

FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA



VNiVERSiDAD
DE SALAMANCA

CARACTERIZACIÓN DEL RESISTOMA EN EL ADENOCARCINOMA
GÁSTRICO.
NUEVAS ESTRATEGIAS DE QUIMIOSENSIBILIZACIÓN

TESIS DOCTORAL

Laura Pérez Silva

2022

FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

CARACTERIZACIÓN DEL RESISTOMA EN EL ADENOCARCINOMA
GÁSTRICO.
NUEVAS ESTRATEGIAS DE QUIMIOSENSIBILIZACIÓN

Memoria presentada por Dña. Laura Pérez Silva para optar al Título de
Doctor por la Universidad de Salamanca

Salamanca, 25 de Marzo 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 del resistoma en el adenocarcinoma gástrico. Nuevas estrategias de quimiosensibilización" presentada por Dña. Laura Pérez Silva 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, el Dr. D. Óscar Briz Sánchez, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, y la Dra. Dña. Elisa Herráez Aguilar, Profesora Contratada Doctor del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, y bajo la tutorización de la Dra. Dña. María Concepción Pérez Melero Profesora Titular del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día 25 de marzo de dos mil veintidós.



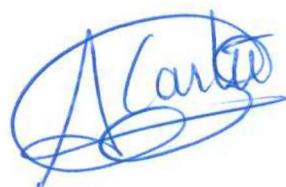
Fdo. José Juan García Marín

Dña. MARÍA ÁNGELES CASTRO GONZÁLEZ, COORDINADORA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN FARMACIA Y SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "Caracterización del resistoma en el adenocarcinoma gástrico. Nuevas estrategias de quimiosensibilización" presentada por Dña. Laura Pérez Silva 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, el Dr. D. Óscar Briz Sánchez, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, y la Dra. Dña. Elisa Herráez Aguilar, Profesora Contratado Doctor del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, y bajo la tutorización de la Dra. Dña. María Concepción Pérez Melero Profesora Titular del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día 25 de marzo de dos mil veintidós.



Fdo. María Ángeles Castro González

D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA, D. ÓSCAR BRIZ SÁNCHEZ, PROFESOR CONTRATADO DOCTOR 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 del resistoma en el adenocarcinoma gástrico. Nuevas estrategias de quimiosensibilización" presentada por Dña. Laura Pérez Silva 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 25 de marzo de dos mil veintidós.



Fdo. José Juan García Marín



Fdo. Oscar Briz Sánchez



Fdo. Elisa Herráez Aguilar

Dña. MARÍA CONCEPCIÓN PÉREZ MELERO, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "Caracterización del resistoma en el adenocarcinoma gástrico. Nuevas estrategias de quimiosensibilización" presentada por Dña. Laura Pérez Silva para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su tutorización 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 25 de marzo de dos mil veintidós.



Fdo. María Concepción Pérez Melero

FINANCIACIÓN

La doctoranda ha disfrutado durante la realización de esta Tesis Doctoral de un Contrato Contratos Predoctoral de Formación en Investigación en Salud (PFIS), del Instituto de Salud Carlos III (FI17/00149) financiado por el del Instituto de Salud Carlos III y el Fondo Social Europeo.

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

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

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

Universidad de Salamanca. Programa I para la financiación de grupos de Investigación. Proyectos de investigación. Modalidad C2. ”Papel de las oxidorreductasas en las alteraciones hormonales asociadas a la colestasis intrahepática gestacional. Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas”. Investigador Principal: Elisa Herráez Aguilar. Periodo: 2019-2021.

Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III. Proyectos de investigación en salud (AES 2019). Modalidad proyectos en salud cofinanciados con Fondos FEDER. Proyecto PI19/00819 “Interés pronóstico y terapéutico de las proteínas SLC y ABC en adenocarcinomas hepáticos y gastrointestinales”. Investigador Principal: José Juan García Marín, Óscar Briz Sánchez (coIP). Periodo: 2020-2022.

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

Consejería de Educación, Junta de Castilla y León. 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.

PUBLICACIONES

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

Al-Abdulla, R., **Perez-Silva, L.**, Abete, L., Romero, M.R., Briz, O., Marin, J.J.G. Unraveling 'The Cancer Genome Atlas' information on the role of SLC transporters in anticancer drug uptake. *Expert review of clinical pharmacology*. 2019; 12: 329-341.

Perez-Silva, L., Al-Abdulla, R., Lozano, E., Macias, R.I.R., Herraez, E., Abad, M., Segues, N., Bujanda, L., Briz, O., Marin, J.J.G. Sensitizing gastric adenocarcinoma to chemotherapy by pharmacological manipulation of drug transporters. *Biochemical pharmacology*. 2020; 171: 113682 (**Co-autoria**).

Briz, O., **Perez-Silva, L.**, Al-Abdulla, R., Abete, L., Reviejo, M., Romero, M.R., Marin, J.J.G. What "The Cancer Genome Atlas" database tells us about the role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in chemoresistance to anticancer drugs. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2019; 15: 577-593.

Marin, J.J.G., **Perez-Silva, L.**, Macias, R.I.R., Asensio, M., Peleteiro-Vigil, A., Sanchez-Martin, A., Cives-Losada, C., Sanchon-Sanchez, P., Sanchez De Blas, B., Herraez, E., Briz, O., Lozano, E. Molecular Bases of Mechanisms Accounting for Drug Resistance in Gastric Adenocarcinoma. *Cancers (Basel)*, 2020;12.

Así mismo, la doctoranda ha participado en otros proyectos de los que se han derivado las siguientes publicaciones:

Lozano, E., Asensio, M., **Perez-Silva, L.**, Banales, J.M., Briz, O., Marin, J.J.G. MRP3-Mediated Chemoresistance in Cholangiocarcinoma: Target for Chemosensitization Through Restoring SOX17 Expression. *Hepatology*. 2020; 72: 949-964.

Perez-Silva, L., Sanchez-Vicente, L., Molina-Alcaide, E., Marin, J.J.G., Herraez, E. Evaluation of the promiscuous component of several bacterial export pumps TolC as a biomarker for toxic pollutants in feedstuffs. *Chemico-biological interactions*. 2019; 305: 195-202.

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

Pérez-Silva, L., Al-Abdulla, R., Lozano, E., Herráez, E., Macías, R.I.R., Abad, M., Segués, N., Bujanda, L., Briz, O., Marín, J.J.G. Inhibición del transporte de fármacos antitumorales por bombas ABC como estrategia de quimiosensibilización en el cáncer gástrico. 43rd Annual meeting of the Spanish Society of Biochemistry and Molecular Biology (SEBBM). Formato online, 19-22/07/2021. Tipo de comunicación: poster. Book of abstracts 2021 p.34.

González-Santiago, JM., **Pérez-Silva, L.**, Al-Abdulla, R., Lozano, E., Herráez, E., Macías, R.I.R., Abad, M., Martín-Arribas, M.I., Segués, N., Bujanda, L., Briz, O., Marín, J.J.G. Sensibilización farmacológica a la quimioterapia en el Adenocarcinoma Gástrico. LXXX Congreso de la Sociedad Española de Patología Digestiva (SEPD) Formato online, 6-7/05/2021. Tipo de comunicación: oral.

Pérez-Silva, L., Al-Abdulla, R., Lozano, E., Herráez, E., Macías, R.I.R., Abad, M., Segués, N., Bujanda, L., Briz, O., Marín, J.J.G. Sensibilización farmacológica a la quimioterapia en el adenocarcinoma gástrico. XIV Jornadas Científicas CIBERehd. Formato online, 9-11/11/2020. Tipo de comunicación: poster.

Pérez-Silva, L., Al-Abdulla, R., Espinosa-Escudero, R.A., Lozano, E., Herráez, E., Macías, R.I.R., Segués, N., Abad, M., Briz, O., Bujanda, L., Marín, J.J.G. Papel de las proteínas exportadoras de fármacos ABCC4 y ABCC5 en la quimiorresistencia del cáncer gástrico. 22^a Reunión anual de la Asociación Española de Gastroenterología (AEG). Madrid, 20-22/03/2019. Tipo de comunicación: poster. Publicado en: Gastroenterología y Hepatología. 42, ISSN 0210-5705.

Pérez-Silva, L., Espinosa-Escudero, R.A., Lozano, E., Al-Abdulla, R., Macías, R.I.R., Herráez, E., Bañales, J.M., Bujanda, L., Briz, O., Serrano, M.A., Marín, J.J.G. Papel de las bombas ABCC4 y ABCC5 en la quimiorresistencia del cáncer gástrico. 41 Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). Santander, 10-13/09/2018. Tipo de comunicación: poster.

La doctoranda ha participado en otros proyectos de los que se han derivado entre otras, las siguientes participaciones en congresos:

Lozano, E., Asensio, M., **Pérez-Silva, L.**, Sanchón-Sánchez, P., Reviejo, M., Serrano, M.A., Bañales, J.M., Briz, O., Marín, J.J.G. MRP3-mediated chemoresistance in cholangiocarcinoma: Target for chemosensitization through restoring SOX17 expression. XIV Jornadas Científicas CIBERehd. Formato online, 9-11/11/2020. Tipo de comunicación: poster.

Macias, R.IR., Lozano, E., Asensio, M., **Pérez-Silva, L.**, Bañales, J.M., Monte, M.J., Romero, M.R., Herráez, E., Briz, O., Marín, J.J.G. Role of the tandem SOX17-MRP3 in the poor response of cholangiocarcinoma to chemotherapy. 2020 Annual Conference Cholangiocarcinoma Foundation. Formato online, 22-24/07/2020. Tipo de comunicación: poster.

Asensio, M., Lozano, E., **Pérez-Silva, L.**, Monte, M.J., Herráez, E., Bañales, J.M., Briz, O., Marín, J.J.G. MRP3-mediated chemoresistance in cholangiocarcinoma: Target for chemosensitization through restoring SOX17 expression. Workshop: "Primary Liver Cancer - Emerging Concepts and Novel Treatments". Mainz (Alemania), 13-14/02/2020. Tipo de comunicación: poster. Libro de abstracts 2020, página 43 (abstract nº 3).

Lozano, E., Asensio, M., **Pérez-Silva, L.**, Bañales, J.M., Monte, M.J., Romero, M.R., Herráez, E., Briz, O., Marín, J.J.G. Role of the tandem SOX17-MRP3 in the poor response of cholangiocarcinoma to chemotherapy. EASL Liver Cancer Summit 2020 Praga (República Checa), 6-8/02/2020. Tipo de comunicación: poster. Abstract book Liver Cancer Summmit 2020, p. 133, 2020.

Lozano, E., Asensio, M., **Pérez-Silva, L.**, Bañales, J.M., Briz, O., Marín, J.J.G. SOX17 reduce la expresión de la bomba exportadora de fármacos MRP3 en el colangiocarcinoma y aumenta su respuesta a la quimioterapia. 1^a Reunión de Hepatología Translacional. Status Quo y nuevos horizontes en el estudio del hígado. AEEH. San Sebastián, 4-5/10/2019. Tipo de comunicación: oral.

Asensio, M., Lozano, E., Cives-Losada C., Carrillo, J., Abete, L., Briz, O., Al Abdulla, R., Alonso-Peña, M., **Pérez-Silva, L.**, Armengol, C., Marín, J.J.G., Macías R.I.R. Role of transportome in chemoresistance of hepatoblastoma. XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF). Cádiz (España), 18-21/09/2018. Tipo de comunicación: póster. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 71: 90.

Monte, M.J., Blázquez, A.M.G., Macías, R.I.R., Cives-Losada C., Iglesia, A., **Pérez-Silva, L.**, Peleteiro-Vigil, A., Romero, M.R., Pérez, M.J., Marín, J.J.G. Bile acid traffic across the mammary gland: Implications on lactation during maternal cholestasis. XXV International Bile Acid Meeting: Bile Acids in Health and Disease 2018. Dublin (Irlanda), 6-7/07/2018. Tipo de comunicación: póster.

Lozano, E., Briz, O., Asensio, M., **Pérez-Silva, L.**, Monte, M.J., Pérez, M.J., Herráez, E., Romero, M.R., Serrano, M.A., Macías, R.I.R., Bujanda, L., Bañales, J.M., Marín, J.J.G. Sensitization of cholangiocarcinoma to chemotherapy by SOX17-induced down-regulation of drug export pumps ABCC3 and ABCG2. The international liver congress, EASL. París (Francia), 11-15/04/2018. Tipo de comunicación: póster. *Journal of Hepatology*, 2018, 68(1): S679.

Lozano, E., Asensio, M., Briz, O., **Pérez-Silva, L.**, Herráez, E., Romero, M.R., Pérez, M.J., Al Abdulla, Alonso-Peña, M., Peleteiro-Vigil, A., Jiménez, F., Monte, M.J., Bujanda, L., Bañales, J.M., Marín, J.J.G. Sensibilización del colangiocarcinoma a la quimioterapia por represión de las bombas exportadoras de fármacos ABCC3 y ABCG2 inducida por la sobreexpresión de SOX17. 43º Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH) Madrid (España), 21-23/02/2018. Tipo de comunicación: póster. *Gastroenterología y Patología*, Volumen 41, Especial Congreso 1, Febrero 2018.

Asensio, M., Lozano, E., **Pérez-Silva, L.**, Monte, M.J., Peleteiro-Vigil, A., Bujanda, J.M., Bañales, J.M., Briz, O., Marín, J.J.G. SOX17-induced selective enhanced sensitivity of cholangiocarcinoma cells to antitumor drugs by down-regulation of MRP3 and BCRP export pumps. The 1st FEBS3+ Joint Meeting of the French-Portuguese-Spanish Biochemical and Molecular Biology Societies, XL SEBBM Congress. Entidad organizadora: Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM) y Federación Europea de

Sociedades Bioquímicas (FEBS). Barcelona (España), 23-26/10/2017. Tipo de comunicación: oral.

Lozano, E., Briz, O., Asensio, M., **Pérez-Silva, L.**, Monte, M.J., Bujanda, J.M., Bañales, J.M., Marín, J.J.G. SOX17 selectively sensitizes cholangiocarcinoma cells to anticancer drugs by interfering with the promoter activation of export pumps ABCC3 and ABCG2. EASL Monothematic Conference “Cholangiocytes in health and disease: from basic science to novel treatments”. Oslo (Noruega), 9-10/06/2017. Tipo de comunicación: póster.

AGRADECIMIENTOS

Tras escribir todo lo que se puede ver en las páginas posteriores, me doy cuenta de que he dejado para el final quizás la parte más difícil, y es resumir en pocas líneas todo el agradecimiento hacia las personas que me han acompañado durante estos años, tanto dentro como fuera del laboratorio, y que han allanado, cada uno a su manera, el camino que me ha traído hasta aquí.

En primer lugar a mis directores de Tesis,

Al Dr. José Juan García Marín, por haber confiado en mí y haberme brindado la oportunidad de pertenecer a este equipo no solo en una sino en dos ocasiones. Por tu dedicación a mi formación, y el apoyo recibido, no solo en lo profesional, sino también en lo personal.

Al Dr. Óscar Briz Sánchez, no imagino haber llegado hasta aquí sin todo el trabajo que has dedicado en los últimos años a mi formación. Gracias por sacar tiempo no solo para experimentos sino también para miles de charlas de entender resultados. Eres, sin duda, la estrella polar de los Predocs, no solo nos guías, sino que eres capaz de mostrarnos la luz cuando solo vemos sombras, haces que todo sea más fácil.

A la Dra. Elisa Herráez Aguilar, por tu confianza, creer en mí y valorar mi trabajo. Por ese artemiento que al final nos ha llevado a encontrar cosas inesperadas y que no habrían ocurrido sin ti. Gracias por los miles de consejos a lo largo de estos años y las grandes ideas que han ayudado a dar forma a esta Tesis.

Al resto del grupo Hevepharm,

A la Dra. M^a Ángeles Serrano, por estar siempre en todo, ser capaz de solucionar cualquier trámite administrativo por difícil que parezca. Por tu capacidad de esfuerzo, mostrando que con trabajo se puede llegar donde se quiera.

A la Dra. M^a Jesús Monte, por ser esa luchadora nata contra la entropía que podría consumirnos en el laboratorio. Porque cada día nos enseñas que con orden todo es más sencillo.

A la Dra. Rocío I. R. Macías, nunca olvidaré el día que me “fichaste”, primer día del Máster, y llamada al despacho de la directora... siempre dispuesta a ayudar sacando tiempo para ello pese a estar en mil frentes.

A la Dra. Marta R. Romero, mi “compi” del banco de células. Gracias por todos tus consejos, por cuidar tanto a todos los del 118, y sobre todo por ser la otra mami, un ejemplo a seguir en un mundo donde la maternidad parece casi imposible.

A la Dra. Elisa Lozano, de tu mano di mis primeros pasos en un laboratorio, y fuiste tú quien me inculcaste las ganas de trabajar en ciencia. Me alegra que ahora sea a la inversa y seas tú quien me siga en la dura vida del Crossfitero. Gracias por ser esa compañera y amiga, dentro y fuera del laboratorio. Gracias por escuchar y aconsejarme.

A la Dra. Maitane Asensio, nuestra “lab manager”, y a la Dra. Marta Alonso, de vosotras tengo la experiencia de ver el final de la Tesis Doctoral, pero también me llevo unas grandes compañeras dispuestas a ayudar en lo que sea. Lo mismo puedo decir de la reciente Dra. Ana Peleteiro, mi compi desde el primer día, contigo empecé este camino, y casi a la vez lo terminamos.

Al Dr. Álvaro Gacho y a Ricky, el “chico de la banda”, los dos me habéis hecho las tardes en el 118 mucho más amenas, hemos pasado grandes momentos y risas en ese rincón del departamental, y en vosotros he encontrado grandes amigos.

A la Dra. Sara Ortiz, llegaste hace poco y nos trajiste nuevas ideas y mejoras; a Bea y a María, porque entrar al 129 y encontrarlos se traduce en salir de allí con ganas de comerse el mundo.

A Candela, siempre dispuesta a ayudar, poseedora de toda la información posible del laboratorio. Muchísimas gracias por tu ayuda incondicional todos estos años.

A Anabel, mi compañera del CRISPR, porque tu trabajo puso los cimientos a parte del mío, gracias por enseñarme tanto de esta técnica.

A Paula, mi compi de risas, la más rápida del laboratorio, que nada cambie tu manera de ver el mundo.

A Emilia, por tu alegría y positivismo, el laboratorio no sería lo mismo sin ti.

A aquellos que me dieron los mejores consejos cuando estaba lejos, gracias al Dr. Walter Kolch y al Dr. Jens Rauch del SBI de Dublín, que me ayudaron a encontrar el camino; y a mis tíos Marina y Puri que confiaron en mí y me apoyaron en mi salto al vacío.

A los Crossfitados, sin deporte la vida no es igual, pero sin los amigos que se crean es imposible vivirla con la misma intensidad,

A Diana y Raúl, porque con vosotros empezó todo, el origen de la piña, habéis sido parte de mi vida en los momentos más importantes y habéis dotado de significado a la palabra amistad.

A Merchán, Gorka, David, Sergio, Laurita, Javi, Irene y Moni, por las tardes en Villa Hiru, por los viajes y las tardes de piscina. Porque un WOD es menos duro cuando coincidimos y los latigazos, heridas, contracturas y moratones se llevan de otra manera cuando son compartidos.

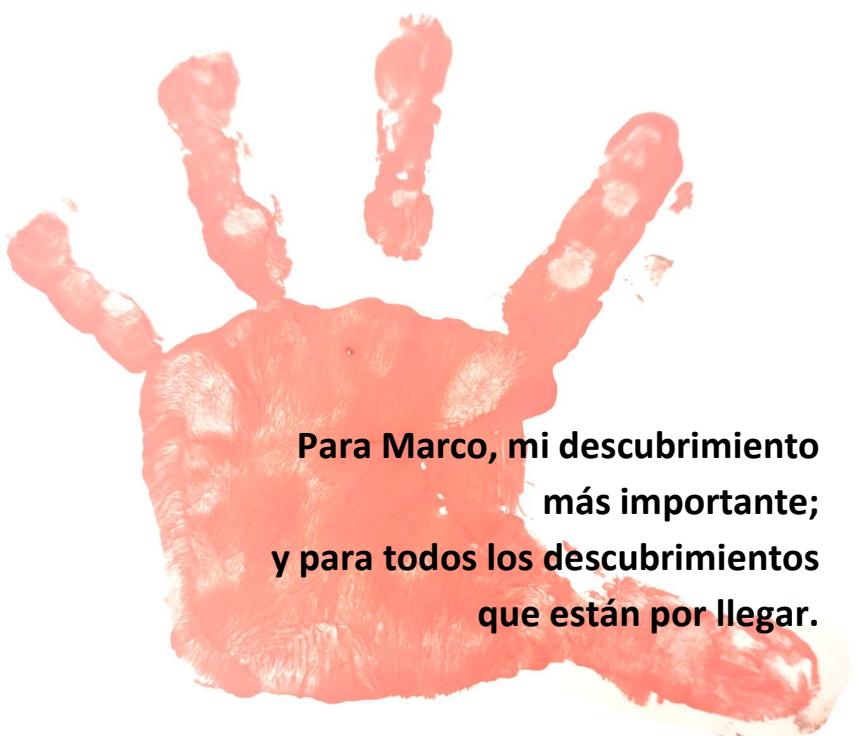
A mi familia,

A mis padres, sois los que me habéis traído hasta aquí, me habéis convertido en quien soy. Gracias por enseñarme a luchar por los sueños, gracias por haber estado a mi lado en cada paso, y estar siempre dispuestos a todo porque sea feliz.

A mi sister, porque Marina, eres mi compañera de vida, no me imagino mi vida sin tenerte cerquita, porque nadie como tú para ayudarme cuando tengo dudas, para apoyarme cuando lo he necesitado, por ver en mí más de lo que nadie ha visto.

A Alberto, por estar siempre, escucharme y soñar conmigo. Me has hecho fuerte cuando lo he necesitado, y sobre todo, me has enseñado a mirar todo con una nueva perspectiva. Gracias por embarcarte en este y otros mil viajes conmigo, y por ser ese incansable compañero de aventuras, el barco solo acaba de zarpar.

A Marco, lo mejor que me llevo de esta Tesis. Porque contigo he podido desconectar, sonreír y disfrutar cada día. Contigo he aprendido a dar importancia a las cosas que de verdad la tienen, y creo que no hay nada más difícil que eso.



**Para Marco, mi descubrimiento
más importante;
y para todos los descubrimientos
que están por llegar.**

ABREVIATURAS

5-FU: 5-Fluorouracilo

ABC: *ATP-binding cassette*

ABCC: Familia C de proteínas ABC

ACG: Adenocarcinoma gástrico

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ADNg: ADN genómico

AINE: Antiinflamatorio no esteroideo

ANOVA: Análisis de la varianza

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNsg: ARN guía

ATP: Adenosín trifosfato

BSA: Albúmina sérica bovina

CA: Antígeno carbohidratado

Cas9: CRISPR *asociated protein 9*

CEA: Antígeno carcinoembrionario

CF: Carboxifluoresceína

COI: Capecitabina, Oxaliplatino e Irinotecan

CRISPR: *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

DE: Desviación estándar

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle medium*

ECF: Epirrubicina, cisplatino, 5-FU

ECX: Epirrubicina, cisplatino, capecitabina

EEM: Error estándar de la media

EGFP: Enhanced green fluorescent protein

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

EOF: Epirrubicina, Oxaliplatino, 5-FU

EOX: Epirrubicina, oxaliplatino, capecitabina

F: Forward Primer para PCR

FBS: Suero bovino fetal

FLOT: 5-FU, Leucovorina, Oxaliplatino y Docetaxel

FOLFOX: Leucovorina cálcica, 5-Fluorouracilo y Oxaliplatino

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GIST: Tumores del estroma gastrointestinal

HCC: Carcinoma hepatocelular

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il-etanosulfónico

HER2: Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2

HGQT: Huella genética de quimiorresistencia tumoral

HPRT1: Hipoxantina fosforribosiltransferasa 1

IC₅₀: Concentración inhibitoria 50

IC₇₅: Concentración inhibitoria 75

IF: Inmunofluorescencia

IRES: Internal ribosome entry side

KO: Knockout

MDR: Resistencia a múltiples fármacos

MOI: Multiplicidad de infección

MPR: Mecanismo de farmacorresistencia

MRP: Proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos

NT: No tumoral

OATP: Polipéptido transportador de aniones orgánicos

OCT: Transportador de cationes orgánicos

OMS: Organización mundial de la Salud

pb: pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino

PG: Pepsinógeno

PGE: Edición genética programada

R: *Reverse Primer* para PCR

RIPA: *Radioimmunoprecipitation assay*

rpm: Revoluciones por minuto

RT-qPCR: Transcripción reversa y PCR cuantitativa

shARN: *short hairpin* ARN

SLC: Proteína transportadora de solutos

SNP: *Single nucleotide polymorphism*

T: Tumoral

TBS: Tampón Tris salino

TEM: Transición epitelial-mesenquimal

TGF-β: Factor de crecimiento transformante β

TKI: Inhibidor de tirosina quinasas

TLDA: *Taqman Low-Density Arrays*

TNF-α: Factor de necrosis tumoral α

TYMP: Timidina fosforilasa

UAF: Unidades arbitrarias de fluorescencia

VEGFR: Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular

VIM: Vimentina

WT: *Wild type*

ÍNDICE

1. Objetivos.....	1
2. Introducción.....	5
 2.1. EL ESTÓMAGO	7
 2.2 CÁNCER GÁSTRICO	9
2.2.1. Epidemiología.....	9
2.2.2. Clasificación.....	10
2.2.3. Etiología y patogenia del adenocarcinoma gástrico	12
2.2.4. Diagnóstico.....	19
2.2.5. Tratamiento.....	20
 2.3. MECANISMOS DE FARMACORRESISTENCIA	25
2.3.1. Transporte de fármacos (MPR-1).....	26
2.3.2. Metabolismo de fármacos (MPR-2)	28
2.3.3. Dianas farmacológicas (MPR-3)	30
2.3.4. Mecanismos de reparación del DNA (MPR-4).....	30
2.3.5. Cambios en el balance apoptosis/supervivencia celular (MPR-5)	32
2.3.6. Microambiente tumoral (MPR-6).....	34
2.3.7. Transformaciones fenotípicas (MPR-7).....	35
3. Materiales y Métodos.....	37
 3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	39
3.1.1. Muestras humanas.....	39
3.1.2. Modelos animales	39
3.1.3. Líneas celulares	41
3.1.4. Bacterias	41
 3.2. PRODUCTOS	41
 3.3. MEDIOS INSTRUMENTALES	44
 3.4. CULTIVOS CELULARES	48
3.4.1. Cultivo de células para estudios de expresión génica y estudios de funcionalidad de proteínas transportadoras	49
3.4.2. Cultivo de células para estudios de viabilidad celular.....	49

3.4.3. Edición genética mediante CRISPR/Cas9.....	49
3.4.4. Transducción de células con lentivirus.....	51
3.4.5. Cultivo de células para selección de clones	51
3.5. EXPERIMENTOS IN VIVO	51
3.6. CULTIVO DE BACTERIAS	53
3.6.1. Transformación de bacterias por choque térmico.....	53
3.6.2. Selección de colonias y crecimiento en medio líquido	53
3.6.3. Purificación del ADN plasmídico de cultivos de bacterias	54
3.7. PRODUCCIÓN DE VECTORES VIRALES	54
3.7.1. Fundamento	54
3.7.2. Producción de las partículas virales	54
3.7.3. Titulación por citometría de flujo.....	55
3.7.4. Determinación de la multiplicidad de infección (MOI) y condiciones de transducción óptimas.....	56
3.8. MÉTODOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR	56
3.8.1. PCR de alta fidelidad	56
3.8.2. Electroforesis en geles de agarosa no desnaturizante.....	57
3.8.3. Purificación del ADN contenido en geles de agarosa y reacciones enzimáticas.....	57
3.8.4. Purificación del ADN genómico procedente de cultivos celulares.....	57
3.8.5. Digestión con enzimas de restricción.....	57
3.8.6. Secuenciación de ADN.....	58
3.8.7. Ensayo de detección de escisiones en el genoma o test de la endonucleasa T7.....	58
3.9. TÉCNICAS DE CLONACIÓN	59
3.9.1. Clonación de la secuencia codificante de MRP4 en el plásmido de lentivirus pWPI.....	59
3.9.2. Generación de plásmidos portadores de sh-ARN (<i>short hairpin ARNs</i>)	60
3.9.3. Clonación de las guías para el sistema CRISPR/Cas9.....	61
3.10. ANALISIS DE LOS NIVELES DE ARNm POR RT-PCR CUANTITATIVA	62
3.10.1. Extracción y cuantificación del ARN total	62
3.10.2. Transcripción reversa (RT).....	62
3.10.3. Realización de la PCR cuantitativa (qPCR).....	62
3.10.4. Tarjetas microfluídicas	63
3.10.5. Cuantificación relativa.....	63
3.11. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTE	64
3.11.1. Soluciones empleadas	64

3.11.2. Obtención de homogenados de cultivos celulares	65
3.11.3. Obtención de crudos de membranas de cultivos celulares	65
3.11.4. Procedimiento	65
3.11.4.1. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	65
3.11.4.2. Transferencia.....	66
3.11.4.3. Inmunodetección	66
3.11.4.4. Revelado.....	66
3.12. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA	66
3.12.1. Soluciones empleadas.....	66
3.12.2. Preparación de las muestras	67
3.12.3. Inmunodetección	68
3.13. ESTUDIOS DE TRANSPORTE <i>IN VITRO</i>	68
3.13.1. Soluciones utilizadas	69
3.13.2. Experimentos de funcionalidad de las bombas MRPs y selección de clones.....	69
3.14. ESTUDIOS <i>IN SILICO</i>	69
3.14.1. Expresión de genes en muestras de pacientes	69
3.14.2. Diseño de cebadores	70
3.14.3. Diseño de oligonucleótidos para el sistema CRISPR/Cas9	73
3.15. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	75
3.15.1. Determinación de la viabilidad celular por el test del azul de Tripán	75
3.15.2. Determinación de la viabilidad celular por el test de MTT	75
3.15.3. Determinación de la viabilidad celular por el test de la sulforrodamina	76
3.15.4. Valoración de proteínas totales	77
3.15.5. Parámetros bioquímicos en suero	77
3.15.6. Medida de sorafenib por HPLC-MS/MS	77
3.16. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	78
4. Resultados y Discusión I: Quimiosensibilización Farmacológica del Adenocarcinoma Gástrico.....	79
4.1. ANTECEDENTES	81
4.2. RESULTADOS	84
4.2.1. Identificación de la huella genética de quimiorresistencia del ACG	84
4.2.2. Caracterización del transportoma de una línea celular de ACG	98

4.2.3. Quimiosensibilización <i>in vitro</i> de células de ACG a fármacos antitumorales	103
4.2.4. Quimiosensibilización <i>in vivo</i> de células de ACG al sorafenib.....	105
4.3. DISCUSIÓN	108
5. Conclusiones	115
6. Bibliografía.....	119
7. English Summary	155

1. Objetivos

English Summary

Bibliografía

**Resultados y
Discusión**

**Materiales y
Métodos**

Introducción

Objetivos

El cáncer de estómago es una enfermedad agresiva y de mal pronóstico que causa más de 700.000 muertes cada año en el mundo, ocupando la quinta posición en incidencia anual por tumores malignos. La mayoría de los cánceres gástricos diagnosticados son adenocarcinomas (ACG) originados en las glándulas de la mucosa gástrica. Su alta tasa de mortalidad se debe, principalmente, a que se diagnostican en estadios avanzados de la enfermedad cuando la resección quirúrgica ya no es aconsejable. Además el tratamiento farmacológico disponible es poco eficaz debido a la alta quimiorresistencia que presenta el ACG.

Existe una gran variedad de mecanismos de quimiorresistencia en las células tumorales, que en ocasiones se presentan de forma simultánea en el tumor, pudiendo actuar de forma sinérgica. La consecuencia es la aparición del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (MDR, del inglés *Multidrug Resistance*), que limita las opciones de tratamiento farmacológico y condiciona el pronóstico de los pacientes. La identificación de la huella genética de quimiorresistencia (HGQT) del ACG podría ayudar a desarrollar estrategias de quimiosensibilización del tumor. La presencia en el ACG de niveles altos de expresión de la bomba de expulsión de fármacos MRP4, podría desempeñar un papel relevante en el desarrollo de la farmacorresistencia de este tipo de tumores y constituir una diana farmacológica para el desarrollo de estrategias de quimiosensibilización. Aunque esta proteína tiene la capacidad de reconocer como sustratos algunos fármacos, se desconoce su papel en el transporte de los fármacos antitumorales que se utilizan en el tratamiento de primera o segunda línea frente al ACG.

Por otro lado, el desarrollo del fenotipo de malignidad del ACG que incluye aspectos como la proliferación celular, la progresión del tumor y la falta de respuesta a los agentes farmacológicos esta favorecido por la aparición de alteraciones en la expresión de genes supresores de tumores.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos planteamos como **objetivo global** de esta Tesis Doctoral la identificación de la HGQT del cáncer gástrico, centrándonos en el papel del transportoma en la quimiorresistencia del ACG, y en especial la proteína MRP4, como base para el desarrollo de nuevas terapias quimiosensibilizantes de este tipo de tumor.

Para alcanzar dicho objetivo global, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

Objetivo 1: Identificar los mecanismos determinantes de la falta de respuesta del ACG a la quimioterapia antitumoral mediante la identificación de la HGQT.

Objetivo 2: Llevar a cabo la evaluación preclínica de una estrategia de quimiosensibilización del ACG basada en la inhibición de bombas exportadoras de fármacos de la familia ABCC.

Objetivo 3: Investigar el papel de la bomba MRP4 en la resistencia del ACG a distintos fármacos antitumorales utilizados en el tratamiento de este tumor.

Objetivo 4: Desarrollar, mediante edición genómica programada (PGE) basada en el sistema CRISPR/Cas9, sublíneas celulares de ACG con silenciamiento de bombas ABC, para utilizarlos como modelos celulares en el desarrollo de una estrategia de quimiosensibilización por inhibición de estos transportadores.

Objetivo 5: Generar modelos celulares de ACG con pérdida de expresión de genes supresores tumorales, utilizando estrategias basadas en CRISPR/Cas9, para identificar su papel en la farmacorresistencia del ACG.

2. Introducción

English Summary	Bibliografía	Conclusiones	Resultados y Discusión	Materiales y Métodos	Introducción	Objetivos
-----------------	--------------	--------------	------------------------	----------------------	--------------	-----------

2.1. EL ESTÓMAGO

El estómago (Figura I-1A) es la parte del tracto digestivo donde tiene lugar la fase gástrica de la digestión. Las funciones generales de este órgano son i) el almacenamiento y mezcla del alimento ingerido y la regulación de su paso al intestino delgado; ii) la digestión química y mecánica del alimento; iii) la protección del cuerpo mediante la destrucción de agentes patógenos. Además, mediante la secreción de diferentes hormonas el estómago es capaz de controlar diversos procesos fisiológicos como son la secreción gástrica (gastrina, histamina y somatostatina), el apetito (grelina) y el balance energético (péptido liberador de gastrina).

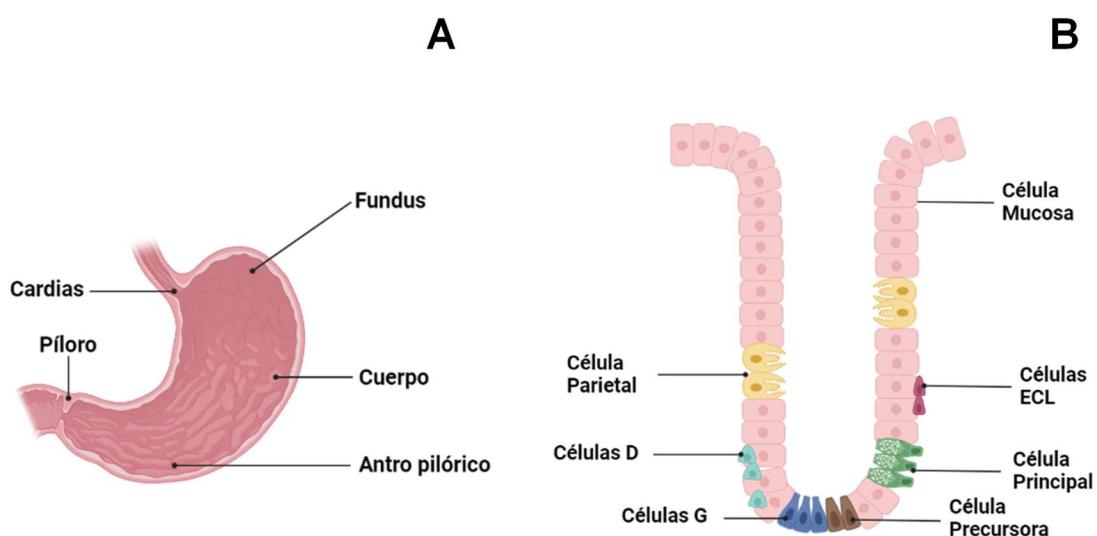


Figura I-1. Anatomía e histología del estómago. Partes anatómicas del estómago (A). Células que forman las glándulas principales de la mucosa del fundus y el cuerpo (B).

El cardias y el antro son similares histológicamente y protegen al esófago (cardias) o al duodeno (antro) del ácido y de las diferentes enzimas presentes en las secreciones gástricas. Ambos están formados principalmente por células mucosas encargadas de secretar bicarbonato y un moco viscoso que protege las células de la acción del ácido clorhídrico (HCl). Además de estas células, el antro pilórico contiene células G secretoras de gastrina. Por otro lado, la mucosa del fundus y el cuerpo no presenta diferencias a nivel histológico. Ambos están formados por las llamadas glándulas principales o fúndicas las cuales presentan varios tipos de células (Figura I-1B):

- Células mucosas: secretoras del moco que actúa como capa protectora.
- Células parietales: situadas en la parte más profunda de la glándula gástrica, secretan:
 - HCl: importante en la destrucción de los microorganismos ingeridos así como en la desnaturalización de las proteínas.
 - El factor intrínseco: este factor forma complejos con la vitamina B₁₂ favoreciendo su absorción.
- Células principales: estas células de la glándula gástrica secretan:
 - Pepsinógeno: es la proenzima que tras su escisión da lugar a la pepsina, responsable de la digestión proteica.
 - Lipasa gástrica: se secreta con la pepsina, y constituye, junto con lipasa lingual, el grupo de lipasas ácidas, que no requieren ácidos biliares o colipasas para alcanzar la actividad enzimática óptima. Las lipasas ácidas contribuyen al 30 % de la hidrólisis de los triglicéridos durante la digestión en el adulto.
- Células neuroendocrinas: estas células son responsables de liberar distintas hormonas, ya sean con función paracrina (histamina), endocrina (gastrina), o bien con ambas funciones (serotonina). Dentro de este grupo de células destacan:
 - Células D: secretan somatostatina, hormona inhibidora de la secreción gástrica.
 - Células G: estas células se encuentran en la parte más profunda de la glándula gástrica y son las encargadas de secretar gastrina, estimuladora de la secreción ácida del estómago.
 - Células ECL (células similares a las enterocromafines): localizadas principalmente en el cuerpo y en el fundus, secretan histamina, la cual estimula la secreción ácida del estómago.
- Células precursoras: células madre encargadas de renovar el epitelio glandular.

2.2 CÁNCER GÁSTRICO

El cáncer de estómago es una enfermedad agresiva y de mal pronóstico y, pese a que en las últimas décadas su incidencia y mortalidad ha sufrido un leve descenso (Sung et al. 2021), sigue ocupando el quinto puesto en el orden de incidencia de los distintos tipos de cáncer, con más de un millón de nuevos casos diagnosticados cada año en todo el mundo, y se sitúa en cuarta posición en lo que se refiere al número de muertes debidas al cáncer (GLOBOCAN 2020) (Figura I-2A). La gran mayoría de los tumores gástricos que se diagnostican son malignos y, de estos, aproximadamente el 90 % son adenocarcinomas gástricos (ACG), que se originan en células de la mucosa gástrica. El resto de tumores gástricos son los tumores del estroma gastrointestinal (GIST) y, con menor frecuencia, linfomas y sarcomas (Karimi et al. 2014).

2.2.1. Epidemiología

La tasa de incidencia del cáncer gástrico es más del doble en hombres que en mujeres (Ferlay et al. 2010) y aumenta con la edad, situándose la media del diagnóstico entre los 65 y 75 años. En cuanto a su heterogénea distribución geográfica, la mayor prevalencia del ACG se encuentra en Asia, donde se diagnosticaron en 2020 el 75,3 % de estos tipos de cáncer, seguida de Europa (12,5 %) y América del Sur (6,2 %). En el lado contrario se encuentran la mayoría de los países de África y América del Norte, donde la incidencia de este tipo de tumor no supera el 3 %. Los estudios en la población de Estados Unidos han relevado que la incidencia en los distintos grupos raciales también es diferente, con una gran diferencia entre la población blanca no latina y el resto de las etnias, llegando a duplicarse en la población afroamericana y los asioamericanos (Siegel et al. 2014). En España, la incidencia del cáncer gástrico presenta niveles de incidencia medios (Figura I-2B). Castilla y León presentan una incidencia superior a la media nacional (García-Esquinas et al. 2009). Todas estas diferencias sugieren la importancia no solo de la susceptibilidad genética, sino también de los diversos factores ambientales.

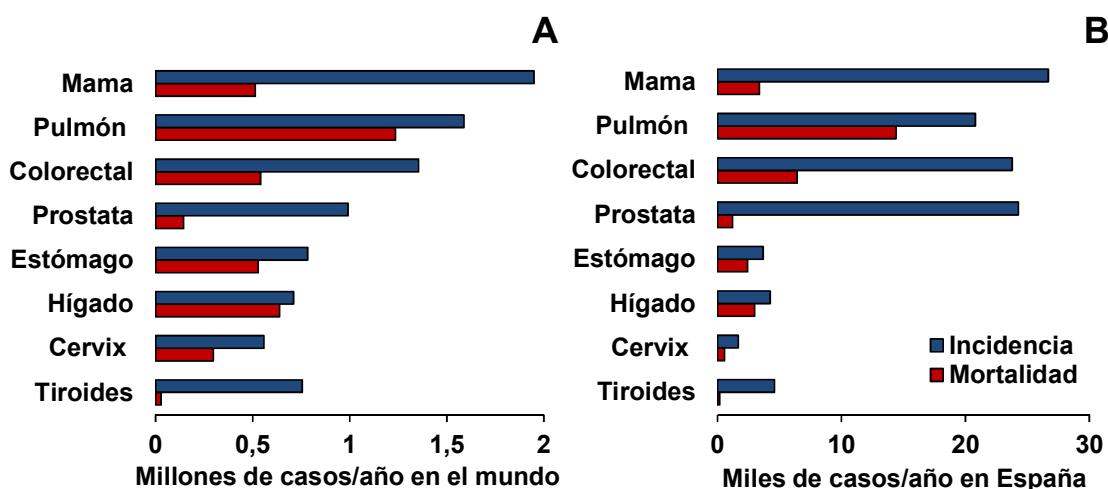


Figura I-2. Tumores con mayor incidencia y mortalidad en 2020 según la OMS. El cáncer de estómago se sitúa en quinta posición respecto a incidencia y cuarta respecto en número de muertes a nivel mundial (A). En España se repite el mismo patrón tanto de incidencia como de mortalidad que en el resto del mundo (B).

2.2.2. Clasificación

El cáncer gástrico es una enfermedad heterogénea que presenta características epidemiológicas e histopatológicas variadas. Es importante conocer las diferentes particularidades del cáncer puesto que influyen no solo en el pronóstico, sino también en la respuesta al tratamiento. Como se ha dicho anteriormente, la mayoría de los pacientes con cáncer gástrico sufren ACG, del cual se pueden distinguir diferentes tipos atendiendo a sus características histológicas o moleculares.

Los sistemas de clasificación histológica más conocidos son el sistema descrito por Lauren en 1965 (Lauren 1965), y el promovido por la Organización mundial de la Salud (OMS) (Tabla I-1) (Mihailovici et al. 2002). Según la clasificación de Lauren se distinguen dos subtipos:

ACG de tipo entérico o intestinal: estos tumores son los más frecuentes y se caracterizan por presentar un patrón glandular definido. La estructura de las glándulas varía de tumores bien a poblemente diferenciados, y crecen siguiendo un patrón expansivo no infiltrativo. Estos tumores aparecen frecuentemente en el antro y se han asociado a lesiones premalignas, como la gastritis crónica (Gore 1997; Dicken et al. 2005).

ACG difuso: este tipo de tumores se caracterizan por la presencia de células no cohesivas e infiltraciones profundas en la pared del estómago con poca o nula formación de glándulas (Werner et al. 2001). A diferencia de los anteriores la influencia ambiental es menor y aparecen más frecuentemente en pacientes jóvenes, presentando un peor pronóstico.

En algunos pacientes los tumores pueden presentar características de ambos tipos. En esos casos se clasifican como carcinomas mixtos (Fenoglio-Preiser et al. 2000).

Tabla I-1. Sistemas de clasificación de los carcinomas gástricos según Lauren y la OMS (Adaptado de Yakirevich and Resnick 2013).

Lauren	Organización Mundial de la Salud
Tipo intestinal	Adenocarcinoma papilar Adenocarcinoma tubular Adenocarcinoma mucinoso
Tipo Difuso	Carcinoma poco cohesivo (incluyendo el carcinoma de células en anillo de sella y otras variantes)
Tipo mixto	Tipo mixto, mezcla de glandular (papilar/tubular) y poco cohesivo/células en anillo
Indeterminado	Carcinoma indiferenciado Carcinoma adenoescamoso Carcinoma con estroma linfoide Adenocarcinoma hepatoide Carcinoma de células escamosas

A diferencia de la clasificación de Lauren, la OMS ha desarrollado un sistema de clasificación basado en el grado de semejanza con el tejido intestinal metaplásico, distinguiendo principalmente cuatro subtipos: papilar, tubular, mucinoso y de células en anillo de sella (Tabla I-1) (Fenoglio-Preiser et al. 2000; Werner et al. 2001).

En las últimas décadas se han propuesto otros sistemas de clasificación basados en los avances en genómica y en análisis de alto rendimiento que permiten diferenciar mejor los distintos tipos de tumores a nivel molecular y, por tanto, un tratamiento más personalizado (Chia and Tan 2016). En la clasificación molecular del cáncer gástrico se tiene en cuenta la presencia de mutaciones génicas, la inestabilidad cromosómica, los cambios transcripcionales y el estatus epigenético.

2.2.3. Etiología y patogenia del adenocarcinoma gástrico

Una de las causas de la alta mortalidad de estos tipos de tumores es que suele diagnosticarse en estadios avanzados debido a que los síntomas iniciales son inespecíficos, y muy similares a los que aparecen en la gastritis crónica. El cáncer gástrico es, además, una enfermedad multifactorial resultado de un proceso de varias etapas, y que en más del 90 % de los casos está relacionado con la infección por *Helicobacter pylori* (Petryszyn et al. 2020). En el caso del ACG, se ha propuesto un modelo secuencial de su desarrollo, la denominada “Cascada de Correa”, que describe la secuencia de lesiones histológicas que culminarían con la aparición del adenocarcinoma. El proceso comenzaría con el proceso inflamatorio en el antro desencadenado por factores ambientales, siendo el más importante la infección con *H. pylori*, esto conllevaría a la evolución a las distintas lesiones premalignas, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal y displasia y, finalmente, el cáncer (Correa and Piazuelo 2012; Correa et al. 2006). Los diferentes factores de riesgo que propician el desencadenamiento de esta cascada y resultarían en el desarrollo de ACG son:

Infección por *H. pylori*

Se consideran dos posibles causas por las que la infección por *H. pylori* favorece la carcinogénesis: la acción indirecta del *H. pylori* sobre el epitelio gástrico causando inflamación crónica y la acción directa de las bacterias sobre las células epiteliales por medio de la inducción de mutaciones del ADN y la activación de vías de supervivencia (Chiba et al. 2008).

Dieta

El alto consumo en sal, alimentos ahumados y carne roja está relacionado con un aumento en la probabilidad de padecer ACG. Por el contrario, la ingesta de verdura y fruta fresca se asocia a una protección frente a este tipo de cáncer debido probablemente al aporte de vitamina C, folato y carotenoides (Wiseman 2008; Dungal 1961).

Uso de fármacos

El uso de estatinas para el tratamiento de la hipercolesterolemia se ha asociado a un menor riesgo de padecer diversos tipos de cáncer, entre ellos el cáncer gástrico (Wu et al. 2013). Por otro lado, la ingesta de antiinflamatorios no esteroideos presenta una relación inversa con el riesgo de padecer ACG, probablemente porque este tipo de fármacos pueden tener un efecto protector (Abnet et al. 2009).

Obesidad

La obesidad es uno de los principales factores de riesgo del ACG, promoviendo la aparición de diferentes lesiones premalignas (Chow et al. 1998).

Reflujo gastroesofágico

El riesgo de padecer ACG es de 2 a 4 veces mayor en los pacientes con antecedentes de reflujo gastroesofágico (Farrow et al. 2000). El reflujo gastroesofágico está detrás del desarrollo del esófago de Barret, afección que consiste en la modificación del revestimiento esofágico a un epitelio tipo intestinal, y que en un bajo porcentaje de casos deriva en la aparición de un adenocarcinoma esofágico (Nakanishi et al. 2021).

Factores genéticos

Solo entre el 1 y el 3 % de los cánceres gástricos son consecuencia de síndromes hereditarios (Lynch et al. 2005), siendo la aparición de diferentes lesiones premalignas de carácter no hereditario, principalmente, el origen del ACG. Sin embargo, tanto en un caso como en otro, se han descrito alteraciones genéticas vinculadas a la aparición de este tipo de tumor. Dentro de estos cambios genéticos se incluyen: i) silenciamiento de genes supresores tumorales o activación de oncogenes; ii) inestabilidad cromosómica e inestabilidad de microsatélites; y iii) cambios epigenéticos (Yakirevich and Resnick 2013).

Las diferentes alteraciones genéticas propician, además, la aparición de características de malignidad tumoral consecuencia de alteraciones en diversas cascadas de señalización celular, que promueven el aumento de la supervivencia celular, la proliferación celular y/o la inhibición de la apoptosis.

Entre las vías de señalización más frecuentemente alteradas en el ACG destacan las vías de señalización del factor nuclear NF-κB y la ruta Wnt/β-catenina, desreguladas en el 70 % de los pacientes de cáncer gástrico (Ooi et al. 2009; Marin et al. 2020). En el caso de la ruta del factor nuclear NF-κB, está vía se activa durante la inflamación producida por la infección por *H. pylori*, induciendo la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, así como la transcripción de genes con efectos proliferativos y antiapoptóticos, como la ciclina D1, o las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 o Bcl-X_L (Karin and Lin 2002; Karin et al. 2002; Kang et al. 2008). Por otro lado, la ruta Wnt/β-catenina que también es desregulada debido a la infección por *H. pylori*, promueve la movilización de la β-catenina desde la membrana plasmática hacia el citoplasma y su posterior acumulación en el núcleo. Por tanto, la activación aberrante de la ruta Wnt/β-catenina produce un aumento de la proliferación celular, de la angiogénesis, y la inhibición de la apoptosis, así como de la activación de genes involucrados en la diferenciación de las células epiteliales gastrointestinales (Murata-Kamiya et al. 2007), y promueve la aparición de propiedades de células madre (Yong et al. 2016). Muchos miembros de esta vía de señalización presentan alteraciones en su expresión o aparecen mutados en pacientes de cáncer gástrico. Este es el caso de los genes *Wnt-1* y *Wnt-5* (Mao et al. 2014; Kurayoshi et al. 2006), sobreexpresados en cáncer gástrico, o el gen *SOX10* cuya expresión está disminuida (Tong et al. 2014). Pero, entre todas las alteraciones de la vía, destacan las producidas por la alteración de la expresión de *APC*, *CDH1* y *CTNNB1*:

- **APC:** *APC* es un supresor tumoral cuyo impacto en otros tipos tumorales ya ha sido descrito. Se ha identificado la presencia de mutaciones en este gen entre el 20 y el 40 % de los ACG de tipo intestinal, mientras que en los de tipo difuso la incidencia de mutaciones no llega al 2% (Tahara 2004). Su inactivación evita la degradación de la β-catenina en el proteasoma, favoreciendo su actividad y acumulación en el núcleo, lo que desencadena una proliferación celular descontrolada, aumento de la angiogénesis e inhibición de la apoptosis.
- **CTNNB1:** *CTNNB1* es el oncogén que codifica para la β-catenina, y para el que no existe consenso acerca de su papel en la carcinogénesis en la bibliografía. Por un lado, algunos autores afirman que este gen está mutado en alrededor del 30 % de

los tumores de tipo intestinal y difuso, conduciendo a la acumulación nuclear de β -catenina y la activación constitutiva de la vía Wnt/ β -catenina (Clements et al. 2002; Park et al. 1999; Ogasawara et al. 2006). Sin embargo, algunos estudios de la incidencia de mutaciones en este gen reportan una baja frecuencia de estas en estos tipos de tumores (Candidus et al. 1996; Sasaki et al. 2001).

- **CDH1:** este gen codifica para la proteína E-cadherina, involucrada en la adhesión celular y en la regulación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina al mantener anclada a la membrana plasmática la β -catenina. Cuando *CDH1* está mutado, la β -catenina es liberada al citoplasma donde se acumula para posteriormente entrar en el núcleo. Respecto al papel en ACG de esta proteína, no hay acuerdo en la bibliografía. Mutaciones inactivantes de este gen son comunes sobre todo en el ACG difuso de tipo hereditario (Corso et al. 2012; Cavallaro and Christofori 2004). La frecuente inactivación de *CDH1* en el avance del tumor ha llevado a integrarlo en el grupo de supresores tumorales. Sin embargo, no se ha encontrado asociación entre esta inactivación y supervivencia (Ibarrola-Villava et al. 2015).

La ruta de señalización PI3K/AKT/mTOR es una vía que participa en procesos de proliferación, supervivencia y crecimiento celular, movilidad, apoptosis y autofagia, y cuya alteración se da en multitud de enfermedades, incluyendo el cáncer gástrico. Son muchos los genes implicados en esta ruta, entre ellos, en cáncer gástrico destaca la implicación de *PTEN* y *PIK3CA*:

- **PTEN:** Es un inhibidor de esta ruta de señalización, considerado un supresor tumoral porque su inactivación induce un aumento de la supervivencia celular, proliferación e invasión de las células cancerosas (Hu et al. 2019). La pérdida de expresión de *PTEN* generalmente se relaciona con estadios avanzados del tumor y la resistencia a la quimioterapia (S. Zhang and Yu 2010). Cabe destacar, que la caída de la expresión de *PTEN* se relaciona con una mayor invasividad en los tumores de tipo difuso, reflejando el valor diagnóstico de *PTEN* como biomarcador de malignidad (Rhode et al. 2021).
- **PIK3CA:** este oncogén codifica la subunidad catalítica α de la fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa (Fruman and Rommel 2014), que se sobreexpresa en muchos

tumores incluidos los tumores gástricos (Firoozinia et al. 2014; Abe et al. 2013; Li et al. 2005).

La ruta ERK/MAPK es otra de las vías de señalización más estudiada en cáncer. En el caso del cáncer gástrico, son varios estudios los que han demostrado su implicación en la migración celular y la invasividad de las células tumorales (Akter et al. 2015). El 27 % de los ACG presentan sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Kim et al. 2008), el cual activa entre otras, esta cascada de señalización. Por otro lado, entre un 7 % y un 34 % de los ACG presentan sobreexpresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (*HER2*), siendo más frecuente en los tumores de tipo intestinal (Hofmann et al. 2008). Esta sobreexpresión es un evento temprano en el desarrollo del carcinoma, puesto que se ha descrito un aumento progresivo según avanza la displasia (Fassan et al. 2012). También se han identificado mutaciones activantes de *KRAS* que causan la activación de esta cascada independientemente de la señalización por EGFR o HER2. Estas mutaciones se han asociado a la infección por *H. pylori*, y solo están presentes en el ACG de tipo intestinal y no suelen aparecer en los ACG difusos (Gong et al. 1999; Yakirevich and Resnick 2013). Por otro lado, el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (*MET*) se sobreexpresa en varios tipos de cáncer, entre ellos el esofágico y el gástrico (Jardim et al. 2014). Esta sobreexpresión está relacionada con un aumento de la proliferación celular y una mayor invasividad del tumor. También se han descrito mutaciones en este gen, pero aparecen raramente en ACG (Chen et al. 2001).

Distintos miembros de la vía de señalización Hedgehog pueden sufrir alteraciones en su expresión debidas a la infección por *H. pylori*. Esta vía de señalización es importante en el desarrollo embrionario, la diferenciación, proliferación y mantenimiento de la diferenciación de algunos tejidos adultos. Debido a que en el tracto gastrointestinal las células epiteliales están en continua renovación, el buen funcionamiento de esta ruta es esencial. La sobreexpresión de algunos de sus miembros como son *GLI1* o *SHH* se ha correlacionado con un fenotipo más agresivo, así como con la aparición de metástasis linfoide y un peor pronóstico (Yan et al. 2013; Niu et al. 2014). También cabe destacar, que la desregulación de la vía de señalización de Notch, importante en la regulación celular, la apoptosis y la diferenciación y de la vía de señalización Hippo, implicada en el

crecimiento celular y en el mantenimiento de la homeostasis en el tejido gastrointestinal, está implicada en la progresión del cáncer gástrico (Yeh et al. 2009), y en el inicio y desarrollo de metástasis (Zhou et al. 2013).

Por otro lado, algunos genes implicados en la regulación del ciclo celular presentan alteraciones en su expresión que derivan en la carcinogénesis, debido, entre otros factores, a que son capaces de interferir en las vías de señalización comentadas previamente. Es el caso del factor de transcripción *TP53*, implicado en la regulación del ciclo celular, especialmente en respuesta al estrés celular, ya que puede detener la proliferación, inducir la reparación del ADN y, si es necesario, promover la muerte celular mediante la activación de la apoptosis. La pérdida de la expresión de p53 favorece, entre otras cosas, la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y como consecuencia aumenta el potencial angiogénico de las células cancerosas (Farhang Ghahremani et al. 2013). Además, la activación de la ruta PI3K/AKT induce la supervivencia celular mediante la inactivación de este supresor tumoral.

También implicado en la regulación del ciclo celular, se ha identificado recientemente un nuevo supresor tumoral implicado en la aparición del cáncer gástrico, el dominio de interacción rico en AT de la proteína A1 (ARID1A) (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014). La pérdida de expresión de este gen se da en el 11-51,3 % de los tumores gástricos (Abe et al. 2012; Wang et al. 2012). Esta proteína es una helicasa cuya expresión está disminuida en las fases del ciclo celular S/G2/M, mientras que se sobreexpresa en la fase G0/G1, lo que apoya el papel de ARID1A en la regulación de la proliferación celular (Qadir et al. 2020). ARID1A regula diferentes procesos celulares cruciales en la prevención de la carcinogénesis mediante la regulación transcripcional de diversos proto-oncogenes y genes supresores de tumores (Qadir et al. 2021). Así por ejemplo, la pérdida de función de esta proteína por mutaciones sin sentido, induce la activación de la ruta PI3K/AKT promoviendo la carcinogénesis mediante la inhibición de la apoptosis, el incremento de la proliferación celular, la adhesión celular y la diferenciación (Samartzis et al. 2013; Yang et al. 2019).

Además de las alteraciones genéticas ya comentadas, la inestabilidad genómica y las alteraciones epigenéticas parecen tener un papel importante en la aparición y progresión del cáncer gástrico:

- Inestabilidad genómica: la inestabilidad genómica se puede manifestar como un síndrome de inestabilidad cromosómica o de inestabilidad de microsatélites (Yakirevich and Resnick 2013). Esta última es consecuencia de disfunciones en el sistema de reparación de errores de apareamiento en el ADN y están implicadas las proteínas MLH1, PMS2, MLH2 y MLH6. El ACG con inestabilidad de microsatélites es más frecuente en pacientes de edad avanzada con tumores de tipo intestinal y localizados en el antro (Tahara 2004; Aarnio et al. 1999). En cuanto a la inestabilidad cromosómica, con pérdidas o ganancias cromosómica, estas aparecen en etapas tempranas de la carcinogénesis dando lugar a la aparición de un patrón aneuploide (Yakirevich and Resnick 2013).
- Alteraciones epigenéticas: el silenciamiento de los genes puede ser consecuencia de la metilación de su promotor. En la progresión de gastritis a ACG aumenta la frecuencia de metilación del promotor en diversos genes, principalmente en las llamadas islas CpG, microARNs y ARNs no codificantes (Aarnio et al. 1999). Esta alteración en la metilación del ADN contribuye a aumentar la heterogeneidad del cáncer gástrico y se ha propuesto su estudio como biomarcador para su uso en diagnóstico y pronóstico (Qu et al. 2013).

Estado socioeconómico

La incidencia de infección con *H. pylori* es mayor en las clases sociales más bajas, que se suma a un menor acceso a alimentos frescos y mayor consumo de alimentos procesados en este grupo poblacional, lo que incrementa el riesgo de aparición de este tipo de tumor (Kelley and Duggan 2003).

2.2.4. Diagnóstico

Signos y síntomas

Las manifestaciones clínicas que aparecen con frecuencia cuando la enfermedad se encuentra en estadios avanzados, no son específicas, lo que dificulta el diagnóstico y hace que, en la mayoría de los casos, este se haga de forma tardía, cuando la resección quirúrgica ya no es una alternativa terapéutica aconsejable (Dicken et al. 2005). Alrededor de la mitad de los pacientes con ACG sufren dispepsia y en etapas avanzadas hasta un 95 % presentan dolor epigástrico, acompañado generalmente de otros signos como son pérdida de peso y anorexia (Gore 1997). Otros síntomas como son náuseas y vómitos así como sensación de saciedad aparecen en tumores de gran volumen que obstruyen la luz gastrointestinal o tumores con un alto grado de infiltración que afecta a la distensión del estómago (JMarin et al. 2016).

En etapas avanzadas, un examen físico puede revelar la presencia de masas abdominales palpables, obstrucción intestinal, hepatomegalia, ascitis, caquexia o edema en las extremidades inferiores. Las metástasis pueden detectarse examinando los ganglios linfáticos supraclavicular, axilar izquierdo o periumbilical (Gore 1997; Albert 1995).

Marcadores tumorales

Los marcadores tumorales pueden utilizarse tanto para el diagnóstico precoz como para el seguimiento del cáncer tras el tratamiento. Algunos de estos marcadores son el CEA (antígeno carcinoembrionario) y el CA19.9 (antígeno carbohidrato 19.9) que pueden estar elevados, aunque no son específicos de este tipo de tumor (Takahashi et al. 2003).

Se ha sugerido la relación entre el pepsinógeno I y II (PGI y PGII) en suero como marcador de la progresión del ACG. Durante el desarrollo de la gastritis atrófica, la concentración en suero de PGI disminuye, mientras que los de PGII se mantienen, por lo que valores bajos de PGI/II se traducen en un mayor riesgo de ACG (Ren et al. 2009; Helget et al. 1992). También G-17 (gastrina-17), una hormona peptídica sintetizada por las células G del antrum, se ha propuesto como posible marcador de cáncer gástrico. Sin embargo, en función de que la lesión sea en el cuerpo o en el antrum, los valores de G-17 pueden

aumentar, disminuir o mantenerse normales, por lo que el valor predictivo de este marcador no está claro (Leung et al. 2008).

Diversos estudios recientes han propuesto el uso de algunos marcadores serológicos más específicos y sensibles del cáncer gástrico, como es el caso de diferentes citoquinas con valor diagnóstico y pronóstico del ACG (Wu et al. 2019).

Técnicas de diagnóstico por imagen

La endoscopia es considerada la técnica más sensible para el diagnóstico en pacientes sospechosos de padecer ACG (Karpeh and Brennan 1998). Esta técnica permite visualizar la localización del tumor, su extensión y obtener biopsias para su estudio (Sadowski and Rabeneck 1997). Hasta el momento se han implementado diferentes técnicas endoscópicas, siendo la más prometedora la *Narrow Band Imaging*, técnica de alta resolución que permite observar el patrón mucoso con mayor detalle (Pasechnikov et al. 2014; Yao et al. 2008).

2.2.5. Tratamiento

La resección quirúrgica es en la mayoría de los casos el tratamiento de elección, sin embargo, en muchas ocasiones, sobre todo en aquellas en las que el tumor ha sido diagnosticado en estadios avanzados o hay una recaída en la enfermedad lo que se recomienda es combinar la resección con otros tratamientos (Smyth et al. 2016). La resección puede ser total o parcial y suele ir acompañada de extirpación de los ganglios linfáticos (Orditura et al. 2014). Cuando el tumor es detectado en etapas tempranas, tras la resección quirúrgica la probabilidad de cura es superior al 50 %, sin embargo como ya se ha comentado anteriormente, esto no es lo que suele ocurrir. En los casos en los que el tumor ha metastatizado alcanzando otros órganos, la intervención quirúrgica no está recomendada y se debe emplear otros tipos de tratamientos para mejorar el pronóstico de los pacientes o de manera paliativa (Figura I-3) (Schauer et al. 2011).

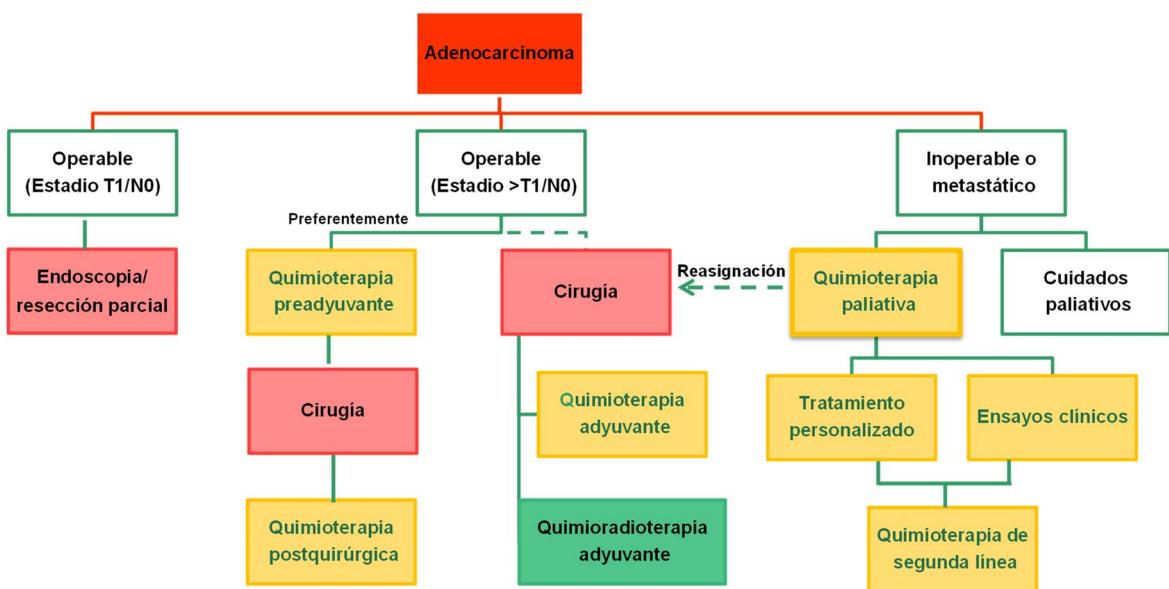


Figura I-3. Algoritmo de tratamiento de pacientes de cáncer gástrico, adaptado de Smyth et al. 2016.

La quimioterapia neoadyuvante ha demostrado su utilidad para mejorar la supervivencia a 5 años de los pacientes del 23 al 36 % (Cunningham et al. 2006), por lo que está recomendada antes de la resección quirúrgica (Smyth et al. 2016). Sin embargo, los resultados obtenidos en pacientes con tumores en estadios avanzados no son buenos puesto que la tasa de respuesta es menor del 40 % y los efectos beneficiosos son a menudo incompletos o transitorios, lo que se traduce en una supervivencia de 7 a 10 meses en los pacientes tratados en lugar de 3 a 4 meses cuando no reciben tratamiento (Rivera et al. 2007). La terapia usada más comúnmente es el régimen ECF, llamado así por combinar los fármacos epirrubicina, cisplatino y 5-fluorouracilo (5-FU). Dado que la capecitabina, profármaco que es metabolizado en las células y convertido en 5-FU, puede suministrarse de forma oral mimetizando la infusión continua intravenosa de este fármaco, en ocasiones sustituye al 5-FU en el tratamiento combinado, en este caso el régimen quimioterapéutico se denomina ECX (Cunningham et al. 2008). Un estudio en fase 2/3 ha demostrado que la combinación FLOT (5-FU, leucovorina, oxaliplatino y docetaxel) mejora la tasa de supervivencia en los pacientes con tumores localizados tras la resección quirúrgica en comparación con los tratamientos ECF/ECX (Al-Batran et al. 2019). Estas terapias combinadas, así como otras que consideran diferentes combinaciones con compuestos platinados (cisplatino y oxaliplatino), fluoropirimidinas

(5-FU y capecitabina) y taxanos (docetaxel y paclitaxel) mejoran el pronóstico de los pacientes, pero están asociadas a una alta toxicidad (Tabla I-2) (Van Cutsem et al. 2006). No existe un consenso para seleccionar los agentes antitumorales y la decisión se basa en cada caso en los resultados de las pruebas clínicas y de imagen realizadas al paciente.

Para aquellos pacientes que no han recibido quimioterapia neoadyuvante está recomendado el uso de quimiorradioterapia o quimioterapia adyuvante. Sin embargo, la radioterapia adyuvante no ha demostrado un efecto aditivo en los casos en los que ya se ha aplicado quimioterapia neoadyuvante (Smyth et al. 2016). En términos generales, la radioterapia en ACG puede generar reacciones adversas severas principalmente en el intestino delgado cuyas células son más sensibles a la radioterapia. Estas reacciones pueden ir desde la aparición de edema, hemorragias y trastornos de electrolitos, pudiendo llegar a producir la muerte. Por todo ello es necesario desarrollar una tecnología más precisa capaz de delimitar el área de acción, e implementar un plan de radioterapia que tenga en cuenta los posibles factores que pueden influir en este tipo de tratamiento, como son los movimientos del diafragma durante la respiración o los cambios en el volumen y la movilidad gastrointestinal (Song et al. 2017).

No hay suficientes estudios clínicos en pacientes de edad avanzada que, sin embargo, representan el mayor porcentaje de población con cáncer gástrico. Los tratamientos que se han estudiado en esta población son capecitabina + oxaliplatino, FOLFOX (leucovorina, 5-FU y oxaliplatino) y la capecitabina usada como agente único, presentando todos estos estudios resultados muy similares en cuanto a tasa de supervivencia (Xiang et al. 2012; Lee et al. 2008; Catalano et al. 2013).

Los pacientes con tumores inoperables o bien metastáticos mejoran su tasa de supervivencia y la calidad de vida al ser tratados con quimioterapia y no solo con tratamientos paliativos (Glimelius et al. 1997). Sin embargo, en estos casos hay que considerar las posibles comorbilidades así como la funcionalidad de todos los órganos internos. Estos pacientes suelen recibir tratamientos compuestos por dobles combinaciones de compuestos platinados y fluoropirimidinas, aunque hay meta-análisis que han demostrado una mejora significativa al añadir una antraciclina al tratamiento doble sin que haya grandes diferencias entre usar ECF, ECF, EOF (siendo O oxaliplatino), o

EOX (Okines et al. 2009). También se considera como tratamiento de primera línea en estos casos los combinados que incluyen docetaxel, sin embargo, pese a estar asociados a una mayor tasa de supervivencia, también presentan mayores efectos tóxicos (Van Cutsem et al. 2006).

En los tumores resistentes a los tratamientos de primera línea o bien en cánceres recurrentes, se usa una segunda línea de quimioterapia que consiste en irinotecán, taxanos (docetaxel o paclitaxel) usados solos o en combinación con paclitaxel (Smyth et al. 2016). Los tratamientos dirigidos presentan resultados prometedores. Por un lado, el anticuerpo monoclonal contra el receptor 2 del factor epidérmico (HER2), trastuzumab, ha demostrado mejorar la supervivencia en pacientes HER2 positivo aplicado junto con la quimioterapia habitual (Bang et al. 2010), por lo que se ha propuesto la combinación de trastuzumab, 5-FU y cisplatino como tratamiento de primera línea para este tipo de pacientes (Bang et al. 2010). Otros anticuerpos monoclonales como cetuximab, dirigidos al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en combinación con quimioterápicos de primera línea han conseguido en pacientes con cáncer gástrico en estadios avanzados, una tasa de remisión del 40 % (Lordick et al. 2010), sin embargo, otros estudios han demostrado que los anticuerpos monoclonales no presentan beneficios para los pacientes (Waddell et al. 2013). Por otro lado, anticuerpos contra el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) como el bevacizumab, o inhibidores de los receptores tirosina quinasa (TKIs) como el sorafenib, el lapatinib o el pertuzumab están en diferentes fases de estudio y se utilizan como fármacos de segunda línea (Lv et al. 2016; Morishita et al. 2014).

Se ha estudiado la posibilidad de otros tipos de tratamiento como son los inhibidores de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPIs), los inhibidores del ciclo y la inmunoterapia (Kimata et al. 2002; Motwani et al. 2003; de Guillebon et al. 2015), que solos o en combinación con tratamientos ya conocidos, constituyen una nueva aproximación al tratamiento del cáncer gástrico, pero que necesitan de más investigación, principalmente de cara al diseño de tratamientos personalizados que permitan al paciente obtener los máximos beneficios de su tratamiento farmacológico.

Tabla I-2. Fármacos usados en el tratamiento del cáncer gástrico Adaptado de Marin et al. 2016.

Fármacos de primera línea	Fármacos de segunda línea
Principales fármacos: Cisplatino/Oxaliplatino 5-FU/Tegafur/capecitabina Regímenes: S1 (tegafur, gimeracil y oteracil) XELOX (capecitabina y oxaliplatino) FOLFIRI (irinotecan, leucovorina, 5-FU) FOLFOX4 (oxaliplatino, 5-FU, leucovorina) ECF (epirrubicina, cisplatino y 5-FU) DCF(docetaxel, cisplatino y 5-FU) ECX (epirrubicina, cisplatino y capecitabina) MacDonald (5-FU, leucovorina, radioterapia) FLOT (5-FU, leucovorina, oxaliplatino y docetaxel)	Irinotecan Trastuzumab Ramucirumab Onartuzumab Pertuzumab Sorafenib Lapatinib

Aunque en las últimas décadas se han llevado a cabo estudios para el desarrollo de nuevas terapias curativas del ACG, en la clínica apenas se observan los progresos de estos tratamientos (Okines et al. 2010; Van Cutsem et al. 2016), ya que, aunque se ha conseguido aumentar levemente la supervivencia de los pacientes combinando los diferentes tratamientos disponibles, la mortalidad sigue siendo muy elevada (Anderson et al. 2015). Esto es debido, en parte al resistoma, entendido como el conjunto de proteínas expresadas en el tumor que contribuyen a los mecanismos de resistencia farmacológica, y que aún no ha sido estudiado en profundidad. Por lo cual, la farmacología moderna, con el fin de mejorar esta situación, tiene como objetivos i) el desarrollo de herramientas que nos permitan predecir la falta de respuesta a la quimioterapia, y ii) la identificación de los mecanismos subyacentes que expliquen la refractariedad primaria o adquirida de las células tumorales a los fármacos antitumorales. Conocer mejor estos dos aspectos permitiría seleccionar el mejor tratamiento para cada paciente, así como desarrollar estrategias novedosas de sensibilización de las células de ACG a la quimioterapia para superar la resistencia (Marin et al. 2016).

2.3. MECANISMOS DE FARMACORRESISTENCIA

Cuando el tumor es detectado en etapas tempranas, la tasa de supervivencia a cinco años es superior al 90 % (Lazar et al. 2009), sin embargo, cuando se detecta en estadios más avanzados, que es lo más común, la tasa de supervivencia cae en picado, siendo la media de supervivencia de los pacientes menor a doce meses, y llegando a sobrevivir 5 años solo el 8 % de los pacientes, debido, principalmente, a la presencia de metástasis (Schauer et al. 2011). Además, la quimioterapia disponible, ya sea en terapia neoadyuvante o adyuvante, o bien cuando se usa como tratamiento paliativo, es poco eficaz. Esto es debido a que el ACG es muy resistente a los fármacos utilizados habitualmente (Marin et al. 2016).

Los mecanismos que contribuyen a la quimiorresistencia y refractariedad a los fármacos antitumorales se pueden clasificar en 7 grupos de mecanismos de resistencia farmacológica (MPR, del inglés “Mechanisms of Pharmacoresistance”) (Marin et al. 2009; Marin et al. 2020; Marin and Macias 2021). Estos suelen estar presentes de manera simultánea en el tumor y actuar de forma sinérgica. Como consecuencia, suele aparecer resistencia cruzada a diferentes fármacos antitumorales, lo que se denomina fenotipo de resistencia a múltiples fármacos o MDR, que se traduce en una importante limitación en cuanto a las opciones de tratamiento farmacológico, afectando de manera significativa a su tasa de éxito. A continuación, se detalla cómo cada uno de los diferentes MPR afecta a la falta de respuesta del ACG a la quimioterapia (Figura I-4).

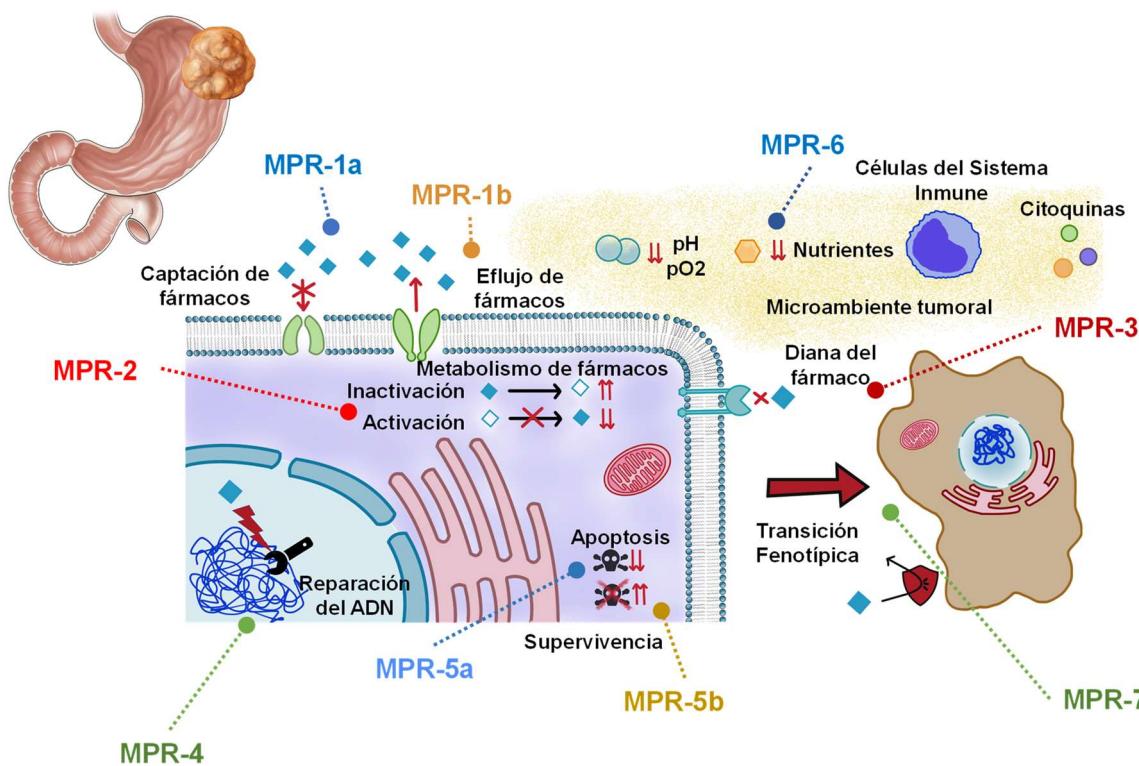


Figura I-4. Representación esquemática de los mecanismos de farmacorresistencia (MPRs) presentes en la célula tumoral del ACG: reducción de la concentración intracelular del fármaco por una disminución de la captación (MPR-1a) o un aumento de la expulsión (MPR-1b); alteraciones en el metabolismo de los fármacos por una menor activación del profármaco o un mayor metabolismo del agente citotóxico (MPR-2); alteraciones en las dianas moleculares (MPR-3); cambios en el sistema de reparación del ADN (MPR-4); desregulación de las rutas implicadas en la supervivencia celular o en la apoptosis (MPR-5); cambios en el microambiente tumoral (MPR-6) y transición epitelio-mesenquimal (EMT) (MPR-7). Imagen adaptada de Marin et al. 2020.

2.3.1. Transporte de fármacos (MPR-1)

Este grupo de MPRs incluye los mecanismos implicados en la reducción de la concentración intracelular de fármacos antitumorales, ya sea debido a una disminución de la captación de estos compuestos (MPR-1a), o a una mayor exportación de estos (MPR-1b). Su eficacia depende de los cambios de expresión y a la presencia de variantes genéticas que afectan a las proteínas que constituyen el “transportoma” (Marin et al. 2009; Marin et al. 2012).

Transportadores de captación (MPR-1a)

Varios transportadores presentes en la membrana plasmática pertenecientes a la superfamilia de proteínas SLC (“Solute Carriers”) desempeñan un papel determinante en la captación de fármacos. La mayoría de estas proteínas se expresan débilmente en las células de ACG (Obuchi et al. 2013; Al-Abdulla et al. 2020), sin embargo hay algunas excepciones como el transportador de cobre CTR1 (gen *SLC31A1*) cuya presencia puede determinar la sensibilidad al cisplatino (Al-Abdulla et al. 2020; Holzer et al. 2006). En cuanto a la familia de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos “OATPs” (familia *SLCO*), se ha detectado en biopsias de ACG una mayor expresión de las isoformas 2B1, 3A1, 4A1 y 5A1 que en el tejido gástrico sano (Zhao et al. 2016). Estos transportadores son responsables de la captación de irinotecán, docetaxel y metotrexato, y por lo tanto su expresión determina la sensibilidad del ACG a estos fármacos.

Bombas de expulsión de fármacos (MPR-1b)

La superfamilia de transportadores dependientes de ATP (ABC) tiene la capacidad de expulsar de las células cancerosas una gran variedad de fármacos antitumorales, lo que reduce su efecto farmacológico. Una proteína de esta familia es la bomba de resistencia a múltiples fármacos (MDR1 o glicoproteína P, *ABCB1*), cuyo papel en la quimiorresistencia del ACG es controvertido. Por un lado, se ha descrito una expresión de baja a moderada en biopsias de ACG (Al-Abdulla et al. 2020). Además los análisis de inmunohistoquímica indican que la presencia de esta proteína es intracelular (de Oliveira et al. 2014), por lo que no podría desarrollar su actividad exportadora a través de la membrana plasmática. Sin embargo, otros autores han encontrado una expresión elevada de esta bomba en muestras de ACG recogidas de pacientes que no respondieron a la terapia basada en compuestos platinados (Zhai et al. 2019), y otros estudios *in vitro* han descrito una relación directa entre la expresión de MDR1 y la resistencia a cisplatino (Mo et al. 2016) y oxaliplatin (Wu et al. 2018). Por otra parte, MDR1 está implicada en la resistencia a 5-FU (Xia et al. 2016) y epirubicina (Felipe et al. 2018). Además, el tratamiento farmacológico del ACG tiene la capacidad de modular la expresión de MDR1 y la sensibilidad a otros fármacos. Es el caso del sorafenib, el cual puede revertir la resistencia al cisplatino mediante una reducción de la expresión de MDR1 (Huang et al. 2015).

Por otro lado, las proteínas MRP1 (*ABCC1*), y MRP4 (*ABCC4*), de la familia ABC presentan una expresión elevada en ACG (Al-Abdulla et al. 2020). Tanto es así, que MRP1 se ha propuesto como marcador de resistencia en este tipo de tumores (Wongsirisin et al. 2018). La expresión de esta bomba es elevada en pacientes y líneas celulares resistentes al cisplatino (Wongsirisin et al. 2018), y su sobreexpresión está implicada en la aparición de resistencia a la doxorrubicina, la cual se puede reducir mediante el uso de inhibidores de MRP1 (Xu et al. 2018c). En el caso de MRP4, su expresión también se ha relacionado con la resistencia al cisplatino (Zhang et al. 2010) y a una menor respuesta a fármacos como el dasatinib (Furmanski et al. 2013). En cuanto a MRP2 (*ABCC2*), su expresión en ACG es baja. Sin embargo, se ha descrito que la presencia de SNPs específicos en el ARNm modula la expresión de esta proteína y afecta a la efectividad del tratamiento encontrándose en estos casos una mayor resistencia al tratamiento basado en oxaliplatino y fluoropirimidinas (Al-Abdulla et al. 2020; Li et al. 2016).

También la proteína de resistencia al cáncer de mama o BCRP (*ABCG2*), está implicada en la aparición de quimiorresistencia al cisplatino (Zhang et al. 2017). Su expresión se asocia a una menor tasa de supervivencia en los pacientes de ACG tratados con terapia basada en cisplatino (Yu et al. 2017b), así como como una mayor incidencia de recaídas en pacientes tratados con 5-FU (Yu et al. 2017a). Estos hallazgos han fomentado el desarrollo de estrategias para vencer la resistencia a los fármacos mediada por BCRP como es el caso del uso de ribozimas para disminuir los niveles de ARNm de esta proteína y así conseguir una mayor sensibilidad a la terapia (Kowalski et al. 2002). Por último, en cuanto a las proteínas de Menkes y Wilson (*ATP7A* y *ATP7B*, respectivamente), se han llegado a relacionar con la resistencia en el ACG, sin embargo su papel es controvertido (Chen et al. 2007; Leonhardt et al. 2009).

2.3.2. Metabolismo de fármacos (MPR-2)

Dentro de este grupo se incluyen todos aquellos mecanismos responsables de la presencia de una baja proporción de agentes activos en el interior de la célula tumoral, debido a la inactivación de fármacos o a la menor activación de pro-fármacos.

En el ACG estos procesos suelen ser consecuencia de cambios en la expresión o la actividad de las enzimas metabólicas implicadas en la destoxicación de fármacos. Así por ejemplo, dentro del grupo de enzimas del citocromo P450, destaca en ACG el papel de CYP2A6 en la activación del profármaco tegafur a 5-FU (Ikeda et al. 2000). La presencia de variantes genéticas de esta enzima afecta a la sensibilidad de los tumores al 5-FU (Daigo et al. 2002, Jeong et al. 2017; Yang et al. 2017; Kim et al. 2016). También en relación a la activación del 5-FU, destaca el papel de la enzima timidina fosforilasa (TYMP) implicada en su biotransformación al metabolito activo. Su expresión, por tanto, está directamente relacionada con la sensibilidad a este fármaco, aunque su papel es aún controvertido (Noguchi et al. 2003; Sasako et al. 2015). Por otro lado, la sobreexpresión de la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD), enzima implicada en el catabolismo del 5-FU, reduce la de sensibilidad a este fármaco (Wang et al. 2016).

Las metalotioneínas (MTs) son pequeñas proteínas ricas en cisteínas con un papel importante en los mecanismos de protección contra la toxicidad de muchos xenobióticos. No existe consenso respecto a su papel en la respuesta a la quimioterapia en pacientes de ACG. Por un lado, varios estudios describen la existencia de una relación directa entre su expresión y la refractariedad al irinotecan y al cisplatino (Chun et al. 2004; Suganuma et al. 2003), mientras que otros autores afirman que una mayor expresión de MT2A mejora la respuesta a la quimioterapia (Pan et al. 2016).

Por otro lado, las tres isoenzimas principales de la glutatión-S-transferasa (GST), GSTM (mu), GSTT (theta) y GSTP (pi) que se expresan de forma generalizada en todo el tracto gastrointestinal son responsables de la resistencia en ACG a los derivados del platino, al 5-FU y a la mitomicina C (Okuyama et al. 1994; Geng et al. 2013).

Otras enzimas como son las carboxiesterasas, están implicadas en la conversión de los pro-fármacos capecitabina e irinotecán a 5-FU o SN-38, respectivamente (Quinney et al. 2005; Xu et al. 2002). Mientras que las UDP-glucuronosiltransferasas (*UGT*), entre las que destaca *UGT1A1*, son cruciales en el metabolismo de fase 2 de una gran variedad de fármacos, como del irinotecan (Cengiz et al. 2015).

2.3.3. Dianas farmacológicas (MPR-3)

Dentro de este grupo se consideran todos aquellos mecanismos que inducen cambios de expresión o mutaciones en moléculas diana sobre las que actúa el fármaco antitumoral.

En ACG destaca la aparición del MPR-3 como consecuencia de la caída de expresión de la topoisomerasa II, diana de la doxorrubicina y la epirrubicina (Geng et al. 2013), y la elevada expresión de la timidilato sintasa (TS), enzima implicada en el mecanismo de acción del 5-FU (Kim et al. 2019b). Por otro lado, los taxanos actúan sobre las subunidades α y β -tubulina que estabilizan los microtúbulos y bloquean la progresión del ciclo celular. La sobreexpresión de la β -tubulina-III (TUBB3) se asocia a la resistencia a la quimioterapia basada en docetaxel en ACG (Urano et al. 2006).

Los receptores con actividad tirosina quinasa que son dianas de los inhibidores de tirosina quinasa (TKI) juegan un papel importante en la moderna farmacología oncológica. En el caso del receptor HER2, se ha correlacionado su baja expresión con la aparición de resistencia a trastuzumab, un anticuerpo monoclonal que interacciona con el HER2 (Wang et al. 2019a). Además la baja expresión del factor de crecimiento endotelial vascular VEGF se ha asociado con una peor respuesta a TKIs en pacientes con ACG avanzado (Zhao et al. 2018).

2.3.4. Mecanismos de reparación del DNA (MPR-4)

En este grupo se engloba los mecanismos implicados en la reparación del daño en el ADN inducido por los fármacos antitumorales. El equilibrio dinámico entre el daño y la reparación del ADN depende del tipo de lesión y de la actividad de los mecanismos de reparación que preservan la integridad del genoma: la reparación por escisión de nucleótidos, la reparación por escisión de bases, la reparación de mal apareamiento, la unión de extremos no homólogos, y los sistemas de recombinación homóloga. La activación aberrante de estos mecanismos puede impedir que las células tumorales activen la apoptosis inducida por fármacos, teniendo un papel fundamental en la aparición de la quimiorresistencia.

En el sistema de reparación por escisión de nucleótidos, destaca el papel de la proteína de reparación por escisiones complementarias cruzadas (ERCC), ERCC1. Aproximadamente el 70 % de las muestras de pacientes con ACG avanzado son positivas en la tinción por inmunohistoquímica de ERCC1, lo que se asocia a una menor tasa de supervivencia en pacientes tratados con la terapia neoadyuvante FOLFOX (Kwon et al. 2007). La expresión elevada de esta proteína también se relaciona de forma inversa con la respuesta a la quimioterapia basada en el platino (Wei et al. 2014), así como a una menor tasa de respuesta en pacientes tratados con irinotecán más cisplatino (Yamada et al. 2013). En ACG, los cambios de expresión de esta proteína se asocian a miR-122 y miR-139-5p, cuya inducción *in vitro* provoca una caída en los niveles de expresión de ERCC1, y la restauración de la sensibilidad al platino (Song et al. 2019; Ning et al. 2019). También las diferentes variantes genéticas de ERCC1 pueden influir en la sensibilidad farmacológica del ACG a los agentes que dañan el ADN (Liu et al. 2014; Ma et al. 2015; Xue et al. 2015). Por otro lado, la expresión de ERCC2 se ha asociado a una menor tasa de supervivencia en los pacientes con ACG tratados con FOLFOX (Yeh et al. 2020). Lo mismo ocurre con ERCC4, asociado en este caso con la resistencia al cisplatino, y cuya expresión podría estar modulada por varios miARNs (Ning et al. 2019; Li et al. 2019).

En cuanto al sistema de reparación por escisión de bases, destaca la proteína de complemento cruzado de reparación de rayos X-1 (XRCC1) dada su capacidad de inducir resistencia al cisplatino mediante el aumento de su expresión (Xu et al. 2014). Además existen variantes genéticas de este gen que se han asociado con la progresión de los pacientes tratados con oxaliplatino (Zhang et al. 2014).

El sistema de reparación por mal apareamiento reconoce y repara bases no coincidentes así como inserciones y delecciones. Las deficiencias en esta maquinaria de reparación pueden favorecer la aparición de mutaciones genéticas en las células tumorales que conducen al llamado fenotipo por inestabilidad de microsatélites, presente en el 15-30 % de los ACG (Young et al. 2016). El fenotipo por inestabilidad de microsatélites se ha asociado en ACG con la disminución de la expresión de las proteínas reparadoras MLH1, PMS2 y PMS1 (Yao et al. 2004). Así, por ejemplo, existe una relación entre la falta de

expresión de MLH1 y la quimiorresistencia en pacientes tratados con quimioterapia neoadyuvante basada en 5-FU (Hashimoto et al. 2019).

Por último, dentro de los sistemas de recombinación homóloga, el 17 % de los pacientes de ACG que han recibido quimioterapia adyuvante, presentan una expresión reducida de las proteínas de reparación BRCA1 y 2, aunque este resultado aún no se ha podido relacionar con ningún parámetro clínico (HKim et al. 2019a). Sin embargo, ciertos polimorfismos en BRCA1 se han asociado con una mejor respuesta y elevación en la tasa de supervivencia de los pacientes tratados con taxanos y terapias basadas en cisplatino (HShim et al. 2010).

2.3.5. Cambios en el balance apoptosis/supervivencia celular (MPR-5)

Se incluyen en este grupo procesos que inducen la desregulación del balance apoptosis/supervivencia, lo que puede deberse a la potenciación de los mecanismos de supervivencia (MPR-5a), o bien, a la reducción de la apoptosis (MPR-5b).

Factores proapóticos (MPR-5a)

En la apoptosis inducida por fármacos, destaca el papel desempeñado por el supresor tumoral p53. La relación entre la expresión de esta proteína y la quimiorresistencia es aún controvertida. Mientras que algunos autores relacionan la caída de su expresión con la refractariedad del ACG a la terapia neoadyuvante con 5-FU y cisplatino (Yashiro et al. 2009), y a la basada en etopósido, cisplatino y mitomicina C (Bataille et al. 2003), otros estudios muestran una mejor respuesta en los tumores que no expresan p53 (Cascinu et al. 1998). Por otro lado, se ha propuesto a p53 como marcador predictivo de la respuesta a la quimioterapia en el ACG (Yashiro et al. 2009). Así por ejemplo, la variante rs1042522 (p.Arg72Pro), no solo está asociada a un mayor riesgo de padecer ACG (Liu et al. 2012), sino que además su presencia se ha vinculado con una peor respuesta al tratamiento con 5-FU más paclitaxel (Huang et al. 2008) y al tratamiento basado en cisplatino (Kim et al. 2009). Sin embargo, mutaciones de ganancia de función en *TP53*, dan lugar a una mayor expresión de HER2, que conlleva a la sobreactivación de la vía de supervivencia mediada por este factor, y por lo tanto a una peor tasa de supervivencia en pacientes con ACG (Roman-Rosales et al. 2018; Tahara et al. 2019; Tahara et al. 2016).

La proteína p16^{INK4a} (*CDKN2A*) participa en la regulación del ciclo celular y en la activación de la apoptosis. La pérdida de su expresión debido a la hipermetilación de su promotor ocurre en aproximadamente la mitad de los ACG (Shim et al. 2000), y se asocia con una peor respuesta a la terapia adyuvante con 5-FU (Wang et al. 2014a). Sin embargo, algunos estudios han asociado esa hipermetilación del promotor con una mayor supervivencia (Mitsuno et al. 2007).

La desregulación de la activación de la vía intrínseca de la apoptosis también está implicada en la aparición de quimiorresistencia en el ACG (Bartchewsky et al. 2010). La caída de la expresión de proteínas de activación de la apoptosis aumenta la quimiorresistencia. En el caso de BAX esta caída se asocia con una menor respuesta en los pacientes que reciben 5-FU más cisplatino, COI (capecitabina, oxaliplatin e irinotecan) y FOLFLOX (Wang et al. 2014b; Jeong et al. 2011; Pietrantonio et al. 2012). Una menor expresión de BAK implica una peor respuesta a los tratamientos que incluyen docetaxel (Kubo et al. 2016). Por otro lado, las proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, BH3-only, activan BAK y BAX, por lo que cambios en su expresión pueden implicar una mayor quimiorresistencia (Wu et al. 2017; H. Kim et al. 2015; Xu et al. 2018b).

También los elementos que forman parte de la vía extrínseca de las apoptosis participan en la aparición de quimiorresistencia en el ACG (Qiao and Wong 2009). Este es el caso de FADD, cuya pérdida de expresión es frecuente en ACG (Yoo et al. 2007) y está implicada en la aparición de resistencia a la doxorrubicina (Pang et al. 2019).

Vías de supervivencia (MPR-5b)

En cuanto a la inhibición de la apoptosis (MPR-5b), en ACG es común que las vías NK-K β , la vía Wnt/ β -catenina, la vía Hedgehog y Notch estén hiperactivadas, lo cual, en todos los casos, favorece en la aparición de quimiorresistencia en ACG (Fu et al. 2018; Ooi et al. 2009; Akyala and Peppelenbosch 2018; Yeh et al. 2009). En el caso de la vía NK-K β , su desregulación induce la activación de distintos factores antiapoptóticos como la survivina (BIRC5), BCL-XL y XIAP (Manu et al. 2014). En el caso de la survivina, los niveles elevados de esta en el suero se han propuesto como un predictor de la respuesta a la terapia DCF (doxorrubicina, cisplatino y 5-FU) en el ACG avanzado (Bozkaya et al. 2018).

Como ya se ha comentado, uno de los principales factores que contribuye a la desregulación de la vía Wnt/β-catenina y a la vía Hedgehog es la infección con *H. pylori* (Santos et al. 2016; Yoon et al. 2014). Esta es capaz de inducir la acumulación de β-catenina en el citoplasma y el núcleo así como la expresión de diferentes factores de transcripción (Santos et al. 2016), y además daña el tejido activando la segunda de estas vías. Por otro lado, se ha encontrado una expresión elevada del receptor Notch 1 en los pacientes de ACG que no responden a la terapia neoadyuvante con 5-FU y cisplatino (Bauer et al. 2015). Además, esta vía regula la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), enzima que se expresa en la mucosa gástrica durante la inflamación y la carcinogénesis, y que está relacionada con la sensibilidad de las células de ACG a la quimioterapia (Li et al. 2012).

Se ha descrito que la acumulación de YAP1 y TAZ1, pertenecientes a la vía Hippo, está asociada a la quimiorresistencia en ACG (Huang et al. 2020) puesto que una alta expresión de ambas implica una peor respuesta al tratamiento adyuvante (Melucci et al. 2018). También la respuesta al cisplatino o al trastuzumab es menor debido al aumento de actividad de las vías PI3K/AKT y JAK/STAT3 (Dai et al. 2020; Diaz-Serrano et al. 2018).

2.3.6. Microambiente tumoral (MPR-6)

Dentro de este grupo se incluyen los cambios en el microambiente de las células tumorales que reducen la eficacia de los agentes antitumorales. Las células tumorales interactúan con el microambiente que las rodea, el cual está formado por el estroma tumoral, los vasos sanguíneos, las células inflamatorias reclutadas y otros tipos celulares asociados. Estos generan factores que afectan a la progresión del tumor alterando drásticamente la respuesta a la quimioterapia (Russi et al. 2019).

Una de las características más comunes del microambiente tumoral es la hipoxia. Está se ha asociado a una mayor resistencia a la quimioterapia en el ACG a través de un mecanismo que implica la expresión del factor inducible por hipoxia HIF-1. En ACG HIF-1α induce resistencia a los fármacos platinados al impedir la apoptosis mediante la desregulación de la expresión de miR-27a y miR-421 (Danza et al. 2016; Ge et al. 2016) y el lncARN PVT1 (Zhang et al. 2015). La expresión de HIF-1α se ha asociado a la recaída en

pacientes de ACG tratados con 5-FU tras la cirugía (Nakamura et al. 2010). La hipoxia también induce la expresión de la glicoproteína staniocalcina-1 (STC-1), implicada en la resistencia al cisplatino y a una mayor invasividad del tumor (Wang et al. 2019b).

Otra característica del microambiente tumoral es la presencia de inflamación. En condiciones inflamatorias se induce la expresión del receptor nuclear huérfano 4A2, cuya elevada expresión se ha relacionado con la resistencia al 5-FU (Han et al. 2013b). Se ha descrito que la elevada expresión de diferentes citoquinas tiene un papel relevante en la aparición de quimiorresistencia a fármacos como el 5-FU, derivados del platino, y el tratamiento combinado ECF (Ham et al. 2019; Zhai et al. 2019; Kuai et al. 2012; Ma et al. 2019; Ye et al. 2015; Xu et al. 2018a). Además de las citoquinas, componentes de la familia de factores de necrosis tumoral (TNF), como son APRIL y Fn14 están implicados en la aparición de resistencia al cisplatino y al 5-FU respectivamente (Zhi et al. 2015; Kwon et al. 2014).

Los exosomas provenientes de determinados tipos celulares también contribuyen a la aparición de resistencia a fármacos. Es el caso de los exosomas derivados de células madre mesenquimales, que mediante la inducción de la expresión de bombas ABC o la inhibición de la apoptosis inducen resistencia al 5-FU (Ji et al. 2015); o los exosomas derivados de los macrófagos asociados al tumor que inducen resistencia al cisplatino debido a la inhibición de la apoptosis y la activación de la vía PI3K/AKT (Zheng et al. 2017).

Las células de ACG pueden prosperar en un microambiente desfavorable aumentando la tasa de glucólisis y disminuyendo la actividad mitocondrial (efecto Warburg). Estos fenómenos se han asociado con la resistencia al 5-FU (Bhattacharya et al. 2014).

2.3.7. Transformaciones fenotípicas (MPR-7)

Este MPR comprende todas aquellas transiciones fenotípicas asociadas a la aparición de rasgos mesenquimales y de células madre que dan lugar a una menor respuesta a la quimioterapia.

En la transición epitelial-mesenquimal (TEM), la polarización y la adhesión de las células cancerosas se alteran, aumentando de este modo la migración y la invasividad celular y la

resistencia a la apoptosis (Xia and Xu 2017). En el ACG la TEM es desencadenado por diversas procesos intracelulares como es la sobreactivación de las vías de supervivencia (MOC-5), y a señales extracelulares como el HGF, el HIF-1 α (MOC-6), y el factor de crecimiento tumoral β (TGF- β) que desempeña un papel crucial en la aparición de la resistencia al 5-FU (Zhang et al. 2019) y al oxaliplatino (Luo et al. 2019). En cuanto a las células madres tumorales, estas pueden originarse en la médula ósea o en el propio estómago como consecuencia de la aparición de mutaciones oncogénicas en las células progenitoras (Fu et al. 2020). Las células madre tumorales, y las implicadas en la TEM, son heterogéneas y se dividen en diferentes subgrupos según el patrón de expresión de diferentes glicoproteínas de adhesión (CD44, CD24, CD90, CD133, CXCR4 y EpCAM), enzimas (aldehído deshidrogenasa 1) o factores de transcripción (SOX2, SNAIL1, STAT3, TWIST1, ZEB1 Y ZEB2) (Fu et al. 2020). Por ejemplo, la expresión en las células madre tumorales de CD44 está asociada a la hiperactivación de la vía de supervivencia Hedgehog (Yoon et al. 2014) y a la resistencia al 5-FU y al etopósido (Takaishi et al. 2009), así como a una menor tasa de supervivencia en los pacientes tratados con FOLFOX (Yoon et al. 2014). También la sobreexpresión de otros marcadores de célula madre como son CD133, CD24 o EpCAM están relacionados con la aparición de resistencia al 5-FU, taxanos o antraciclinas (Han et al. 2011).

Tras el tratamiento prolongado con fármacos antitumorales pueden aparecer células madres tumorales y activarse la TEM. Así, el tratamiento con oxaliplatino, doxorrubicina y el trastuzumab puede inducir TEM en las células de ACG tras una exposición prolongada (Zheng et al. 2013; Han et al. 2013a), y el tratamiento a largo plazo con 5-FU está relacionado con el aumento de la proporción de células madre tumorales (Ohkuma et al. 2012)

3. Materiales y Métodos

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Muestras humanas

Las muestras de adenocarcinoma gástrico (intestinal, difuso o de tipo mixto) fueron proporcionadas por los Biobancos del Hospital Universitario de Salamanca y del Instituto Biosanitario Biodonostia de San Sebastián. Los datos clínicos, quirúrgicos, histológicos y de tratamiento fueron aportados por los diferentes colaboradores del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL) y de Biodonostia (Tabla MM-1).

Las muestras se tomaron con el consentimiento escrito de los pacientes según determina la legislación vigente. Los datos personales fueron tratados con confidencialidad y seguridad, de acuerdo con la normativa basada en la Ley 15/99 (R.D. 1720/2007). Los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del área de Salud de los diferentes hospitales de los que procedían las muestras.

3.1.2. Modelos animales

Para la realización del modelo de quimiosensibilización por diclofenaco se utilizaron ratones nude atímicos (Swiss-nu/nu) (Charles River Laboratories, Barcelona, España). Los animales tenían libre acceso tanto a la comida (pienso granulado comercial) como a la bebida, y se mantuvieron en salas en las que las condiciones de temperatura (20°C), luz (ciclos de luz/oscuridad 12 h/12 h constante) y humedad relativa estaban controladas.

Los animales se manipularon siguiendo las especificaciones de la Comunidad Europea (Directiva 63/2010/UE) y la normativa española vigente para el uso y cuidado de animales utilizados en experimentación (RD 53/2013). Los protocolos experimentales que se aplicaron en la realización de este trabajo fueron aprobados por el Comité de Bioética para el Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Salamanca.

Tabla MM-1. Características de los pacientes y tumores de ACG.

	Cohorte de San Sebastián	Cohorte de Salamanca
Pacientes	23	19
Edad, media ± DE	70,3 ± 11,3	73,1 ± 10,3
Rango de Edad	45-84	49-91
Hombres, n (%)	13 (56,5 %)	11 (57,9 %)
Mujeres, n (%)	10 (43,5 %)	8 (42,1 %)
Tipo histológico <i>(Clasificación de Lauren), n (%)</i>		
Intestinal	8 (34,8 %)	18 (94,7 %)
Difuso	8 (34,8 %)	1 (5,3 %)
Inclasificable	7 (30,4 %)	0 (0 %)
Localización tumoral, n (%)		
Cardias	4 (17,4 %)	2 (10,5 %)
Fondo	5 (21,7 %)	0 (0 %)
Cuerpo	8 (34,8 %)	3 (15,8 %)
Antro	6 (26,1 %)	11 (57,9 %)
No disponible	0 (0 %)	3 (15,8 %)
Tumor primario, n (%)		
T1	0 (0 %)	1 (5,3 %)
T2	5 (21,7 %)	1 (5,3 %)
T3	18 (78,3 %)	15 (79,0 %)
T4	0 (0 %)	2 (10,4 %)
Estado nódulos linfáticos, n (%)		
NX	0 (0 %)	1 (5,3 %)
N0	5 (21,7 %)	4 (21,1 %)
N1	6 (26,1 %)	5 (26,3 %)
N2	7 (30,4 %)	6 (31,5 %)
N3	5 (21,7 %)	3 (15,8 %)
Metástasis a distancia, n (%)		
MX	0 (0 %)	5 (26,3 %)
M0	21 (91,3 %)	12 (63,2 %)
M1	2 (8,7 %)	2 (10,5 %)
Estadio tumoral, n (%)		
I	4 (17,4 %)	2 (10,5 %)
II	5 (21,7 %)	7 (36,9 %)
III	10 (43,5 %)	3 (15,8 %)
IV	4 (17,4 %)	2 (10,5 %)
No disponible	0 (0 %)	5 (26,3 %)
Grado de diferenciación, n (%)		
Bien	4 (17,4 %)	10 (52,6 %)
Moderada	7 (30,4 %)	7 (36,9 %)
Pobre	12 (52,2 %)	0 (0 %)
No disponible	0 (0 %)	2 (10,5 %)

3.1.3. Líneas celulares

Para la realización de esta Tesis Doctoral se han utilizado las siguientes líneas celulares:

- AGS, de ACG humano (CRL-1739): Obtenida de la European Collection of Cell Cultures, y proporcionada por la casa comercial Sigma Aldrich, Madrid, España.
- HEK-293T (CRL-3216): Células embrionarias de riñón humano proporcionadas por la casa comercial American Type Culture Collection (ATCC, LGC Standards, Barcelona).

3.1.4. Bacterias

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

Para amplificar algunos vectores se utilizaron bacterias *E. coli* “One Shot Mach1-T1®”, químicamente competentes y de elevada eficacia de transformación (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Barcelona).

3.2. PRODUCTOS

Los productos utilizados en esta Tesis Doctoral se obtuvieron en las siguientes casas comerciales:

- Abbot Laboratorios (Madrid, España): isofluorano (Forane®) y pentobarbital sódico (Nembutal N.R.).
- Air Liquide (Valladolid, España): CO₂ y N₂ líquido.
- AppliChem (Madrid, España): ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico (HEPES), glicina y leche descremada liofilizada.
- BD Biosciences (Madrid, España): colágeno tipo I de cola de rata y fluido envolvente FACS Flow para citometría de flujo.
- Biomers.net (Ulm, Alemania): “primers”.

- Bio-Rad (Madrid, España): acrilamida, membranas de nitrocelulosa, persulfato de amonio, tampón Tris 0,5 M pH 6,8 y 1,5 M pH 8,8, y tetrametiletilendiamina (TEMED).
- Biotools B&M Labs (Madrid, España): Mycoplasma Gel Form Kit.
- Condalab (Madrid, España): agar, extracto de levaduras y triptona.
- Dako Diagnósticos (Barcelona, España): medio de montaje para fluorescencia.
- GE Healthcare (Barcelona, España): Reactivos de detección ECL (“Enhanced ChemoLuminiscence”) que incluye los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa y los reactivos de detección 1 y 2, kit “GFX PCR DNA & Gel Band Purification”, kit “PlasmidPrep Mini Spin”, el kit “illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit”.
- Menarini Diagnostics (Barcelona, España): portaobjetos Optiplus™ y kits de química seca “Spotchem II Liver-1” y “Spotchem II Kidney-3”.
- Merck (Barcelona, España): acetato sódico anhidro, ácido fórmico, cloruro sódico, etanol, glicerol, hidróxido sódico, isopropanol, β-mercaptopropano, metanol, reactivo de Folin Ciocalteau, tartrato sódico y sulfato de cobre.
- Millipore (Waters Corporation, Madrid, España): filtros “Steritop™” para la esterilización de los medios de cultivo.
- New England Biolabs (Werfen, Barcelona, España): gel “loading dye purple” y algunas enzimas de restricción.
- Pfizer: Citarabina.
- Promega Corporation (Madison, Wisconsin, EE.UU.): algunas enzimas de restricción.
- Pronadisa (Hispalab S.A., Madrid, España): agarosa de baja electroendosmosis, de bajo punto de fusión o para análisis de rutina.
- Quiagen (Izasa, Barcelona, España): kit de extracción de ADN “DNeasy Blood & Tissue kit”.
- Selleckchem: atorvastatina, brivanib, dovitinib, flutivatinib, ivosidenib, linitinib, panobinostat, pemigatinib, pitavastatina, pravastatina, regorafenib.
- Sigma-Aldrich (Madrid, España): acetaminofeno, ácido glicirrícílico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), actinomicina D, albúmina sérica bovina

(fracción V), ampicilina, azul de bromofenol, azul de Tripán, bicarbonato sódico, 5(6)-carboxifluoresceína diacetato (CF), cis-diaminodicloroplatino II (cisplatino), curcumina, D-glucosa, sal sódica de diclofenaco (DICLO), dimetilsulfóxido (DMSO), docetaxel, dodecil sulfato sódico (SDS), doxorubicina, epirubicina, etopósido, 5-fluorouracilo (5-FU), Fluo-3 acetoximetil éster, furosemida, ibuprofeno, ioduro de propidio (IP), lapatinib, medio de cultivo “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM)-high glucose”, medio F12 Ham (“Nutrient Mixture F-12”), metotrexato, mezcla de inhibidores de proteasas piruvato sódico, MK-517, mitomicina C, mitoxantrona, naringina, paclitaxel, polibreno (bromuro de hexadimetrina), polietilenimina (PEI), probenecid, 7-etil-10-hidroxi-camtotecina (SN-38), sulforrodamina B, tripsina de páncreas porcino, Tris (trishidroximetil aminometano) base (Trizma) o clorhidrato (Tris-HCl), vinblastina, vincristina.

- Thermo Fisher Scientific (Madrid, España): Accuprime®Pfx ADN polimerasa de alta fidelidad, polimerasa “AmpliTaq Gold”, anticuerpos secundarios fluorescentes anti-IgG de ratón, de conejo y de cabra marcados con AlexaFluor® 594 o AlexaFluor® 488, fluvastatina, gemcitabina, mezcla de antibióticos (penicilina/estreptomicina), 4,6-diamidino-2-fenilindol (Dapi), enzimas de restricción “FastDigest™”, suplemento de glutamina GlutaMAX, indometacina, kit comercial para el test de la endonucleasa “GeneArt® Genomic Cleavage Detection Kit”, kits comerciales para la transcripción reversa (RT) “SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit” y “High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit”, “LipofectamineTM LTX Reagent” y “PlusTM Reagent”, lovastatina, marcadores de peso molecular de ADN (25, 100 y 500 pb y 1 kb plus), marcador de peso molecular de proteínas “Page Ruler”, naproxeno, oxaliplatino, proteinasa K, suero bovino fetal (FBS), SYBR Green I para teñir ADN en geles de agarosa (“SYBR Safe”), silimarina, simvastatina, “SYBR Green I PCR Master Mix”, T4 polinucleótido quinasa, “Taqman® Universal PCR Master Mix” y tarjetas microfluídicas o TLDAs.
- VWR Internacional (Barcelona, España): ácido acético, ácido acético glacial, ácido clorhídrico, ácido tricloroacético, carbonato sódico, cloruro cálcico, cloruro potásico, dihidrógeno fosfato potásico, fosfato ácido potásico, fosfato disódico,

indicador universal de pH, medio de montaje Entellan®, sulfato magnésico y Tween® 20.

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

Los plásmidos lentivirales pWPI, psPAX2 y PMD2.G fueron cedidos por el Dr. Ángel Hernández Hernández del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

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

3.3. MEDIOS INSTRUMENTALES

- Las pesadas se realizaron en balanzas electrónicas digitales Precisa 125 A y Sartorius BL 150S (Grupo Taper, Madrid, España). Para pesar los animales se utilizó una balanza electrónica digital Precisa, modelo 600 C (Grupo Taper, Madrid, España).
- El pH se determinó utilizando un electrodo Crison PH BASIC 20 (Crison Instruments, Barcelona, España).
- El agua destilada y el agua ultrapura se obtuvieron con equipos de purificación de agua del Sistema MiliQ Integral 3 (Millipore-Merck, Madrid, España).
- Las incubaciones se llevaron a cabo en un baño termostatizado LAUDA Ecoline StarEdition RE106, en un bloque térmico QBA2 Grant (Thermo Fisher), y en un bloque térmico Isotemp (Thermo Fisher).
- Para las centrifugaciones se utilizaron centrífugas refrigeradas 5417R y 5810R marca Eppendorf (Hamburgo, Alemania, España), Beckam Avanti J-20, y L8-M Ultracentrifuge y rotor SW 28 Ti (Beckman Instruments, Madrid, España). También se utilizaron picofugas Stratagene y Galaxy Ministar (VWR International Eurolab, Barcelona, España).
- Las medidas espectrofotométricas se hicieron con un espectrofotómetro Hitachi U-2000 (Grupo Taper, Madrid, España) y para la determinación de la viabilidad celular se utilizó los lectores de ELISA modelo ELx808 de BioTek (Izasa, Barcelona, España) y Multiskan SkyHigh (Thermo Fisher). Las determinaciones

espectrofotométricas de la concentración de ADN y ARN se realizaron con un NanoDrop 1000 (Thermo Fisher, Madrid, España) y se analizaron con el programa informático correspondiente.

- Para hacer filtraciones a vacío se empleó una bomba Millipore XX5522050 (Millipore Ibérica, Madrid, España). La esterilización de materiales sólidos y líquidos, así como el material de cultivos celulares se llevó a cabo en un autoclave, modelo Tuttnaver 2340 M (Duerolab, Salamanca, España).
- Se utilizó los termocicladores Eppendorf Mastercycle ep gradient (Thermo Fisher, Madrid, España) y SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems) para llevar a cabo las PCR analíticas y las RTs. Los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real en tubos de 0,2 ml se realizaron en un equipo ABI PRISM® 7300 Sequence Detection System y en el equipo QuantStudio3 (Applied Biosystems), de Applied Biosystems (Thermo Fisher, Madrid España). Para las tarjetas microfluídicas se utilizó el modelo ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System de la misma compañía. Los reactivos se manejaron dentro de una campana de flujo laminar Euroclone modelo Aura Mini (Milán, Italia).
- La secuenciación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca utilizando un secuenciador automático capilar ABI PRISM 3100-Genetic Analyzer de Applied Biosystems (Thermo Fisher, Madrid España). Para la visualización de las secuencias y diseño de estudios de restricción de los plásmidos se usó el programa Gene Construction kit 2.5.13 para MacOS X (Textco, New Hampshire, EE.UU.).
- La electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa se realizó en un sistema de geles horizontales sumergidos modelo MT-1001 de la casa Ecogen (Madrid, España), acoplado a una fuente Bio-Rad Power Pac 3000 (Bio-Rad, Madrid, España).
- Se empleó el sistema de electroforesis modelo Mini-Protean II Cell con fuente de alimentación modelo PowerPac 300 para llevar a cabo las electroforesis de proteínas. La transferencia electroforética a membranas de nitrocelulosa se realizó en un sistema Trans-Blot Cell II, todo procedente de la casa comercial Bio-Rad (Madrid, España).

- Para la visualización de la fluorescencia en los geles de ácidos nucleicos y la luminiscencia de las membranas de western blot se empleó un equipo de análisis de imagen Fujifilm LAS- 4000 (TDI, Madrid, España). La captura de imágenes se llevó a cabo con una cámara refrigerada del equipo, sin filtros y con una apertura del diafragma del objetivo de f 0,8 cuando se trataba de quimioluminiscencia, y con filtro Y515 y diafragma del objetivo f 1,5 para SYBR Green, con luz azul como fuente de excitación. Las imágenes se analizaron con el programa informático MultiGauge v3.0 (Fujifilm).
- Las homogeneizaciones de tejidos se realizaron con los homogeneizadores Polytron Typ PT 10/35 Kinemática GMBH (Lucerna, Suiza) o “Bullet Blender Storm” de Next Advance (NY, EE.UU.), o con un sonicador tipo baño Ultrasonic Cleaner 400 W, 30 kHz (Fungilab S.A., Barcelona, España), en el caso de compuestos poco solubles.
- Para la manipulación de los cultivos celulares se utilizó una campana de flujo laminar modelo AV-30/70 (Telstar, Barcelona, España); las células se mantenían a 37°C en un incubador termostatizado con atmósfera de CO₂ humidificada modelo Hepa Class 100 (Thermo Fisher, Madrid, España), y se observaban a través de un microscopio Leitz Fluovert FS (Leitz). Se utilizaron placas de cultivo y frascos Roux de cuello inclinado de la marca TPP (Biotech S.L., Madrid, España) para el cultivo de las líneas celulares. Para algunas líneas celulares se utilizaron frascos de cultivo con colágeno a la concentración de 0,5 mg/ml. La esterilización de las soluciones se hizo mediante filtro Sterivex de 0,2 µm (Millipore Ibérica, Madrid, España). Para contar las células se utilizaron cámaras Thoma (Duerolab, Salamanca, España).
- Para visualizar la fluorescencia se utilizó un microscopio Nikon Eclipse TE 2000-S (Nikon, Duerolab, Salamanca, España) o un microscopio confocal modelo TCS SP2 (Leica, Barcelona, España) perteneciente al Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca.
- Los cortes histológicos en muestras congeladas se realizaron con un criostato (Leica Biosystems, modelo 1900UV, Barcelona, España).

- El cultivo de bacterias se hizo en una estufa termostatizada a 37°C modelo S-20 (Selecta, Barcelona, España). Para el cultivo de bacterias en medio líquido en agitación se usó un agitador orbital (Infors HT, Basilea, Suiza).
- El análisis por citometría de flujo de la captación o eflujo de compuestos fluorescentes se realizó en un citómetro FACScalibur, de la casa BD Biosciences (Madrid, España). El programa informático utilizado para la adquisición y análisis de datos fue el CellQuestPro, de la misma casa comercial.
- Se utilizó un sistema cromatográfico acoplado a un detector de masas, HPLC-MS/MS, de la casa Agilent Technologies (Santa Clara, EE.UU.). Este sistema se compone de un equipo de HPLC serie 1200 formado por: una bomba cuaternaria con desgasificador de vacío (modelo G12354A); un inyector de 20 µl de capacidad (modelo G1328B); un detector ultravioleta/visible (modelo G1314B) de longitud de onda variable y programable y una columna de fase reversa Zorbax C18 de 30 mm x 2,1 mm, 3,5 µm de tamaño de poro termostatizada a 35°C (Agilent Technologies). El Detector de Masas Triple Cuadrupolo (modelo G6410A) está acoplado a una fuente de ionización a presión atmosférica (API) serie 6000 (modelo G1948B). Todo el sistema se controló desde un ordenador Pentium IV (modelo HP LP2065) utilizando el software Q-TOF, QQQ, TOF (Agilent Technologies) que permite, tanto el control del HPLC, como del detector de masas.
- Las determinaciones de parámetros bioquímicos indicadores de daño hepático y renal en suero se llevaron a cabo mediante los kits de química seca “Spotchem II Liver-1” y “Spotchem II Kidney-3” compatibles con el analizador automatizado “Spotchem EZ SP-4430” (Arkray Factory, A. Menarini Diagnostics, Badalona, España).
- Se contó con pequeño equipamiento, como agitadores magnéticos Selecta (DueroLab, Salamanca, España), agitadores Vortex de Ika Works (Wilmington, EE.UU.) y micropipetas Gilson (Provisa, Salamanca, España).
- Las muestras se conservaron en congeladores a -20°C y -80°C marca Revco (Pacisa), mientras que los viales de almacenamiento de las distintas líneas

celulares se conservaban en contenedores de N₂ líquido (Thermo Fisher, Madrid, España).

- El material de vidrio utilizado en Biología Molecular se trataba mediante calor seco a 180°C durante un mínimo de 4 h en una estufa Memmert modelo 500 (Izasa, Barcelona, España).

3.4. CULTIVOS CELULARES

Los medios de cultivo estériles que se utilizaron para cada línea celular fueron los siguientes:

- Para las células AGS: F-12 Ham suplementado con 13,8 mM de bicarbonato sódico y 1 % de Glutamax.
- Para las células HEK-293T: DMEM suplementado con 1 % de GlutaMax.

A todos los medios se les añadió FBS inactivado al 10% (v/v). La inactivación del suero se realizó a 56°C durante 30 minutos. También fueron suplementados con una mezcla de antibióticos y antimicóticos al 1 % que contenía penicilina (20 U/ml) y estreptomicina (0,02 mg/ml).

Tanto al recibir las células como al recuperarlas del N₂ líquido en el que se almacenaban la descongelación de los criotubos se hizo en condiciones de esterilidad en baño maría a 37°C. Una vez descongeladas, se centrifugaron a 300 xg durante 10 min. El precipitado se resuspendió en el medio de cultivo correspondiente y se pasó a frascos Roux que se introdujeron en la estufa a 37°C, en atmósfera del 5 % de CO₂ en aire y humedad relativa del 80 %.

El crecimiento de las células se produjo tras la adhesión a la superficie de la placa. Para la línea celular HEK-293T se utilizaron frascos de cultivo con colágeno tipo I a concentración de 0,5 mg/ml.

Cuando se llegaba a confluencia del cultivo se realizaba una tripsinización (0,25% de tripsina y 20 mM de EDTA en PBS) y las células se recogían en medio de cultivo. La viabilidad celular se determinaba mediante el test del azul de Tripán (apartado 3.15.5).

3.4.1. Cultivo de células para estudios de expresión génica y estudios de funcionalidad de proteínas transportadoras

La expresión de los diferentes genes analizados en las distintas líneas celulares con las que se ha trabajado en esta Tesis Doctoral, así como la evaluación de la funcionalidad de las bombas exportadoras ABC, se determinó sembrando las células en placas de 6 pocillos en un volumen final de 3 ml/pocillo a la densidad celular adecuada en función de cada línea celular. A las 48 h de la siembra las células se recogían y se procesaban para la obtención de ARN total (apartado 3.10.1), para la obtención de proteínas totales (apartados 3.11.2 y 3.11.3), o bien para los estudios de citometría de flujo (apartado 3.13).

3.4.2. Cultivo de células para estudios de viabilidad celular

Para evaluar el efecto de agentes citostáticos e inhibidores de los transportadores en las distintas líneas celulares empleadas en esta Tesis Doctoral, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad variable en función del tipo celular. A las 24 h se añadían los agentes citostáticos con o sin inhibidor, y se incubaban durante 72 h, para posteriormente realizar el test de formazán o de MTT (apartado 3.15.2) o el test de la sulforrodamina (apartado 3.15.3).

3.4.3. Edición genética mediante CRISPR/Cas9

La técnica de edición genética CRISPR/Cas permite la modificación de la expresión génica mediante el uso de una endonucleasa bacteriana, Cas9, que realiza el corte en el ADN guiada por una secuencia de ARN capaz de reconocer la secuencia de ADN que queremos cortar. Una vez realizado el corte por la endonucleasa, por un lado puede darse la reparación del ADN por parte de las células, y por tanto la incorporación de nuevas mutaciones que puedan interrumpir la correcta transcripción del gen; o bien, el corte proporciona la posibilidad de introducir en el genoma un fragmento de interés que facilitemos a las células.

En esta Tesis Doctoral, hemos utilizado esta técnica con el fin de silenciar de forma estable genes específicos en la línea celular AGS. Para ello se utilizó el método de

transfección transitoria con lípidos catiónicos. Este método permite la adquisición de las células del transgén, en este caso Cas9, de manera transitoria, ya que el plásmido recombinante es extracromosómico y se pierde durante la división celular. Para ello se utilizaron los reactivos “Lipofectamine™ LTX Reagent” y “Plus™ Reagent”, y los plásmidos:

- pCMV-tdTomato-N1, que codifica la proteína fluorescente Tomato en tandem.
- pH-L-Cas9, que codifica SpCas9, la endonucleasa Cas9 humanizada de *Streptococcus pyogenes*.
- Plásmido pGEM-sgc vacío o bien que contenía un casete con el promotor U6, un terminador de polimerasa III y la correspondiente secuencia codificante de un crRNA que determinará el sitio de corte en la secuencia del gen diana.

Previamente, en nuestro laboratorio se determinaron las condiciones óptimas para realizar la transfección de las células AGS con el lípido catiónico Lipofectamina LTX eligiéndose la relación lípidos/ADN con las que se conseguía la mayor eficacia de transfección y menor toxicidad celular.

Las células se sembraban en placas de 24 pocillos a la densidad celular apropiada (70000 células por pocillo), y a las 24 h eran transfectadas. La cantidad total de ADN plasmídico que se utilizaba en cada pocillo fue de 750 ng. Las mezclas de transfección se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, tiempo necesario para que el reactivo plus y el ADN interaccionen favoreciendo la formación de liposomas. Posteriormente se añadió la lipofectamina en proporción ADN:LTX 1:3. Los complejos de transfección fueron retirados a las 24 h, y se añadió medio nuevo, que contenía puromicina a la concentración 1 µg/ml. A las 48 h se determinó la eficacia de transfección midiendo por citometría de flujo la fluorescencia en las células transfectadas con el plásmido tdTomato. Al resto de pocillos transfectados, se les cambió el medio por medio nuevo sin puromicina a las 72 h. Para comprobar la eficacia del CRISPR, una vez recuperadas las células se recogió ADN genómico y se realizó el ensayo de detección de escisiones en el genoma o test de la endonucleasa T7 (apartado 3.8.7).

3.4.4. Transducción de células con lentivirus

Para conseguir el silenciamiento de MRP4 en la línea celular AGS, se utilizaron lentivirus recombinantes. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos y se transdijeron a las 24 h con los lentivirus recombinantes en presencia de polibreno a MOI 10 (multiplicidad de infección). Las placas se centrifugaron a 1800 xg durante 90 min a 32°C. A las 16 h se retiró el medio de cultivo y se añadió medio nuevo. Cuatro días tras la transducción se determinó el porcentaje de células fluorescentes que expresaban la EGFP por citometría de flujo.

3.4.5. Cultivo de células para selección de clones

Para la selección de clones a partir de una población policlonal después de la transducción o la transfección se realizó una dilución límite del cultivo. Para ello se sembró una célula por pocillo en una placa de 96 pocillos. Se realizó un seguimiento de los pocillos, descartando aquellos en los que crecían varias colonias. Para la selección de clones de células transducidas con lentivirus recombinantes, se determinó la presencia de una única población de células fluorescentes que expresaban la EGFP por citometría de flujo.

3.5. EXPERIMENTOS IN VIVO

Para comprobar la capacidad quimiosensibilizante del diclofenaco se utilizaron ratones nude atípicos hembra de 8 semanas de edad. Los ratones fueron anestesiados con isofluorano para la implantación en ambos flancos mediante inyección subcutánea de una solución de células AGS (2×10^6) resuspendidas en una mezcla de 100 µl de medio RPMI más 100 µl Matrigel. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de $\approx 75 \text{ mm}^3$ (12 días post-inyección), los animales se dividieron en cuatro grupos, y dos veces por semana se les administraba, mediante inyección intraperitoneal, el tratamiento correspondiente según el grupo experimental:

- **Grupo diclofenaco:** 20 mg/kg p.c de diclofenaco.
- **Grupo sorafenib:** 10 mg/kg p.c de sorafenib .
- **Grupo sorafenib + diclofenaco:** a combinación de diclofenaco (20 mg/kg) y sorafenib (10 mg/kg p.c.).
- **Grupo control:** Solución salina.

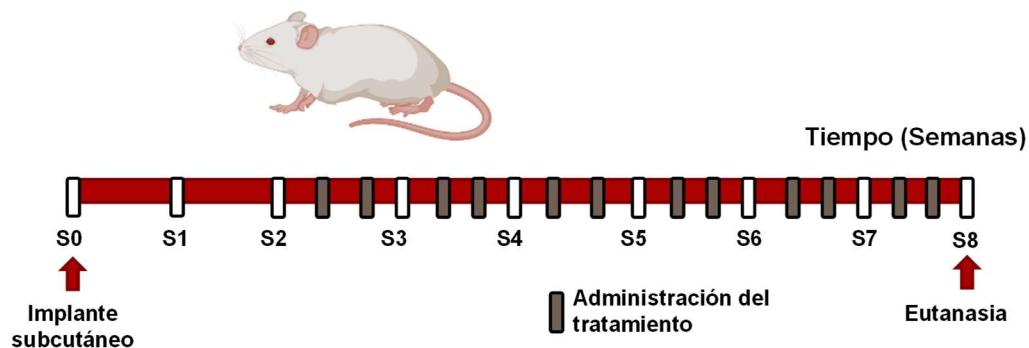


Figura MM-1. Esquema ilustrativo del modelo experimental *in vivo* realizado para estudiar la quimiosensibilización del ACG al sorafenib.

Del mismo modo, dos veces por semana se realizó el seguimiento del tamaño de los tumores y el peso de los animales. Para calcular de manera aproximada el volumen de los tumores se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen tumoral} = \frac{(\text{Largo} \cdot \text{Ancho})^2}{2}$$

El periodo experimental concluyó a los 43 días de tratamiento, cuando los tumores de mayor tamaño presentaban un volumen de $\sim 1,5 \text{ cm}^3$ (límite máximo establecido por el Comité de Bioética de Experimentación Animal). Los animales fueron sacrificados mediante sobredosis con pentobarbital sódico i.p., y se procedió a la resección de los tumores y una muestra de suero. Los tejidos se colocaron inmediatamente en N_2 líquido y las muestras se conservaron a -80°C para posteriormente determinar el contenido de sorafenib en los tumores (apartado 3.15.6), y la toxicidad hepática y renal (apartado 3.15.5).

3.6. CULTIVO DE BACTERIAS

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

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

3.6.1. Transformación de bacterias por choque térmico

Se mezclaron 50 µl de suspensión bacteriana con 1 µl (10 ng DNA) del plásmido de interés y se incubó durante 30 min en hielo. Para facilitar la entrada del plásmido, las bacterias fueron sometidas a un choque térmico, el cuál consistió, en primer lugar en elevar la temperatura a 42°C durante 2 minutos y en segundo lugar mantener la mezcla en hielo otros 2 minutos. A continuación se añadieron 250 µl de medio SOC sobre dicha mezcla y se realizó una incubación en agitación durante 1 h a 37°C. Posteriormente, la mitad del volumen se sembró en condiciones de esterilidad por extensión con un asa de vidrio en una placa con medio LB y agar suplementado con el antibiótico de selección ampicilina a una concentración de 100 µg/ml. Las placas se incubaron en una estufa a 37°C durante 16 h. En el caso de las bacterias *E. coli* “One shot Mach®” el procedimiento de transformación fue igual a excepción del choque térmico, que en este caso consistió en elevar la temperatura durante 30 segundos a 42°C seguido de 2 minutos en los que la mezcla se mantuvo en hielo.

3.6.2. Selección de colonias y crecimiento en medio líquido

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

3.6.3. Purificación del ADN plasmídico de cultivos de bacterias

Para la extracción del ADN plasmídico de los cultivos de *E. coli* de una manera rápida y eficaz, se utilizó el kit comercial “illustra PlasmidPrep Mini Spin”. Este kit utiliza columnas de sílice que adsorben el ADN y permite su posterior elución. El ADN plasmídico purificado se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm en un NanoDrop. Posteriormente para comprobar la identidad del clon seleccionado, se realizó un estudio de restricción (apartado 3.8.5).

3.7. PRODUCCIÓN DE VECTORES VIRALES

3.7.1. Fundamento

Los lentivirus son retrovirus de ARN lineal monocatenario, cuyo genoma se integra en el genoma de la célula huésped, y por tanto, permite una expresión estable y de larga duración del transgén de interés. Esto hace que los lentivirus sean idóneos para realizar estudios *in vitro* de la sobreexpresión o silenciamiento de un gen de interés.

Para llevar a cabo distintos experimentos *in vitro* se han producido lentivirus recombinantes defectivos de forma que, por un lado, las partículas virales generadas no tuvieran capacidad replicativa, y por otro, los genes de las proteínas virales se sustituían por el transgén de interés. Para producir lentivirus se necesita una línea celular específica (célula empaquetadora) que se transfecta con tres plásmidos, dos de ellos con secuencias que codifican las proteínas estructurales de los lentivirus, y un tercer plásmido recombinante que contenga el ADN de interés flanqueado por las secuencias LTR (“long terminal repeats”) y por la señal de empaquetamiento, además de por otros elementos necesarios en *cis* como el TSS (sitio de inicio de transcripción), y el tracto polipurínico necesario para la síntesis de la segunda cadena. De esta manera, se generarán partículas lentivirales defectivas que pueden ser purificadas y concentradas a partir de los sobrenadantes del cultivo celular (Kuroda et al. 2009).

3.7.2. Producción de las partículas virales

Se utilizaron las células empaquetadores HEK-293T que se sembraron a subconfluencia en placas de 10 cm de diámetro recubiertas con colágeno. Se incubaron durante 8 h a 37°C

en atmósfera de 5 % de CO₂ humidificada. A continuación, se transfecaron utilizando el método de la polietilenimina (PEI) con los siguientes plásmidos:

- El vector de transferencia pLVTHM que portaba el shARN de interés. Este además contenía el gen reportero EGFP (“Enhanced Green Fluorescence Protein”), que permite el seguimiento de la fluorescencia de las células transducida, tanto por microscopía de fluorescencia como por citometría de flujo, así como el transgén de interés, separados entre sí por un elemento IRES. De forma paralela, se realizaba la transfección con el plásmido lentiviral pLVTHM-shLuc2, que codifica la EGFP y que se utilizó para producir virus control.
- El plásmido psPAX2, que codifica proteínas estructurales del virus.
- El vector de expresión pMD2.G, que codifica la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular.

Para formar los complejos PEI:ADN se mezclaron 6 µg del plásmido psPAX2, 4,5 µg del plásmido pMD2.G y 6 µg del plásmido de transferencia, disueltos en 1,2 ml de solución salina, con 60 µl de PEI. La mezcla se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y se añadió a la placa de cultivo de células HEK-293T. Para mejorar la eficacia de transfección se añadió al cultivo cloroquina a 25 µM, ya que inhibe la degradación del ADN plasmídico en los lisosomas y aumenta así el rendimiento del proceso de producción de algunos tipos de virus (Gavrilescu and Van Etten 2007). A las 24 h se retiró el medio de cultivo con los complejos PEI:ADN y se sustituyó por medio nuevo.

Se recogió el medio de cultivo de las placas a las 48 h, 56 h y 72 h después de la transfección. Este se purificó utilizando filtros de 0,45 µm de tamaño de poro y se ultracentrifugó a 20000 rpm, a 16°C durante 130 min para concentrar las partículas lentivirales. El precipitado se resuspendió en medio de cultivo RPMI y se incubó a 4°C durante 4 h. Se realizaron alícuotas de la suspensión viral y se conservó a -80°C hasta su uso.

3.7.3. Titulación por citometría de flujo

El título vital se determinó infectando las células diana con diluciones seriadas de la solución viral. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a la densidad celular

apropiada. A las 24 h, se prepararon las diluciones crecientes de la solución viral en medio de cultivo con polibreno, y se añadieron a la placa, que se centrifugaba a 1800 xg durante 90 min a 32°C. 16 h después, se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por medio nuevo. Cuatro días tras la transducción, se determinó el porcentaje de células EGFP+ por citometría de flujo. La concentración de partículas virales se calculó por la fórmula:

$$\text{Título } \left(\frac{\text{TU}}{\text{ml}} \right) = \frac{10^{\text{ED}50} * 2 * \text{Nº células}}{\text{Vol}}$$

donde,

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

3.7.4. Determinación de la multiplicidad de infección (MOI) y condiciones de transducción óptimas

La MOI es la relación entre el número de partículas virales y el número de células diana presentes en el cultivo. Se determinó la MOI óptima (aquella en la que utilizando la menor cantidad de partículas virales se consigue una transducción más eficiente) sembrando en placas de 96 pocillos el número adecuado de células según la línea celular. A las 24 h se infectaron con diferentes MOIs utilizando partículas virales con polibreno. A los 4 días tras la transducción, se determinó el número de células fluorescentes que expresaban la EGFP por citometría de flujo.

3.8. MÉTODOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.8.1. PCR de alta fidelidad

Para llevar a cabo la PCR de alta fidelidad se utilizó el kit “AccuPrime Pfx SuperMix”. Se realizó una mezcla del ADN molde con los reactivos suministrados por el kit siguiendo las instrucciones del proveedor. La mezcla se incubó en un termociclador con las siguientes condiciones: un ciclo a 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos de 95°C 15 segundos, 58°C 30 segundos y 68°C durante un tiempo variable (1 minuto por cada kilobase del amplicón); y finalmente un ciclo de extensión a 68°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se

visualizaron en un gel de agarosa y se purificaron tal y como se indica en los siguientes apartados.

3.8.2. Electroforesis en geles de agarosa no desnaturalizante

Los geles de agarosa se prepararon mezclando tampón TAE pH 8,3 (40 mM Tris base, 1m EDTA y 20 mM ácido acético) con 1-2% de agarosa (p/v), dependiendo del tamaño de los amplicones a analizar. La mezcla se llevó a ebullición para disolver la agarosa y se añadió SYBR Green I para teñir el ADN. Tras polimerizar, el gel se colocó en la cubeta de electroforesis con tampón TAE. Las muestras se mezclaron con la solución de carga, relación 1:6 (v/v), antes de depositarlas en los pocillos del gel. Como patrón de tamaños moleculares de ADN se empleó un estándar de 1 kb o 100 pb, según el caso. El resultado de la electroforesis se visualizó en un equipo de análisis de imagen LAS-4000.

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

Tras su visualización, en ocasiones los productos de PCR se recuperaron del gel de agarosa. Para ello, el fragmento del gel que contenía la banda de ADN de interés se cortó. Se usó el kit “Illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification” para extraer y purificar el ADN siguiendo las instrucciones del proveedor. La agarosa se disolvió calentando la solución correspondiente a 60°C durante 15 min, el ADN se purificó en una columna y se eluyó con tampón TE o agua, dependiendo de su aplicación posterior.

El ADN resultante de reacciones enzimáticas se purificaba usando columnas del mismo kit, aplicando el protocolo correspondiente.

3.8.4. Purificación del ADN genómico procedente de cultivos celulares

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

3.8.5. 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/μg de ADN) y agua ultrapura. Se añadía albúmina bovina sérica al 1% a la mezcla cuando la casa comercial lo recomendaba. 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 por electroforesis en un gel de agarosa.

3.8.6. 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. Se envió una mezcla de 500 ng en caso de ser ADN plasmídico, o bien 100 ng por cada kilobase si era un producto de PCR, con 3,3 pmol de un “primer” específico, disueltos en 8 µl de agua ultrapura. El análisis de los cromatogramas tras la electroforesis capilar se realizó con el programa informático FinchTV 1.4 (Geospiza, PerkinElmer, Seattle, EE.UU.) y para la visualización de las secuencias de ADN se usó el programa Gene Construction Kit.

3.8.7. Ensayo de detección de escisiones en el genoma o test de la endonucleasa T7

La eficacia del método de silenciamiento CRISPR/Cas9 se comprobó mediante el ensayo de escisiones en el genoma, también llamado test de la endonucleasa T7. Este ensayo está basado en la capacidad de la endonucleasa T7 de detectar y cortar heterodímeros de ADN (Lowell and Klein 2000). Para ello se siguió el protocolo de kit comercial “GeneArt® Genomic Cleavage Detection Kit”. Brevemente, extrajo ADN genómico y, utilizando la enzima AmpliTaq Gold® y los cebadores específicos para cada gen, se amplificó un fragmento de ADN que contenía la región en la que se deseaban introducir mutaciones por CRISPR/Cas9. El producto de PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión y el amplicón se purificó. Posteriormente se llevó a cabo la desnaturalización de las hebras de ADN por calentamiento a 95 °C durante 5 min, seguido del reanillamiento enfriando progresivamente hasta 25 °C. En este paso pueden darse dos posibilidades, que el reanillamiento se produzca entre hebras de ADN complementarias, o bien, que este proceso ocurra entre dos hebras no complementarias fruto de las diversas mutaciones que pueda haber incorporado el binomio CRISPR/Cas9. En este último caso, la falta de complementariedad es detectada y cortada por la endonucleasa. Los fragmentos resultantes se visualizan en un gel de agarosa de alta resolución. Pueden observarse 3 bandas, una de mayor tamaño correspondiente al amplicón sin cortar, y otras dos de

menor tamaño correspondientes a los productos de corte de la enzima de detección (Figura MM-2).

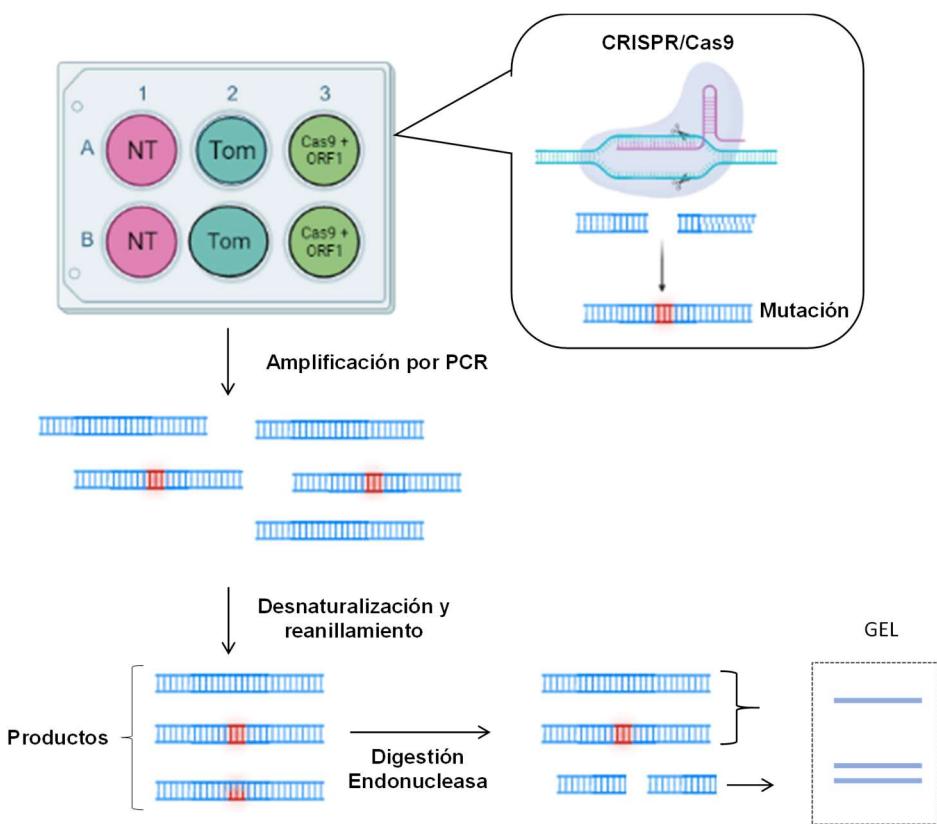


Figura MM-2. Esquema del ensayo de detección de escisiones en el genoma llevado a cabo para determinar si el silenciamiento por el método CRISPR/Cas9 ha resultado efectivo.

3.9. TÉCNICAS DE CLONACIÓN

3.9.1. Clonación de la secuencia codificante de MRP4 en el plásmido de lentivirus pWPI

El plásmido pWPI-MRP4 fue desarrollado en un trabajo previo a esta Tesis Doctoral (Espinosa-Escudero 2018). Brevemente, la secuencia codificante de la ORF del gen *ABCC4* humano fue amplificada a partir del ADN complementario (ADNc) de células AGS mediante PCR de alta fidelidad (apartado 3.8.1), utilizando una estrategia de clonación de la ORF en dos fragmentos en vectores pGEM-T. Posteriormente se añadieron a los extremos de las secuencias sitios de corte para las enzimas de restricción adecuadas, y se procedió a la restricción de los fragmentos y su posterior ligación para la obtención de la ORF completa, y su posterior clonación en el plásmido lentiviral pWPI-V5.

3.9.2. Generación de plásmidos portadores de sh-ARN (*short hairpin ARNs*)

Dos de las secuencias de los sh-ARN frente a MRP4 habían sido previamente publicadas (sh2-MRP4: (Sassi et al. 2008); y sh4-MRP4: (van de Ven et al. 2008)), mientras que otras dos fueron diseñadas en el laboratorio (Tabla MM-2). En base a ello, se diseñaron oligonucleótidos para obtener los sh-ARN de interés con los extremos cohesivos para las enzimas de restricción Mlul y Clal. La estrategia a seguir consiste en diseñar cuatro parejas de oligonucleótidos (F y R), que posteriormente fueron hibridadas con su complementaria para generar la secuencia completa de cada sh-ARN. Se realizó una fosforilación de los extremos mediante una quinasa en presencia de ATP, y posteriormente se llevó a cabo la ligación con el plásmido lentiviral pLVTHM (Addgene) en los sitios de Clal y Mlul usando una relación vector:inserto de 1:25 con la enzima ligasa T4 en un tampón adecuado.

Tabla MM-2: Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para clonar los shABCC4 y shLuc2.

sh-ARN	Oligos	Secuencia (5' - 3')
shLuc2	F	CGCGTCTGACGCGGAATACTTCGATTCAAGAGATCGAAGTATTCCCGTCA GTTTTGGAAATCG
	R	CGATTTCAAAAACTGACGCGGAATACTTCGATCTCTGAATCGAAGTATTG CGCGTCAGACGCG
sh1-MRP4	F1	CGCGTCACAGAACGCCTCTTAACATTCAAGAGATGTTAAA GAAGGCTCTGTGCTTTGGAAAT
	R1	CGATTTCAAAAAGCACAGAACGCCTCTTAACATCTCTTGAA TGTAAAGAAGGCTCTGTGCA
sh2-MRP4	F2	CGCGTCAGTGTCTTACACTCCTAAGTTCTAGGAAGTGTA AGAACACTGTTGGAAAT
	R2	CGATTTCAAAAACAGTGTCTTACACTCCTAGAGAACTTAG GAAGTGTAAAGAACACTGA
sh3-MRP4	F3	CGCGTTACGTCTTGTAACCTTCATTCAAGAGATGAAGAGT TAACAAGGACGTATTTGGAAAT
	R3	CGATTTCAAAAATACGTCTTGTAACCTTCATCTCTGAA TGAAGAGTTAACAGGACGTAA
sh4-MRP4	F4	CGCGTGATGGTGCATGTGCAGGATTCAAGAGAACCTGCACATG CACCATCTTTGGAAAT
	R4	CGATTTCAAAAAGATGGTGCATGTGCAGGATTCTCTGAAATCCT GCACATGCACCATCA

A continuación, se transformaron, por choque térmico, bacterias *E. coli* DH5 α con 2 μ l del producto de ligación como se describe en el apartado 3.6.1. Las bacterias se sembraron en placas de LB solidificadas con agar, y suplementadas con ampicilina como antibiótico de selección. Algunas colonias se crecieron en medio LB líquido también suplementado con el antibiótico, y se extrajo el ADN plasmídico (apartado 3.6.3). La identidad de los clones seleccionados se confirmó con un estudio de restricción utilizando las enzimas EcoRI y XbaI y, finalmente, mediante secuenciación usando el oligonucleótido SP6 (5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3') disponible en el Servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca (apartado 3.8.6).

El plásmido control pLVTHM-shLuc2 se había clonado previamente en el laboratorio siguiendo la misma estrategia.

3.9.3. Clonación de las guías para el sistema CRISPR/Cas9

Se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos (F y R) para cada gen (apartado 3.14.3) que fueron hibridadas para la construcción de la guía y posteriormente ligadas al plásmido pGEM-sgc en el sitio *BbsI* usando una relación vector:inserto 1:14. A continuación, por choque térmico se transformaron bacterias DH5 α con 2 μ l del producto de la ligación como se describe en el apartado 3.6.1. Se sembraron en placas con medio LB y agar suplementado con ampicilina como antibiótico de selección. Alguna de las colonias se crecieron en medio LB líquido suplementado con el antibiótico y se extrajo el ADN plasmídico (apartado 3.6.3). Se confirmó la identidad de los clones seleccionados con un estudio de restricción utilizando las enzimas *BbsI* y *PvuII*, y finalmente, mediante secuenciación en el servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca (apartado 3.8.6).

El plásmido pHL-Cas9 que contiene la endonucleasa, y el plásmido control CMV-Tomato ya habían sido clonados previamente en el laboratorio.

3.10. ANALISIS DE LOS NIVELES DE ARNm POR RT-PCR CUANTITATIVA

3.10.1. Extracción y cuantificación del ARN total

Para extraer el ARN total a partir de los homogeneizados de tejido y de los lisados celulares, se utilizó el kit comercial “Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit”. Siguiendo el protocolo del proveedor se procesaron un máximo de 5×10^6 células o 30 mg de tejido. El precipitado obtenido se mezclaba con un tampón de lisis que inactivaba las ARNasas, asegurando de esta manera la integridad del ARN durante el proceso de extracción. A continuación se añadía etanol para proporcionar las condiciones adecuadas de retención del ARN en la membrana de sílice de las columnas sobre las que se aplicaban las muestras. El ADN adsorbido en la membrana se eliminaba mediante tratamiento con DNase I, y la purificación se completaba con varios pasos de lavados y centrifugaciones. La concentración del ARN extraído se cuantificaba espectrofotométricamente a $\lambda = 260$ nM en el NanoDrop.

3.10.2. Transcripción reversa (RT)

Se sintetizó el ADN complementario (ADNc) que servía como molde en la reacción de PCR a partir del ARN extraído. Para la retrotranscripción se usó como molde 2 μ g del ARN total, utilizando el kit comercial “SuperScript[®] VILO[™] cDNA Synthesis Kit” o el kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit”. Estos kits proporcionan la transcriptasa reversa de un virus de la leucemia murina de Moloney recombinante (rMoMuLV) optimizada, el buffer de reacción y *random primers*. Se siguieron las condiciones de incubación en el termociclador indicadas por el proveedor.

3.10.3. Realización de la PCR cuantitativa (qPCR)

La determinación de los niveles de expresión de genes se hizo utilizando una variante de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis et al. 1992) la PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR). La qPCR se llevó a cabo utilizando como sistema de detección SYBR Select Master Green.

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

La abundancia del ADN problema se corrigió por la del normalizador, GAPDH o HPRT, determinados paralelamente en cada muestra. Las determinaciones se realizaron siempre por duplicado y se incluyeron blancos de reacción, es decir, tubos en los que se sustituyó el ADNc por agua ultrapura.

3.10.4. Tarjetas microfluídicas

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

El uso de TLDA presenta varias ventajas respecto al uso de la PCR convencional: se usa un volumen de ADNc, es un método sensible, fiable, más barato, y además es un método rápido.

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

Para analizar los resultados, se llevó a cabo una cuantificación relativa como se describe en el apartado 3.10.5. Para normalizar los valores de Ct de los genes diana se utilizaron los genes *GAPDH* y *β-actina* como controles endógenos (la media de sus valores de ΔCt).

3.10.5. Cuantificación relativa

La cuantificación relativa se basa en el método de comparación del ciclo umbral o Ct. Se utiliza un control endógeno como elemento normalizador, de forma que, la relación entre

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

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

En otros casos, en lugar de utilizar una muestra como calibrador, se ha estudiado la expresión relativa de cada gen en relación a la expresión del normalizador. En este caso, la cantidad de diana, normalizada frente al control endógeno, y relativa al normalizador, viene dada por:

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

3.11. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

3.11.1. Soluciones empleadas

- Tampón A: 0,2 mM CaCl₂, 10 mM Hepes-Tris pH 7,4, 100 mM KNO₃, 10 mM MgCl₂ y 250 mM sacarosa.
- Tampón fостato saline (PBS): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 Mm KH₂PO₄ a pH 7,4.
- Tampón de migración: 192 mM L-glicina, 1% SDS y 25 mM Tris.
- Tampón RIPA: IGEPAL CA-630 1%, desoxicolato sódico 0,5%, SDS 0,1% disuelto en PBS.
- Tampón de transferencia: 192 mM L-glicina, 20 % Metanol y 25 mM Tris.
- Tampón Tris saline (TBS): 2,42 g/l Tris base, 8 g/l NaCl; pH 7,6.
- TBS-T: TBS suplementado con 0,1% de Tween-20 (v/v).
- Solución de carga 4x: 250 mM Tris-HCl base pH 6,8, 9,2% SDS, 10% glicerol, 20% - mercaptoetanol, 0,08% azul de bromofenol.

3.11.2. Obtención de homogenados de cultivos celulares

Para la obtención de homogeneizados de células se tripsinizaron las células y tras lavarlas con PBS para eliminar restos de medio y tripsina, se resuspendieron en el volumen deseado de RIPA más inhibidor de proteasas al 1%. Posteriormente se incubaba el homogeneizado 20 min en hielo agitando cada 5 min. Se centrifugó a 20.000 xg durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante que contenía el homogeneizado celular se congeló a -80°C. Posteriormente se determinó la concentración de proteínas (apartado 3.15.4).

3.11.3. Obtención de crudos de membranas de cultivos celulares

Para la obtención de crudos de membrana las células se tripsinizaron y tras lavarlas con PBS para eliminar restos de medio y tripsina, se resuspendieron en el tampón A (0,5 ml/10⁶ células). Posteriormente se utilizó un potter manual “tight fitting” para disgregar las células. Los crudos de membrana se separaron del citoplasma ultracentrifugando a 46700 rpm durante 95 min a 16°C. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante que contenía las proteínas del citoplasma y el contenido intracelular, y por otro lado, se resuspendió el precipitado, es decir los crudos de membrana, en tampón A (0,1 ml/10⁶ células).

3.11.4. Procedimiento

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

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

El homogeneizado de proteínas se mezcló con la solución de carga 4x y β-mercaptoetanol (5%, v/v), y se dejó a temperatura ambiente durante 5 min. Se cargaron por pocillo 20-50 µg de proteínas, y se desencadenó la electroforesis vertical en una cubeta con solución de migración a una corriente constante de 15 mA para el gel concentrador, y 30 mA para el gel separador.

3.11.4.2. Transferencia

Una vez terminada la electroforesis se llevó a cabo la transferencia de proteínas desde el gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa en una cubeta con tampón de transferencia sometido a una corriente constante de 250 mA, a 4°C en agitación durante 120 min.

3.11.4.3. Inmunodetección

Tras la transferencia a la membrana de nitrocelulosa, se bloqueó los sitios inespecíficos de unión embebiendo la membrana durante 1 h en agitación en leche descremada al 5% (p/v) disuelta en TBS-T. Después la membrana se incubó con el anticuerpo primario específico (Tabla MM-3) frente a la proteína de interés en leche descremada al 1-5% a 4°C durante 16 h. Posteriormente se lavó la membrana 3 veces (15 min cada lavado) con TBS-T, y se incubó durante 1 h con el anticuerpo secundario correspondiente (1:2000) conjugado con la peroxidasa (HRP). Tras otros 3 lavados se reveló la membrana.

3.11.4.4. Revelado

La membrana se incubó brevemente con los reactivos de detección ECL ("Enhanced Chemiluminiscence") y se llevó a cabo el revelado en el equipo de análisis LAS-4.000 durante el tiempo necesario en cada caso para obtener una señal detectable con el menor ruido posible.

3.12. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA

3.12.1. Soluciones empleadas

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

Tabla MM-3. Anticuerpos primarios empleados para detectar proteínas humanas.

Antígeno	Referencia	Especie de origen	Dilución	Casa Comercial
ARID1A	12354	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:1000 (BSA 5 %)	Cell Signaling
BCRP	ab3380	<i>Mus musculus</i>	1:500 (leche 1 %)	Abcam
GAPDH	sc-32233	<i>Mus musculus</i>	1:1000 (leche 5 %)	Santa Cruz Biotechnology
MDR1	c219	<i>Mus musculus</i>	1:1000 (leche 5 %)	Thermo
MRP1	ALX-801-007	<i>Rattus norvegicus</i>	1:1000 (leche 2 %)	Enzo Life Sciences
MRP2	ALX-801-016	<i>Mus musculus</i>	1:300 (leche 2 %)	Enzo Life Sciences
MRP3	M0318	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:500 (leche 5 %)	Sigma-Aldrich
MRP3	M0318	<i>Mus musculus</i>	1:50 (leche 5 %)	Sigma-Aldrich
MRP4	ab15602	<i>Mus musculus</i>	1:500 (leche 2 %)	Abcam
MRP5	AM31988SU-N	<i>Rattus norvegicus</i>	1:50 (leche 1 %)	Acris Antibodies
Na⁺/K⁺-ATPasa	ab2871	<i>Mus musculus</i>	1:100 (leche 5 %)	Abcam
Na⁺/K⁺-ATPasa	ab76020	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:100 (leche 5 %)	Abcam
Na⁺/K⁺-ATPasa	sc-28800	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:100 (leche 5 %)	Santa Cruz Biotechnology
p53	sc126	<i>Mus musculus</i>	1:500 (leche 5 %)	Santa Cruz Biotechnology

3.12.2. Preparación de las muestras

De los fragmentos de tejido almacenados a -80°C se obtuvieron cortes de 5 µm en un criostato a una temperatura entre -20°C y -15°C. Estos se colocaron en portas, y se guardaron a -20°C hasta su utilización.

Para el marcaje con inmunofluorescencia las células se sembraron en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos circulares a la densidad óptima según la línea celular con 500 µl de medio de cultivo por pocillo.

3.12.3. Inmunodetección

La fijación/permeabilización se llevó a cabo incubando durante 1 min con metanol puro almacenado a -20 °C. Tras tres lavados rápidos con PBS, las uniones inespecíficas se bloquearon incubando durante 30 min con suero bovino fetal al 5% en PBS. A continuación se incubaron las muestras durante 1 h con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla MM-4) diluidos en FBS a distinta concentración según el anticuerpo. Seguidamente se realizaron tres lavados de 10 min con PBS, y se llevó a cabo la incubación en oscuridad con el anticuerpo secundario adecuado: anti-IgG de ratón o rata conjugado con Alexa Fluor-488® o Alexa Fluor-594® (dilución 1:1.000) y con DAPI para teñir los núcleos (1:5.000). Después se volvieron a realizar los lavados con PBS, se añadió medio de montaje, se colocó el cubreobjetos sobre el portaobjetos y se selló con esmalte de uñas. Para visualizar el marcaje se utilizó un microscopio confocal.

Tabla MM-4. Anticuerpos primarios empleados para detectar proteínas humanas por inmunofluorescencia.

Antígeno	Referencia	Especie de origen	Dilución	Casa Comercial
MRP1	ALX-801-007	<i>Rattus norvegicus</i>	1:40 (FBS 1 %)	Enzo Life Sciences
MRP3	ab3375	<i>Mus musculus</i>	1:40 (FBS 1 %)	Abcam
MRP4	NB100-1471	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:100 (FBS 1 %)	Novus Biologicals
MRP5	AM31988SU-N	<i>Rattus norvegicus</i>	1:25 (PBS)	Acris Antibodies
Na⁺/K⁺-ATPasa	ab2871	<i>Mus musculus</i>	1:500 (FBS 1 %)	Abcam
Na⁺/K⁺-ATPasa	ab76020	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:100 (FBS 1 %)	Abcam
Na⁺/K⁺-ATPasa	sc-28800	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:100 (FBS 1 %)	Santa Cruz Biotechnology

3.13. ESTUDIOS DE TRANSPORTE IN VITRO

El uso de fluorocromos en citometría de flujo nos permite evaluar la funcionalidad de proteínas transportadoras como las proteínas ABC. En esta Tesis Doctoral utilizamos sustratos fluorescentes específicos, Fluo-3 para el estudio de la capacidad transportadora

de MRP1 y MRP3, y CF como sustrato de MRP4 y MRP5. Estos sustratos se acumulan en el interior celular en función de la actividad de las proteínas con capacidad de transportarlos.

3.13.1. Soluciones utilizadas

- Medio de captación pH 7,4: CaCl₂ 1,8 mM, D-glucosa 11 mM, Hepes 50 mM, KCl 5,3 mM, KH₂PO₄ 1 mM, MgSO₄ 0,8 mM y NaCl 96 mM.
- Tampón fosfato salino: KCl 5,3 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, NaCl 137 mM y Na₂HPO₄ 0,5 mM.

3.13.2. Experimentos de funcionalidad de las bombas MRPs y selección de clones

Se realizaron experimentos de captación de sustratos conocidos decada una de las bombas estudiadas. Las células se tripsinizaron, se lavaron con PBS, y tras una centrifugación de 5 minutos se resuspendieron en medio de captación (Al-Abdulla et al. 2020). Para evaluar el tiempo necesario para la carga de cada sustrato, las células se incubaron a 37°C con cada compuesto fluorescente (1 µM CF o 2 µM Fluo-3) durante diferentes tiempos (5, 10, 15, 20, 30 y 45 minutos) antes de añadir medio de captación a 4°C para parar el proceso de transporte. En el caso de la selección de clones, se realizó la medida solo a un tiempo óptimo para cada caso. A continuación, la fluorescencia intracelular fue medida en el citómetro de flujo utilizando como luz de excitación la proporcionada por el láser de 488 nm. Como filtro de emisión se utilizó FL1.

En el caso de los estudios de eflujo, así como en los estudios de inhibición, la captación del sustrato se hizo tanto en presencia como en ausencia de los inhibidores durante el tiempo escogido.

3.14. ESTUDIOS *IN SILICO*

3.14.1. Expresión de genes en muestras de pacientes

En esta Tesis Doctoral se realizó un estudio *in silico* de la expresión de los genes ABCC1 y ABCC4 en muestras de pacientes disponibles públicamente en la bases de datos TCGA y “Human Protein Atlas” (www.proteinatlas.org).

En la base de datos TCGA se recoge un total de 406 casos de adenocarcinoma gástrico. De estos, seleccionamos para su análisis los datos pareados, es decir aquellos casos que presentan información de la expresión en el tejido tumoral (T) y en el tejido adyacente no tumoral (NT), y que eran un total de 26 pacientes.

La base de datos “Human Protein Atlas” relaciona la expresión de los diferentes genes con el tiempo de supervivencia de los pacientes tras el diagnóstico, mediante un análisis Kaplan-Meier. En el caso del cáncer de estómago esta herramienta presenta información para 354 pacientes.

3.14.2. Diseño de cebadores

Los cebadores o “primers” específicos para el ADN codificante de cada una de las proteínas a estudiar en esta Tesis Doctoral, se diseñaron utilizando como referencia la secuencia del ARNm específica para cada gen publicada en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) mediante el programa OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/Oligoanalyzer>) (Integrated DNA Technologies, Coralville, EE.UU.). La especificidad de cada uno de ellos se chequeó con el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Los *primers* utilizados se diseñaron, en la medida de lo posible, a caballo entre dos exones codificantes, para así minimizar los problemas derivados de la contaminación de las muestras de ARN con ADN genómico y transcritos primarios (pre-ARNm).

Las casas comerciales suministraron los *primers* liofilizados. Antes de su uso se solubilizaron en agua ultrapura, y se valoraron por espectrofotometría a $\lambda = 260$ nm en un Nanodrop.

En la Tabla MM-5 se recogen las secuencias de nucleótidos de los cebadores utilizados para la cuantificación relativa de la abundancia de ARNm de las diferentes proteínas estudiadas en esta Tesis Doctoral.

Tabla MM-5. “Primers” forward y reverse utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes humanos por RT-PCR cuantitativa.

Gen	Proteína	Cebador (5'→3')	Tipo	Amplicón (pb)	Número de acceso
<i>ABCB1</i>	MDR1	GCGCGAGGTGGAAATGGAT CCATGGATGATGGCAGCAAAGTT	F R	198	NM_000927
<i>ABCC1</i>	MRP1	CCGCTCTGGACTGGAATGT GTGTCATCTGAATGTAGCCTCGGT	F R	166	NM_004996
<i>ABCC2</i>	MRP2	TGAAGAGGAAGCCACAGTCCATGA TTCAGATGCCTGCCATTGGACCTA	F R	171	NM_000392
<i>ABCC3</i>	MRP3	CCAAGTTCTGGACTCCAACCTG ATGATGTAGCCACGACAATGGTGC	F R	160	NM_003786
<i>ABCC4</i>	MRP4	TGCAAGGGTTCTGGGATAAAGA CTTTGGCACTTCTCAATTAAACG	F R	141	NM_005845
<i>ABCC5</i>	MRP5	CGTGAACTGCAGAACAGTAGAGAGAC GGCACACGATGGACAGGATGA	F R	128	NM_005688
<i>ABCC6</i>	MRP6	GTGGGTTCTGGCCTGGTCT ATGCTATTGCCTTGTGCTCC	F R	164	NM_001171
<i>ABCG2</i>	BCRP	CCCAGGCCTCTATAGCTCAGATCATT CACGGCTGAAACACTGCTGAAACA	F R	161	NM_004827
<i>ARID1A</i>	ARID1A	CCCTCCAGCTTGCCTGATCTATCT GCTGGAAATCCCTGATGTGCTCA	F R	99	NM_006015
<i>ATP7A</i>	Menkes Disease- Associated	CAAACATCAAAGGCTCCTATCCAGCA ACAATCCATACCAAGAGGGTGGCA	F R	104	NM_000052
<i>ATP7B</i>	Wilson Disease- Associated	TTGAGCTGACAATCACAGGGATGAC ACTTAACAAGGGCTTGCTGGTGG	F R	126	NM_000053
<i>CD44</i>	CD44	GCCTGGCGCAGATCGATTGAATA CCTCCGTCGAGAGATGCTGTA	F R	93	NM_000610
<i>CDC6</i>	CDC6	CAAGCAAGAAGGCATTGCTACCA TCCCCACAGATGTGTTCCCTCAAGAAA	F R	128	NM_001254.4
<i>CDH2</i>	N-cadherina	GAGTCAGTGAAGGAGTCAGCAGAAGT GGAGGGATGACCCAGTCTCTTT	F R	107	NM_001792.5

Objetivos

Introducción

Materiales y
MétodosResultados y
Discusión

Conclusiones

Bibliografía

English Summary

<i>CDKN1A</i>	p21	GAGGAGGCCATGTCAGAA ATTAGCGCATCACAGTCGGG	F R	124	NM_000389
<i>FAS</i>	FAS	GCCCTGTCCCTCAGGTGAAA GGCTTGTCTGTACTCCTTCCC	F R	103	NM_000043
<i>GAPDH</i>	GAPDH	TGAGCCCGCAGCCTCC TACGACCAAATCCGTTGACTCC	F R	138	NM_002046
<i>HPRT1</i>	HPRT1	GCCCTGGCGTCGTGATTAGT AGCAAGACGTTCAGCCTGTCCATAA	F R	140	NM_000194
<i>PTEN</i>	PTEN	GGCGGAACTTGCAATCCTCAGTT AGGTAACGGCTGAGGGAACTCAA	F R	123	NM_000314
<i>POLR2A</i>	POLR2A	CGGCTATAAGGTGGAACGGCA AGCGAAAGGTAGACCATGGGAGAAT	F R	125	NM_000937.5
<i>SLC22A1</i>	OCT1	TGCAGACAGGTTGCCGT GCCCGAGCCAACAAATTCTGTGAT	F R	187	NM_003057
<i>SLC22A2</i>	OCT2	CCCTTCAGCGCCTGAGACTT TCACCTGCAAGGCCATGT	F R	177	NM_003058
<i>SLC22A3</i>	OCT3	CATCGTCAGCGAGTTGACCTGT GTAAATGACGATCCTGCCATACCTGTC	F R	139	NM_21977
<i>SLC31A1</i>	CTR1	GGAAATTCTGCCAACAAACCCAGA TCCGCCTCCTAGGTTCAAGTGATT	F R	277	NM_001859
<i>SLCO1B1</i>	OATP1B1	TGCAATGGATTGAAGATGTTCTGGCA GCAAATTCCAATTCAAAGCTCCGTC	F R	166	NM_006446
<i>SLCO1B3</i>	OATP1B3	AGATTGTGAAAGGAATCTGGTCACA AGTGCAAAGCCAATGACTGGAC	F R	198	NM_019844
<i>TP53</i>	p53	CGCTGCTCAGATAGCGATGGT TGGTACAGTCAGAGCCAACCTCA	F R	151	NM_000546.5
<i>UGT1A</i>	UGT1A	CTTGGGCAAAATCCCTCAGACAG GTCATGGGTGACCAAGCAGA	F R	124	NM_000463.3
<i>VIM</i>	Vimentina	CGGCAGGTGGACCAGCTAA TCTGAAGCATCTCCTCTGCAATTCT	F R	112	NM_003380.5

3.14.3. Diseño de oligonucleótidos para el sistema CRISPR/Cas9

Para la aplicación del sistema CRISPR/Cas9 es necesaria la generación de guías capaces de interaccionar con la endonucleasa Cas9 y que la dirijan a la secuencia específica del genoma donde ha de realizar el corte.

Las diferentes guías se formaron mediante la hibridación de dos oligonucleótidos diseñados específicamente para cada gen a silenciar, y que tuvieran extremos compatibles con el plásmido pGEM-sgc linealizado. Se diseñaron utilizando como referencia la secuencia del ARNm específica para cada gen, publicada en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) mediante el programa OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyizer/Applications/Oligoanalyzer>) (Integrated DNA Technologies, Coralville, EE.UU.), esta herramienta determina las regiones con PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) y muestra todas las posibles guías.

Tabla MM-6. Parejas de oligonucleótidos utilizados en la formación de guías para el sistema CRISPR/Cas9.

Gen	Proteína	Exón	Oligonucleótidos (5' – 3')	Tipo
<i>ABCC1</i>	MRP1	9	CACCGGATCAAGACCGCTGTCATT	F
			AAACAATGACAGCGGTCTTGATCC	R
<i>ABCC3</i>	MRP3	2	CACCGGATGATGTAGGCCACGACAA	F
			AAACTTGTCTGGCTACATCATCC	R
<i>ABCC4</i>	MRP4	15	CACCGAAGGTACGATTCTTAGTGT	F
			AAACACACTAAGGAATCGTACCTTC	R
<i>AXIN1</i>	AXIN1	2	CACCGCCCTGCTGGATGACCAAGAT	F
			AAACATCTTGGTCATCCAGCAGGGC	R
<i>ARID1A</i>	ARID1A	5	CACCGTCAATAGATGACCTCCCCAT	F
			AAACATGGGGAGGTCATCTATTGAC	R
<i>PTEN</i>	PTEN	6	CACCGCTACCTGTTAAAGAACATC	F
			AAACGATGATTCTTAACAGGTAGC	R
<i>TP53</i>	p53	6	CACCGTCCACTCGGATAAGATGCTG	F
			AAACCAGCATCTTATCCGAGTGGAC	R

En todos los casos se valoró la posible aparición de “off-targets”, es decir, la modificación indeseada de otras secuencias del genoma, y se seleccionaron las guías con mayor eficacia y especificidad teniendo en cuenta el riesgo de “off-targets” para evitar su aparición. Por otro lado, se intentó que el exón a silenciar fuera común a todas las variantes del gen, y que, preferentemente, estuviera delante para así romper la fase y evitar que se formara la proteína. En la Tabla MM-6 se recogen las secuencias de nucleótidos de los cebadores utilizados para la formación de las guías diseñadas.

Para el chequeo de la eficacia del método mediante el ensayo de detección de escisiones en el genoma (apartado 3.8.7) y para la validación por secuenciación de las poblaciones monoclonales generadas, se diseñaron, utilizando las mismas herramientas bioinformáticas indicadas anteriormente, cebadores específicos que flanqueaban la mutación producida por el sistema. En la Tabla MM-7 se recogen las secuencias de nucleótidos de los cebadores utilizados para ello.

Tabla MM-7. “Primers” forward y reverse diseñados para la validación de la eficacia del sistema CRISPR/Cas9 por el ensayo de detección de escisiones en el genoma y secuenciación de los *loci* de interés mutados en las poblaciones onoclonales generadas.

Gen	Proteína	Oligonucleótidos (5' – 3')	Tipo	Amplícón (pb)
<i>ABCC1</i>	MRP1	CTCAGGAGAAAGTTGCAGTGCAA	F	395 (153/242)
		GCTACCCCTCATCCTACTGCTCCA	R	
<i>ABCC3</i>	MRP3	GACTCCAACCTGTCTGTGCACAC	F	897 (796/131)
		GACGCACCACAGCAGGACA	R	
<i>ABCC4</i>	MRP4	GACCTAACACAGAGTCTGGCTGAGAA T	F	542 (318/224)
		ATGGAATAGAGCCCTGAAACCACAGAA	R	
<i>AXIN1</i>	AXIN1	GACCCACCTTCTAATCCTTGTCC	F	1049 (637/412)
		GCTCTCGGAGGTGAGTACAGAAAGT	R	
<i>ARID1A</i>	ARID1A	GAGACGTGCCATTGCACTCCA	F	567 (320/247)
		CAGGCATGAGCCAGAGATGCTTT	R	
<i>PTEN</i>	PTEN	GGCTACGACCCAGTTACCATAGCA	F	271 (158/118)
		TCCAATACATGGAAGGATGAGAATTCAAGCA	R	
<i>TP53</i>	p53	CACCATGAGCGCTGCTCAGA	F	353 (227/126)
		CTTTGCACATCTCATGGGTTATAGGGA	R	

Como en el caso de los cebadores usados para PCR cuantitativa, las casas comerciales suministraron los *primers* liofilizados y antes de su uso se solubilizaron en agua ultrapura, y se valoraron por espectrofotometría a $\lambda = 260$ nm en un Nanodrop.

3.15. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

3.15.1. Determinación de la viabilidad celular por el test del azul de Tripán

Este método se basa en que solo las células vivas son capaces de excluir el colorante azul de Tripán. Para la realización de este test se mezclaron en proporciones iguales una suspensión celular y azul de Tripán al 0,4%. Las células se contaron al microscopio en una cámara Thoma, siendo viables sólo aquellas que no eran azules.

3.15.2. Determinación de la viabilidad celular por el test de MTT

Soluciones utilizadas:

- Medio de cultivo: el usado respectivamente para cada línea celular.
- Solución de MTT: 5 mg/ml de MTT en PBS.
- Solución de lisis: 10% SDS, 10 mM HCl en agua filtrada.

Se cuantificó el número de células vivas en los ensayos de proliferación o quimiosensibilización celular utilizando un método colorimétrico, el test de formazán. Este método se basa en la transformación del MTT por las deshidrogenasas mitocondriales metabólicamente activa, a una sal de tetrazolio de color amarillento, en formazán, que es insoluble y de color violeta. Los cristales violetas de formazán se solubilizan con una solución detergente ácida. La cantidad de formazán producido se cuantifica utilizando un espectrofotómetro y es directamente proporcional al número de células vivas.

Para llevar a cabo esta técnica, en primer lugar se añadieron a cada pocillo de la placa 110 μl de 0,5 mg/ml MTT en medio de cultivo. La placa se incubó durante 4 h a 37 °C y posteriormente se añadió 100 μl /pocillo de solución de lisis.

Tras 16 h de incubación a 37°C en oscuridad, se determinó la intensidad del color del sobrenadante en un lector de ELISA a una longitud de onda de 595 nm. Como blanco se

utilizaron pocillos en los que no se habían sembrado células pero si se habían incubado con los distintos compuestos ensayados y a los que también se habían sometido a la técnica de MTT.

3.15.3. Determinación de la viabilidad celular por el test de la sulforrodamina

Soluciones utilizadas:

- Ácido acético 1% /p/v) en agua.
- Ácido tricloroacético (TCA) 5% /p/v) en agua.
- PBS.
- Sulforrodamina B 0,057 % (p/v) en ácido acético 1 %.
- Tris 10 mM pH 10.5.

Se cuantificó el número de células vivas en los ensayos de viabilidad o proliferación utilizando un método colorimétrico, el test de la sulforrodamina. Este método se basa en el aumento de la afinidad de la SRB a los aminoácidos básicos de las proteínas en condiciones ácidas. Se fija a estos proporcionando de esta manera un índice del contenido de proteína celular que se cuantifica utilizando un espectrofotómetro y es directamente proporcional al número de células vivas.

- Para llevar a cabo esta técnica, en primer lugar se lavan las células con PBS y se fijan durante 1 h a 4° utilizando TCA frío al 10 %. Posteriormente las células se lavan cuatro veces con agua destilada y se secan durante 90 min a 50 °C.
- Para la tinción las células se incuban 30 min a temperatura ambiente con sulforrodamina B 0,057 %. Para eliminar el exceso de tinción, transcurrido ese tiempo los pocillos se lavan cuatro veces con ácido acético 1 % y se dejan secar durante 90 min a 50°C.
- Para disolver la tinción, se añadieron a cada pocillo 200 µl de solución base Tris 10 mM y se incubó la placa 16 h a temperatura ambiente.
- Tras la incubación se determinó la intensidad del color del sobrenadante en un lector de ELISA a una longitud de onda de 540 nm. Como blanco se utilizaron pocillos en los que no se habían sembrado células pero si se habían incubado con

los distintos compuestos ensayados y a los que también se habían sometido a la misma técnica.

3.15.4. Valoración de proteínas totales

Se utilizó una modificación del método de Lowry (Markwell et al. 1978) para medir la concentración de proteínas totales. Este método se basa en la reducción de proteínas con cobre en medio alcalino y la posterior reducción del ácido fosfomolíbdico fosfatúngstico con las proteínas tratadas. El producto resultante se determina espectrofotométricamente. Como patrón se utilizó albumina bovina sérica.

3.15.5. Parámetros bioquímicos en suero

En los modelos *in vivo* se determinaron los parámetros bioquímicos de daño hepático y renal en suero mediante métodos de química seca con el analizador automático “Spotchem EZ SP-4430”. Como marcadores de daño hepático se midieron: proteínas totales, albúmina, bilirrubina, AST (aspartato aminotransferasa) y ALT (alanina aminotransferasa). Para la determinación del daño renal se midió el ácido úrico y BUN (nitrógeno ureico).

3.15.6. Medida de sorafenib por HPLC-MS/MS

De cada tumor homogeneizamos aproximadamente 35 mg, a los que añadimos 10 µl de solución salina por cada mg de tejido tumoral. De este volumen se tomaban 50 µl que se añadían a 200 µl de metanol absoluto. El mix se centrifugó a 4°C durante 5 min a máxima velocidad. Se recogían 100 µl del sobrenadante que se preparaban para el análisis en el HPLC-MS-MS.

Una vez procesadas las muestras tumorales, se siguió una modificación del método descrito por Sparidans (Sparidans et al. 2009) para la medida de sorafenib por HPLC-MS/MS.

Para la separación cromatográfica se utilizó una columna Zorbax C18 (30 mm x 2,1 mm; 3,5 µm) termostatizada a 35°C, y empleando como fase móvil una mezcla de metanol agua (70:30), conteniendo ambos constituyentes 5 mM de acetato amónico y 0,1 % de

ácido fórmico a pH 4,6. El flujo de trabajo era de 0,3 ml/min, y en todos los casos el volumen de inyección 1 µl. Para la fuente iónica las condiciones de trabajo fueron: temperatura de gas (N_2) 350°C, flujo del gas 10 ml/min, presión del nebulizador 20 psi, y voltaje de 2.500V.

En primer lugar, se elaboró una recta patrón de sorafenib con soluciones preparadas en metanol con concentraciones de 0,3 a 40 µM. La presencia de sorafenib en los tumores se confirmó utilizando el método de trabajo MRM siguiendo la transición específica del ion precursor (ion molecular - H⁺) 465,1 m/z a los iones producto 270 y 252 m/z.

3.16. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

La expresión de los resultados se ha calculado como la media y la desviación estándar (DE) o el error estándar de la media (EEM).

La significación estadística de las diferencias al comparar dos medias se ha calculado usando el test de la *t* de Student de valores pareados y no pareados según el caso. Para las comparaciones entre varios grupos se utilizó el test de comparaciones múltiples de Bonferroni tras un previo análisis de la varianza (ANOVA).

4. Resultados y Discusión I:

**Quimiosensibilización Farmacológica
del Adenocarcinoma Gástrico**

English Summary	Bibliografía	Conclusiones	Resultados y Discusión	Materiales y Métodos	Introducción	Objetivos
-----------------	--------------	--------------	------------------------	----------------------	--------------	-----------

4.1. ANTECEDENTES

Como ya se ha comentado anteriormente, el tipo más común de cáncer de estómago es el ACG que, además de por su alta incidencia, destaca por su elevada mortalidad (Cheng et al. 2017) y por una pobre respuesta a la quimioterapia antineoplásica disponible en la actualidad.

En algunos pacientes, la quimioterapia adyuvante o neoadyuvante puede mejorar el pronóstico e incrementar la esperanza de vida. Sin embargo, en la mayoría de los casos, estos tratamientos que, como ya se ha mencionado detalladamente en Introducción, incluyen como terapia de primera línea combinaciones de fármacos, fundamentalmente las denominadas ECF, ECX, así como taxanos, irinotecán y paclitaxel como tratamientos de segunda línea, que en ningún caso aumentan significativamente la esperanza de vida de los pacientes (Takahari 2017). Actualmente, se está estudiando el uso de TKIs como el sorafenib o el lapatinib para el tratamiento del ACG, pero hasta ahora su uso clínico no se ha generalizado (Tirino et al. 2018).

El **primer objetivo** de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar la huella genética de quimiorresistencia (HGQT) del ACG, con el fin de identificar los mecanismos determinantes en la falta de respuesta de los tumores gástricos a la quimioterapia y poder así desarrollar estrategias encaminadas a superar esta grave limitación del tratamiento farmacológico. Entre los mecanismos más importantes responsables de la baja eficacia de los fármacos antitumorales se encuentran aquellos que determinan una reducción de su contenido intracelular y que se han clasificado como mecanismos de resistencia farmacológica de tipo 1 (MPR-1) (Marin et al. 2020). Estos pueden deberse a cambios en la expresión o en la función de proteínas transportadoras de membrana, que provocan una disminución de la captación de los fármacos antitumorales (MPR-1a) o una mayor exportación por las células tumorales (MPR-1b). Este último proceso es el resultado de la sobreexpresión de proteínas ABC, que juegan un papel clave en el desarrollo del fenotipo MDR en las células de cáncer. Aunque su relevancia e interés pronóstico y terapéutico aún no se conoce con exactitud en ACG, su inhibición podría ser una estrategia útil para mejorar la eficacia de la quimioterapia, puesto que este bloqueo

provocaría un aumento en la concentración intracelular del fármaco. Esto a su vez, podría aumentar la eficacia de los fármacos a dosis más bajas, disminuyendo de este modo los efectos secundarios de la quimioterapia. Los inhibidores de estas bombas o quimiosensibilizadores ideales para ser utilizados en clínica deben cumplir tres características: ser altamente efectivos, específicos y poco tóxicos para el paciente. Algunos compuestos sintéticos, productos naturales y derivados semisintéticos de estos, así como nuevas estrategias basadas en la nanotecnología y en el uso de ácidos nucleicos, proteínas y péptidos han demostrado ser eficaces *in vitro* reduciendo la actividad de diferentes bombas ABC y sensibilizando a distintos fármacos antitumorales a células derivadas de tumores gastrointestinales (Marin et al. 2018). Basándonos en esto, nos planteamos como **segundo objetivo** de esta Tesis Doctoral, llevar a cabo la evaluación preclínica de una estrategia de quimiosensibilización del ACG basándonos en la inhibición de bombas exportadoras de fármacos ABCC.

Tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, se han llevado a cabo estudios de sensibilización de ACG por inhibición de las bombas de expulsión de fármacos o mediante disminución de la expresión de estas. En el caso de MRP1 se ha estudiado la posibilidad de reutilizar fármacos, sustratos o inhibidores de esta bomba, indicados en el tratamiento de otras patologías para sensibilizar a las células tumorales a la quimioterapia. Este es el caso de la mifepristona, un fármaco antiprogestágeno usado como anticonceptivo y abortivo, y que ha demostrado en líneas celulares de ACG potenciar la sensibilidad de las células a vincristina mediante inhibición de MDR1 y MRP1 (Li et al. 2004). El Rofecoxib, fármaco de la familia de los AINES usado antiguamente en el tratamiento de la osteoartritis y la dismenorrea, también ha demostrado su poder quimiosensibilizante en líneas celulares de cáncer gástrico a diferentes fármacos utilizados en el tratamiento del ACG (Zhu et al. 2010). El pantoprazol, un fármaco usado comúnmente en el tratamiento del reflujo gastroesofágico, ha mostrado tanto *in vitro* como *in vivo* su capacidad de sensibilizar las células tumorales a doxorubicina mediante la disminución de la expresión de MRP1 y MDR1 (Chen et al. 2012). Por otro lado, el uso de shARN para el silenciamiento de la expresión de diferentes proteínas como son ZNF139 (Li et al. 2014) y la integrina ligada a quinasa (ILK) (Song et al. 2012) han demostrado su eficacia sensibilizando las células a cisplatino, oxaliplatino y 5-FU. Por el contrario, estrategias para la sobreexpresión del

factor de transcripción AP-2 α en líneas celulares de cáncer gástrico revierten el fenotipo MDR aumentando la sensibilidad de las células a vincristina mediante la inhibición de la ruta de señalización Notch (Lian et al. 2017). Otros fármacos cuya eficacia como quimiosensibilizadores a través del bloqueo del eflujo mediado por MRP1 ha sido probada en modelos *in vitro* son el inmunosupresor everolimus (Ying et al. 2014), el fitoestrógeno genisteína (W. Huang et al. 2014) o el terpenoide oridonina (He et al. 2017). Por otro lado, se ha conseguido silenciar la bomba MRP4 en líneas celulares de cáncer gástrico mediante el uso de siARN aumentando de este modo la sensibilidad a su sustrato 5-FU (Zhang et al. 2015). Por último, se ha logrado aumentar la efectividad del tratamiento con mitoxantrona mediante la inhibición de la bomba BCRP utilizando metabolitos fúngicos como la triprostatina A (Woehlecke et al. 2003) o el uso de siARN (Priebsch et al. 2006).

Pese al gran número de estudios llevados a cabo tanto *in vitro* como *in vivo*, a día de hoy no hay ensayos clínicos concluyentes que demuestren el efecto de las estrategias quimiosensibilizantes en ACG.

El conocimiento de las bases moleculares responsables de los mecanismos de resistencia farmacológica es crucial para dilucidar la firma genética que caracteriza al resistoma del ACG. Su definición permitirá seleccionar biomarcadores para predecir la respuesta al tratamiento farmacológico e identificar los puntos débiles del tumor de forma personalizada y dinámica, así como proponer nuevas dianas sobre las que actuar en el tumor para superar la quimiorresistencia.

4.2. RESULTADOS

4.2.1. Identificación de la huella genética de quimiorresistencia del ACG

Para obtener una primera aproximación que diese una visión general de la HGQT del ACG utilizamos una mezcla de cDNAs de 23 muestras pareadas de tejido tumoral (T) y tejido adyacente no tumoral (NT) de una colección de biopsias obtenidas de pacientes con este tipo de tumor procedentes del biobanco del Instituto Biosanitario Biodonostia de San Sebastián, cuya información clínica se resume en la Tabla MM-1 del apartado Materiales y Métodos. Analizamos la expresión de un panel de 87 genes de quimiorresistencia utilizando tarjetas microfluídicas o TLDAs (Figura 1), que han sido diseñadas por nuestro grupo para estudiar el fenotipo MDR de otros tumores gastrointestinales (Martinez-Becerra et al. 2012b; Martinez-Becerra et al. 2012a).

Los resultados revelaron una expresión baja ($\Delta Ct > 8$) (respecto a la doble normalización con GAPDH y β -actina) en el tejido tumoral de la mayoría de los genes de la familia SLC que codifican para proteínas implicadas en la captación de fármacos (MPR-1a). Solo los genes *SLC22A3*, *SLCO2B1*, *SLCO4A1*, *SLC31A1* que codifican las proteínas OCT3, OATP2B1, OATP4A1 y CTR1 respectivamente, así como los transportadores de nucleótidos *SLC28A2* (CNT2), *SLC28A3* (CNT3) y *SLC29A1* (ENT1) presentaron una expresión entre moderada (ΔCt entre 5 y 8) y alta ($\Delta Ct < 5$) en ACG.

En cuanto a los genes que codifican bombas exportadoras de fármacos (MPR-1b), encontramos una expresión moderada (ΔCt entre 5 y 8) o alta ($\Delta Ct < 5$) en el tejido tumoral para la mayoría de ellas, destacando sobre el resto la de MRP3, MRP4, MRP5 y las proteínas de Menkes y Wilson (genes *ABCC3*, *ABCC4*, *ABCC5*, *ATP7A* y *ATP7B*, respectivamente), siendo la de MDR1 (*ABCB1*), MRP1 (*ABCC1*) y BCRP (*ABCG2*) algo inferior (Figura 1). La expresión de MRP2 (*ABCC2*) y MRP6 (*ABCC6*) fue baja ($\Delta Ct > 8$). Por otro lado, para la proteína MRP7 (gen *ABCC10*), una de las últimas proteínas descritas de esta familia, y de la que apenas hay información sobre su actividad transportadora (Hopper et al. 2001), detectamos una expresión moderada. Alguna de las proteínas de la familia ABCA, presentaban una expresión moderada (ΔCt entre 5 y 8) (Figura 1), y

también observamos que los niveles de ARNm de *MVP*, *ATP7A*, y *ATP7B* eran los más elevados ($\Delta Ct < 5$).

El análisis de la expresión de los genes implicados en el metabolismo de los fármacos (MPR-2), mostró una expresión muy baja de las enzimas del citocromo P450 (CYP) como la 1A1, 1A2 y 3A4 (Figura 1). En cambio, encontramos niveles de expresión elevados ($\Delta Ct < 5$) de dihidropirimidina deshidrogenasa (*DPYD*), *GST α* (*GSTA1*) y *GST π* (*GSTP1*). Finalmente, la timidina fosforilasa (*TYMP*), enzima implicada en la activación metabólica del 5-FU (Parker and Cheng 1990), presentó una expresión moderada.

Entre los genes que codifican dianas moleculares de fármacos (MPR-3), encontramos altos niveles de expresión de los genes que codifican para las DNA topoisomerasas 1 y 2A (Figura 1), así como para la enzima timidilato sintasa (*TYMS*).

La mayoría de los genes implicados en los procesos de reparación del ADN (MPR-4) presentaban una expresión entre moderada (ΔCt entre 5 y 8) y alta ($\Delta Ct < 5$), destacando *MSH2*, y *ERCC1*. Resultados similares se encontraron para aquellos genes que controlan el balance entre apoptosis (MPR-5a) y supervivencia (MPR-5b). Así, la expresión de los factores pro-apoptóticos (MPR-5a) fue en la mayoría de los casos elevada ($\Delta Ct < 5$), al igual que la expresión de genes antiapoptóticos (MPR-5b), como *BIRC2*, *BIRC3* y *BIRC5* o *c-MYC*. Además, genes clave de las vías PI3K/AKT y NF- κ B, como *AKT* y *NFKB1*, se encontraron muy expresados en el tejido no tumoral, y los niveles de ARNm se mantenían elevados en las muestras de ACG que fueron analizadas.

Dada la importancia de los mecanismos de quimiorresistencia de tipo 1 en la refractariedad de los tumores gastrointestinales a los fármacos antineoplásicos, decidimos centrar el estudio en el papel del transportoma en la quimiorresistencia del ACG. Por ello, tras seleccionar, en base a los resultados de la TLDA y su relación con los fármacos utilizados en clínica, los principales genes que pudieran estar implicados en el MPR-1 en ACG, determinamos por RT-qPCR convencional su expresión en cada una de las muestras de los pacientes de la cohorte de San Sebastián, y se analizó su relación con el estadio del tumor, la localización en el estómago y el grado de diferenciación.

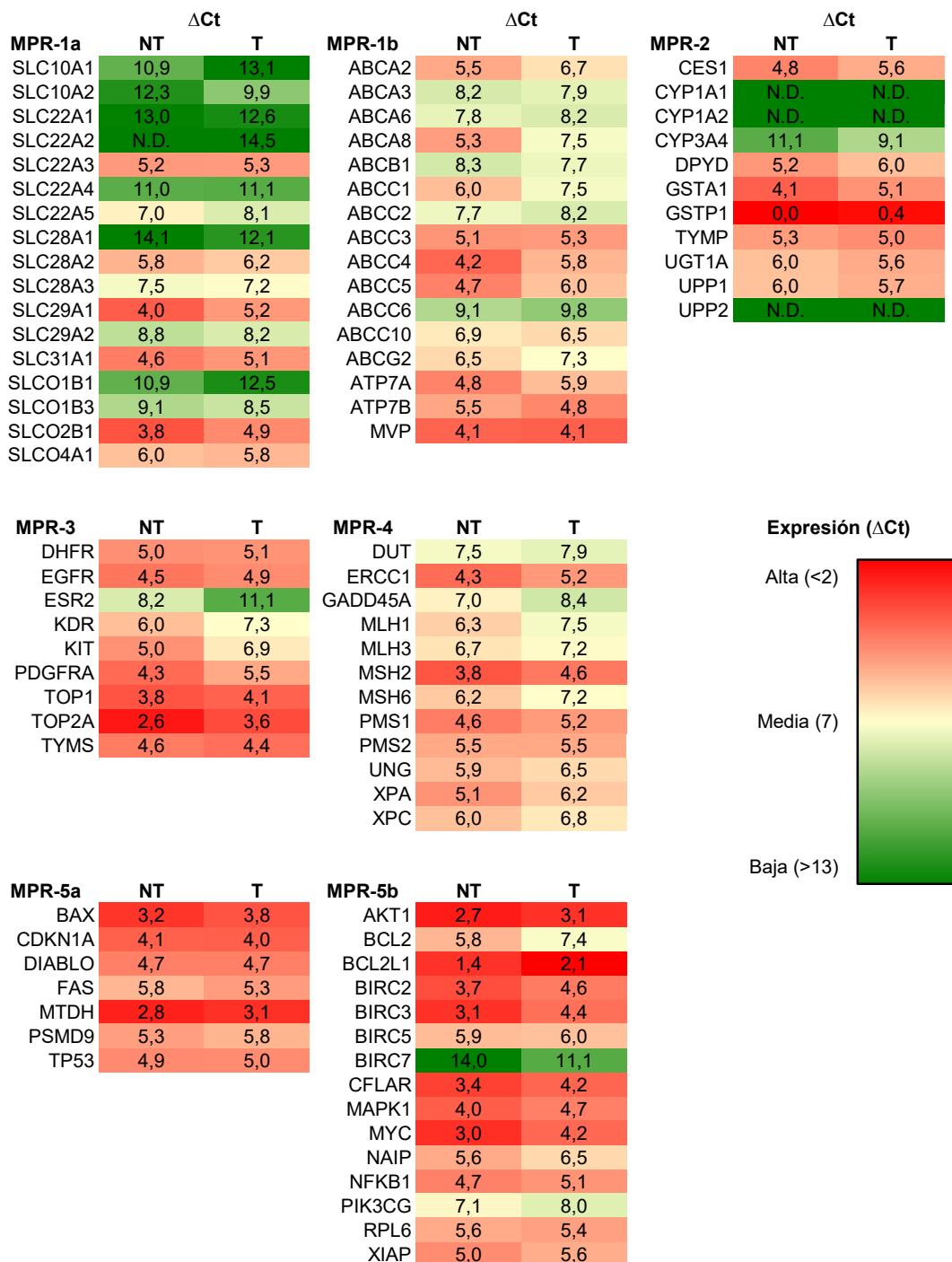


Figura 1. Heatmap de la expresión de genes involucrados en mecanismos de resistencia farmacológica (MPR) en mezclas de ADNc procedentes de muestras pareadas (n=23) de tejido tumoral (T) y tejido adyacente no tumoral (NT) de pacientes con adenocarcinoma gástrico (ACG). Los niveles de ARNm se determinaron por RT-qPCR mediante tarjetas microfluídicas o TLDAs y se expresan como ΔCt , que es la diferencia entre el Ct del gen diana y el de los normalizadores *GAPDH* y *ACTB*.

Los resultados obtenidos confirmaron la información extraída de las TLDA. En cuanto al MPR-1a, encontramos que la expresión de los transportadores de cationes orgánicos OCT1 y OCT2 era baja (< 10 % de la de GAPDH) o muy baja (< 1 % de la de GAPDH) (Figura 2A y 2B), mientras que el OCT3 fue el que presentó mayor expresión, siendo moderada (entre el 10 y 100 % de la de GAPDH) y similar en el tejido tumoral y no tumoral (Figura 2C). Respecto a su expresión dependiendo del estadio o la localización del tumor, solo en el caso de OCT2 observamos una ligera tendencia a una mayor expresión en los pacientes en estadio IV (Figura 3B), que no alcanzó significación estadística. Sin embargo, encontramos cambios significativos al comparar la expresión de los OCTs con el grado de diferenciación del tumor (Figura 3A-3C). Aquellos pacientes con tumores poco diferenciados presentaron una expresión mayor de OCT1 que aquellos bien diferenciados (Figura 3A). Por otro lado, la expresión de OCT3 fue mayor en los casos con una diferenciación moderada con respecto a los que mostraba baja diferenciación (Figura 3C).

En cuanto a los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP), encontramos una expresión baja del OATP1B1 (*SLCO1B1*) (Figura 2D y 4A), un transportador expresado casi exclusivamente en hepatocitos (Niemi et al. 2011). En cambio, resultó llamativo el aumento de expresión de OATP1B3 (*SLCO1B3*) en el tejido tumoral con respecto al no tumoral (Figura 2E), lo que no ocurría en los tumores localizados en el cardias (Figura 4B).

Dentro de los genes englobados en el MPR-1a, también analizamos la expresión del transportador de cobre CTR1, que resultó ser moderada tanto en el tejido tumoral como en el adyacente no tumoral (Figura 2F), independientemente del estadio tumoral y del grado de diferenciación, con un aumento progresivo de expresión desde la zona más proximal a la más distal del estómago (Figura 4C).

A continuación, evaluamos los niveles de expresión de los genes de la superfamilia de proteínas ABC que codifican para las principales bombas exportadoras de fármacos, pertenecientes al MPR-1b. MDR1 y MRP2 fueron las que mostraron menor expresión en ACG (Figuras 5A y 5C) que disminuía progresivamente cuanto más distal era la localización del tumor en el estómago (Figura 6A y 6C). La expresión de MRP1, MRP3, MRP4 y MRP5 fue moderada o alta, siendo mayor en el tejido adyacente no tumoral que en el tejido tumoral en todos los casos (Figuras 5B y 5D-5F). No encontramos cambios destacados en

los niveles de expresión de MRP1, MRP3 y MRP4 en función del estadio ni del grado de diferenciación, con una mayor expresión de MRP1 en tumores de cardias (Figuras 6B, 7A y 7B). La localización del tumor no condicionó la expresión de MRP4, pero observamos que su expresión aumentaba en tumores no diferenciados (Figura 7B). En cuanto a los niveles de ARNm de BCRP, estos presentaron una tendencia a disminuir con el desarrollo tumoral (Figura 8A), aunque fueron muy variables en las diferentes muestras analizadas (Figura 5G).

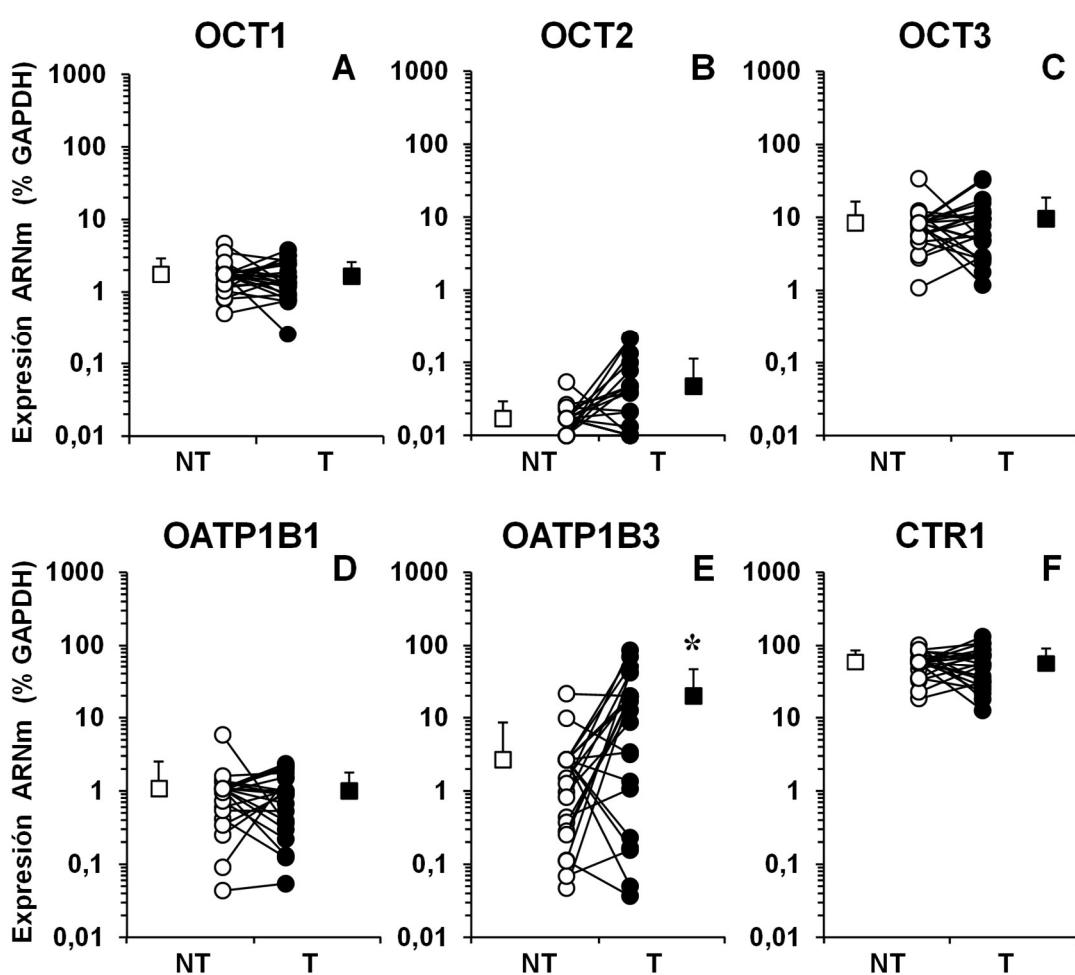


Figura 2. Niveles de expresión relativa de OCT1 (A), OCT2 (B), OCT3 (C), OATP1B1 (D), OATP1B3 (E) y CTR1 (F) en muestras de pacientes de adenocarcinoma gástrico. Los valores se representan como media \pm DE (cuadrados) y datos individuales (círculos) de muestras pareadas ($n=23$) de tejido tumoral (T) y tejido adyacente no tumoral (NT) determinadas por RT-qPCR y expresadas como porcentaje de expresión de GAPDH. *, $p < 0,05$, al comparar tejido tumoral y no tumoral.

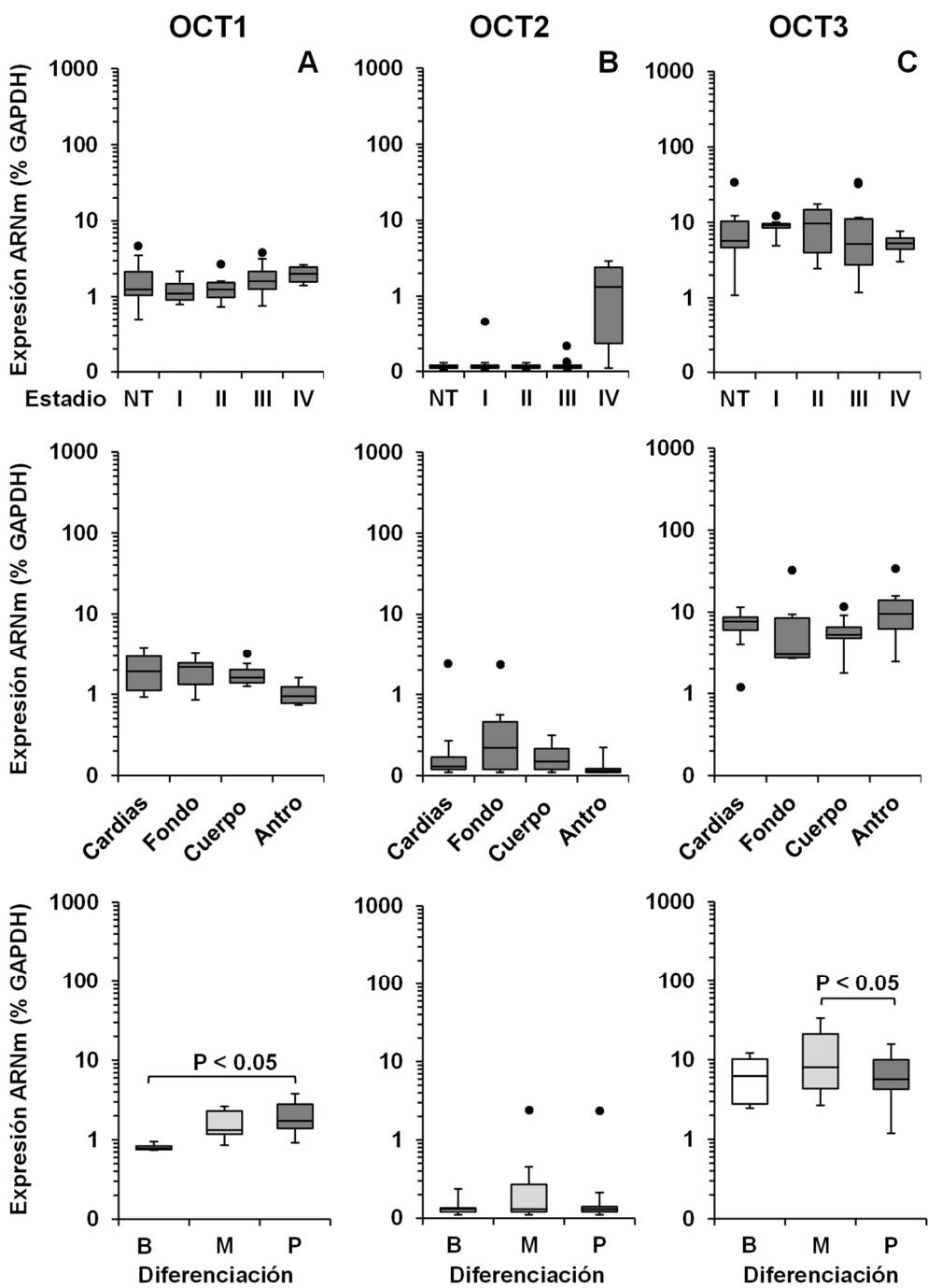


Figura 3. Niveles de expresión relativa de OCT1 (A), OCT2 (B) y OCT3 (C), en muestras de pacientes de adenocarcinoma gástrico. Los diagramas de caja muestran la relación de la expresión de cada gen con el estadio del tumor, su localización en el estómago y el grado de diferenciación, clasificado en bueno (B), moderado (M), o pobre (P). Las partes inferior, media y superior de cada cuadro representan el primer, segundo y tercer cuartil respectivamente. Los bigotes inferior y superior tienen un valor de 1,5 veces el rango intercuartílico (IQR) del primer y tercer cuartil, respectivamente. Los círculos negros son valores que exceden los bigotes y son considerados valores atípicos. Los valores se muestran como media \pm EEM.

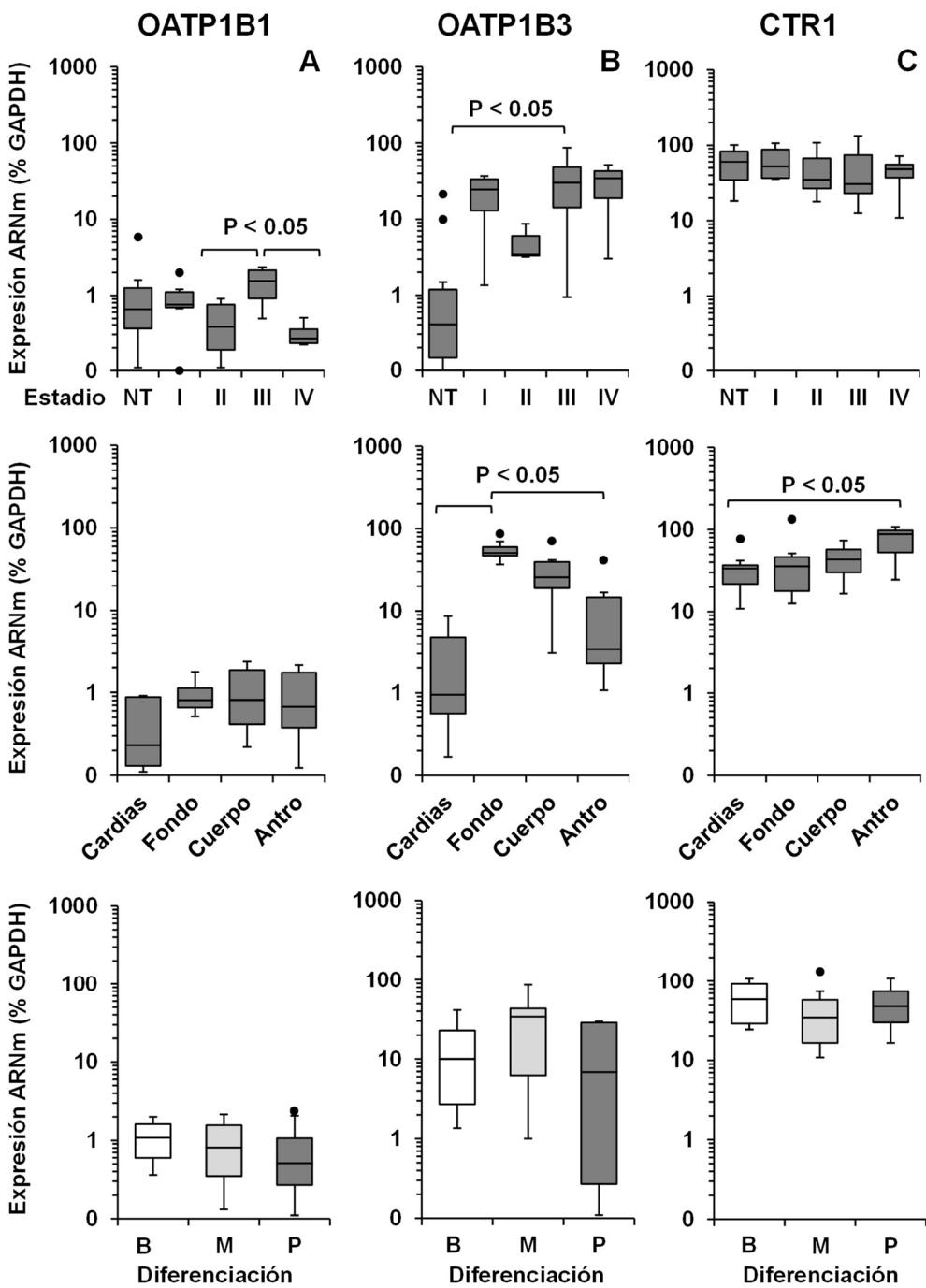


Figura 4. Niveles de expresión relativa de OATP1B1 (A), OATP1B3 (B) y CTR1 (C) en muestras de pacientes de adenocarcinoma gástrico. Los diagramas de caja muestran la relación de la expresión de cada gen con el estadio del tumor, su localización en el estómago y el grado de diferenciación, clasificado en bueno (B), moderado (M), o pobre (P). Las partes inferior, media y superior de cada cuadro representan el primer, segundo y tercer cuartil respectivamente. Los bigotes inferior y superior tienen un valor de 1,5 veces el rango intercuartílico (IQR) del primer y tercer cuartil, respectivamente. Los círculos negros son valores que exceden los bigotes y son considerados valores atípicos. Los valores se muestran como media ± EEM.

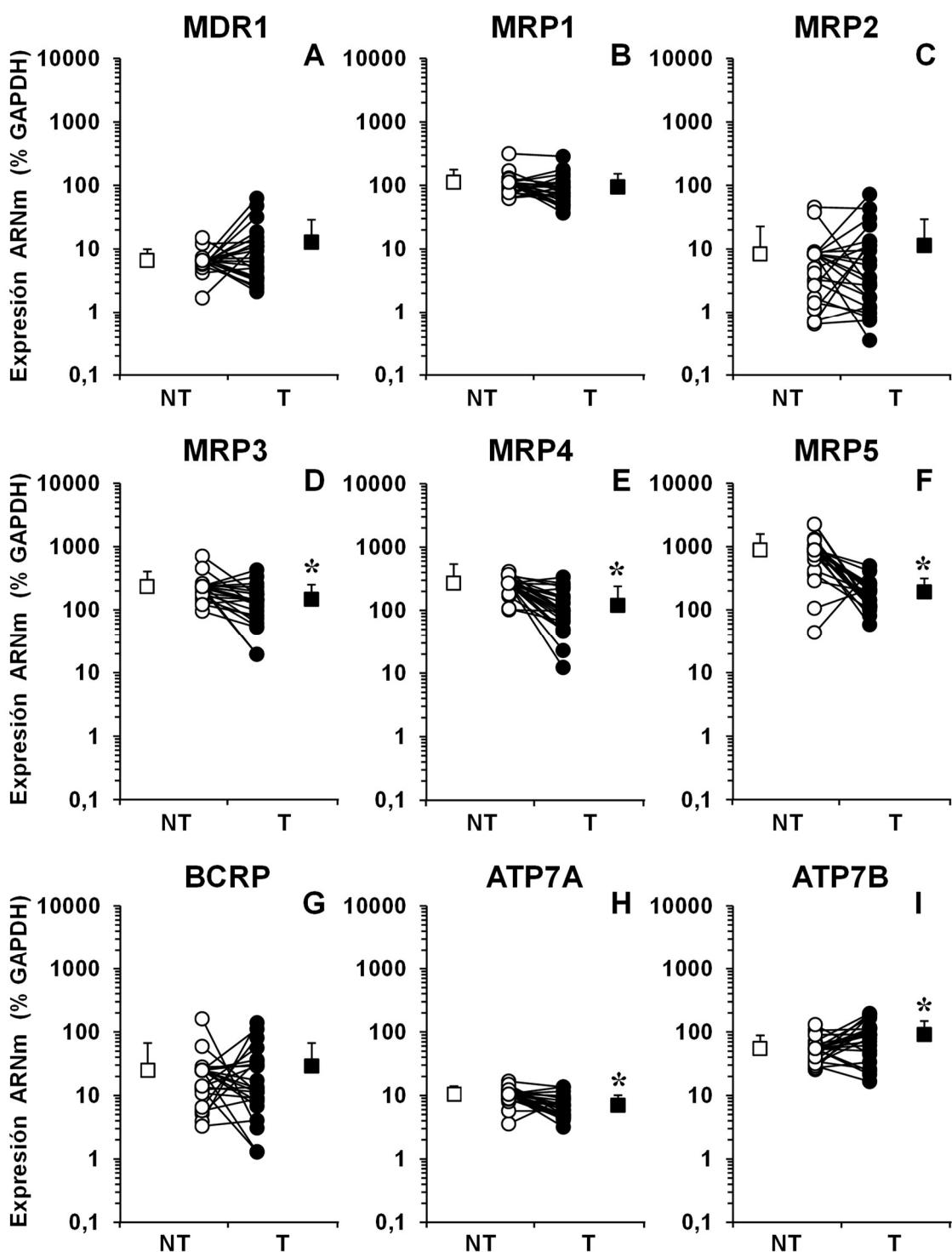


Figura 5. Niveles de expresión relativa de MDR1 (A), MRP1 (B), MRP2 (C), MRP3 (D), MRP4 (E), MRP5 (F), BCRP (G) ATP7A (H) y ATP7B (I) en muestras de pacientes de adenocarcinoma gástrico. Los valores se representan como media \pm DE (cuadrados) y datos individuales (círculos) de muestras pareadas ($n=23$) de tejido tumoral (T) y tejido adyacente no tumoral (NT) determinadas por RT-qPCR y expresadas como porcentaje de expresión de GAPDH. *, $p < 0,05$, al comparar tejido tumoral y no tumoral.

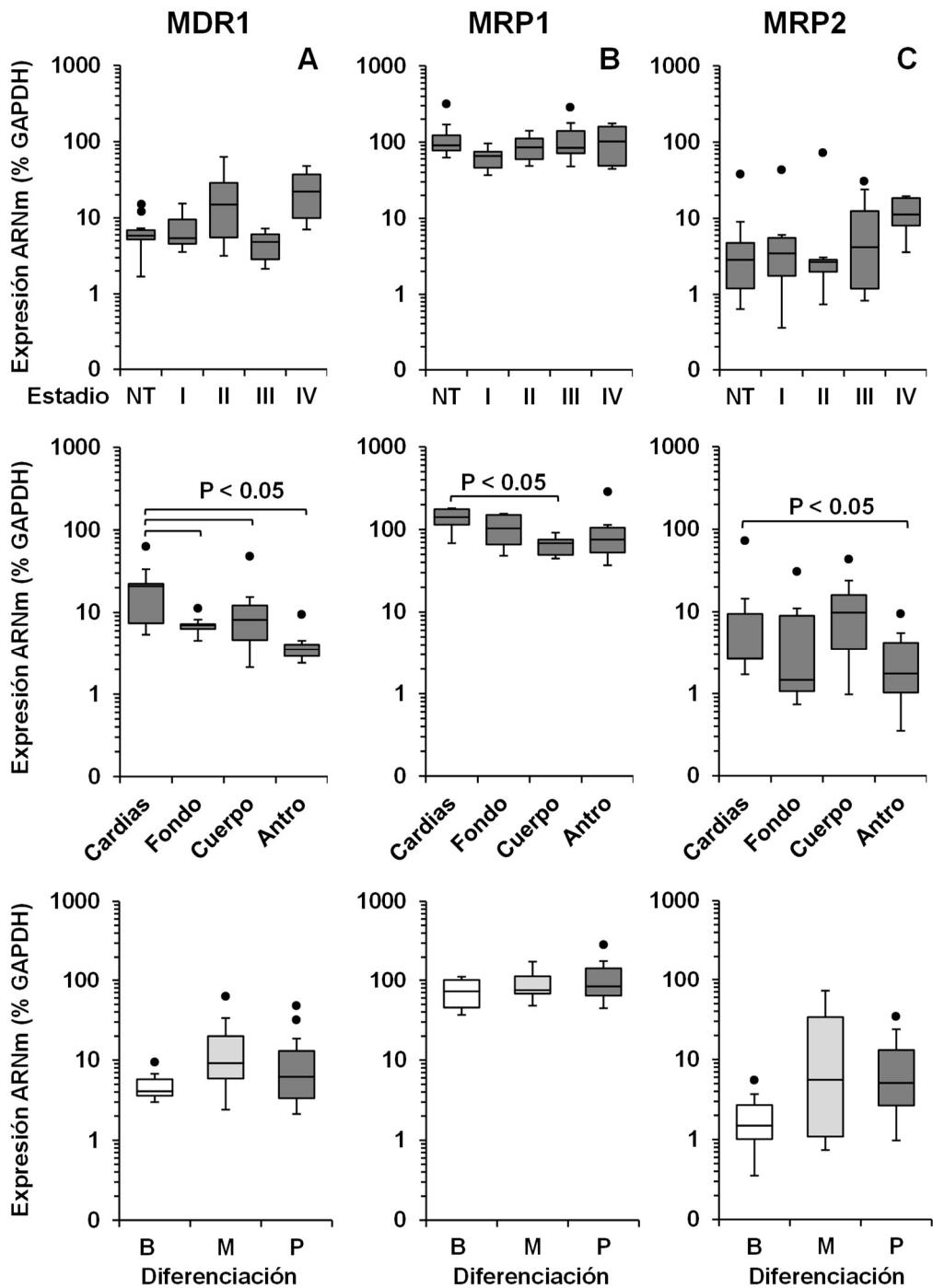


Figura 6. Niveles de expresión relativa de MDR1 (A), MRP1 (B) y MRP2 (C) en muestras de pacientes de adenocarcinoma gástrico. Los diagramas de caja muestran la relación de la expresión de cada gen con el estadio del tumor, su localización en el estómago y el grado de diferenciación, clasificado en bueno (B), moderado (M), o pobre (P). Las partes inferior, media y superior de cada cuadro representan el primer, segundo y tercer cuartil respectivamente. Los bigotes inferior y superior tienen un valor de 1,5 veces el rango intercuartílico (IQR) del primer y tercer cuartil, respectivamente. Los círculos negros son valores que exceden los bigotes y son considerados valores atípicos. Los valores se muestran como media ± EEM.

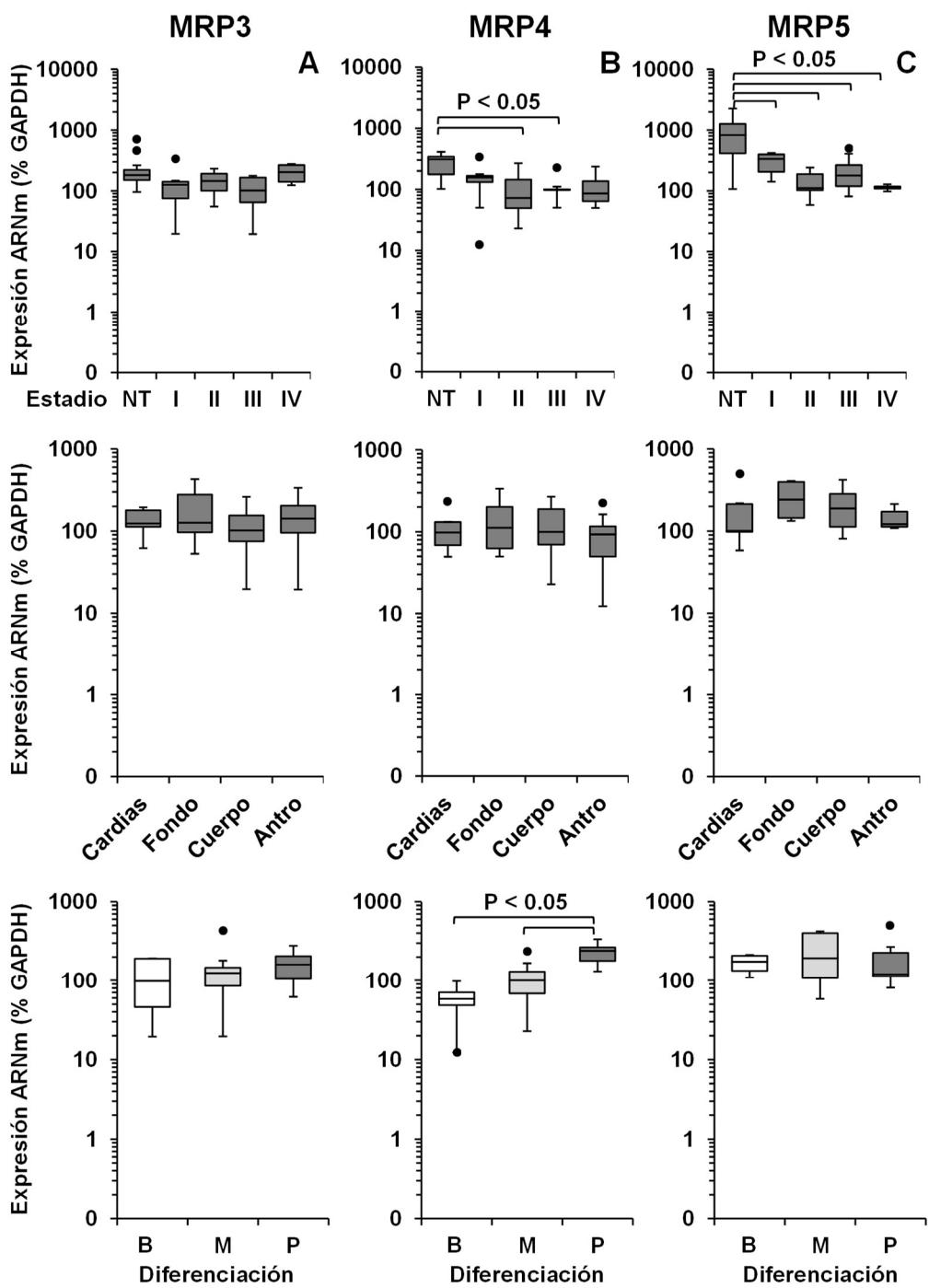


Figura 7. Niveles de expresión relativa de MRP3 (A), MRP4 (B) y MRP2 (C) en muestras de pacientes de adenocarcinoma gástrico. Los diagramas de caja muestran la relación de la expresión de cada gen con el estadio del tumor, su localización en el estómago y el grado de diferenciación, clasificado en bueno (B), moderado (M), o pobre (P). Las partes inferior, media y superior de cada cuadro representan el primer, segundo y tercer cuartil respectivamente. Los bigotes inferior y superior tienen un valor de 1,5 veces el rango intercuartílico (IQR) del primer y tercer cuartil, respectivamente. Los círculos negros son valores que exceden los bigotes y son considerados valores atípicos. Los valores se muestran como media \pm EEM.

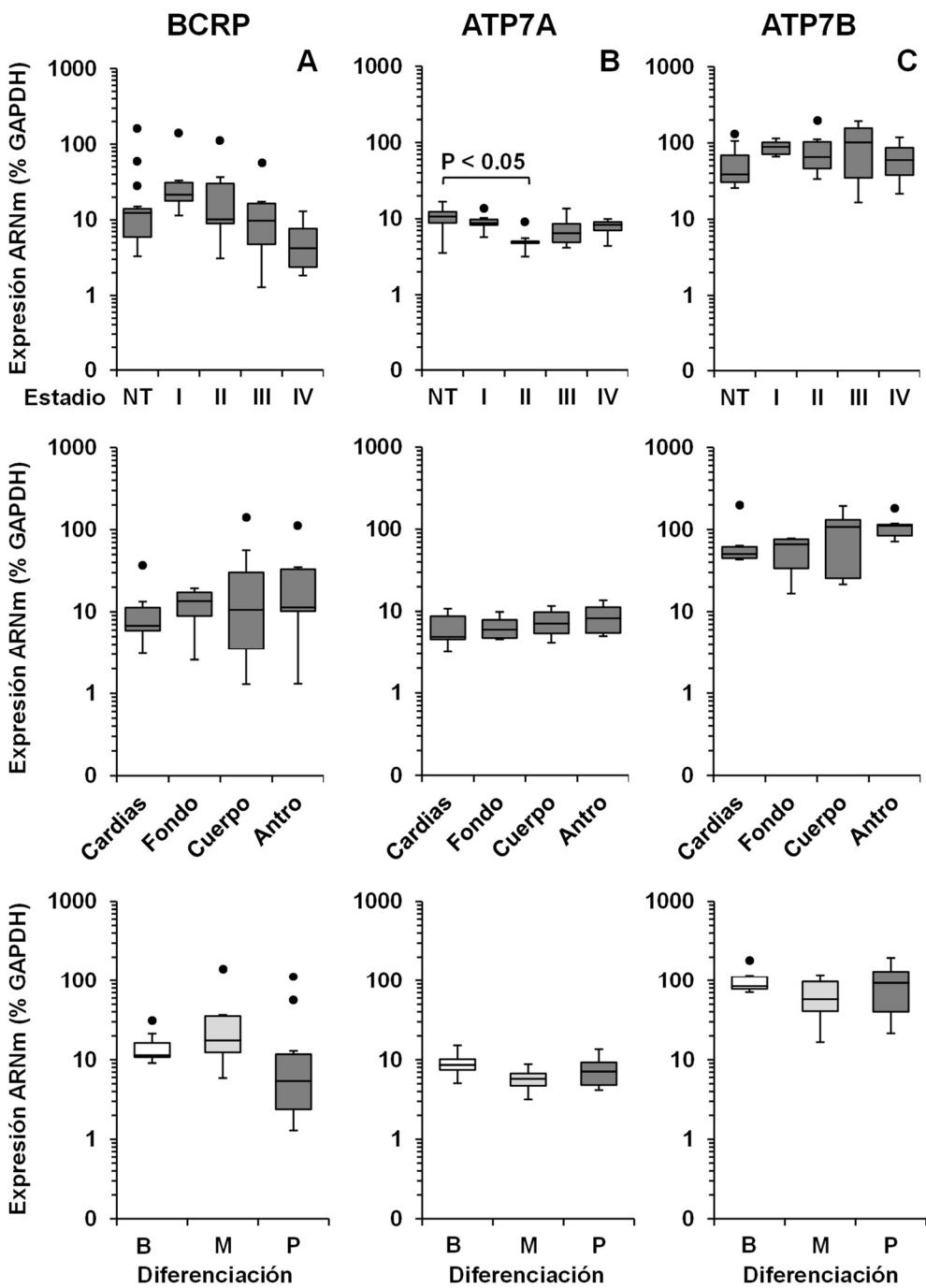


Figura 8. Niveles de expresión relativa de BCRP (A), ATP7A (B) y ATP7B (C) en muestras de pacientes de adenocarcinoma gástrico. Los diagramas de caja muestran la relación de la expresión de cada gen con el estadio del tumor, su localización en el estómago y el grado de diferenciación, clasificado en bueno (B), moderado (M), o pobre (P). Las partes inferior, media y superior de cada cuadro representan el primer, segundo y tercer cuartil respectivamente. Los bigotes inferior y superior tienen un valor de 1,5 veces el rango intercuartílico (IQR) del primer y tercer cuartil, respectivamente. Los círculos negros son valores que exceden los bigotes y son considerados valores atípicos. Los valores se muestran como media \pm EEM.

En las muestras de ACG analizadas, la expresión del transportador de cobre *ATP7A* fue baja, mientras que la de *ATP7B* fue moderada (Figuras 5H y 5I). Sin embargo, no se encontró una clara asociación entre la expresión de estas y la localización tumoral, ni con el grado de diferenciación (Figuras 8B y 8C).

Los niveles de expresión moderados o elevados de varios genes del MPR-1b en las muestras de pacientes con ACG y su conocida relación con el transporte de los fármacos utilizados en este tipo de tumor sugieren un papel destacado de este MPR en la quimiorresistencia del ACG. Sin embargo, los niveles de ARNm a veces no se correlacionan con los niveles de la proteína y su localización en la membrana plasmática, donde llevan a cabo la función de extrusión de fármacos. Por ello, el siguiente paso fue realizar un estudio por IF en muestras de ACG para investigar la localización subcelular de aquellas proteínas que presentaban niveles más elevados de ARNm: MRP1, MRP3, MRP4 y MRP5. La Figura 9 muestra imágenes representativas obtenidas mediante microscopía confocal en las que se observaba un marcaje intenso de MRP1 y MRP4, mientras que el de MRP3 fue débil y el de MRP5, moderado. En el caso de las dos primeras, se apreciaba una clara colocalización con el marcador de membrana plasmática Na^+/K^+ ATPasa. Sin embargo, MRP5 mostró una localización fundamentalmente intracelular en las células tumorales (Figuras 9D-9F y 9J-9K).

Utilizando la base de datos TCGA-STAD analizamos la expresión de MRP1 y MRP4 en 26 muestras pareadas de tejido tumoral y tejido adyacente no tumoral de pacientes de cáncer gástrico. A diferencia de los datos encontrados en la serie de San Sebastián incluida en nuestro estudio, encontramos que la expresión de MRP1 y MRP4 era ligeramente superior en el tejido tumoral que en el no tumoral (Figuras 10A y 10B). Esta diferencia podría deberse a los distintos métodos de análisis utilizados en ambos casos.

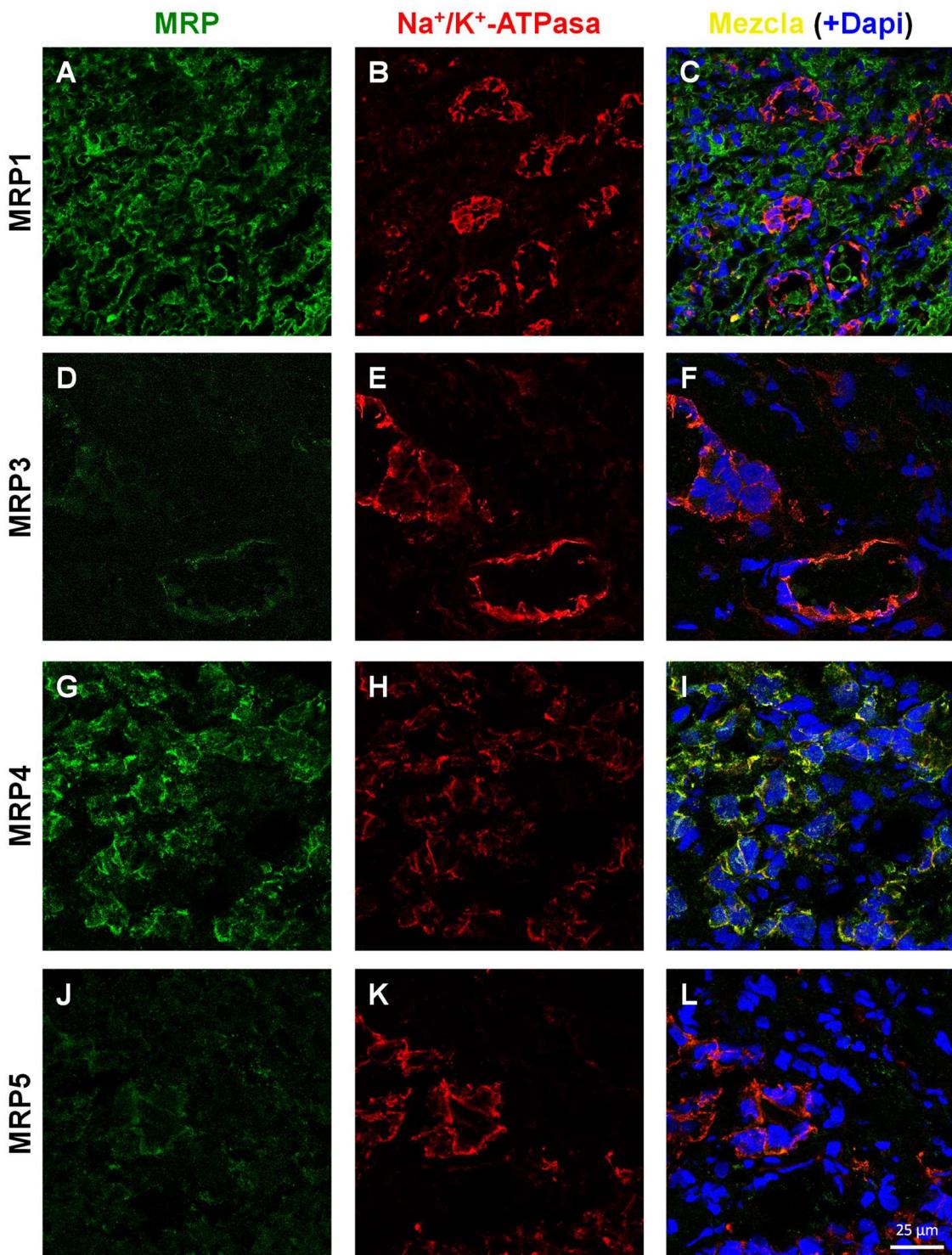


Figura 9. Localización por inmunofluorescencia de MRP1 (A–C), MRP3 (D–F), MRP4 (G–I) y MRP5 (J–L) en cortes de tejido de adenocarcinoma gástrico. Las criosecciones se han marcado en verde con anticuerpos anti-MRP1 (A), anti-MRP3 (D), anti-MRP4 (G), anti-MRP5 (J), y en rojo con anticuerpo anti- Na^+/K^+ -ATPasa (B, E, H, K). El núcleo se ha marcado en azul con DAPI.

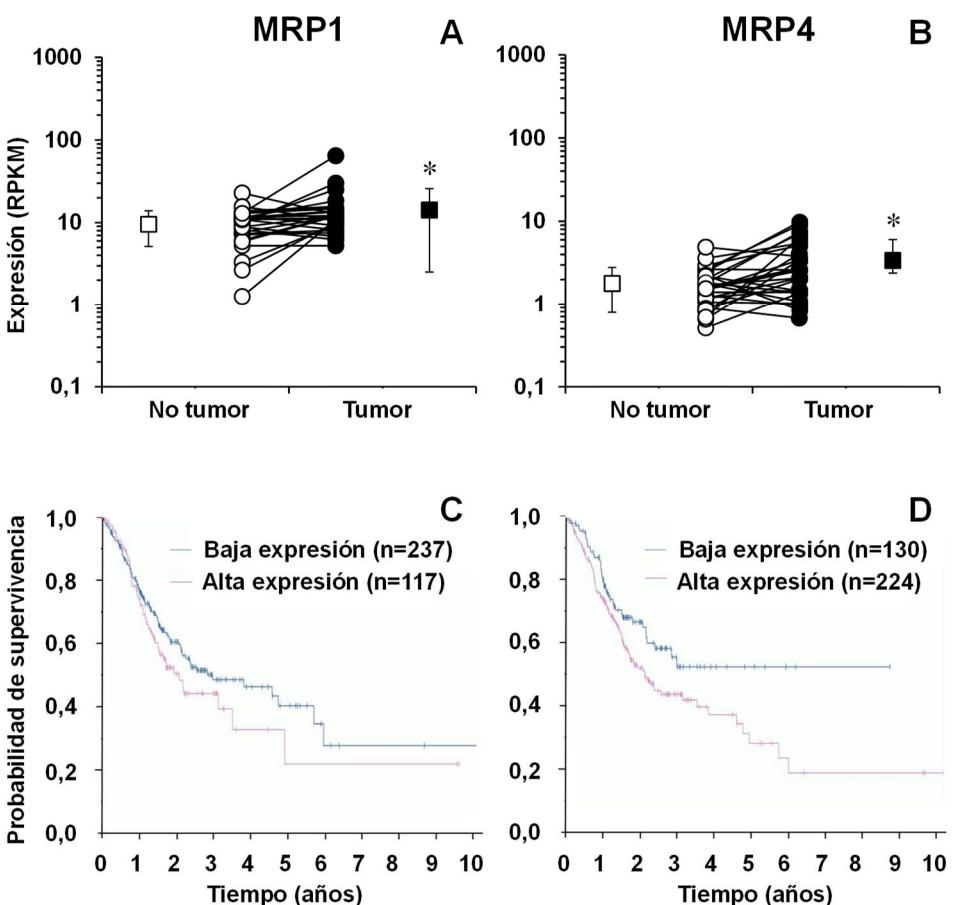


Figura 10. Niveles de expresión de MRP1 (A) y MRP4 (B) en muestras de pacientes con cáncer gástrico. Los valores se indican como media ± DE (cuadrados) y datos individuales (círculos) de muestras pareadas ($n=26$) de tejido tumoral y tejido adyacente no tumoral, determinados por secuenciación del ARN (RNA-seq) y expresados como RPKM (reads per kilobase per million mapped), se obtuvieron de la base de datos TCGA. *, $p < 0,05$, al comparar tejido tumoral y no tumoral. Análisis Kaplan-Meier de la relación entre los niveles de expresión de MRP1 (C) o MRP4 (D) y el tiempo de supervivencia tras el diagnóstico en 354 pacientes con adenocarcinoma gástrico de datos procedentes del “Human Protein Atlas”.

Por otro lado, utilizando la herramienta on-line “Human Protein Atlas” analizamos la relación existente entre la expresión de estas proteínas y la tasa de supervivencia de los pacientes. Esta herramienta no nos permite separar los datos de los pacientes con adenocarcinoma del resto de pacientes con otros tipos de tumores gástricos. Sin embargo, teniendo en cuenta que la mayoría de los pacientes con cáncer gástrico padecen ACG, la información proporcionada por este sitio web puede considerarse una visión bastante aproximada a lo que ocurre en los pacientes de ACG. En total se analizaron 354 pacientes sometidos a diversos regímenes farmacológicos, en los que

observamos una tendencia a una supervivencia mayor en aquellos pacientes cuyos tumores expresaban niveles más bajos de MRP1 y MRP4 (Figura 10C y 10D).

El papel de las bombas ABC en la quimiorresistencia antitumoral está ampliamente estudiado para muchos tipos de tumores, aunque su contribución al fenotipo MDR en el caso del ACG no se conoce con exactitud. Por esta razón decidimos profundizar en el papel de las proteínas ABC en la quimiorresistencia del ACG, para lo que era necesario desarrollar diferentes modelos experimentales que nos permitieran evaluar su papel tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*.

4.2.2. Caracterización del transportoma de una línea celular de ACG

Para estudiar en un modelo *in vitro* el papel del transportoma en la quimiorresistencia del ACG, elegimos la línea celular AGS, derivada de ACG. Estas células adherentes derivan de un ACG de una mujer de raza caucásica de 54 años que no había recibido tratamiento farmacológico antitumoral previo a la extirpación del tumor (Barranco et al. 1983).

En primer lugar, analizamos por RT-qPCR la expresión de las bombas MDR1, MRP1-MRP5 y BCRP en esta línea celular. Los niveles de ARNm de MRP1 y MRP3 fueron los más elevados; MRP4 y MRP5 mostraron niveles de ARNm moderados (Figura 11A), mientras que los niveles de expresión de MDR1, MRP2 y BCRP fueron muy bajos (Figura 11A).

El análisis de los niveles de estas proteínas por Western blot mostró que MRP1 se encontraba principalmente en la fracción citosólica, aunque había una pequeña fracción localizada en la membrana plasmática (Figura 11B). Sin embargo MRP3 no se detectó en ninguno de los dos compartimentos celulares a pesar de su elevada expresión a nivel de ARNm, lo que podría deberse a que los anticuerpos disponibles para MRP3 no son capaces de detectar la proteína por Western blot (Figura 11B). MRP4 estaba presente en ambos compartimentos en cantidad elevada, mientras que MRP5 solo se detectaba en la fracción citosólica (Figura 11B).

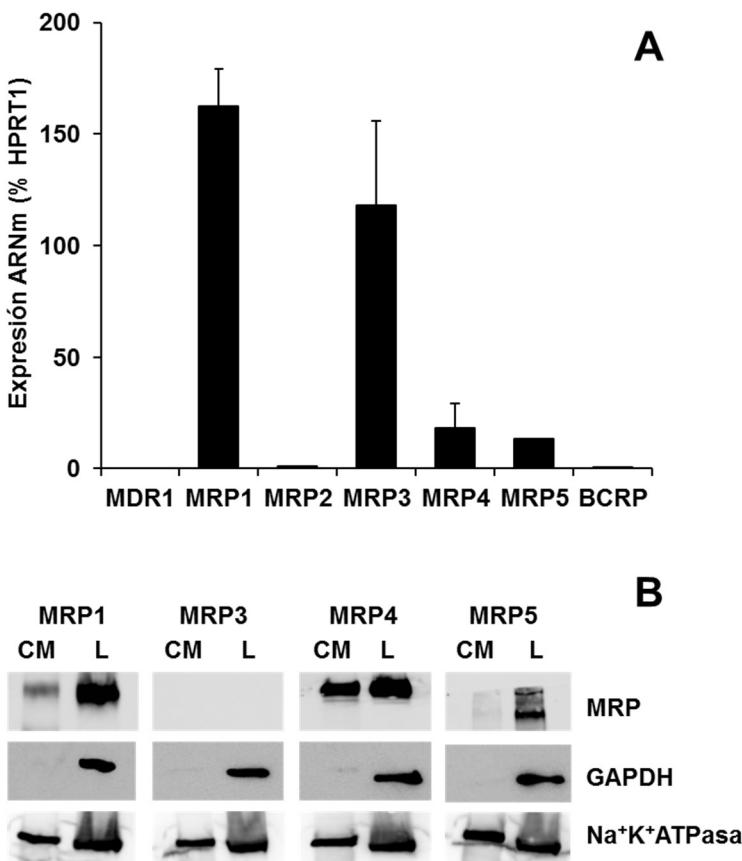


Figura 11. (A) Niveles de expresión relativa de MDR1, MRP1-5 y BCRP en células AGS. Los valores se muestran como media ± DE de las medidas determinadas por RT-qPCR de dos cultivos de células AGS llevadas a cabo por duplicado y expresada como porcentaje respecto HPRT1. (B) Imagen representativa de la detección por Western blot de MRP1, MRP3, MRP4 y MRP5 en células AGS. Las células se procesaron para obtener crudos de membrana (CM) y lisados celulares (L) y se cargaron 50 µg de proteína por calle. Como control de carga se utilizaron GAPDH y Na⁺/K⁺-ATPasa.

Para validar estos resultados realizamos un ensayo de IF. MRP1, tal y como sugerían los resultados de Western blot, se localizaba tanto intracelularmente como en la membrana plasmática (Figuras 12A-12C). Para MRP3 detectamos una señal débil tanto en el interior celular como en la membrana plasmática (Figuras 12D-12F). MRP4 se colocalizó en la membrana con la Na⁺/K⁺ ATPasa, mientras que el marcaje para MRP5 se observó únicamente intracelularmente (Figuras 12G-12L). Los resultados de IF confirmaron los resultados obtenidos por Western blot.

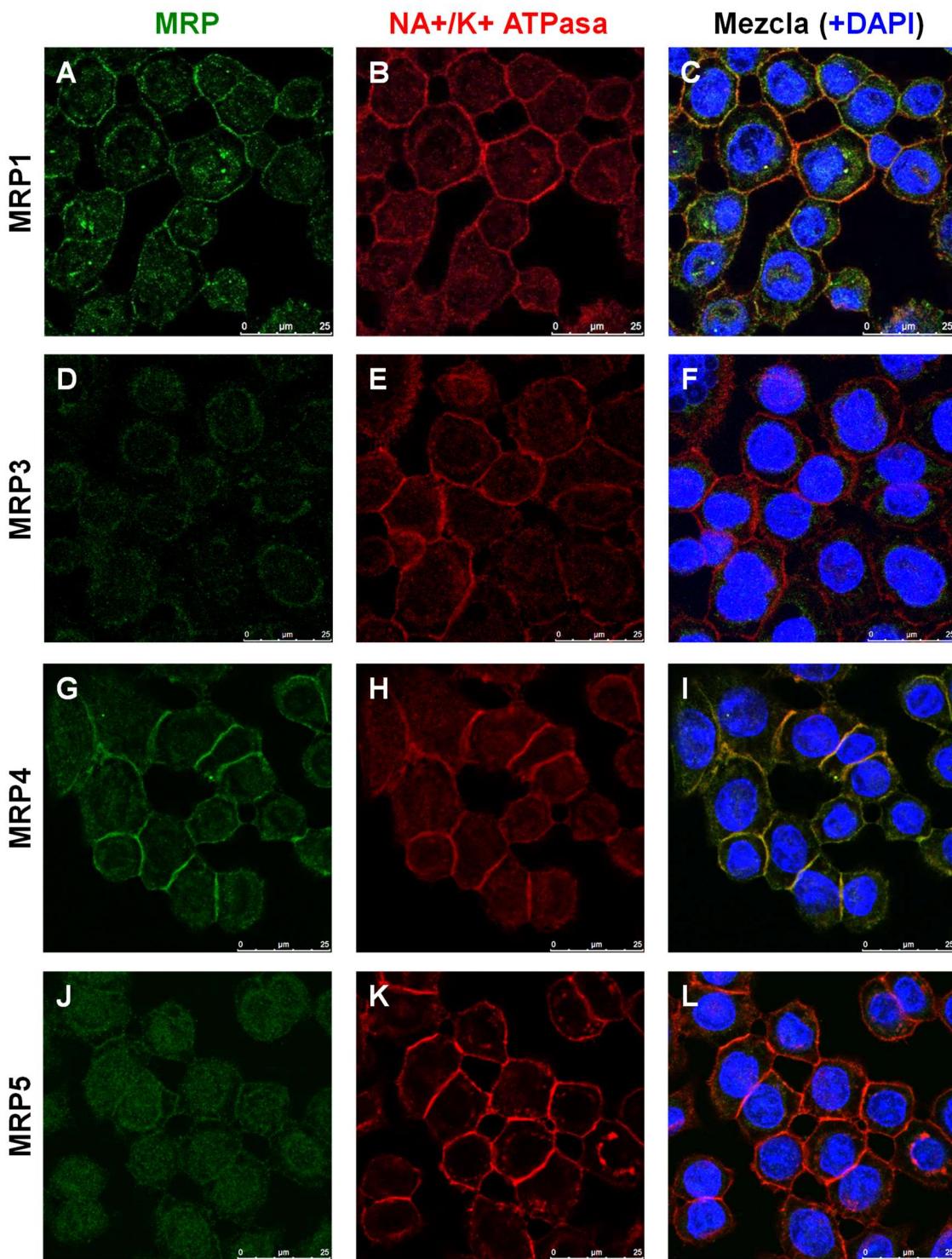


Figura 12. Localización por inmunofluorescencia de MRP1 (A–C), MRP3 (D–F), MRP4 (G–I) y MRP5 (J–L) en células AGS. Se ha marcado en verde con anticuerpos anti-MRP1 (A), anti-MRP3 (D), anti-MRP4 (G), anti-MRP5 (J), y en rojo con anticuerpo anti- Na^+/K^+ -ATPasa (B, E, H, K). El núcleo se ha marcado en azul con DAPI.

La IF realizada en las células AGS concuerda con lo observado previamente en el estudio por IF de las muestras de pacientes con ACG. En ambos casos la expresión de membrana más elevada fue la de MRP4, seguida de MRP1, que también estaba presente intracelularmente. Para MRP3, tanto en las células como en las muestras de pacientes observamos un marcaje apenas perceptible en ambos compartimentos celulares y, por último, MRP5 que presentaba un marcaje moderado y difuso en las muestras de tumores, se presentaba en las células AGS de la misma manera.

A continuación, para estudiar la actividad de MRP1 y MRP4 en la línea celular AGS realizamos estudios de transporte por citometría de flujo. Se midió la acumulación celular de sustratos fluorescentes para evaluar la capacidad de las células para expulsar a través de las bombas ABC los distintos sustratos ensayados. Para estudiar la actividad de MRP1 usamos Fluo-3, un compuesto fluorescente sustrato de esta bomba (Keppler et al. 1999), mientras que para evaluar la actividad de MRP4 usamos carboxifluoresceína (CF) (Luna-Tortos et al. 2010). La Figura 13 muestra, la evolución temporal del contenido en las células de cada uno de los sustratos fluorescentes al incubar las células con 2 μ M Fluo-3 (Figura 13A) o 1 μ M CF (Figura 13C), respectivamente. En ambos casos la carga del compuesto fluorescente alcanzó una meseta tras los 30 minutos, por lo que fue el tiempo escogido para los estudios posteriores de eflujo. Como inhibidores utilizamos el AINE diclofenaco y el fármaco uricosúrico probenecid, capaces de inhibir tanto *in vitro* (El-Sheikh et al. 2007; Gollapudi et al. 1997) como *in vivo* (El-Sheikh et al. 2007) las MRPs. Observamos una relación directa entre la concentración del inhibidor y el contenido celular del sustrato fluorescente en las células (Figuras 13B y 13D). Para inhibir la función de MRP1 fueron suficientes bajas concentraciones de ambos inhibidores; sin embargo, solo el probenecid a la concentración más alta ensayada (500 μ M) fue capaz de inhibir de forma significativa la actividad de MRP4. Estos resultados demostraron que las bombas MRP1 y MRP4 eran funcionales en las células AGS.

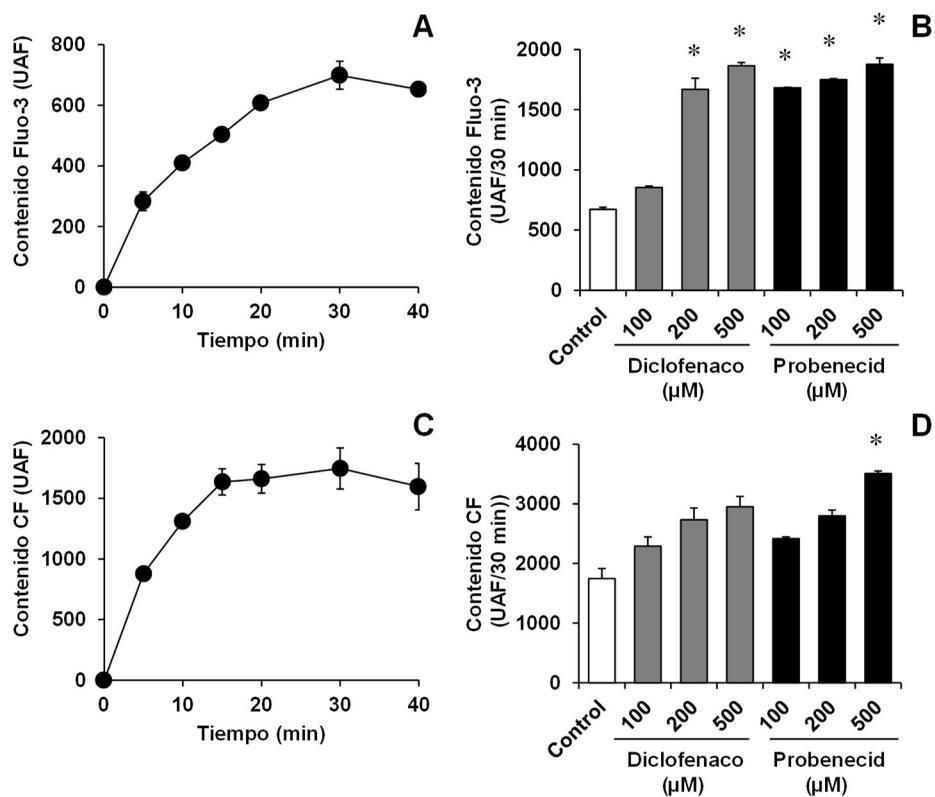


Figura 13. Evolución temporal del contenido del sustrato de MRP1, Fluo-3 (A), y el sustrato de MRP3, MRP4 y MRP5, carboxifluoresceína (CF) (C). Efecto de los inhibidores de MRPs diclofenaco y probenecid en la acumulación celular de Fluo-3 (B) y carboxifluoresceína (D). Las células se incubaron a 37°C con 2 μM de Fluo-3 acetoximetil éster o 1 μM de carboxifluoresceína diacetato durante el tiempo indicado, en presencia o ausencia de las concentraciones indicadas de los inhibidores y se determinó la intensidad de fluorescencia (Unidades arbitrarias de fluorescencia, UAF) media por citometría de flujo. Los valores representan la media ± DE de 9 determinaciones realizadas en 3 cultivos diferentes. *, p<0,05, comparado con el Control.

4.2.3. Quimiosensibilización *in vitro* de células de ACG a fármacos antitumorales

En base a los resultados descritos anteriormente, pudimos concluir que las células AGS son un buen modelo para ensayar *in vitro* la capacidad de compuestos inhibidores de MRPs para sensibilizar las células a distintos agentes quimioterápicos que ya se usan para el tratamiento de otras patologías, lo que puede favorecer que este método de quimiosensibilización pueda ser llevado a la clínica de manera más rápida.

Como prueba de concepto elegimos como fármaco sensibilizante el diclofenaco. En primer lugar quisimos seleccionar una concentración del fármaco no tóxica para las células. Para ello, incubamos las células durante 72 horas con diferentes concentraciones de diclofenaco. Se seleccionó para los siguientes experimentos la concentración de 50 μ M, que no mostró efectos significativos sobre la viabilidad celular (Figura 14A). A continuación, estudiamos la capacidad del diclofenaco de sensibilizar las células a diferentes fármacos antitumorales. Como muestra la Figura 14, la quimiosensibilización más marcada se dio en las células tratadas con sorafenib (Figura 14B), fármaco utilizado en el tratamiento paliativo de pacientes en los estadios más avanzados de ACG (Cheng et al. 2017). Esta quimiosensibilización también se observó en células tratadas con una concentración subtóxica de probenecid (Figura 15A y 15B). El diclofenaco también aumentó de forma significativa la sensibilidad de las células al docetaxel (Figura 14D), y, en menor medida, a la doxorrubicina y al etopósido (Figura 14D-14F). Sin embargo, no tuvo ningún efecto sensibilizante al cisplatino, al 5-FU o al SN-38 (Figura 14C, 14G y 14H).

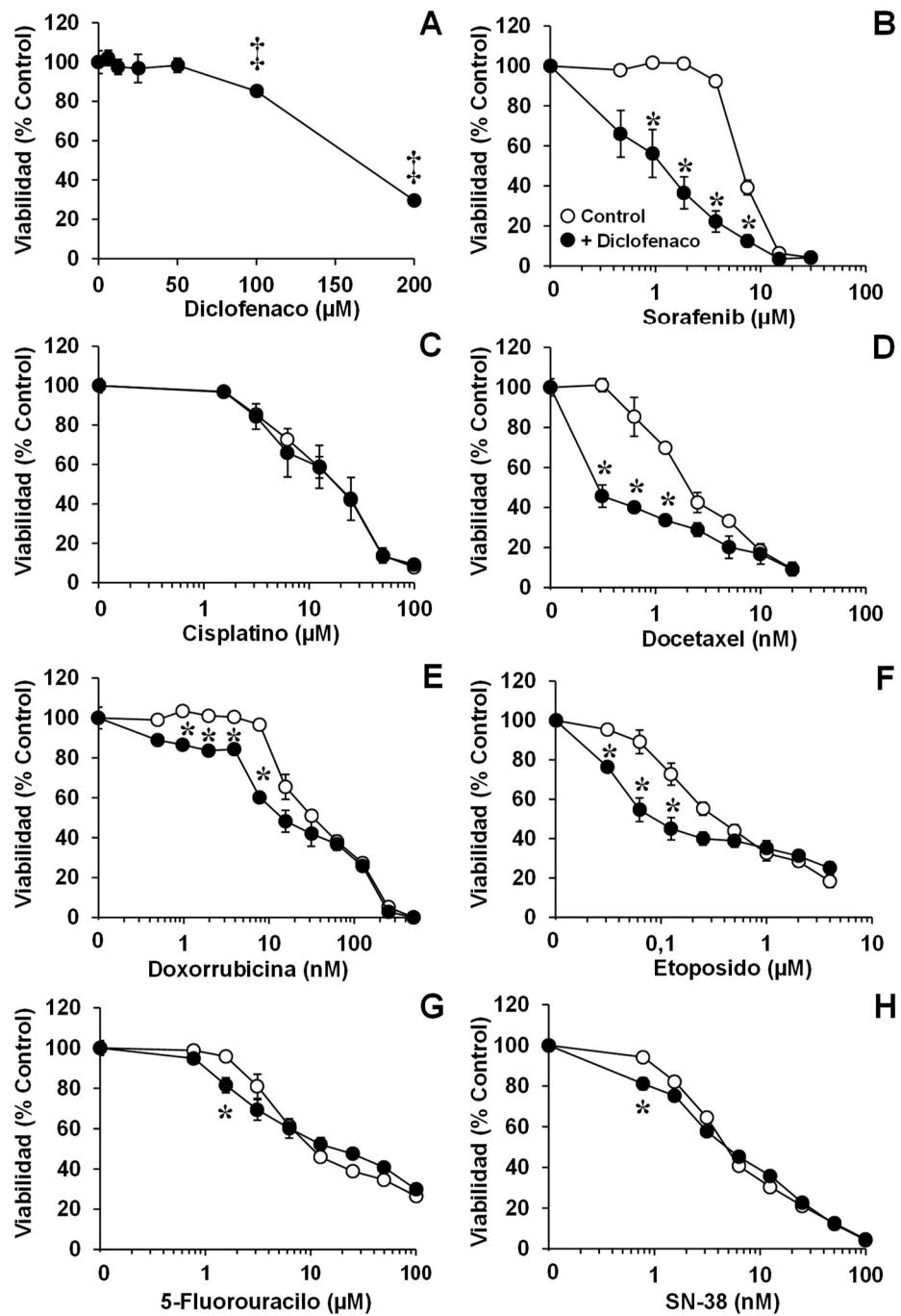


Figura 14. Efecto citostático en células AGS del inhibidor diclofenaco solo (A) o en combinación con los fármacos sorafenib (B), cisplatino (C), docetaxel (D), doxorrubicina (E), etopósido (F), 5-fluorouracilo (G) o SN-38 (H). Las células AGS se incubaron durante 72 horas solo con los fármacos (Control) o en combinación con 50 μM diclofenaco y se determinó la viabilidad por el test de MTT. Los valores se expresan como porcentaje de la viabilidad de células no tratadas (media ± EES) medido en 9 experimentos hechos en al menos 3 cultivos celulares diferentes. ‡, p<0,05 comparado con células sin tratar. *, p<0,05 comparado con el Control.

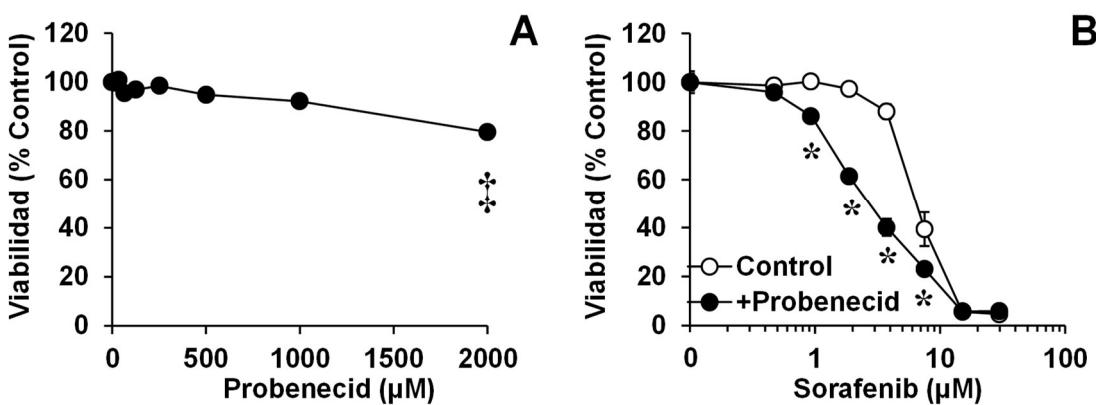


Figura 15. Efecto citostático en células AGS del inhibidor probenecid solo (A) o en combinación con sorafenib (B). Las células se incubaron durante 72 horas solo con sorafenib (Control) o en combinación con 500 μ M probenecid y se determinó la viabilidad por el test de MTT. Los valores se expresan como porcentaje de células no tratadas (media \pm EES) medido en 9 experimentos hechos en al menos tres cultivos celulares diferentes. ‡, p<0,05 comparado con células sin tratar. *, p<0,05 comparado con el Control.

4.2.4. Quimiosensibilización *in vivo* de células de ACG al sorafenib

Para completar los estudios de sensibilización del ACG por inhibidores de MRPs, evaluamos *in vivo* su efecto sobre la actividad antitumoral del sorafenib, fármaco seleccionado para esta etapa por ser el que mejores resultados mostró en los experimentos *in vitro*.

Se realizaron implantes subcutáneos de células AGS en ratones *nude* inmunodeprimidos. Cuando el tumor alcanzó un volumen adecuado, se dividieron los animales en cuatro grupos experimentales: “Control”, que recibieron por vía i.p. solo solución salina; “Diclofenaco”, a los que se administró 20 mg/kg p.c. de diclofenaco dos días por semana; “Sorafenib”, tratados dos veces por semana con sorafenib 10 mg/kg p.c.; y “Sorafenib + Diclofenaco” a los que se le suministró dos veces por semana la combinación de ambos (20 mg/kg diclofenaco y 10 mg/kg p.c. sorafenib).

Observamos que la administración del diclofenaco y del sorafenib, individualmente, tenían un efecto similar sobre el crecimiento del tumor que la administración del vehículo (Figura 16A). Por el contrario, en el grupo tratado con ambos compuestos en combinación observamos una inhibición significativa del crecimiento tumoral a partir de los 10 días de tratamiento (Figura 16A).

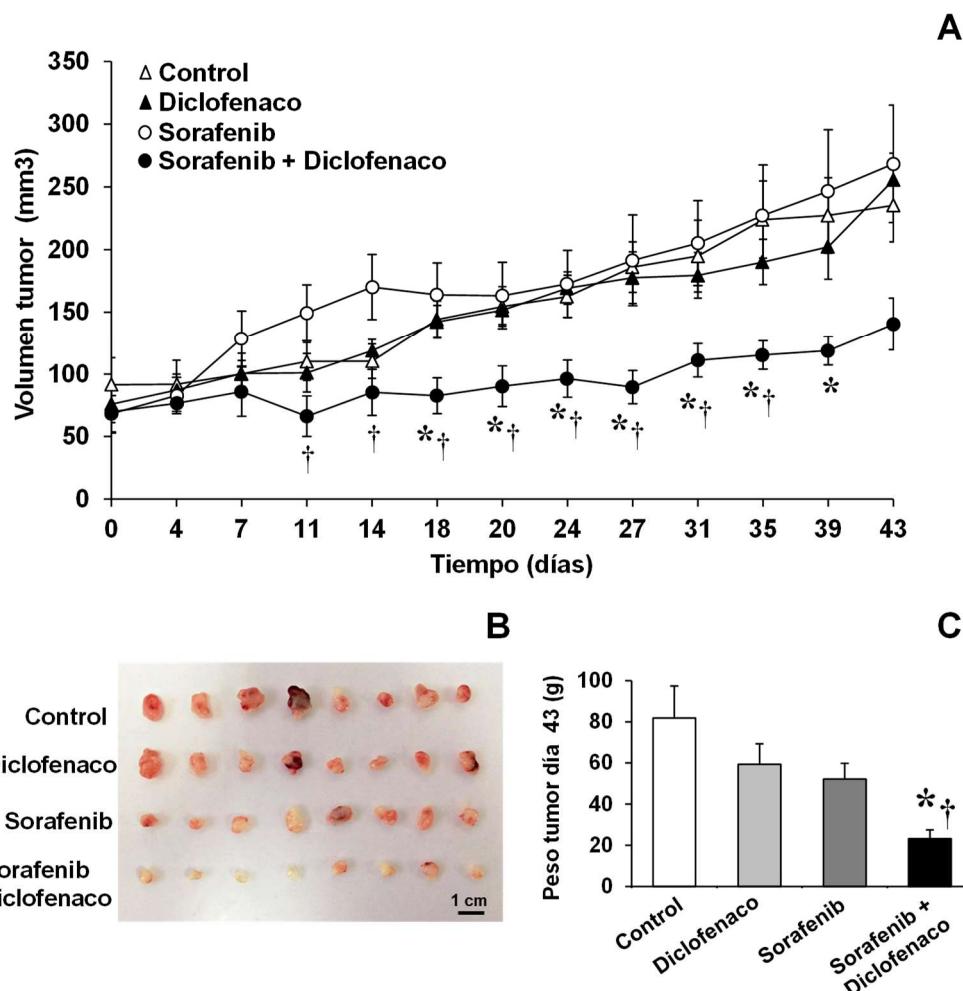


Figura 16. Evolución temporal del crecimiento de los tumores derivados de células AGS implantadas subcutáneamente en ratones inmunodeficientes nu/nu tratados (i.p.) con sorafenib (10 mg/kg p.c.), diclofenaco (20 mg/kg p.c.), o la combinación de ambos (A) dos veces a la semana. El tratamiento comenzó cuando los tumores alcanzaron el volumen de ≈ 75 mm³. Imagen (B) y peso (C) de los tumores extraídos a los ratones tras ser sacrificados al final del periodo experimental (43 días). Los valores muestran la media \pm EEM ($n = 8$ por grupo). *, p<0,05 comparado con el grupo control. †, p<0,05 comparado con el grupo tratado únicamente con sorafenib.

Al final del tratamiento analizamos tanto el tamaño (Figura 16B) como el peso (Figura 16C) de los tumores. Observamos que el tamaño de los tumores era inferior en los animales que recibieron diclofenaco junto al sorafenib. El peso de los tumores fue ligeramente menor en los animales tratados con sorafenib comparado con el grupo “Control”, pero fue significativamente menor en los animales tratados con la combinación con diclofenaco (Figura 16C). Además, encontramos una mayor acumulación del

sorafenib en los tumores de los animales que recibieron la terapia combinada respecto a la encontrada en los extraídos de animales tratados únicamente con este fármaco (Figura 17).

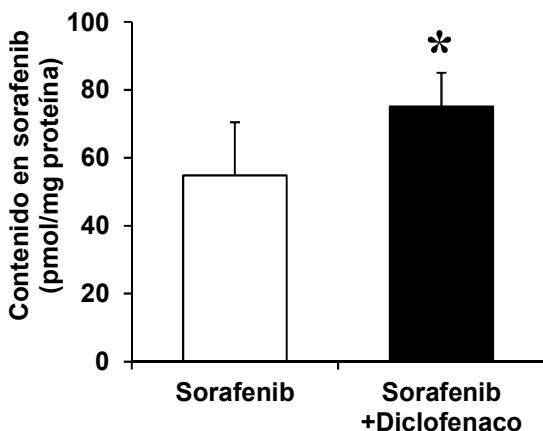


Figura 17. Contenido de sorafenib al finalizar el periodo experimental, de los tumores extraídos de los ratones tratados con sorafenib solo, o la combinación de este con diclofenaco medido por HPLC-MS/MS. Los valores muestran la media ± EEM ($n = 8$ por grupo). *, $p < 0,05$ comparado con el grupo tratado únicamente con sorafenib.

Los perfiles bioquímicos del suero de los animales de todos los grupos experimentales (Tabla 1) no mostraron ninguna señal de toxicidad hepática o renal.

Tabla 1. Perfiles bioquímicos en sangre de la función hepática y renal de los ratones inmunodeprimidos.

Grupo Experimental	Proteína (g/dl)	Albumina (mg/dl)	Bilirrubina (mg/dl)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	BUN (mg/dl)	AU (mg/dl)	CRE (mg/dl)
Control	3,7±0,2	1,7±0,1	0,3±0,1	100±23	45±8	23±2	1,2±0,4	0,6±0,1
Diclofenaco	3,8±0,3	1,5±0,3	0,6±0,3	90±29	30±11	23±2	1,6±0,6	0,6±0,1
Sorafenib	4,1±0,3	1,6±0,1	0,7±0,2	160±35	28±9	30±2	2,2±1,0	0,7±0,1
Sorafenib+diclofenaco	4,2±0,6	1,6±0,3	0,5±0,2	101±30	35±11	31±4	2,6±0,3	0,7±0,1

Los valores son la media ± DE de 4 animales por grupo. $p > 0,05$, comparado con el grupo Control mediante el test de Bonferroni de comparaciones múltiples. AST, aspartato-aminotransferasa; ALT, alanina-aminotransferasa; AU, ácido úrico; BUN, nitrógeno ureico en sangre; CRE, creatinina.

4.3. DISCUSIÓN

El cáncer gástrico es una enfermedad común, situada en quinta posición en el orden de frecuencia de los tipos de cáncer a nivel mundial (Sung et al. 2021), con un limitado número de opciones terapéuticas y con un pronóstico funesto. La supervivencia media a cinco años de los pacientes diagnosticados en estadio 3 no supera el 35 % y en aquellos diagnosticados en estadio 4 es solo del 5,5 % (Institute 2017). En la gran mayoría de los pacientes con cáncer gástrico el tumor es un ACG, originado en las glándulas de la mucosa gástrica, representando el 90 % de todos los tumores malignos primarios que se encuentran en el estómago. La terapia curativa de elección es la resección quirúrgica, que frecuentemente implica una gastrectomía total o subtotal acompañada de linfadenectomía, pero aún en los casos de pacientes que han sido operados la tasa de supervivencia a 5 años no supera el 30 %. Una de las razones para el mal pronóstico del ACG es que cuando aparecen los primeros síntomas con frecuencia el tumor se encuentra en estado muy avanzado, y en la mayoría de los pacientes diagnosticados existe invasión de los ganglios linfáticos perigástricos o metástasis a distancia. Además, debido a la resistencia del ACG a los fármacos utilizados habitualmente, la quimioterapia es poco eficaz, tanto cuando se utiliza de forma paliativa en pacientes con ACG en los que la cirugía no es aconsejable, como en aquellos en los que se utiliza como neoadyuvante o adyuvante. Esta escasa respuesta del ACG a la quimioterapia no es el resultado de un proceso simple, sino que generalmente se debe a la combinación de varios mecanismos de farmacorresistencia (MPR).

En esta Tesis Doctoral hemos caracterizado la HGQT, definida por los elementos que condicionan la sensibilidad a los agentes antitumorales y la importancia que cada uno tiene en el fenotipo MDR. La HGQT puede ser de gran utilidad para guiar la selección individualizada de los pacientes hacia el tratamiento con mayores posibilidades de éxito así como identificar dianas moleculares sobre las que actuar en el desarrollo de nuevas estrategias de superación de la quimiorresistencia.

Aunque hemos encontrado evidencias del papel en la quimiorresistencia de genes implicados en todos los mecanismos de farmacorresistencia, hemos centrado el estudio

en el conjunto de genes relacionados con el transporte de fármacos cuyos cambios de expresión pueden determinar la respuesta a los tratamientos antitumorales, también conocido como transportoma (Martin-Richard et al. 2013), ya que en las células tumorales se ha descrito el aumento de exportación de los agentes antitumorales a través de la membrana plasmática, y la menor captación de los mismos, como la causa predominante de aparición del fenotipo MDR (Li et al. 2016).

Entre los transportadores implicados en la captación de fármacos destaca la expresión de moderada de CTR1 y ENT1, relacionadas con la captación de los derivados del platino y los análogos de pirimidina respectivamente (Holzer et al. 2006; Takechi et al. 2001). Es probable que su nivel de expresión sea suficiente para alcanzar una concentración efectiva de estos compuestos en las células tumorales, ya que la ausencia de diferencias de tumor con el tejido no tumoral sugiere que el MPR-1a no desempeña un papel predominante en heterogeneidad de respuesta del ACG a los fármacos de primera línea.

En cuanto al MPR-1b, la expresión de baja a moderada de *ABCB1*, *ABCC2* y *ABCG2* en las muestras de pacientes y en la línea celular AGS, sugiere que estas bombas juegan un papel minoritario en el fenotipo MDR de este tipo de cáncer. Por el contrario, MRP1, MRP3, MRP4 y MRP5 que se expresan de una manera más notable en ACG, y podrían estar implicadas en dicha quimiorresistencia. También, la bomba MRP7 presenta una expresión moderada. Este es un transportador poco conocido que podría participar en la quimiorresistencia en ACG dada su capacidad de transportar antraciclinas, camptotecinas, etopósido y gemcitabina (Hopper-Borge et al. 2009), taxanos y alcaloides de la Vinca (Hopper-Borge et al. 2004). Además, tampoco podemos descartar la contribución a la quimiorresistencia de otras bombas que no son de la familia ABC, cuya expresión se ha asociado con la falta de respuesta a derivados de platino, como son las proteínas de Menkes (Chen et al. 2007) y Wilson (Ohbu et al. 2003; Leonhardt et al. 2009) (codificadas por los genes *ATP7A* y *ATP7B*, respectivamente), concretamente, en el caso del ACG, hay estudios que relacionan altos niveles de expresión de *ATP7A* con la resistencia al oxaliplatino (Chen et al. 2007). Además la proteína VAULT1 codificada por el gen *MVP*, principal componente de la macroestructura celular ribonucleoproteíca *Vault* (Tanaka et al. 2009), se ha propuesto como marcador de una menor respuesta a la quimioterapia y

una menor supervivencia global (Siva et al. 2001) probablemente relacionada con su capacidad de secuestrar los fármacos quimioterápicos en vesículas citoplasmáticas (Han et al. 2012).

Por otro lado, la mayoría de las proteínas de la familia ABCA presentan una expresión moderada. La función principal de esta familia de transportadores está relacionada con la homeostasis de lípidos, aunque en muchos casos el mecanismo de acción de estas bombas es desconocido (Briz et al. 2019) y no hay información de su papel en ACG. De los genes de esta familia que hemos estudiado, solo se ha descrito un papel en la aparición de quimiorresistencia para *ABCA2* y *ABCA3*. Así, se ha relacionado la sobreexpresión de *ABCA2*, con el desarrollo de resistencia a mitoxantrona (Boonstra et al. 2004), mientras que *ABCA3* puede estar relacionada con la resistencia a antraciclinas (Steinbach et al. 2006), cisplatino, paclitaxel (Overbeck et al. 2013) y daunorrubicina (Chapuy et al. 2008).

Aunque en el desarrollo de este trabajo de investigación nos hemos centrado en el MPR-1, cabe destacar que dentro del MPR-2, encontramos una elevada expresión de la dihidropirimidina deshidrogenasa y GSTP π (MPR-2). La primera de ellas es capaz de inactivar más del 80 % del 5-FU administrado (Diasio and Harris 1989), por lo que se ha propuesto como biomarcador para predecir la respuesta a los derivados del 5-FU y el pronóstico de los pacientes con ACG (Shen et al. 2015; Wang et al. 2016). Algunos estudios han revelado que su sobreexpresión podría tener un papel relevante en la quimiorresistencia intrínseca y adquirida del ACG al 5-FU, el cisplatino y a la mitomicina C (Geng et al. 2013; Goto et al. 1999; Okuyama et al. 1994). La baja expresión de las enzimas CYP, implicadas en la inactivación de algunos fármacos antitumorales (Kivistö et al. 1995; Patterson and Murray 2002; Kawashiro et al. 1998; Crommentuyn et al. 1998), sugiere que no están asociadas a la aparición de quimiorresistencia en ACG. Dentro del MPR-3, hemos encontrado una expresión elevada de las topoisomerasa 1 y 2A, estas proteínas son dianas de fármacos de segunda línea usados en el ACG como el irinotecán, la doxorrubicina y la epirrubicina (Orditura et al. 2014). La expresión de la topoisomerasa 2A se ha asociado previamente con la quimiorresistencia del cáncer gástrico (Downing 2000). Dentro de este grupo de MPR también destaca la expresión de la enzima timidilato sintasa (*TYMS*), cuya sobreexpresión está relacionada con un peor pronóstico de los

pacientes tratados con capecitabina (Kim et al. 2019), y EGFR, cuya sobreexpresión se ha descrito en cáncer gástrico (Kim et al. 2008). Por último, dentro de los MPR-4 y 5, la expresión de moderada a alta de alguno de los genes que componen estos grupos podría estar asociada con la quimiorresistencia del ACG. En el MPR-4 destacan MSH2 que contribuye a la resistencia al cisplatino (Clodfelter et al. 2005), y ERCC1, que se ha relacionado con la resistencia a derivados de platino (Lord et al. 2002; De Dosso et al. 2013; Lee et al. 2005) y al irinotecán (Tsuburaya et al. 2016). En cuanto al MPR-5a, la baja expresión de la mayoría de los genes que componen este grupo de MPR sugiere que probablemente no desempeñen un papel importante en la quimiorresistencia del ACG. Al contrario que los genes del MPR-5b, que presentan una elevada expresión como es el caso de los genes que codifican proteínas antiapoptóticas como las IAP, la survivina, y el oncogén *MYC* que codifica c-MYC, cuya expresión está relacionada con la resistencia al cisplatino en pacientes de ACG (Zhang et al. 2012; Yang et al. 2014).

Dentro de las bombas de la familia ABCC estudiadas, nuestros resultados sugieren que las proteínas MDR1, MRP2 y BCRP no tienen un papel relevante en la farmacorresistencia del ACG, lo que contrastaba con los elevados niveles de expresión observados en la membrana plasmática de las células tumorales de MRP1 y MRP4, lo que las convierte en interesantes dianas para ser inhibidas como estrategia de sensibilización de las células de ACG a fármacos antitumorales que sean expulsados a través de estas bombas. Además, estudios *in silico*, demostraron, sobre todo en el caso de MRP4, como una baja expresión de esta proteína está claramente relacionada con una mayor probabilidad de supervivencia de los pacientes, lo que indica la posible relevancia de esta proteína en la quimiorresistencia de este tipo de tumores.

MRP1 transporta una amplia variedad de fármacos antitumorales, como antraciclinas (doxorrubicina, epirrubicina), colchicina, alcaloides de la Vinca (vincristina), taxanos y epipodofilotoxinas (etopósido) (Hipfner et al. 1999), mientras que MRP4 está relacionada con la resistencia al 5-FU y la doxorrubicina, y algunos estudios han mostrado su capacidad para transportar TKIs, como el dasatinib (Furmanski et al. 2013) o el sorafenib, para el que experimentos preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio han

mostrado la capacidad de esta bomba de reducir la respuesta de las células tumorales a este TKI (Perez-Silva 2019).

Para estudiar una posible estrategia de sensibilización de las células, escogimos como inhibidor de las bombas el AINE diclofenaco. El uso de AINES se ha asociado previamente con un menor riesgo de desarrollar cáncer gástrico (Huang et al. 2017). Además, estudios previos han demostrado la capacidad de los AINES para incrementar la sensibilidad a algunas antraciclinas. Sin embargo, no se ha encontrado efecto en otros tratamientos basados en 5-FU y cisplatino (Duffy et al. 1998). Por otro lado se ha demostrado previamente que algunos AINES como el diclofenaco tienen potentes efectos inhibitorios sobre los transportadores de la familia ABC (El-Sheikh et al. 2007; Pandey et al. 2019). También seleccionamos una batería de fármacos entre los que se consideraron sustratos de MRP1 (doxorrubicina y etopósido), sustratos de MRP4 (doxorrubicina, 5-FU y sorafenib), y fármacos de primera y segunda línea empleados en el tratamiento del cáncer gástrico o que se encuentran en estudio (SN-38, 5-FU, cisplatino, docetaxel y sorafenib).

Nuestros resultados mostraron un aumento de la sensibilidad de las células AGS a sorafenib, doxorrubicina, docetaxel y etopósido en presencia de diclofenaco. Por ejemplo, en el caso del etopósido, la sensibilidad observada coincide con estudios previos llevados a cabo *in vitro* donde se han asociado los niveles de expresión de MRP1 con una menor sensibilidad de las células de ACG a este fármaco (Obuchi et al. 2013).

El resultado más relevante que hemos encontrado ha sido la capacidad del inhibidor diclofenaco para sensibilizar células derivadas de ACG al sorafenib. Por el momento, en ensayos clínicos llevados a cabo en pacientes de cáncer gástrico con este TKI, solo se han obtenido resultados modestos que no han justificado implementar fases más avanzadas de estudio (Martin-Richard et al. 2013). Uno de los principales problemas de estos estudios es que combinan el sorafenib con otros agentes quimioterápicos, lo que aumenta la aparición de efectos secundarios. En el caso de la combinación que sugieren nuestros resultados de tratar de administrar sorafenib con un inhibidor no tóxico de MRPs como es el caso del diclofenaco, los efectos secundarios se ven reducidos tal y como demuestran los perfiles bioquímicos de toxicidad renal y hepática llevados a cabo

en el estudio *in vivo*, donde además queda de manifiesto la capacidad de este tratamiento combinado para reducir el crecimiento tumoral. Este hallazgo resulta de enorme interés y podría tener un impacto significativo en la lucha en la práctica clínica contra la escasa respuesta del ACG a los tratamientos quimioterápicos disponibles.

5. Conclusiones

Bibliografía

**Resultados y
Discusión**

**Materiales y
Métodos**

Introducción

Objetivos

Conclusiones



CONCLUSIÓN PRIMERA:

La expulsión activa de los fármacos de las células tumorales a través de proteínas exportadoras de la superfamilia ABC constituye una de las principales causas del fenotipo MDR propio del ACG. Entre estas bombas, MRP1 y MRP4 son las que presentan una expresión más elevada en la membrana plasmática de las células de ACG, por lo que son potenciales dianas para el desarrollo de estrategias sensibilizantes para mejorar la eficacia del tratamiento farmacológico contra el cáncer gástrico.

CONCLUSIÓN SEGUNDA:

La administración de fármacos de uso común, que son capaces de inhibir a las bombas MRP, como el diclofenaco, podría ser una aproximación terapéutica eficaz para el tratamiento del ACG, al potenciar el efecto de fármacos inhibidores de receptores con actividad tirosina quinasa como el sorafenib, que no se utilizan actualmente por su poca eficacia frente al cáncer gástrico.

CONCLUSIÓN TERCERA:

Utilizando un modelo de sobreexpresión de MRP4 en células embrionarias de riñón humano HEK-293T, se ha podido demostrar que esta bomba es capaz de expulsar fármacos antitumorales como el metotrexato y el panobinostat y otros fármacos utilizados en el tratamiento de primera y segunda línea del ACG, como el 5-fluorouracilo, antraciclinas y derivados del irinotecán. Esto, junto con los elevados niveles de expresión de MRP4 que hemos encontrado en las muestras obtenidas de pacientes con cáncer gástrico, sugiere un papel importante de esta bomba en la quimiorresistencia del ACG.

CONCLUSIÓN CUARTA:

Utilizando la tecnología de edición genómica programada basada en el sistema CRISPR/Cas9 se han generado modelos *in vitro* por anulación de la expresión de proteínas MRPs en células AGS derivadas de cáncer gástrico. Estos modelos constituyen una herramienta útil para evaluar el papel de cada una de las bombas de manera individual evitando las interferencias de la actividad de otras MRPs.

CONCLUSIÓN QUINTA:

Utilizando células AGS con expresión endógena de MRP4, pero en las que se habían silenciado de forma permanente tanto MRP1 como MRP3, mediante CRISPR-Cas9, se ha demostrado que la curcumina, un polifenol de origen natural, y la indometacina, un antiinflamatorio no esteroideo, son eficaces inhibidores de la actividad de MRP4. Como consecuencia, la curcumina y la indometacina pueden sensibilizar las células AGS al efecto citostático de fármacos antitumorales que son expulsados por esta bomba.

CONCLUSIÓN SEXTA:

El estudio de la relación entre el silenciamiento de supresores tumorales mediante CRISPR-Cas9, los cambios que se producen en el resistoma y su impacto en la quimiorresistencia ha revelado que la pérdida de expresión de *TP53* y *PTEN*, pero no la de *ARID1A*, reduce la respuesta de las células de ACG a fármacos antitumorales utilizados en el tratamiento del cáncer gástrico, lo que no se debe a cambios en la expresión de proteínas ABC pero si de los genes *UGT1A*, implicado en el metabolismo de fármacos, y *CD44*, relacionado con un fenotipo de mayor malignidad.

6. Bibliografía

Aarnio, M., Sankila, R., Pukkala, E., Salovaara, R., Aaltonen, L. A., et al. (1999), 'Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes', *Int J Cancer*, 81 (2), 214-8.

Abe, A., Minaguchi, T., Ochi, H., Onuki, M., Okada, S., et al. (2013), 'PIK3CA overexpression is a possible prognostic factor for favorable survival in ovarian clear cell carcinoma', *Hum Pathol*, 44 (2), 199-207.

Abe, H., Maeda, D., Hino, R., Otake, Y., Isogai, M., et al. (2012), 'ARID1A expression loss in gastric cancer: pathway-dependent roles with and without Epstein-Barr virus infection and microsatellite instability', *Virchows Arch*, 461 (4), 367-77.

Abnet, C. C., Freedman, N. D., Kamangar, F., Leitzmann, M. F., Hollenbeck, A. R., et al. (2009), 'Non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of gastric and oesophageal adenocarcinomas: results from a cohort study and a meta-analysis', *Br J Cancer*, 100 (3), 551-7.

Aggarwal, B. B., Kumar, A., and Bharti, A. C. (2003), 'Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies', *Anticancer Res*, 23 (1A), 363-98.

Akter, H., Park, M., Kwon, O. S., Song, E. J., Park, W. S., et al. (2015), 'Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by neuropeptides promotes cell invasion and migration through ERK pathway in gastric cancer', *Tumour Biol*, 36 (8), 6053-62.

Akyala, A. I. and Peppelenbosch, M. P. (2018), 'Gastric cancer and Hedgehog signaling pathway: emerging new paradigms', *Genes Cancer*, 9 (1-2), 1-10.

Al-Abdulla, R., Perez-Silva, L., Lozano, E., Macias, R. I. R., Herraez, E., et al. (2020), 'Sensitizing gastric adenocarcinoma to chemotherapy by pharmacological manipulation of drug transporters', *Biochem Pharmacol*, 171, 113682.

Al-Batran, S. E., Homann, N., Pauligk, C., Goetze, T. O., Meiler, J., et al. (2019), 'Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): a randomised, phase 2/3 trial', *Lancet*, 393 (10184), 1948-57.

Albert, Clive (1995), 'Clinical aspects of gastric cancer', *Gastrointestinal cancer: biology, diagnosis and therapy*. Philadelphia: Lippincott Raven, 197-216.

Alexandrow, M. G., Song, L. J., Altior, S., Gray, J., Haura, E. B., et al. (2012), 'Curcumin: a novel Stat3 pathway inhibitor for chemoprevention of lung cancer', *Eur J Cancer Prev*, 21 (5), 407-12.

Anderson, L. A., Tavilla, A., Brenner, H., Luttmann, S., Navarro, C., et al. (2015), 'Survival for oesophageal, stomach and small intestine cancers in Europe 1999-2007: Results from EUROCARE-5', *Eur J Cancer*, 51 (15), 2144-57.

Anonymous (2002), 'Curcumin (Curcuma, Turmeric) and Cancer (PDQ(R)): Health Professional Version', PDQ Cancer Information Summaries (Bethesda (MD)).

Ashrafizadeh, M., Najafi, M., Ang, H. L., Moghadam, E. R., Mahabady, M. K., et al. (2020), 'PTEN, a Barrier for Proliferation and Metastasis of Gastric Cancer Cells: From Molecular Pathways to Targeting and Regulation', *Biomedicines*, 8 (8).

Bang, Y. J., Van Cutsem, E., Feyereislova, A., Chung, H. C., Shen, L., et al. (2010), 'Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial', *Lancet*, 376 (9742), 687-97.

Barranco, S. C., Townsend, C. M., Jr., Casartelli, C., Macik, B. G., Burger, N. L., et al. (1983), 'Establishment and characterization of an in vitro model system for human adenocarcinoma of the stomach', *Cancer Res*, 43 (4), 1703-9.

Bartchewsky, W., Jr., Martini, M. R., Squassoni, A. C., Alvarez, M. C., Ladeira, M. S., et al. (2010), 'Effects of Helicobacter pylori infection on the expressions of Bax and Bcl-2 in patients with chronic gastritis and gastric cancer', *Dig Dis Sci*, 55 (1), 111-6.

Bataille, F., Rummele, P., Dietmaier, W., Gaag, D., Klebl, F., et al. (2003), 'Alterations in p53 predict response to preoperative high dose chemotherapy in patients with gastric cancer', *Mol Pathol*, 56 (5), 286-92.

Bauer, L., Takacs, A., Slotta-Huspenina, J., Langer, R., Becker, K., et al. (2015), 'Clinical Significance of NOTCH1 and NOTCH2 Expression in Gastric Carcinomas: An Immunohistochemical Study', *Front Oncol*, 5, 94.

Bazzichetto, C., Conciatori, F., Pallocca, M., Falcone, I., Facciulli, M., et al. (2019), 'PTEN as a Prognostic/Predictive Biomarker in Cancer: An Unfulfilled Promise?', *Cancers (Basel)*, 11 (4).

Beretta, G. L., Cassinelli, G., Pennati, M., Zuco, V., and Gatti, L. (2017), 'Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: The dual role of tyrosine kinase inhibitors as multitargeting agents', *Eur J Med Chem*, 142, 271-89.

Bhattacharya, B., Low, S. H., Soh, C., Kamal Mustapa, N., Beloueche-Babari, M., et al. (2014), 'Increased drug resistance is associated with reduced glucose levels and an enhanced glycolysis phenotype', *Br J Pharmacol*, 171 (13), 3255-67.

Boonstra, R., Timmer-Bosscha, H., van Echten-Arends, J., van der Kolk, D. M., van den Berg, A., et al. (2004), 'Mitoxantrone resistance in a small cell lung cancer cell line is associated with ABCA2 upregulation', *Br J Cancer*, 90 (12), 2411-7.

Borst, P., de Wolf, C., and van de Wetering, K. (2007), 'Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5', *Pflugers Arch*, 453 (5), 661-73.

Bozkaya, Y., Ozdemir, N. Y., Sezer, S., Kostek, O., Demirci, N. S., et al. (2018), 'Is serum survivin expression a predictive biomarker in locally advanced gastric cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy?', *Cancer Biomark*, 22 (1), 143-49.

Briz, O., Perez-Silva, L., Al-Abdulla, R., Abete, L., Reviejo, M., et al. (2019), 'What "The Cancer Genome Atlas" database tells us about the role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in chemoresistance to anticancer drugs', *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 15 (7), 577-93.

Bunz, F., Hwang, P. M., Torrance, C., Waldman, T., Zhang, Y., et al. (1999), 'Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents', *J Clin Invest*, 104 (3), 263-9.

Byun, J. Y., Huang, K., Lee, J. S., Huang, W., Hu, L., et al. (2022), 'Targeting HIF-1alpha/NOTCH1 pathway eliminates CD44(+) cancer stem-like cell phenotypes, malignancy, and resistance to therapy in head and neck squamous cell carcinoma', *Oncogene*, 41 (9), 1352-63.

Cai, H., Jing, C., Chang, X., Ding, D., Han, T., et al. (2019), 'Mutational landscape of gastric cancer and clinical application of genomic profiling based on target next-generation sequencing', *J Transl Med*, 17 (1), 189.

Candidus, S., Bischoff, P., Becker, K. F., and Hofler, H. (1996), 'No evidence for mutations in the alpha- and beta-catenin genes in human gastric and breast carcinomas', *Cancer Res*, 56 (1), 49-52.

Carroll, R. E., Benya, R. V., Turgeon, D. K., Vareed, S., Neuman, M., et al. (2011), 'Phase IIa clinical trial of curcumin for the prevention of colorectal neoplasia', *Cancer Prev Res (Phila)*, 4 (3), 354-64.

Cascinu, S., Graziano, F., Del Ferro, E., Staccioli, M. P., Ligi, M., et al. (1998), 'Expression of p53 protein and resistance to preoperative chemotherapy in locally advanced gastric carcinoma', *Cancer*, 83 (9), 1917-22.

Catalano, V., Bisonni, R., Graziano, F., Giordani, P., Alessandroni, P., et al. (2013), 'A phase II study of modified FOLFOX as first-line chemotherapy for metastatic gastric cancer in elderly patients with associated diseases', *Gastric Cancer*, 16 (3), 411-9.

Cavallaro, U. and Christofori, G. (2004), 'Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer', *Nat Rev Cancer*, 4 (2), 118-32.

Cengiz, B., Yumrutas, O., Bozgeyik, E., Borazan, E., Igci, Y. Z., et al. (2015), 'Differential expression of the UGT1A family of genes in stomach cancer tissues', *Tumour Biol*, 36 (8), 5831-7.

Clements, W. M., Wang, J., Sarnaik, A., Kim, O. J., MacDonald, J., et al. (2002), 'beta-Catenin mutation is a frequent cause of Wnt pathway activation in gastric cancer', *Cancer Res*, 62 (12), 3503-6.

Clodfelter, J. E., M, B. Gentry, and Drotschmann, K. (2005), 'MSH2 missense mutations alter cisplatin cytotoxicity and promote cisplatin-induced genome instability', *Nucleic Acids Res*, 33 (10), 3323-30.

Correa, P. and Piazuelo, M. B. (2012), 'The gastric precancerous cascade', *J Dig Dis*, 13 (1), 2-9.

Correa, P., Piazuelo, M. B., and Camargo, M. C. (2006), 'Etiopathogenesis of gastric cancer', *Scand J Surg*, 95 (4), 218-24.

Corso, G., Marrelli, D., Pascale, V., Vindigni, C., and Roviello, F. (2012), 'Frequency of CDH1 germline mutations in gastric carcinoma coming from high- and low-risk areas: metanalysis and systematic review of the literature', *BMC Cancer*, 12, 8.

Crommentuyn, K. M., Schellens, J. H., van den Berg, J. D., and Beijnen, J. H. (1998), 'In-vitro metabolism of anti-cancer drugs, methods and applications: paclitaxel, docetaxel, tamoxifen and ifosfamide', *Cancer Treat Rev*, 24 (5), 345-66.

Cunningham, D., Starling, N., Rao, S., Iveson, T., Nicolson, M., et al. (2008), 'Capecitabine and oxaliplatin for advanced esophagogastric cancer', *N Engl J Med*, 358 (1), 36-46.

Cunningham, D., Allum, W. H., Stenning, S. P., Thompson, J. N., Van de Velde, C. J., et al. (2006), 'Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer', *N Engl J Med*, 355 (1), 11-20.

Chapuy, B., Koch, R., Radunski, U., Corsham, S., Cheong, N., et al. (2008), 'Intracellular ABC transporter A3 confers multidrug resistance in leukemia cells by lysosomal drug sequestration', *Leukemia*, 22 (8), 1576-86.

Chen, C. C., Chen, L. T., Tsou, T. C., Pan, W. Y., Kuo, C. C., et al. (2007), 'Combined modalities of resistance in an oxaliplatin-resistant human gastric cancer cell line with enhanced sensitivity to 5-fluorouracil', *Br J Cancer*, 97 (3), 334-44.

Chen, E., Liu, N., Zhao, Y., Tang, M., Ou, L., et al. (2022), 'Panobinostat reverses HepaCAM gene expression and suppresses proliferation by increasing histone acetylation in prostate cancer', *Gene*, 808, 145977.

Chen, J. D., Kearns, S., Porter, T., Richards, F. M., Maher, E. R., et al. (2001), 'MET mutation and familial gastric cancer', *J Med Genet*, 38 (8), E26.

Chen, M., Huang, S. L., Zhang, X. Q., Zhang, B., Zhu, H., et al. (2012), 'Reversal effects of pantoprazole on multidrug resistance in human gastric adenocarcinoma cells by down-regulating the V-ATPases/mTOR/HIF-1alpha/P-gp and MRP1 signaling pathway in vitro and in vivo', *J Cell Biochem*, 113 (7), 2474-87.

Chen, S. F., Zhang, Z. Y., and Zhang, J. L. (2015), 'Meloxicam increases intracellular accumulation of doxorubicin via downregulation of multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) in A549 cells', *Genet Mol Res*, 14 (4), 14548-60.

Chen, Z., Shi, T., Zhang, L., Zhu, P., Deng, M., et al. (2016), 'Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade', *Cancer Lett*, 370 (1), 153-64.

Cheng, A. L., Hsu, C. H., Lin, J. K., Hsu, M. M., Ho, Y. F., et al. (2001), 'Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions', *Anticancer Res*, 21 (4B), 2895-900.

Cheng, R., Yong, H., Xia, Y., Xie, Q., Gao, G., et al. (2017), 'Chemotherapy regimen based on sorafenib combined with 5-FU on HIF-1alpha and VEGF expression and survival in advanced gastric cancer patients', *Oncol Lett*, 13 (4), 2703-07.

Chia, N. Y. and Tan, P. (2016), 'Molecular classification of gastric cancer', *Ann Oncol*, 27 (5), 763-9.

Chiba, T., Marusawa, H., Seno, H., and Watanabe, N. (2008), 'Mechanism for gastric cancer development by Helicobacter pylori infection', *J Gastroenterol Hepatol*, 23 (8 Pt 1), 1175-81.

Chow, W. H., Blot, W. J., Vaughan, T. L., Risch, H. A., Gammon, M. D., et al. (1998), 'Body mass index and risk of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia', *J Natl Cancer Inst*, 90 (2), 150-5.

Chun, J. H., Kim, H. K., Kim, E., Kim, I. H., Kim, J. H., et al. (2004), 'Increased expression of metallothionein is associated with irinotecan resistance in gastric cancer', *Cancer Res*, 64 (14), 4703-6.

Dai, Q., Zhang, T., and Li, C. (2020), 'LncRNA MALAT1 Regulates the Cell Proliferation and Cisplatin Resistance in Gastric Cancer via PI3K/AKT Pathway', *Cancer Manag Res*, 12, 1929-39.

Daigo, S., Takahashi, Y., Fujieda, M., Ariyoshi, N., Yamazaki, H., et al. (2002), 'A novel mutant allele of the CYP2A6 gene (CYP2A6*11) found in a cancer patient who showed poor metabolic phenotype towards tegafur', *Pharmacogenetics*, 12 (4), 299-306.

Danza, K., Silvestris, N., Simone, G., Signorile, M., Saragoni, L., et al. (2016), 'Role of miR-27a, miR-181a and miR-20b in gastric cancer hypoxia-induced chemoresistance', *Cancer Biol Ther*, 17 (4), 400-6.

De Dosso, S., Zanellato, E., Nucifora, M., Boldorini, R., Sonzogni, A., et al. (2013), 'ERCC1 predicts outcome in patients with gastric cancer treated with adjuvant cisplatin-based chemotherapy', *Cancer Chemother Pharmacol*, 72 (1), 159-65.

de Guillebon, E., Roussille, P., Frouin, E., and Tougeron, D. (2015), 'Anti program death-1/anti program death-ligand 1 in digestive cancers', *World J Gastrointest Oncol*, 7 (8), 95-101.

de Oliveira, J., Felipe, A. V., Neto, R. A., Oshima, C. T., de Souza Silva, M., et al. (2014), 'Association between ABCB1 immunohistochemical expression and overall survival in gastric cancer patients', *Asian Pac J Cancer Prev*, 15 (16), 6935-8.

Deng, W., Hao, Q., Vadgama, J., and Wu, Y. (2021), 'Wild-Type TP53 Predicts Poor Prognosis in Patients with Gastric Cancer', *J Cancer Sci Clin Ther*, 5 (1), 134-53.

Diasio, R. B. and Harris, B. E. (1989), 'Clinical pharmacology of 5-fluorouracil', *Clin Pharmacokinet*, 16 (4), 215-37.

Diaz-Serrano, A., Angulo, B., Dominguez, C., Pazo-Cid, R., Salud, A., et al. (2018), 'Genomic Profiling of HER2-Positive Gastric Cancer: PI3K/Akt/mTOR Pathway as Predictor of Outcomes in HER2-Positive Advanced Gastric Cancer Treated with Trastuzumab', *Oncologist*, 23 (9), 1092-102.

Dicken, B. J., Bigam, D. L., Cass, C., Mackey, J. R., Joy, A. A., et al. (2005), 'Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions', *Ann Surg*, 241 (1), 27-39.

Downing, K. H. (2000), 'Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16, 89-111.

Duffy, C. P., Elliott, C. J., O'Connor, R. A., Heenan, M. M., Coyle, S., et al. (1998), 'Enhancement of chemotherapeutic drug toxicity to human tumour cells in vitro by a subset of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)', *Eur J Cancer*, 34 (8), 1250-9.

Dungal, N. (1961), 'The special problem of stomach cancer in Iceland, with particular reference to dietary factors', *JAMA*, 178, 789-98.

El-Sheikh, A. A., van den Heuvel, J. J., Koenderink, J. B., and Russel, F. G. (2007), 'Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with multidrug resistance protein (MRP) 2/ABCC2- and MRP4/ABCC4-mediated methotrexate transport', *J Pharmacol Exp Ther*, 320 (1), 229-35.

Espinosa-Escudero, RA (2018), 'Obtención de líneas celulares que expresan transportadores mrp para el estudio de la resistencia a fármacos antitumorales', (University of Salamanca).

Esteva, F. J., Guo, H., Zhang, S., Santa-Maria, C., Stone, S., et al. (2010), 'PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer', *Am J Pathol*, 177 (4), 1647-56.

Farhang Ghahremani, M., Goossens, S., Nittner, D., Bisteau, X., Bartunkova, S., et al. (2013), 'p53 promotes VEGF expression and angiogenesis in the absence of an intact p21-Rb pathway', *Cell Death Differ*, 20 (7), 888-97.

Farrow, D. C., Vaughan, T. L., Sweeney, C., Gammon, M. D., Chow, W. H., et al. (2000), 'Gastroesophageal reflux disease, use of H2 receptor antagonists, and risk of esophageal and gastric cancer', *Cancer Causes Control*, 11 (3), 231-8.

Fassan, M., Mastracci, L., Grillo, F., Zagonel, V., Bruno, S., et al. (2012), 'Early HER2 dysregulation in gastric and oesophageal carcinogenesis', *Histopathology*, 61 (5), 769-76.

Fedier, A., Steiner, R. A., Schwarz, V. A., Lenherr, L., Haller, U., et al. (2003), 'The effect of loss of Brca1 on the sensitivity to anticancer agents in p53-deficient cells', *Int J Oncol*, 22 (5), 1169-73.

Felipe, A. V., Oliveira, J., Moraes, A. A., Franca, J. P., Silva, T. D., et al. (2018), 'Reversal of Multidrug Resistance in an Epirubicin-Resistant Gastric Cancer Cell Subline', *Asian Pac J Cancer Prev*, 19 (5), 1237-42.

Feng, G. J., Cotta, W., Wei, X. Q., Poetz, O., Evans, R., et al. (2012), 'Conditional disruption of Axin1 leads to development of liver tumors in mice', *Gastroenterology*, 143 (6), 1650-9.

Fenoglio-Preiser, C, Carneiro, F, Correa, P, Guilford, P, Lambert, R, et al. (2000), 'Gastric carcinoma', *Pathology and genetics of tumours of the digestive system*, 1, 35-52.

Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., et al. (2010), 'Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008', *Int J Cancer*, 127 (12), 2893-917.

Firoozinia, M., Zareian Jahromi, M., Moghadamtousi, S. Z., Nikzad, S., and Abdul Kadir, H. (2014), 'PIK3CA gene amplification and PI3K p110alpha protein expression in breast carcinoma', *Int J Med Sci*, 11 (6), 620-5.

Fletcher, J. I., Haber, M., Henderson, M. J., and Norris, M. D. (2010), 'ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps', *Nat Rev Cancer*, 10 (2), 147-56.

Frandsen, P. A. and Christoffersen, H. (1983), '[Stress fractures at the distal end of the fibula]', *Ugeskr Laeger*, 145 (13), 993-4.

Frattini, M., Saletti, P., Romagnani, E., Martin, V., Molinari, F., et al. (2007), 'PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients', *Br J Cancer*, 97 (8), 1139-45.

Fresno Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., et al. (2004), 'PI3K/Akt signalling pathway and cancer', *Cancer Treat Rev*, 30 (2), 193-204.

Fruman, D. A. and Rommel, C. (2014), 'PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities', *Nat Rev Drug Discov*, 13 (2), 140-56.

Fu, L., Bu, L., Yasuda, T., Koiwa, M., Akiyama, T., et al. (2020), 'Gastric Cancer Stem Cells: Current Insights into the Immune Microenvironment and Therapeutic Targets', *Biomedicines*, 8 (1).

Fu, Z. H., Liu, S. Q., Qin, M. B., Huang, J. A., Xu, C. Y., et al. (2018), 'NIK and IKKbetabinding protein contributes to gastric cancer chemoresistance by promoting epithelialmesenchymal transition through the NFkappaB signaling pathway', *Oncol Rep*, 39 (6), 2721-30.

Furmanski, B. D., Hu, S., Fujita, K. I., Li, L., Gibson, A. A., et al. (2013), 'Contribution of ABCC4-mediated gastric transport to the absorption and efficacy of dasatinib', *Clin Cancer Res*, 19 (16), 4359-70.

Gao, X., Zheng, X., Zhang, Y., Dong, L., Sun, L., et al. (2021), 'Deficient or R273H and R248W Mutations of p53 Promote Chemoresistance to 5-FU via TCF21/CD44 Axis-Mediated Enhanced Stemness in Colorectal Carcinoma', *Front Cell Dev Biol*, 9, 788331.

Garcia-Esquinas, E., Perez-Gomez, B., Pollan, M., Boldo, E., Fernandez-Navarro, P., et al. (2009), 'Gastric cancer mortality trends in Spain, 1976-2005, differences by autonomous region and sex', *BMC Cancer*, 9, 346.

Gavrilescu, L. C. and Van Etten, R. A. (2007), 'Production of replication-defective retrovirus by transient transfection of 293T cells', *J Virol Exp*, (10), 550.

Ge, S., Xia, X., Ding, C., Zhen, B., Zhou, Q., et al. (2018), 'A proteomic landscape of diffuse-type gastric cancer', *Nat Commun*, 9 (1), 1012.

Ge, X., Liu, X., Lin, F., Li, P., Liu, K., et al. (2016), 'MicroRNA-421 regulated by HIF-1alpha promotes metastasis, inhibits apoptosis, and induces cisplatin resistance by targeting E-cadherin and caspase-3 in gastric cancer', *Oncotarget*, 7 (17), 24466-82.

Geng, M., Wang, L., Chen, X., Cao, R., and Li, P. (2013), 'The association between chemosensitivity and Pgp, GST-pi and Topo II expression in gastric cancer', *Diagn Pathol*, 8, 198.

Ghafouri-Fard, S., Vafaee, R., Shoorei, H., and Taheri, M. (2020), 'MicroRNAs in gastric cancer: Biomarkers and therapeutic targets', *Gene*, 757, 144937.

Glimelius, B., Ekstrom, K., Hoffman, K., Graf, W., Sjoden, P. O., et al. (1997), 'Randomized comparison between chemotherapy plus best supportive care with best supportive care in advanced gastric cancer', *Ann Oncol*, 8 (2), 163-8.

GLOBOCAN 'Global Cancer Observatory', <<http://gco.iarc.fr/>>.

Gollapudi, S., Kim, C. H., Tran, B. N., Sangha, S., and Gupta, S. (1997), 'Probenecid reverses multidrug resistance in multidrug resistance-associated protein-overexpressing HL60/AR and H69/AR cells but not in P-glycoprotein-overexpressing HL60/Tax and P388/ADR cells', *Cancer Chemother Pharmacol*, 40 (2), 150-8.

Gong, C., Mera, R., Bravo, J. C., Ruiz, B., Diaz-Escamilla, R., et al. (1999), 'KRAS mutations predict progression of preneoplastic gastric lesions', *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 8 (2), 167-71.

Gore, R. M. (1997), 'Gastric cancer. Clinical and pathologic features', *Radiol Clin North Am*, 35 (2), 295-310.

Goto, S., Iida, T., Cho, S., Oka, M., Kohno, S., et al. (1999), 'Overexpression of glutathione S-transferase pi enhances the adduct formation of cisplatin with glutathione in human cancer cells', *Free Radic Res*, 31 (6), 549-58.

Graziano, F., Fischer, N. W., Bagaloni, I., Di Bartolomeo, M., Lonardi, S., et al. (2020), 'TP53 Mutation Analysis in Gastric Cancer and Clinical Outcomes of Patients with Metastatic Disease Treated with Ramucirumab/Paclitaxel or Standard Chemotherapy', *Cancers (Basel)*, 12 (8).

Gui, L., Zhang, S., Xu, Y., Zhang, H., Zhu, Y., et al. (2021), 'UBE2S promotes cell chemoresistance through PTEN-AKT signaling in hepatocellular carcinoma', *Cell Death Discov*, 7 (1), 357.

Gupta, E., Wang, X., Ramirez, J., and Ratain, M. J. (1997), 'Modulation of glucuronidation of SN-38, the active metabolite of irinotecan, by valproic acid and phenobarbital', *Cancer Chemother Pharmacol*, 39 (5), 440-4.

Hagmann, W., Jesnowski, R., Faissner, R., Guo, C., and Lohr, J. M. (2009), 'ATP-binding cassette C transporters in human pancreatic carcinoma cell lines. Upregulation in 5-fluorouracil-resistant cells', *Pancreatology*, 9 (1-2), 136-44.

Ham, I. H., Oh, H. J., Jin, H., Bae, C. A., Jeon, S. M., et al. (2019), 'Targeting interleukin-6 as a strategy to overcome stroma-induced resistance to chemotherapy in gastric cancer', *Mol Cancer*, 18 (1), 68.

Han, M., Lv, Q., Tang, X. J., Hu, Y. L., Xu, D. H., et al. (2012), 'Overcoming drug resistance of MCF-7/ADR cells by altering intracellular distribution of doxorubicin via MVP knockdown with a novel siRNA polyamidoamine-hyaluronic acid complex', *J Control Release*, 163 (2), 136-44.

Han, M. E., Jeon, T. Y., Hwang, S. H., Lee, Y. S., Kim, H. J., et al. (2011), 'Cancer spheres from gastric cancer patients provide an ideal model system for cancer stem cell research', *Cell Mol Life Sci*, 68 (21), 3589-605.

Han, R., Xiong, J., Xiao, R., Altaf, E., Wang, J., et al. (2013a), 'Activation of beta-catenin signaling is critical for doxorubicin-induced epithelial-mesenchymal transition in BGC-823 gastric cancer cell line', *Tumour Biol*, 34 (1), 277-84.

Han, Y., Cai, H., Ma, L., Ding, Y., Tan, X., et al. (2013b), 'Expression of orphan nuclear receptor NR4A2 in gastric cancer cells confers chemoresistance and predicts an unfavorable postoperative survival of gastric cancer patients with chemotherapy', *Cancer*, 119 (19), 3436-45.

Hashimoto, T., Kurokawa, Y., Takahashi, T., Miyazaki, Y., Tanaka, K., et al. (2019), 'Predictive value of MLH1 and PD-L1 expression for prognosis and response to preoperative chemotherapy in gastric cancer', *Gastric Cancer*, 22 (4), 785-92.

He, Z., Hu, B., Tang, L., Zheng, S., Sun, Y., et al. (2015), 'The overexpression of MRP4 is related to multidrug resistance in osteosarcoma cells', *J Cancer Res Ther*, 11 (1), 18-23.

He, Z., Xiao, X., Li, S., Guo, Y., Huang, Q., et al. (2017), 'Oridonin induces apoptosis and reverses drug resistance in cisplatin resistant human gastric cancer cells', *Oncol Lett*, 14 (2), 2499-504.

Helget, V. M., Smith, P. W., Safranek, T. J., and Newlon, C. M. (1992), 'Advances in hospital infection control programs', *Nebr Med J*, 77 (5), 105-8.

- Hipfner, D. R., Deeley, R. G., and Cole, S. P. (1999), 'Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1', *Biochim Biophys Acta*, 1461 (2), 359-76.
- Hofmann, M., Stoss, O., Shi, D., Buttner, R., van de Vijver, M., et al. (2008), 'Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study', *Histopathology*, 52 (7), 797-805.
- Holzer, A. K., Varki, N. M., Le, Q. T., Gibson, M. A., Naredi, P., et al. (2006), 'Expression of the human copper influx transporter 1 in normal and malignant human tissues', *J Histochem Cytochem*, 54 (9), 1041-9.
- Hopfner, K. P. (2016), 'Invited review: Architectures and mechanisms of ATP binding cassette proteins', *Biopolymers*, 105 (8), 492-504.
- Hopper-Borge, E., Chen, Z. S., Shchaveleva, I., Belinsky, M. G., and Kruh, G. D. (2004), 'Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel', *Cancer Res*, 64 (14), 4927-30.
- Hopper-Borge, E., Xu, X., Shen, T., Shi, Z., Chen, Z. S., et al. (2009), 'Human multidrug resistance protein 7 (ABCC10) is a resistance factor for nucleoside analogues and epothilone B', *Cancer Res*, 69 (1), 178-84.
- Hopper, E., Belinsky, M. G., Zeng, H., Tosolini, A., Testa, J. R., et al. (2001), 'Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily', *Cancer Lett*, 162 (2), 181-91.
- Hossain, M., Bhalla, K., and Stillman, B. (2021), 'Multiple, short protein binding motifs in ORC1 and CDC6 control the initiation of DNA replication', *Mol Cell*, 81 (9), 1951-69 e6.
- Hu, M., Zhu, S., Xiong, S., Xue, X., and Zhou, X. (2019), 'MicroRNAs and the PTEN/PI3K/Akt pathway in gastric cancer (Review)', *Oncol Rep*, 41 (3), 1439-54.
- Huang, C., Yuan, W., Lai, C., Zhong, S., Yang, C., et al. (2020a), 'EphA2-to-YAP pathway drives gastric cancer growth and therapy resistance', *Int J Cancer*, 146 (7), 1937-49.
- Huang, H., Li, J., Shen, J., Lin, L., Wu, X., et al. (2020b), 'Increased ABCC4 Expression Induced by ERRalpha Leads to Docetaxel Resistance via Efflux of Docetaxel in Prostate Cancer', *Front Oncol*, 10, 1474.
- Huang, W., Wan, C., Luo, Q., and Huang, Z. (2014), 'Genistein-inhibited cancer stem cell-like properties and reduced chemoresistance of gastric cancer', *Int J Mol Sci*, 15 (3), 3432-43.

Huang, X. Z., Chen, Y., Wu, J., Zhang, X., Wu, C. C., et al. (2017), 'Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs use reduce gastric cancer risk: A dose-response meta-analysis', *Oncotarget*, 8 (3), 4781-95.

Huang, Y. S., Xue, Z., and Zhang, H. (2015), 'Sorafenib reverses resistance of gastric cancer to treatment by cisplatin through down-regulating MDR1 expression', *Med Oncol*, 32 (2), 470.

Huang, Z. H., Hua, D., Li, L. H., and Zhu, J. D. (2008), 'Prognostic role of p53 codon 72 polymorphism in gastric cancer patients treated with fluorouracil-based adjuvant chemotherapy', *J Cancer Res Clin Oncol*, 134 (10), 1129-34.

Ianari, A., Natale, T., Calo, E., Ferretti, E., Alesse, E., et al. (2009), 'Proapoptotic function of the retinoblastoma tumor suppressor protein', *Cancer Cell*, 15 (3), 184-94.

Ibarrola-Villava, M., Llorca-Cardenosa, M. J., Tarazona, N., Mongort, C., Fleitas, T., et al. (2015), 'Deregulation of ARID1A, CDH1, cMET and PIK3CA and target-related microRNA expression in gastric cancer', *Oncotarget*, 6 (29), 26935-45.

Ikeda, K., Yoshisue, K., Matsushima, E., Nagayama, S., Kobayashi, K., et al. (2000), 'Bioactivation of tegafur to 5-fluorouracil is catalyzed by cytochrome P-450 2A6 in human liver microsomes in vitro', *Clin Cancer Res*, 6 (11), 4409-15.

Inada, R., Sekine, S., Taniguchi, H., Tsuda, H., Katai, H., et al. (2015), 'ARID1A expression in gastric adenocarcinoma: clinicopathological significance and correlation with DNA mismatch repair status', *World J Gastroenterol*, 21 (7), 2159-68.

Institute, National Cancer 'SEER Stat Fact Sheets: Stomach Cancer', <<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/stomach.html>>.

Jardim, D. L., de Melo Gagliato, D., Falchook, G. S., Janku, F., Zinner, R., et al. (2014), 'MET aberrations and c-MET inhibitors in patients with gastric and esophageal cancers in a phase I unit', *Oncotarget*, 5 (7), 1837-45.

Jeong, J. H., Park, S. R., Ahn, Y., Ryu, M. H., Ryoo, B. Y., et al. (2017), 'Associations between CYP2A6 polymorphisms and outcomes of adjuvant S-1 chemotherapy in patients with curatively resected gastric cancer', *Gastric Cancer*, 20 (1), 146-55.

Jeong, S. H., Han, J. H., Kim, J. H., Ahn, M. S., Hwang, Y. H., et al. (2011), 'Bax predicts outcome in gastric cancer patients treated with 5-fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin palliative chemotherapy', *Dig Dis Sci*, 56 (1), 131-8.

Ji, D., Deeds, S. L., and Weinstein, E. J. (2007), 'A screen of shRNAs targeting tumor suppressor genes to identify factors involved in A549 paclitaxel sensitivity', *Oncol Rep*, 18 (6), 1499-505.

Ji, R., Zhang, B., Zhang, X., Xue, J., Yuan, X., et al. (2015), 'Exosomes derived from human mesenchymal stem cells confer drug resistance in gastric cancer', *Cell Cycle*, 14 (15), 2473-83.

Kang, M. J., Ryu, B. K., Lee, M. G., Han, J., Lee, J. H., et al. (2008), 'NF-kappaB activates transcription of the RNA-binding factor HuR, via PI3K-AKT signaling, to promote gastric tumorigenesis', *Gastroenterology*, 135 (6), 2030-42, 42 e1-3.

Kapoor, I., Bodo, J., Hill, B. T., and Almasan, A. (2021), 'Cooperative miRNA-dependent PTEN regulation drives resistance to BTK inhibition in B-cell lymphoid malignancies', *Cell Death Dis*, 12 (11), 1061.

Karimi, P., Islami, F., Anandasabapathy, S., Freedman, N. D., and Kamangar, F. (2014), 'Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention', *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 23 (5), 700-13.

Karin, M. and Lin, A. (2002), 'NF-kappaB at the crossroads of life and death', *Nat Immunol*, 3 (3), 221-7.

Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R., and Li, Z. W. (2002), 'NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit', *Nat Rev Cancer*, 2 (4), 301-10.

Karpeh, M. S., Jr. and Brennan, M. F. (1998), 'Gastric carcinoma', *Ann Surg Oncol*, 5 (7), 650-6.

Kawase, A., Yamamoto, T., Egashira, S., and Iwaki, M. (2016), 'Stereoselective Inhibition of Methotrexate Excretion by Glucuronides of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs via Multidrug Resistance Proteins 2 and 4', *J Pharmacol Exp Ther*, 356 (2), 366-74.

Kawashiro, T., Yamashita, K., Zhao, X. J., Koyama, E., Tani, M., et al. (1998), 'A study on the metabolism of etoposide and possible interactions with antitumor or supporting agents by human liver microsomes', *J Pharmacol Exp Ther*, 286 (3), 1294-300.

Kelley, J. R. and Duggan, J. M. (2003), 'Gastric cancer epidemiology and risk factors', *J Clin Epidemiol*, 56 (1), 1-9.

Keppler, D., Cui, Y., Konig, J., Leier, I., and Nies, A. (1999), 'Export pumps for anionic conjugates encoded by MRP genes', *Adv Enzyme Regul*, 39, 237-46.

Kim, C. W., Lu, J. N., Go, S. I., Jung, J. H., Yi, S. M., et al. (2013), 'p53 restoration can overcome cisplatin resistance through inhibition of Akt as well as induction of Bax', *Int J Oncol*, 43 (5), 1495-502.

Kim, H., Choi, H., and Lee, S. K. (2015), 'Epstein-Barr virus miR-BART20-5p regulates cell proliferation and apoptosis by targeting BAD', *Cancer Lett*, 356 (2 Pt B), 733-42.

Kim, H. S., Hwang, I. G., Min, H. Y., Bang, Y. J., and Kim, W. H. (2019a), 'Clinical significance of BRCA1 and BRCA2 mRNA and protein expression in patients with sporadic gastric cancer', *Oncol Lett*, 17 (5), 4383-92.

Kim, J. G., Sohn, S. K., Chae, Y. S., Song, H. S., Kwon, K. Y., et al. (2009), 'TP53 codon 72 polymorphism associated with prognosis in patients with advanced gastric cancer treated with paclitaxel and cisplatin', *Cancer Chemother Pharmacol*, 64 (2), 355-60.

Kim, J. H., Takahashi, T., Chiba, I., Park, J. G., Birrer, M. J., et al. (1991), 'Occurrence of p53 gene abnormalities in gastric carcinoma tumors and cell lines', *J Natl Cancer Inst*, 83 (13), 938-43.

Kim, M. A., Lee, H. S., Lee, H. E., Jeon, Y. K., Yang, H. K., et al. (2008), 'EGFR in gastric carcinomas: prognostic significance of protein overexpression and high gene copy number', *Histopathology*, 52 (6), 738-46.

Kim, M. H., Zhang, X., Jung, M., Jung, I., Park, H. S., et al. (2019b), 'Immunohistochemistry Biomarkers Predict Survival in Stage II/III Gastric Cancer Patients: From a Prospective Clinical Trial', *Cancer Res Treat*, 51 (2), 819-31.

Kim, Y. B., Ham, I. H., Hur, H., and Lee, D. (2016a), 'Various ARID1A expression patterns and their clinical significance in gastric cancers', *Hum Pathol*, 49, 61-70.

Kim, Y. W., Kim, M. J., Ryu, K. W., Lim, H. S., Lee, J. H., et al. (2016b), 'A phase II study of perioperative S-1 combined with weekly docetaxel in patients with locally advanced gastric carcinoma: clinical outcomes and clinicopathological and pharmacogenetic predictors for survival', *Gastric Cancer*, 19 (2), 586-96.

Kimata, M., Otani, Y., Kubota, T., Igarashi, N., Yokoyama, T., et al. (2002), 'Matrix metalloproteinase inhibitor, marimastat, decreases peritoneal spread of gastric carcinoma in nude mice', *Jpn J Cancer Res*, 93 (7), 834-41.

Kivistö, K. T., Kroemer, H. K., and Eichelbaum, M. (1995), 'The role of human cytochrome P450 enzymes in the metabolism of anticancer agents: implications for drug interactions', *Br J Clin Pharmacol*, 40 (6), 523-30.

Kokubo, Y., Gemma, A., Noro, R., Seike, M., Kataoka, K., et al. (2005), 'Reduction of PTEN protein and loss of epidermal growth factor receptor gene mutation in lung cancer with natural resistance to gefitinib (IRESSA)', *Br J Cancer*, 92 (9), 1711-9.

Kowalski, P., Stein, U., Scheffer, G. L., and Lage, H. (2002), 'Modulation of the atypical multidrug-resistant phenotype by a hammerhead ribozyme directed against the ABC transporter BCRP/MXR/ABCG2', *Cancer Gene Ther*, 9 (7), 579-86.

Kuai, W. X., Wang, Q., Yang, X. Z., Zhao, Y., Yu, R., et al. (2012), 'Interleukin-8 associates with adhesion, migration, invasion and chemosensitivity of human gastric cancer cells', *World J Gastroenterol*, 18 (9), 979-85.

Kubo, T., Kawano, Y., Himuro, N., Sugita, S., Sato, Y., et al. (2016), 'BAK is a predictive and prognostic biomarker for the therapeutic effect of docetaxel treatment in patients with advanced gastric cancer', *Gastric Cancer*, 19 (3), 827-38.

Kurayoshi, M., Oue, N., Yamamoto, H., Kishida, M., Inoue, A., et al. (2006), 'Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion', *Cancer Res*, 66 (21), 10439-48.

Kuroda, H., Kutner, R. H., Bazan, N. G., and Reiser, J. (2009), 'Simplified lentivirus vector production in protein-free media using polyethylenimine-mediated transfection', *J Virol Methods*, 157 (2), 113-21.

Kwon, H. C., Roh, M. S., Oh, S. Y., Kim, S. H., Kim, M. C., et al. (2007), 'Prognostic value of expression of ERCC1, thymidylate synthase, and glutathione S-transferase P1 for 5-fluorouracil/oxaliplatin chemotherapy in advanced gastric cancer', *Ann Oncol*, 18 (3), 504-9.

Kwon, O. H., Kim, J. H., Kim, S. Y., and Kim, Y. S. (2014), 'TWEAK/Fn14 signaling mediates gastric cancer cell resistance to 5-fluorouracil via NF-kappaB activation', *Int J Oncol*, 44 (2), 583-90.

Lauren, P. (1965), 'The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification', *Acta Pathol Microbiol Scand*, 64, 31-49.

Lazar, D., Taban, S., Dema, A., Cornianu, M., Goldis, A., et al. (2009), 'Gastric cancer: the correlation between the clinicopathological factors and patients' survival (I)', *Rom J Morphol Embryol*, 50 (1), 41-50.

Lee, J., Jeong, C. K., Hong, S. P., Chong, S. Y., Oh, D., et al. (2005), '[Clinical significance of thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in Korean patients with gastric cancer]', *Korean J Gastroenterol*, 46 (1), 32-8.

Lee, J. L., Kang, Y. K., Kang, H. J., Lee, K. H., Zang, D. Y., et al. (2008), 'A randomised multicentre phase II trial of capecitabine vs S-1 as first-line treatment in elderly patients with metastatic or recurrent unresectable gastric cancer', *Br J Cancer*, 99 (4), 584-90.

Lee, S. Y., Kim, D. W., Lee, H. S., Ihn, M. H., Oh, H. K., et al. (2015), 'Loss of AT-rich interactive domain 1A expression in gastrointestinal malignancies', *Oncology*, 88 (4), 234-40.

Leonhardt, K., Gebhardt, R., Mossner, J., Lutsenko, S., and Huster, D. (2009), 'Functional interactions of Cu-ATPase ATP7B with cisplatin and the role of ATP7B in the resistance of cells to the drug', *J Biol Chem*, 284 (12), 7793-802.

Leung, W. K., Wu, M. S., Kakugawa, Y., Kim, J. J., Yeoh, K. G., et al. (2008), 'Screening for gastric cancer in Asia: current evidence and practice', *Lancet Oncol*, 9 (3), 279-87.

Li, C., Xu, Z. L., Zhao, Z., An, Q., Wang, L., et al. (2017), 'ARID1A gene knockdown promotes neuroblastoma migration and invasion', *Neoplasma*, 64 (3), 367-76.

Li, D. Q., Wang, Z. B., Bai, J., Zhao, J., Wang, Y., et al. (2004), 'Reversal of multidrug resistance in drug-resistant human gastric cancer cell line SGC7901/VCR by antiprogestin drug mifepristone', *World J Gastroenterol*, 10 (12), 1722-5.

Li, M., Gao, M., Xie, X., Zhang, Y., Ning, J., et al. (2019), 'MicroRNA-200c reverses drug resistance of human gastric cancer cells by targeting regulation of the NER-ERCC3/4 pathway', *Oncol Lett*, 18 (1), 145-52.

Li, T., Lu, Y. Y., Zhao, X. D., Guo, H. Q., Liu, C. H., et al. (2014a), 'MicroRNA-296-5p increases proliferation in gastric cancer through repression of Caudal-related homeobox 1', *Oncogene*, 33 (6), 783-93.

Li, V. S., Wong, C. W., Chan, T. L., Chan, A. S., Zhao, W., et al. (2005), 'Mutations of PIK3CA in gastric adenocarcinoma', *BMC Cancer*, 5, 29.

Li, W., Zhang, H., Assaraf, Y. G., Zhao, K., Xu, X., et al. (2016a), 'Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies', *Drug Resist Updat*, 27, 14-29.

Li, W., Fan, J., Hochhauser, D., Banerjee, D., Zielinski, Z., et al. (1995), 'Lack of functional retinoblastoma protein mediates increased resistance to antimetabolites in human sarcoma cell lines', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (22), 10436-40.

Li, Y., Tan, B. B., Fan, L. Q., Zhao, Q., Liu, Y., et al. (2012), 'Heterogeneity of COX-2 and multidrug resistance between primary tumors and regional lymph node metastases of gastric cancer', *Tumori*, 98 (4), 516-22.

Li, Y., Tan, B. B., Zhao, Q., Fan, L. Q., Liu, Y., et al. (2014b), 'Regulatory mechanism of ZNF139 in multi-drug resistance of gastric cancer cells', *Mol Biol Rep*, 41 (6), 3603-10.

Li, Z., Xing, X., Shan, F., Li, S., Xiao, A., et al. (2016b), 'ABCC2-24C > T polymorphism is associated with the response to platinum/5-Fu-based neoadjuvant chemotherapy and better clinical outcomes in advanced gastric cancer patients', *Oncotarget*, 7 (34), 55449-57.

Lian, W., Zhang, L., Yang, L., and Chen, W. (2017), 'AP-2alpha reverses vincristine-induced multidrug resistance of SGC7901 gastric cancer cells by inhibiting the Notch pathway', *Apoptosis*, 22 (7), 933-41.

Liu, K. J., Qi, H. Z., Yao, H. L., Lei, S. L., Lei, Z. D., et al. (2012), 'An updated meta-analysis of the p53 codon 72 polymorphism and gastric cancer risk', *Mol Biol Rep*, 39 (8), 8265-75.

Liu, L., Li, C. H., Jin, T. F., and Xu, D. Y. (2014), 'Study on the ERCC1 gene polymorphism response to chemotherapy and prognosis of gastric cancer', *Genet Mol Res*, 13 (4), 8722-8.

Lord, R. V., Brabender, J., Gandara, D., Alberola, V., Camps, C., et al. (2002), 'Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer', *Clin Cancer Res*, 8 (7), 2286-91.

Lordick, F., Luber, B., Lorenzen, S., Hegewisch-Becker, S., Folprecht, G., et al. (2010), 'Cetuximab plus oxaliplatin/leucovorin/5-fluorouracil in first-line metastatic gastric cancer: a phase II study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO)', *Br J Cancer*, 102 (3), 500-5.

Lowell, J. L. and Klein, D. A. (2000), 'Heteroduplex resolution using T7 endonuclease I in microbial community analyses', *Biotechniques*, 28 (4), 676-8, 80, 81.

Luna-Tortos, C., Fedrowitz, M., and Loscher, W. (2010), 'Evaluation of transport of common antiepileptic drugs by human multidrug resistance-associated proteins (MRP1, 2 and 5) that are overexpressed in pharmacoresistant epilepsy', *Neuropharmacology*, 58 (7), 1019-32.

Luo, Q., Wu, X., Chang, W., Zhao, P., Nan, Y., et al. (2020), 'ARID1A prevents squamous cell carcinoma initiation and chemoresistance by antagonizing pRb/E2F1/c-Myc-mediated cancer stemness', *Cell Death Differ*, 27 (6), 1981-97.

Luo, Q., Wu, X., Zhang, Y., Shu, T., Ding, F., et al. (2018), 'ARID1A ablation leads to multiple drug resistance in ovarian cancer via transcriptional activation of MRP2', *Cancer Lett*, 427, 9-17.

Luo, Y., Wu, J., Wu, Q., Li, X., Zhang, J., et al. (2019), 'miR-577 Regulates TGF-beta Induced Cancer Progression through a SDPR-Modulated Positive-Feedback Loop with ERK-NF-kappaB in Gastric Cancer', *Mol Ther*, 27 (6), 1166-82.

Lv, Y., Song, L., Chang, L., Liu, Y., Zhang, X., et al. (2016), 'Bevacizumab followed by chemotherapy is potential therapy for gastric cancer', *J BUON*, 21 (6), 1466-70.

Lynch, H. T., Grady, W., Suriano, G., and Huntsman, D. (2005), 'Gastric cancer: new genetic developments', *J Surg Oncol*, 90 (3), 114-33; discussion 33.

Ma, J., Song, X., Xu, X., and Mou, Y. (2019), 'Cancer-Associated Fibroblasts Promote the Chemo-resistance in Gastric Cancer through Secreting IL-11 Targeting JAK/STAT3/Bcl2 Pathway', *Cancer Res Treat*, 51 (1), 194-210.

Ma, S. C., Zhao, Y., Zhang, T., Ling, X. L., and Zhao, D. (2015), 'Association between the ERCC1 rs11615 polymorphism and clinical outcomes of oxaliplatin-based chemotherapies in gastrointestinal cancer: a meta-analysis', *Onco Targets Ther*, 8, 641-8.

Manu, K. A., Shanmugam, M. K., Li, F., Chen, L., Siveen, K. S., et al. (2014), 'Simvastatin sensitizes human gastric cancer xenograft in nude mice to capecitabine by suppressing nuclear factor-kappa B-regulated gene products', *J Mol Med (Berl)*, 92 (3), 267-76.

Mao, J., Fan, S., Ma, W., Fan, P., Wang, B., et al. (2014), 'Roles of Wnt/beta-catenin signaling in the gastric cancer stem cells proliferation and salinomycin treatment', *Cell Death Dis*, 5, e1039.

Marin, J. J. and Macias, R. I. (2021), 'Understanding drug resistance mechanisms in cholangiocarcinoma: assisting the clinical development of investigational drugs', *Expert Opin Investig Drugs*, 30 (7), 675-79.

Marin, J. J., Romero, M. R., Martinez-Becerra, P., Herraez, E., and Briz, O. (2009), 'Overview of the molecular bases of resistance to chemotherapy in liver and gastrointestinal tumours', *Curr Mol Med*, 9 (9), 1108-29.

Marin, J. J., Briz, O., Monte, M. J., Blazquez, A. G., and Macias, R. I. (2012), 'Genetic variants in genes involved in mechanisms of chemoresistance to anticancer drugs', *Curr Cancer Drug Targets*, 12 (4), 402-38.

Marin, J. J., Al-Abdulla, R., Lozano, E., Briz, O., Bujanda, L., et al. (2016), 'Mechanisms of Resistance to Chemotherapy in Gastric Cancer', *Anticancer Agents Med Chem*, 16 (3), 318-34.

Marin, J. J. G., Perez-Silva, L., Macias, R. I. R., Asensio, M., Peleteiro-Vigil, A., et al. (2020), 'Molecular Bases of Mechanisms Accounting for Drug Resistance in Gastric Adenocarcinoma', *Cancers (Basel)*, 12 (8).

Marin, J. J. G., Briz, O., Herraez, E., Lozano, E., Asensio, M., et al. (2018), 'Molecular bases of the poor response of liver cancer to chemotherapy', *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 42 (3), 182-92.

Markwell, M. A., Haas, S. M., Bieber, L. L., and Tolbert, N. E. (1978), 'A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples', *Anal Biochem*, 87 (1), 206-10.

Martin-Richard, M., Gallego, R., Pericay, C., Garcia Foncillas, J., Queralt, B., et al. (2013), 'Multicenter phase II study of oxaliplatin and sorafenib in advanced gastric adenocarcinoma after failure of cisplatin and fluoropyrimidine treatment. A GEMCAD study', *Invest New Drugs*, 31 (6), 1573-9.

Martinez-Becerra, P., Monte, I., Romero, M. R., Serrano, M. A., Vaquero, J., et al. (2012a), 'Up-regulation of FXR isoforms is not required for stimulation of the expression of genes involved in the lack of response of colon cancer to chemotherapy', *Pharmacol Res*, 66 (5), 419-27.

Martinez-Becerra, P., Vaquero, J., Romero, M. R., Lozano, E., Anadon, C., et al. (2012b), 'No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors', *Mol Pharm*, 9 (6), 1693-704.

Matsuhashi, N., Saio, M., Matsuo, A., Sugiyama, Y., and Saji, S. (2004), 'Expression of p53 protein as a predictor of the response to 5-fluorouracil and cisplatin chemotherapy in human gastrointestinal cancer cell lines evaluated with apoptosis by use of thin layer collagen gel', *Int J Oncol*, 24 (4), 807-13.

Matsuhashi, N., Saio, M., Matsuo, A., Sugiyama, Y., and Saji, S. (2005), 'The evaluation of gastric cancer sensitivity to 5-FU/CDDP in terms of induction of apoptosis: time- and p53 expression-dependency of anti-cancer drugs', *Oncol Rep*, 14 (3), 609-15.

Melucci, E., Casini, B., Ronchetti, L., Pizzuti, L., Sperati, F., et al. (2018), 'Expression of the Hippo transducer TAZ in association with WNT pathway mutations impacts survival outcomes in advanced gastric cancer patients treated with first-line chemotherapy', *J Transl Med*, 16 (1), 22.

Mihailovici, M. S., Danciu, M., Teleman, S., Stanciu, C., Stan, M., et al. (2002), '[Diagnosis of gastric cancer on endobiopsies using the WHO classification]', *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 106 (4), 725-9.

Ming, X. and Thakker, D. R. (2010), 'Role of basolateral efflux transporter MRP4 in the intestinal absorption of the antiviral drug adefovir dipivoxil', *Biochem Pharmacol*, 79 (3), 455-62.

Mitsuno, M., Kitajima, Y., Ide, T., Ohtaka, K., Tanaka, M., et al. (2007), 'Aberrant methylation of p16 predicts candidates for 5-fluorouracil-based adjuvant therapy in gastric cancer patients', *J Gastroenterol*, 42 (11), 866-73.

Mo, D., Fang, H., Niu, K., Liu, J., Wu, M., et al. (2016), 'Human Helicase RECQL4 Drives Cisplatin Resistance in Gastric Cancer by Activating an AKT-YB1-MDR1 Signaling Pathway', *Cancer Res*, 76 (10), 3057-66.

Montoliu, Lluís (2019), Editando genes: recorta, pega y colorear. Las maravillosas herramientas CRISPR (Next Door...).

Morishita, A., Gong, J., and Masaki, T. (2014), 'Targeting receptor tyrosine kinases in gastric cancer', *World J Gastroenterol*, 20 (16), 4536-45.

Motwani, M., Rizzo, C., Sirotnak, F., She, Y., and Schwartz, G. K. (2003), 'Flavopiridol enhances the effect of docetaxel in vitro and in vivo in human gastric cancer cells', *Mol Cancer Ther*, 2 (6), 549-55.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., et al. (1992), 'Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986', *Biotechnology*, 24, 17-27.

Murata-Kamiya, N., Kurashima, Y., Teishikata, Y., Yamahashi, Y., Saito, Y., et al. (2007), 'Helicobacter pylori CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells', *Oncogene*, 26 (32), 4617-26.

Nabeya, Y., Loganzo, F., Jr., Maslak, P., Lai, L., de Oliveira, A. R., et al. (1995), 'The mutational status of p53 protein in gastric and esophageal adenocarcinoma cell lines predicts sensitivity to chemotherapeutic agents', *Int J Cancer*, 64 (1), 37-46.

Nagata, Y., Lan, K. H., Zhou, X., Tan, M., Esteva, F. J., et al. (2004), 'PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients', *Cancer Cell*, 6 (2), 117-27.

Nakamura, J., Kitajima, Y., Kai, K., Hashiguchi, K., Hiraki, M., et al. (2010), 'HIF-1alpha is an unfavorable determinant of relapse in gastric cancer patients who underwent curative surgery followed by adjuvant 5-FU chemotherapy', *Int J Cancer*, 127 (5), 1158-71.

Nakanishi, R., Shimizu, T., Kumagai, K., Takai, A., and Marusawa, H. (2021), 'Genetic Pathogenesis of Inflammation-Associated Cancers in Digestive Organs', *Pathogens*, 10 (4).

Nandi, S. K., Roychowdhury, T., Chattopadhyay, S., Basu, S., Chatterjee, K., et al. (2022), 'Deregulation of the CD44-NANOG-MDR1 associated chemoresistance pathways of breast cancer stem cells potentiates the anti-cancer effect of Kaempferol in synergism with Verapamil', *Toxicol Appl Pharmacol*, 437, 115887.

Network, Cancer Genome Atlas Research (2014), 'Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma', *Nature*, 513 (7517), 202-9.

Niemi, M., Pasanen, M. K., and Neuvonen, P. J. (2011), 'Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake', *Pharmacol Rev*, 63 (1), 157-81.

- Ning, J., Jiao, Y., Xie, X., Deng, X., Zhang, Y., et al. (2019), 'miR1385p modulates the expression of excision repair crosscomplementing proteins ERCC1 and ERCC4, and regulates the sensitivity of gastric cancer cells to cisplatin', *Oncol Rep*, 41 (2), 1131-39.
- Niu, Y., Li, F., Tang, B., Shi, Y., Hao, Y., et al. (2014), 'Clinicopathological correlation and prognostic significance of sonic hedgehog protein overexpression in human gastric cancer', *Int J Clin Exp Pathol*, 7 (8), 5144-53.
- Noguchi, T., Fujiwara, S., Takeno, S., Kai, S., Mizuta, A., et al. (2003), 'Clinical impact of thymidine phosphorylase expression in gastric cancer', *Oncol Rep*, 10 (3), 561-6.
- Obuchi, W., Ohtsuki, S., Uchida, Y., Ohmine, K., Yamori, T., et al. (2013), 'Identification of transporters associated with Etoposide sensitivity of stomach cancer cell lines and methotrexate sensitivity of breast cancer cell lines by quantitative targeted absolute proteomics', *Mol Pharmacol*, 83 (2), 490-500.
- Ogasawara, N., Tsukamoto, T., Mizoshita, T., Inada, K., Cao, X., et al. (2006), 'Mutations and nuclear accumulation of beta-catenin correlate with intestinal phenotypic expression in human gastric cancer', *Histopathology*, 49 (6), 612-21.
- Ohbu, M., Ogawa, K., Konno, S., Kanzaki, A., Terada, K., et al. (2003), 'Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is expressed in human gastric carcinoma', *Cancer Lett*, 189 (1), 33-8.
- Ohkuma, M., Haraguchi, N., Ishii, H., Mimori, K., Tanaka, F., et al. (2012), 'Absence of CD71 transferrin receptor characterizes human gastric adenosquamous carcinoma stem cells', *Ann Surg Oncol*, 19 (4), 1357-64.
- Okines, A., Verheij, M., Allum, W., Cunningham, D., and Cervantes, A. (2010), 'Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up', *Ann Oncol*, 21 Suppl 5, v50-4.
- Okines, A. F. C., Norman, A. R., McCloud, P., Kang, Y. K., and Cunningham, D. (2009), 'Meta-analysis of the REAL-2 and ML17032 trials: evaluating capecitabine-based combination chemotherapy and infused 5-fluorouracil-based combination chemotherapy for the treatment of advanced oesophago-gastric cancer', *Ann Oncol*, 20 (9), 1529-34.
- Okuyama, T., Maehara, Y., Endo, K., Baba, H., Adachi, Y., et al. (1994), 'Expression of glutathione S-transferase-pi and sensitivity of human gastric cancer cells to cisplatin', *Cancer*, 74 (4), 1230-6.
- Ooi, C. H., Ivanova, T., Wu, J., Lee, M., Tan, I. B., et al. (2009), 'Oncogenic pathway combinations predict clinical prognosis in gastric cancer', *PLoS Genet*, 5 (10), e1000676.

Orditura, M., Galizia, G., Sforza, V., Gambardella, V., Fabozzi, A., et al. (2014), 'Treatment of gastric cancer', *World J Gastroenterol*, 20 (7), 1635-49.

Overbeck, T. R., Hupfeld, T., Krause, D., Waldmann-Beushausen, R., Chapuy, B., et al. (2013), 'Intracellular ATP-binding cassette transporter A3 is expressed in lung cancer cells and modulates susceptibility to cisplatin and paclitaxel', *Oncology*, 84 (6), 362-70.

Owen-Schaub, L. B., Zhang, W., Cusack, J. C., Angelo, L. S., Santee, S. M., et al. (1995), 'Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression', *Mol Cell Biol*, 15 (6), 3032-40.

Padmanabhan, N., Ushijima, T., and Tan, P. (2017), 'How to stomach an epigenetic insult: the gastric cancer epigenome', *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 14 (8), 467-78.

Pan, Y., Lin, S., Xing, R., Zhu, M., Lin, B., et al. (2016), 'Epigenetic Upregulation of Metallothionein 2A by Diallyl Trisulfide Enhances Chemosensitivity of Human Gastric Cancer Cells to Docetaxel Through Attenuating NF-kappaB Activation', *Antioxid Redox Signal*, 24 (15), 839-54.

Pandey, S. K., Yadav, S., Goel, Y., Temre, M. K., Singh, V. K., et al. (2019), 'Molecular docking of anti-inflammatory drug diclofenac with metabolic targets: Potential applications in cancer therapeutics', *J Theor Biol*, 465, 117-25.

Pang, X., Zhou, Z., Yu, Z., Han, L., Lin, Z., et al. (2019), 'Foxo3a-dependent miR-633 regulates chemotherapeutic sensitivity in gastric cancer by targeting Fas-associated death domain', *RNA Biol*, 16 (2), 233-48.

Park, W. S., Oh, R. R., Park, J. Y., Lee, S. H., Shin, M. S., et al. (1999), 'Frequent somatic mutations of the beta-catenin gene in intestinal-type gastric cancer', *Cancer Res*, 59 (17), 4257-60.

Parker, W. B. and Cheng, Y. C. (1990), 'Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil', *Pharmacol Ther*, 48 (3), 381-95.

Pasechnikov, V., Chukov, S., Fedorov, E., Kikuste, I., and Leja, M. (2014), 'Gastric cancer: prevention, screening and early diagnosis', *World J Gastroenterol*, 20 (38), 13842-62.

Patterson, L. H. and Murray, G. I. (2002), 'Tumour cytochrome P450 and drug activation', *Curr Pharm Des*, 8 (15), 1335-47.

Pavlidou, Evangelia N and Balis, Vasileios (2020), 'Diagnostic significance and prognostic role of the ARID1A gene in cancer outcomes', *World Academy of Sciences Journal*, 2 (2), 49-64.

Peng, X., Cuff, L. E., Lawton, C. D., and DeMali, K. A. (2010), 'Vinculin regulates cell-surface E-cadherin expression by binding to beta-catenin', *J Cell Sci*, 123 (Pt 4), 567-77.

Perez-Silva, L.; Al-Abdulla, R.; Espinosa-Escudero, R.A.; Lozano, E.; Herraez, E.; Macias, R.I.R.; Segues, N.; Abad, M.; Briz, O.; Bujanda, L.; Marin, J.J.G. (2019), 'Papel de las proteínas exportadoras de fármacos abcc4 y abcc5 en la quimiorresistencia del cáncer gástrico', *Gastroenterología y Hepatología*, 42, 201.

Petryszyn, P., Chapelle, N., and Matysiak-Budnik, T. (2020), 'Gastric Cancer: Where Are We Heading?', *Dig Dis*, 38 (4), 280-85.

Pietrantonio, F., Biondani, P., de Braud, F., Pellegrinelli, A., Bianchini, G., et al. (2012), 'Bax expression is predictive of favorable clinical outcome in chemonaive advanced gastric cancer patients treated with capecitabine, oxaliplatin, and irinotecan regimen', *Transl Oncol*, 5 (3), 155-9.

Priebsch, A., Rompe, F., Tonnies, H., Kowalski, P., Surowiak, P., et al. (2006), 'Complete reversal of ABCG2-depending atypical multidrug resistance by RNA interference in human carcinoma cells', *Oligonucleotides*, 16 (3), 263-74.

Qadir, J., Majid, S., Khan, M. S., Rashid, F., Wani, M. D., et al. (2021), 'Implication of ARID1A Undercurrents and PDL1, TP53 Overexpression in Advanced Gastric Cancer', *Pathol Oncol Res*, 27, 1609826.

Qadir, J., Majid, S., Khan, M. S., Rashid, F., Wani, M. D., et al. (2020), 'AT-rich Interaction Domain 1A Gene Variations: Genetic Associations and Susceptibility to Gastric Cancer Risk', *Pathol Oncol Res*, 26 (4), 2237-46.

Qiao, L. and Wong, B. C. (2009), 'Targeting apoptosis as an approach for gastrointestinal cancer therapy', *Drug Resist Updat*, 12 (3), 55-64.

Qiu, W., Wu, J., Walsh, E. M., Zhang, Y., Chen, C. Y., et al. (2008), 'Retinoblastoma protein modulates gankyrin-MDM2 in regulation of p53 stability and chemosensitivity in cancer cells', *Oncogene*, 27 (29), 4034-43.

Qu, Y., Dang, S., and Hou, P. (2013), 'Gene methylation in gastric cancer', *Clin Chim Acta*, 424, 53-65.

Quinney, S. K., Sanghani, S. P., Davis, W. I., Hurley, T. D., Sun, Z., et al. (2005), 'Hydrolysis of capecitabine to 5'-deoxy-5-fluorocytidine by human carboxylesterases and inhibition by loperamide', *J Pharmacol Exp Ther*, 313 (3), 1011-6.

Ren, J. S., Kamangar, F., Qiao, Y. L., Taylor, P. R., Liang, H., et al. (2009), 'Serum pepsinogens and risk of gastric and oesophageal cancers in the General Population Nutrition Intervention Trial cohort', *Gut*, 58 (5), 636-42.

Rhode, P., Mehdorn, M., Lyros, O., Kahlert, C., Kurth, T., et al. (2021), 'Characterization of Total RNA, CD44, FASN, and PTEN mRNAs from Extracellular Vesicles as Biomarkers in Gastric Cancer Patients', *Cancers (Basel)*, 13 (23).

Rivera, F., Vega-Villegas, M. E., and Lopez-Brea, M. F. (2007), 'Chemotherapy of advanced gastric cancer', *Cancer Treat Rev*, 33 (4), 315-24.

Roman-Rosales, A. A., Garcia-Villa, E., Herrera, L. A., Gariglio, P., and Diaz-Chavez, J. (2018), 'Mutant p53 gain of function induces HER2 over-expression in cancer cells', *BMC Cancer*, 18 (1), 709.

Russi, S., Verma, H. K., Laurino, S., Mazzone, P., Storto, G., et al. (2019), 'Adapting and Surviving: Intra and Extra-Cellular Remodeling in Drug-Resistant Gastric Cancer Cells', *Int J Mol Sci*, 20 (15).

Sadowski, D. C. and Rabeneck, L. (1997), 'Gastric ulcers at endoscopy: brush, biopsy, or both?', *Am J Gastroenterol*, 92 (4), 608-13.

Samartzis, E. P., Noske, A., Dedes, K. J., Fink, D., and Imesch, P. (2013), 'ARID1A mutations and PI3K/AKT pathway alterations in endometriosis and endometriosis-associated ovarian carcinomas', *Int J Mol Sci*, 14 (9), 18824-49.

San Jose-Eneriz, E., Gimenez-Camino, N., Agirre, X., and Prosper, F. (2019), 'HDAC Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia', *Cancers (Basel)*, 11 (11).

Santos, J. C., Carrasco-Garcia, E., Garcia-Puga, M., Aldaz, P., Montes, M., et al. (2016), 'SOX9 Elevation Acts with Canonical WNT Signaling to Drive Gastric Cancer Progression', *Cancer Res*, 76 (22), 6735-46.

Sasaki, Y., Morimoto, I., Kusano, M., Hosokawa, M., Itoh, F., et al. (2001), 'Mutational analysis of the beta-catenin gene in gastric carcinomas', *Tumour Biol*, 22 (2), 123-30.

Sasako, M., Terashima, M., Ichikawa, W., Ochiai, A., Kitada, K., et al. (2015), 'Impact of the expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase genes on survival in stage II/III gastric cancer', *Gastric Cancer*, 18 (3), 538-48.

Sassi, Y., Lipskaia, L., Vandecasteele, G., Nikolaev, V. O., Hatem, S. N., et al. (2008), 'Multidrug resistance-associated protein 4 regulates cAMP-dependent signaling pathways and controls human and rat SMC proliferation', *J Clin Invest*, 118 (8), 2747-57.

Schauer, M., Peiper, M., Theisen, J., and Knoefel, W. (2011), 'Prognostic factors in patients with diffuse type gastric cancer (linitis plastica) after operative treatment', *Eur J Med Res*, 16 (1), 29-33.

- Sharma, A., Comstock, C. E., Knudsen, E. S., Cao, K. H., Hess-Wilson, J. K., et al. (2007), 'Retinoblastoma tumor suppressor status is a critical determinant of therapeutic response in prostate cancer cells', *Cancer Res*, 67 (13), 6192-203.
- Sharma, R. A., Euden, S. A., Platton, S. L., Cooke, D. N., Shafayat, A., et al. (2004), 'Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance', *Clin Cancer Res*, 10 (20), 6847-54.
- Shen, X. M., Zhou, C., Lian, L., Li, L. Q., Li, W., et al. (2015), 'Relationship Between the DPD and TS mRNA Expression and the Response to S-1-Based Chemotherapy and Prognosis in Patients with Advanced Gastric Cancer', *Cell Biochem Biophys*, 71 (3), 1653-61.
- Shi, H., Tao, T., Abraham, B. J., Durbin, A. D., Zimmerman, M. W., et al. (2020), 'ARID1A loss in neuroblastoma promotes the adrenergic-to-mesenchymal transition by regulating enhancer-mediated gene expression', *Sci Adv*, 6 (29), eaaz3440.
- Shim, H. J., Yun, J. Y., Hwang, J. E., Bae, W. K., Cho, S. H., et al. (2010), 'BRCA1 and XRCC1 polymorphisms associated with survival in advanced gastric cancer treated with taxane and cisplatin', *Cancer Sci*, 101 (5), 1247-54.
- Shim, Y. H., Kang, G. H., and Ro, J. Y. (2000), 'Correlation of p16 hypermethylation with p16 protein loss in sporadic gastric carcinomas', *Lab Invest*, 80 (5), 689-95.
- Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., and Jemal, A. (2014), 'Cancer statistics, 2014', *CA Cancer J Clin*, 64 (1), 9-29.
- Siva, A. C., Raval-Fernandes, S., Stephen, A. G., LaFemina, M. J., Schepé, R. J., et al. (2001), 'Up-regulation of vaults may be necessary but not sufficient for multidrug resistance', *Int J Cancer*, 92 (2), 195-202.
- Smith, M. G., Hold, G. L., Tahara, E., and El-Omar, E. M. (2006), 'Cellular and molecular aspects of gastric cancer', *World J Gastroenterol*, 12 (19), 2979-90.
- Smyth, E. C., Verheij, M., Allum, W., Cunningham, D., Cervantes, A., et al. (2016), 'Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up', *Ann Oncol*, 27 (suppl 5), v38-v49.
- Song, A. L., Zhao, L., Wang, Y. W., He, D. Q., and Li, Y. M. (2019), 'Chemosensitivity in gastric cancer is attributed to the overexpression of excision repair cross-complementing 1 (ERCC1) caused by microRNA-122 dysregulation', *J Cell Physiol*, 234 (12), 22485-92.
- Song, W., Jiang, R., and Zhao, C. M. (2012), 'Role of integrin-linked kinase in multi-drug resistance of human gastric carcinoma SGC7901/DDP cells', *Asian Pac J Cancer Prev*, 13 (11), 5619-25.

Song, Z., Wu, Y., Yang, J., Yang, D., and Fang, X. (2017), 'Progress in the treatment of advanced gastric cancer', *Tumour Biol.*, 39 (7), 1010428317714626.

Sparidans, R. W., Vlaming, M. L., Lagas, J. S., Schinkel, A. H., Schellens, J. H., et al. (2009), 'Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for sorafenib and sorafenib-glucuronide in mouse plasma and liver homogenate and identification of the glucuronide metabolite', *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877 (3), 269-76.

Stefanski, C. D., Keffler, K., McClintock, S., Milac, L., and Prosperi, J. R. (2019), 'APC loss affects DNA damage repair causing doxorubicin resistance in breast cancer cells', *Neoplasia*, 21 (12), 1143-50.

Steinbach, D., Gillet, J. P., Sauerbrey, A., Gruhn, B., Dawczynski, K., et al. (2006), 'ABCA3 as a possible cause of drug resistance in childhood acute myeloid leukemia', *Clin Cancer Res*, 12 (14 Pt 1), 4357-63.

Steinbach, N., Hasson, D., Mathur, D., Stratikopoulos, E. E., Sachidanandam, R., et al. (2019), 'PTEN interacts with the transcription machinery on chromatin and regulates RNA polymerase II-mediated transcription', *Nucleic Acids Res*, 47 (11), 5573-86.

Suganuma, K., Kubota, T., Saikawa, Y., Abe, S., Otani, Y., et al. (2003), 'Possible chemoresistance-related genes for gastric cancer detected by cDNA microarray', *Cancer Sci*, 94 (4), 355-9.

Summaries, PDQ Cancer Information (2002), 'Curcumin (Curcuma, Turmeric) and Cancer (PDQ(R)): Health Professional Version', PDQ Cancer Information Summaries (Bethesda (MD)).

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., et al. (2021), 'Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries', *CA Cancer J Clin*, 71 (3), 209-49.

Tahara, E. (2004), 'Genetic pathways of two types of gastric cancer', *IARC Sci Publ*, (157), 327-49.

Tahara, T., Shibata, T., Okamoto, Y., Yamazaki, J., Kawamura, T., et al. (2016), 'Mutation spectrum of TP53 gene predicts clinicopathological features and survival of gastric cancer', *Oncotarget*, 7 (27), 42252-60.

Tahara, T., Tahara, S., Horiguchi, N., Okubo, M., Terada, T., et al. (2019), 'Molecular subtyping of gastric cancer combining genetic and epigenetic anomalies provides distinct clinicopathological features and prognostic impacts', *Hum Mutat*, 40 (3), 347-54.

Takahashi, D. (2017), 'Second-line chemotherapy for patients with advanced gastric cancer', *Gastric Cancer*, 20 (3), 395-406.

- Takahashi, Y., Takeuchi, T., Sakamoto, J., Touge, T., Mai, M., et al. (2003), 'The usefulness of CEA and/or CA19-9 in monitoring for recurrence in gastric cancer patients: a prospective clinical study', *Gastric Cancer*, 6 (3), 142-5.
- Takaishi, S., Okumura, T., Tu, S., Wang, S. S., Shibata, W., et al. (2009), 'Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44', *Stem Cells*, 27 (5), 1006-20.
- Takechi, T., Koizumi, K., Tsujimoto, H., and Fukushima, M. (2001), 'Screening of differentially expressed genes in 5-fluorouracil-resistant human gastrointestinal tumor cells', *Jpn J Cancer Res*, 92 (6), 696-703.
- Tanaka, H., Kato, K., Yamashita, E., Sumizawa, T., Zhou, Y., et al. (2009), 'The structure of rat liver vault at 3.5 angstrom resolution', *Science*, 323 (5912), 384-8.
- Tate, J. G., Bamford, S., Jubb, H. C., Sondka, Z., Beare, D. M., et al. (2019), 'COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer', *Nucleic Acids Res*, 47 (D1), D941-D47.
- Tian, Q., Zhang, J., Tan, T. M., Chan, E., Duan, W., et al. (2005), 'Human multidrug resistance associated protein 4 confers resistance to camptothecins', *Pharm Res*, 22 (11), 1837-53.
- Tirino, G., Pompella, L., Petrillo, A., Laterza, M. M., Pappalardo, A., et al. (2018), 'What's New in Gastric Cancer: The Therapeutic Implications of Molecular Classifications and Future Perspectives', *Int J Mol Sci*, 19 (9).
- Tong, X., Li, L., Li, X., Heng, L., Zhong, L., et al. (2014), 'SOX10, a novel HMG-box-containing tumor suppressor, inhibits growth and metastasis of digestive cancers by suppressing the Wnt/beta-catenin pathway', *Oncotarget*, 5 (21), 10571-83.
- Tong, Z., Yan, C., Dong, Y. A., Yao, M., Zhang, H., et al. (2020), 'Whole-exome sequencing reveals potential mechanisms of drug resistance to FGFR3-TACC3 targeted therapy and subsequent drug selection: towards a personalized medicine', *BMC Med Genomics*, 13 (1), 138.
- Tsuburaya, A., Sugimoto, N., Imamura, H., Nishikawa, K., Imamoto, H., et al. (2016), 'Molecular Biomarker Study in a Randomised Phase III Trial of Irinotecan Plus S-1 versus S-1 for Advanced Gastric Cancer (GC0301/TOP-002)', *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 28 (8), e45-51.
- Urano, N., Fujiwara, Y., Doki, Y., Kim, S. J., Miyoshi, Y., et al. (2006), 'Clinical significance of class III beta-tubulin expression and its predictive value for resistance to docetaxel-based chemotherapy in gastric cancer', *Int J Oncol*, 28 (2), 375-81.
- Usui, G., Matsusaka, K., Mano, Y., Urabe, M., Funata, S., et al. (2021), 'DNA Methylation and Genetic Aberrations in Gastric Cancer', *Digestion*, 102 (1), 25-32.

- Van Cutsem, E., Sagaert, X., Topal, B., Haustermans, K., and Prenen, H. (2016), 'Gastric cancer', *Lancet*, 388 (10060), 2654-64.
- Van Cutsem, E., Moiseyenko, V. M., Tjulandin, S., Majlis, A., Constenla, M., et al. (2006), 'Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group', *J Clin Oncol*, 24 (31), 4991-7.
- van de Ven, R., Scheffer, G. L., Reurs, A. W., Lindenberg, J. J., Oerlemans, R., et al. (2008), 'A role for multidrug resistance protein 4 (MRP4; ABCC4) in human dendritic cell migration', *Blood*, 112 (6), 2353-9.
- Vasey, P. A., Jones, N. A., Jenkins, S., Dive, C., and Brown, R. (1996), 'Cisplatin, camptothecin, and taxol sensitivities of cells with p53-associated multidrug resistance', *Mol Pharmacol*, 50 (6), 1536-40.
- Vasiliou, V., Vasiliou, K., and Nebert, D. W. (2009), 'Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family', *Hum Genomics*, 3 (3), 281-90.
- Waddell, T., Chau, I., Cunningham, D., Gonzalez, D., Okines, A. F., et al. (2013), 'Epirubicin, oxaliplatin, and capecitabine with or without panitumumab for patients with previously untreated advanced oesophagogastric cancer (REAL3): a randomised, open-label phase 3 trial', *Lancet Oncol*, 14 (6), 481-9.
- Wang, D., Yu, X., and Wang, X. (2016), 'High/positive expression of 5-fluorouracil metabolic enzymes predicts better response to S-1 in patients with gastric cancer: a meta-analysis', *Int J Biol Markers*, 31 (2), e101-9.
- Wang, D. D., Chen, Y. B., Pan, K., Wang, W., Chen, S. P., et al. (2012), 'Decreased expression of the ARID1A gene is associated with poor prognosis in primary gastric cancer', *PLoS One*, 7 (7), e40364.
- Wang, D. S., Liu, Z. X., Lu, Y. X., Bao, H., Wu, X., et al. (2019a), 'Liquid biopsies to track trastuzumab resistance in metastatic HER2-positive gastric cancer', *Gut*, 68 (7), 1152-61.
- Wang, K., Yuen, S. T., Xu, J., Lee, S. P., Yan, H. H., et al. (2014a), 'Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer', *Nat Genet*, 46 (6), 573-82.
- Wang, M., Li, Y., Gao, J., Zhou, J., Gu, L., et al. (2014b), 'p16 Methylation is associated with chemosensitivity to fluorouracil in patients with advanced gastric cancer', *Med Oncol*, 31 (6), 988.

Wang, X., Lin, Y., Lan, F., Yu, Y., Ouyang, X., et al. (2014c), 'BAX and CDKN1A polymorphisms correlated with clinical outcomes of gastric cancer patients treated with postoperative chemotherapy', *Med Oncol*, 31 (11), 249.

Wang, Y., Qi, Z., Zhou, M., Yang, W., Hu, R., et al. (2019b), 'Stanniocalcin1 promotes cell proliferation, chemoresistance and metastasis in hypoxic gastric cancer cells via Bcl2', *Oncol Rep*, 41 (3), 1998-2008.

Wei, K. K., Jiang, L., Wei, Y. Y., Wang, Y. F., Qian, X. K., et al. (2014), 'The prognostic value of ERCC1 expression in gastric cancer patients treated with platinum-based chemotherapy: a meta-analysis', *Tumour Biol*, 35 (9), 8721-31.

Wen, J., Luo, J., Huang, W., Tang, J., Zhou, H., et al. (2015), 'The Pharmacological and Physiological Role of Multidrug-Resistant Protein 4', *J Pharmacol Exp Ther*, 354 (3), 358-75.

Wen, J., Wu, J., Cao, T., Zhi, S., Chen, Y., et al. (2021), 'Methylation silencing and reactivation of exogenous genes in lentivirus-mediated transgenic mice', *Transgenic Res*, 30 (1), 63-76.

Werner, M., Becker, K. F., Keller, G., and Hofler, H. (2001), 'Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology', *J Cancer Res Clin Oncol*, 127 (4), 207-16.

Wiseman, M. (2008), 'The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective', *Proc Nutr Soc*, 67 (3), 253-6.

Woehlecke, H., Osada, H., Herrmann, A., and Lage, H. (2003), 'Reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by tryprostatin A', *Int J Cancer*, 107 (5), 721-8.

Wongsirisin, P., Limpakan Yamada, S., Yodkeeree, S., Punfa, W., and Limtrakul, P. (2018), 'Association of DNA Repair and Drug Transporter in Relation to Chemosensitivity in Primary Culture of Thai Gastric Cancer Patients', *Biol Pharm Bull*, 41 (3), 360-67.

Wu, D., Zhang, P., Ma, J., Xu, J., Yang, L., et al. (2019), 'Serum biomarker panels for the diagnosis of gastric cancer', *Cancer Med*, 8 (4), 1576-83.

Wu, N., Huang, Y., Zou, Z., Gimenez-Capitan, A., Yu, L., et al. (2017), 'High BIM mRNA levels are associated with longer survival in advanced gastric cancer', *Oncol Lett*, 13 (3), 1826-34.

Wu, Q., Li, Z. S., Li, D. W., Peng, Z. H., and Yang, Z. R. (2009a), '[Relationship between the expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and chemotherapy response in gastric carcinoma]', *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*, 12 (5), 498-501.

Wu, X., Zheng, Y., Han, B., and Dong, X. (2018), 'Long noncoding RNA BLACAT1 modulates ABCB1 to promote oxaliplatin resistance of gastric cancer via sponging miR-361', *Biomed Pharmacother*, 99, 832-38.

Wu, X. D., Zeng, K., Xue, F. Q., Chen, J. H., and Chen, Y. Q. (2013), 'Statins are associated with reduced risk of gastric cancer: a meta-analysis', *Eur J Clin Pharmacol*, 69 (10), 1855-60.

Wu, Z., Cho, H., Hampton, G. M., and Theodorescu, D. (2009b), 'Cdc6 and cyclin E2 are PTEN-regulated genes associated with human prostate cancer metastasis', *Neoplasia*, 11 (1), 66-76.

Xia, L. L., Tang, Y. B., Song, F. F., Xu, L., Ji, P., et al. (2016), 'DCTPP1 attenuates the sensitivity of human gastric cancer cells to 5-fluorouracil by up-regulating MDR1 expression epigenetically', *Oncotarget*, 7 (42), 68623-37.

Xia, P. and Xu, X. Y. (2017), 'Epithelial-mesenchymal transition and gastric cancer stem cell', *Tumour Biol*, 39 (5), 1010428317698373.

Xiang, X. J., Zhang, L., Qiu, F., Yu, F., Zhan, Z. Y., et al. (2012), 'A phase II study of capecitabine plus oxaliplatin as first-line chemotherapy in elderly patients with advanced gastric cancer', *Chemotherapy*, 58 (1), 1-7.

Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., et al. (1993), 'p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases', *Nature*, 366 (6456), 701-4.

Xu, G., Zhang, W., Ma, M. K., and McLeod, H. L. (2002), 'Human carboxylesterase 2 is commonly expressed in tumor tissue and is correlated with activation of irinotecan', *Clin Cancer Res*, 8 (8), 2605-11.

Xu, W., Wang, S., Chen, Q., Zhang, Y., Ni, P., et al. (2014), 'TXNL1-XRCC1 pathway regulates cisplatin-induced cell death and contributes to resistance in human gastric cancer', *Cell Death Dis*, 5, e1055.

Xu, W., Wei, Q., Han, M., Zhou, B., Wang, H., et al. (2018a), 'CCL2-SQSTM1 positive feedback loop suppresses autophagy to promote chemoresistance in gastric cancer', *Int J Biol Sci*, 14 (9), 1054-66.

Xu, Y. C., Liu, X., Li, M., Li, Y., Li, C. Y., et al. (2018b), 'A Novel Mechanism of Doxorubicin Resistance and Tumorigenesis Mediated by MicroRNA-501-5p-Suppressed BLID', *Mol Ther Nucleic Acids*, 12, 578-90.

Xu, Z., Chen, L., Xiao, Z., Zhu, Y., Jiang, H., et al. (2018c), 'Potentiation of the anticancer effect of doxorubicin in drug-resistant gastric cancer cells by tanshinone IIA', *Phytomedicine*, 51, 58-67.

Xue, M. H., Li, G. Y., Wu, X. J., Zhang, C. X., Zhang, C. F., et al. (2015), 'Genetic variability of genes in NER pathway influences the treatment outcome of gastric cancer', *Int J Clin Exp Pathol*, 8 (5), 5563-9.

Yakirevich, E. and Resnick, M. B. (2013), 'Pathology of gastric cancer and its precursor lesions', *Gastroenterol Clin North Am*, 42 (2), 261-84.

Yamada, Y., Boku, N., Nishina, T., Yamaguchi, K., Denda, T., et al. (2013), 'Impact of excision repair cross-complementing gene 1 (ERCC1) on the outcomes of patients with advanced gastric cancer: correlative study in Japan Clinical Oncology Group Trial JCOG9912', *Ann Oncol*, 24 (10), 2560-65.

Yan, R., Peng, X., Yuan, X., Huang, D., Chen, J., et al. (2013), 'Suppression of growth and migration by blocking the Hedgehog signaling pathway in gastric cancer cells', *Cell Oncol (Dordr)*, 36 (5), 421-35.

Yang, L., Yang, S., Liu, J., Wang, X., Ji, J., et al. (2014), 'Expression of GRP78 predicts taxane-based therapeutic resistance and recurrence of human gastric cancer', *Exp Mol Pathol*, 96 (2), 235-41.

Yang, L., Zou, S., Shu, C., Song, Y., Sun, Y. K., et al. (2017), 'CYP2A6 Polymorphisms Associate with Outcomes of S-1 Plus Oxaliplatin Chemotherapy in Chinese Gastric Cancer Patients', *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 15 (4), 255-62.

Yang, Y., Wang, X., Yang, J., Duan, J., Wu, Z., et al. (2019), 'Loss of ARID1A promotes proliferation, migration and invasion via the Akt signaling pathway in NPC', *Cancer Manag Res*, 11, 4931-46.

Yao, K., Iwashita, A., Tanabe, H., Nishimata, N., Nagahama, T., et al. (2008), 'White opaque substance within superficial elevated gastric neoplasia as visualized by magnification endoscopy with narrow-band imaging: a new optical sign for differentiating between adenoma and carcinoma', *Gastrointest Endosc*, 68 (3), 574-80.

Yao, Y., Tao, H., Kim, J. J., Burkhead, B., Carloni, E., et al. (2004), 'Alterations of DNA mismatch repair proteins and microsatellite instability levels in gastric cancer cell lines', *Lab Invest*, 84 (7), 915-22.

Yashiro, M., Inoue, T., Nishioka, N., Matsuoka, T., Boland, C. R., et al. (2009), 'Allelic imbalance at p53 and microsatellite instability are predictive markers for resistance to chemotherapy in gastric carcinoma', *Ann Surg Oncol*, 16 (10), 2926-35.

Ye, X. L., Zhao, Y. R., Weng, G. B., Chen, Y. C., Wei, X. N., et al. (2015), 'IL-33-induced JNK pathway activation confers gastric cancer chemotherapy resistance', *Oncol Rep*, 33 (6), 2746-52.

Yeh, T. S., Wu, C. W., Hsu, K. W., Liao, W. J., Yang, M. C., et al. (2009), 'The activated Notch1 signal pathway is associated with gastric cancer progression through cyclooxygenase-2', *Cancer Res*, 69 (12), 5039-48.

Yeh, Y. S., Chen, Y. T., Tsai, H. L., Huang, C. W., Ma, C. J., et al. (2020), 'Predictive Value of ERCC1, ERCC2, and XRCC Expression for Patients with Locally Advanced or Metastatic Gastric Cancer Treated with Neoadjuvant mFOLFOX-4 Chemotherapy', *Pathol Oncol Res*, 26 (2), 1105-16.

Ying, L., Zu-An, Z., Qing-Hua, L., Qing-Yan, K., Lei, L., et al. (2014), 'RAD001 can reverse drug resistance of SGC7901/DDP cells', *Tumour Biol*, 35 (9), 9171-7.

Yokozaki, H., Kuniyasu, H., Kitadai, Y., Nishimura, K., Todo, H., et al. (1992), 'p53 point mutations in primary human gastric carcinomas', *J Cancer Res Clin Oncol*, 119 (2), 67-70.

Yong, X., Tang, B., Xiao, Y. F., Xie, R., Qin, Y., et al. (2016), 'Helicobacter pylori upregulates Nanog and Oct4 via Wnt/beta-catenin signaling pathway to promote cancer stem cell-like properties in human gastric cancer', *Cancer Lett*, 374 (2), 292-303.

Yoo, N. J., Lee, S. H., Jeong, E. G., Lee, J. W., Soung, Y. H., et al. (2007), 'Expression of nuclear and cytoplasmic phosphorylated FADD in gastric cancers', *Pathol Res Pract*, 203 (2), 73-8.

Yoon, C., Park, D. J., Schmidt, B., Thomas, N. J., Lee, H. J., et al. (2014), 'CD44 expression denotes a subpopulation of gastric cancer cells in which Hedgehog signaling promotes chemotherapy resistance', *Clin Cancer Res*, 20 (15), 3974-88.

Young, K., Starling, N., and Cunningham, D. (2016), 'Targeting deficient DNA damage repair in gastric cancer', *Expert Opin Pharmacother*, 17 (13), 1757-66.

Yu, B., Gu, D., Zhang, X., Liu, B., and Xie, J. (2017a), 'The role of GLI2-ABCG2 signaling axis for 5Fu resistance in gastric cancer', *J Genet Genomics*, 44 (8), 375-83.

Yu, B., Gu, D., Zhang, X., Li, J., Liu, B., et al. (2017b), 'GLI1-mediated regulation of side population is responsible for drug resistance in gastric cancer', *Oncotarget*, 8 (16), 27412-27.

Zeng, X., Zhang, Y., Xu, X., Chen, Z., Ma, L., et al. (2022), 'Construction of pH-sensitive targeted micelle system co-delivery with curcumin and dasatinib and evaluation of anti-liver cancer', *Drug Deliv*, 29 (1), 792-806.

Zhai, J., Shen, J., Xie, G., Wu, J., He, M., et al. (2019), 'Cancer-associated fibroblasts-derived IL-8 mediates resistance to cisplatin in human gastric cancer', *Cancer Lett*, 454, 37-43.

Zhang, G., Wang, Z., Qian, F., Zhao, C., and Sun, C. (2015a), 'Silencing of the ABCC4 gene by RNA interference reverses multidrug resistance in human gastric cancer', *Oncol Rep*, 33 (3), 1147-54.

Zhang, H., Ren, L., Ding, Y., Li, F., Chen, X., et al. (2019), 'Hyaluronan-mediated motility receptor confers resistance to chemotherapy via TGFbeta/Smad2-induced epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer', *FASEB J*, 33 (5), 6365-77.

Zhang, J. X., Chen, Z. H., Chen, D. L., Tian, X. P., Wang, C. Y., et al. (2018), 'LINC01410-miR-532-NCF2-NF-kB feedback loop promotes gastric cancer angiogenesis and metastasis', *Oncogene*, 37 (20), 2660-75.

Zhang, L., Hu, J. F., Li, G. Q., Xiao, X., and Su, Q. (2012), 'Rosiglitazone reverses mitomycin C resistance in human gastric cancer cells', *Am J Med Sci*, 343 (5), 382-7.

Zhang, L., Guo, X., Zhang, D., Fan, Y., Qin, L., et al. (2017), 'Upregulated miR-132 in Lgr5(+) gastric cancer stem cell-like cells contributes to cisplatin-resistance via SIRT1/CREB/ABCG2 signaling pathway', *Mol Carcinog*, 56 (9), 2022-34.

Zhang, S. and Yu, D. (2010), 'PI(3)king apart PTEN's role in cancer', *Clin Cancer Res*, 16 (17), 4325-30.

Zhang, W., Dahlberg, J. E., and Tam, W. (2007), 'MicroRNAs in tumorigenesis: a primer', *Am J Pathol*, 171 (3), 728-38.

Zhang, X., Jiang, L. P., Yin, Y., and Wang, Y. D. (2014a), 'XRCC1 and XPD genetic polymorphisms and clinical outcomes of gastric cancer patients treated with oxaliplatin-based chemotherapy: a meta-analysis', *Tumour Biol*, 35 (6), 5637-45.

Zhang, X. W., Bu, P., Liu, L., Zhang, X. Z., and Li, J. (2015b), 'Overexpression of long non-coding RNA PVT1 in gastric cancer cells promotes the development of multidrug resistance', *Biochem Biophys Res Commun*, 462 (3), 227-32.

Zhang, Y. H., Wu, Q., Xiao, X. Y., Li, D. W., and Wang, X. P. (2010), 'Silencing MRP4 by small interfering RNA reverses acquired DDP resistance of gastric cancer cell', *Cancer Lett*, 291 (1), 76-82.

Zhang, Z., Li, Z., Li, Y., and Zang, A. (2014b), 'MicroRNA and signaling pathways in gastric cancer', *Cancer Gene Ther*, 21 (8), 305-16.

Zhao, N., Zhang, C., Zhao, Y., Bai, B., An, J., et al. (2016), 'Optical imaging of gastric cancer with near-infrared heptamethine carbocyanine fluorescence dyes', *Oncotarget*, 7 (35), 57277-89.

Zhao, T. T., Xu, H., Xu, H. M., Wang, Z. N., Xu, Y. Y., et al. (2018), 'The efficacy and safety of targeted therapy with or without chemotherapy in advanced gastric cancer treatment: a network meta-analysis of well-designed randomized controlled trials', *Gastric Cancer*, 21 (3), 361-71.

Zheng, H. X., Cai, Y. D., Wang, Y. D., Cui, X. B., Xie, T. T., et al. (2013), 'Fas signaling promotes motility and metastasis through epithelial-mesenchymal transition in gastrointestinal cancer', *Oncogene*, 32 (9), 1183-92.

Zheng, P., Chen, L., Yuan, X., Luo, Q., Liu, Y., et al. (2017), 'Exosomal transfer of tumor-associated macrophage-derived miR-21 confers cisplatin resistance in gastric cancer cells', *J Exp Clin Cancer Res*, 36 (1), 53.

Zhi, X., Tao, J., Xiang, G., Cao, H., Liu, Z., et al. (2015), 'APRIL induces cisplatin resistance in gastric cancer cells via activation of the NF-kappaB pathway', *Cell Physiol Biochem*, 35 (2), 571-85.

Zhou, G. X., Li, X. Y., Zhang, Q., Zhao, K., Zhang, C. P., et al. (2013), 'Effects of the hippo signaling pathway in human gastric cancer', *Asian Pac J Cancer Prev*, 14 (9), 5199-205.

Zhu, F. S., Chen, X. M., Huang, Z. G., Wang, Z. R., Zhang, D. W., et al. (2010), 'Rofecoxib augments anticancer effects by reversing intrinsic multidrug resistance gene expression in BGC-823 gastric cancer cells', *J Dig Dis*, 11 (1), 34-42.

7. English Summary

UNIVERSITY OF SALAMANCA
FACULTY OF BIOLOGY
DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY



VNiVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE

CHARACTERIZATION OF THE RESISTOME IN GASTRIC
ADENOCARCINOMA.
NEW STRATEGIES FOR CHEMOSENSITIZATION

Presented by **Laura Pérez Silva** to obtain PhD in the University of Salamanca

2022

Abbreviations

5-FU: 5-Fluorouracil

ABC: ATP-binding cassette transporter

ATP: adenosine triphosphate

Cas9: CRISPR associated protein 9

cDNA: complementary DNA

CRISPR: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DNA: Deoxyribonucleic Acid

EGFP: enhanced green fluorescent protein

GAC: gastric adenocarcinoma

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HPRT1: Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1

IC₅₀: Inhibitory concentration 50

IC₇₅: Inhibitory concentration 50

IF: immunofluorescence

KO: Knockout

MDR: multidrug resistance

MPR: Mechanism of pharmacoresistance

mRNA: messenger ribonucleic acid

MRP: multidrug resistance-associated protein

NSAID: non-steroidal anti-inflammatory drugs

NT: Non-tumor

PGE: programmed genome editing

RNA: Ribonucleic acid

RT-qPCR: Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction

sgRNA: single guide RNA

T: Tumor

TKI: Tyrosin kinase inhibitor

TLDA: Taqman Low-Density Arrays

VIM: vimentin

WT: Wild type

AIMS

Gastric cancer is an aggressive disease with a poor prognosis that causes more than 700.000 deaths worldwide each year. The majority of gastric tumors diagnosed are gastric adenocarcinomas (GAC). These have a high mortality rate mainly because they are diagnosed in advanced stages of the disease when surgical resection is no longer feasible. In addition, the available antitumor chemotherapy is not very effective due to the high resistance of this type of tumor.

A wide variety of mechanisms of pharmacoresistance in tumor cells are known, which sometimes occur simultaneously in the tumor and can act in a synergistic manner. The consequence is the appearance of the multidrug resistance (MDR) phenotype, which limits drug treatment options and conditions the prognosis of patients. The identification of the Gene Expression Signature of Chemoresistance in GAC could be the key to understanding the mechanisms responsible for the lack of response to chemotherapy and to develop, based on this knowledge, strategies for tumor chemosensitization. Different studies have demonstrated the presence in GAC of high expression levels of the drug efflux pump MRP4, which could play a relevant role in the development of drug resistance in this type of tumor, and constitutes a new pharmacological target for the development of chemosensitization strategies. However, although this protein has the capacity to transport some antitumor drugs, its role in the transport of drugs used in first- or second-line treatment against GAC is not well understood.

On the other hand, the development of GAC is favored by the appearance of alterations in the expression of tumor suppressor genes involved in cell cycle regulation, which, in some types of tumors, have been implicated in the appearance of the MDR phenotype.

Taking into account this background, the overall objective of this Doctoral Thesis is to identify the Gene Expression Signature of Chemoresistance of GAC, as a basis for the development of new chemosensitizing therapies for this type of tumor, as well as to investigate the role of the membrane transporter protein MRP4 in GAC chemoresistance.

To achieve this general objective, the following partial objectives were defined:

Aim 1: To identify the determinant mechanisms of GAC unresponsiveness to antitumor chemotherapy by characterizing the Gene Expression Signature of Chemoresistance.

Aim 2: To evaluate in an *in vivo* model a GAC a chemosensitization strategy based on the inhibition of drug export pumps of the ABCC family.

Aim 3: To investigate the role of MRP4 in the resistance of GAC to different antitumor drugs used in the treatment of this tumor.

Aim 4: To develop, by programmed genome editing (PGE) based on the CRISPR/Cas9 system, GAC cell lines with permanent silencing of ABC pumps, for the evaluation of chemosensitization strategies based on the use of ABC pump inhibitors.

Aim 5: To generate cellular models of GAC with loss of tumor suppressor gene expression, using CRISPR/Cas9-based strategies, for the study of their role in the development of GAC pharmacoresistance.

INTRODUCTION

GASTRIC CANCER

Gastric cancer is an aggressive disease with a poor prognosis and, despite a slight decrease in incidence and mortality in recent decades (Sung et al. 2021), it still ranks fifth in the order of incidence of the different types of cancer, with more than one million new cases diagnosed worldwide each year, and is in fourth position in terms of the number of deaths due to cancer (GLOBOCAN 2020). The majority of gastric tumors diagnosed are malignant, and of these, approximately 90% are gastric adenocarcinomas (GAC), which originate in gastric mucosal cells.

Etiology and pathogenesis

One of the causes of the high GAC-induced mortality rate is that these cancers are usually diagnosed in advanced stages because the initial symptoms are non-specific, and very similar to those that appear in chronic gastritis. Gastric cancer is also a multifactorial disease resulting from a multistage process, and in more than 90% of cases is related to *Helicobacter pylori* infection (Petryszyn et al. 2020). The different risk factors that would result in the development of GAC are: *H. pylori* infection, diet, pharmacological treatment, obesity, gastroesophageal reflux, genetic factors and the socioeconomic status.

Diagnosis

The clinical manifestations that frequently appear when the disease is in advanced stages are not specific, which makes diagnosis difficult and, in the majority of cases, it is made late, when surgical resection is no longer a feasible therapeutic alternative (Dicken et al. 2005). On the other hand, tumor markers can be used both for early diagnosis and for cancer follow-up after treatment. Some of these markers are CEA (carcinoembryonic antigen) and CA19.9 (carbohydrate antigen 19.9) which may be elevated, although they are not specific for this type of tumor (Takahashi et al. 2003).

Treatment

Neoadjuvant chemotherapy has proven useful in improving 5-year survival of patients by 23-36% (Cunningham et al. 2006), and is therefore recommended prior to surgical resection (Smyth et al. 2016). The most used therapy is the ECF regimen, it combines the drugs epirubicin, cisplatin and 5-fluorouracil (5-FU). A phase 2/3 study has shown that the FLOT combination (5-FU, leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel) improves survival rate in patients with localized tumors after surgical resection compared to ECF/ECX treatments (Al-Batran et al. 2019). These combination therapies, as well as others considering different combinations with platinum compounds (cisplatin and oxaliplatin), fluoropyrimidines (5-FU and capecitabine) and taxanes (docetaxel and paclitaxel) improve patient prognosis, but are associated with high toxicity (Van Cutsem et al. 2006). For those patients who have not received neoadjuvant chemotherapy, the use of chemoradiotherapy or adjuvant chemotherapy is also recommended. On the other hand, patients with inoperable or metastatic tumors improve their survival rate and quality of life when treated with chemotherapy and not only with palliative treatments (Glimelius et al. 1997).

In tumors resistant to first-line treatments or in recurrent cancers, a second line of chemotherapy consisting on irinotecan, taxanes (docetaxel or paclitaxel) either alone or in combination with paclitaxel is currently used (Smyth et al. 2016). Targeted therapies also show promising results. These is the case of the monoclonal antibody against epidermal factor receptor 2 (HER2), trastuzumab or the monoclonal antibody cetuximab. Receptor tyrosine kinase inhibitors (TKIs) such as sorafenib, lapatinib or pertuzumab are in different phases of study and are also used as second-line drugs.

DRUG RESISTANCE MECHANISMS

GAC is highly resistant to commonly used drugs (Marin et al. 2016). The mechanisms that contribute to chemoresistance and refractoriness to antitumor drugs can be classified into 7 groups of Mechanisms of Pharmacoresistance (MPR) (Figure I-1) (Marin et al. 2009; Marin et al. 2020; Marin and Macias 2021). These are often present simultaneously in the tumor and act in a synergistic manner. As a consequence, cross-resistance to different antitumor drugs often occurs, called multidrug resistance phenotype or MDR, which results in a major limitation in terms of drug treatment options, significantly affecting their success rate.

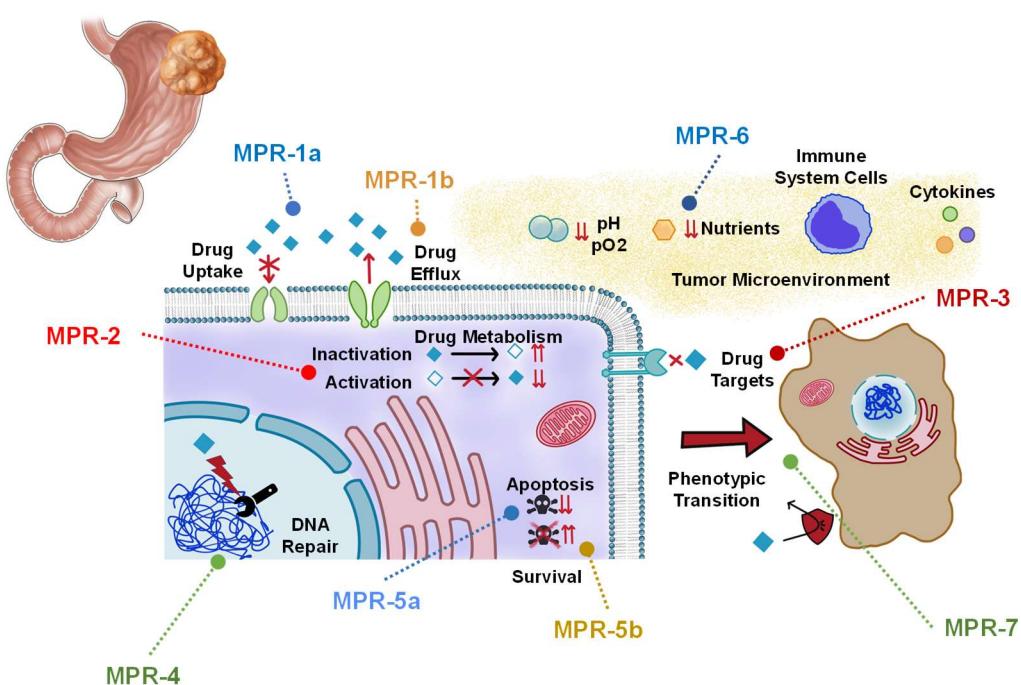


Figure I-1. Schematic representation of the mechanisms of drug resistance (MPRs) present in the GAC tumor cell: reduction of intracellular drug concentration by decreased uptake (MPR-1a) or increased expulsion (MPR-1b); alterations in drug metabolism by decreased activation of the prodrug or increased metabolism of the cytotoxic agent (MPR-2); alterations in molecular targets (MPR-3); changes in the DNA repair system (MPR-4); dysregulation of pathways involved in cell survival or apoptosis (MPR-5); changes in the tumor microenvironment (MPR-6) and epithelial-mesenchymal transition (EMT) (MPR-7). Image adapted from (Marin et al. 2020).

- **Mechanism of Pharmacoresistance Type 1 (MPR-1):** This group of MPRs includes the mechanisms involved in the reduction of the intracellular concentration of antitumor drugs, either due to a decrease in the uptake of these compounds (MPR-1a), or to their increased export (MPR-1b). Their efficacy depends on changes in expression and the presence of genetic variants that affect the proteins that constitute the "transportome" (Marin et al. 2009; Marin et al. 2012).
- **Mechanism of Pharmacoresistance Type 2 (MPR-2):** This group includes all those mechanisms responsible of the presence of a low proportion of active agents inside the tumor cell, due to inactivation of drugs or reduced activation of pro-drugs.
- **Mechanism of Pharmacoresistance Type 3 (MPR-3):** This group includes all those mechanisms that induce changes in expression or mutations in target molecules on which the antitumor drug acts.
- **Mechanism of Pharmacoresistance Type 4 (MPR-4):** This group encompasses the mechanisms involved in the repair of DNA damage induced by antitumor drugs.
- **Mechanism of Pharmacoresistance Type 5 (MPR-5):** This group includes processes that induce the deregulation of the apoptosis/survival balance, which may be due to the potentiation of survival mechanisms (MPR-5a) or to the reduction of apoptosis (MPR-5b).
- **Mechanism of Pharmacoresistance Type 6 (MPR-6):** This group includes changes in the tumor cell microenvironment that reduce the efficacy of antitumor agents.
- **Mechanism of Pharmacoresistance Type 7 (MPR-7):** This MPR comprises all those phenotypic transitions associated with the appearance of mesenchymal and stem cell features that result in a reduced response to chemotherapy.



Sensitizing gastric adenocarcinoma to chemotherapy by pharmacological manipulation of drug transporters



Ruba Al-Abdulla^{a,1}, Laura Perez-Silva^{a,1}, Elisa Lozano^{a,e}, Rocio I.R. Macias^{a,e}, Elisa Herraez^{a,e}, Mar Abad^b, Nerea Segues^c, Luis Bujanda^{d,e}, Oscar Briz^{a,e,2}, Jose J.G. Marin^{a,e,2,*}

^a Experimental Hepatology and Drug Targeting (HEVEFARM), IBSAL, University of Salamanca, Salamanca, Spain

^b Department of Pathology, IBSAL, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

^c Department of Pathology, Biodonostia Research Institute (Donostia University Hospital), San Sebastian, Spain

^d Department of Liver and Gastrointestinal Diseases, Biodonostia Research Institute (Donostia University Hospital), University of Basque Country (UPV/EHU), San Sebastian, Spain

^e Center for the Study of Liver and Gastrointestinal Diseases (CIBERehd), Carlos III National Institute of Health, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Chemotherapy
Diclofenac
Multidrug resistance
Sorafenib
Stomach cancer

ABSTRACT

Owing to intrinsic and acquired chemoresistance, the response of gastric adenocarcinoma (GAC) to chemotherapy is very poor. Here we have investigated the role of transportome in reducing the intracellular content of anticancer drugs and conferring multidrug resistance (MDR) phenotype. Tumors specimens and paired adjacent tissue were analyzed to determine the MDR signature by TaqMan Low-Density Arrays and single-gene qPCR. Strategies of sensitization were evaluated *in vitro* using the GAC-derived cell line AGS and *in vivo* using a subcutaneous xenograft model in immunodeficient nude mice. Several transporters involved in drug uptake and export, which are present in healthy stomach, were highly expressed in GAC. In contrast, the cancer-type OATP1B3 was almost exclusively expressed in tumor tissue. The transportome profile varied depending on tumor anatomical location, differentiation, and stage. Immunofluorescence analysis revealed high MRP1 and MRP4 expression at the plasma membrane of tumor cells as well as AGS cells in culture, in which MRP inhibition resulted in selective sensitization to cytotoxic MRP substrates, such as sorafenib, docetaxel, etoposide, and doxorubicin. In mice with subcutaneous tumors formed by AGS cells, sorafenib alone failed to prevent tumor growth. In contrast, this drug induced a marked inhibitory effect when it was co-administered with diclofenac. In conclusion, MRP1 and MRP4 play an important role in the lack of response of GAC to drugs that are transported by these export pumps. Moreover, agents, such as sorafenib, considered at present useless to treat GAC, may become active antitumor drugs when co-administered with non-toxic MRP inhibitors, such as diclofenac.

1. Introduction

Gastric adenocarcinoma (GAC), the most common malignant tumor of the stomach, is characterized by its high incidence and mortality [1]. One important factor contributing to its poor prognosis [2] is that GAC is frequently diagnosed when the tumor is already in an advanced stage, and the therapeutic options are minimal. In the early stages of the disease, radical surgical resection is a potentially curative option [3],

but the aggressiveness of this procedure markedly reduces the likelihood of a successful outcome after surgery [4]. In some patients, conventional drugs used as neoadjuvant or adjuvant chemotherapy can improve prognosis and increase overall survival. First-line treatments include combinations of 5-fluorouracil (5-FU) or its prodrug capecitabine, anthracyclines (doxorubicin or epirubicin) and platinum compounds (cisplatin or oxaliplatin). Other drugs approved for second-line therapy are taxanes, irinotecan and mitomycin C, which have not

Abbreviations: 5-FU, 5-fluorouracil; ABC, ATP-binding cassette; BCRP, breast cancer resistance protein; CF, carboxyfluorescein diacetate; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; GAC, gastric adenocarcinoma; MDR, multidrug resistance; MOC, mechanism of chemoresistance; MRP, multidrug resistance-associated protein; NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drugs; NT, non-tumor; OATP, organic anion transporting polypeptide; qPCR, quantitative PCR; OCT, organic cation transporter; SLC, solute carrier protein; T, tumor; TCGA, The Cancer Genome Atlas; TKI, tyrosine kinase inhibitor; TLDA, Taqman Low Density Array

* Corresponding author at: Department of Physiology and Pharmacology, Campus Miguel de Unamuno E.D. S-09, 37007-Salamanca, Spain.

E-mail address: jjgmarin@usal.es (J.J.G. Marin).

¹ Drs Al-Abdulla and Perez-Silva contributed equally as joint first authors.

² Drs Briz and Marin contributed equally as joint senior authors.

significantly improved patient survival [5]. Although inhibitors of receptors with tyrosine kinase activity (TKIs), such as apatinib, lapatinib, regorafenib, sunitinib and sorafenib, and monoclonal antibodies have been useful in the treatment of several tumors, these have shown only modest success in patients with GAC [6,7].

The failure of the pharmacological treatment in GAC is accounted for by the existence of intrinsic and acquired “mechanisms of chemoresistance” (MOCs) [8], which confer tumor cells a strong multidrug resistance (MDR) phenotype [9]. MOCs were initially classified into five groups [8,10], which have been later updated to seven types [11]. MOC-1 includes processes leading to a reduction in intracellular concentrations of antitumor drugs [12], due to impaired drug uptake (MOC-1a) or enhanced drug export (MOC-1b), which can be the consequence of changes in the expression of proteins belonging to the “transportome” [9] or the presence of genetic variants with gain- or loss-of-function repercussions [13].

The main transporters responsible for the uptake of drugs (MOC-1a) used in the treatment of GAC are the organic cation transporters (OCTs) accounting for the tumor uptake of anthracyclines (OCT1 and OCTN1), platinum derivatives (OCT1, OCT2, OCT3, and OCTN1), irinotecan and TKIs such as sorafenib (OCT1) [14]. Other important transporters are organic anion transporters able to transport irinotecan (OATP2B1), docetaxel (OATP1B1 and OATP1B3), and some TKIs such as regorafenib, sunitinib and sorafenib (OATP1B1 and OATP1B3). The copper transporter CTR1, which transports cisplatin, and the nucleoside transporters CNTs and ENTs, which transport 5-FU, may also be relevant in GAC [14]. Regarding MOC-1a, in lung and colon cancer and cell lines derived from these tumors, Nagai et al. [15] have identified a novel cancer-type variant of the *SLCO1B3* mRNA (OATP1B3), which has its own transcription initiation site and is not found in non-tumor tissue. Whether this variant is expressed in GAC and plays a role in the MDR phenotype of this cancer is still unknown.

The overexpression of drug export pumps (MOC-1b) in tumors is a major factor contributing to the failure of chemotherapy [16]. ATP-binding cassette (ABC) pumps potentially involved in the MDR phenotype of GAC are MDR1 (*ABCB1* gene), the first member of the B subfamily, which transports anthracyclines, mitomycin C and docetaxel; members belonging to the C subfamily of multidrug resistance-associated proteins (MRPs), which export anthracyclines, platinum derivatives, 5-FU, mitomycin C, taxanes, camptothecins, and TKIs; and BCRP (*ABCG2* gene), which mediates the efflux of anthracyclines, 5-FU, camptothecins, and TKIs. In addition, the P-type ATPases ATP7A and ATP7B can extrude platinum derivatives [17].

Although the role of transportome in the “resistome” - defined as the set of expressed proteins accounting for MOCs - has been reported [9], its relevance in the lack of response of patients with GAC to antitumor drugs is poorly understood. The critical clinical relevance of this problem justifies the interest in advancing the knowledge of MOCs in GAC, which is required to develop novel strategies to improve the effectiveness of anticancer drugs, for instance, increasing their concentration in cancer cells either by enhancing drug uptake or inhibiting drug export via ABC transporters. Despite the fact that many chemosensitizing agents have shown promising ability to overcome the MDR phenotype in cancer cells *in vitro*, most of them have not achieved clinical approval due to their reduced efficacy in the *in vivo* setting or their adverse side effects [18–20]. Non-toxic inhibitors of ABC transporters include a wide variety of natural compounds, but also widely used drugs such as non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), including diclofenac, probenecid and indomethacin, which are potent inhibitors of several isoforms of MRPs [21,22].

Thus, in the present study, the role of transportome in the MDR phenotype and whether pharmacological manipulation of essential transporters can sensitize GAC cancer cells to chemotherapy have been investigated.

Table 1
Information on patients and gastric adenocarcinoma tumors.

	Donostia Cohort	Salamanca Cohort
Patients	23	19
Age, mean \pm SD	70.3 \pm 11.3	73.1 \pm 10.3
Age, range	45–84	49–91
Male, n (%)	13 (56.5%)	11 (57.9%)
Female, n (%)	10 (43.5%)	8 (42.1%)
<i>Histologic type (Lauren classification), n (%)</i>		
Intestinal	8 (34.8%)	18 (94.7%)
Diffuse	8 (34.8%)	1 (5.3%)
Unclassifiable	7 (30.4%)	0 (0%)
<i>Tumor location, n (%)</i>		
Cardia	4 (17.4%)	2 (10.5%)
Fundus	5 (21.7%)	0 (0%)
Body	8 (34.8%)	3 (15.8%)
Antrum	6 (26.1%)	11 (57.9%)
Not available	0 (0%)	3 (15.8%)
<i>Depth of tumor invasion, n (%)</i>		
T1	0 (0%)	1 (5.3%)
T2	5 (21.7%)	1 (5.3%)
T3	18 (78.3%)	15 (79.0%)
T4	0 (0%)	2 (10.4%)
<i>Lymph node status, n (%)</i>		
NX	0 (0%)	1 (5.3%)
N0	5 (21.7%)	4 (21.1%)
N1	6 (26.1%)	5 (26.3%)
N2	7 (30.4%)	6 (31.5%)
N3	5 (21.7%)	3 (15.8%)
<i>Distant metastasis, n (%)</i>		
MX	0 (0%)	5 (26.3%)
M0	21 (91.3%)	12 (63.2%)
M1	2 (8.7%)	2 (10.5%)
<i>Tumor stage, n (%)</i>		
I	4 (17.4%)	2 (10.5%)
II	5 (21.7%)	7 (36.9%)
III	10 (43.5%)	3 (15.8%)
IV	4 (17.4%)	2 (10.5%)
Not available	0 (0%)	5 (26.3%)
<i>Differentiation grade, n (%)</i>		
Well	4 (17.4%)	10 (52.6%)
Medium	7 (30.4%)	7 (36.9%)
Poor	12 (52.2%)	0 (0%)
Not available	0 (0%)	2 (10.5%)

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

5-FU, 5(6)-carboxyfluorescein diacetate (CF), cis-diamineplatinum (II) dichloride (cisplatin), diclofenac, docetaxel, doxorubicin, etoposide, Fluo-3 acetoxymethyl ester, probenecid, propidium iodide and 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Sorafenib tosylate was obtained from Selleckchem (Deltalon, Madrid, Spain). The purity of all these compounds was $\geq 95\%$.

2.2. Cultured cells

The AGS cell line derived from human GAC was obtained from the European Collection of Authenticated Cell Cultures (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). The cells were cultured with Nutrient Mixture F-12 Ham medium (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) supplemented with 13.8 mM sodium bicarbonate, 1% Glutamax, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin solution, all supplied by Thermo Fisher (Madrid, Spain). Cell cultures were tested by PCR to ensure the absence of mycoplasma contamination throughout the experiments by using the Mycoplasma Gel Form Kit (Biotoools B&M Labs,

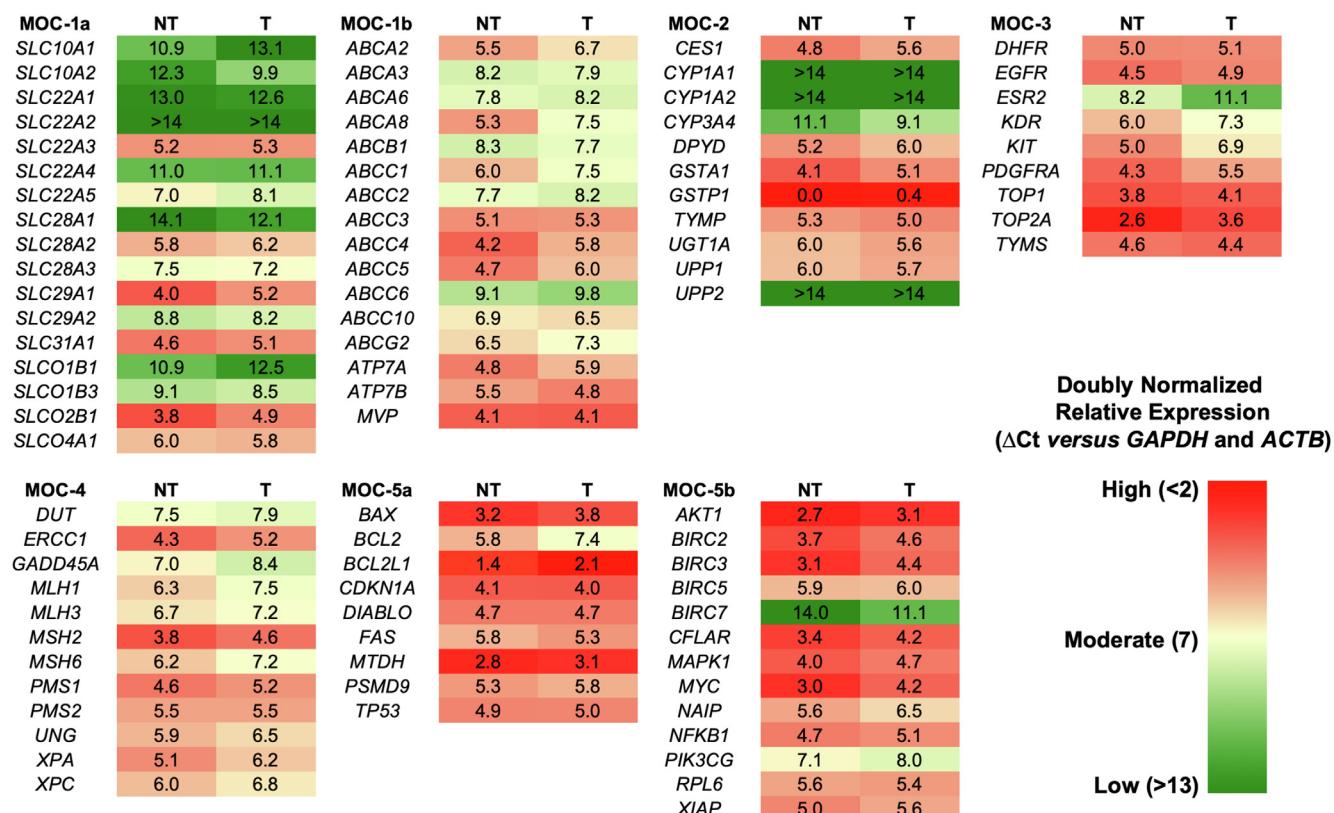


Fig. 1. Heatmap of the expression of genes involved in mechanisms of chemoresistance (MOC) determined by RT-qPCR using TLDA in two pooled samples of cDNA derived from specimens ($n = 23$) of surgically removed human gastric adenocarcinomas (T) and paired adjacent non-tumor tissue (NT). Expression levels are represented as ΔCt , which is the difference between the Ct of the target gene and that of the double normalizers GAPDH and ACTB.

Madrid, Spain).

2.3. Tumor samples

Specimens of GAC tumors (T) and adjacent non-tumor tissue (NT) were collected after partial gastrectomy at Salamanca and Donostia University Hospitals and donated for this project by the Tumor Biobanks of both Hospitals. The Ethical Committees for Clinical Research of both institutions approved the research protocols, and all patients signed written consents for the use of their samples for biomedical research. The declaration of Helsinki was followed to collect patient samples. Patient and tumor information is included in Table 1.

2.4. Determination of mRNA levels

Total RNA was extracted from tissue samples and cells using RNA mini-spin columns treated with RNase-free DNase I (GE Healthcare, Madrid, Spain) and used for cDNA synthesis using random primers and reverse transcriptase included in the SuperScript VILO cDNA Synthesis kit (Invitrogen, Thermo Fisher, Madrid, Spain) or the High Capacity Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher, Madrid, Spain). Quantitative PCR (qPCR) was performed using AmpliTaq Gold polymerase and SYBR® Green I detection kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher, Madrid, Spain) in an ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Thermo Fisher, Madrid, Spain) for single-tube assays or using Taqman Low Density Arrays (TLAs) in an ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Madrid, Spain). Sequences of gene-specific primers, spanning exon-exon junctions in the target mRNA, used for single-tube qPCR and genes included in the TLAs, are available upon request. In all cases the following thermal conditions were used: a single cycle of 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s. The

mRNA abundance was normalized based on HPRT1 or GAPDH content in AGS cells and tissues, respectively, and double normalization based on GAPDH and ACTB was used when TLDA analysis was carried out. Determination of 18S rRNA was used as a quality control check among samples.

2.5. Immunoblotting and immunofluorescence assays

For immunoblotting assays, cell lysates were prepared in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer and crude of membrane preparations were obtained as reported [23]. Immunoblotting analyses were carried out in 7.5% SDS-PAGE, loading 50 µg of protein per lane, and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Madrid, Spain). Na⁺/K⁺-ATPase was used as a membrane loading control. GAPDH was used as a normalizer for cell lysate load. Primary antibodies against MRP1 (1:1000) (clone MRPr1, ALX-801-007, Enzo Life Sciences, Palex Medical, Barcelona, Spain), MRP3 (1:500) (clone M0318, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), MRP4 (1:500) (clone M4I-10, ab15602, Abcam, Cambridge, UK), MRP5 (1:50) (clone M5I.10, AM31988SU-N, Acris Antibodies, OriGene Technologies, Herford, Germany), Na⁺/K⁺-ATPase (1:100) (clone H-300, sc-28800, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany; EP1845Y ab76020 or M8-P1-A3 ab2872 both from Abcam, Cambridge, UK) and GAPDH (1:1000) (clone 6C5, sc-32233, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), were diluted in PBS-Tween milk 1% (MRP5), 2% (MRP1, MRP4), 5% (MRP3, Na⁺/K⁺-ATPase, GAPDH). Anti-rabbit IgG, anti-rat IgG and anti-mouse IgG HRP-linked secondary antibodies (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) were diluted 1:2000. Bands of immunoreactive proteins were visualized using enhanced chemiluminescence ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany), and quantified using ImageJ software (NIH, US).

Immunofluorescent staining was performed as previously described

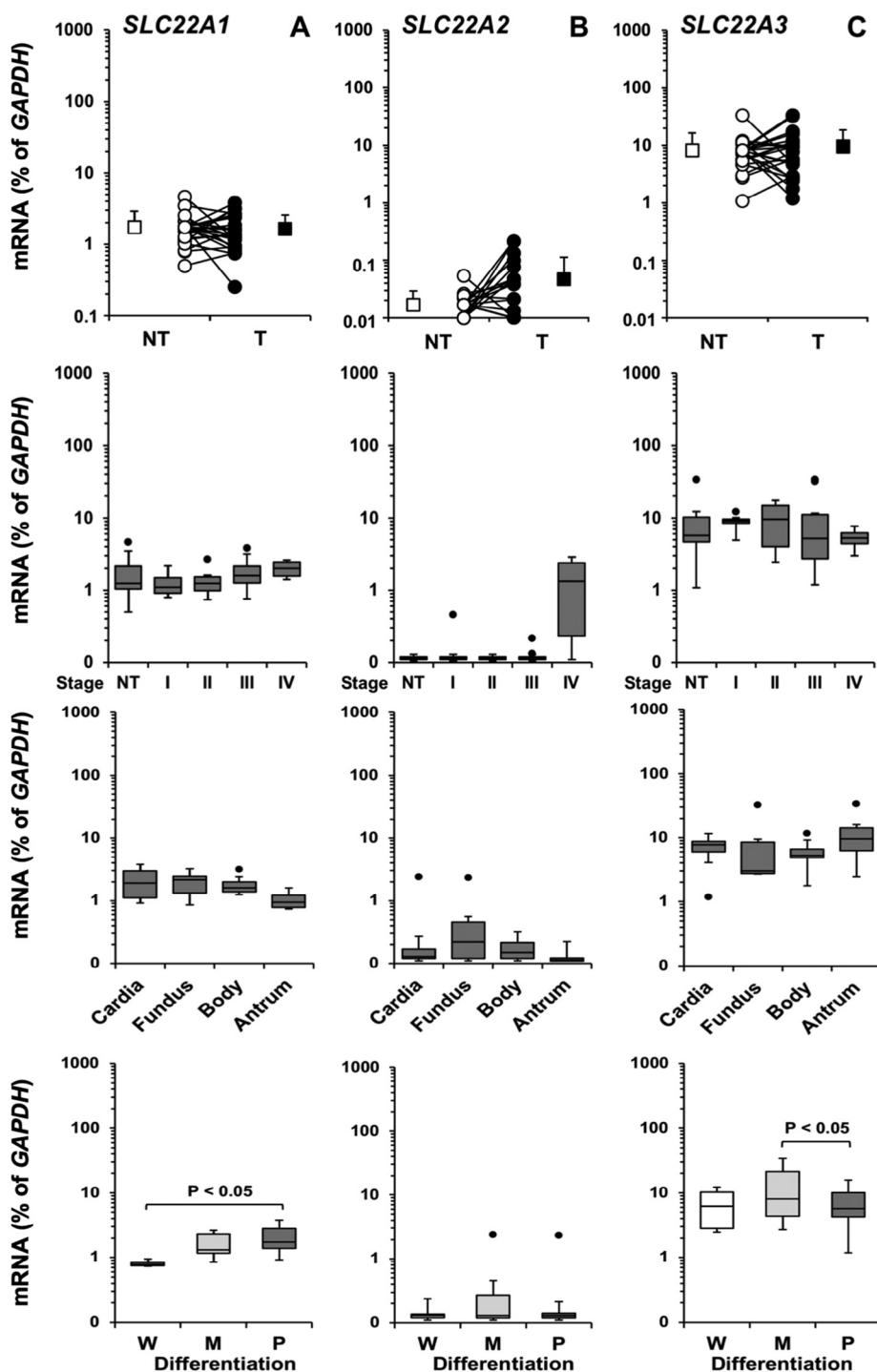


Fig. 2. Relative mRNA levels of *SLC22A1* (A), *SLC22A2* (B) and *SLC22A3* (C) in samples ($n = 23$) obtained from surgically gastric adenocarcinomas (GAC). Values are shown as mean \pm S.D. and individual paired data as determined by RT-qPCR in adjacent non-tumor tissue (NT) and in tumor (T) and expressed as a percentage of *GAPDH* expression. Box plots show the relationship between gene expression and tumor staging, different location in the stomach and degree of differentiation classified into well (W), moderately (M) and poorly (P) differentiated. The bottom, middle and top marks of each box represent the first, second and third quartiles, respectively. The lower and upper plot whiskers represent the 1.5 inter-quartile ranges (IQR) of the first and third quartiles. Dots are values exceeding whiskers and are considered outliers.

[24], on 5- μ m tumor cryosections air-dried or in cells grown on round coverslips placed on 24-well plates. Both were fixed with ice-cold methanol and blocked with 5% FBS in PBS for 30 min. Primary antibodies against MRP1 (1:40) (clone MRPr1), MRP3 (1:40) (clone M3II-9), MRP4 (1:100) (NB100-1471, Novus Biologicals, Bio-Techne R&D Systems, Madrid, Spain), MRP5 (1:25) (clone M5I.10), and Na^+/K^+ ATPase (1:100) (clone H-300, EP1845Y or M8-P1-A3) diluted in 1% fetal bovine serum in PBS were used. Appropriate secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor-488 or Alexa Fluor-594 (1:1000, Molecular Probes, Thermo Fisher, Madrid, Spain) were used. Nuclei were counterstained with DAPI (Molecular Probes, Thermo Fisher, Madrid, Spain). Confocal laser-scanning immunofluorescence microscopy was performed using a Leica TCS SP5 apparatus (Leica, Barcelona, Spain).

2.6. ABC-mediated transport assay

The activity of MRPs in AGS cells was measured by a modification of a previously described assay [24]. The cells in suspension were incubated for the indicated time at 37 °C in 100 μ l of “uptake” medium (96 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 1.1 mM KH_2PO_4 , 0.8 mM MgSO_4 , 1.8 mM CaCl_2 , 11 mM glucose, and 50 mM HEPES, pH 7.40) containing one of the following fluorescent substrates: 2 μ M Fluo-3 acetoxyethyl ester (for MRP1 and MRP2) and 1 μ M CF (for MRP3, MRP4 and MRP5). In some conditions, the MRP inhibitors probenecid and diclofenac were also added to the cells with the fluorescent substrates. This loading period was finished by dilution with 900 μ l of ice-cold uptake medium and the intracellular fluorescence was determined using a FACSCalibur

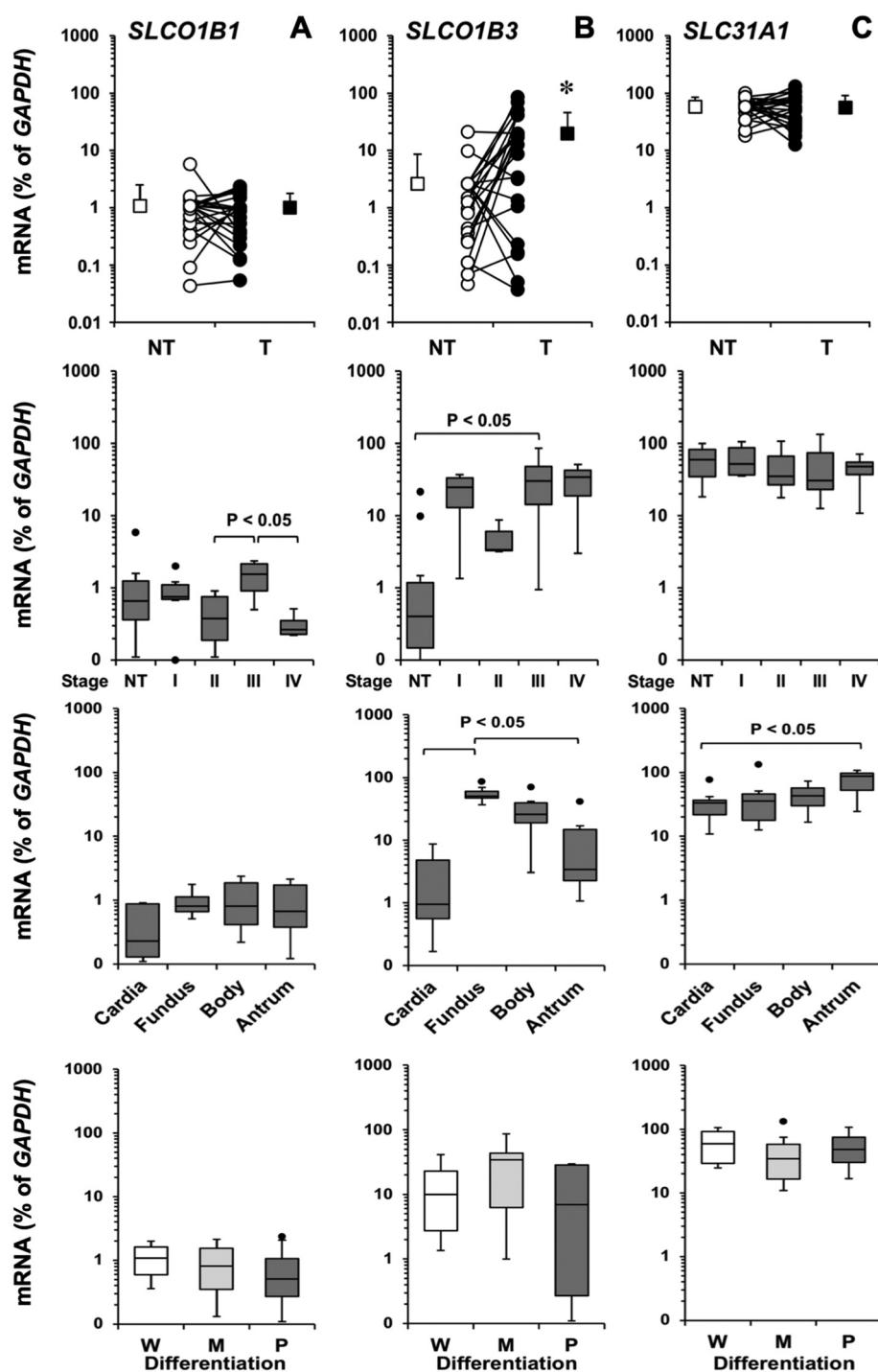


Fig. 3. Relative mRNA levels of *SLCO1B1* (A), *SLCO1B3* (B), and *SLC31A1* (C) in samples ($n = 23$) obtained from surgically resected gastric adenocarcinomas (GAC). Values are shown as mean \pm S.D. and individual paired data as determined by RT-qPCR in adjacent non-tumor tissue (NT) and in tumor (T) and expressed as a percentage of *GAPDH* expression. Box plots show the relationship between gene expression and tumor staging, different location in the stomach and degree of differentiation classified into well (W), moderately (M) and poorly (P) differentiated. The bottom, middle and top marks of each box represent the first, second and third quartiles, respectively. The lower and upper plot whiskers represent the 1.5 inter-quartile ranges (IQR) of the first and third quartiles. Dots are values exceeding whiskers and are considered outliers. *, $p < 0.05$.

flow cytometer (BD Biosciences, Madrid, Spain). Dead cells were identified by staining with propidium iodide (5 µg/ml) and excluded from data analysis.

2.7. In vitro cytostatic effect

To determine cytostatic activity 5×10^3 cell/well were plated onto 96-well plates. After 24 h, the cells were treated with different concentrations of the compound to be tested, alone or in combination with the MRP inhibitor, for the indicated time period. Cell viability was determined 72 h after exposure of cells to the drugs by the formazan test by using thiazolyl blue tetrazolium bromide (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) as a reagent.

2.8. In vivo antitumor activity

Chemosensitizing ability of diclofenac was investigated *in vivo* using the mouse xenograft model. Eight weeks old female immunodeficient nude mice (Swiss *nu/nu*) (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) were housed in sterile micro-isolator cages under controlled conditions of temperature (20 °C), humidity and light/dark cycle (12 h/12 h), and fed on standard rodent chow (Panlab, Madrid, Spain) and water *ad libitum*. Methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations and all protocols were approved by the University of Salamanca Ethical Committee for Laboratory Animals. AGS cells (2×10^6) were suspended in 100 µl RPMI medium with 100 µl Matrigel (BD Biosciences Madrid, Spain), and subcutaneously

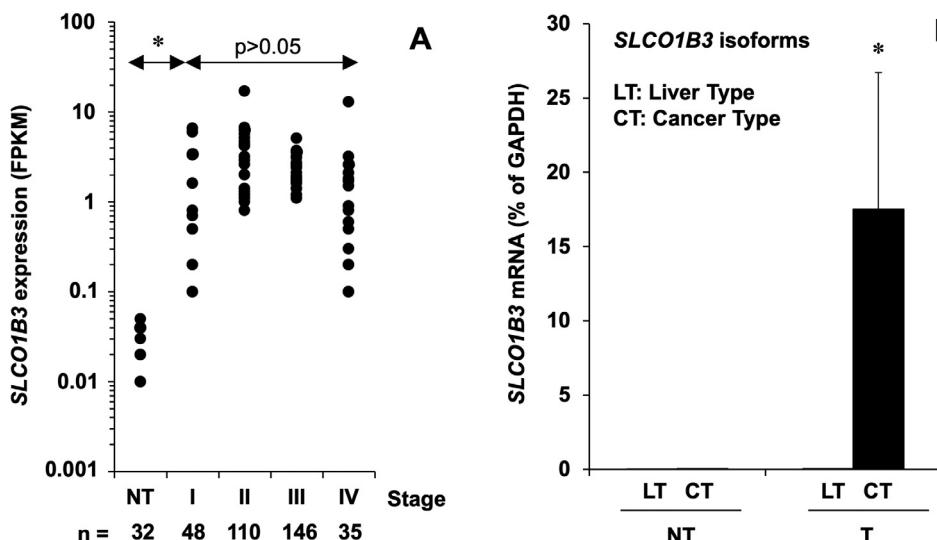


Fig. 4. Relative *SLCO1B3* mRNA levels in adjacent non-tumor tissue (NT) and gastric adenocarcinomas (GAC) at a different stage (A). Values were extracted from The Cancer Genome Atlas. Discrimination by RT-qPCR between the expression of liver-type (LT) and cancer-type (CT) *SLCO1B3* mRNA isoforms in a series of 19 paired NT and GAC specimens (T) collected at the Salamanca University Hospital (B). Values expressed as a percentage of *GAPDH* expression are mean \pm SEM. *, $p < 0.05$ as compared with NT tissue. FPKM, Fragments per kilobase million.

injected into the flanks of anesthetized nude mice. When the tumors reached $\approx 75 \text{ mm}^3$ volume (12 days after injection), the animals were randomly divided into four groups. They received (i.p.) twice a week either: i) the vehicle alone (sterile saline); ii) sorafenib (10 mg/kg b.w.); iii) diclofenac (20 mg/kg b.w.); or iv) the combination of sorafenib (10 mg/kg b.w.) and diclofenac (20 mg/kg b.w.). Owing to its low solubility in saline solution, drugs were administered as a suspension. The doses of sorafenib [23] and diclofenac [25] were selected based on previous studies. Tumor size was measured twice per week with a sliding caliper to calculate the approximate volume using the formula ($\text{length} \times \text{width}^2$)/2. After 43 days of treatment, the animals were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg b.w., i.p.) and their tumors were resected and weighed. Tissue samples were placed immediately in liquid nitrogen and stored at -80°C until used for sorafenib content determination. This was measured by HPLC-MS/MS (6410 Triple Quad LC/MS; Agilent Technologies, Santa Clara, CA), as previously reported [23].

2.9. Statistical analysis

Results were statistically analyzed using Microsoft Excel (version 15.32) and GraphPad (Prism5). Bonferroni method of multiple-range testing and paired or unpaired Student *t*-test were used as appropriate as post hoc procedures to calculate the statistical significance of differences among groups. Linear regression analysis was carried out by the Least Squares method. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Gene expression signature of chemoresistance in GAC

To get an overview of the resistome in these tumors, the expression of one hundred genes in pooled samples obtained from 23 different biopsies of GAC (T) and adjacent non-tumor (NT) tissues was determined (Fig. 1). The result revealed low expression of drug uptake transporters (MOC-1a). Only *SLC22A3*, *SLCO2B1*, *SLCO4A1*, *SLC31A1* and the nucleoside transporters *SLC28A2* and *SLC29A1* showed low or moderate expression in GAC. A moderate expression of several drug export pumps (MOC-1b) was also found. Among genes involved in drug metabolism (MOC-2), moderate (*GSTP1* and *TYMP*) and high (*GSTA1*) expression levels were found. Moderate expression of several drug targets (MOC-3), such as *TOP1*, *TOP2A*, *EGFR* and thymidylate synthase (*TYMS*), the target of 5-FU, was seen. Moderate to high expression levels of several genes involved in DNA repair (MOC-4) and survival

pathways (MOC-5) were found.

3.2. Gene expression of transporters involved in drug uptake

The expression of transporters involved in the uptake of antitumor drugs used in the treatment of GAC was re-evaluated using single-gene qPCR in T and NT samples. The results confirmed the information obtained by TLDA analysis (Fig. 1). Thus, the expression of OCTs was low (*SLC22A1* and *SLC22A2*) (Fig. 2A and B), or moderate (*SLC22A3*) (Fig. 2C) with no significant differences between T and NT tissues.

The transporter of organic anions OATP1B1 (*SLCO1B1*) was barely expressed in GAC (Fig. 3A), whereas OATP1B3 (*SLCO1B3*) was moderately expressed (Fig. 3B). In this study, primers used for qPCR detected all *SLCO1B3* mRNA variants. *SLCO1B3* expression showed intragastric regional differences but was not associated with the degree of GAC differentiation. In our cohort, a trend to higher *SLCO1B3* mRNA expression in the more advanced stage was observed, however information publicly available at the TCGA-STAD project of the NIH, although confirmed high OATP1B3 expression in GAC and the absence in NT, showed no relationship between tumor stage and *SLCO1B3* expression levels (Fig. 4A). Analysis of a different set of 19 paired specimens from the Salamanca Biobank using primers able to discriminate between liver- and cancer-type OATP1B3 mRNA variants revealed negligible expression of the liver-type in both T and NT. In contrast, almost all synthesized *SLCO1B3* mRNA in T was the cancer-type variant (Fig. 4B).

The copper transporter 1 (CTR1, *SLC31A1* gene) showed high expression in both NT and T (Fig. 3C), regardless of tumor stage and degree of differentiation, with a trend to higher expression from proximal to the distal location in the stomach.

3.3. Gene expression of transporters involved in drug efflux

In GAC, the expression of *ABCB1* (Fig. 5A) and *ABCC2* (Fig. 5C) was lower than that of *ABCC1* (Fig. 5B), *ABCC3* (Fig. 6A), *ABCC4* (Fig. 6B), and *ABCC5* (Fig. 6C), which were highly expressed in NT and T. No relationship between *ABCC1* and *ABCC3* mRNA and GAC stage was found. However, *ABCC4* expression was higher in less differentiated tumors. *ABCC3*, *ABCC4* and *ABCC5* expression was not affected by tumor location. *ABCG2*, which showed a moderate expression in NT stomach, showed variable levels of mRNA in GAC (Fig. 7A), whereas those of *ATP7A*, which was highly expressed in NT tissue, were slightly decreased (Fig. 7B) and those of *ATP7B* increased (Fig. 7C) in T versus NT. No clear association with tumor location or degree of differentiation was seen. Export pumps that showed higher mRNA levels and

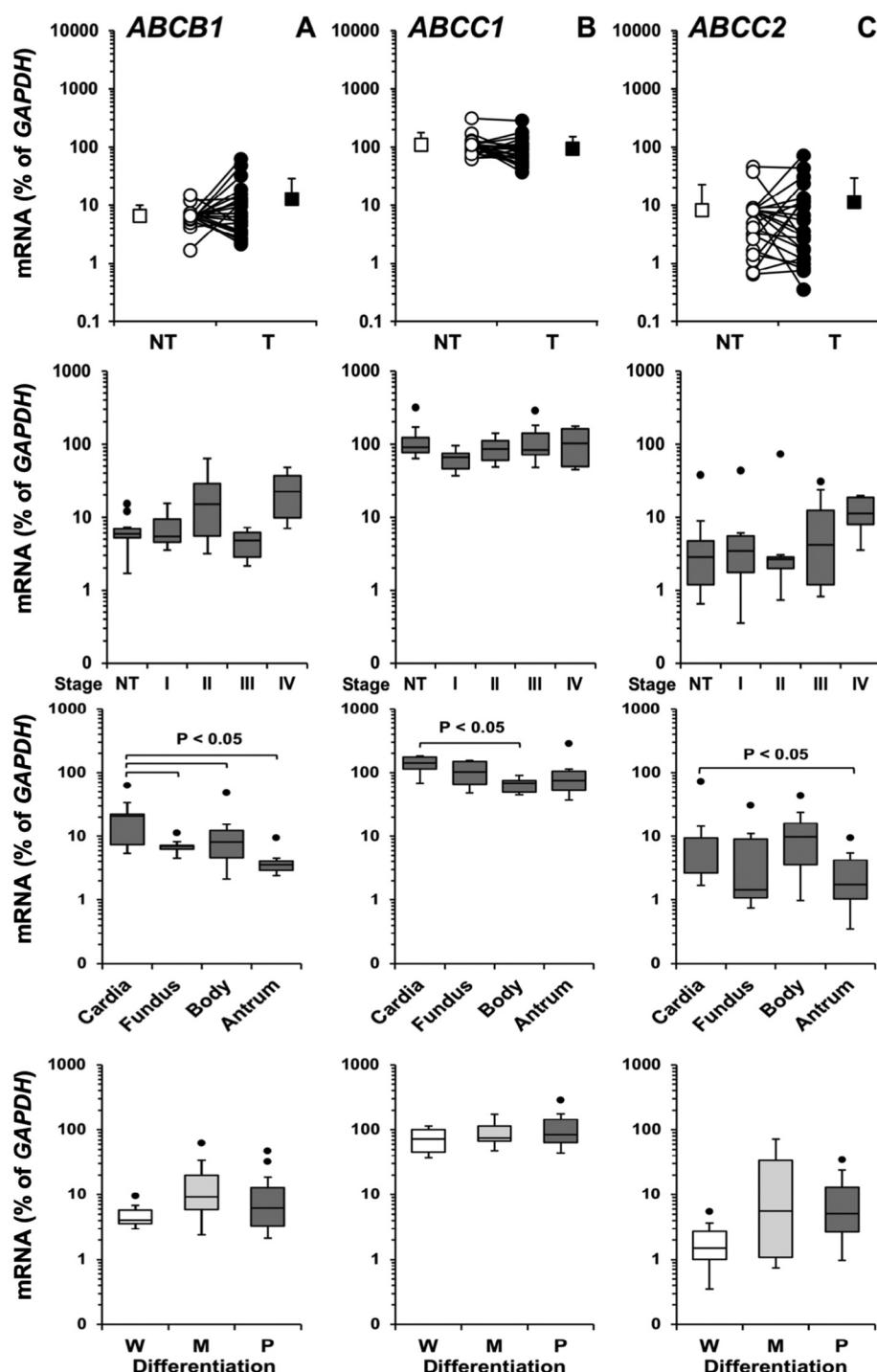


Fig. 5. Relative mRNA levels of *ABCB1* (A), *ABCC1* (B) and *ABCC2* (C) in samples ($n = 23$) obtained from surgically resected gastric adenocarcinomas (GAC). Values are shown as mean \pm SEM and individual paired data as determined by RT-qPCR in adjacent non-tumor tissue (NT) and in tumor (T) and expressed as a percentage of *GAPDH* expression. Box plots show the relationship between gene expression and tumor staging, different location in the stomach and degree of differentiation classified into well (W), moderately (M) and poorly (P) differentiated. The bottom, middle and top marks of each box represent the first, second and third quartiles, respectively. The lower and upper plot whiskers represent the 1.5 inter-quartile ranges (IQR) of the first and third quartiles. Dots are values exceeding whiskers and are considered outliers.

could be potentially involved in the transport of drugs used in the treatment of GAC were selected for further analysis of immunofluorescence in T (Fig. 8). The staining was marked for MRP1 (*ABCC1*) and MRP4 (*ABCC4*), and mild for MRP3 (*ABCC3*) and MRP5 (*ABCC5*). Co-localization with Na^+/K^+ -ATPase at the plasma membrane was particularly intense for MRP4. Interestingly, in the *in silico* study of the TCGA database on 26 paired samples of T and NT tissue, we have found a similar high expression of *ABCC1* and *ABCC4* in GAC and NT (data not shown). When the relationship between *ABCC1* and *ABCC4* expression with the probability of survival in 354 patients with GAC (TCGA-STAD project) was analyzed using the Human Protein Atlas online tool (www.proteinatlas.org), a trend to more prolonged survival in patients with GAC tumors expressing low levels of *ABCC1* and *ABCC4* was observed

(data not shown).

3.4. Effect of inhibition of MRP transporters on cell sensitivity to chemotherapy

AGS cells were used as an *in vitro* model to evaluate the role of ABC transporters in GAC chemoresistance, because mRNA levels of *ABCC1*, *ABCC3*, *ABCC4* and *ABCC5* were in the order of those found in GAC, whereas *ABCB1*, *ABCC2* and *ABCG2* expression was negligible (Fig. 9B). Western blot (Fig. 9C) analysis permitted to detect MRP1 and MRP4 in cell lysates and in crude membranes. The presence of MRP5 was clearly seen in cell lysate, while this protein was scarcely detected in crude membranes. MRP3 could not be detected by several antibodies

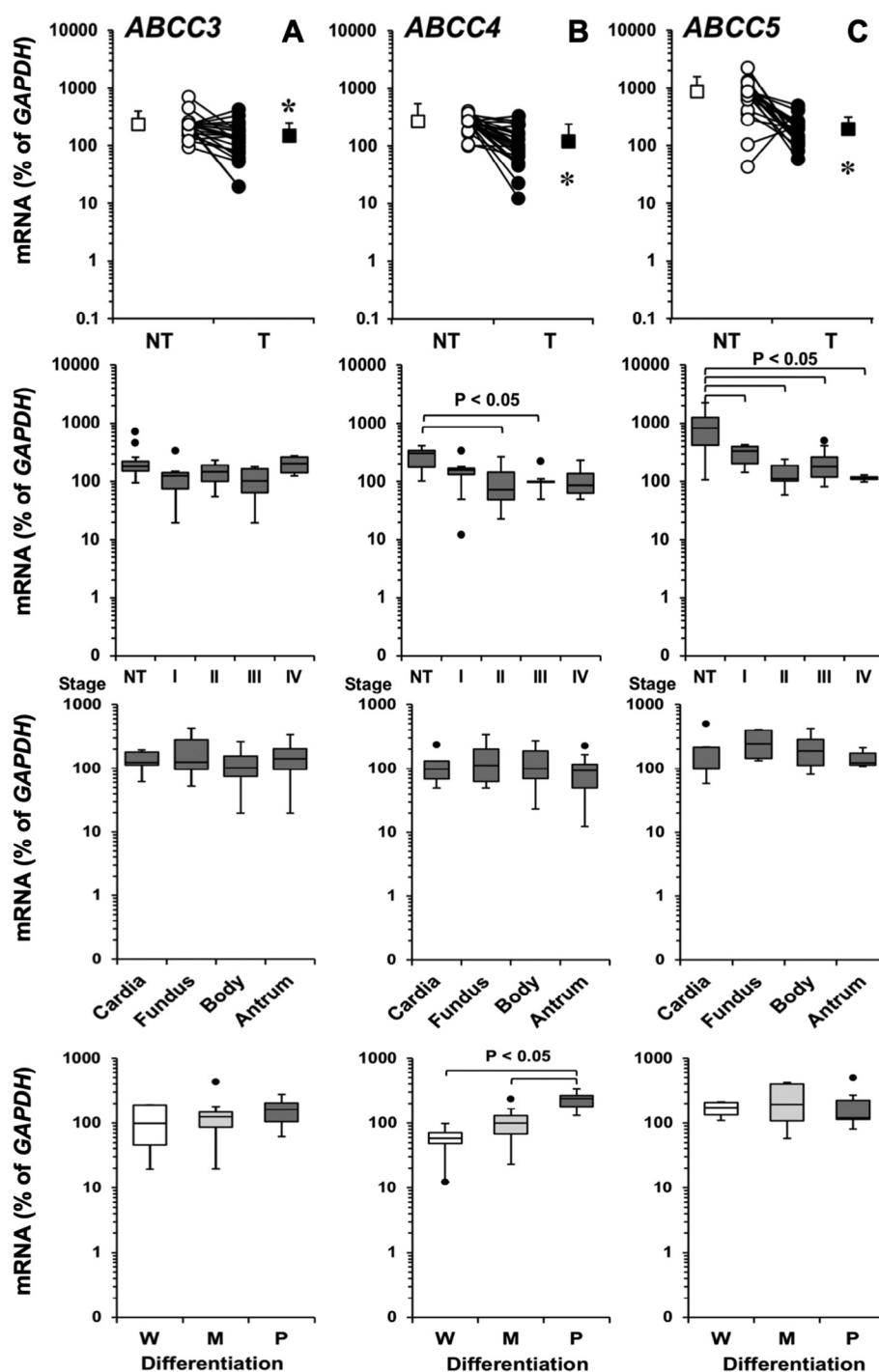


Fig. 6. Relative mRNA levels of ABCC3 (A), ABCC4 (B) and ABCC5 (C) in samples ($n = 23$) obtained from surgically resected gastric adenocarcinomas (GAC). Values are shown as mean \pm SEM and individual paired data as determined by RT-qPCR in adjacent non-tumor tissue (NT) and in tumor (T) and expressed as a percentage of GAPDH expression. Box plots show the relationship between gene expression and tumor staging, different location in the stomach and degree of differentiation classified into well (W), moderately (M) and poorly (P) differentiated. The bottom, middle and top marks of each box represent the first, second and third quartiles, respectively. The lower and upper plot whiskers represent the 1.5 inter-quartile ranges (IQR) of the first and third quartiles. Dots are values exceeding whiskers and are considered outliers. *, $p < 0.05$.

assayed for immunoblotting (data not shown). However, a weak intracellular signal of MRP3 and at the plasma membrane was detected by immunofluorescence (Fig. 9A), which could be due to the low affinity of the available primary antibody. The results of immunofluorescence analysis for the rest of MRPs are in agreement with data obtained by western blot. Functional studies showed the ability of AGS cells to take up fluorescent substrates suitable for determining in this cellular model the activity of MRP1 (Fluo-3) and MRP4 (CF). The efflux of these compounds from previously loaded AGS cells was reduced by MRP inhibitors, such as diclofenac and probenecid (Fig. 9D and E). After selecting a non-toxic concentration of diclofenac (50 μ M) and probenecid (500 μ M), their ability to sensitize AGS cells to the cytotoxic effect of antitumor drugs exported by MRPs expressed in AGS cells was

assayed (Fig. 10). Diclofenac markedly increased the response of AGS cells to sorafenib and docetaxel. The effect was milder for doxorubicin and etoposide and absent for cisplatin, 5-FU and SN-38 (Fig. 10F-H). The dependence on MRP inhibition of enhanced sensitivity to sorafenib was confirmed by using a non-toxic concentration of probenecid instead of diclofenac (Fig. 10J-K).

3.5. Diclofenac sensitized GAC tumors to sorafenib *in vivo*

The subcutaneous xenograft model in immunodeficient mice was used to evaluate the effect of inhibiting MRPs on the antitumor activity of sorafenib *in vivo*. The growth of implanted tumors derived from AGS cells was similar regardless of mice received the vehicle, diclofenac or

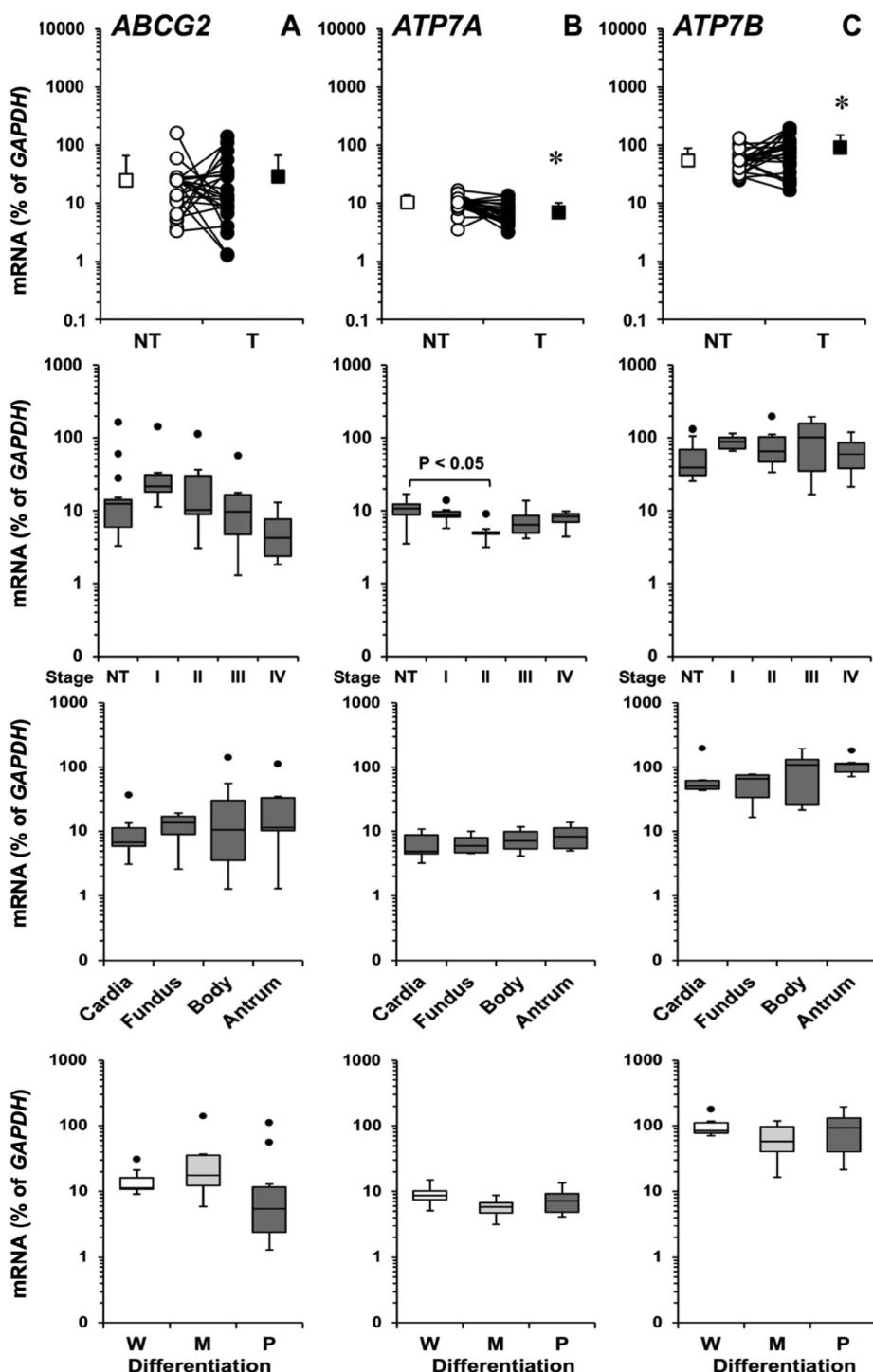


Fig. 7. Relative mRNA levels of *ABCG2* (A), *ATP7A* (B) and *ATP7B* (C) in samples ($n = 23$) obtained from surgically resected gastric adenocarcinomas (GAC). Values are shown as mean \pm SEM and individual paired data as determined by RT-qPCR in adjacent non-tumor tissue (NT) and in tumor (T) and expressed as a percentage of *GAPDH* expression. Box plots show the relationship between gene expression and tumor staging, different location in the stomach and degree of differentiation classified into well (W), moderately (M) and poorly (P) differentiated. The bottom, middle and top marks of each box represent the first, second and third quartiles, respectively. The lower and upper plot whiskers represent the 1.5 inter-quartile ranges (IQR) of the first and third quartiles. Dots are values exceeding whiskers and are considered outliers. *, $p < 0.05$.

sorafenib alone. In contrast, a marked tumor suppression effect was observed in the group of mice treated with sorafenib plus diclofenac (Fig. 11A). At the end of treatment, both tumor size (Fig. 11B) and weight (Fig. 11C) were lower in the group of mice that received combined chemotherapy. These findings were consistent with the observation that sorafenib accumulation was significantly higher in tumors resected from mice that had received sorafenib plus diclofenac in comparison with mice treated only with sorafenib (Fig. 11D). Biochemical profiles analyzed in the serum of these animals in all experimental groups did not reveal any sign of hepatic or renal toxicity (data not shown).

4. Discussion

In search of novel targets for chemosensitizing strategies, we have characterized the transcriptomic signature of GAC chemoresistance. Although evidence for the role of genes involved in MOC-2 to MOC-5 has been found, in the present study, we have focused our investigation on genes involved in determining intracellular drug concentrations. The most relevant finding was that the cells derived from GAC become sensitive to certain anticancer drugs in the presence of MRP inhibitors diclofenac and probenecid. Nevertheless, other interesting observations are described by the present study.

Regarding primary transporters involved in drug uptake, OATP1B3

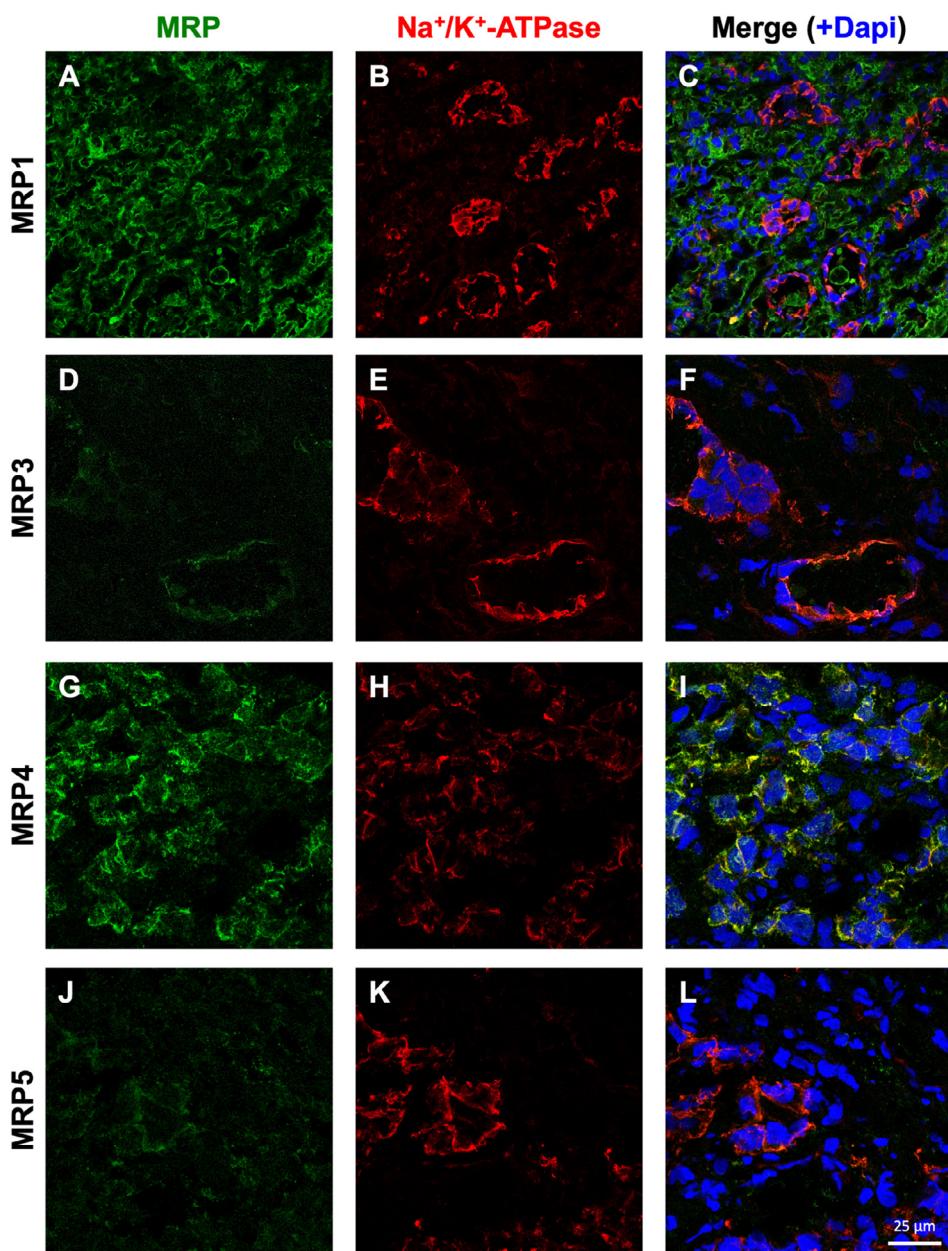


Fig. 8. Representative images of immunofluorescence localization of MRP1 (A–C), MRP3 (D–F), MRP4 (G–I) and MRP5 (J–L) in gastric adenocarcinoma. Cryosections were stained with anti-MRP1 (A), anti-MRP3 (D), anti-MRP4 (G), anti-MRP5 (J) (green) and anti- Na^+/K^+ -ATPase (B, E, H, K) (red) antibodies. Nuclei were stained with DAPI (blue).

upregulation in GAC was remarkable, which has also been reported in other types of cancer, such as colon, breast and prostate [26]. This observation was mainly due to the appearance of a cancer-type *SLCO1B3* mRNA variant. Although its functional significance is still controversial [15,27], its absence in the healthy stomach is an attractive characteristic that supports the possibility of using this variant as a biomarker for GAC, as has been already suggested for colorectal cancer [28]. Also involved in MOC-1a, the high expression of CTR1, which plays a significant role in cisplatin uptake, suggested that the cause of the poor response of GAC to platinum derivatives [29] is not due to the lack of uptake through CTR1.

Regarding MOC-1b, the low or moderate expression of *ABCB1*, *ABCC2*, and *ABCG2* in GAC specimens and AGS cells indicates that these pumps play a minor role in the MDR of this cancer. In contrast, MRP1, MRP3, MRP4 and MRP5 were markedly expressed in GAC, and hence, they might be potentially involved in the chemoresistance of this

cancer. Moreover, the contribution to GAC chemoresistance of other non-ABC pumps that have been associated with a less critical role in the lack of response to platinum-derived drugs, such as *ATP7A* [30] and *ATP7B* [31,32], cannot be ruled out.

Several compounds have shown promising properties *in vitro* overcoming MDR phenotype by blocking drug efflux from tumor cells, but most of them have not achieved clinical approval due to their reduced efficacy or their dangerous side effects *in vivo*. In the present study, we have evaluated the possibility of using already licensed drugs, which could simplify the translation of chemosensitizers to actual clinical practice. In this sense, some NSAIDs, including diclofenac and probenecid, are known to inhibit MRP-mediated transport both *in vitro* [21,22] and *in vivo* [21]. On the other hand, NSAIDs have been already studied to evaluate their ability to increase the sensitivity to antitumor drugs, such as doxorubicin, daunorubicin and epirubicin, but had shown no effect in other treatments such as those based on 5-FU and

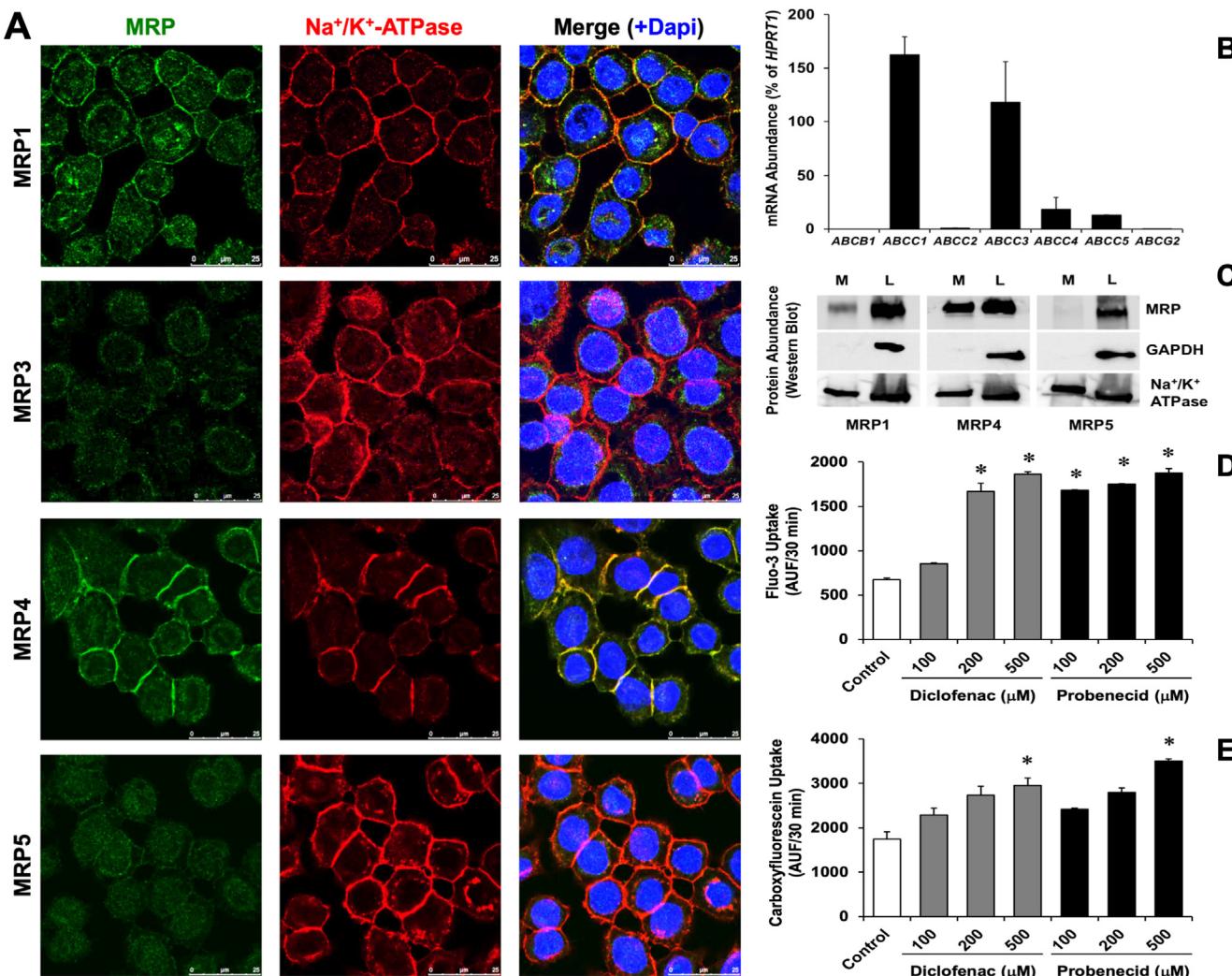


Fig. 9. Representative images of AGS cells after immunofluorescence detected by confocal microscopy of MRP1, MRP3, MRP4 and MRP5 stained with anti-MRP (green) and anti-Na⁺/K⁺ ATPase (red) antibodies. Nuclei were stained with DAPI (blue) (A). Relative mRNA levels of ABCB1, ABCC1-5 and ABCG2 in AGS cells. Values are mean ± SEM of measurements of two AGS cultures performed in duplicate by RT-qPCR and expressed as a percentage of HPRT1 expression in each sample (B). Representative image of one of the five immunoblotting analyses carried out to detect MRP1, MRP4 and MRP5 in AGS cells. Cells were collected to obtain the cell lysates (L) and crude of membranes (M). Proteins (50 μg/lane) were separated by 7.5% SDS-PAGE. GAPDH and Na⁺/K⁺-ATPase were used as normalizers (C). Effect of the MRP inhibitors diclofenac and probenecid on the uptake of Fluo-3 (D) and carboxyfluorescein (E). Cells were incubated with 2 μM Fluo-3 acetoxymethyl ester or 1 μM carboxyfluorescein diacetate, with or without the indicated concentrations of inhibitor, at 37 °C for 30 min and the mean fluorescence intensity (Arbitrary Units of Fluorescence, AUF) was determined by flow cytometry. Values are expressed as mean ± S.D. from 9 assays per data point carried out in 3 different cultures. *, p < 0.05, as compared with Control.

cisplatin [33]. Diclofenac, an NSAID of choice in the clinical treatment of inflammation, has an inhibitory effect on ABC transporters, including MRP1, MRP2, MRP4 and BCRP [21,34]. The present study showed that diclofenac increased the sensitivity of GAC cells to doxorubicin, docetaxel, and etoposide. Moreover, we also found a marked sensitization to sorafenib, a TKI previously used in the treatment of advanced GAC [35]. Of note, diclofenac increased the response of GAC to sorafenib both *in vitro* and *in vivo* using non-toxic doses of the sensitizing agent, which is of great importance for the potential translation to clinical treatment of GAC. Interestingly, the use of NSAIDs has also been associated with a lower risk of developing gastric cancer [36].

Regarding the pumps involved in the mechanism of action of the sensitizing strategy, the results obtained in the present study suggested that enhanced sensitivity to anticancer drugs was mainly due to inhibition of MRP1 and MRP4. Although high levels of mRNA of both MRP3 and MRP5, were found in GAC, and MRP3 has been associated with enhanced resistance to sorafenib in other tumors expressing high levels of this pump (e.g., hepatocellular carcinoma [37]), the absence or

weak expression of these proteins at the plasma membrane of cancer cells suggested a low relevance of these pumps in the MDR phenotype of GAC, and hence in its chemosensitization.

MRP1 is known to export anthracyclines (doxorubicin, epirubicin), colchicine, Vinca alkaloids (vincristine), taxanes and epipodophylotoxins (etoposide) [38]. In GAC cells, MRP1 expression has been inversely correlated with their sensitivity to etoposide [39]. On the other hand, in the healthy stomach, MRP4 participates in the transport of oral TKIs, such as dasatinib [40]. MRP4 up-regulation in other tumors, such as hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma, has been described as a shared feature of their resistome profile [41]. Moreover, MRP4 expression is increased (> 10-fold) in liver cancer cells when their chemoresistance is induced by incubation with cisplatin [41,42]. In preliminary experiments, we have found evidence for enhanced resistance to sorafenib of cells with induced MRP4 overexpression [43]. Thus, both MRP1 and MRP4 are candidates to be involved in diclofenac-induced enhanced sensitivity to sorafenib.

In sum, our results indicate that export pumps of the MRP family

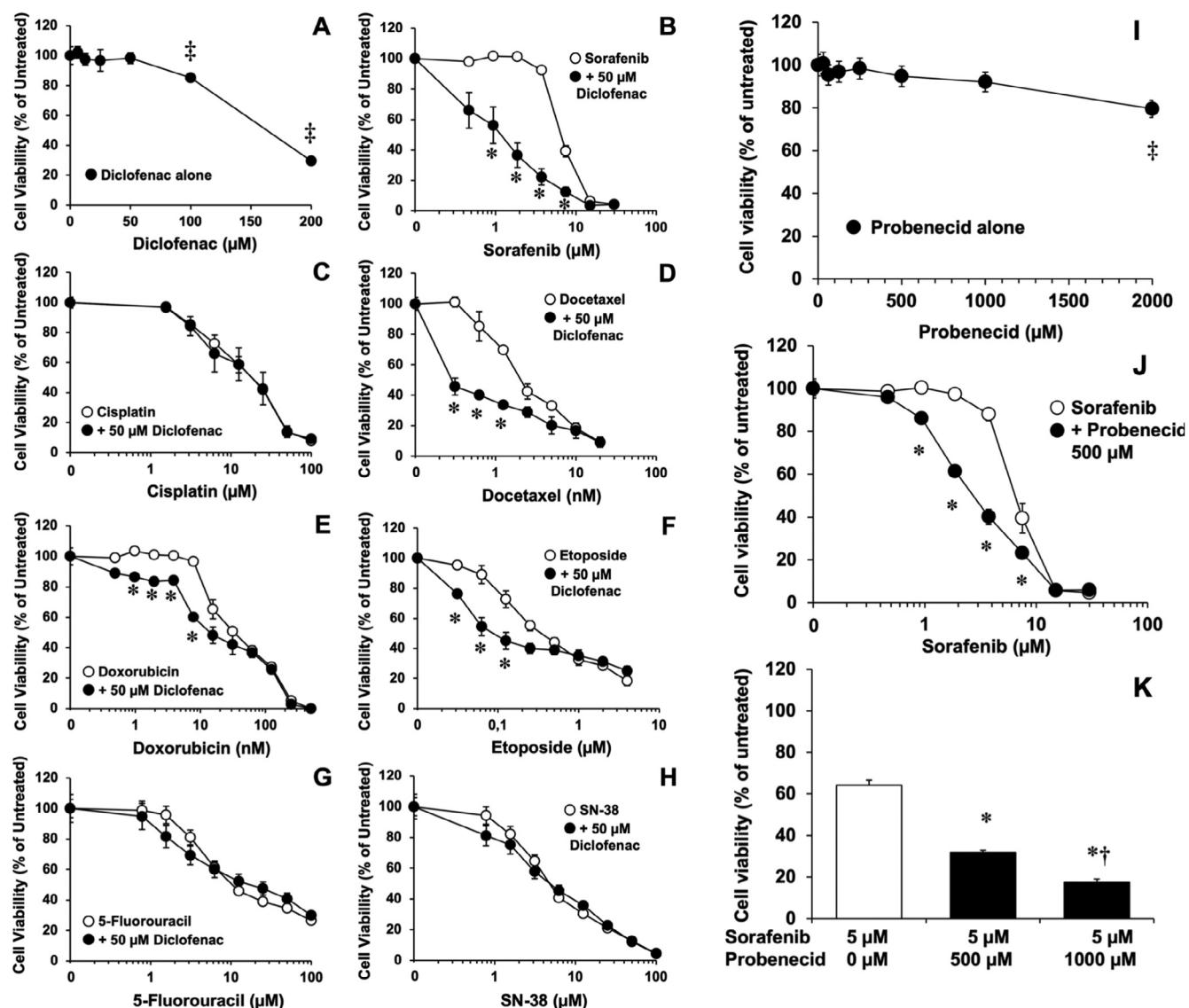


Fig. 10. Cytostatic effect on AGS cells of diclofenac alone (A) or in combination with sorafenib (B), cisplatin (C), docetaxel (D), doxorubicin (E), etoposide (F), 5-fluorouracil (G), or SN-38 (H). AGS cells were cultured with these drugs alone (Control) or in combination with 50 μ M diclofenac for 72 h. Viability of AGS cells after incubation with probenecid alone (I) or in combination with sorafenib at the indicated concentrations of both drugs (J and K) for 72 h. The MTT-formazan test was used to measured cell viability. Values are expressed as percentages of untreated cells (mean \pm SEM) measured in 9 separate plates from 3 different cultures. \ddagger , $p < 0.05$, as compared with untreated cells; *, $p < 0.05$, as compared with cells receiving sorafenib, diclofenac or probenecid alone (Control); †, $p < 0.05$, on comparing cells treated with 500 μ M vs. 1000 μ M probenecid.

play an essential role in the lack of response of GAC to chemotherapy. Moreover, sorafenib and other TKIs, at present considered useless to treat GAC, may become active antitumor agents when co-administered with diclofenac. These findings might have a significant impact on clinical practice in the foreseeable future because owing to the poor prognosis of GAC and the lack of response to available chemotherapy, the conclusion of the present study, which requires confirmation by further clinical investigation, constitutes a funded hope to make a dramatic change in the outcome of these patients by the simple addition of a safe drug like diclofenac to their pharmacological treatment.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

Part of the results included in the present study was based on data generated by the TCGA Research Network (<https://www.cancer.gov/tcga>).

This study was supported by the Carlos III Institute of Health, Spain (PI16/00598 and PI19/00819) co-financed by European Regional Development Fund; Ministry of Science and Innovation, Spain (SAF2016-75197-R); “Asociación Española Contra el Cáncer”, Spain (AECC-Tumores Raros-2017/2020); and “Centro Internacional sobre el Envejecimiento”, Spain (OLD-HEPAMARKER, 0348_CIE_6_E), co-financed with European Union ERDF funds and the COST action EUROCCHOLANGIO-NET (OC-2018-1-22912) funded by the European Union.

RAA was supported by a pre-doctoral contract funded by the “Junta de Castilla y León, Fondo Social Europeo” (EDU/828/2014). LPS has been funded by the “Instituto de Salud Carlos III” and the “Fondo Social Europeo”, Spain (FI17/00149). EL was supported by a post-doctoral contract by the University of Salamanca (2018) Spain.

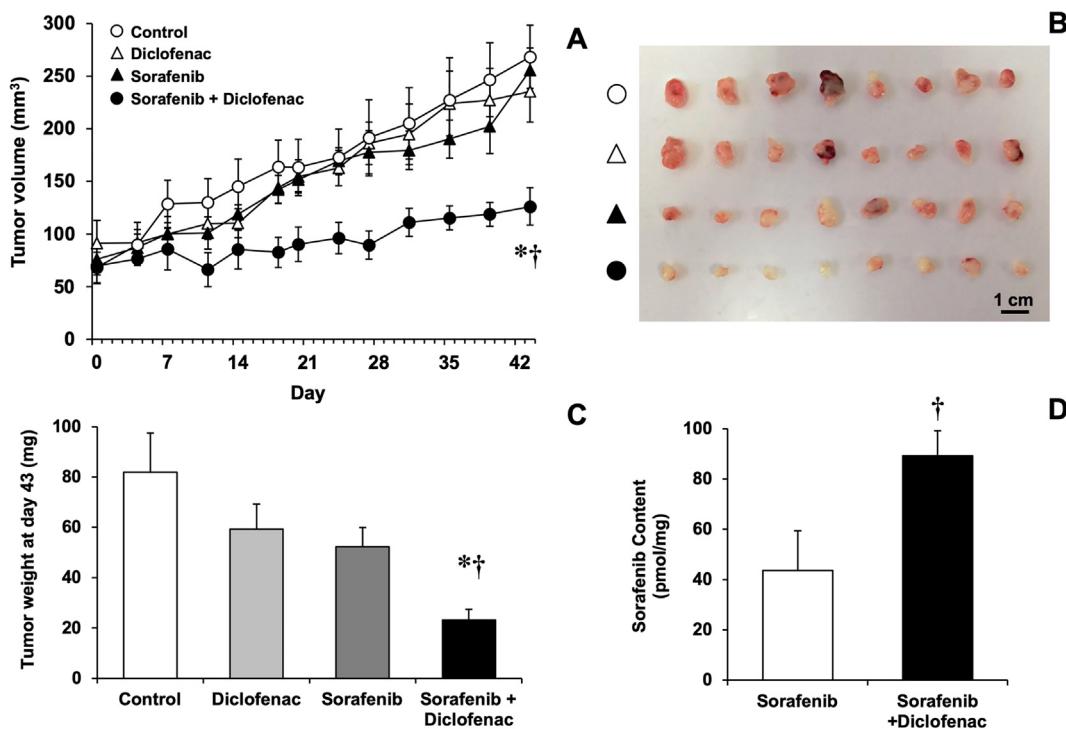


Fig. 11. Effect of diclofenac on sorafenib-induced tumor growth inhibition in xenograft tumors derived from AGS cells subcutaneously implanted in immunodeficient mice. Time-course of tumor growth in nude mice bearing subcutaneously implanted AGS cells treated (i.p.) with sorafenib (10 mg/kg b.w., twice a week), diclofenac (20 mg/kg b.w., twice a week) or both in combination (A). Treatments started when the tumors reached $\approx 75 \text{ mm}^3$ volume. Image of tumors resected from mice at the end of the experimental period (43 days), when the animals were sacrificed (B), the tumors were weighed (C) and their sorafenib content was measured by HPLC-MS/MS (D). Values are expressed as mean \pm S.D. ($n = 8$ per group). * $p < 0.05$, as compared with the group that received saline (Control). †, $p < 0.05$, as compared with the group treated with sorafenib alone.

Ethics approval and consent to participate

The Ethical Committees for Clinical Research of Salamanca and Donostia University Hospitals approved the research protocols, and all patients signed written consents for the use of their samples for biomedical research.

In experiments with mice, the methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations and all protocols were approved by the University of Salamanca Ethical Committee for Laboratory Animals.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and material

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

Study concept and design: OB, LB, JJGM.
 Experimental studies: RAA, LPS, EL, EH, OB.
 Data acquisition: RAA, LPS, EL, RIRM, EH, MA, NS, OB.
 Statistical analysis: RAA, LPS.
 Interpretation of data: EL, EH, OB, RAA, LPS, RIRM, JJGM.
 Obtained funding: OB, RIRM, LB, JJGM.
 Drafting of the manuscript: RAA, OB, JJGM.

References

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J. Clin.* 68 (6) (2018) 394–424.
- [2] Z. Song, Y. Wu, J. Yang, D. Yang, X. Fang, Progress in the treatment of advanced gastric cancer, *Tumour Biol.* 39 (7) (2017), <https://doi.org/10.1177/101042817714626>.
- [3] P.H. Green, K.M. O'Toole, D. Slonim, T. Wang, A. Weg, Increasing incidence and excellent survival of patients with early gastric cancer: experience in a United States medical center, *Am. J. Med.* 85 (5) (1988) 658–661.
- [4] B.J. Dicken, D.L. Bigam, C. Cass, J.R. Mackey, A.A. Joy, S.M. Hamilton, Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions, *Ann. Surg.* 241 (1) (2005) 27–39.
- [5] D. Takahashi, Second-line chemotherapy for patients with advanced gastric cancer, *Gastric Cancer* 20 (3) (2017) 395–406.
- [6] D.C. Lazar, S. Taban, M. Cornianu, A. Faur, A. Goldis, New advances in targeted gastric cancer treatment, *World J. Gastroenterol.* 22 (30) (2016) 6776–6799.
- [7] G. Tirino, L. Pompella, A. Petrillo, M.M. Laterza, A. Pappalardo, M. Caterino, M. Orditura, F. Ciardiello, G. Galizia, F. De Vita, What's new in gastric cancer: the therapeutic implications of molecular classifications and future perspectives, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (9) (2018).
- [8] J.J. Marin, R. Al-Abdulla, E. Lozano, O. Briz, L. Bujanda, J.M. Banales, R.I. Macias, Mechanisms of resistance to chemotherapy in gastric cancer, *Anticancer Agents Med. Chem.* 16 (3) (2016) 318–334.
- [9] J.J. Marin, M.R. Romero, P. Martinez-Becerra, E. Herraez, O. Briz, Overview of the molecular bases of resistance to chemotherapy in liver and gastrointestinal tumours, *Curr. Mol. Med.* 9 (9) (2009) 1108–1129.
- [10] J.J. Marin, M.R. Romero, O. Briz, Molecular bases of liver cancer refractoriness to pharmacological treatment, *Curr. Med. Chem.* 17 (8) (2010) 709–740.
- [11] J.J.G. Marin, O. Briz, E. Herraez, E. Lozano, M. Asensio, S. Di Giacomo, M.R. Romero, L.M. Osorio-Padilla, A.I. Santos-Llamas, M.A. Serrano, C. Armengol, T. Efferth, R.I.R. Macias, Molecular bases of the poor response of liver cancer to chemotherapy, *Clin. Res. Hepatol.* 42 (3) (2018) 182–192.
- [12] J.J. Marin, M.J. Monte, A.G. Blazquez, R.I. Macias, M.A. Serrano, O. Briz, The role of reduced intracellular concentrations of active drugs in the lack of response to anticancer chemotherapy, *Acta Pharmacol. Sin.* 35 (1) (2014) 1–10.
- [13] J.J. Marin, O. Briz, M.J. Monte, A.G. Blazquez, R.I. Macias, Genetic variants in genes involved in mechanisms of chemoresistance to anticancer drugs, *Curr. Cancer Drug Targets* 12 (4) (2012) 402–438.
- [14] R. Al-Abdulla, L. Perez-Silva, L. Abete, M.R. Romero, O. Briz, J.J.G. Marin, Unraveling 'The Cancer Genome Atlas' information on the role of SLC transporters

- in anticancer drug uptake, *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 12 (4) (2019) 329–341.
- [15] M. Nagai, T. Furihata, S. Matsumoto, S. Ishii, S. Motohashi, I. Yoshino, M. Ugajin, A. Miyajima, S. Matsumoto, K. Chiba, Identification of a new organic anion transporting polypeptide 1B3 mRNA isoform primarily expressed in human cancerous tissues and cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 418 (4) (2012) 818–823.
- [16] O. Briz, L. Perez-Silva, R. Al-Abdulla, L. Abete, M. Reviejo, M.R. Romero, J.J.G. Marin, What “The Cancer Genome Atlas” database tells us about the role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in chemoresistance to anticancer drugs, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 15 (7) (2019) 577–593.
- [17] R. Safaei, Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs, *Cancer Lett.* 234 (1) (2006) 34–39.
- [18] E. Mizukoshi, H. Nakagawa, M. Kitahara, T. Yamashita, K. Arai, H. Sunagozaka, N. Iida, K. Fushimi, S. Kaneko, Phase I trial of multidrug resistance-associated protein 1-derived peptide in patients with hepatocellular carcinoma, *Cancer Lett.* 369 (1) (2015) 242–249.
- [19] I.E. Kuppens, E.O. Witteveen, R.C. Jewell, S.A. Radema, E.M. Paul, S.G. Mangum, J.H. Beijnen, E.E. Voest, J.H. Schellens, A phase I, randomized, open-label, parallel-cohort, dose-finding study of elacridar (GF120918) and oral topotecan in cancer patients, *Clin. Cancer Res.* 13 (11) (2007) 3276–3285.
- [20] R. O'Connor, M. O'Leary, J. Ballot, C.D. Collins, P. Kinsella, D.E. Mager, R.D. Arnold, L. O'Driscoll, A. Larkin, S. Kennedy, D. Fennelly, M. Clynes, J. Crown, A phase I clinical and pharmacokinetic study of the multi-drug resistance protein-1 (MRP-1) inhibitor sulindac, in combination with epirubicin in patients with advanced cancer, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 59 (1) (2007) 79–87.
- [21] A.A. El-Sheikh, J.J. van den Heuvel, J.B. Koenderink, F.G. Russel, Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with multidrug resistance protein (MRP) 2/ABCC2- and MRP4/ABCC4-mediated methotrexate transport, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320 (1) (2007) 229–235.
- [22] S. Gollapudi, C.H. Kim, B.N. Tran, S. Sangha, S. Gupta, Probenecid reverses multidrug resistance in multidrug resistance-associated protein-overexpressing HL60/AR and H69/AR cells but not in P-glycoprotein-overexpressing HL60/Tax and P388/ADR cells, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 40 (2) (1997) 150–158.
- [23] R. Al-Abdulla, E. Lozano, R.I.R. Macias, M.J. Monte, O. Briz, C.J. O'Rourke, M.A. Serrano, J.M. Banales, M.A. Avila, M.L. Martinez-Chantar, A. Geier, J.B. Andersen, J.J.G. Marin, Epigenetic events involved in organic cation transporter 1-dependent impaired response of hepatocellular carcinoma to sorafenib, *Br. J. Pharmacol.* 176 (6) (2019) 787–800.
- [24] E. Lozano, M.J. Monte, O. Briz, A. Hernandez-Hernandez, J.M. Banales, J.J. Marin, R.I. Macias, Enhanced antitumour drug delivery to cholangiocarcinoma through the apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT), *J. Control. Release* 216 (2015) 93–102.
- [25] B.L. Valle, T. D'Souza, K.G. Becker, W.H. Wood 3rd, Y. Zhang, R.P. Wersto, P.J. Morin, Non-steroidal anti-inflammatory drugs decrease E2F1 expression and inhibit cell growth in ovarian cancer cells, *PLoS One* 8 (4) (2013) e61836.
- [26] M. Svoboda, J. Riha, K. Wlcek, W. Jaeger, T. Thalhammer, Organic anion transporting polypeptides (OATPs): regulation of expression and function, *Curr. Drug Metab.* 12 (2) (2011) 139–153.
- [27] N. Thakkar, K. Kim, E.R. Jang, S. Han, K. Kim, D. Kim, N. Merchant, A.C. Lockhart, W. Lee, A cancer-specific variant of the SLCO1B3 gene encodes a novel human organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) localized mainly in the cytoplasm of colon and pancreatic cancer cells, *Mol. Pharm.* 10 (1) (2013) 406–416.
- [28] H. Morio, Y. Sun, M. Harada, H. Ide, O. Shimozato, X. Zhou, K. Higashi, R. Yuki, N. Yamaguchi, J.P. Hofbauer, C. Guttmann-Gruber, N. Anzai, H. Akita, K. Chiba, T. Furihata, Cancer-type OATP1B3 mRNA in extracellular vesicles as a promising candidate for a serum-based colorectal cancer biomarker, *Biol. Pharm. Bull.* 41 (3) (2018) 445–449.
- [29] A.D. Wagner, N.L. Syn, M. Moehler, W. Grothe, W.P. Yong, B.C. Tai, J. Ho, S. Unverzagt, Chemotherapy for advanced gastric cancer, *Cochrane Database Syst. Rev.* 8 (2017) CD004064.
- [30] C.C. Chen, L.T. Chen, T.C. Tsou, W.Y. Pan, C.C. Kuo, J.F. Liu, S.C. Yeh, F.Y. Tsai, H.P. Hsieh, J.Y. Chang, Combined modalities of resistance in an oxaliplatin-resistant human gastric cancer cell line with enhanced sensitivity to 5-fluorouracil, *Br. J. Cancer* 97 (3) (2007) 334–344.
- [31] M. Ohbu, K. Ogawa, S. Konno, A. Kanazaki, K. Terada, T. Sugiyama, Y. Takebayashi, Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is expressed in human gastric carcinoma, *Cancer Lett.* 189 (1) (2003) 33–38.
- [32] K. Leonhardt, R. Gebhardt, J. Mossner, S. Lutsenko, D. Huster, Functional interactions of Cu-ATPase ATP7B with cisplatin and the role of ATP7B in the resistance of cells to the drug, *J. Biol. Chem.* 284 (12) (2009) 7793–7802.
- [33] C.P. Duffy, C.J. Elliott, R.A. O'Connor, M.M. Heenan, S. Coyle, I.M. Cleary, K. Kavanagh, S. Verhaegen, C.M. O'Loughlin, R. NicAmhlaoibh, M. Clynes, Enhancement of chemotherapeutic drug toxicity to human tumour cells in vitro by a subset of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), *Eur. J. Cancer* 34 (8) (1998) 1250–1259.
- [34] S.K. Pandey, S. Yadav, Y. Goel, M.K. Temre, V.K. Singh, S.M. Singh, Molecular docking of anti-inflammatory drug diclofenac with metabolic targets: potential applications in cancer therapeutics, *J. Theor. Biol.* 465 (2019) 117–125.
- [35] R. Cheng, H. Yong, Y. Xia, Q. Xie, G. Gao, X. Zhou, Chemotherapy regimen based on sorafenib combined with 5-FU on HIF-1alpha and VEGF expression and survival in advanced gastric cancer patients, *Oncol. Lett.* 13 (4) (2017) 2703–2707.
- [36] X.Z. Huang, Y. Chen, J. Wu, X. Zhang, C.C. Wu, C.Y. Zhang, S.S. Sun, W.J. Chen, Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs use reduce gastric cancer risk: a dose-response meta-analysis, *Oncotarget* 8 (3) (2017) 4781–4795.
- [37] T. Tomonari, S. Takeishi, T. Taniguchi, T. Tanaka, H. Tanaka, S. Fujimoto, T. Kimura, K. Okamoto, H. Miyamoto, N. Muguruma, T. Takayama, MRP3 as a novel resistance factor for sorafenib in hepatocellular carcinoma, *Oncotarget* 7 (6) (2016) 7207–7215.
- [38] D.R. Hipfner, R.G. Deeley, S.P. Cole, Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1, *Biochim. Biophys. Acta* 1461 (2) (1999) 359–376.
- [39] W. Obuchi, S. Ohtsuki, Y. Uchida, K. Ohmine, T. Yamori, T. Terasaki, Identification of transporters associated with Etoposide sensitivity of stomach cancer cell lines and methotrexate sensitivity of breast cancer cell lines by quantitative targeted absolute proteomics, *Mol. Pharmacol.* 83 (2) (2013) 490–500.
- [40] B.D. Furmanski, S. Hu, K.I. Fujita, L. Li, A.A. Gibson, L.J. Janke, R.T. Williams, J.D. Schuetz, A. Sparreboom, S.D. Baker, Contribution of ABCC4-mediated gastric transport to the absorption and efficacy of dasatinib, *Clin. Cancer Res.* 19 (16) (2013) 4359–4370.
- [41] P. Martinez-Becerra, J. Vaquero, M.R. Romero, E. Lozano, C. Anadon, R.I. Macias, M.A. Serrano, N. Grane-Boladeras, L. Munoz-Bellvis, L. Alvarez, B. Sangro, M. Pastor-Anglada, J.J. Marin, No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors, *Mol. Pharm.* 9 (6) (2012) 1693–1704.
- [42] T. Wakamatsu, Y. Nakahashi, D. Hachimine, T. Seki, K. Okazaki, The combination of glycyrrhizin and lamivudine can reverse the cisplatin resistance in hepatocellular carcinoma cells through inhibition of multidrug resistance-associated proteins, *Int. J. Oncol.* 31 (6) (2007) 1465–1472.
- [43] L. Perez-Silva, R. Al-Abdulla, R.A. Espinosa-Escudero, E. Lozano, E. Herraez, R.I.R. Macias, N. Segues, M. Abad, O. Briz, L. Bujanda, J.J.G. Marin, Papel de las proteínas exportadoras de fármacos ABCC4 y ABCC5 en la quimiorresistencia del cáncer gástrico, *Gastroenterol. Hepatol.* 42 (2019) 201.

CONCLUSIONS

First conclusion:

The active expulsion of drugs from tumor cells via ABC superfamily export proteins constitutes one of the main causes of the MDR phenotype characteristic of ACG. Among these pumps, MRP1 and MRP4 are the most highly expressed in the plasma membrane of GAC cells, making them potential targets for the development of sensitizing strategies to improve the efficacy of drug treatment against gastric cancer.

Second conclusion:

The administration of commonly used drugs, which are able to inhibit MRP pumps, such as diclofenac, could be an effective therapeutic approach for the treatment of GAC by enhancing the effect of tyrosine kinase inhibitor drugs such as sorafenib, which are not currently used due to their poor efficacy against gastric cancer

Third conclusion:

Using a model of MRP4 overexpression in human embryonic kidney, HEK-293T cells, it has been possible to demonstrate that this pump is able to expel antitumor drugs such as methotrexate and panobinostat and other drugs used in the first and second-line treatment of GAC, such as 5-fluorouracil, anthracyclines and irinotecan derivatives. This, together with the high levels of MRP4 expression that we have found in samples obtained from patients with gastric cancer, suggests an important role of this pump in GAC chemoresistance.

Fourth conclusion:

Using CRISPR/Cas9-based programmed genomic editing technology, *in vitro* models have been generated by knockdown of MRPs protein expression in gastric cancer-derived AGS cells. These models constitute a useful tool to evaluate the role of each of the pumps individually while avoiding interference from the activity of other MRPs.

Fifth conclusion:

Using AGS cells with endogenous expression of MRP4, but permanently silenced both, MRP1 and MRP3 by CRISPR-Cas9, curcumin, a naturally polyphenol, and indomethacin, a non-steroidal anti-inflammatory drug, have been shown to be effective inhibitors of MRP4 activity. As a consequence, curcumin and indomethacin may sensitize AGS cells to the cytostatic effect of antitumor drugs substrates of this pump.

Sixth conclusion:

The study of the relationship between tumor suppressor silencing by CRISPR-Cas9, the changes occurring in the resistome and their impact on chemoresistance has revealed that loss of *TP53* and *PTEN* expression, but not *ARID1A*, reduces the response of GAC cells to antitumor drugs used in the treatment of gastric cancer, which is not due to changes in the expression of ABC proteins but of the genes *UGT1A*, involved in drug metabolism, and *CD44*, related to a phenotype of increased malignancy.

Objetivos

Introducción

Materiales y
Métodos

Resultados y
Discusión

Conclusiones

Bibliografía

English Summary