H. M., Abugomaa, A., Ragab, R. F., Mady, E. A., Aboubakr, M., Samir, H., Mandour, A. S., El-Mleeh, A., El-Far, A. H., Abd El-Aziz, A. H., & Elbadawy, M. (2021). Role of multidrug resistance-associated proteins in cancer therapeutics: past, present, and future perspectives. *Environmental Science and Pollution Research International*, 28(36), 49447–49466. <https://doi.org/10.1007/S11356-021-15759-5>
- El-Kadiry, A. E.-H., Rafei, M., & Shammaa, R. (2021). Cell Therapy: Types, Regulation, and Clinical Benefits. *Frontiers in Medicine*, 8, 756029. <https://doi.org/10.3389/FMED.2021.756029>
- El-Serag, H. B., Marrero, J. A., Rudolph, L., & Reddy, K. R. (2008). Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 134(6), 1752–1763. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2008.02.090>
- El-Serag, H., & Rudolph, K. (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132(7), 2557–2576. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2007.04.061>
- Emmanouilidi, A., Casari, I., Akkaya, B. G., Maffucci, T., Furic, L., Guffanti, F., Broggin, M., Chen, X., Maxuitenko, Y. Y., Keeton, A. B., Piazza, G. A., Linton, K. J., & Falasca, M. (2020). Inhibition of the Lysophosphatidylinositol Transporter ABCC1 Reduces Prostate Cancer Cell Growth and Sensitizes to Chemotherapy. *Cancers*, 12(8), 1–19. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12082022>
- Ezhevsky, S. A., Nagahara, H., Vocero-Akbani, A. M., Gius, D. R., Wei, M. C., & Dowdy, S. F. (1997). Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20), 10699. <https://doi.org/10.1073/PNAS.94.20.10699>
- Fan, B., Malato, Y., Calvisi, D. F., Naqvi, S., Razumilava, N., Ribback, S., Gores, G. J., Dombrowski, F., Evert, M., Chen, X., & Willenbring, H. (2012). Cholangiocarcinomas can originate from hepatocytes in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(8), 2911–2915. <https://doi.org/10.1172/JCI63212>

- Fang, X., Zhang, S., Wang, Z., Zhou, J., Qi, C., & Song, J. (2021). Cigarette smoke extract combined with LPS down-regulates the expression of MRP2 in chronic pulmonary inflammation may be related to FXR. *Molecular Immunology*, *137*, 174–186. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2021.06.019>
- Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I., & Donato, F. (2004). Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*, *127*(5 Suppl 1). <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2004.09.014>
- Feng, K. chao, Guo, Y. lei, Liu, Y., Dai, H. ren, Wang, Y., Lv, H. yan, Huang, J. hua, Yang, Q. ming, & Han, W. dong. (2017). Cocktail treatment with EGFR-specific and CD133-specific chimeric antigen receptor-modified T cells in a patient with advanced cholangiocarcinoma. *Journal of Hematology & Oncology*, *10*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S13045-016-0378-7>
- Foster, J. R., Jacobsen, M., Kenna, G., Schulz-Utermoehl, T., Morikawa, Y., Salmu, J., & Wilson, I. D. (2012). Differential effect of troglitazone on the human bile acid transporters, MRP2 and BSEP, in the PXB hepatic chimeric mouse. *Toxicologic Pathology*, *40*(8), 1106–1116. <https://doi.org/10.1177/0192623312447542>
- Fouassier, L., Marzioni, M., Afonso, M. B., Dooley, S., Gaston, K., Giannelli, G., Rodrigues, C. M. P., Lozano, E., Mancarella, S., Segatto, O., Vaquero, J., Marin, J. J. G., & Coulouarn, C. (2019). Signalling networks in cholangiocarcinoma: Molecular pathogenesis, targeted therapies and drug resistance. *Liver International : Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, *39* Suppl 1(S1), 43–62. <https://doi.org/10.1111/LIV.14102>
- Frankel, A. D., & Pabo, C. O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, *55*(6), 1189–1193. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90263-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90263-2)
- Fromm, M. F., Leake, B., Roden, D. M., Wilkinson, G. R., & Kim, R. B. (1999). Human MRP3 **transporter: identification of the 5'-flanking region, genomic organization and alternative splice variants**. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1415*(2), 369–374. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(98\)00233-8](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(98)00233-8)
- Fu, D. yuan, Tan, H. sheng, Wei, J. li, Zhu, C. R., Jiang, J. xin, Zhu, Y. xiang, Cai, F. lin, Chong, M. hong, & Ren, C. li. (2015). Decreased expression of SOX17 is associated with tumor progression and poor prognosis in breast cancer. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *36*(10), 8025–8034. <https://doi.org/10.1007/S13277-015-3547-3>
- Fujita, K. ichi, Masuo, Y., Yamazaki, E., Shibutani, T., Kubota, Y., Nakamichi, N., Sasaki, Y., & Kato, Y. (2017). Involvement of the Transporters P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein in Dermal Distribution of the Multikinase Inhibitor Regorafenib and Its Active Metabolites. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *106*(9), 2632–2641. <https://doi.org/10.1016/J.XPHS.2017.04.064>
- Gao, B., Yang, F., Yu, Z., Li, R., Xie, F., Chen, J., Lui, H., & Zhang, J. (2015). Relationship between the expression of MDR1 in hepatocellular cancer and its biological behaviors - PubMed. *Int J Clin Exp Pathol*, *8*(6), 6995–7001. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26261589/>

- Gao, L., Morine, Y., Yamada, S., Saito, Y., Ikemoto, T., Tokuda, K., Takasu, C., Miyazaki, K., & Shimada, M. (2021). Nrf2 signaling promotes cancer stemness, migration, and expression of ABC transporter genes in sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma cells. *PLoS ONE*, *16*(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0256755>
- Geer LY, Marchler-Bauer A, Geer RC, Han L, He J, He D, Liu C, Shi W, & Bryant SH. (2010). *The NCBI BioSystems Database* - *PubMed*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19854944/?from_single_result=The+NCBI+BioSystems+database+AND+geer&expanded_search_query=The+NCBI+BioSystems+database+AND+geer
- Geick, A., Eichelbaum, M., & Burk, O. (2001). Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(18), 14581–14587. <https://doi.org/10.1074/JBC.M010173200>
- Giddings, J. C., Yang, F. J. F., & Myers, M. N. (1976). Flow field-flow fractionation: A versatile new separation method. *Science*, *193*(4259), 1244–1245. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.959835>
- Global Cancer Observatory (GLOBOCAN). (2020). *Cancer Today*. International Agency for Research on Cancer, WHO. https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=0&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Afalse%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D
- Goeddel, D., Kleid, D., Bolivar, F., Heyneker, H., Yansura, D., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K., & Riggs, A. (1979). Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *76*(1), 106–110. <https://doi.org/10.1073/PNAS.76.1.106>
- Goeddel, D. v., Heyneker, H. L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yansura, D. G., Ross, M. J., Miozzari, G., Crea, R., & Seeburg, P. H. (1979). Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature*, *281*(5732), 544–548. <https://doi.org/10.1038/281544A0>
- Grant, C. E., Valdimarsson, G., Hipfner, D. R., Almquist, K. C., Cole, S. P. C., & Deeley, R. G. (1994). Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Research*, *54*(2), 357–361. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8275468/>
- Green, M., & Loewenstein, P. M. (1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*, *55*(6), 1179–1188. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90262-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90262-0)
- Grimm, D., Bauer, J., Wise, P., Krüger, M., Simonsen, U., Wehland, M., Infanger, M., & Corydon, T. J. (2020). The role of SOX family members in solid tumours and metastasis. *Seminars*

- in Cancer Biology*, 67(Pt 1), 122–153. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2019.03.004>
- Grodberg, J., & Dunn, J. J. (1988). ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *Journal of Bacteriology*, 170(3), 1245–1253. <https://doi.org/10.1128/jb.170.3.1245-1253.1988>
- Haber, P. K., Puigvehí, M., Castet, F., Lourdusamy, V., Montal, R., Tabrizian, P., Buckstein, M., Kim, E., Villanueva, A., Schwartz, M., & Llovet, J. M. (2021). Evidence-Based Management of Hepatocellular Carcinoma: Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials (2002-2020). *Gastroenterology*, 161(3), 879–898. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2021.06.008>
- Hafezi, M., Lin, M., Chia, A., Chua, A., Ho, Z. Z., Fam, R., Tan, D., Aw, J., Pavesi, A., Krishnamoorthy, T. L., Chow, W. C., Chen, W., Zhang, Q., Wai, L. E., Koh, S., Tan, A. T., & Bertolotti, A. (2021). Immunosuppressive Drug-Resistant Armored T-Cell Receptor T Cells for Immune Therapy of HCC in Liver Transplant Patients. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 74(1), 200–213. <https://doi.org/10.1002/HEP.31662>
- Harmsen, S., Meijerman, I., Maas-Bakker, R. F., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. M. (2013). PXR-mediated P-glycoprotein induction by small molecule tyrosine kinase inhibitors. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 48(4–5), 644–649. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2012.12.019>
- Hassan, S., Peluso, J., Chalhoub, S., Gillet, Y. I., Benkirane-Jessel, N., Rochel, N., Fuhrmann, G., & Ubeaud-Sequier, G. (2020). Quercetin potentializes the respective cytotoxic activity of gemcitabine or doxorubicin on 3D culture of AsPC-1 or HepG2 cells, through the inhibition of HIF-1 α and MDR1. *PloS One*, 15(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0240676>
- Herraez, E., Gonzalez-Sanchez, E., Vaquero, J., Romero, M. R., Serrano, M. A., Marin, J. J. G., & Briz, O. (2012). Cisplatin-induced chemoresistance in colon cancer cells involves FXR-dependent and FXR-independent up-regulation of ABC proteins. *Molecular Pharmaceutics*, 9(9), 2565–2576. <https://doi.org/10.1021/MP300178A>
- Higgins, C. F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology*, 8, 67–113. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CB.08.110192.000435>
- Higgins, C. F., & Linton, K. J. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(10), 918–926. <https://doi.org/10.1038/NSMB836>
- Higuchi, R., Yamamoto, M., Hatori, T., Shimizu, K., Imai, K., & Takasaki, K. (2006). Intrahepatic cholangiocarcinoma with lymph node metastasis successfully treated by immunotherapy with CD3-activated T cells and dendritic cells after surgery: report of a case. *Surgery Today*, 36(6), 559–562. <https://doi.org/10.1007/S00595-006-3201-1>
- Hingorani, D. v., Chapelin, F., Stares, E., Adams, S. R., Okada, H., & Ahrens, E. T. (2020). Cell penetrating peptide functionalized perfluorocarbon nanoemulsions for targeted cell labeling and enhanced fluorine-19 MRI detection. *Magnetic Resonance in Medicine*, 83(3), 974–987. <https://doi.org/10.1002/MRM.27988>

- Hirai, T., Fukui, Y., & Motojima, K. (2007). PPARalpha agonists positively and negatively regulate the expression of several nutrient/drug transporters in mouse small intestine. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30(11), 2185–2190. <https://doi.org/10.1248/BPB.30.2185>
- Hoffmann, K., Franz, C., Xiao, Z., Mohr, E., Serba, S., Büchler, M. W., & Schemmer, P. (2010). Sorafenib modulates the gene expression of multi-drug resistance mediating ATP-binding cassette proteins in experimental hepatocellular carcinoma. *Anticancer Research*, 30(11), 4503–4508. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21115899/>
- Hotta, K., Ueyama, J., Tatsumi, Y., Tsukiyama, I., Sugiura, Y., Saito, H., Matsuura, K., & Hasegawa, T. (2015). Lack of Contribution of Multidrug Resistance-associated Protein and Organic Anion-transporting Polypeptide to Pharmacokinetics of Regorafenib, a Novel Multi-Kinase Inhibitor, in Rats - PubMed. *Anticancer Res.*, 35(9), 4681–4689. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26254357/>
- Hu, S., Chen, Z., Franke, R., Orwick, S., Zhao, M., Rudek, M. A., Sparreboom, A., & Baker, S. D. (2009). Interaction of the multikinase inhibitors sorafenib and sunitinib with solute carriers and ATP-binding cassette transporters. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(19), 6062–6069. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0048>
- Huang, B., Wu, L., Lu, X., Xu, F., Liu, C., Shen, W., Jia, N., Cheng, H., Yang, Y., & Shen, F. (2016). Small Intrahepatic Cholangiocarcinoma and Hepatocellular Carcinoma in Cirrhotic Livers May Share Similar Enhancement Patterns at Multiphase Dynamic MR Imaging. *Radiology*, 281(1), 150–157. <https://doi.org/10.1148/RADIOL.2016151205>
- Huang, S. L., Wang, Y. M., Wang, Q. Y., Feng, G. G., Wu, F. Q., Yang, L. M., Zhang, X. H., & Xin, H. W. (2021). Mechanisms and Clinical Trials of Hepatocellular Carcinoma Immunotherapy. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2021.691391/FULL>
- Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J., Mimmack, M. M., Gileadi, U., Pearce, S. R., Gallagher, M. P., Gill, D. R., Hubbard, R. E., & Higgins, C. F. (1990). Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*, 346(6282), 362–365. <https://doi.org/10.1038/346362A0>
- Ibbotson, K., Yell, J., & Ronaldson, P. T. (2017). Nrf2 signaling increases expression of ATP-binding cassette subfamily C mRNA transcripts at the blood-brain barrier following hypoxia-reoxygenation stress. *Fluids and Barriers of the CNS*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/S12987-017-0055-4>
- Ilyas, F. Z., Beane, J. D., & Pawlik, T. M. (2021). The State of Immunotherapy in Hepatobiliary Cancers. *Cells*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/CELLS10082096>
- Invitrogen. (2010). *pET-DEST42 Gateway™ Vector A destination vector for high-level, inducible expression in E. coli*. www.invitrogen.com
- Jabalera, Y., Sola-Ieyva, A., Gaglio, S. C., Carrasco-jiménez, M. P., Iglesias, G. R., Perduca, M., & Jimenez-lopez, C. (2021). Enhanced Cytotoxic Effect of TAT-PLGA-Embedded DOXO Carried by Biomimetic Magnetic Nanoparticles upon Combination with Magnetic

- Hyperthermia and Photothermia. *Pharmaceutics*, 13(8).
<https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13081168>
- Janssen, A. W. F., Betzel, B., Stoopen, G., Berends, F. J., Janssen, I. M., Peijnenburg, A. A., & Kersten, S. (2015). The impact of PPAR α activation on whole genome gene expression in human precision cut liver slices. *BMC Genomics*, 16(1).
<https://doi.org/10.1186/S12864-015-1969-3>
- Jarnagin, W. R., Fong, Y., DeMatteo, R. P., Gonen, M., Burke, E. C., Bodniewicz, J., Youssef, M., Klimstra, D., & Blumgart, L. H. (2001). Staging, resectability, and outcome in 225 patients with hilar cholangiocarcinoma. *Annals of Surgery*, 234(4), 507–519.
<https://doi.org/10.1097/00000658-200110000-00010>
- Javle, M., Lowery, M., Shroff, R. T., Weiss, K. H., Springfield, C., Borad, M. J., Ramanathan, R. K., Goyal, L., Sadeghi, S., Macarulla, T., El-Khoueiry, A., Kelley, R. K., Borbath, I., Choo, S. P., Oh, D. Y., **Philip, P. A., Chen, L. T., Reungwetwattana, T., van Cutsem, E., ... Bekaii-Saab, T.** (2018). Phase II Study of BGJ398 in Patients With FGFR-Altered Advanced Cholangiocarcinoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 36(3), 276–282. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.75.5009>
- Jiang, Q., Matsuzaki, Y., Li, K., & Uitto, J. (2006). Transcriptional regulation and characterization of the promoter region of the human ABCC6 gene. *The Journal of Investigative Dermatology*, 126(2), 325–335. <https://doi.org/10.1038/SJ.JID.5700065>
- Jigorel, E., le Vee, M., Boursier-Neyret, C., Parmentier, Y., & Fardel, O. (2006). Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 34(10), 1756–1763. <https://doi.org/10.1124/DMD.106.010033>
- Jilek, J. L., Tu, M. J., Zhang, C., & Yu, A. M. (2020). Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Factors Contribute to Synergism between Let-7c-5p and 5-Fluorouracil in Inhibiting Hepatocellular Carcinoma Cell Viability. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 48(12), 1257–1263. <https://doi.org/10.1124/DMD.120.000207>
- Kang, H. J., Yi, Y. W., Hong, Y. bin, Kim, H. J., Jang, Y. J., Seong, Y. S., & Bae, I. (2014). HER2 confers drug resistance of human breast cancer cells through activation of NRF2 by direct interaction. *Scientific Reports*, 4. <https://doi.org/10.1038/SREP07201>
- Kast, C., & Gros, P. (1998). Epitope insertion favors a six transmembrane domain model for the carboxy-terminal portion of the multidrug resistance-associated protein. *Biochemistry*, 37(8), 2305–2313. <https://doi.org/10.1021/BI972332V>
- Kast, C., & Gros, P. (1997). Topology mapping of the amino-terminal half of multidrug resistance-associated protein by epitope insertion and immunofluorescence. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(42), 26479–26487. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.42.26479>
- Kast, H. R., Goodwin, B., Tarr, P. T., Jones, S. A., Anisfeld, A. M., Stoltz, C. M., Tontonoz, P., Kliewer, S., Willson, T. M., & Edwards, P. A. (2002). Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid

- X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(4), 2908–2915. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109326200>
- Kawabe, T., Chen, Z. S., Wada, M., Uchiumi, T., Ono, M., Akiyama, S. I., & Kuwano, M. (1999). Enhanced transport of anticancer agents and leukotriene C4 by the human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP2). *FEBS Letters*, 456(2), 327–331. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00979-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00979-5)
- Kido, M., Yamanaka, K., Mitani, T., Niki, H., Ogura, T., & Hiraga, S. (1996). RNase E polypeptides lacking a carboxyl-terminal half suppress a mukB mutation in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 178(13), 3917–3925. <https://doi.org/10.1128/jb.178.13.3917-3925.1996>
- Kim, E. J., Kim, Y. J., Lee, H. I., Jeong, S. H., Nam, H. J., & Cho, J. H. (2020). NRF2 Knockdown Resensitizes 5-Fluorouracil-Resistant Pancreatic Cancer Cells by Suppressing HO-1 and ABCG2 Expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 1–10. <https://doi.org/10.3390/IJMS21134646>
- Kim, M. J., Choi, Y. K., Park, S. Y., Jang, S. Y., Lee, J. Y., Ham, H. J., Kim, B. G., Jeon, H. J., Kim, J. H., Kim, J. G., Lee, I. K., & Park, K. G. (2017). PPAR δ Reprograms Glutamine Metabolism in Sorafenib-Resistant HCC. *Molecular Cancer Research: MCR*, 15(9), 1230–1242. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0061>
- Kim, S., Lee, M., Dhanasekaran, D. N., & Song, Y. S. (2018). Activation of LXR α/β by cholesterol in malignant ascites promotes chemoresistance in ovarian cancer. *BMC Cancer*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/S12885-018-5152-5>
- Kipp, B. R., Voss, J. S., Kerr, S. E., Barr Fritcher, E. G., Graham, R. P., Zhang, L., Edward Highsmith, W., Zhang, J., Roberts, L. R., Gores, G. J., & Halling, K. C. (2012). Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cholangiocarcinoma. *Human Pathology*, 43(10), 1552–1558. <https://doi.org/10.1016/J.HUMPATH.2011.12.007>
- Klein, K., Jüngst, C., Mwinyi, J., Stieger, B., Krempler, F., Patsch, W., Eloranta, J. J., & Kullak-Ublick, G. A. (2010). The human organic anion transporter genes OAT5 and OAT7 are transactivated by hepatocyte nuclear factor-1 α (HNF-1 α). *Molecular Pharmacology*, 78(6), 1079–1087. <https://doi.org/10.1124/MOL.110.065201>
- Knappskog, S., Ravneberg, H., Gjerdrum, C., Tröbe, C., Stern, B., & Pryme, I. F. (2007). The level of synthesis and secretion of Gaussia princeps luciferase in transfected CHO cells is heavily dependent on the choice of signal peptide. *Journal of Biotechnology*, 128(4), 705–715. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTECH.2006.11.026>
- Kober, L., Zehe, C., & Bode, J. (2013). Optimized signal peptides for the development of high expressing CHO cell lines. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(4), 1164–1173. <https://doi.org/10.1002/BIT.24776>
- Koga, H., Selvendiran, K., Sivakumar, R., Yoshida, T., Torimura, T., Ueno, T., & Sata, M. (2012). PPAR γ potentiates anticancer effects of gemcitabine on human pancreatic cancer cells. *International Journal of Oncology*, 40(3), 679–685. <https://doi.org/10.3892/IJO.2011.1237>
- Kohan, H. G., & Boroujerdi, M. (2015). Time and concentration dependency of P-gp, MRP1 and MRP5 induction in response to gemcitabine uptake in Capan-2 pancreatic cancer

- cells. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 45(7), 642–652. <https://doi.org/10.3109/00498254.2014.1001809>
- Kohn, W. D., Kay, C. M., & Hodges, R. S. (1997). Salt effects on protein stability: two-stranded alpha-helical coiled-coils containing inter- or intrahelical ion pairs. *Journal of Molecular Biology*, 267(4), 1039–1052. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1997.0930>
- Koike, K., Kawabe, T., Tanaka, T., Toh, S., cimini Morimasa Wada, T. I., Akiyama, S. I., Ono, M., & Kuwano, M. (1997). *A Canalicular Multispecific Organic Anion³nTransporter (cMOAT) Antisense cDNA Enhances Drug Sensitivity in Human Hepatic Cancer Cells1*.
- Komuta, M., Govaere, O., Vandecaveye, V., Akiba, J., van Steenberg, W., Verslype, C., Laleman, W., Pirenne, J., Aerts, R., Yano, H., Nevens, F., Topal, B., & Roskams, T. (2012). Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 55(6), 1876–1888. <https://doi.org/10.1002/HEP.25595>
- Kool, M., van der Linden, M., de Haas, M., Scheffer, G. L., de Vree, J. M. L., Smith, A. J., Jansen, G., Peters, G. J., Ponne, N., Scheper, R. J., Oude Elferink, R. P. J., Baas, F., & Borst, P. (1999). MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(12), 6914. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.12.6914>
- Kort, A., Durmus, S., Sparidans, R. W., Wagenaar, E., Beijnen, J. H., & Schinkel, A. H. (2015). Brain and Testis Accumulation of Regorafenib is Restricted by Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) and P-glycoprotein (P-GP/ABCB1). *Pharmaceutical Research*, 32(7), 2205–2216. <https://doi.org/10.1007/S11095-014-1609-7>
- Kozłowski, L. P. (2021). IPC 2.0: prediction of isoelectric point and pKa dissociation constants. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W285–W292. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB295>
- Krchniakova, M., Skoda, J., Neradil, J., Chlapek, P., & Veselska, R. (2020). Repurposing Tyrosine Kinase Inhibitors to Overcome Multidrug Resistance in Cancer: A Focus on Transporters and Lysosomal Sequestration. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9). <https://doi.org/10.3390/IJMS21093157>
- Kryczka, J., Sochacka, E., Papiewska-Pająk, I., & Boncela, J. (2020). Implications of ABCC4-Mediated cAMP Eflux for CRC Migration. *Cancers*, 12(12), 1–19. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12123547>
- Kuo, I. Y., Wu, C. C., Chang, J. M., Huang, Y. L., Lin, C. H., Yan, J. J., Sheu, B. S., Lu, P. J., Chang, W. L., Lai, W. W., & Wang, Y. C. (2014). Low SOX17 expression is a prognostic factor and drives transcriptional dysregulation and esophageal cancer progression. *International Journal of Cancer*, 135(3), 563–573. <https://doi.org/10.1002/IJC.28695>
- Laber, J. R., Dear, B. J., Martins, M. L., Jackson, D. E., Divenere, A., Gollihar, J. D., Ellington, A. D., Truskett, T. M., Johnston, K. P., & Maynard, J. A. (2017). Charge shielding prevents aggregation of supercharged GFP variants at high protein concentration. *Molecular Pharmaceutics*, 14(10), 3269. <https://doi.org/10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.7B00322>
- Laible, M., & Boonrod, K. (2009). Homemade site directed mutagenesis of whole plasmids. *Journal of Visualized Experiments*, 27. <https://doi.org/10.3791/1135>

- Lamarca, A., Palmer, D. H., Wasan, H. S., Ross, P. J., Ma, Y. T., Arora, A., Falk, S., Gillmore, R., Wadsley, J., Patel, K., Anthoney, A., Maraveyas, A., Waters, J. S., Hobbs, C., Barber, S., Ryder, D., Ramage, J., Davies, L. M., Bridgewater, J. A., & Valle, J. W. (2019). ABC-06 | A randomised phase III, multi-centre, open-label study of active symptom control (ASC) alone or ASC with oxaliplatin / 5-FU chemotherapy (ASC+mFOLFOX) for patients (pts) with locally advanced / metastatic biliary tract cancers (ABC) previously-treated with cisplatin/gemcitabine (CisGem) chemotherapy. *https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.4003*, 37(15_suppl), 4003–4003. https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15_SUPPL.4003
- Lancaster, C. S., Hu, C., Franke, R. M., Filipski, K. K., Orwick, S. J., Chen, Z., Zuo, Z., Loos, W. J., & Sparreboom, A. (2010). Cisplatin-induced downregulation of OCTN2 affects carnitine wasting. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(19), 4789–4799. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1239>
- Latonen, L. (2011). Nucleolar aggresomes as counterparts of cytoplasmic aggresomes in proteotoxic stress. Proteasome inhibitors induce nuclear ribonucleoprotein inclusions that accumulate several key factors of neurodegenerative diseases and cancer. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 33(5), 386–395. <https://doi.org/10.1002/BIES.201100008>
- Latonen, L. (2019). Phase-to-Phase With Nucleoli - Stress Responses, Protein Aggregation and Novel Roles of RNA. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2019.00151>
- Lee, D. H., & Lee, J. M. (2017). Primary malignant tumours in the non-cirrhotic liver. *European Journal of Radiology*, 95, 349–361. <https://doi.org/10.1016/J.EJRAD.2017.08.030>
- Lee, Y., Choi, Y. R., Kim, K. Y., & Shin, D. H. (2016). The impact of intermittent versus continuous exposure to EGFR tyrosine kinase inhibitor on selection of EGFR T790M-mutant drug-resistant clones in a lung cancer cell line carrying activating EGFR mutation. *Oncotarget*, 7(28), 43315. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.9703>
- Lee, Y. T., Tan, Y. J., & Oon, C. E. (2018). Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *European Journal of Pharmacology*, 834, 188–196. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2018.07.034>
- Lemmen, J., Tozakidis, I. E. P., & Galla, H. J. (2013). Pregnane X receptor upregulates ABC-transporter Abcg2 and Abcb1 at the blood-brain barrier. *Brain Research*, 1491, 1–13. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2012.10.060>
- Li, J., Wang, X., Ning, C., Wang, Z., Wang, Y., Zheng, M., Zhang, S., Lu, Y., Zhang, Y., Li, N., Chen, X., & Zhao, D. (2020). Influences of ABC transporter and CYP3A4/5 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of lenvatinib in Chinese healthy subjects. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 76(8), 1125–1133. <https://doi.org/10.1007/S00228-020-02879-Z>
- Li, J., Wei, J., Wan, Y., Du, X., Bai, X., Li, C., Lin, Y., Liu, Z., Zhou, M., & Zhong, Z. (2021). TAT-modified tetramethylpyrazine-loaded nanoparticles for targeted treatment of spinal cord injury. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 335, 103–116. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2021.05.016>

- Li, L., & Wang, H. (2016). Heterogeneity of liver cancer and personalized therapy. *Cancer Letters*, 379(2), 191–197. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2015.07.018>
- Li, M. C., Whitmore, W. F., Golbey, R., & Grabstald, H. (1960). Effects of Combined Drug Therapy on Metastatic Cancer of the Testis. *JAMA*, 174(10), 1291–1299. <https://doi.org/10.1001/JAMA.1960.03030100059013>
- Li, S., Wu, P., Yarlagadda, P., Vadjunec, N. M., Proia, A. D., Harris, R. A., & Portilla, D. (2004). PPAR alpha ligand protects during cisplatin-induced acute renal failure by preventing inhibition of renal FAO and PDC activity. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 286(3). <https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00190.2003>
- Li, X., Xu, Y., Chen, Y., Chen, S., Jia, X., Sun, T., Liu, Y., Li, X., Xiang, R., & Li, N. (2013). SOX2 promotes tumor metastasis by stimulating epithelial-to-mesenchymal transition via regulation of WNT/ β -catenin signal network. *Cancer Letters*, 336(2), 379–389. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2013.03.027>
- Liang, R. bin, Zhao, Y., He, M. K., Wen, D. S., Bu, X. Y., Huang, Y. X., Lai, Z. C., Xu, Y. J., Kan, A., Wei, W., Zhang, Y. J., Chen, M. S., Guo, R. P., Li, Q. J., & Shi, M. (2021). Hepatic Arterial Infusion Chemotherapy of Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin With or Without Sorafenib as Initial Treatment for Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.619461>
- Liang, Q., Yang, Y., Shao, B., Gao, Y., Song, Y., & Han, N. (2018). [Impact of carrier flow composition on membrane adsorption and aggregation of ovalbumin in asymmetrical flow field-flow fractionation]. *Se Pu = Chinese Journal of Chromatography*, 36(5), 480–486. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1123.2017.12014>
- Lin, B., Du, L., Li, H., Zhu, X., Cui, L., & Li, X. (2020). Tumor-infiltrating lymphocytes: Warriors fight against tumors powerfully. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 132. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2020.110873>
- Lin, F. K., Suggs, S., Lin, C. H., Browne, J. K., Smalling, R., Egrie, J. C., Chen, K. K., Fox, G. M., Martin, F., & Stabinsky, Z. (1985). Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(22), 7580–7584. <https://doi.org/10.1073/PNAS.82.22.7580>
- Liu, X. (2019). ABC Family Transporters. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1141, 13–100. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7647-4_2
- Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J.-F., de Oliveira, A. C., Santoro, A., Raoul, J.-L., Forner, A., Schwartz, M., Porta, C., Zeuzem, S., Bolondi, L., Greten, T. F., Galle, P. R., Seitz, J.-F., **Borbath, I., Häussinger, D., ... Bruix, J.** (2008). Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 359(4), 378–390. https://doi.org/10.1056/NEJMOA0708857/SUPPL_FILE/NEJM_LLOVET_378SA1.PDF
- Loilome, W., Bungkanjana, P., Techasen, A., Namwat, N., Yongvanit, P., Puapairoj, A., Khuntikeo, N., & Riggins, G. J. (2014). Activated macrophages promote Wnt/ β -catenin signaling in cholangiocarcinoma cells. *Tumour Biology: The Journal of the International*

- Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(6), 5357–5367.
<https://doi.org/10.1007/S13277-014-1698-2>
- Lopez, P. J., Marchand, I., Joyce, S. A., & Dreyfus, M. (1999). The C-terminal half of RNase E, which organizes the Escherichia coli degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo. *Molecular Microbiology*, 33(1), 188–199.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01465.x>
- Lowell, J. L., & Klein, D. A. (2000). Heteroduplex resolution using T7 endonuclease I in microbial community analyses. *BioTechniques*, 28(4), 676–681.
<https://doi.org/10.2144/00284st03>
- Lowery, M. A., Abou-Alfa, G., Burris III, H. A., Janku, F., Shroff, R. T., Cleary, J. M., Azad, N. S., Goyal, L., Maher, E. A., Gore, L., Hollebecque, A., Beeram, M., Trent II, J. C., Jiang, L., Ishii, Y., Auer, J., Gliser, C., Agresta, S. v, Pandya, S. S., & Zhu, A. X. (n.d.). Phase 1 study of AG-120, an IDH1 mutant enzyme inhibitor: results from the cholangiocarcinoma dose escalation and expansion cohorts. *Investor.Agios.Com*. Retrieved November 13, 2021, from <https://investor.agios.com/static-files/404fc9ff-809d-4152-9fa4-1eb4ebd4d502>
- Lozano, E., Asensio, M., Perez-Silva, L., Banales, J. M., Briz, O., & Marin, J. J. G. (2020). MRP3-Mediated Chemoresistance in Cholangiocarcinoma: Target for Chemosensitization Through Restoring SOX17 Expression. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 72(3), 949–964.
<https://doi.org/10.1002/HEP.31088>
- Lu, J., Zhang, G., Cheng, Y., Tang, Y., Dong, Z., McElwee, K. J., & Li, G. (2014). Reduced expression of SRY-box containing gene 17 correlates with an unfavorable melanoma patient survival. *Oncology Reports*, 32(6), 2571–2579.
<https://doi.org/10.3892/OR.2014.3534>
- Ludwig, J. (1987). New concepts in biliary cirrhosis. *Seminars in Liver Disease*, 7(4), 293–301.
<https://doi.org/10.1055/S-2008-1040584>
- Luo, J., Bian, L., Blevins, M. A., Wang, D., Liang, C., Du, D., Wu, F., Holwerda, B., Zhao, R., Raben, D., Zhou, H., Young, C. D., & Wang, X. J. (2019). Smad7 Promotes Healing of Radiotherapy-Induced Oral Mucositis without Compromising Oral Cancer Therapy in a Xenograft Mouse Model. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 25(2), 808–818. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1081>
- Luo, Y. D., Fang, L., Yu, H. Q., Zhang, J., Lin, X. T., Liu, X. Y., Wu, D., Li, G. X., Huang, D., Zhang, Y. J., Chen, S., Jiang, Y., Shuai, L., He, Y., Zhang, L. da, Bie, P., & Xie, C. M. (2021). p53 haploinsufficiency and increased mTOR signalling define a subset of aggressive hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 74(1), 96–108.
<https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2020.07.036>
- Lv, F., Wang, J., Chen, H., Sui, L., Feng, L., Liu, Z., Liu, Y., Wei, G., & Lu, W. (2021). Enhanced mucosal penetration and efficient inhibition efficacy against cervical cancer of PEGylated docetaxel nanocrystals by TAT modification. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 336, 572–582.
<https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2021.07.008>

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2012). *Brock Biology of Microorganisms* (13th ed.). Pearson. <https://www.pearson.com/us/higher-education/product/Madigan-Brock-Biology-of-Microorganisms-13th-Edition/9780321649638.html>
- Marin, J. J. G., Briz, O., Perez, M. J., Romero, M. R., & Monte, M. J. (2009). Hepatobiliary transporters in the pharmacology and toxicology of anticancer drugs. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, *14*(11), 4257–4280. <https://doi.org/10.2741/3527>
- Marin, J. J. G., Lozano, E., Briz, O., Al-Abdulla, R., Serrano, M. A., & Macias, R. I. R. (2017). Molecular Bases of Chemoresistance in Cholangiocarcinoma. *Current Drug Targets*, *18*(8), 889–900. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150223121508>
- Marin, J. J. G., & Macias, R. I. R. (2021). Understanding drug resistance mechanisms in cholangiocarcinoma: assisting the clinical development of investigational drugs. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *30*(7), 675–679. <https://doi.org/10.1080/13543784.2021.1916912>
- Marin, J. J. G., Macias, R. I. R., Monte, M. J., Herraes, E., Peleteiro-vigil, A., de Blas, B. S., Sanchon-sanchez, P., Temprano, A. G., Espinosa-escudero, R. A., Lozano, E., Briz, O., & Romero, M. R. (2020a). Cellular mechanisms accounting for the refractoriness of colorectal carcinoma to pharmacological treatment. *Cancers*, *12*(9). <https://doi.org/10.3390/cancers12092605>
- Marin, J. J. G., Macias, R. I. R., Monte, M. J., Romero, M. R., Asensio, M., Sanchez-Martin, A., Cives-Losada, C., Temprano, A. G., Espinosa-Escudero, R. A., Reviejo, M., Bohorquez, L. H., & Briz, O. (2020b). Molecular Bases of Drug Resistance in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*, *12*(6), 1–26. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12061663>
- Marioli, M., & Kok, W. T. (2019). Recovery, overloading, and protein interactions in asymmetrical flow field-flow fractionation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *411*(11), 2327. <https://doi.org/10.1007/S00216-019-01673-W>
- Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L., & Tolbert, N. E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*, *87*(1), 206–210. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90586-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90586-9)
- Martinez-Becerra, P., Vaquero, J., Romero, M. R., Lozano, E., Anadon, C., Maclas, R. I. R., Serrano, M. A., Grañé-Boladeras, N., Muñoz-Bellvis, L., Alvarez, L., Sangro, B., Pastor-Anglada, M., & Marin, J. J. G. (2012). No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors. *Molecular Pharmaceutics*, *9*(6), 1693–1704. <https://doi.org/10.1021/MP300028A>
- Marzioni, M. M., Glaser, S. S., Francis, H., Phinizy, J. L., LeSage, G., & Alpini, G. (2002). Functional heterogeneity of cholangiocytes. In *Seminars in Liver Disease* (Vol. 22, Issue 3, pp. 227–240). Semin Liver Dis. <https://doi.org/10.1055/s-2002-34501>
- Massimi, I., Pulcinelli, F. M., Piscitelli, V. P., Alemanno, L., Maltese, T., Guarino, M. L., Marci, R., Canny, G. O., Frati, L., Mallozzi, M., Frega, A., & Caserta, D. (2018). Non-steroidal anti-inflammatory drugs increase MRP4 expression in an endometriotic epithelial cell line

- in a PPAR α dependent manner. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(23), 8487–8496. https://doi.org/10.26355/EURREV_201812_16549
- Masuyama, H., Suwaki, N., Tateishi, Y., Nakatsukasa, H., Segawa, T., & Hiramatsu, Y. (2005). The pregnane X receptor regulates gene expression in a ligand- and promoter-selective fashion. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 19(5), 1170–1180. <https://doi.org/10.1210/ME.2004-0434>
- Matheny, C. J., Lamb, M. W., Brouwer, K. L. R., & Pollack, G. M. (2001). Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation. *Pharmacotherapy*, 21(7), 778–796. <https://doi.org/10.1592/PHCO.21.9.778.34558>
- Mazzaferro, V., Shaib, W., ... L. R.-A. of, & 2016, undefined.** (n.d.). PD-019 ARQ 087, an oral pan-fibroblast growth factor receptor (FGFR) inhibitor, in patients (pts) with advanced and/or metastatic intrahepatic cholangiocarcinoma. *Annalsofoncology.Org*. Retrieved November 13, 2021, from [https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(19\)45883-3/abstract](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(19)45883-3/abstract)
- McAleer, M. A., Breen, M. A., White, N. L., & Matthews, N. (1999). pABC11 (also known as MOAT-C and MRP5), a member of the ABC family of proteins, has anion transporter activity but does not confer multidrug resistance when overexpressed in human embryonic kidney 293 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(33), 23541–23548. <https://doi.org/10.1074/JBC.274.33.23541>
- Meier, P. J. (1988). Transport polarity of hepatocytes. *Seminars in Liver Disease*, 8(4), 293–307. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1040551>
- Memon, R. A., Moser, A. H., Shigenaga, J. K., Grunfeld, C., & Feingold, K. R. (2001). In vivo and in vitro regulation of sterol 27-hydroxylase in the liver during the acute phase response. potential role of hepatocyte nuclear factor-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(32), 30118–30126. <https://doi.org/10.1074/JBC.M102516200>
- Meng, F., Zhao, J., Tan, A. T., Hu, W., Wang, S. Y., Jin, J., Wu, J., Li, Y., Shi, L., Fu, J. L., Yu, S., Shen, Y., Liu, L., Luan, J., Shi, M., Xie, Y., Zhou, C. B., Wong, R. W., Lu-En, W., ... Wang, F. S. (2021). Immunotherapy of HBV-related advanced hepatocellular carcinoma with short-term HBV-specific TCR expressed T cells: results of dose escalation, phase I trial. *Hepatology International*, 15(6), 1402–1412. <https://doi.org/10.1007/S12072-021-10250-2>
- Meric-Bernstam, F., Arkenau, H., Tran, B., Bahleda, R., Kelley, R., Hierro, C., Ahn, D., Zhu, A. X., Javle, M., Winkler, R., He, H., Huang, J., & Goyal, L. (2018). Efficacy of TAS-120, an irreversible fibroblast growth factor receptor (FGFR) inhibitor, in cholangiocarcinoma patients with FGFR pathway alterations who were. *Annalsofoncology.Org*. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy149>
- Merino-Azpitarte, M., Lozano, E., Perugorria, M. J., Esparza-Baquer, A., Erice, O., Santos-Laso, Á., O'Rourke, C. J., Andersen, J. B., Jiménez-Agüero, R., Lacasta, A., D'Amato, M., Briz, Ó., Jalan-Sakrikar, N., Huebert, R. C., Thelen, K. M., Gradilone, S. A., Aransay, A. M., Lavín, J. L., Fernández-Barrena, M. G., ... Banales, J. M. (2017). SOX17 regulates cholangiocyte differentiation and acts as a tumor suppressor in cholangiocarcinoma. *Journal of Hepatology*, 67(1), 72–83. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2017.02.017>

- Michalopoulos, G. K., & DeFrances, M. C. (1997). Liver regeneration. *Science*, 276(5309), 60–65. <https://doi.org/10.1126/science.276.5309.60>
- Miliotou, A. N., & Papadopoulou, L. C. (2018). CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 19(1), 5–18. <https://doi.org/10.2174/1389201019666180418095526>
- Mizukoshi, E., Nakagawa, H., Kitahara, M., Yamashita, T., Arai, K., Sunagozaka, H., Iida, N., Fushimi, K., & Kaneko, S. (2015). Phase I trial of multidrug resistance-associated protein 3-derived peptide in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*, 369(1), 242–249. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2015.08.020>
- Moffit, J. S., Aleksunes, L. M., Maher, J. M., Scheffer, G. L., Klaassen, C. D., & Manautou, J. E. (2006). Induction of hepatic transporters multidrug resistance-associated proteins (Mrp) 3 and 4 by clofibrate is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(2), 537–545. <https://doi.org/10.1124/JPET.105.093765>
- Mokhtari, R. B., Homayouni, T. S., Baluch, N., Morgatskaya, E., Kumar, S., Das, B., & Yeger, H. (2017). Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*, 8(23), 38022. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.16723>
- More, V. R., Campos, C. R., Evans, R. A., Oliver, K. D., Chan, G. N. Y., Miller, D. S., & Cannon, R. E. (2017). PPAR- α , a lipid-sensing transcription factor, regulates blood-brain barrier efflux transporter expression. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 37(4), 1199–1212. <https://doi.org/10.1177/0271678X16650216>
- Morrison TB, Weis JJ, & Wittwer CT. (1998). *Quantification of Low-Copy Transcripts by Continuous SYBR Green I Monitoring During Amplification*. Biotechniques. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9631186/?dopt=Abstract>
- Moxley, J. H., de Vita, V. T., Brace, K., & Frei, E. (1967). Intensive combination chemotherapy and X-irradiation in Hodgkin's disease. *Cancer Research*, 27(7), 1258–1263. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4952914/>
- Myeong HM, Hansun K, & Park I. (1997). Stopless Flow Injection in Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Using a Frit Inlet. *Analytical Chemistry*, 69(7), 1436–1440. <https://doi.org/10.1021/AC960897B>
- Nagtegaal, I., Washington, M., Springer Verlag, Somekh, B., Lewin, C., Moran, J. L., Solomon, P. J., Ministry of Justice, N. Z., Degu, G., Yigzaw, T., Davidson, C., Tolich, M., & Bell, J. (2019). Digestive System Tumours. In *SpringerLink & Springer for R&D online training* (Vol. 13, Issue Health services and outcomes research methodology (Online), HSORM). http://www.mcgraw-hill.co.uk/contact_us.html%5Cnwww.pearsoned.co.nz%5Cnhttp://www.cartercenter.org/documents/ethiopia_health/lecture/plain/health_science_students/In_research_method_final.pdf%5Cnhttp://www.justice.govt.nz/policy/commercial-property-and-r
- Nakamura, H., Arai, Y., Totoki, Y., Shiota, T., Elzawahry, A., Kato, M., Hama, N., Hosoda, F., Urushidate, T., Ohashi, S., Hiraoka, N., Ojima, H., Shimada, K., Okusaka, T., Kosuge, T.,

- Miyagawa, S., & Shibata, T. (2015). Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nature Genetics*, 47(9), 1003–1010. <https://doi.org/10.1038/NG.3375>
- Nakanuma, Y., & Sato, Y. (2012). Cystic and papillary neoplasm involving peribiliary glands: a biliary counterpart of branch-type intraductal papillary mucinous [corrected] neoplasm? *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 55(6), 2040–2041. <https://doi.org/10.1002/HEP.25590>
- Nakeeb, A., Pitt, H. A., Sohn, T. A., Coleman, J. A., Abrams, R. A., Piantadosi, S., Hruban, R. H., Lillemoie, K. D., Yeo, C. J., & Cameron, J. L. (1996). Cholangiocarcinoma. A spectrum of intrahepatic, perihilar, and distal tumors. *Annals of Surgery*, 224(4), 463–475. <https://doi.org/10.1097/00000658-199610000-00005>
- Nambaru, P. K., Hübner, T., Köck, K., Mews, S., Grube, M., Payen, L., Guitton, J., Sendler, M., Jedlitschky, G., Rimmbach, C., Rosskopf, D., Kowalczyk, D. W., Kroemer, H. K., Weiss, F. U., Mayerle, J., Lerch, M. M., & Ritter, C. A. (2011). Drug efflux transporter multidrug resistance-associated protein 5 affects sensitivity of pancreatic cancer cell lines to the nucleoside anticancer drug 5-fluorouracil. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 39(1), 132–139. <https://doi.org/10.1124/DMD.110.033613>
- Namisaki, T., Schaeffeler, E., Fukui, H., Yoshiji, H., Nakajima, Y., Fritz, P., Schwab, M., & Nies, A. T. (2014). Differential expression of drug uptake and efflux transporters in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 42(12), 2033–2040. <https://doi.org/10.1124/DMD.114.059832>
- National Cancer Institute. (n.d.). *Definition of biological therapy - NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute*. NIH. Retrieved February 16, 2022, from <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/biological-therapy>
- Nickel, C., Scherer, C., Noskov, S., Bantz, C., Berger, M., Schupp, W., & Maskos, M. (2021). Observation of interaction forces by investigation of the influence of eluent additives on the retention behavior of aqueous nanoparticle dispersions in asymmetrical flow field-flow fractionation. *Journal of Chromatography. A*, 1637. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2020.461840>
- Nordon, R. E., & Schindhelm, K. (1996). Ex vivo manipulation of cell subsets for cell therapies. *Artificial Organs*, 20(5), 396–402. <https://doi.org/10.1111/J.1525-1594.1996.TB04522.X>
- Oguri, T., Achiwa, H., Sato, S., Bessho, Y., Takano, Y., Miyazaki, M., Muramatsu, H., Maeda, H., Niimi, T., & Ueda, R. (2006). The determinants of sensitivity and acquired resistance to gemcitabine differ in non-small cell lung cancer: a role of ABCC5 in gemcitabine sensitivity. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(7), 1800–1806. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0025>
- Oguri, T., Bessho, Y., Achiwa, H., Ozasa, H., Maeno, K., Maeda, H., Sato, S., & Ueda, R. (2007). MRP8/ABCC11 directly confers resistance to 5-fluorouracil. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(1), 122–127. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0529>

- Ohya, H., Shibayama, Y., Ogura, J., Narumi, K., Kobayashi, M., & Iseki, K. (2015). Regorafenib is transported by the organic anion transporter 1B1 and the multidrug resistance protein 2. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 38(4), 582–586. <https://doi.org/10.1248/BPB.B14-00740>
- Okusaka, T., Nakachi, K., Fukutomi, A., Mizuno, N., Ohkawa, S., Funakoshi, A., Nagino, M., Kondo, S., Nagaoka, S., Funai, J., Koshiji, M., Nambu, Y., Furuse, J., Miyazaki, M., & Nimura, Y. (2010). Gemcitabine alone or in combination with cisplatin in patients with biliary tract cancer: a comparative multicentre study in Japan. *British Journal of Cancer*, 103(4), 469–474. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJC.6605779>
- Olijve, W., de Boer, W., Mulders, J. W. M., & van Wezenbeek, P. M. G. F. (1996). Molecular biology and biochemistry of human recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). *Molecular Human Reproduction*, 2(5), 371–382. <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/2.5.371>
- Oshikata, A., Matsushita, T., & Ueoka, R. (2011). Enhancement of drug efflux activity via MDR1 protein by spheroid culture of human hepatic cancer cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(5), 590–593. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSEC.2011.01.006>
- Ozeki, T., Nagahama, M., Fujita, K., Suzuki, A., Sugino, K., Ito, K., & Miura, M. (2019). Influence of CYP3A4/5 and ABC transporter polymorphisms on lenvatinib plasma trough concentrations in Japanese patients with thyroid cancer. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-41820-Y>
- Pang, E., Hu, Y., Chan, K. Y. Y., Lai, P. B. S., Squire, J. A., Macgregor, P. F., Beheshti, B., Albert, M., Leung, T. W. T., & Wong, N. (2005). Karyotypic imbalances and differential gene expressions in the acquired doxorubicin resistance of hepatocellular carcinoma cells. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 85(5), 664–674. <https://doi.org/10.1038/LABINVEST.3700254>
- Patel, K. D., Mohid, S. A., Dutta, A., Arichthota, S., Bhunia, A., Haldar, D., & Sarojini, V. (2021). Synthesis and antibacterial study of cell-penetrating peptide conjugated trifluoroacetyl and thioacetyl lysine modified peptides. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 219. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2021.113447>
- Perugorria, M. J., Olaizola, P., Labiano, I., Esparza-Baquer, A., Marzioni, M., Marin, J. J. G., Bujanda, L., & Banales, J. M. (2019). Wnt- β -catenin signalling in liver development, health and disease. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 16(2), 121–136. <https://doi.org/10.1038/S41575-018-0075-9>
- Pesarrodona, M., Unzueta, U., & Vázquez, E. (2015). Dialysis: a characterization method of aggregation tendency. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1258, 321–330. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5_18
- Pham, N. B., & Meng, W. S. (2020). Protein aggregation and immunogenicity of biotherapeutics. *International Journal of Pharmaceutics*, 585. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2020.119523>
- Pinte, L., Cunningham, A., Trébédén-Negre, H., Nikiforow, S., & Ritz, J. (2021). Global Perspective on the Development of Genetically Modified Immune Cells for Cancer

- Therapy. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.608485/FULL>
- Pinto, M. R., Bey, E., & Bernstein, R. (1985). The PLC/PRF/5 human hepatoma cell line. I. Reevaluation of the karyotype. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 18(1), 11–18. [https://doi.org/10.1016/0165-4608\(85\)90033-0](https://doi.org/10.1016/0165-4608(85)90033-0)
- Pitkänen, L., & Tenkanen, M. (2019). Field-Flow Fractionation of Cationic Cellulose Derivatives. *Chromatographia*, 82(12), 1827–1832. <https://doi.org/10.1007/S10337-019-03800-2/FIGURES/4>
- Planatscher, H., Weiß, F., Eisen, D., van den Berg, B., Zell, A., Joos, T., & Poetz, O. (2014). Identification of short terminal motifs enriched by antibodies using peptide mass fingerprinting. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(9), 1205–1213. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU009>
- Poetz, O., Hoeppe, S., Templin, M., Stoll, D., & Joos, T. (2009). Proteome wide screening using peptide affinity capture. *Proteomics*, 9(6), 1518–1523. <https://doi.org/10.1002/PMIC.200800842>
- Pooga, M., & Langel, Ü. (2015). Classes of Cell-Penetrating Peptides. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1324, 3–28. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2806-4_1
- Pranchevicius, M. C. S., & Vieira, T. R. (2013). Production of recombinant immunotherapeutics for anticancer treatment: the role of bioengineering. *Bioengineered*, 4(5), 305–312. <https://doi.org/10.4161/BIOE.24666>
- Pratt, S., Shepard, R. L., Kandasamy, R. A., Johnston, P. A., Perry, W., & Dantzig, A. H. (2005). The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(5), 855–863. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-04-0291>
- Prescher, M., Kroll, T., & Schmitt, L. (2019). ABCB4/MDR3 in health and disease - at the crossroads of biochemistry and medicine. *Biological Chemistry*, 400(10). <https://doi.org/10.1515/HSZ-2018-0441>
- Priebe, W., Krawczyk, M., Kuo, M. T., Yamane, Y., Savaraj, N., & Ishikawa, T. (1998). Doxorubicin- and daunorubicin-glutathione conjugates, but not unconjugated drugs, competitively inhibit leukotriene C4 transport mediated by MRP/GS-X pump. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247(3), 859–863. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1998.8887>
- Qadri, I., Hu, L. J., Iwahashi, M., Al-Zuabi, S., Quattrochi, L. C., & Simon, F. R. (2009). Interaction of hepatocyte nuclear factors in transcriptional regulation of tissue specific hormonal expression of human multidrug resistance-associated protein 2 (abcc2). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 234(3), 281–292. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2008.10.005>
- Qian, Y., Xiong, Y., Feng, D., Wu, Y., Zhang, X., Chen, L., & Gu, M. (2019). Coix Seed Extract Enhances the Anti-Pancreatic Cancer Efficacy of Gemcitabine through Regulating ABCB1- and ABCG2-Mediated Drug Efflux: A Bioluminescent Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21). <https://doi.org/10.3390/IJMS20215250>

- Rambaldi, D., Reschiglian, P., & Zattoni, A. (2011). Flow field-flow fractionation: recent trends in protein analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(4), 1439–1447. <https://doi.org/10.1007/S00216-010-4312-5>
- Rao, Y. P., Vlahcevic, Z. R., Stravitz, R. T., Mallonee, D. H., Mullick, J., Avadhani, N. G., & Hylemon, P. B. (1999). Down-regulation of the rat hepatic sterol 27-hydroxylase gene by bile acids in transfected primary hepatocytes: possible role of hepatic nuclear factor 1alpha. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 70(1–3), 1–14. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(99\)00099-0](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(99)00099-0)
- Rappaport, A. M., & Wilson, W. D. (1958). The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). *The Anatomical Record*, 130(4), 673–689. <https://doi.org/10.1002/ar.1091300405>
- Ratajewski, M., Bartosz, G., & Pulaski, L. (2006). Expression of the human ABCC6 gene is induced by retinoids through the retinoid X receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 350(4), 1082–1087. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2006.10.007>
- Rau, S., Autschbach, F., Riedel, H. D., Konig, J., Kulaksiz, H., Stiehl, A., Riemann, J. F., & Rost, D. (2008). Expression of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human cholangiocellular carcinomas. *European Journal of Clinical Investigation*, 38(2), 134–142. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2362.2007.01916.X>
- Ray, C. E., Edwards, A., Smith, M. T., Leong, S., Kondo, K., Gipson, M., Rochon, P. J., Gupta, R., Messersmith, W., Purcell, T., & Durham, J. (2013). Metaanalysis of survival, complications, and imaging response following chemotherapy-based transarterial therapy in patients with unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma. *Journal of Vascular and Interventional Radiology: JVIR*, 24(8), 1218–1226. <https://doi.org/10.1016/J.JVIR.2013.03.019>
- Raynaud, P., Carpentier, R., Antoniou, A., & Lemaigre, F. P. (2011). Biliary differentiation and bile duct morphogenesis in development and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(2), 245–256. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2009.07.020>
- Reddy, R. C., Srirangam, A., Reddy, K., Chen, J., Gangireddy, S., Kalemkerian, G. P., Standiford, T. J., & Keshamouni, V. G. (2008). Chemotherapeutic drugs induce PPAR-gamma expression and show sequence-specific synergy with PPAR-gamma ligands in inhibition of non-small cell lung cancer. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 10(6), 597–603. <https://doi.org/10.1593/NEO.08134>
- Redwan, E. R. M. (2009). Animal-derived pharmaceutical proteins. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, 30(3), 262–290. <https://doi.org/10.1080/15321810903084400>
- Ren, L., Xiao, L., Hu, J., Li, Z., & Wang, Z. (2007). MDR1 and MDR3 genes and drug resistance to cisplatin of ovarian cancer cells. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences = Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ying De Wen Ban = Huazhong Keji Daxue Xuebao. Yixue Yingdewen Ban*, 27(6), 721–724. <https://doi.org/10.1007/S11596-007-0627-7>

- Renga, B., Migliorati, M., Mencarelli, A., Cipriani, S., D'Amore, C., Distrutti, E., & Fiorucci, S. (2011). Farnesoid X receptor suppresses constitutive androstane receptor activity at the multidrug resistance protein-4 promoter. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1809(3), 157–165. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGRM.2011.01.008>
- Ros, J. E., Libbrecht, L., Geuken, M., Jansen, P. L. M., & Roskams, T. A. D. (2003). High expression of MDR1, MRP1, and MRP3 in the hepatic progenitor cell compartment and hepatocytes in severe human liver disease. *The Journal of Pathology*, 200(5), 553–560. <https://doi.org/10.1002/PATH.1379>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(APR). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00172>
- Rosenfeld, J. M., Vargas, R., Xie, W., & Evans, R. M. (2003). Genetic profiling defines the xenobiotic gene network controlled by the nuclear receptor pregnane X receptor. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 17(7), 1268–1282. <https://doi.org/10.1210/ME.2002-0421>
- Rudin, D., Li, L., Niu, N., Kalari, K., Gilbert, J., Ames, M., & Wang, L. (2011). Gemcitabine Cytotoxicity: Interaction of Efflux and Deamination. *Journal of Drug Metabolism & Toxicology*, 2(107). <https://doi.org/10.4172/2157-7609.1000107>
- Runyon, J. R., Nilsson, L., Alftrén, J., & Bergenståhl, B. (2013). Characterization of oat proteins and aggregates using asymmetric flow field-flow fractionation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(21), 6649–6655. <https://doi.org/10.1007/S00216-013-7115-7>
- Ruseska, I., & Zimmer, A. (2020). Internalization mechanisms of cell-penetrating peptides. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11, 101. <https://doi.org/10.3762/BJNANO.11.10>
- Sartoris, R., Gregory, J., Burgio, M., Ronot, M., & V, V. v. (2021). HCC advances in diagnosis and prognosis: Digital and Imaging. *Liver International : Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 41 Suppl 1(S1), 73–77. <https://doi.org/10.1111/LIV.14865>
- Satyananda, V., Oshi, M., Tokumaru, Y., Maiti, A., Hait, N., Matsuyama, R., Endo, I., & Takabe, K. (2021). Sphingosine 1-phosphate (S1P) produced by sphingosine kinase 1 (SphK1) and exported via ABCC1 is related to hepatocellular carcinoma (HCC) progression. *American Journal of Cancer Research*, 11(9), 4394–4407. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34659894/>
- Savaraj, N., Wu, C., Wangpaichitr, M., Kuo, M., Lampidis, T., Robles, C., Furst, A., & Feun, L. (2003). Overexpression of mutated MRP4 in cisplatin resistant small cell lung cancer cell line: collateral sensitivity to azidothymidine - PubMed. *Int J Oncol*, 23(1), 173–179. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12792791/>
- Schimpf, M. E., Caldwell, K., & Giddings, J. C. (2000). *Field flow fractionation handbook*. 592.
- Schirmacher, V. (2019). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *International Journal of Oncology*, 54(2), 407. <https://doi.org/10.3892/IJO.2018.4661>

- Schulze, K., Imbeaud, S., Letouzé, E., Alexandrov, L., Calderaro, J., Rebouissou, S., Couchy, G., Meiller, C., Shinde, J., Soysouvanh, F., Calatayud, A., Pinyol, R., Pelletier, L., C. B. C., **Laurent, A., Blanc, J., Mazzaferro, V., Calvo, F., Villanueva, A., ... Zucman-Rossi, J.** (2015). Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nature Genetics*, 47(5), 505–511. <https://doi.org/10.1038/NG.3252>
- Scoazec, J. Y., Bringuier, A. F., Medina, J. F., Martínez-Ansó, E., Veissiere, D., Feldmann, G., & Housset, C. (1997). The plasma membrane polarity of human biliary epithelial cells: in situ immunohistochemical analysis and functional implications. *Journal of Hepatology*, 26(3), 543–553. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(97\)80419-9](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(97)80419-9)
- Sekiya, S., & Suzuki, A. (2012). Intrahepatic cholangiocarcinoma can arise from Notch-mediated conversion of hepatocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(11), 3914–3918. <https://doi.org/10.1172/JCI63065>
- Shaib, Y., & El-Serag, H. (2004). The epidemiology of cholangiocarcinoma. *Seminars in Liver Disease*, 24(2), 115–125. <https://doi.org/10.1055/S-2004-828889>
- Shen, T., Kuang, Y. H., Ashby, C. R., Lei, Y., Chen, A., Zhou, Y., Chen, X., Tiwari, A. K., Hopper-Borge, E., Ouyang, J., & Chen, Z. S. (2009). Imatinib and nilotinib reverse multidrug resistance in cancer cells by inhibiting the efflux activity of the MRP7 (ABCC10). *PLoS One*, 4(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0007520>
- Shibayama, Y., Nakano, K., Maeda, H., Taguchi, M., Ikeda, R., Sugawara, M., Iseki, K., Takeda, Y., & Yamada, K. (2011). Multidrug resistance protein 2 implicates anticancer drug-resistance to sorafenib. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 34(3), 433–435. <https://doi.org/10.1248/BPB.34.433>
- Shin, D. J., & Wang, L. (2019). Bile Acid-Activated Receptors: A Review on FXR and Other Nuclear Receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 256, 51–72. https://doi.org/10.1007/164_2019_236
- Shroff, R. T., Kennedy, E. B., Bachini, M., Bekaii-Saab, T., Crane, C., Edeline, J., El-Khoueiry, A., Feng, M., Katz, M. H. G., Primrose, J., Soares, H. P., Valle, J. W., & Maithel, S. K. (2019). Adjuvant Therapy for Resected Biliary Tract Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 37(12), 1015–1027. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.02178>
- Sia, D., Hoshida, Y., Villanueva, A., Roayaie, S., Ferrer, J., Tabak, B., Peix, J., Sole, M., Tovar, V., Alsinet, C., Cornella, H., Klotzle, B., Fan, J. B., Cotsoglou, C., Thung, S. N., Fuster, J., Waxman, S., Garcia-Valdecasas, J. C., **Bruix, J., ... Llovet, J. M.** (2013). Integrative Molecular Analysis of Intrahepatic Cholangiocarcinoma Reveals 2 Classes That Have Different Outcomes. *Gastroenterology*, 144(4), 829. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2013.01.001>
- Simon, D., Aden, D. P., & Knowles, B. B. (1982). Chromosomes of human hepatoma cell lines. *International Journal of Cancer*, 30(1), 27–33. <https://doi.org/10.1002/IJC.2910300106>

- Simonetti, R., Cammà, C., Fiorello, F., Politi, F., D'Amico, G., & Pagliaro, L. (1991). Hepatocellular carcinoma. A worldwide problem and the major risk factors. *Digestive Diseases and Sciences*, 36(7), 962–972. <https://doi.org/10.1007/BF01297149>
- Si-Tayeb, K., Lemaigre, F. P., & Duncan, S. A. (2010). Organogenesis and development of the liver. *Developmental Cell*, 18(2), 175–189. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2010.01.011>
- Smith, A. J., van Helvoort, A., van Meer, G., Szabó, K., Welker, E., Szakács, G., Váradi, A., Sarkadi, B., & Borst, P. (2000). MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 23530–23539. <https://doi.org/10.1074/JBC.M909002199>
- Sogawa, C., Eguchi, T., Namba, Y., Okusha, Y., Aoyama, E., Ohyama, K., & Okamoto, K. (2021). Gel-Free 3D Tumoroids with Stem Cell Properties Modeling Drug Resistance to Cisplatin and Imatinib in Metastatic Colorectal Cancer. *Cells*, 10(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/CELLS10020344>
- Srimunta, U., Sawanyawisuth, K., Kraiklang, R., Pairojkul, C., Puapairoj, A., Titipungul, T., Hahnvanawong, C., Tassaneeyakul, W., Wongkham, C., Wongkham, S., & Vaeteewoottacharn, K. (2012). High expression of ABCC1 indicates poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 13 Suppl(SUPPL.1), 125–130. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.KKSuppl.125>
- Sripa, B., & Pairojkul, C. (2008). Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand. *Current Opinion in Gastroenterology*, 24(3), 349–356. <https://doi.org/10.1097/MOG.0B013E3282FBF9B3>
- Stano, N. M., & Patel, S. S. (2004). T7 lysozyme represses T7 RNA polymerase transcription by destabilizing the open complex during initiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 16136–16143. <https://doi.org/10.1074/JBC.M400139200>
- Stöckel, B., König, J., Nies, A. T., Cui, Y., Brom, M., & Keppler, D. (2000). Characterization of the 5'-flanking region of the human multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene and its regulation in comparison with the multidrug resistance protein 3 (MRP3) gene. *European Journal of Biochemistry*, 267(5), 1347–1358. <https://doi.org/10.1046/J.1432-1327.2000.01106.X>
- Südbeck, P., & Scherer, G. (1997). Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(44), 27848–27852. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.44.27848>
- Sugihara, J., Smirnova, I., Kasho, V., & Kaback, H. R. (2011). Sugar recognition by CscB and LacY. *Biochemistry*, 50(51), 11009. <https://doi.org/10.1021/BI201592Y>
- Synold, T. W., Dussault, I., & Forman, B. M. (2001). The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nature Medicine*, 7(5), 584–590. <https://doi.org/10.1038/87912>
- Szatmari, I., Vámosi, G., Brazda, P., Balint, B. L., Benko, S., Széles, L., Jeney, V., Özvegy-Laczka, C., Szántó, A., Barta, E., Balla, J., Sarkadi, B., & Nagy, L. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated ABCG2 expression confers cytoprotection to

- human dendritic cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(33), 23812–23823. <https://doi.org/10.1074/JBC.M604890200>
- Tabibian, J. H., Masyuk, A. I., Masyuk, T. v., O'Hara, S. P., & LaRusso, N. F. (2013). Physiology of cholangiocytes. *Comprehensive Physiology*, 3(1), 541–565. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120019>
- Tandia, M., Mhiri, A., Paule, B., Saffroy, R., Cailliez, V., Noé, G., Farinotti, R., & Bonhomme-Faivre, L. (2017). Correlation between clinical response to sorafenib in hepatocellular carcinoma treatment and polymorphisms of P-glycoprotein (ABCB1) and of breast cancer resistance protein (ABCG2): monocentric study. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 79(4), 759–766. <https://doi.org/10.1007/S00280-017-3268-Y>
- Teng, S., Jekerle, V., & Piquette-Miller, M. (2003). Induction of ABCC3 (MRP3) by pregnane X receptor activators. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 31(11), 1296–1299. <https://doi.org/10.1124/DMD.31.11.1296>
- Teng, S., & Piquette-Miller, M. (2005). The involvement of the pregnane X receptor in hepatic gene regulation during inflammation in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312(2), 841–848. <https://doi.org/10.1124/JPET.104.076141>
- Teng, S., & Piquette-Miller, M. (2007). Hepatoprotective role of PXR activation and MRP3 in cholic acid-induced cholestasis. *British Journal of Pharmacology*, 151(3), 367–376. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0707235>
- Terentiev, A. A., & Moldogazieva, N. T. (2006). Structural and functional mapping of alpha-fetoprotein. *Biochemistry. Biokhimiia*, 71(2), 120–132. <https://doi.org/10.1134/S0006297906020027>
- Thamavit, W., Kongkanuntn, R., Tiwawech, D., & Moore, M. A. (1987). Level of Opisthorchis infestation and carcinogen dose-dependence of cholangiocarcinoma induction in Syrian golden hamsters. *Virchows Archiv. B, Cell Pathology Including Molecular Pathology*, 54(1), 52–58. <https://doi.org/10.1007/BF02899196>
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I., & Willingham, M. C. (1987). Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21), 7735–7738. <https://doi.org/10.1073/PNAS.84.21.7735>
- Tian, Q., Zhang, J., Tan, T. M. C., Chan, E., Duan, W., Sui, Y. C., Boelsterli, U. A., Ho, P. C. L., Yang, H., Bian, J. S., Huang, M., Zhu, Y. Z., Xiong, W., Li, X., & Zhou, S. (2005). Human multidrug resistance associated protein 4 confers resistance to camptothecins. *Pharmaceutical Research*, 22(11), 1837–1853. <https://doi.org/10.1007/S11095-005-7595-Z>
- Tokumoto, N., Ikeda, S., Ishizaki, Y., Kurihara, T., Ozaki, S., Iseki, M., Shimizu, Y., Itamoto, T., Arihiro, K., Okajima, M., & Asahara, T. (2005). Immunohistochemical and mutational analyses of Wnt signaling components and target genes in intrahepatic cholangiocarcinomas - PubMed. *Int J Oncol*, 27(4), 973–980. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16142313/>
- Tran, E., Turcotte, S., Gros, A., Robbins, P. F., Lu, Y. C., Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Somerville, R. P., Hogan, K., Hinrichs, C. S., Parkhurst, M. R., Yang, J. C., & Rosenberg, S.

- A. (2014). Cancer Immunotherapy Based on Mutation-Specific CD4+ T Cells in a Patient with Epithelial Cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6184), 641. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1251102>
- Tsunedomi, R., Iizuka, N., Hamamoto, Y., Uchimura, S., Miyamoto, T., Tamesa, T., Okada, T., Takemoto, N., Takashima, M., Sakamoto, K., Hamada, K., Yamada-Okabe, H., & Oka, M. (2005). Patterns of expression of cytochrome P450 genes in progression of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *International Journal of Oncology*, 27(3), 661–667. <https://doi.org/10.3892/ijo.27.3.661>
- U.S. Department of Health and Human Services, F. and D. A. C. for B. E. and R. (2001). Guidance for human somatic cell therapy and gene therapy. *Human Gene Therapy*, 12(3), 303–314. <https://doi.org/10.1089/10430340150218431>
- U.S. Food & Drug Administration. (2018, August 16). *FDA approves lenvatinib for unresectable hepatocellular carcinoma | FDA*. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-lenvatinib-unresectable-hepatocellular-carcinoma>
- Valle, J. W., Borbath, I., Khan, S. A., Huguet, F., Gruenberger, T., Arnold, D., & On behalf of the ESMO Guidelines Committee. (2016). Biliary cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 27(suppl 5), v28–v37. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDW324>
- Valle, J. W., Furuse, J., Jitlal, M., Beare, S., Mizuno, N., Wasan, H., Bridgewater, J., & Okusaka, T. (2014). Cisplatin and gemcitabine for advanced biliary tract cancer: a meta-analysis of two randomised trials. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 25(2), 391–398. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDT540>
- Valle, J. W., Wasan, H., Palmer, D. H., Cunningham, D., Anthoney, A., Maraveyas, A., Madhusudan, S., Iveson, T., Hughes, S., Pereira, S. P., Roughton, M., & Bridgewater, J. (2010). Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *The New England Journal of Medicine*, 362(14), 1273–1281. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA0908721>
- Vincent, P., Zhang, X., Chen, C., Lantz, L., Rembiesa, C., & Polony, B. (2003). *Preclinical chemotherapy with the Raf kinase inhibitor BAY 43-9006 in combination with gefitinib, venorelbine, gemcitabine or doxorubicin*.
- Vivès, E., Brodin, P., & Lebleu, B. (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(25), 16010–16017. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.25.16010>
- Wahlund, K. Gustav., & Giddings, J. C. (1987). Properties of an asymmetrical flow field-flow fractionation channel having one permeable wall. *Analytical Chemistry*, 59(9), 1332–1339. <https://doi.org/10.1021/AC00136A016>
- Wakamatsu, T., Nakahashi, Y., Hachimine, D., Seki, T., & Okazaki, K. (2007). The combination of glycyrrhizin and lamivudine can reverse the cisplatin resistance in hepatocellular

- carcinoma cells through inhibition of multidrug resistance-associated proteins - PubMed. *Int J Oncol*, 31(6), 1465–1472. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17982673/>
- Wang, H., He, L., Ma, F., Regan, M. M., Balk, S. P., Richardson, A. L., & Yuan, X. (2013). SOX9 regulates low density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6) and T-cell factor 4 (TCF4) expression and Wnt/ β -catenin activation in breast cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 288(9), 6478–6487. <https://doi.org/10.1074/JBC.M112.419184/ATTACHMENT/1BF4BE35-7C98-4CEC-8A04-9340CD305A52/MMC1.PDF>
- Wang, T., Chen, Z., Zhu, Y., Pan, Q., Liu, Y., Qi, X., Jin, L., Jin, J., Ma, X., & Hua, D. (2015). Inhibition of Transient Receptor Potential Channel 5 Reverses 5-Fluorouracil Resistance in Human Colorectal Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(1), 448. <https://doi.org/10.1074/JBC.M114.590364>
- Wang, W. (1999). Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, 185(2), 129–188. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00152-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00152-0)
- Wang, W., Hayashi, Y., Ninomiya, T., Ohta, K., Nakabayashi, H., Tamaoi, T., & Itoh, H. (1998). Expression of HNF-1 alpha and HNF-1 beta in various histological differentiations of hepatocellular carcinoma - PubMed. *J Pathol*, 184(3), 272–278. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9614379/>
- Wang, X., Campos, C. R., Peart, J. C., Smith, L. K., Boni, J. L., Cannon, R. E., & Miller, D. S. (2014). Nrf2 upregulates ATP binding cassette transporter expression and activity at the blood-brain and blood-spinal cord barriers. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(25), 8585–8593. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2935-13.2014>
- Wang, X. H., Zhang, S. F., Wu, H. Y., Gao, J., Wang, X. H., & Gao, T. H. (2021). SOX17 inhibits proliferation and invasion of neuroblastoma through CXCL12/CXCR4 signaling axis. *Cellular Signalling*, 87. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2021.110093>
- Weber, J. D., Taylor, L. J., Roussel, M. F., Sherr, C. J., & Bar-Sagi, D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nature Cell Biology*, 1(1), 20–26. <https://doi.org/10.1038/8991>
- WeiB, F., Hammer, H., Klein, K., Planatscher, H., Zanger, U., Norén, A., Wegler, C., Artursson, P., Joos, T., & Poetz, O. (2018). Direct Quantification of Cytochromes P450 and Drug Transporters-A Rapid, Targeted Mass Spectrometry-Based Immunoassay Panel for Tissues and Cell Culture Lysates. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 46(4), 387–396. <https://doi.org/10.1124/DMD.117.078626>
- Wu, Y. M., Su, F., Kalyana-Sundaram, S., Khazanov, N., Ateeq, B., Cao, X., Lonigro, R. J., Vats, P., Wang, R., Lin, S. F., Cheng, A. J., Kunju, L. P., Siddiqui, J., Tomlins, S. A., Wyngaard, P., **Sadis, S., Roychowdhury, S., Hussain, M. H., Feng, F. Y., ... Chinnaiyan, A. M.** (2013). Identification of targetable FGFR gene fusions in diverse cancers. *Cancer Discovery*, 3(6), 636–647. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0050>

- Xiao, H., Zheng, Y., Ma, L., Tian, L., & Sun, Q. (2021). Clinically-Relevant ABC Transporter for Anti-Cancer Drug Resistance. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.648407>
- Xie, Q. shi, Zhang, J. xin, Liu, M., Liu, P. hua, Wang, Z. jian, Zhu, L., Jiang, L., Jin, M. meng, Liu, X. nan, Liu, L., & Liu, X. dong. (2021). Short-chain fatty acids exert opposite effects on the expression and function of p-glycoprotein and breast cancer resistance protein in rat intestine. *Acta Pharmacologica Sinica*, 42(3), 470–481. <https://doi.org/10.1038/S41401-020-0402-X>
- Yadav, B., Wennerberg, K., Aittokallio, T., & Tang, J. (2015). Searching for Drug Synergy in Complex Dose–Response Landscapes Using an Interaction Potency Model. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13, 504. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2015.09.001>
- Yin, W., Xiang, D., Wang, T., Zhang, Y., Pham, C. v., Zhou, S., Jiang, G., Hou, Y., Zhu, Y., Han, Y., Qiao, L., Tran, P. H. L., & Duan, W. (2021). The inhibition of ABCB1/MDR1 or ABCG2/BCRP enables doxorubicin to eliminate liver cancer stem cells. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-021-89931-9>
- Yothaisong, S., Thanee, M., Namwat, N., Yongvanit, P., Boonmars, T., Puapairoj, A., & Loilome, W. (2014). Opisthorchis viverrini infection activates the PI3K/ AKT/PTEN and Wnt/ β -catenin signaling pathways in a Cholangiocarcinogenesis model. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 15(23), 10463–10468. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.23.10463>
- Yousefi, B., Azimi, A., Majidinia, M., Shafiei-Irannejad, V., Badalzadeh, R., Baradaran, B., Zarghami, N., & Samadi, N. (2017). Balaglitazone reverses P-glycoprotein-mediated multidrug resistance via upregulation of PTEN in a PPAR γ -dependent manner in leukemia cells. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 39(10), 1–11. <https://doi.org/10.1177/1010428317716501>
- Yuan, J., Lv, H., Peng, B., Wang, C., Yu, Y., & He, Z. (2009). Role of BCRP as a biomarker for predicting resistance to 5-fluorouracil in breast cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 63(6), 1103–1110. <https://doi.org/10.1007/S00280-008-0838-Z>
- Zaman, G. J. R., Flens, M. J., van Leusden, M. R., de Haas, M., Mulder, H. S., Lankelma, J., Pinedo, H. M., Scheper, R. J., Baas, F., Broxterman, H. J., & Borst, P. (1994). The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(19), 8822. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.19.8822>
- Zhang, G. F., Qiu, L., Yang, S. L., Wu, J. C., & Liu, T. J. (2020). Wnt/ β -catenin signaling as an emerging potential key pharmacological target in cholangiocarcinoma. *Bioscience Reports*, 40(3). <https://doi.org/10.1042/BSR20193353>
- Zhang, G., Wang, Z., Qian, F., Zhao, C., & Sun, C. (2015). Silencing of the ABCC4 gene by RNA interference reverses multidrug resistance in human gastric cancer. *Oncology Reports*, 33(3), 1147–1154. <https://doi.org/10.3892/OR.2014.3702>

- Zhang, J., Zhang, X., Li, J., & Song, Z. (2020). Systematic analysis of the ABC transporter family in hepatocellular carcinoma reveals the importance of ABCB6 in regulating ferroptosis. *Life Sciences*, 257. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2020.118131>
- Zhang, L., Leng, Q., & Mixson, A. J. (2005). Alteration in the IL-2 signal peptide affects secretion of proteins in vitro and in vivo. *The Journal of Gene Medicine*, 7(3), 354–365. <https://doi.org/10.1002/JGM.677>
- Zhang, X., Wang, T., Yang, Y., Li, R., Chen, Y., Li, R., Jiang, X., & Wang, L. (2020). Tanshinone IIA attenuates acetaminophen-induced hepatotoxicity through HOTAIR-Nrf2-MRP2/4 signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 130. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2020.110547>
- Zhang, X., Zhao, L., Li, X., Wang, X., Li, L., Fu, X., Sun, Z., Li, Z., Nan, F., Chang, Y., & Zhang, M. (2015). ATP-binding cassette sub-family C member 4 (ABCC4) is overexpressed in human NK/T-cell lymphoma and regulates chemotherapy sensitivity: Potential as a functional therapeutic target. *Leukemia Research*, 39(12), 1448–1454. <https://doi.org/10.1016/J.LEUKRES.2015.10.001>
- Zhang, Y., Bao, W., Wang, K., Lu, W., Wang, H., Tong, H., & Wan, X. (2016). SOX17 is a tumor suppressor in endometrial cancer. *Oncotarget*, 7(46), 76036–76046. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.12582>
- Zhang, Y. H., Wu, Q., Xiao, X. Y., Li, D. W., & Wang, X. P. (2010). Silencing MRP4 by small interfering RNA reverses acquired DDP resistance of gastric cancer cell. *Cancer Letters*, 291(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2009.10.003>
- Zhang, Y., Jiang, F. Z., Bao, W., Zhang, H., He, X. Y., Wang, H., & Wan, X. (2016). SOX17 increases the cisplatin sensitivity of an endometrial cancer cell line. *Cancer Cell International*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S12935-016-0304-7>
- Zheng, K., Zhu, X., Fu, S., Cao, G., Li, W.-Q., Xu, L., Chen, H., Wu, D., Yang, R., Wang, K., Liu, W., Wang, H., Bao, Q., Liu, M., Hao, C., Shen, L., Xing, B., & Wang, X. (2022). Sorafenib Plus Hepatic Arterial Infusion Chemotherapy versus Sorafenib for Hepatocellular Carcinoma with Major Portal Vein Tumor Thrombosis: A Randomized Trial. *Radiology*. <https://doi.org/10.1148/RADIOL.211545>
- Zhong, L., Li, Y., Xiong, L., Wang, W., Wu, M., Yuan, T., Yang, W., Tian, C., Miao, Z., Wang, T., & Yang, S. (2021). Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/S41392-021-00572-W>
- Zhou, S.-F., Wang, L.-L., Di, Y., Xue, C., Duan, W., Li, C., & Li, Y. (2008). Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Current Medicinal Chemistry*, 15(20), 1981–2039. <https://doi.org/10.2174/092986708785132870>
- Zhou, W., Wang, K., Wang, J., Qu, J., Du, G., & Zhang, Y. (2019). SOX17 Inhibits Tumor Metastasis Via Wnt Signaling In Endometrial Cancer. *OncoTargets and Therapy*, 12, 8275–8286. <https://doi.org/10.2147/OTT.S220536>

BIBLIOGRAFÍA

- Zhu, Q., & Center, M. (1994). Cloning and sequence analysis of the promoter region of the MRP gene of HL60 cells isolated for resistance to adriamycin - PubMed. *Cancer Res*, 54(16), 4488–4492. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8044800/>
- Zimmermann, C., van de Wetering, K., van de Steeg, E., Wagenaar, E., Vens, C., & Schinkel, A. H. (2008). Species-dependent transport and modulation properties of human and mouse multidrug resistance protein 2 (MRP2/Mrp2, ABCC2/Abcc2). *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 36(4), 631–640. <https://doi.org/10.1124/DMD.107.019620>
- Zimmermann, G. R., Lehár, J., & Keith, C. T. (2007). Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. *Drug Discovery Today*, 12(1–2), 34–42. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2006.11.008>
- Zou, L., Peng, Q., Wang, P., & Zhou, B. (2017). Progress in Research and Application of HIV-1 TAT-Derived Cell-Penetrating Peptide. *The Journal of Membrane Biology*, 250(2), 115–122. <https://doi.org/10.1007/S00232-016-9940-Z>

